



МИКРОСКОПИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ. ОБНАРУЖЕНИЕ ЧАСТИЦ НАНОМЕТРОВОГО РАЗМЕРА

А.Гаскаров, И.Яминский, д.ф.-м.н. / yaminsky@nanoscopy.ru

Наиболее известные методы наблюдения наночастиц – электронная и сканирующая зондовая микроскопия. К достоинствам электронной микроскопии можно отнести прямое представление изображения, высокую скорость сканирования, совмещение с различными приставками. Однако она требует работы только с образцами, помещенными на подложку и в вакуум. Также в случае непроводящих образцов необходимо учитывать влияние пространственного заряда.

В случае сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) возможны работа в воздушной и в водной среде, разрешение лучше единиц нанометра, исследования вязко-упругих свойств объектов и манипулирование ими. Недостатки – малая площадь и скорость сканирования, небольшой ресурс зонда высокого разрешения, артефакты вследствие изменения его формы. Возможность работы в жидкой среде ограничена снижением добротности кантилевера и сложностью закрепления объектов на подложке.

Современный СЗМ, в частности, СЗМ ФемтоСкан может выполняться в компактном варианте, обеспечивая предельное разрешение в сотые и тысячные доли нанометра [1]. Он позволяет увидеть размеры и форму отдельных наночастиц (рис.1), характерный диаметр которых – 17 нм, длина фрагментов варьируется от десятков до сотен нанометров.

Существует также широкий спектр доступных и точных методов обнаружения нанометровых частиц. К ним относятся:

- анализ траектории наночастиц (АТН) – Nanoparticle Tracking Analysis (NTA);
- динамическое рассеяние света (ДРС) – Dynamic Light Scattering (DLS);
- микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (МПЦИ) – stimulation emission depletion (STED);

MICROSCOPY IN CLINICAL DIAGNOSTICS. DETECTION OF PARTICLES OF A NANOMETER SIZE

A.Gaskarov, I.Yaminsky, D.Sc. / yaminsky@nanoscopy.ru

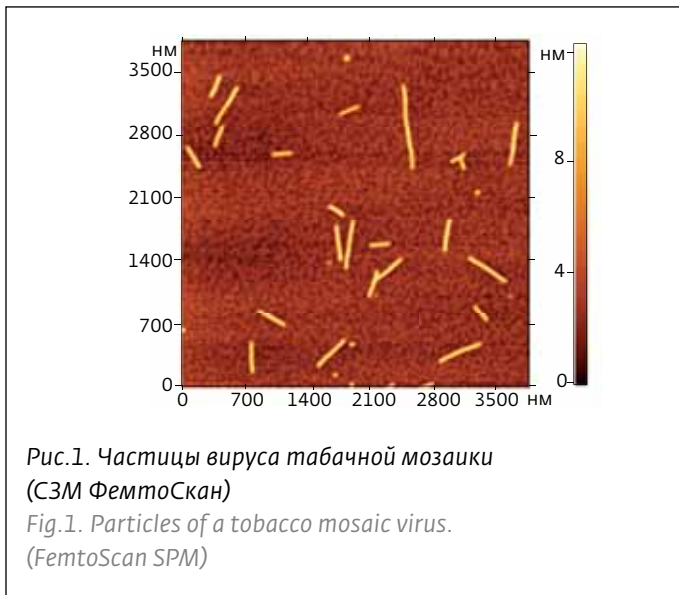
The most well-known methods of observation of nanoparticles are provided by the electronic and scanning probe microscopy. Among the advantages of the electronic microscopy could be mentioned a direct image presentation and high speed of scanning, and combination with various attachments. However, it can operate only with the samples placed on a substrate and in vacuum. Besides, in case of nonconductive samples it is necessary to take into account the influence of a space charge.

A scanning probe microscope (SPM) can work in an air or water environment, have resolution better than units of a nm, ensure research of viscous-elastic properties of objects and manipulation of them. Disadvantages: a small area and low speed of scanning, a short service life of a high resolution probe, occurrence of artifacts because of its changing form. Possibility of operation in a liquid environment is limited by a quality decrease of a cantilever and complexity of fastening of objects on a substrate.

A modern SPM, in particular, FemtoScan SPM can be made in a compact version, ensuring an extremely high resolution of a 100th and even thousandth share of a nm [1]. The microscope allows us to see the sizes and forms of separate nanoparticles (Fig.1). Typical diameter of such particles is 17 nm, and the length of their fragments varies from tens up to hundreds of nm.

There is also a wide range of available and precise methods for detection of the nanometer particles. Among them are:

- Nanoparticle Tracking Analysis (NTA),
- Dynamic Light Scattering (DLS),
- Stimulation emission depletion (STED),
- Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM),
- Photoactivated Localization Microscopy (PALM),
- Tunable Resistive Pulse Sensor (TRPS),
- Differential Centrifugal Sedimentation (DCS),
- Transmission Electron Microscopy (TEM),



- стохастическая оптическая микроскопия (СОМ) – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM);
- фотоактивационная микроскопия (ФАМ) – Photoactivated Localization Microscopy (PALM);
- импульсное перестраиваемое резистивное зондирование (ПРИЗ) – Tunable Resistive Pulse Sensor (TRPS);
- дифференциальная седиментация центробежными силами (ДСЦМ) – Differential Centrifugal Sedimentation (DCS);
- просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) – Transmission Electron Microscopy (TEM).

В работе [2] сравнивались методы ПРИЗ, АТН, ДСЦМ, ДРС и просвечивающая электронная микроскопия. ПРИЗ и ДСЦМ обеспечили наибольшую разрешающую способность и точность, а также позволили выделить с точностью до 5% максимумы пиков 220, 330 и 410 нм всех трех частиц, присутствующих в смешанном образце. АТН и ДРС менее чувствительны и не позволили выявить эти различия.

АНАЛИЗ ТРАЕКТОРИИ НАНОЧАСТИЦ (АТН)

Метод АТН в виде прибора реализован компанией Nanosight (Великобритания) (рис.2). В его основе лежит наблюдение за броуновским движением отдельных частиц [3]. Это позволяет использовать принцип для измерения их размера в коллоидных растворах, интенсивности рассеяния и концентрации каждой фракции. Программа дает возможность выделять центры наночастиц, прорисовывать траектории их движения,

In [2] TRPS, NTA, DCS, DLS methods and TEM were compared. TRPS and DCS ensured a resolution sufficient for revealing of all particles present in a multimodal sample and also allowed to determine with up to 5 % accuracy the maxima of peaks 220, 330 and 410 nm of all three particles present in a mixed sample. NTA and DLS appeared to be less sensitive and could not reveal these distinctions.

NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)

The method of NTA in the form of an instrument was realized by Nanosight Co. (Great Britain). It is based on observation of the Brownian movement of separate nanoparticles [3]. This allows to use the given principle for measuring their size in the colloidal solutions, the intensity of scattering and concentrations of each of the fractions.

The program allows to single out the centers of nanoparticles, to track their movement, to calculate the size of each observed particle, for which also the intensity of light scattering is determined.

Particle distribution analysis presented on "Size-Intensity" diagram allows to interpret the results in a broader way. If points on it do not lay down on the power function, but are grouped in certain areas, this means that the investigated sample [4] has a more complex composition.

An important sphere of application of NTA is analysis of the virus and virus-like particles [6], including for production of vaccines. NTA is also being developed actively for the analysis of exosomes and microvesicles in clinical diagnostics [7]. Application of fluorescently marked antibodies against proteins [8] on the surface of bionanoparticles and a fluorescent mode of the instrument allow to measure the total number and the sizes of exosomes, as well as selectively marked fractions. Advantages of the method: obviousness, simplicity, short measurement time, absence of complex sample preparation procedures, acceptable price, low cost of the consumables.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

DLS) makes possible to determine a diffusion factor of the particles dispersed in a liquid. From this factor a radius of nanoparticles is calculated (Fig.3).

Due to the Brownian movement of the dispersed particles or macromolecules in a liquid their concentrations are fluctuated. As a result they have local heterogeneity of the refraction index and fluctuation of the intensity of a scattered light, when a laser beam goes through such an environment.

The factor of the particles' diffusion is inversely proportional to the typical time of relaxation of the



рассчитывать размер каждой частицы, для которой также определяется интенсивность рассеяния света.

Анализ распределения частиц на графике "Размер-Интенсивность" позволяет расширенно интерпретировать результаты. Если точки на нем не ложатся на степенную функцию, а группируются в определенных областях, это означает более сложный состав исследуемого образца [4].

Значимая область применения АТН – анализ вирусных и вирусоподобных частиц [6], в том числе при производстве вакцин. Активно развивается АТН для анализа экзосом и микровезикул в клинической диагностике [7]. Использование флуоресцентно-меченых антител против белков [8] на поверхности бионаночастиц и флуоресцентного режима прибора позволяет измерять общее число и размеры экзосом, а также селективно-меченой фракции. Достоинства метода: наглядность, простота, малое время измерений, отсутствие сложных процедур подготовки образцов, приемлемая стоимость, низкая цена расходных материалов.

ДИНАМИЧЕСКОЕ РАССЕЯНИЕ СВЕТА (ДРС)

ДРС позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости. Из этого коэффициента рассчитывается радиус наночастиц (рис.3).

Вследствие броуновского движения дисперсных частиц или макромолекул в жидкости происходят флуктуации их концентрации. Результатом являются локальные неоднородности показателя преломления и флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении через такую среду луча лазера.

Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Гидродинамический радиус частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, связывающей их размер с вязкостью жидкости и коэффициентом диффузии.

Достоинства ДРС [9]: возможность работы в жидкой среде в условиях близких к естественным, простота пробоподготовки, оперативное получение распределения наночастиц по размерам, отсутствие воздействия на объект, простота эксплуатации, зависимость интенсивности рассеянного света от размера взвешенных частиц, обеспечивающая достаточно точное измерение распределение тяжелых частиц на фоне мелких.

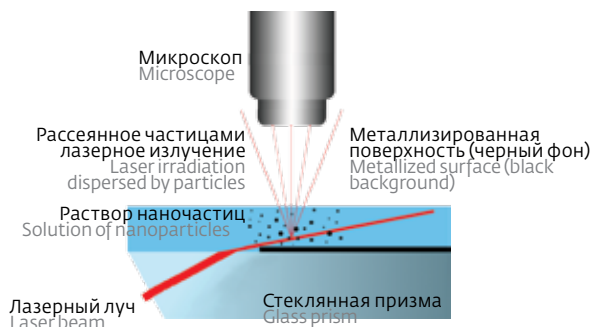


Рис.2. Установка для обнаружения наночастиц по методу АТН [4]

Fig.2. Installations for detection of nanoparticles by NTA method [4]

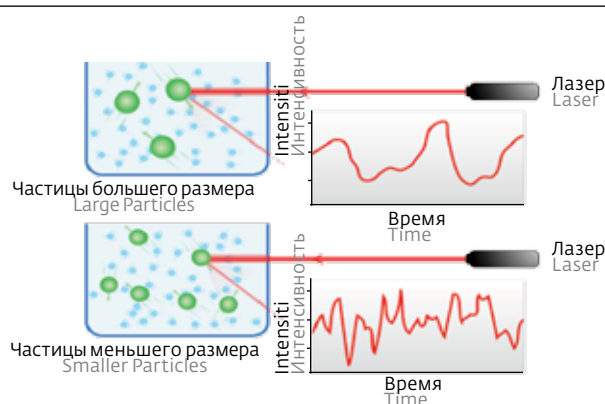


Рис.3. Гипотетическое ДРС в двух вариантах: частицы большего и меньшего размеров [9]

Fig.3. Hypothetical DLS in two versions: particles of a bigger size, of a smaller size [9]

fluctuations of the intensity of a diffused light. The hydrodynamic radius of the particles is calculated under the formula of Stocks-Einstein linking their size with the viscosity of a liquid and the diffusion factor.

Advantages of DLS [9]: possibility of operation in a liquid environment in the conditions close to natural, simplicity of preparation of samples, quick results of distribution of particles by size, no impact on the investigated objects, simplicity in operation, dependence of the intensity of the scattered light on the size of the suspended particles allows to measure accurately enough the distribution of the heavy particles on the background of the light ones.

Disadvantages: impossibility to determine the form of objects and artifacts in case of complex form objects, necessity to select a solvent matching the hydrophobic nanoparticles, the dependence of the intensity of the scattered light on the size of the suspended particles impedes measurement of the light particles on the background of the heavy ones, which means



Недостатки: невозможность определения формы объектов, артефакты при наличии объектов сложной формы, необходимость подбора растворителя для гидрофобных нанопорошков, зависимость интенсивности рассеянного света от размера взвешенных частиц, затрудняющая измерение легких частиц на фоне тяжелых.

МИКРОСКОПИЯ НА ОСНОВЕ ПОДАВЛЕНИЯ СПОНТАННОГО ИСПУСКАНИЯ (МПСИ)

МПСИ – разновидность люминесцентной микроскопии (рис.4). Молекулы красителя возбуждаются лазерным пятном минимального размера. На краях этого пятна возбуждение молекул тушится. С помощью дополнительного импульса лазера кольцевой формы, настроенного на длину волны люминесценции красителя, происходит испускание им фотона. После этих двух импульсов регистрируется свечение возбужденных молекул в центре пятна [11].

СТОХАСТИЧЕСКАЯ ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ (СОМ)

В методе используется последовательное возбуждение молекул, окрашивающих объект флуорофоров. Каждая молекула представлена в виде дифракционного пятна. Это возможно при использовании возбуждающего излучения малой мощности, статистически достоверно возбуждающего малую часть присутствующих флуорофоров. Такой подход позволяет определять локализацию каждой флуоресцентной молекулы с нанометровой точностью. Повторяющиеся импульсы дают возможность определить положение всех молекул, что при наложении создает изображение с крайне высоким разрешением и их точными координатами.

Вследствие малого времени экспозиции и высокой частоты кадров СОМ можно использовать для наблюдения динамических процессов в живых клетках. Трудность при получении их изображений – сферические aberrации и рассеяние света в ткани. Это является причиной потери фотонов каждого флуорофора и снижения точности локализации. Решением проблемы может стать использование первичных меток и яркого переключаемого флуорофора, излучающего в дальнем красном спектре. СОМ – удобный инструмент для определения локализации рецепторов на нейронах, молекул внеклеточного матрикса мозга в синаптических и перисинаптических областях нейронов, что

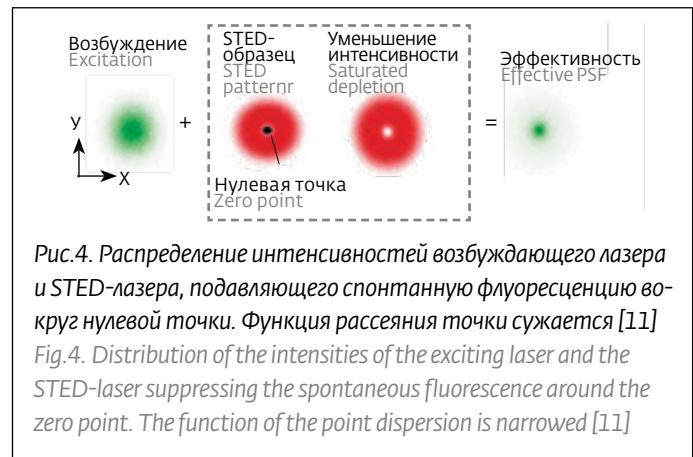


Рис.4. Распределение интенсивностей возбуждающего лазера и STED-лазера, подавляющего спонтанную флуоресценцию вокруг нулевой точки. Функция рассеяния точки сужается [11]

Fig.4. Distribution of the intensities of the exciting laser and the STED-laser suppressing the spontaneous fluorescence around the zero point. The function of the point dispersion is narrowed [11]

that the instrument should have unique technical characteristics.

МИКРОСКОПИЯ НА ОСНОВЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ ЭМИССИИ ПОДАВЛЕНИЯ (STED)

STED is a version of a luminescent microscopy (Fig.4). Dye molecules are excited by a laser spot of a minimum possible size. At the edges of this spot the excitation of the molecules is specially extinguished. With the help of an additional impulse of a ring form laser tuned to the length of the wave luminescence, a photon is emitted by them. After these two impulses a luminescence is registered of the excited molecules, which remained in the centre of the spot [11].

СТОХАСТИЧЕСКАЯ ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ (STORM)

The method uses a consecutive excitement of the molecules, which dye the object of the phosphors. Each molecule is presented in the form of one diffraction spot. This is possible, in particular, when an exciting radiation of low power is used, which statistically surely excites a small part of the phosphors present in an object. Such an approach allows to localize each fluorescent molecule with a nanometric accuracy. The repeating impulses make possible to determine the positions of all the molecules, which, when superimposed, create an image with the highest resolution and exact co-ordinates.

Due to a short time exposition and high frequency of frames, STORM can be used for observation of the dynamic processes in the living cells. The problem with obtaining of images of the nanoscopic structures of the living cells is created by the spherical aberrations and light scattering in a tissue. This is the reason explaining the loss of the photons of every phosphor, and, hence, decrease of the accuracy of a localization. A solution can be application as an initial mark of a



вносит значительный вклад в понимание их функций [12].

ФОТОАКТИВАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ (ФАМ)

В методе используются оптические метки (например, флуоресцентные белки), положение которых определяется оптическим микроскопом с точностью в единицы нанометра. О структуре объекта судят по расположению на нем оптических меток, которые можно рассматривать как точечные источники света. Аналогичным методом микроскопии сверхвысокого разрешения является СОМ. Оба они основаны на одинаковом принципе. Различие состоит в применении различных оптических меток. В ФАМ применяются, как правило, флуоресцентные белки, в СОМ – циановые красители [12].

ИМПУЛЬСНОЕ ПЕРЕСТРАИВАЕМОЕ РЕЗИСТИВНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ (ИПРЗ)

ИПРЗ обеспечивает высокое разрешение пропускной способности для одной частицы, когда она проходит через нанопору, размер которой может изменяться. Используется резистивное импульсное зондирование, позволяющее контролировать ток через отверстие, в сочетании с перестраиванием нанопор. Это позволяет проходить ионному току и регулировать прохождение одной частицы при изменении размера пор. Метод дает возможность определять частицы в сложной смеси, в соответствии с размерами частиц оптимизировать диаметры пор, улучшать точность измерений. В сочетании с мелкомасштабным контролем давления ИПРЗ позволяет определять концентрацию частиц, точную их электрофоретическую подвижность и поверхностный заряд [13]. Измерение дает детальное определение размера частиц, их концентрации, взаимодействия, дзета-потенциала. Метод применяется при исследовании доставки лекарств, в вирусологии, биомедицинской диагностике, микробиологии [14].

В целом существует достаточно большое количество методов, помогающих увидеть микромир. Они отличаются относительно небольшой стоимостью, простотой в использовании и наглядностью. Существует возможность достаточно быстрого измерения многих параметров. Эти методы активно используются в клинической диагностике, доставке лекарств, определении локализации различных рецепторов. Можно надеяться, что скоро появятся методы, позволяющие получить новые знания о наномире, о которых исследователи ранее и не задумывались.

bright tunable phosphor, emitting light in a remote red spectrum. STORM is a convenient instrument for localization of the receptors on neurons and the molecules of a brain's territorial matrix in the synaptic and perisynaptic areas of the neurons. All this makes an important contribution to understanding of their functions [12].

PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY (PALM)

The method uses optical marks (for example, fluorescent proteins), the position of which is determined by an optical microscope with the accuracy of several nm. An object structure is judged by the arrangement on it of optical marks, which can be considered as dot light sources. A similar method of microscopy of an ultrahigh resolution is STORM. Both of them are based on an identical principle. The difference between the methods consists in primary application of various optical marks. As a rule in PALM fluorescent proteins are applied, and in STORM – cyanic dyes [12].

TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSOR (TRPS)

TRPS ensures a high resolution of a conducting capacity for one particle when it passes through a nanopore, the size of which can change. The method uses a resistive pulse probing, permitting to control a current through an aperture, in a combination with the technology of tunable nanopores. It is possible to conduct an ionic current and control the passage of one particle with the size of a pore controlled. The method makes possible to detect a particle after a particle in a complex mix, and in accordance with the sizes of the particles to optimize the diameters of the pores and to improve the accuracy of measurements. In a combination with a small-scale control of pressure TRPS allows to determine concentration of particles, their exact electrophoretic mobility and a surface charge [13]. Measurement ensures a detailed determination of the sizes of particles, their concentration, interaction and zeta-potential. The method is applied for research of delivery of medicines, in virology, biomedical diagnostics and microbiology [14].

As a whole there are a sufficient number of methods helping to see a microcosm. All of them are distinguished by a small cost, simplicity in operation and visualization. Already today, they give a chance to measure quickly enough the sizes of particles, their concentration, speed, zeta-potential and many other things. These methods are used actively in clinical diagnostics, delivery of medicines and localization of various receptors. It is quite possible that soon such methods opening way to new knowledge will be available, which were unthinkable before.



Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (Федеральная целевая программа, шифр 2013-1.2-14-512-0011. Поисковые НИР по теме "Создание научных основ повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики", Технологическая платформа "Медицина будущего"), Госконтракт 14.512.11.0026.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://en.nanoscopy.ru/equipment/femtoscan>
2. **Anderson W. et al.** A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size. – Journal of Colloid and Interface Science, 2013. – Режим доступа: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979713001756.
3. **Федосов И.В., Нефедов И.С., Хлебцов Б.Н., Тучин В.В.** Измерение коэффициента диффузии наночастиц методом микроскопии селективного планарного освещения – Оптика и спектроскопия, 2009, т.107, №6, 894–900.
4. http://ru.wikipedia.org/wiki/Анализ_траекторий_наночастиц.
5. www.nanoindustry.su/journal/article/3003
6. **Kendall K. et al.** Virus Concentration and Adhesion Measured by Laser Tracking. – Journal of Adhesion., 2010, v.86, №10, p.1029–1040.
7. **Sokolova V. et al.** Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. – Colloids Surf., 2011, v.87, №1, p.146–148.
8. **Filipe V., Hawe A., Jiskoot W.** Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. – Pharmaceut. Res., 2010, v.27, №5, p.796–797.
9. http://ru.wikipedia.org/wiki/Динамическое_рассеяние_света.
10. <http://opticlub.net/lstdrs>
11. **Митрошина Е.В.** Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга. Электронное учебно-методическое пособие. – Н.Новгород: ННГУ, 2012.
12. zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html
13. www.izon.com/products/trps/tunable-resistive-pulse-sensing-trps
14. www.izon.com/products/qnano

The work was done with the support of the Ministry of Education and Science of the RF (Federal target program, code number 2013-1.2-14-512-0011) - the research works on this theme: «Creation of scientific bases for increasing the efficiency of the molecule-genetic diagnostics», Future Medicine Technological Platform), State contract 14.512.11.0026.

LITERATURE

1. <http://en.nanoscopy.ru/equipment/femtoscan>
2. **Anderson W. et al.** A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions / Journal of Colloid and Interface Science. – 2013. – Access mode: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979713001756>.
3. **I.V.Fedosov, I.S.Nefedov, B.N.Khlebtsov, V.V.Tuchin**, Measurement of the nanoparticles' diffusion factor by the method of microscopy of a selective planar illumination. Optics and Spectroscopy, v. 107, № 6, 894-900 (2009).
4. http://ru.wikipedia.org/wiki/Nanoparticle_Tracking_Analysis
5. <http://www.nanoindustry.su/journal/article/3003>
6. **Kendall K. [et al.]**. Virus Concentration and Adhesion Measured by Laser Tracking // Journal of Adhesion. – 2010. – Vol.86, №10. – P.1029-1040.
7. **V.Sokolova V. [et al.]**. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy // Colloids Surf., – 2011. – Vol.87, № 1. – p.146-148.
8. **Filipe V., Hawe A., Jiskoot W.** Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates // Pharmaceut. Res., – 2010. – Vol.27, № 5. – P.796-797.
9. http://ru.wikipedia.org/wiki/Dynamic_Light_Scattering
10. <http://opticlub.net/lstdrs>
11. **Mitroshina E.V.** Optical Imaging in Application to the Research of Neurobiological Brain Systems. Electronic Teaching-methodical Manual. – N.Novgorod: NNGU, 2012. – 40 p.
12. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>
13. <http://www.izon.com/products/trps/tunable-resistive-pulse-sensing-trps>
14. <http://www.izon.com/products/qnano>