

# **Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.**

**Алексей Валерьевич Феофанов**

***Кафедра биоинженерии***

***Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова***

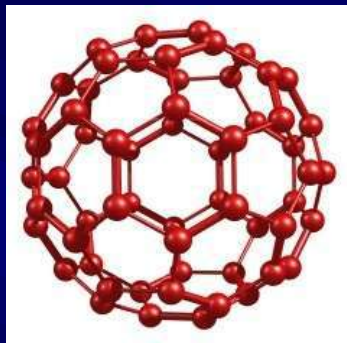
***Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии  
биомолекул***

***ИБХ РАН***

**Лекция № 7**

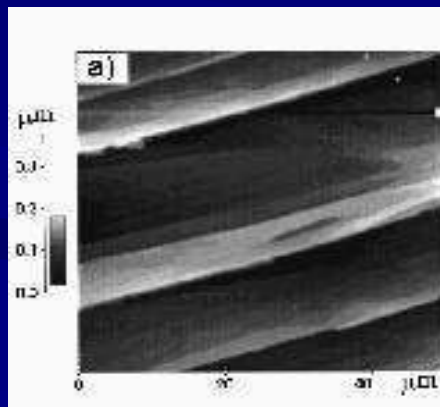
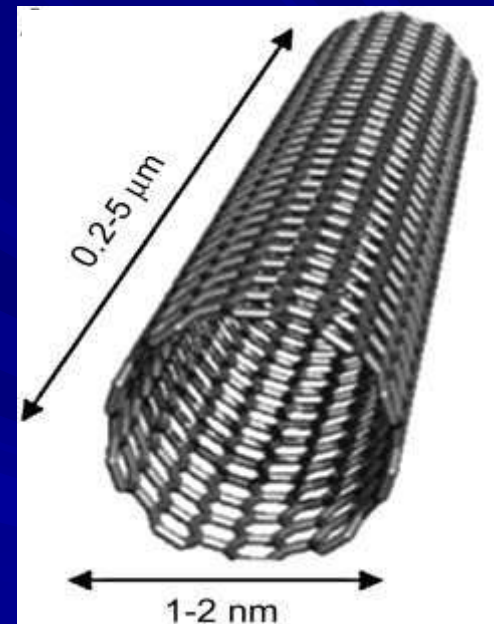
# Наноматериалы –

это материалы с характерными размерами  
менее 100 нм



↑  
1 нм  
↓

наночастицы  
нановолокна  
нанопленки

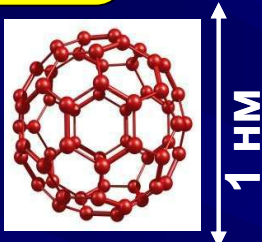


# ВИДЫ наноматериалов

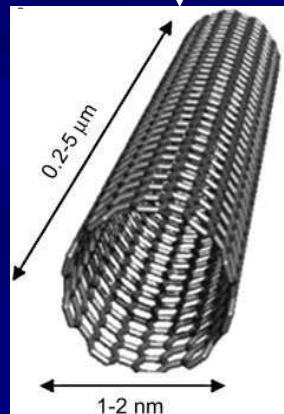
на основании форм-фактора

на основании химического состава

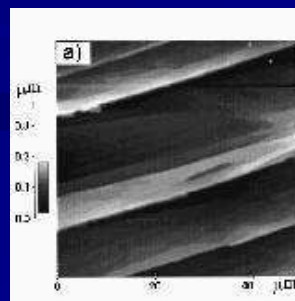
наночастицы



нанотрубки,  
нановолокна



нанопленки,  
нанопокрyтия



металлические  
*Au, Ag, Pt, Pd,  
Ru, Ni, Cu*

оксиды металлов и  
неметаллов  
*SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>,  
ZnO, MoO<sub>3</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, PbO,  
Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NiO*

полупроводниковые  
*CdS, CdSe, PbS,  
PbTe, GaN, GaAs,  
InN*

углеродные  
*C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>*  
нанотрубки

органические  
полимеры  
дендримеры

наноглины  
*{[Si<sub>n</sub>Al<sub>m</sub>]Mg<sub>j</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>  
x Na<sub>k</sub> K<sub>k</sub> или Ca<sub>k</sub>}*

## Годовое производство некоторых видов наночастиц

Различные фуллерены	> 500 т/год
Одностенные и многостенные углеродные нанотрубки	> 100 т/год
Наночастицы серебра	> 500 т/год
Наночастицы кремния и диоксида кремния	> 100 000 т/год
Диоксид титана	> 5 000 т/год
Оксид церия	> 10 000 т/год
Оксид цинка	> 20 т/год

Число наночастиц размером 20 нм в 1 миллиграмме примерно такое же, как число клеток в организме взрослого человека.

# **Виды потребительской продукции, в состав которой входят наночастицы**

- лакокрасочные материалы**
- очистка воды**
- солнечные батареи**
- фармацевтика**
- косметика**
- текстиль**
- пищевые продукты**

# Количество видов потребительской продукции, в состав которой входят наночастицы

Количество  
наименований товаров

наночастицы серебра	> 240
фуллерены	> 70
диоксид титана	> 40
нанокремний	> 30
цинксодержащие	> 30
нанозолото	> 16

**Возможное накопление наночастиц в живых организмах вызывает опасение из-за не изученных эффектов, которые эти наночастицы могут вызывать**

**Причины накопления наночастиц в биообъектах:**

**активное развитие наноиндустрии;**

**загрязнение наноматериалами окружающей среды;**

**использования наночастиц в продуктах бытового назначения;**

**разработка лекарств и наносистем доставки лекарств к молекулярным и клеточным мишеням.**



## **Что нас настораживает в свойствах наночастиц с точки зрения биобезопасности:**

**повышенная проницаемость клеток, тканей, т.н. биологических барьеров для наноразмерных частиц;**

**возможное изменение или усиление отдельных свойств материалов в форме наночастиц по сравнению с микрочастицами и макроматериалами.**

**В частности, резкое увеличение площади поверхности материалов в наноразмерной форме;**  
**увеличение числа дефектов кристаллической структуры на поверхности наночастиц;**  
**увеличение адсорбционной емкости материалов в наноразмерной форме.**



**Нужны методы, позволяющие обнаруживать, идентифицировать, выявлять локализацию и распределение наночастиц в биообъектах**

**составная часть системы биомониторинга и системы оценки рисков и контроля безопасности наноматериалов для человека, животных и растений;**

**полезный инструмент, помогающий в разработке наносистем доставки лекарств.**

# Методы изучения наночастиц

**Форма и размер наночастиц:** методы сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), просвечивающей и растровой электронной микроскопии (ПЭМ, РЭМ);

**Распределение наночастиц по размерам:** СЗМ, ПЭМ, РЭМ, методы фракционирования в поперечном поле сил, гидродинамическая и эксклюзионная хроматография, ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние, масс-спектрометрия единичных частиц;

**Химический состав наночастиц:** ЯМР, фотоэлектронная спектроскопия, рентгеноструктурный анализ, электронная Оже-спектроскопия, атомно-абсорбционный анализ, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, аналитическая электронная микроскопия, включая энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДС) и спектроскопию характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ).

# Методы изучения наночастиц

**Установление структуры наночастиц:** ПЭМ, РЭМ, СЗМ, малоугловое нейтронное рассеяние и рентгеноструктурный анализ.

**Измерение поверхностного заряда:** капиллярный электрофорез, методы определения зета-потенциала (электрокинетического потенциала).

**Величина удельной поверхности наночастиц:** BET-метод (метод Брунауэра-Эммета-Теллера),

**Удельный объем пор на поверхности наночастиц:** метод Баррета-Джойнера-Халенды (Barrett-Joyner-Halenda method, BJH).

**Ситуация с выбором методов анализа  
значительно усложняется, если необходимо  
установить присутствие и локализацию  
экзогенных наночастиц в биологических  
образцах**

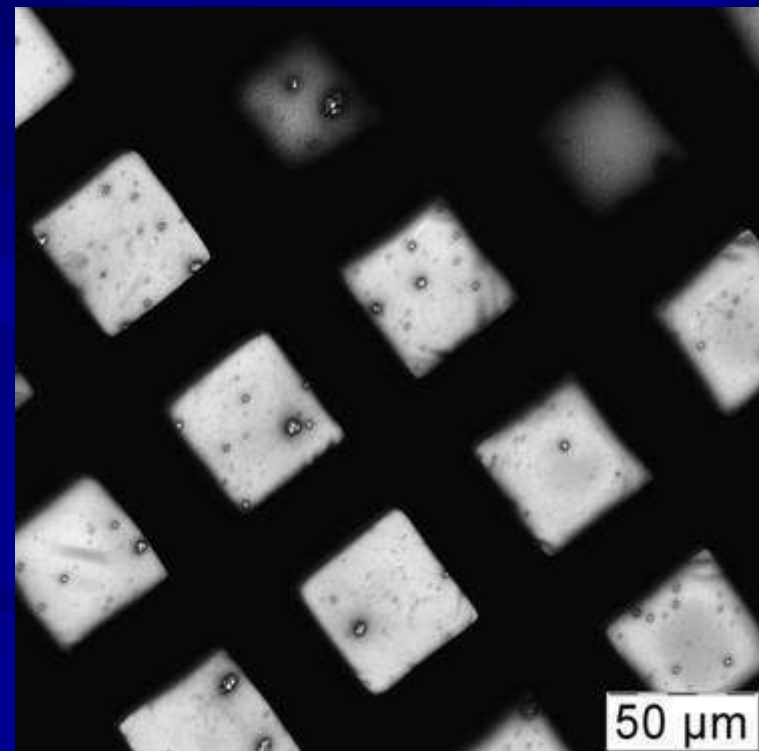
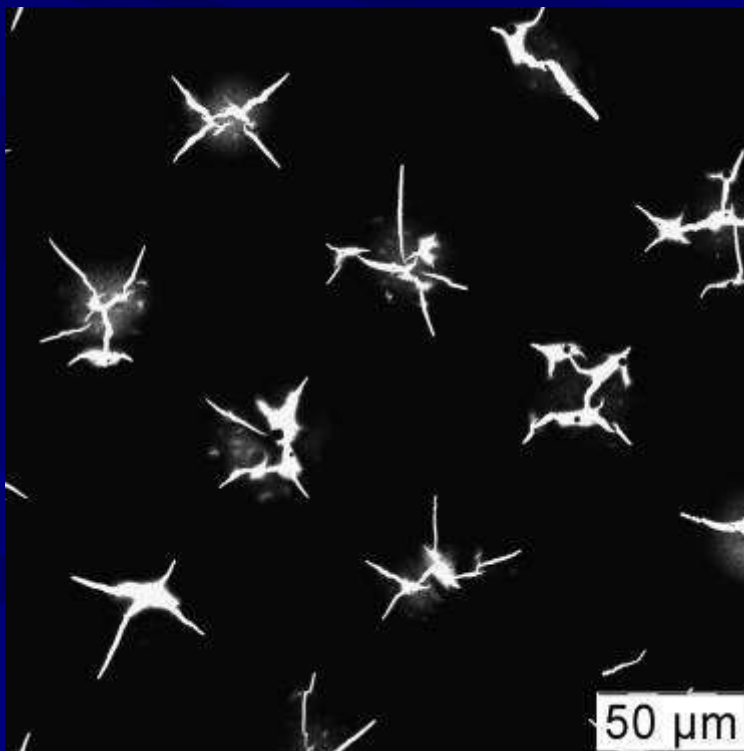
**Метод: просвечивающая электронная микроскопия**  
**Объект: наночастицы золота (35 нм) в сыворотке крови**

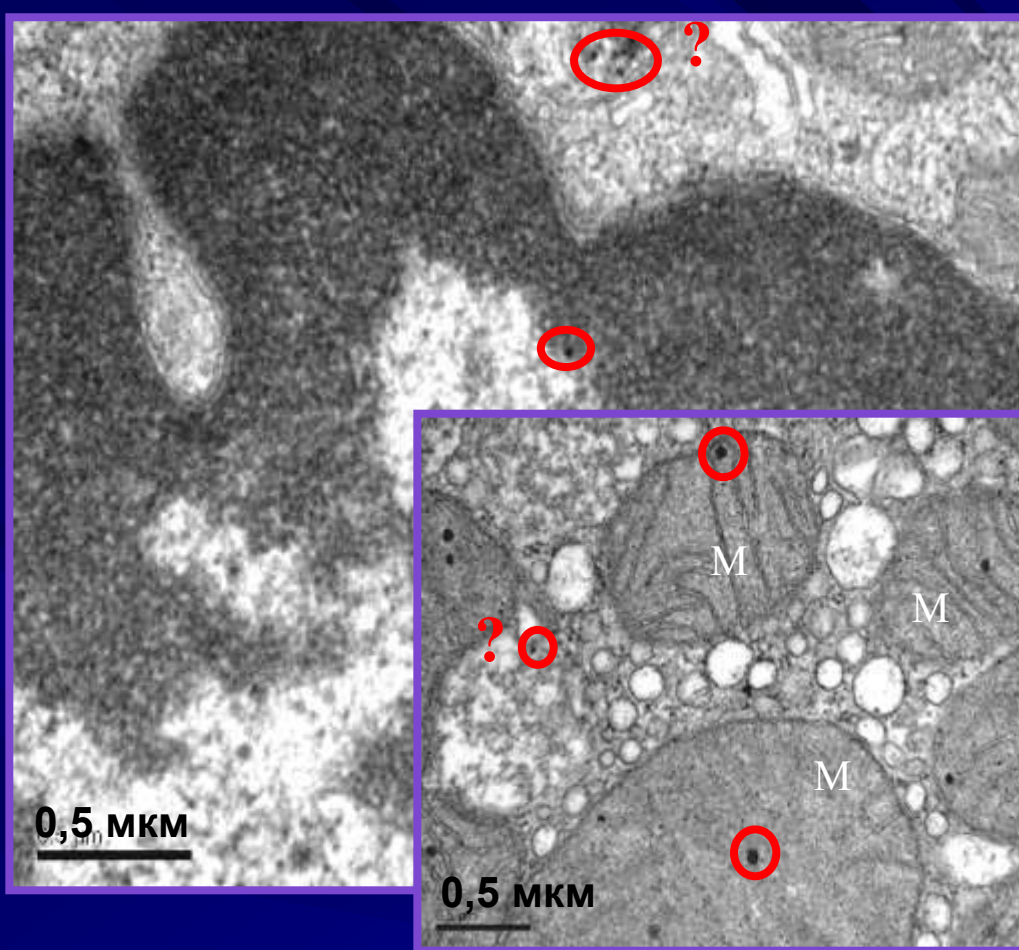
**Проблема:**

**сыворотка при высыхании образует электронно-плотный слой большой толщины, полностью маскирующий наночастицы**

**Решение:**

**–пробоподготовка включает обработку образца различными ферментами;**  
**– оптимизирована техника нанесения образца.**



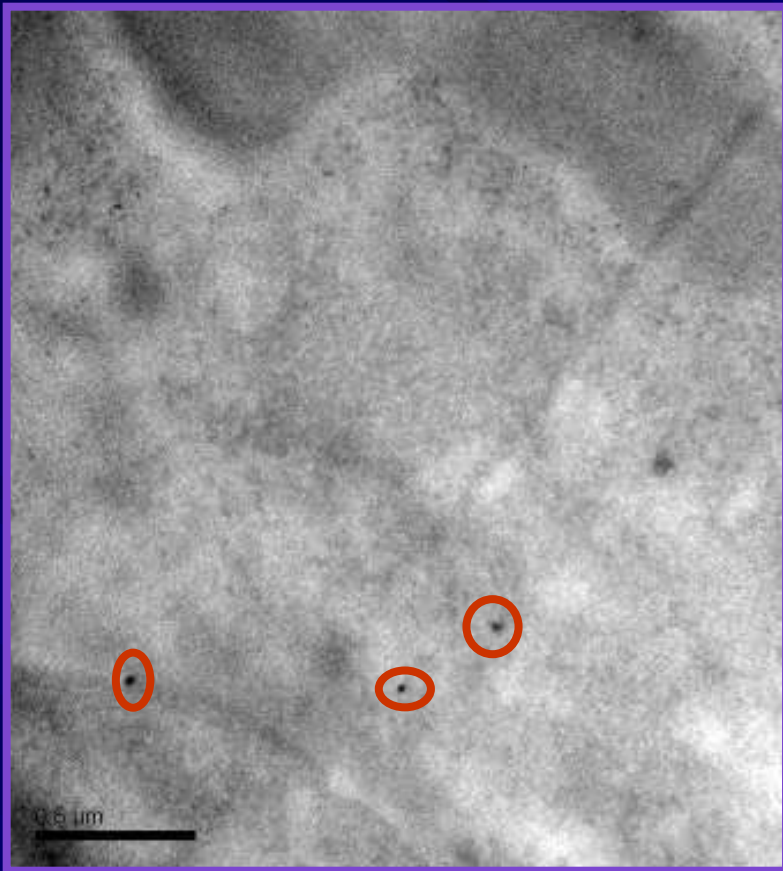


**наночастицы золота  
(12 нм) в срезах ткани  
лимфатического узла  
и эпителия почки  
мышы**

## **Проблема**

**соли тяжелых металлов маскируют наночастицы, интенсивно окрашивая определенные внутриклеточные структуры и включения, например, соли кальция (в митохондриях- М)**





**наночастицы золота (12 нм)  
в срезе ткани эпителия почки**

**для улучшения надежности и  
достоверность выявления  
наночастиц в срезах тканей и  
клетках методом ПЭМ**

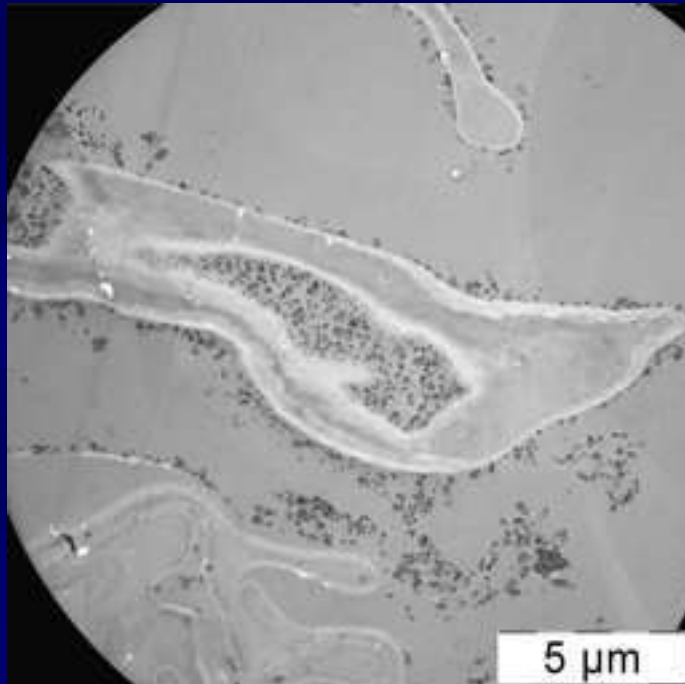
**исключить контрастирование с  
применением**

- OsO<sub>4</sub>**
- уранила ацетата**
- цитрата свинца**

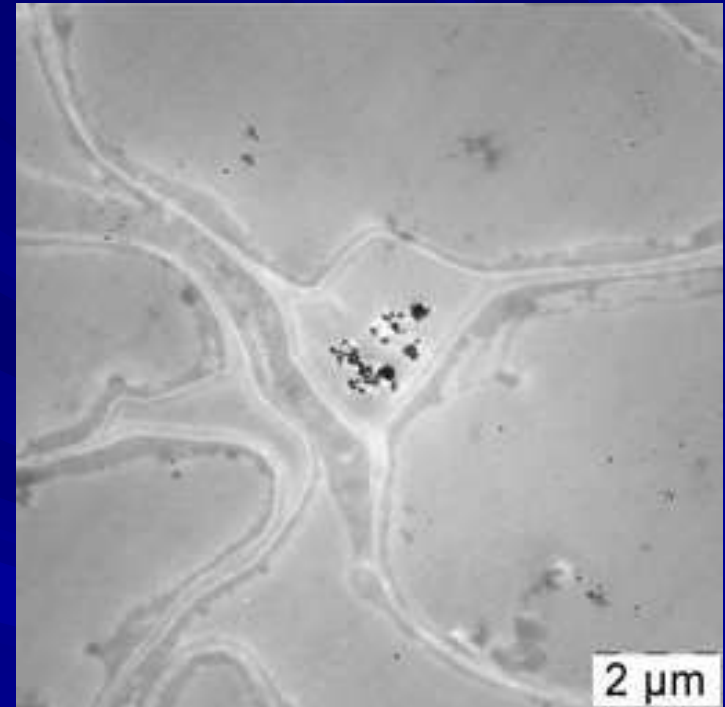
**Вместо фиксации и заливки  
образца в эпоксидные блоки  
можно использовать криостатные  
ультратонкие срезы**



**Детекция наночастиц оксида алюминия (<35 нм) в проростках  
риса. ПЭМ неконтрастированных срезов**



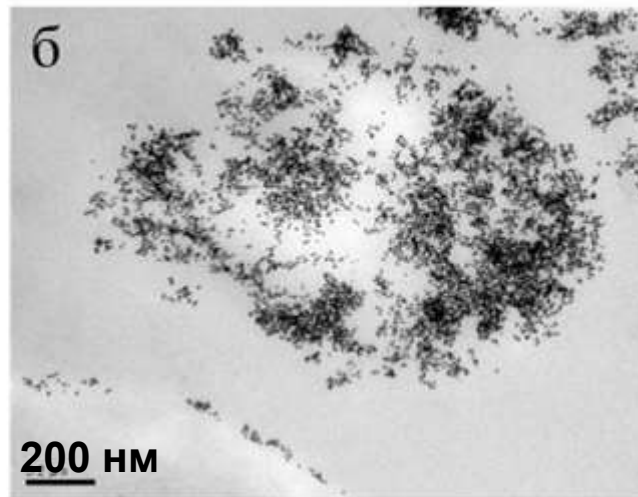
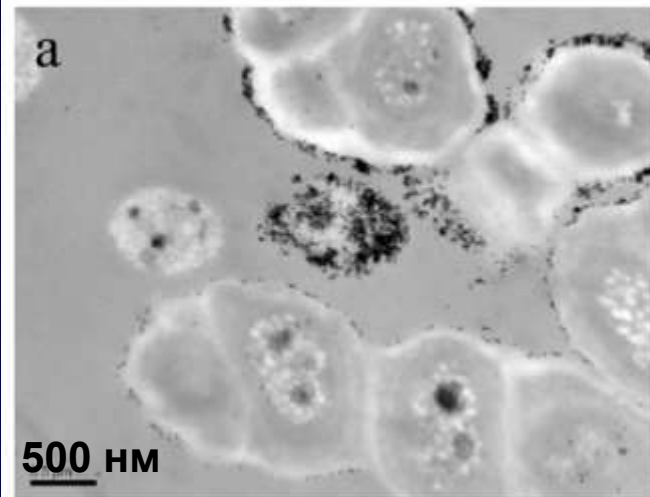
**Корень**



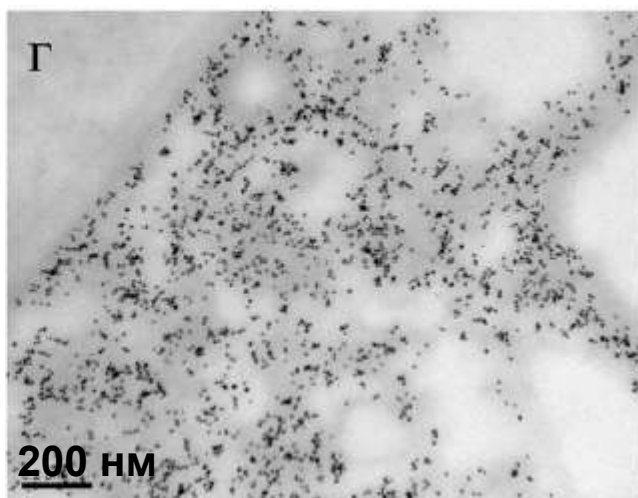
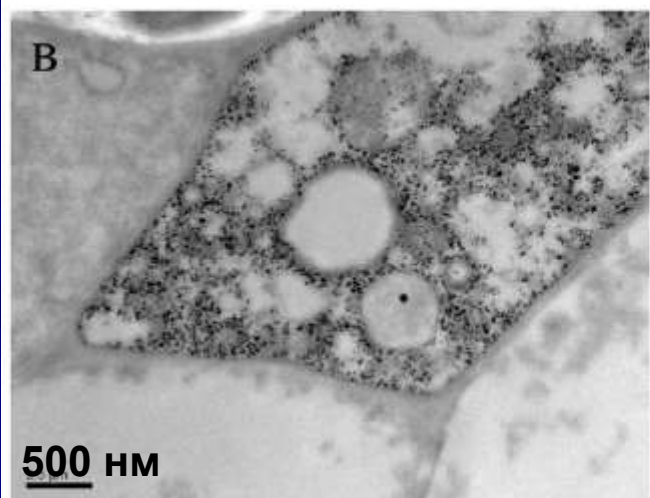
**Лист**

# Детекция наночастиц золота (7 нм) в различных органах и тканях проростков риса. ПЭМ неконтрастированных срезов

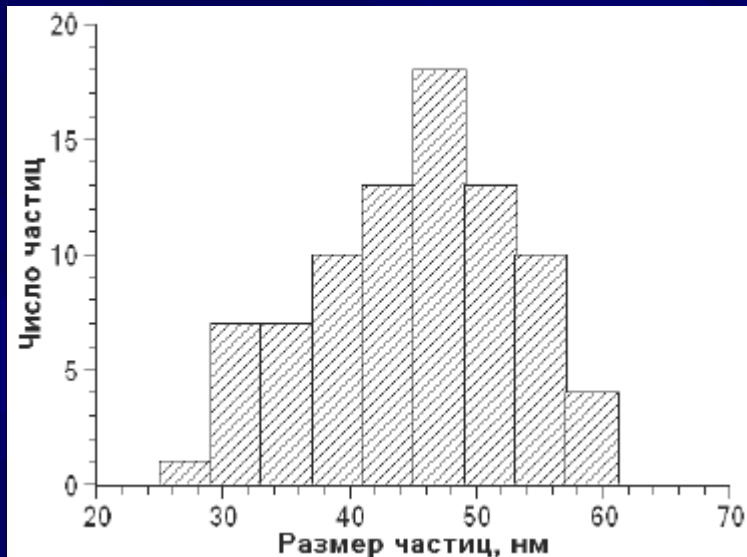
Клетки паренхимы колеоптиля



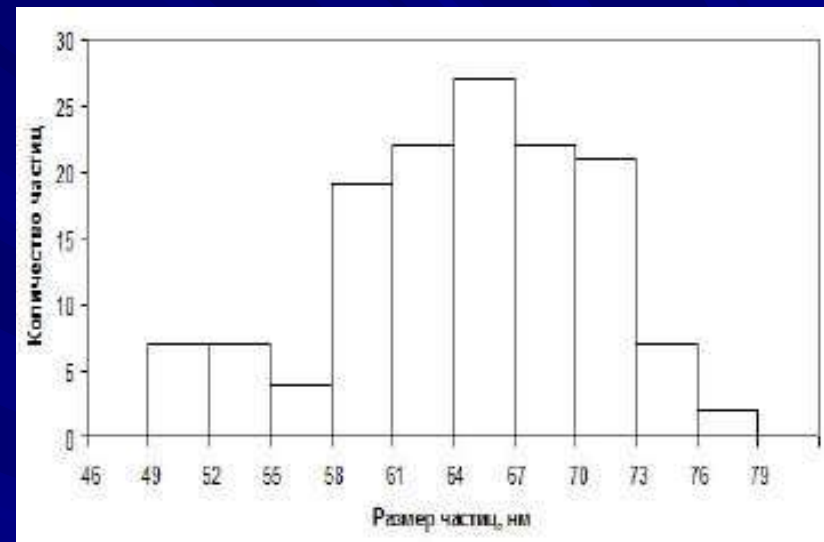
Обкладочные клетки в зоне перехода корня в стебель



# Анализ распределения наночастиц золота по размерам с использованием ПЭМ

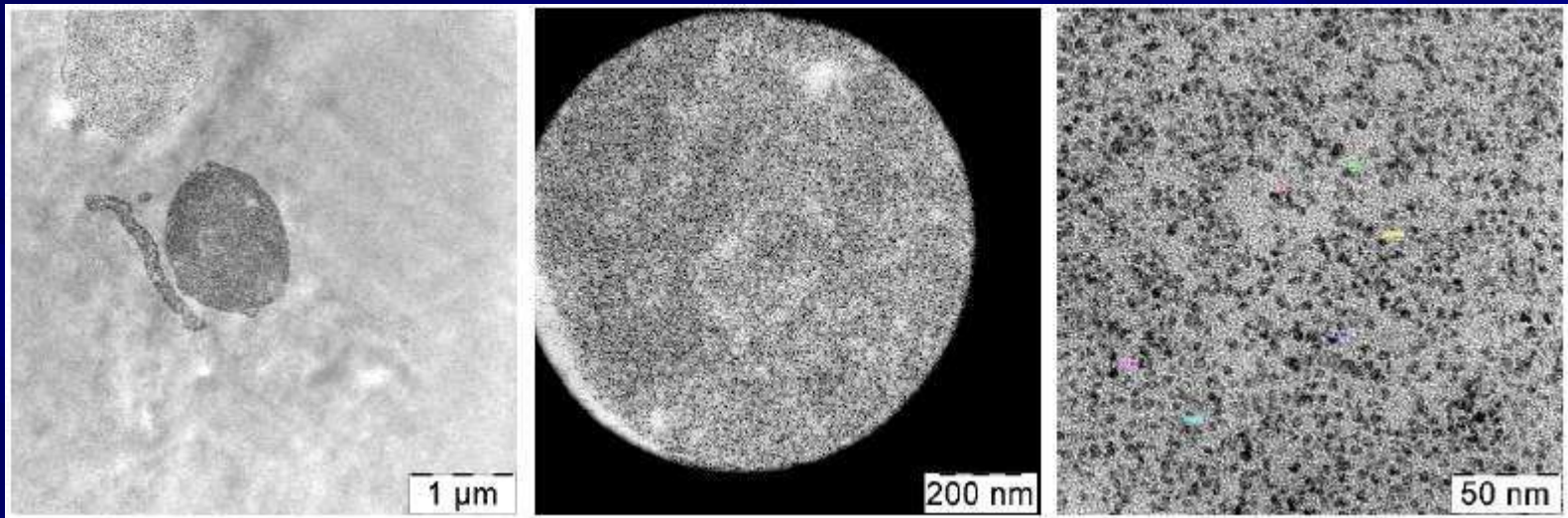


Исходный коллоид  
Средний размер  $45 \pm 8$  нм



Наночастицы в сыворотке крови  
Средний размер  $64 \pm 15$  нм

ПЭМ обладает высочайшим разрешением – лучше 1 нм, что дает возможность охарактеризовать размеры и форму наночастиц в биологических образцах



**Ультратонкий срез селезенки мыши.  
Анализ выявляет присутствие скоплений электронно-  
плотных наночастиц размером - 4-5 нм**



Распознавание наночастиц по характерному размеру и форме затруднено, если наночастицы способны агрегировать или частично растворяться в биологических средах

Сложности обнаружения и распознавания наночастиц возрастают по мере уменьшения их размера и плотности распределения в анализируемых биопробах

### **Необходимы:**

- оптимизация пробоподготовки, улучшающая надежность и достоверность анализа
- вспомогательные методики, обеспечивающие идентификацию наночастиц

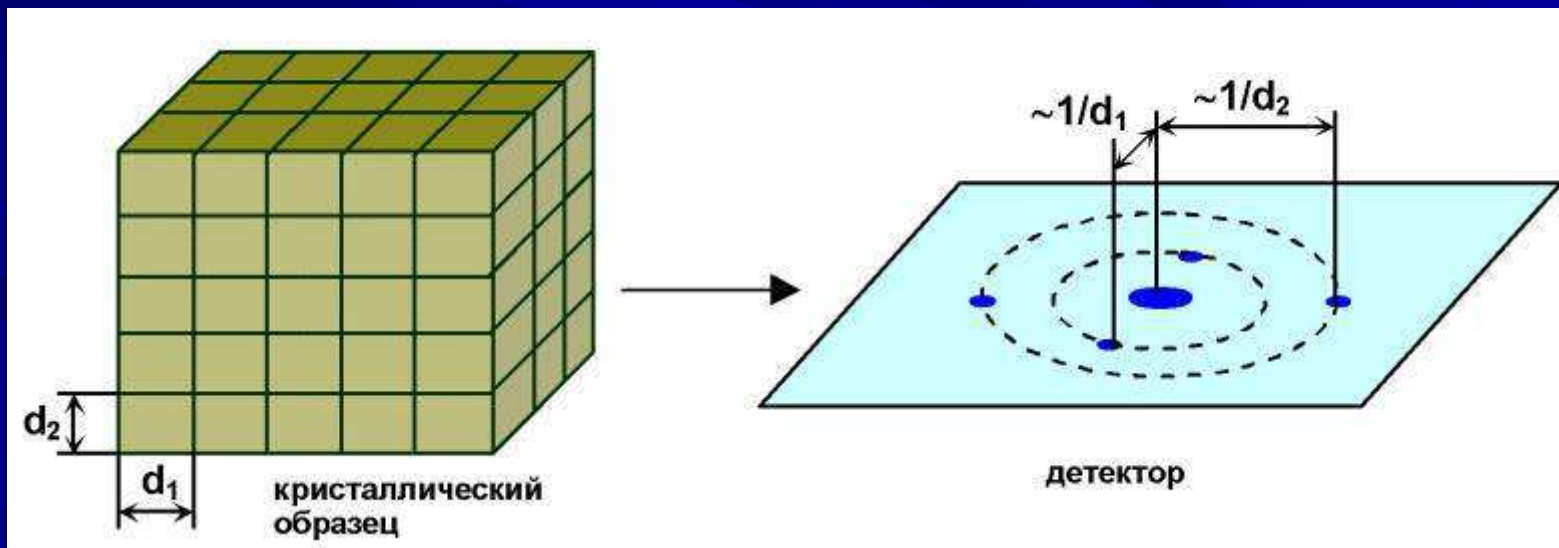
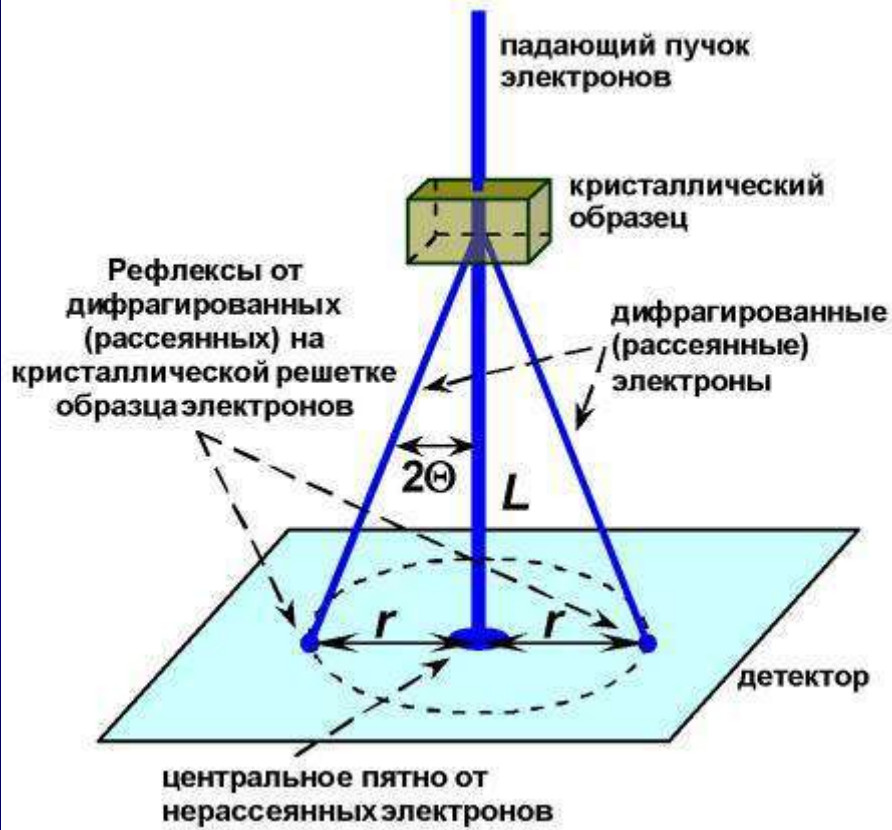
# Принцип метода дифракции электронов

закон Вульфа—Брэгга:

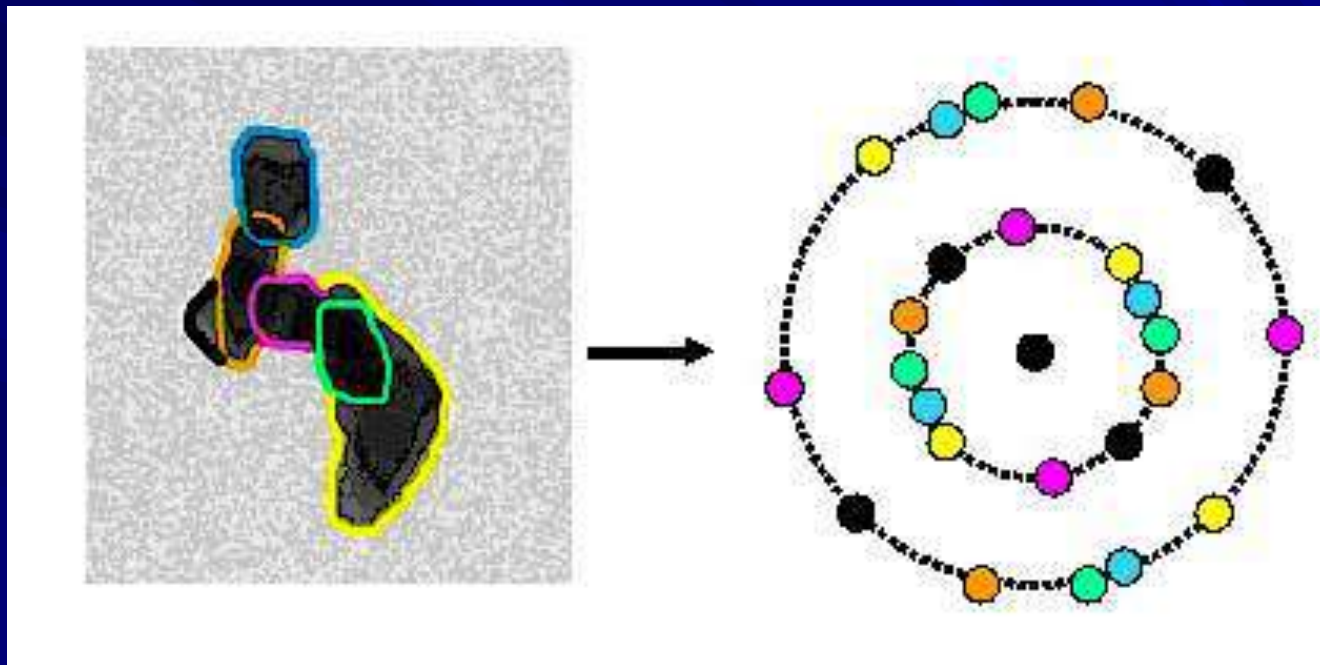
$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

$$d = L\lambda / r,$$

$L$  — расстояние от образца до детектора.

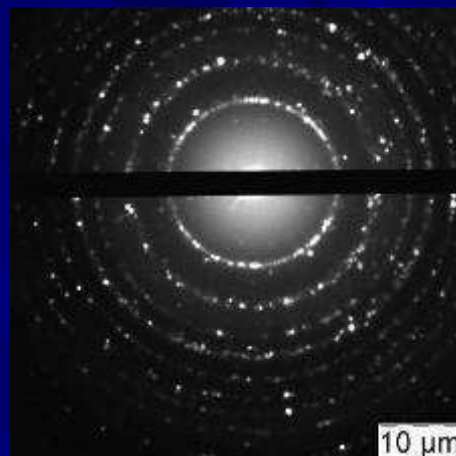
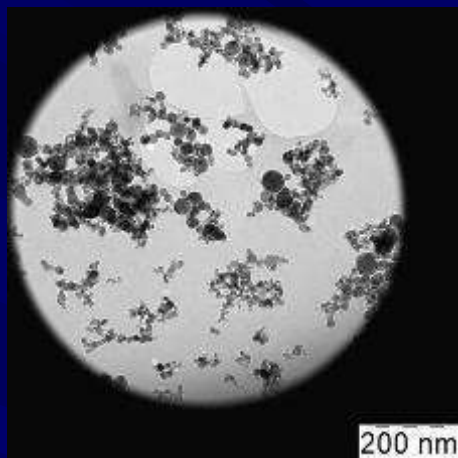


# Картина дифракции электронов от нескольких нанокристаллов одинакового состава

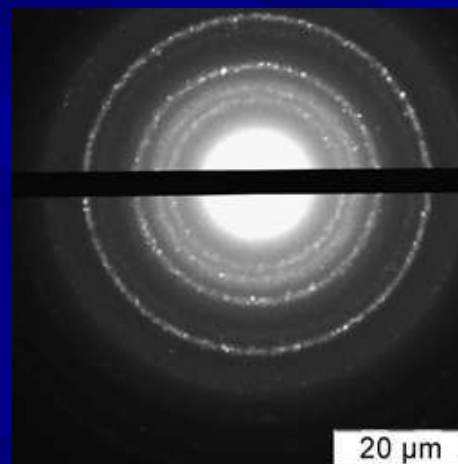
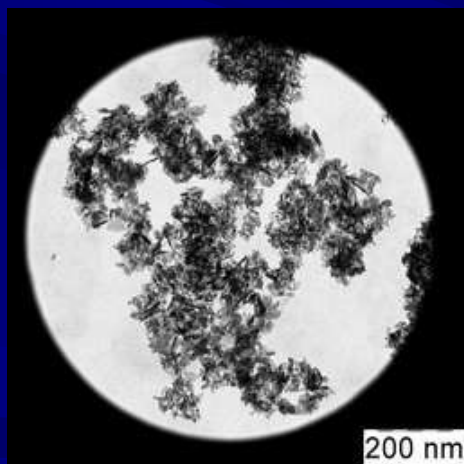




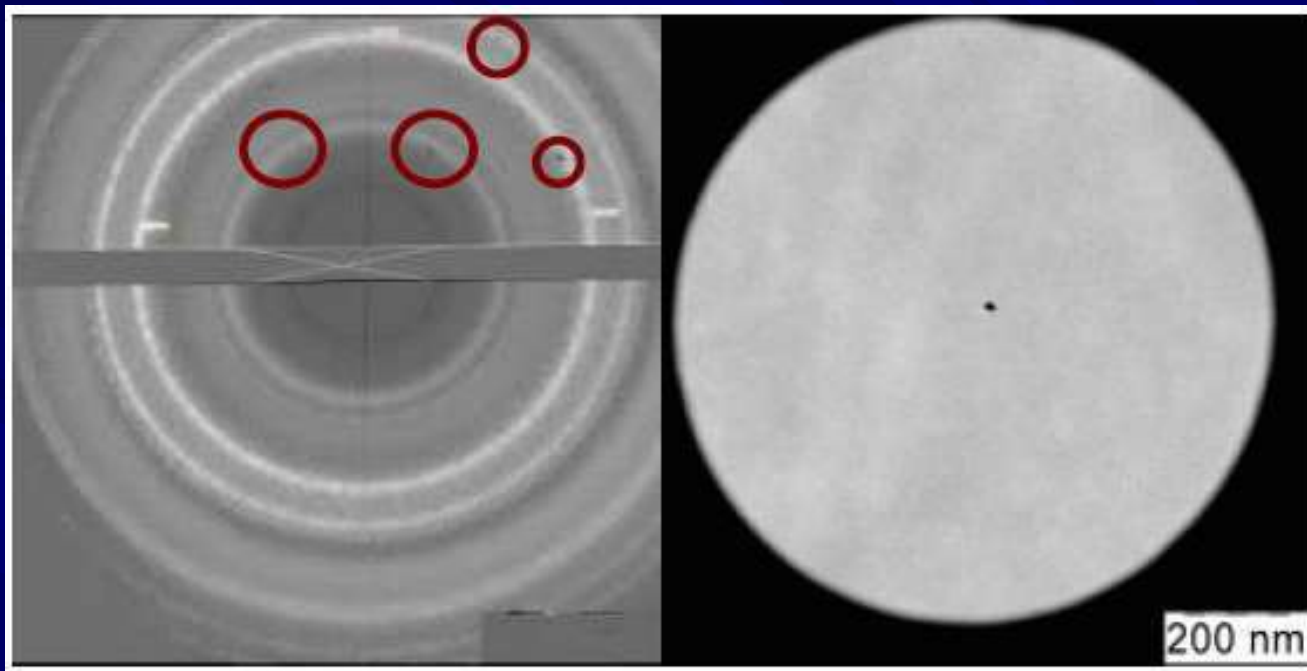
# ПЭМ и метод дифракции электронов



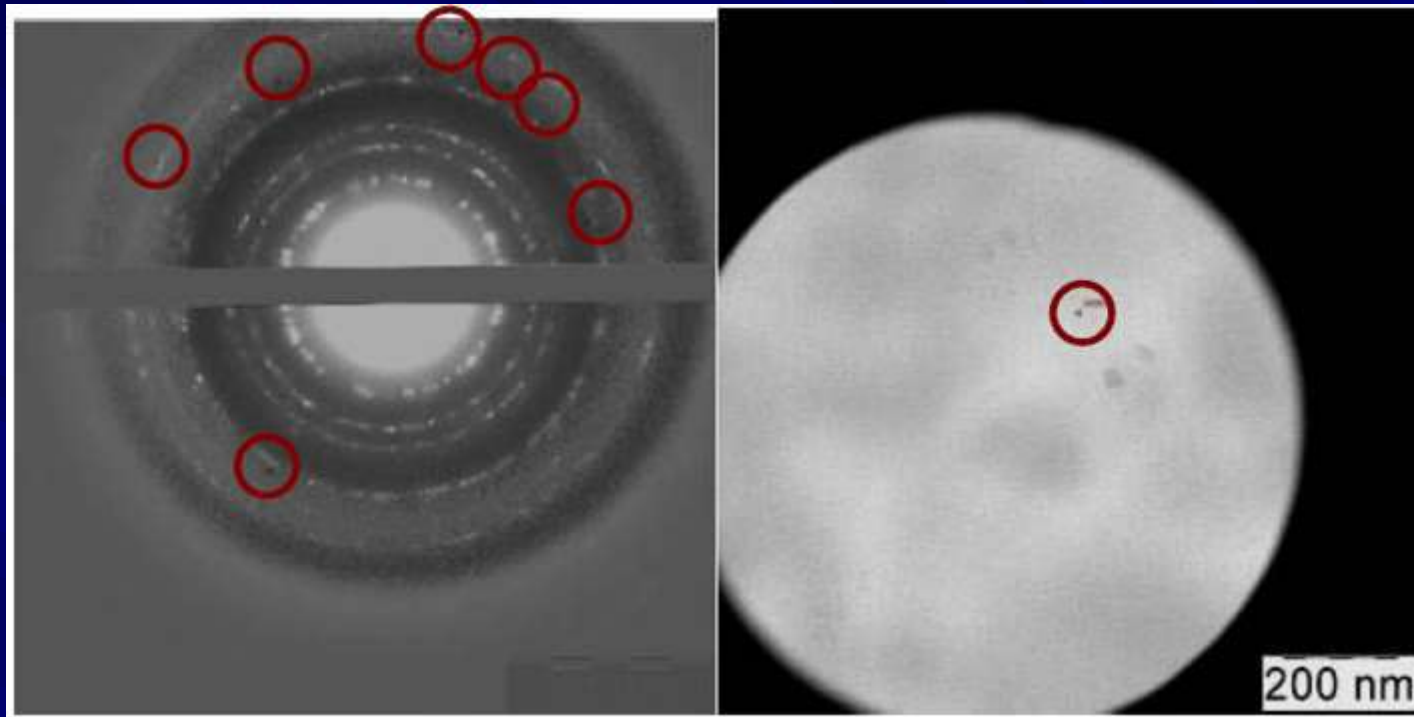
**Наночастицы оксида титана**



**Наночастицы оксида алюминия**

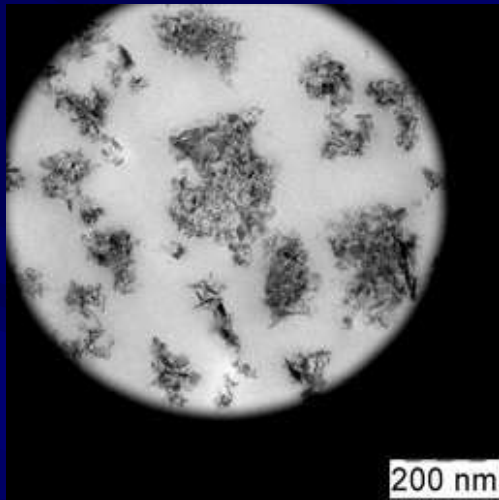


**Наложение электронограммы наночастицы золота (35 нм) в клетке лимфатического узла на электронограмму стандарта - золотой пленки . Четыре из пяти рефлексов наночастицы ложатся на «кольца» стандарта.**

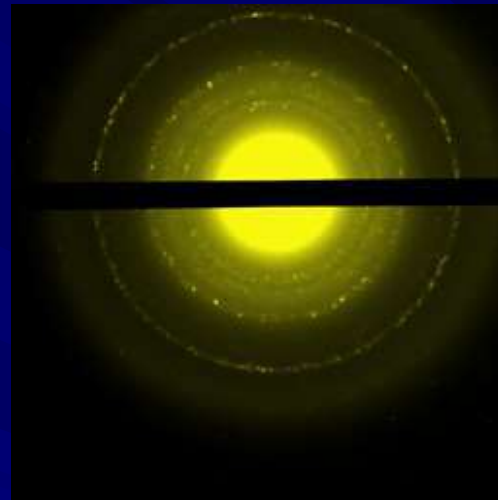


**Наложение электронограммы наночастицы диоксида титана (25 нм) в клетке A431 на электронограмму стандарта – порошка наночастиц диоксида титана. Большинство рефлексов наночастицы ложатся на «кольца» стандарта.**

**ПЭМ в комбинации с методом дифракции электронов.  
Выявление и идентификация наночастиц оксида алюминия в  
проростках риса**



**ПЭМ клеток корня  
риса**

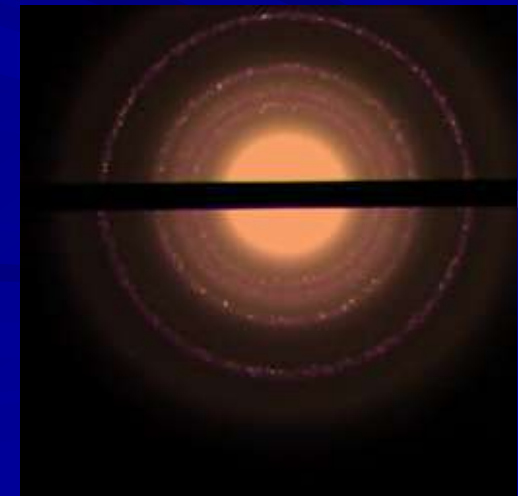


**ДЭ на наночастицах в  
исследуемом образце**

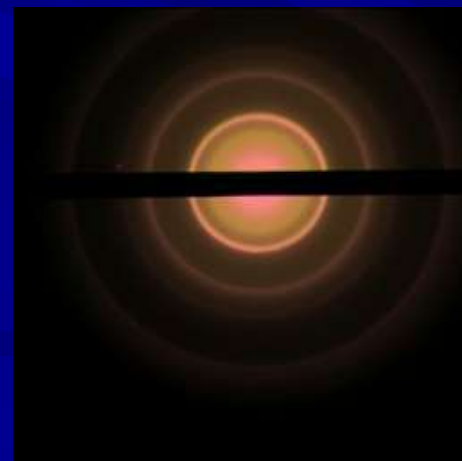
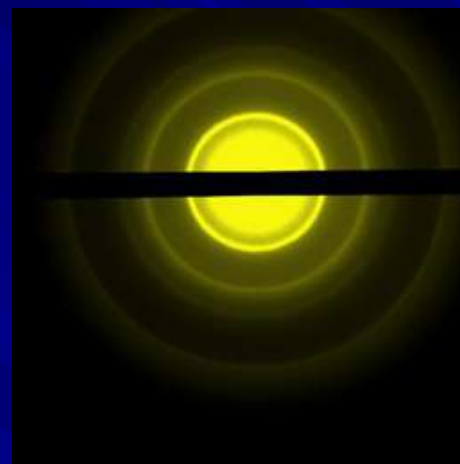
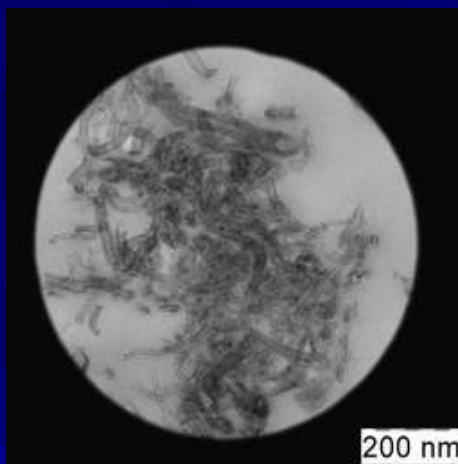
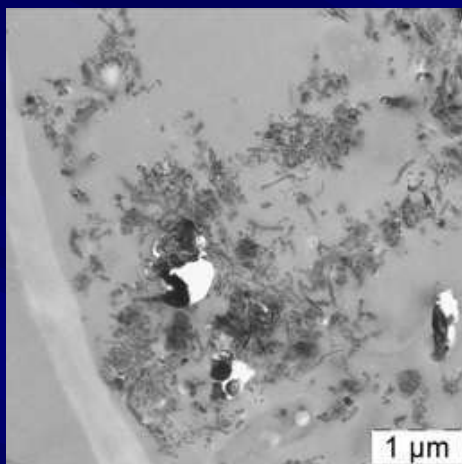


**Электроннограмма  
исходного порошка  
наночастиц**

**Наложение двух  
электроннограмм**

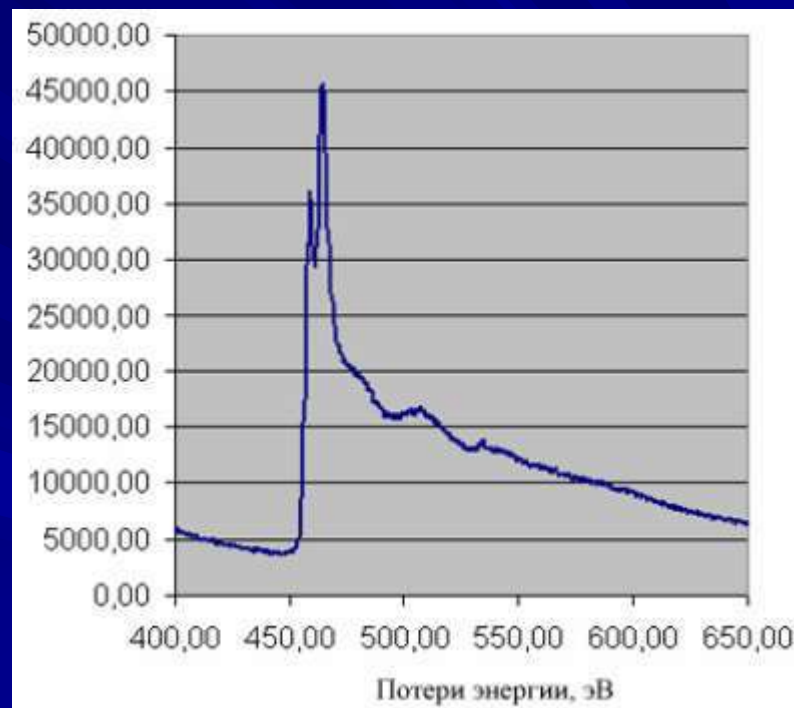
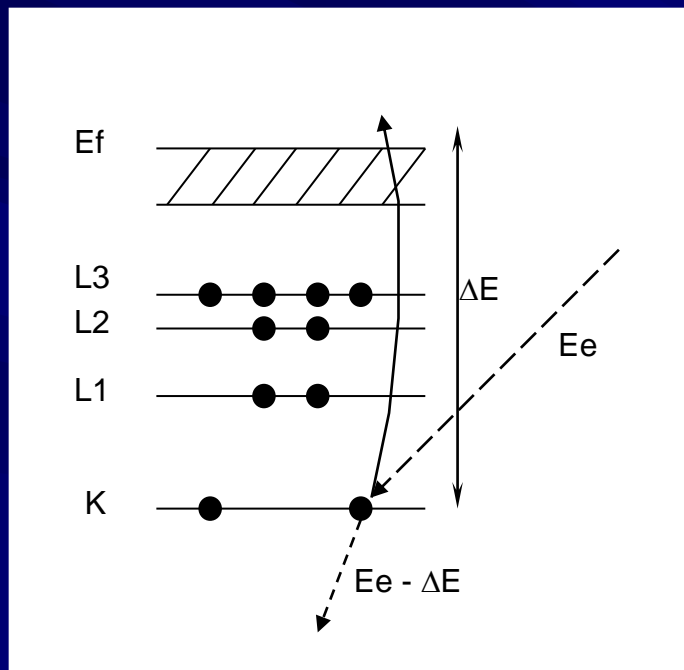


# Выявление и идентификация многостенных углеродных нанотрубок в листе проростка эспарцета

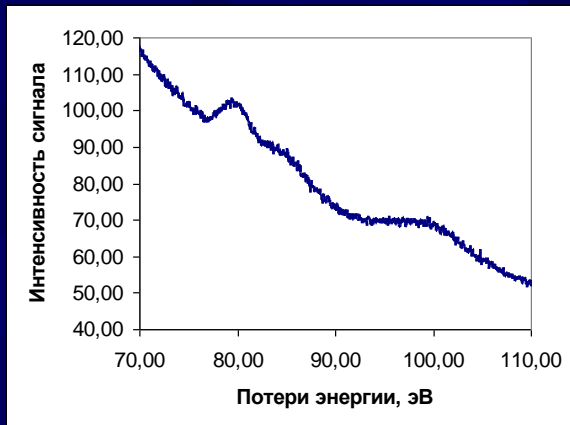
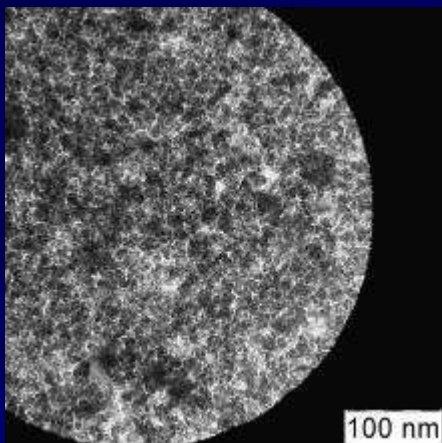




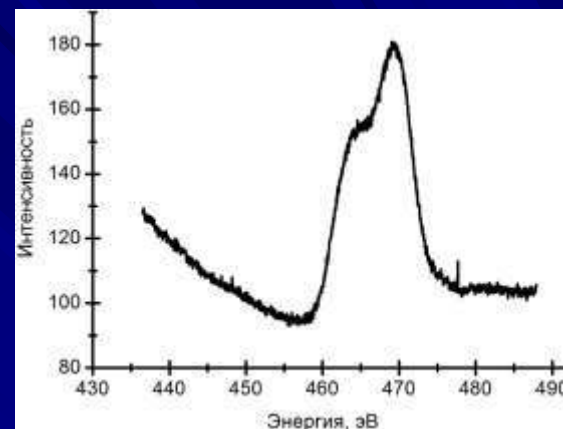
# Принцип спектроскопии характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ) electron energy loss spectroscopy (EELS)



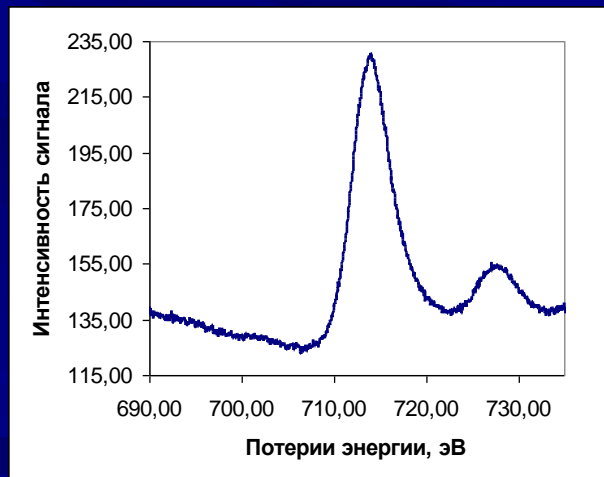
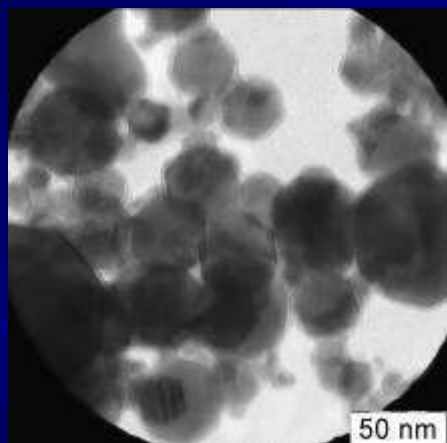
# ПЭМ и измерение спектров ХПЭЭ в заданных областях



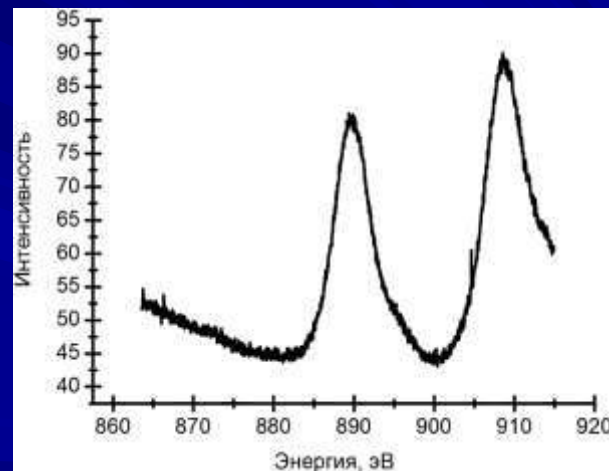
СХПЭЭ наночастиц суспензии Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



СХПЭЭ наночастиц TiO<sub>2</sub>

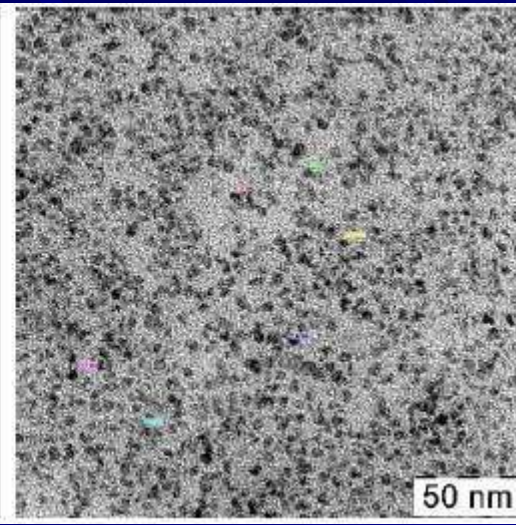
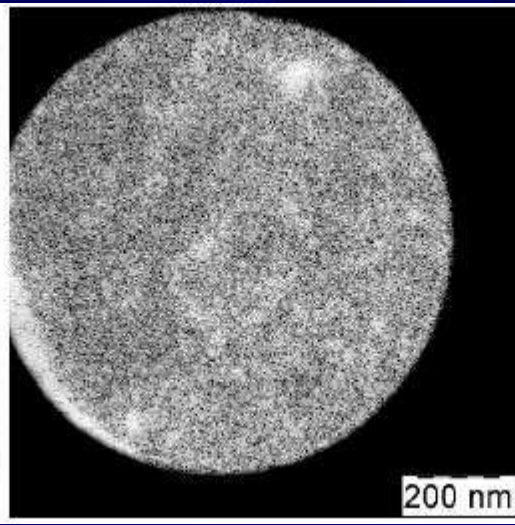
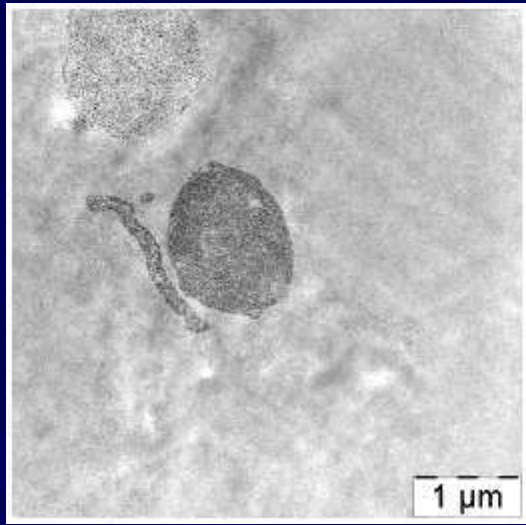


СХПЭЭ наночастиц порошка Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



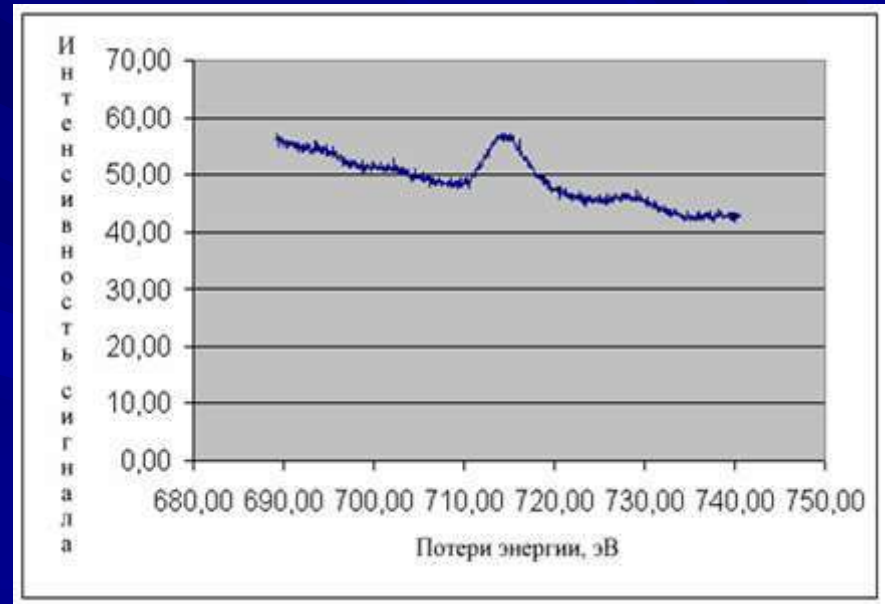
СХПЭЭ наночастиц CeO<sub>2</sub>





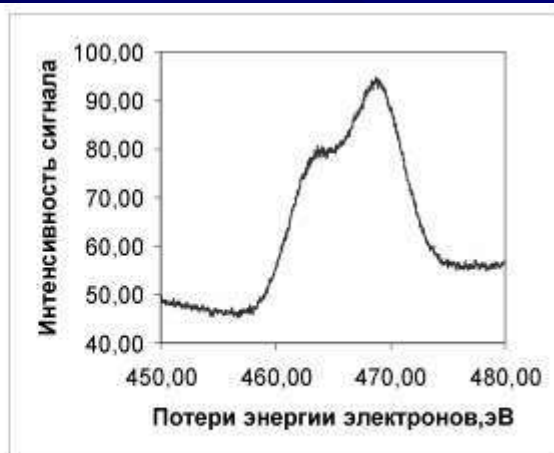
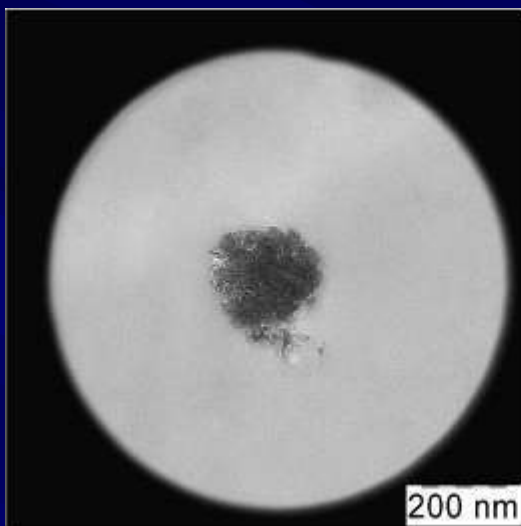
**Ультратонкий срез селезенки мыши. Оптимизированная процедура пробоподготовки: без контрастирования. Размер наночастиц - 4-5 нм.**

**Анализ спектров ХПЭЭ показывает, что в состав наночастиц входит железо**

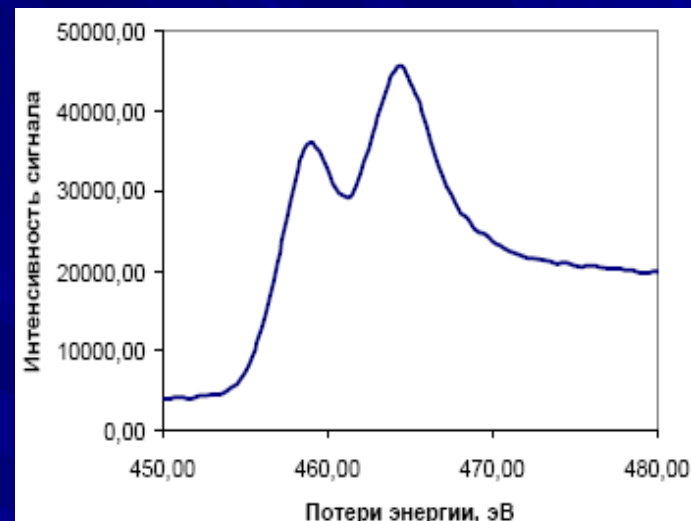


**Наблюдаемые наночастицы – результат деградации гемоглобина и запасания железа в форме ферритина.**

# Агрегаты наночастиц диоксида титана в клетках эукариот

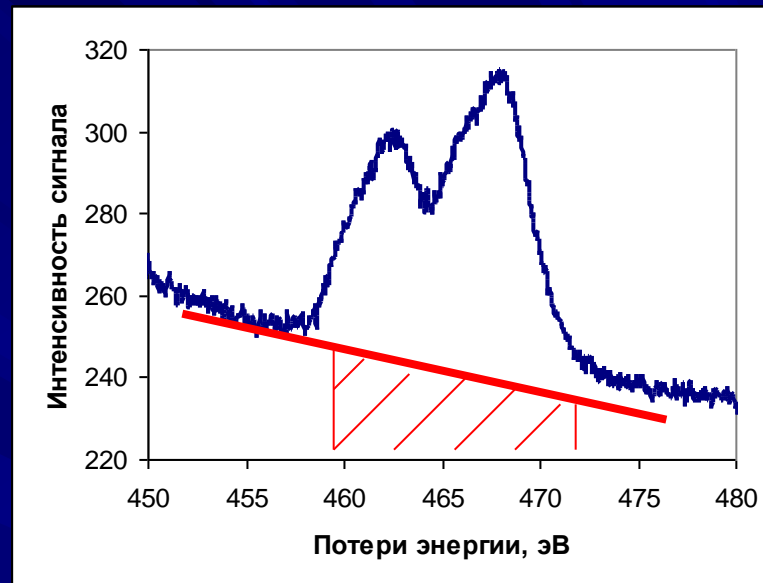
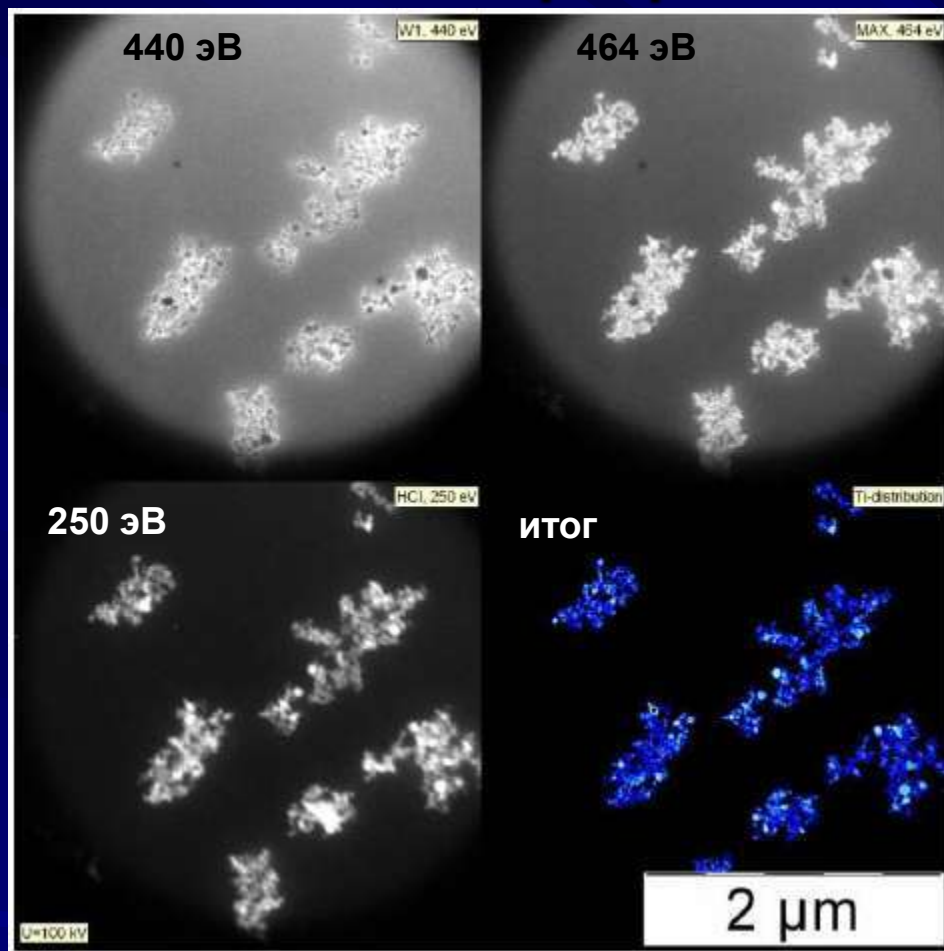


спектр ХПЭЭ снятый с области, ограниченной диафрагмой



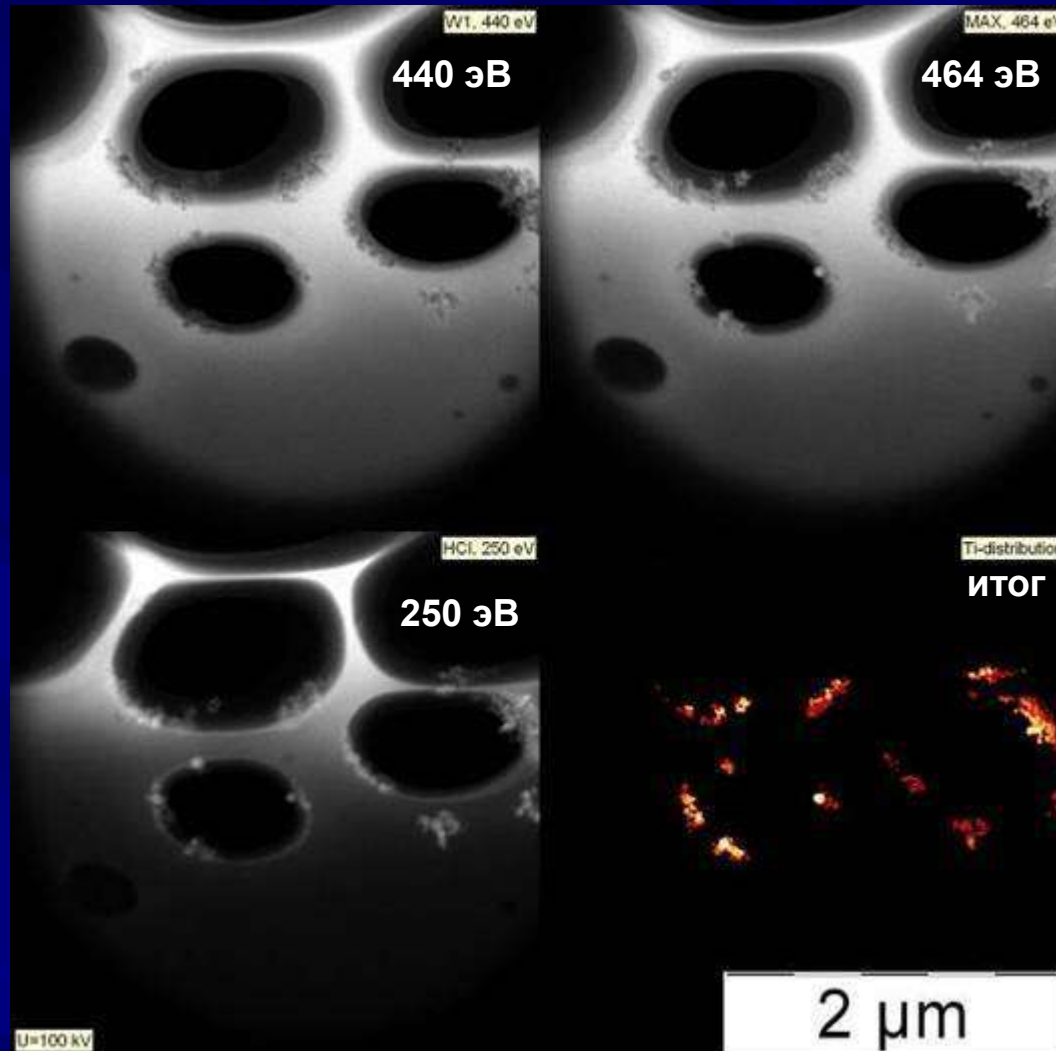
Спектр ХПЭЭ титана из атласа спектров

# Элементное картирование на основе метода СХПЭЭ



Агрегаты наночастиц  $\text{TiO}_2$  в плазме крови

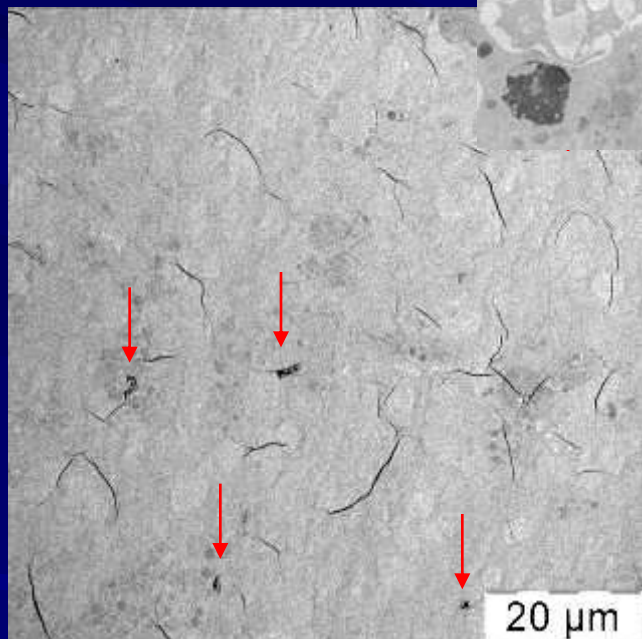
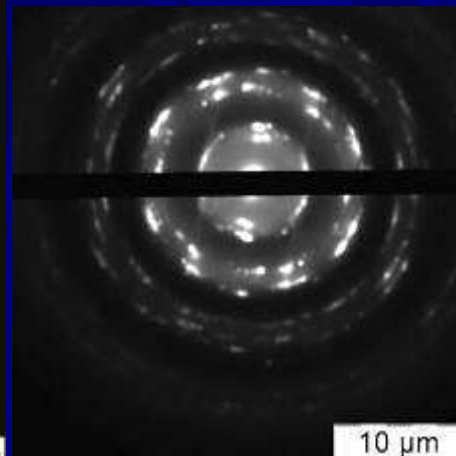
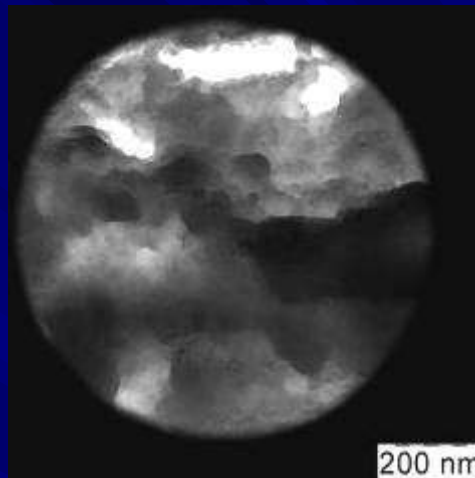
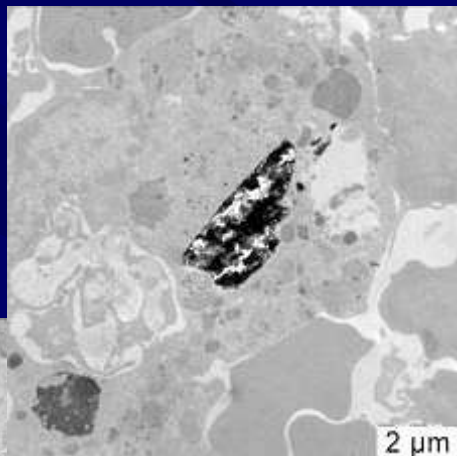
# Элементное картирование на основе метода СХПЭЭ



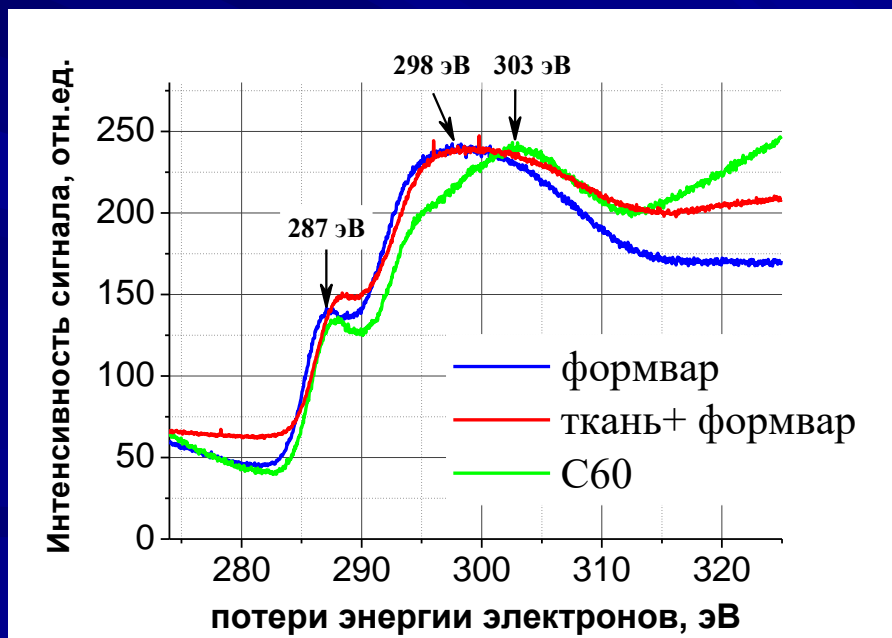
Агрегаты наночастиц TiO<sub>2</sub> в плазме крови



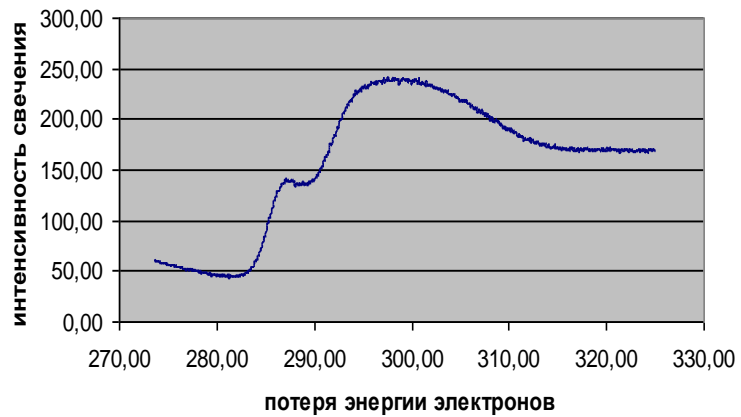
# Выявление и идентификация агрегатов фуллерена



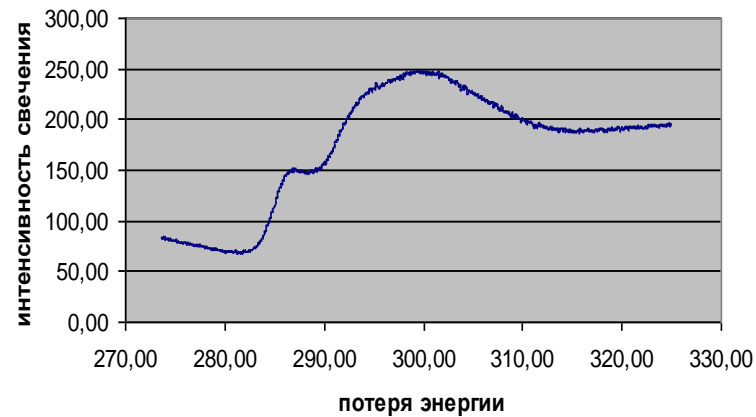
**Агрегаты фуллерена  
в селезёнке.  
Контрастирование  
тетраокисью осмия**



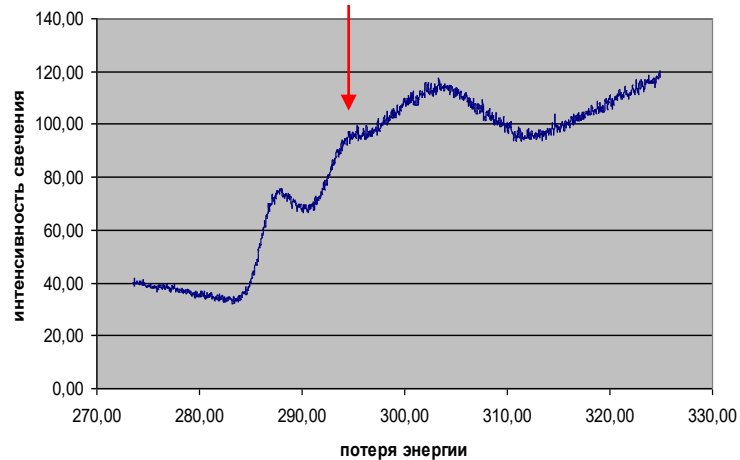
### Углерод в формваровой подложке



### Углерод в биологическом образце



### Сухой порошок фуллеренов



**Методом СХПЭЭ** лучше всего регистрируются элементы, характеристические пики которых расположены в диапазоне от 30 до 1000 эВ

С ростом порядкового номера элемента увеличивается диапазон энергии, в котором должен работать энергетический фильтр (область измерения энергии неупругого рассеяния)

**Метод СХПЭЭ не применим для:**

P, S, Cl, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Sr, Y, Zr, Nb, Mo,  
Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In