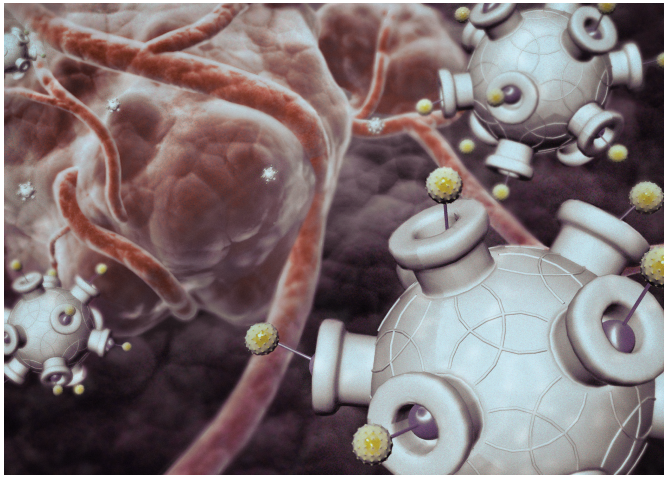
CERIC

PaGES4

Pianificazione, Gestione ed esecuzione di un Esperimento Scientifico in un centro di ricerca internazionale

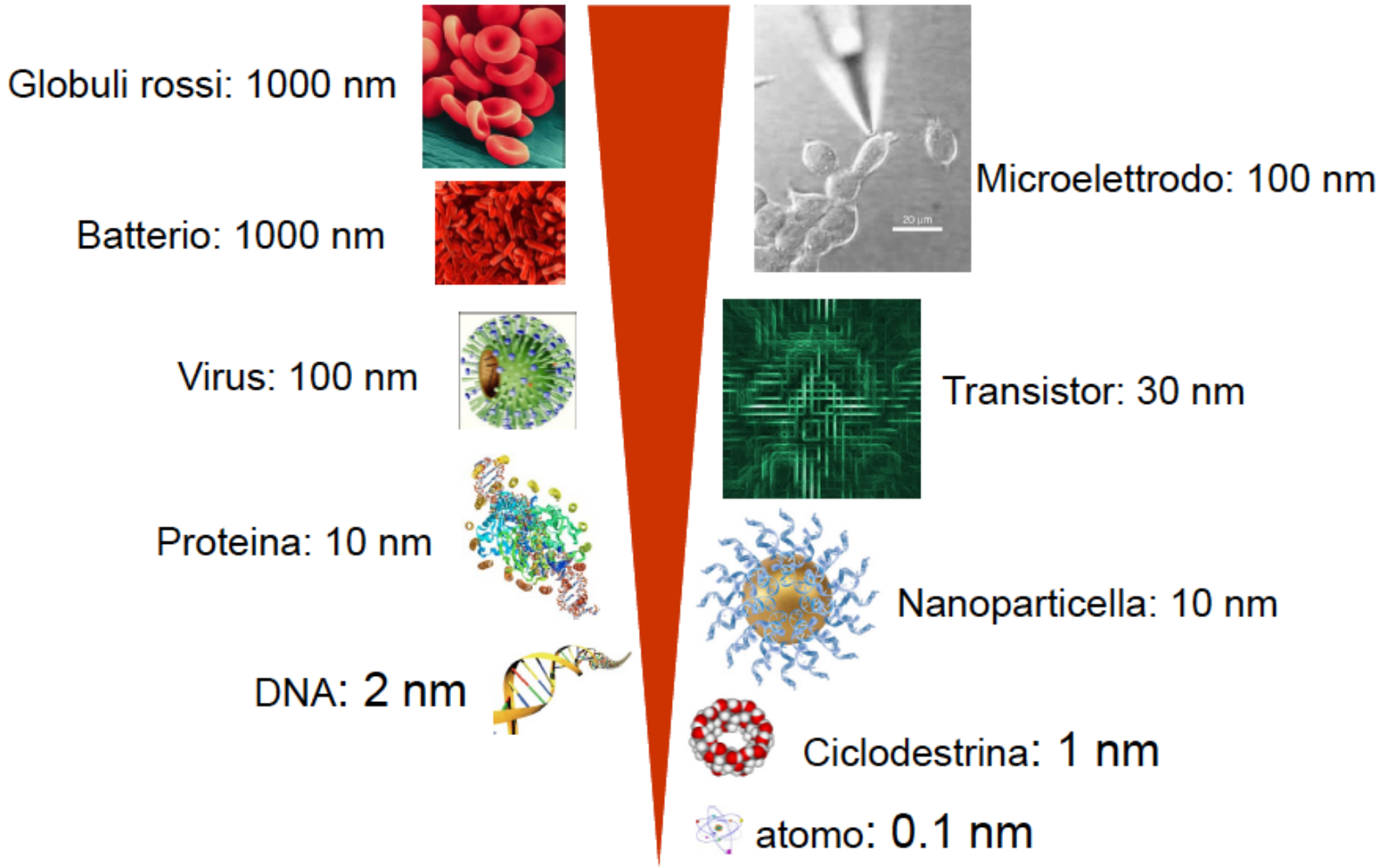
Il colore delle nanoparticelle d'oro: applicazioni in nanomedicina



Loredana Casalis e Pietro Parisse, Elettra Sincrotrone Trieste
Pages4 Event1, 8/01/2019

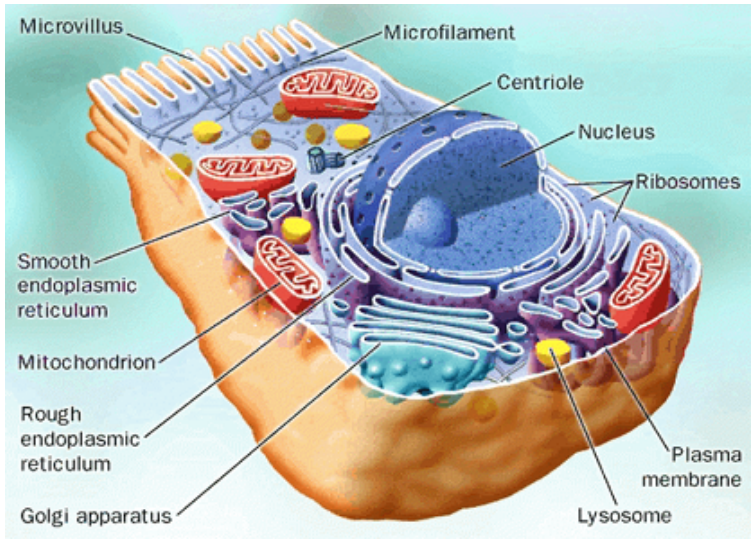
La nanoscala

"nano" significa "miliardesimo"

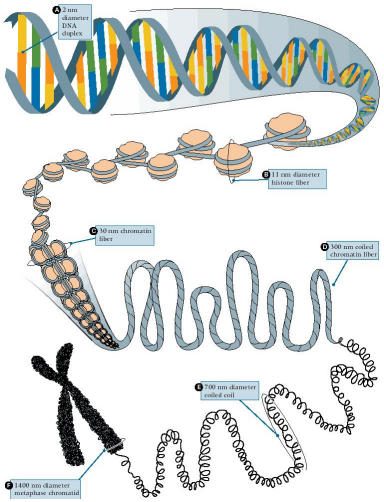


Cosa fanno le nanotecnologie

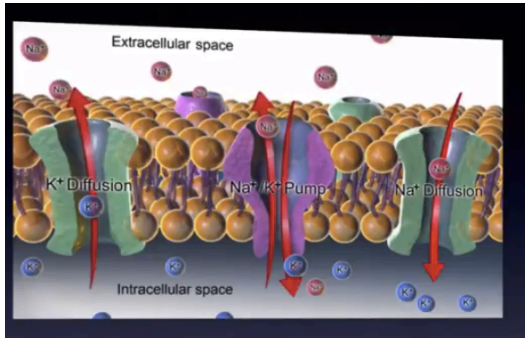
Le **nanotecnologie** offrono i **mezzi e le tecnologie** per la **realizzazione di sistemi nano-strutturati sintetici** e per lo **studio delle proprietà dei sistemi nanometrici**, cercando di **imitare i sistemi naturali**, che sono altamente organizzati, efficienti e funzionali

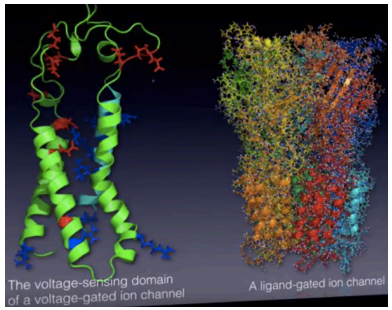


Cellula animale



DNA e cromatina





Membrana cellulare

Nanotecnologie: l'inizio

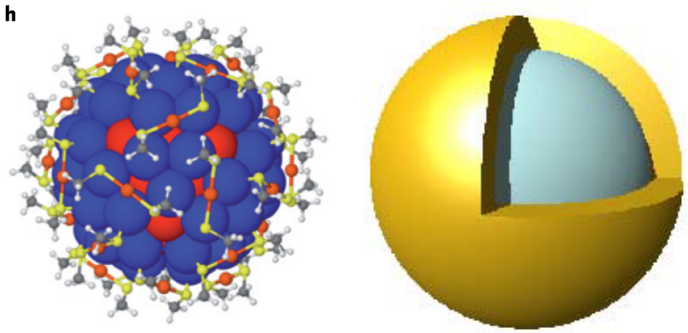
There's Plenty of Room at the Bottom

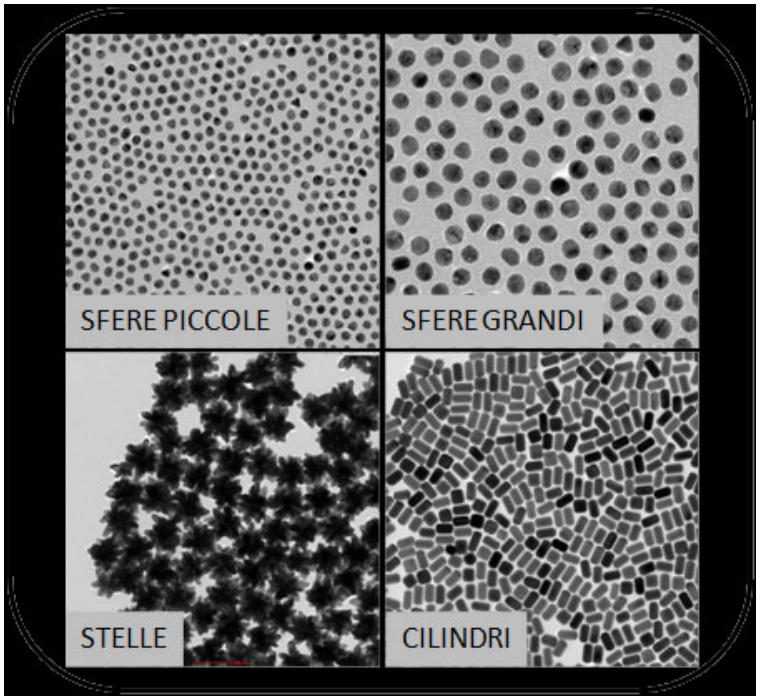
Richard Feynman, 1959

….. Quando nel 2000 la gente guardera' indietro, si chiedera' perche' si sia arrivati al 1960 prima di muoversi seriamente in questa direzione. Ma non mi spaventa affrontare anche la questione finale, cioe' se - in un lontano futuro - potremo sistemare gli atomi nel modo in cui vogliamo; proprio i singoli atomi, al fondo della scala! ……

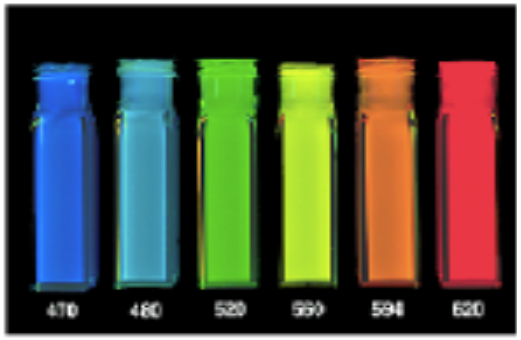
Nanoparticelle

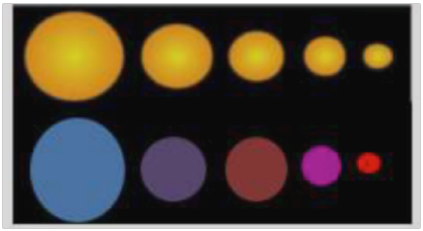
Le nanoparticelle di semiconduttori (es: ZnS, CdSe) o di metallo (es: Au, Ag) o miste (core-shell), sono costituite da poche migliaia di atomi (2-10 nm dia, a 50 nm hanno già qualche milione di atomi!) assorbono ed emettono luce il cui colore dipende dalle dimensioni, cioè dal numero di atomi che contengono, e dalla loro disposizione spaziale (forma).





Nanoparticelle





Le **particelle più piccole** (pochi nm) **assorbono nel blu**, le **più grandi** (100 nm) **nel rosso**. Grazie a questa proprietà (di natura quantistica, legata al piccolo numero di atomi in gioco), le NP possono essere usate per esempio come "**sonde ottiche**": si vanno a legare chimicamente a molecole che possono interagire nel corpo con specifiche proteine/ recettori, per localizzare queste zone.
Da cui l' applicazione in Nanomedicina

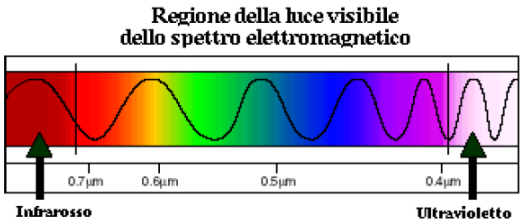


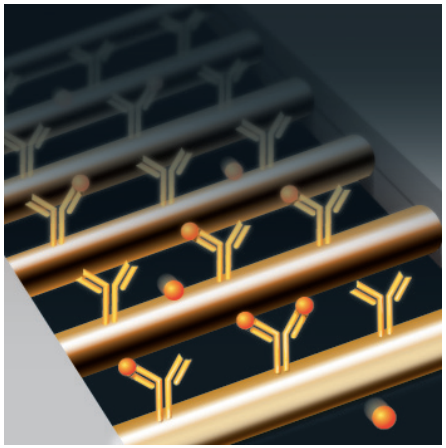
Fig. 5 La ruota dei colori complementari: in base al colore assorbito è possibile prevedere quello riflesso e viceversa

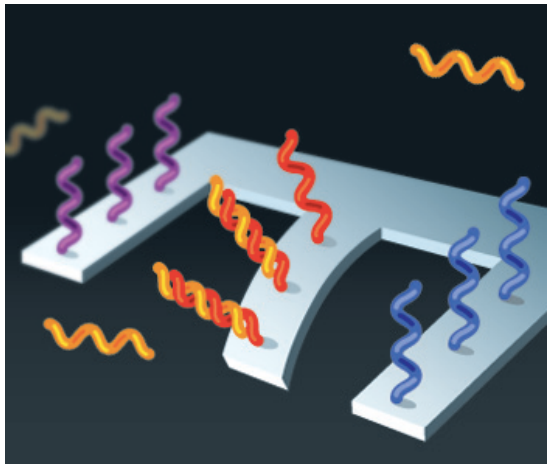
Nanoparticelle d'oro

La coppa di Licurgo (romana, IV sec dc)
British Museum

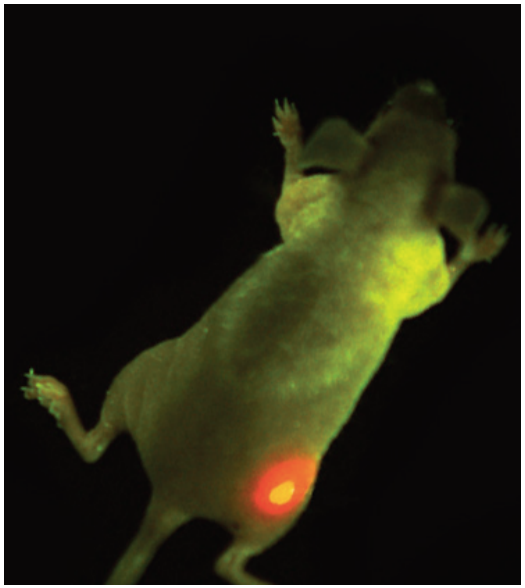
Nanotecnologie e medicina

Nanosensori

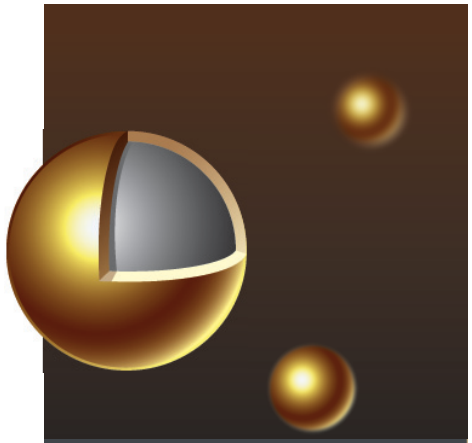


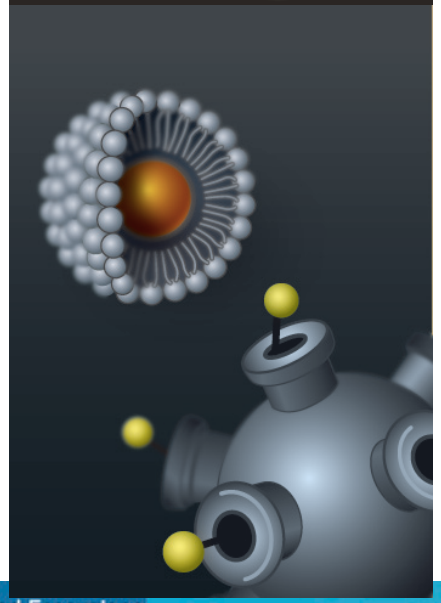


Diagnostica per immagini



Drug delivery





Le promesse della nanomedicina

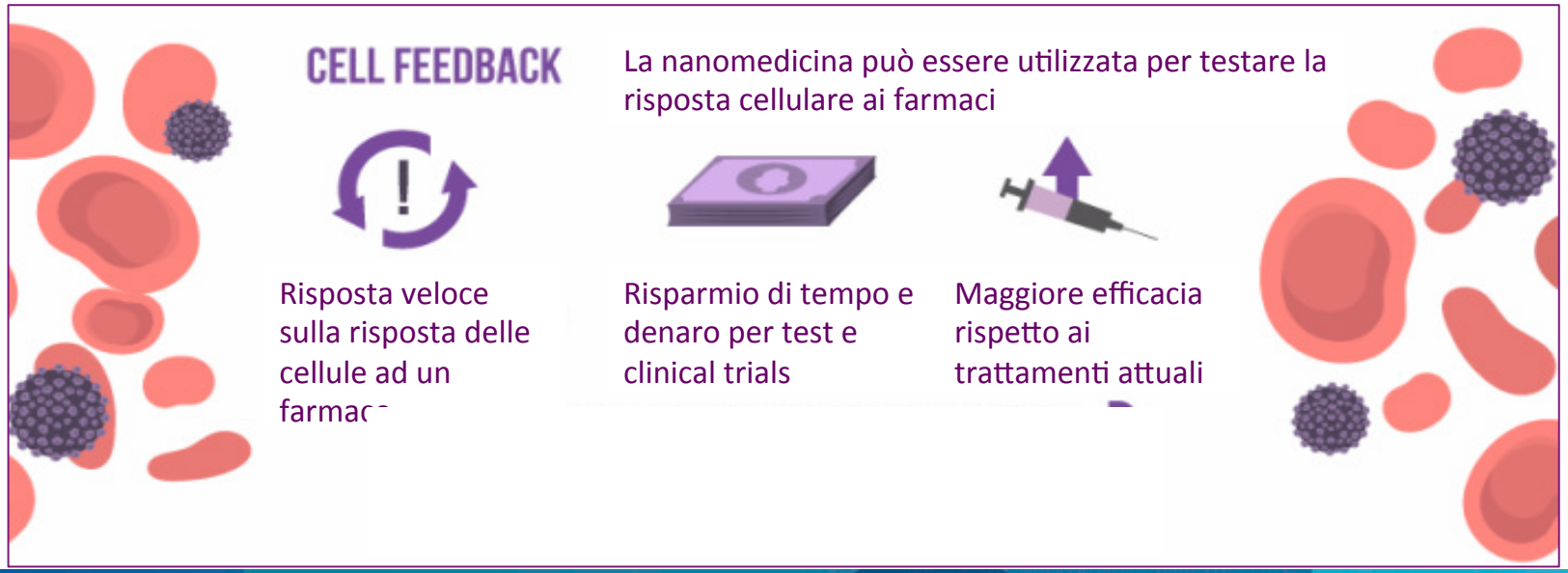
VANTAGGI DELLA NANOMEDICINA

Diagnosi più rapida di molte malattie

Trattamento più preciso di condizioni quali il cancro

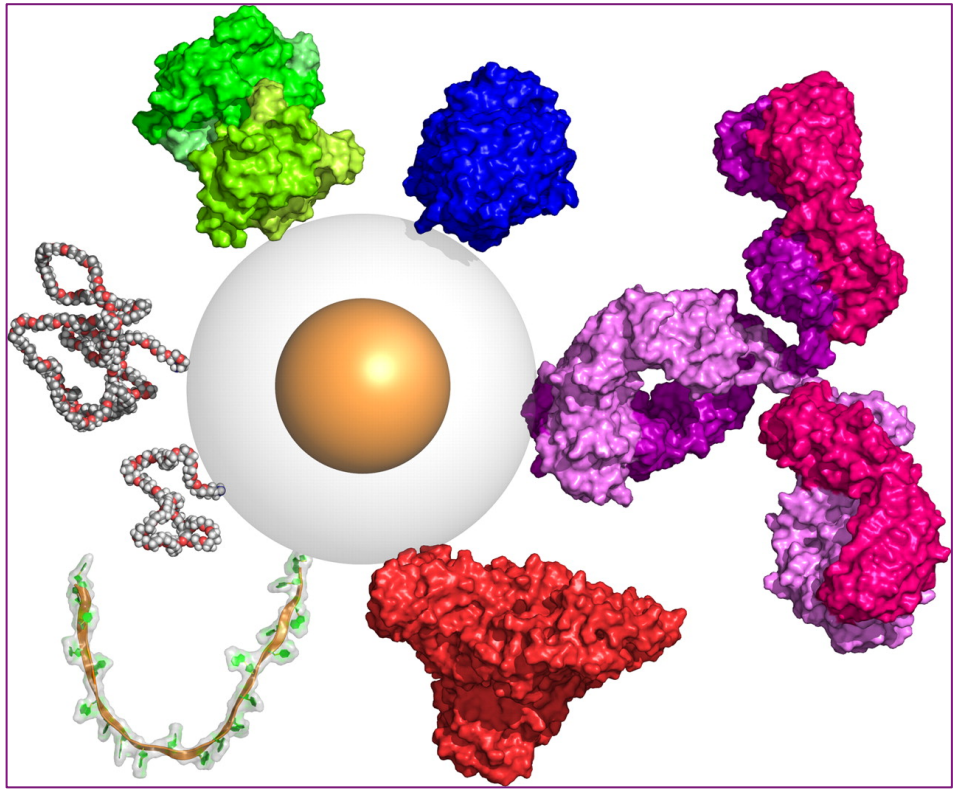
Riparazione dei tessuti anche all'interno del corpo

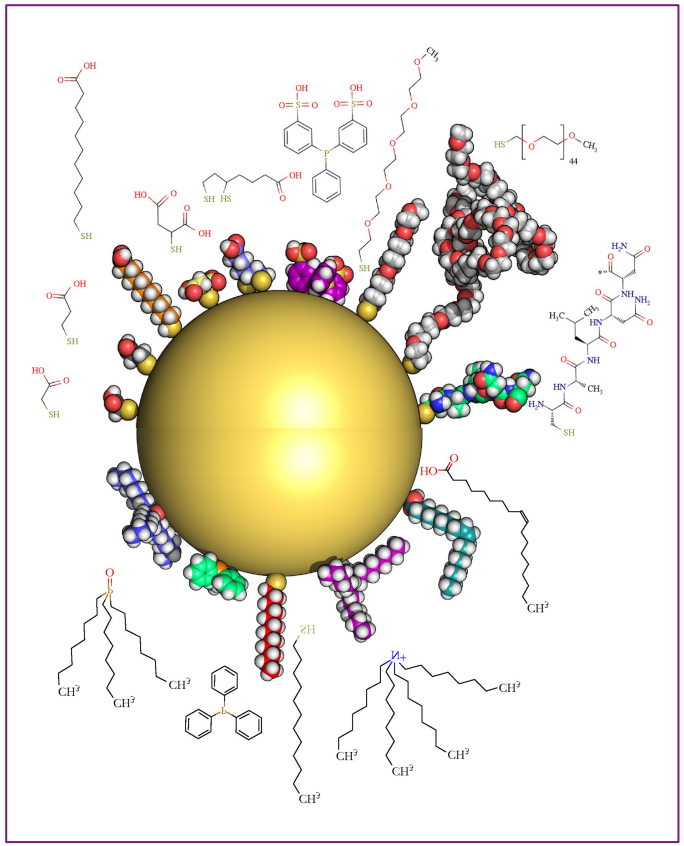
Mirata solo a organi malati senza intaccare i tessuti sani



Le promesse della nanomedicina

Nanoparticelle d'oro: proteine artificiali

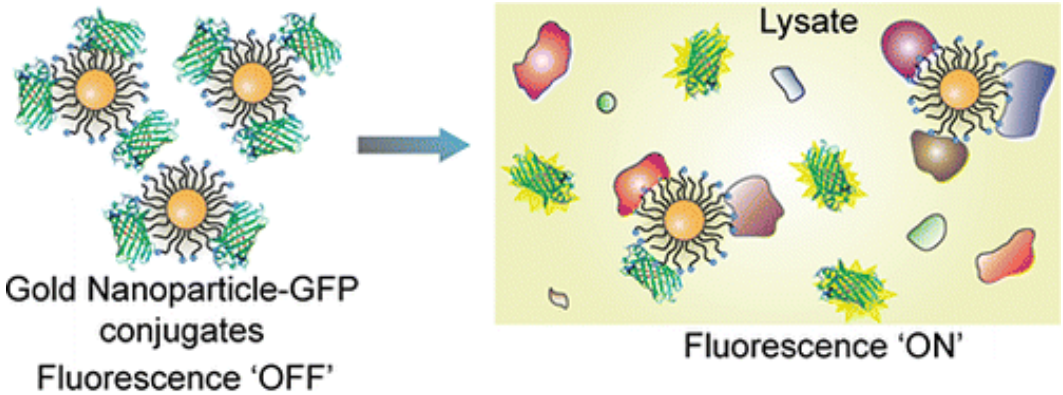




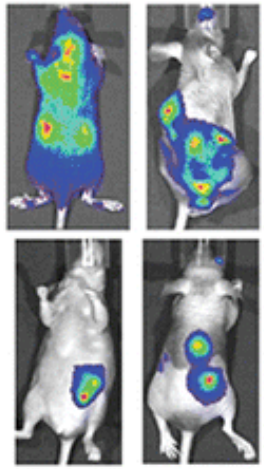
https://oggiscienza.it/2017/07/14/nanoparticelle-sintetiche-proteine-iit-medicina-personalizzata/

Le promesse della nanomedicina

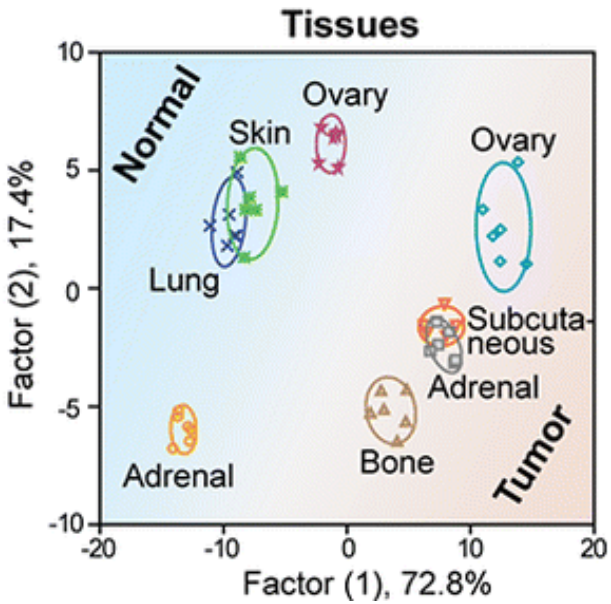
Nanoparticelle d'oro e imaging



Alle Nanoparticelle d'oro possono essere **legate** in superficie **molecole** capaci di legare proteine **per marcare un tumore**



Generation of metastases



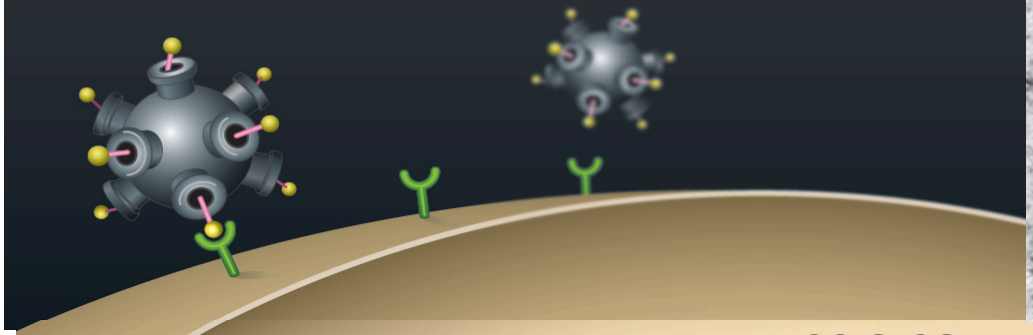
Illuminando con luce visibile il paziente, si vede dove le particelle si localizzano e si identifica la zona del tumore

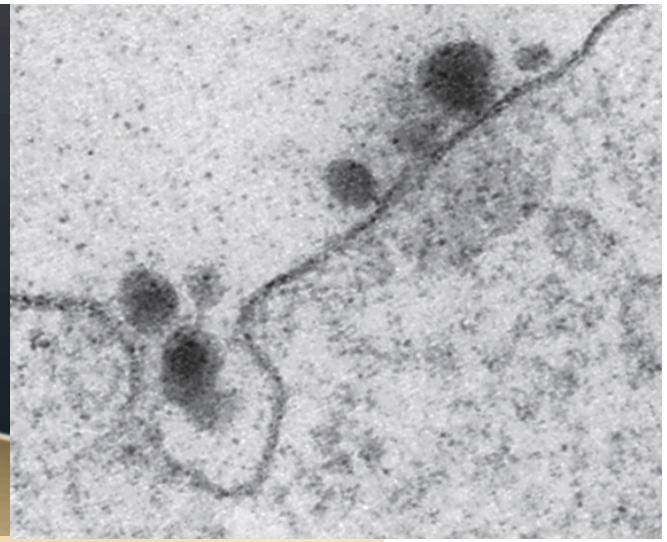
Le promesse della nanomedicina

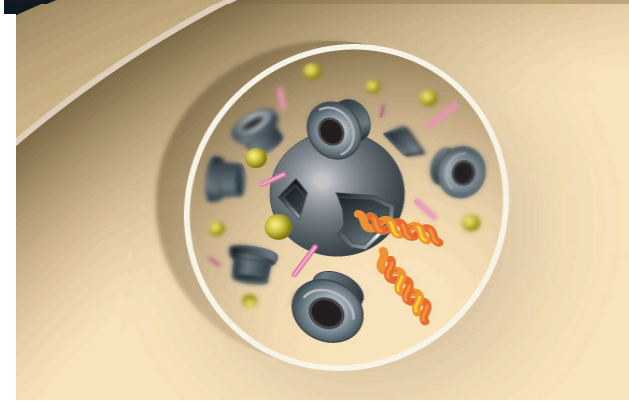
Nanoparticelle d'oro per il rilascio controllato di farmaci (drug delivery)

TARGETING ATTIVO DI TUMORI

I recettori di superficie di una cellula tumorale si legano alla proteina sulla nanoparticella facilitandone l'internalizzazione per endocitosi





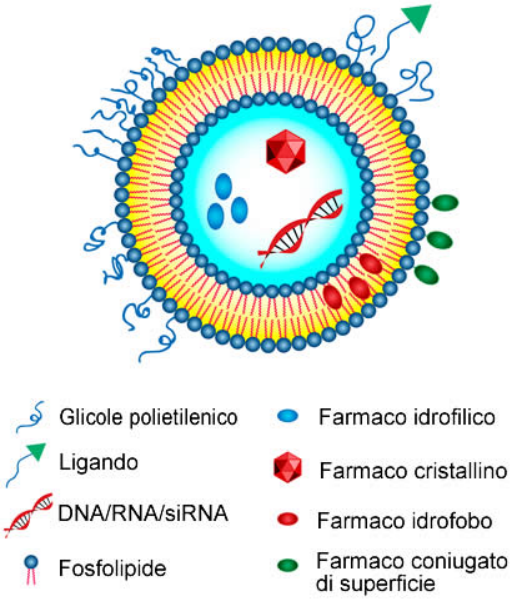


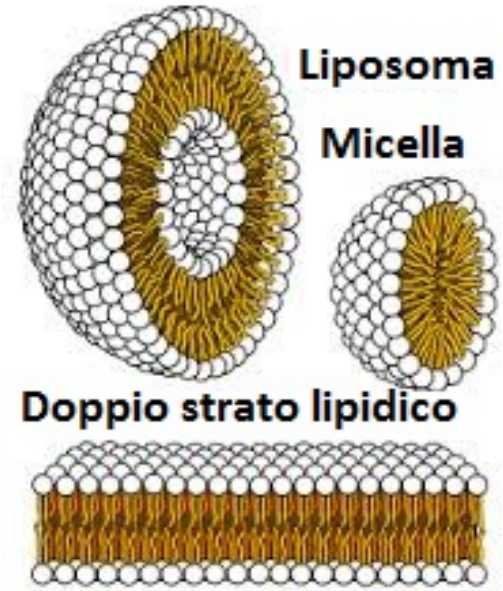
RILASCIO CONTROLLATO

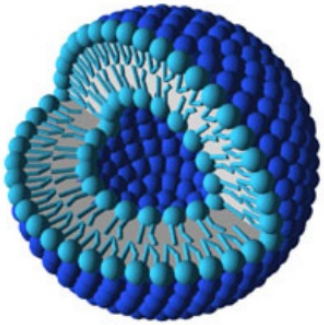
Una volta all'interno della cellula un sensore chimico dentro la nanoparticella risponde al basso pH all'interno della cavità endocitotica causando il disassemblaggio della nanoparticella e il rilascio del farmaco che può inibire la crescita della cellula tumorale

Le promesse della nanomedicina

Altri sistemi “nano” per il drug delivery:
i liposomi



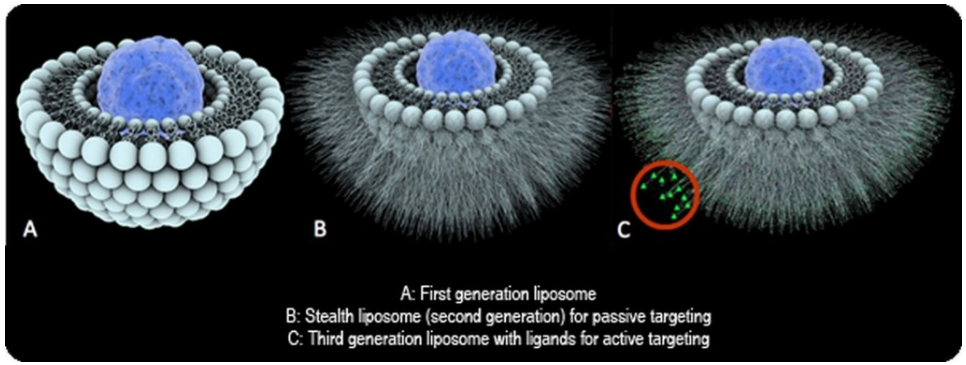


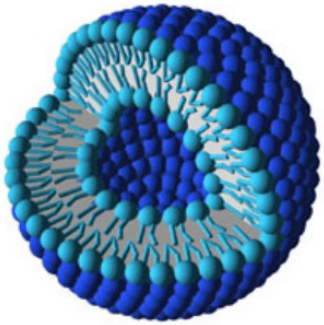


https://www.tomshw.it/liposomi-cura-cancro-ottenere-farmaci-mirati-84333

Le promesse della nanomedicina

I liposomi artificiali sono spesso instabili. Per stabilizzarli si “funzionalizzano” ad esempio per renderli invisibili al sistema immunitario (vero anche per le NP)



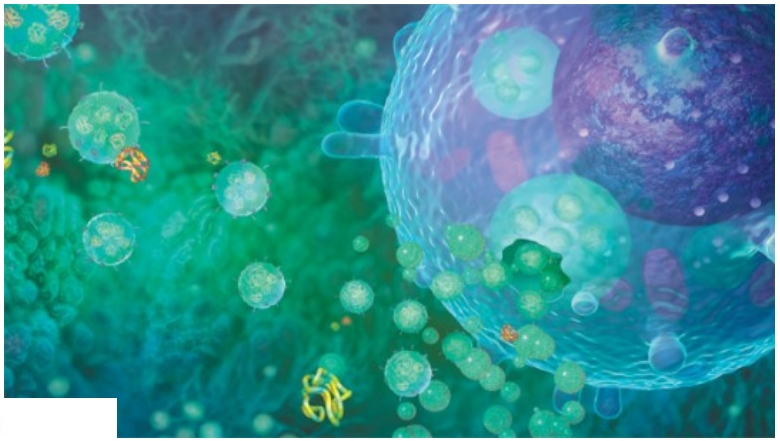


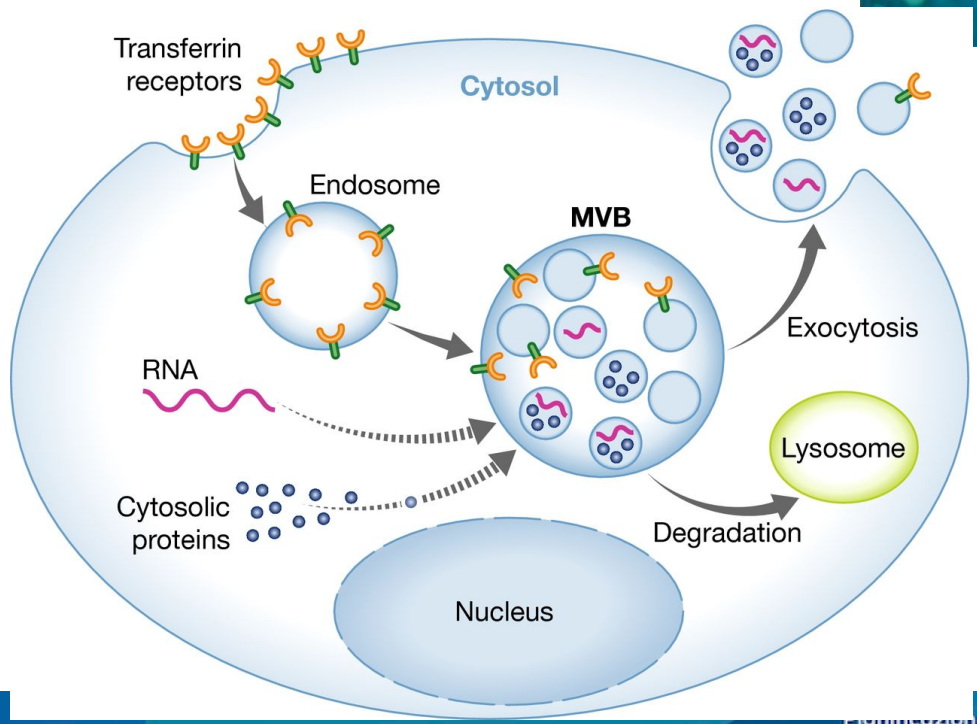
https://www.tomshw.it/liposomi-cura-cancro-ottenere-farmaci-mirati-84333

Le promesse della nanomedicina

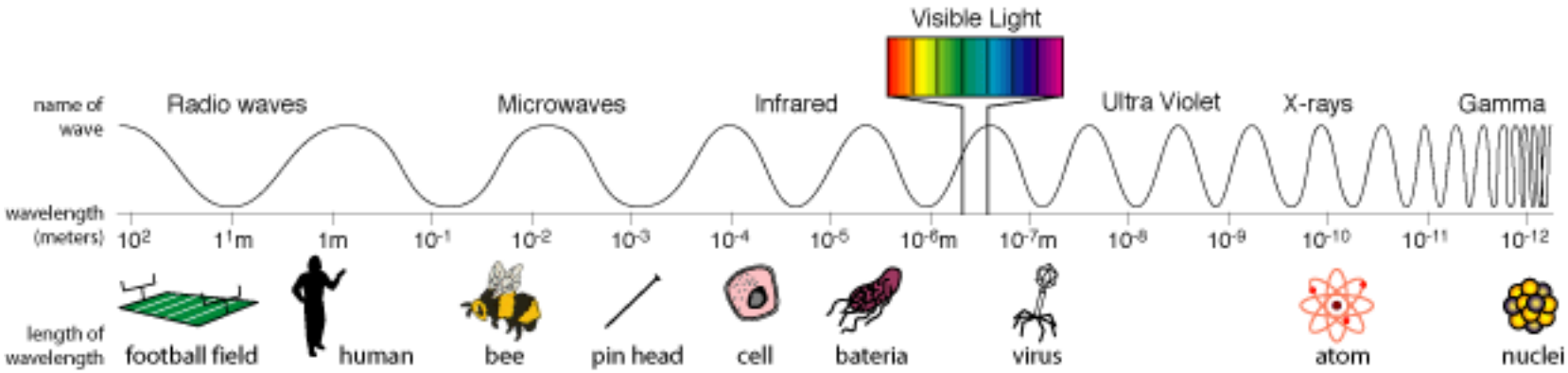
Esosomi

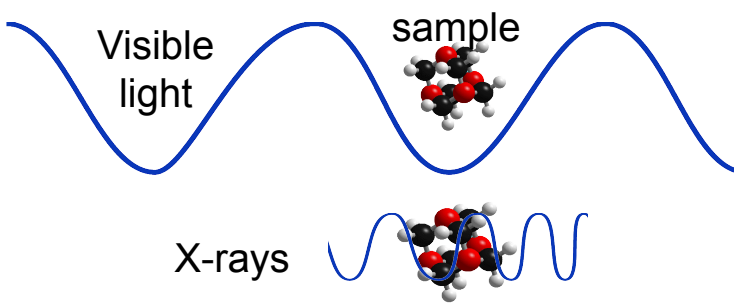
Esiste una famiglia di liposomi naturali, di dimensioni "nano" (tra 20 e 200 nm) chiamati **ESOSOMI** che sfugge al sistema immunitario e che ha un ruolo fondamentale nello scambio di molecole tra cellule nel corpo





Liposomi, esosomi e nanoparticelle a ELETTRA





Importanza della lunghezza d'onda:
Per visualizzare un oggetto abbiamo bisogno di lunghezze d'onda simili o minori delle dimensioni dell'oggetto stesso

Pages 4_Evento#4

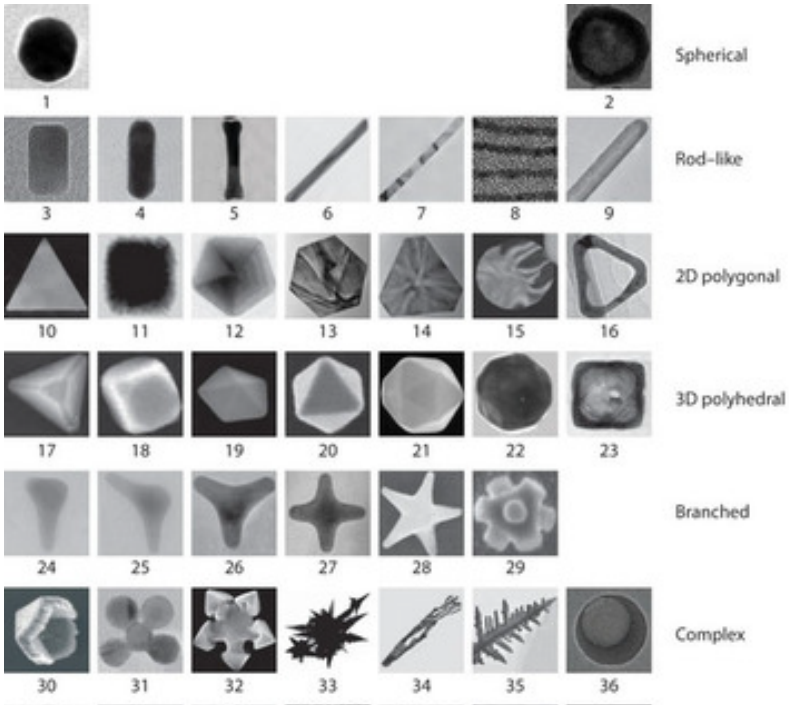
Nei laboratori di Basovizza, un gruppo di ragazzi si cimenterà con due tipologie di esperimenti (a rotazione):

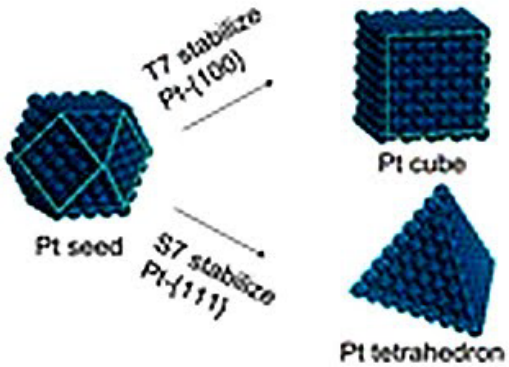
1. Caratterizzazione di **nanoparticelle d'oro** (stabilità in soluzioni saline, aggregazione, determinazione della dimensione dalle proprietà di **assorbimento della luce visibile**). Tenteremo anche un esperimento di **funzionalizzazione delle NP con molecole di DNA** e di aggregazione controllata

2. Produzione di **liposomi** a partire dalle componenti lipidiche e visualizzazione

Pages 4_Evento#4_NANOLAB_EXP#1

Exp#1: Nanoparticelle d'oro





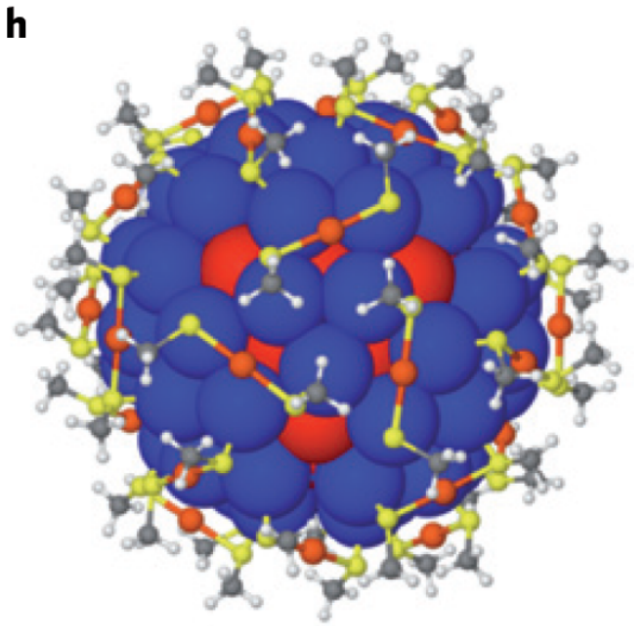
Le proprietà ottiche delle NP dipendono da:

-materiale
-dimensioni
-forma

È possibile sintetizzare particelle per esempio metalliche di dimensione e forma prestabilite, e controllare cosí le loro proprietà ottiche.

www.nhn.ou.edu/~bumm/NanoLab/ppt/nanogold.ppt

Nanoparticelle d'oro



Come tutti I nanomateriali hanno un grande rapporto superficie/volume.

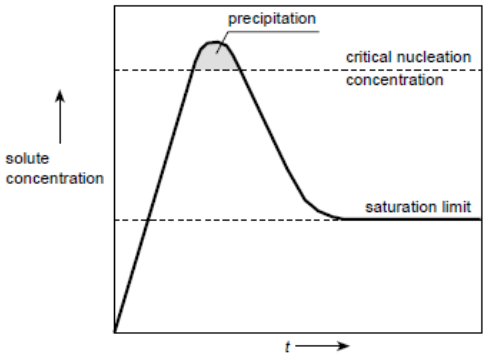
Una NP di oro di 10 nm di raggio, ad esempio, contiene circa 220000 atomi d'oro di cui circa 1/3 in superficie.
Una particella macroscopica di 100 micron, invece, ha circa S/V $1/10^4$.
A parità di unità di volume ci sono più atomi in superficie che partecipano alle possibili reazioni del nanomateriale, rendendo il processo più efficiente.

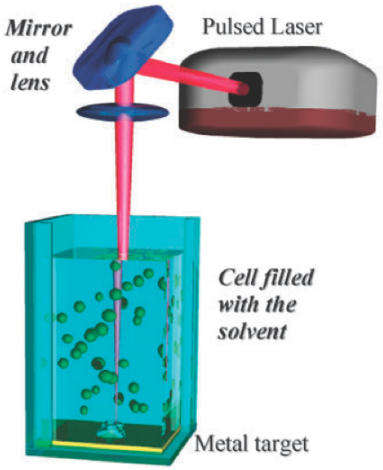
Elevato rapporto superficie/volume → Tensione superficiale

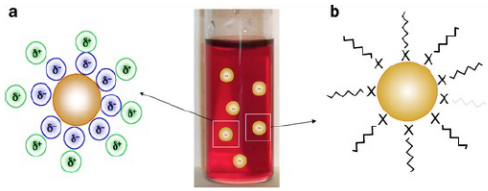
Tendenza all'aggregazione

raggio atomico Au, nm	volume atomo di Au, nm^3
0,144 [56]	0,0125

Nanoparticelle d'oro







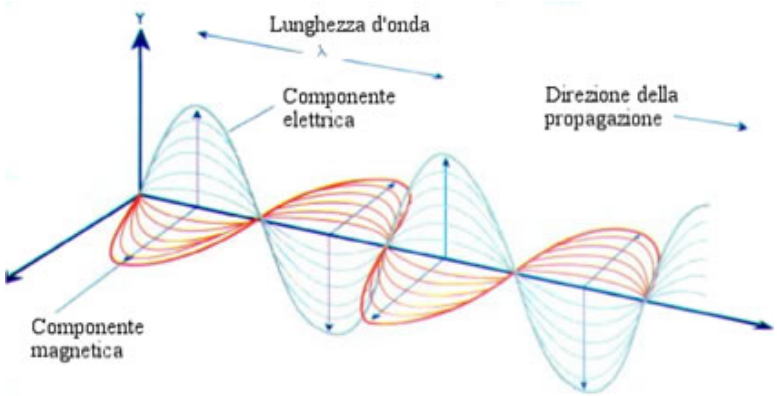
Stabilizzazione elettrostatica Stabilizzazione sterica

Come si producono le NP metalliche:

- Top-Down
  Laser Ablation
- Bottom-Up
  Sintesi chimica: si tratta di fare nucleare particelle d'oro colloidali a partire da sali d'oro (es: $HAuCl_4$) e agenti riducenti come citrati. Le AuNP prodotte hanno grande tensione di superficie che le fa aggregare. Si riduce stabilizzandole con molecole come tioli, ammine, polimeri o per via elettrostatica

https://www.youtube.com/watch?v=kOy0yuWpUzU

Frequenza di plasma dell'oro

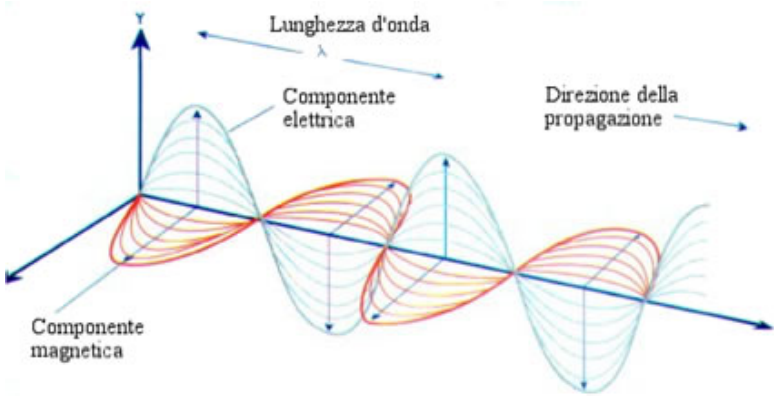


Come mai le AuNP assorbono a determinate lunghezze d'onda della luce visibile?

Secondo il modello di Drude, gli elettroni di valenza di un metallo si muovono nel metallo come un gas di elettroni liberi. "Urtano" contro gli ioni e raggiungono l'equilibrio termico con una velocità media che dipende dalla temperatura.
Applicando un campo elettrico, tutti gli elettroni di valenza del metallo si muovono in fase, in risposta al campo stesso, facendo un'oscillazione "collettiva" con una frequenza detta "frequenza di plasma", che dipende dalla densità degli elettroni di valenza del materiale, N_e.

$$\omega_P = (N_e e^2/\varepsilon_0 m_e)^{1/2}$$

Frequenza di plasma dell'oro



Come mai le AuNP assorbono a determinate lunghezze d'onda della luce visibile?

Si può vedere come il moto di una massa che risente di una forza elastica di richiamo, dovuta agli ioni. Come tale, ha una frequenza di risonanza, la frequenza plasmonica per l'appunto.

Frequenza di plasma dell'oro

Come mai le AuNP assorbono a determinate lunghezze d'onda della luce visibile?

Il campo elettromagnetico si propaga quindi nel metallo alla frequenza di plasma. Nel caso dell'oro, questa cade nel viola. Assorbendo nel viola, ci appare giallo.

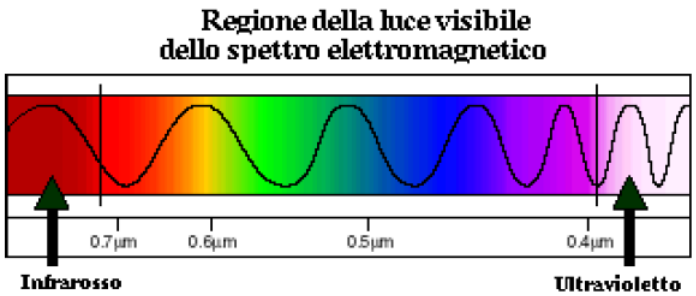
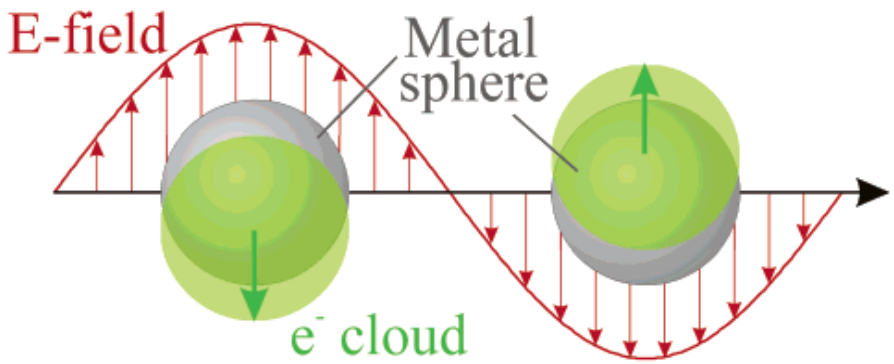
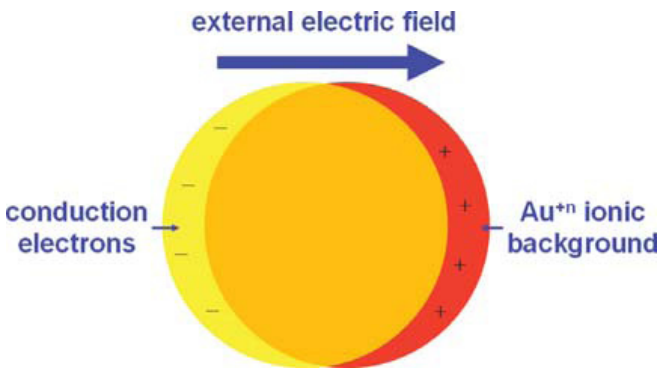


Fig. 5 La ruota dei colori complementari: in base al colore assorbito è possibile prevedere quello riflesso e viceversa

Nanoparticelle d'oro





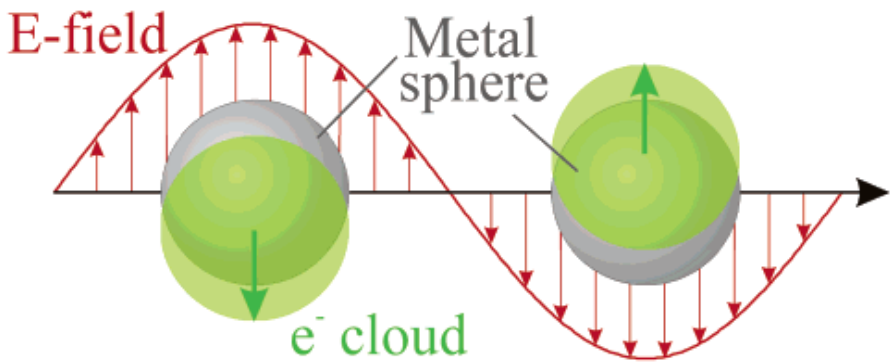
Come mai le AuNP assorbono a determinate lunghezze d'onda della luce visibile?

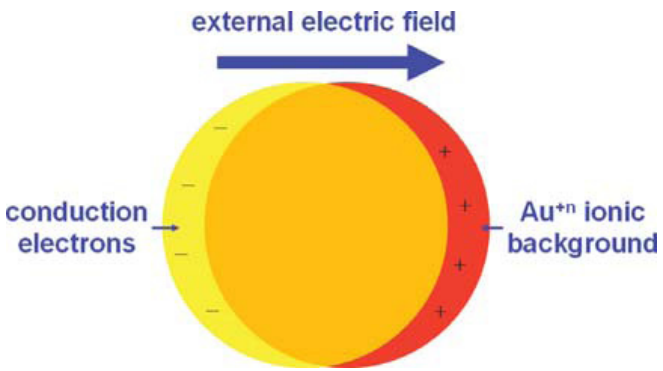
Alla nanoscala le oscillazioni collettive, plasmoniche, dipendono dal materiale ma anche dalla dimensione e dall'ambiente in cui le nanoparticelle sono immerse.

Per questo le NP si possono usare come sensori molecolari.

Il dipolo elettrico istantaneo produce uno sbilanciamento di carica che dà un effetto massa-molla che dipende dalla densità di carica di superficie, quindi da dimensione e forma della NP.

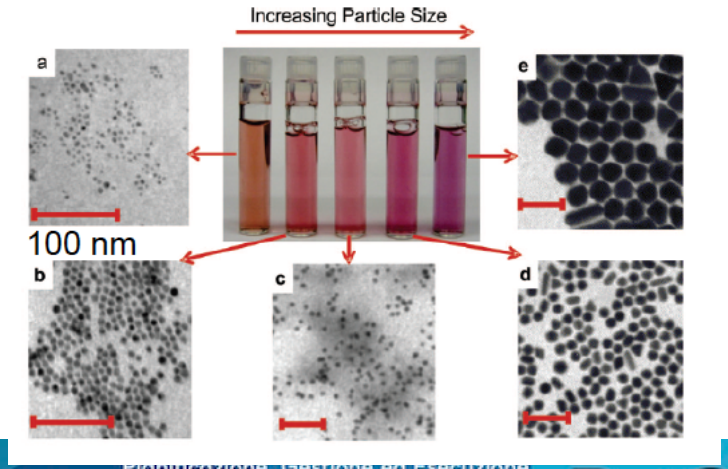
Nanoparticelle d'oro



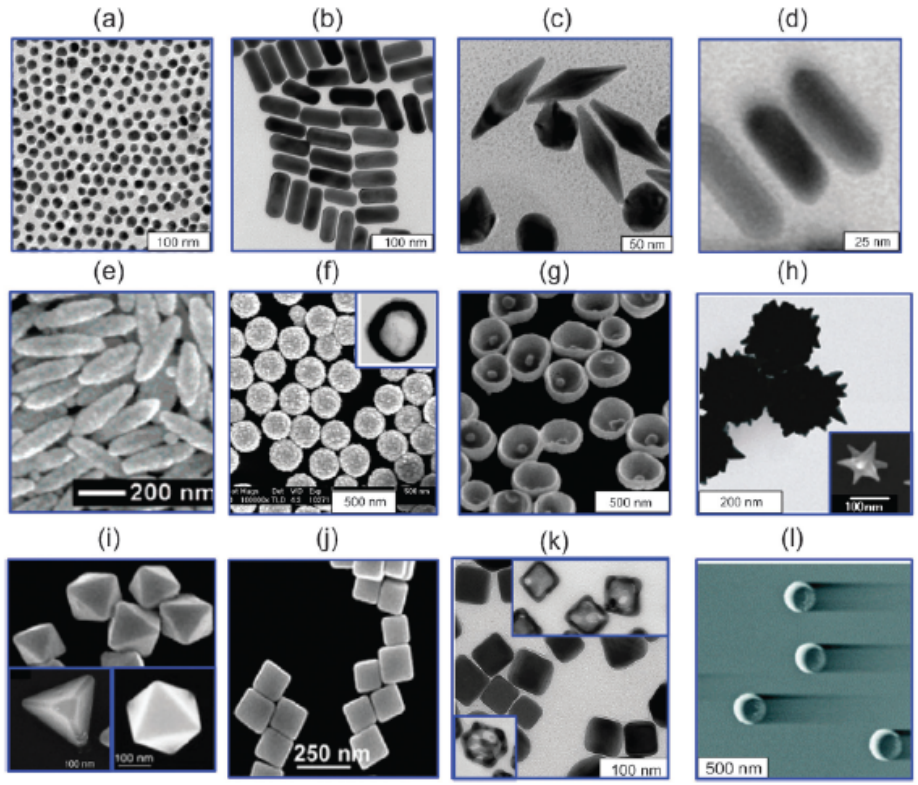


Come mai le AuNP assorbono a determinate lunghezze d'onda della luce visibile?

Queste oscillazioni di plasma danno luogo a un effetto noto come Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR), e si hanno solo quando la lunghezza d'onda della luce è molto più grande del diametro della NP.
L'interazione luce-nanomateria è in questo caso molto intensa.

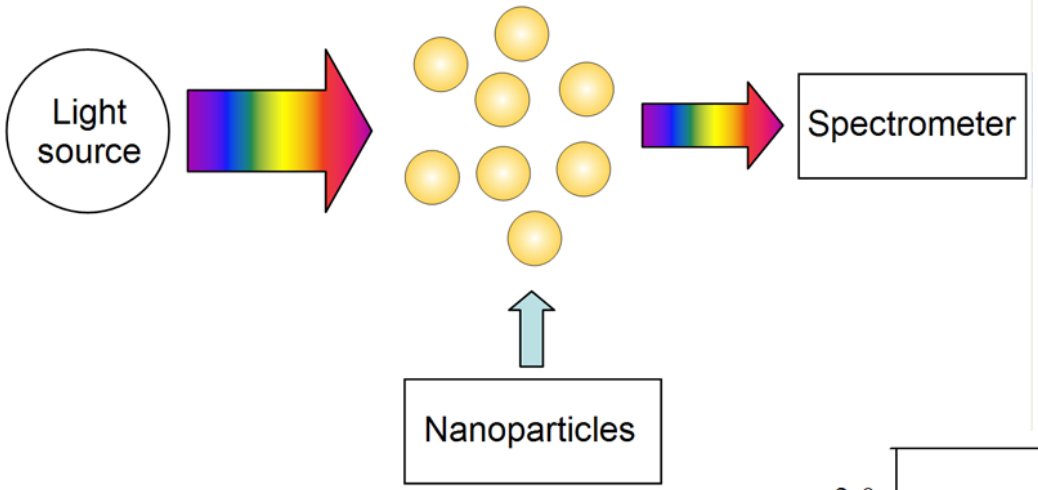


Nanoparticelle d'oro

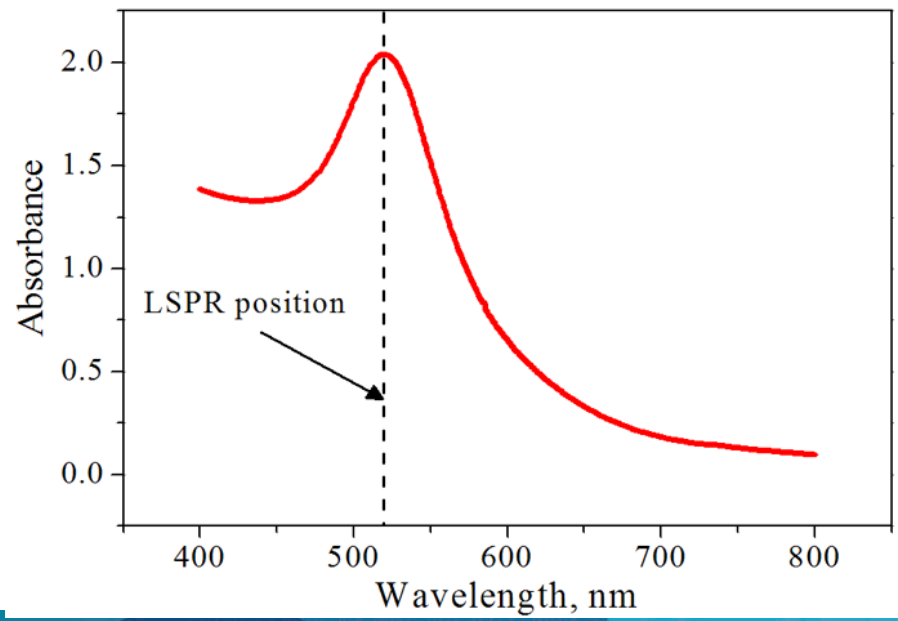


NP cave hanno frequenze di assorbimento più basse di quelle piene. NP a rod hanno due diversi modi di oscillazione, uno longitudinale a freq. bassa e uno trasversale a freq. più alta.

Analisi di dimensione di nanoparticelle d'oro

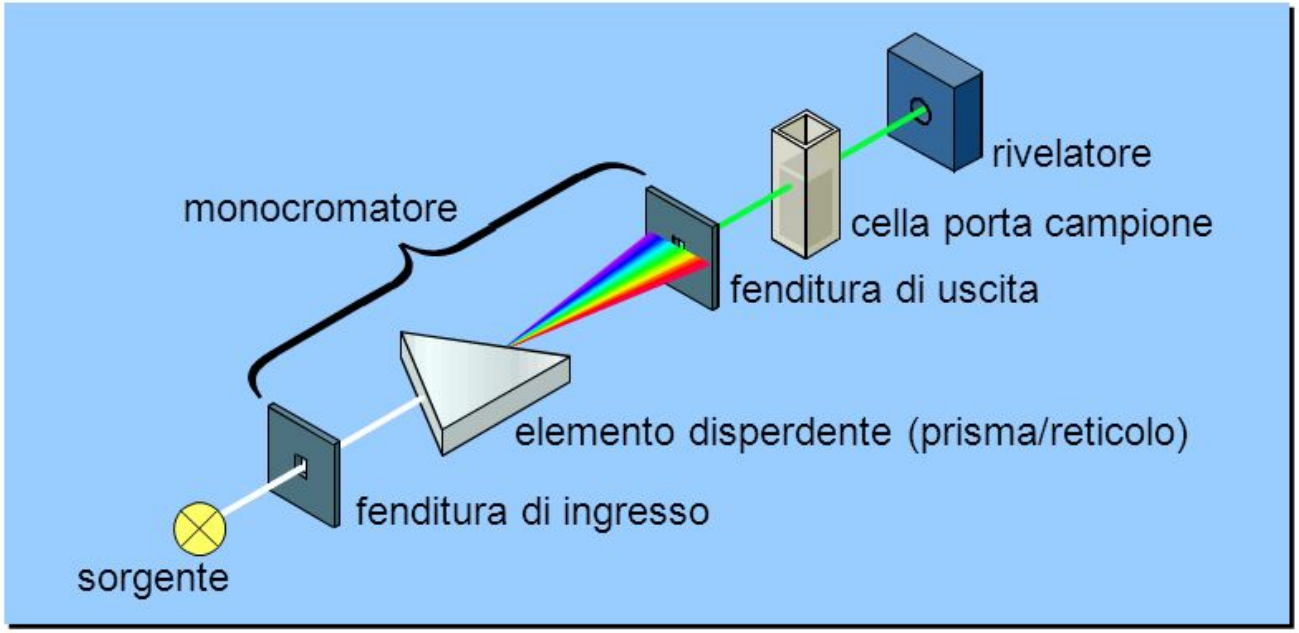


Esperimenti di assorbimento: spettrofotometro



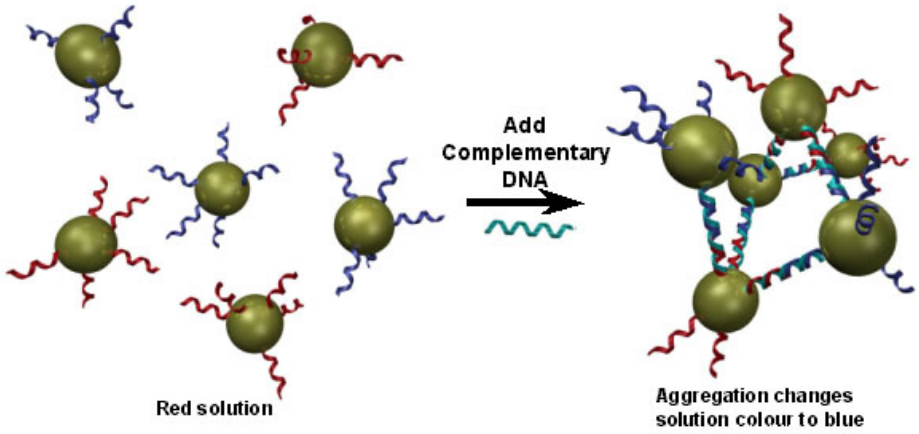
Analisi di dimensione di nanoparticelle d'oro

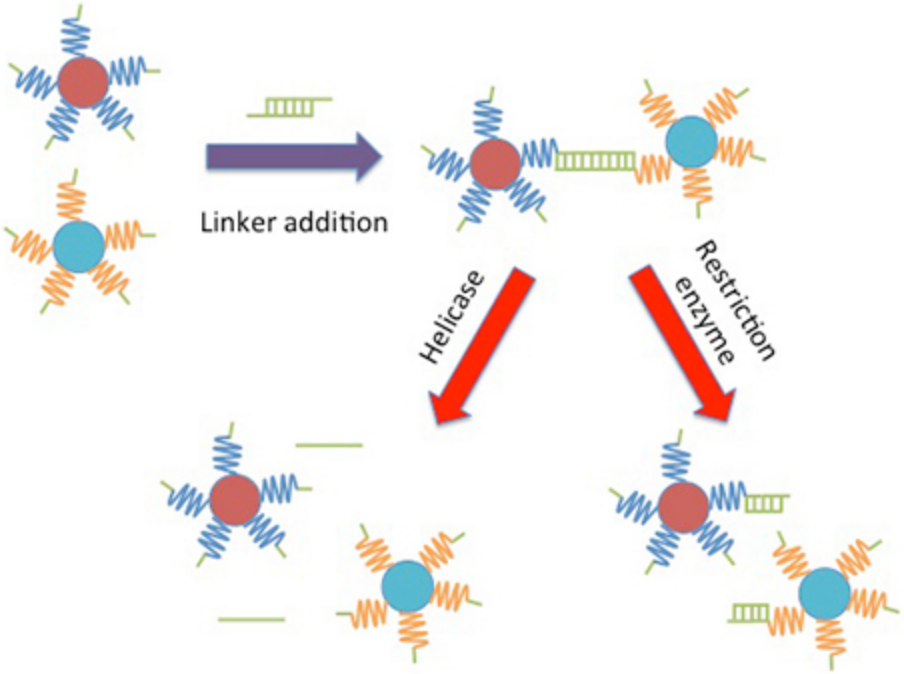
Esperimenti di assorbimento:
spettrofotometro



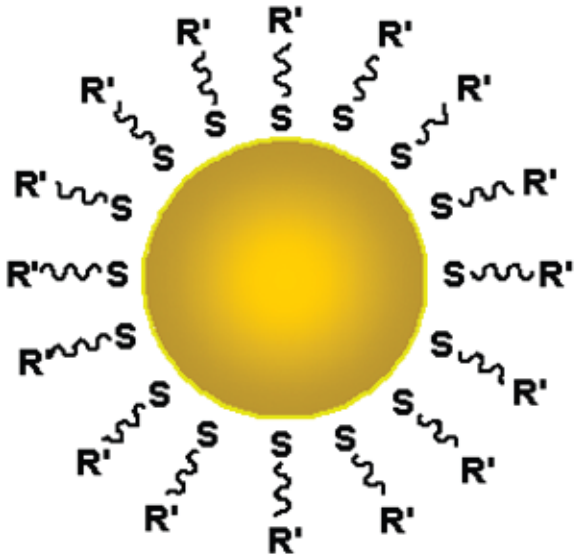
Pages 4_Evento#4_NANOLAB_EXP#1bis: Aggregazione/disaggregazione di NP

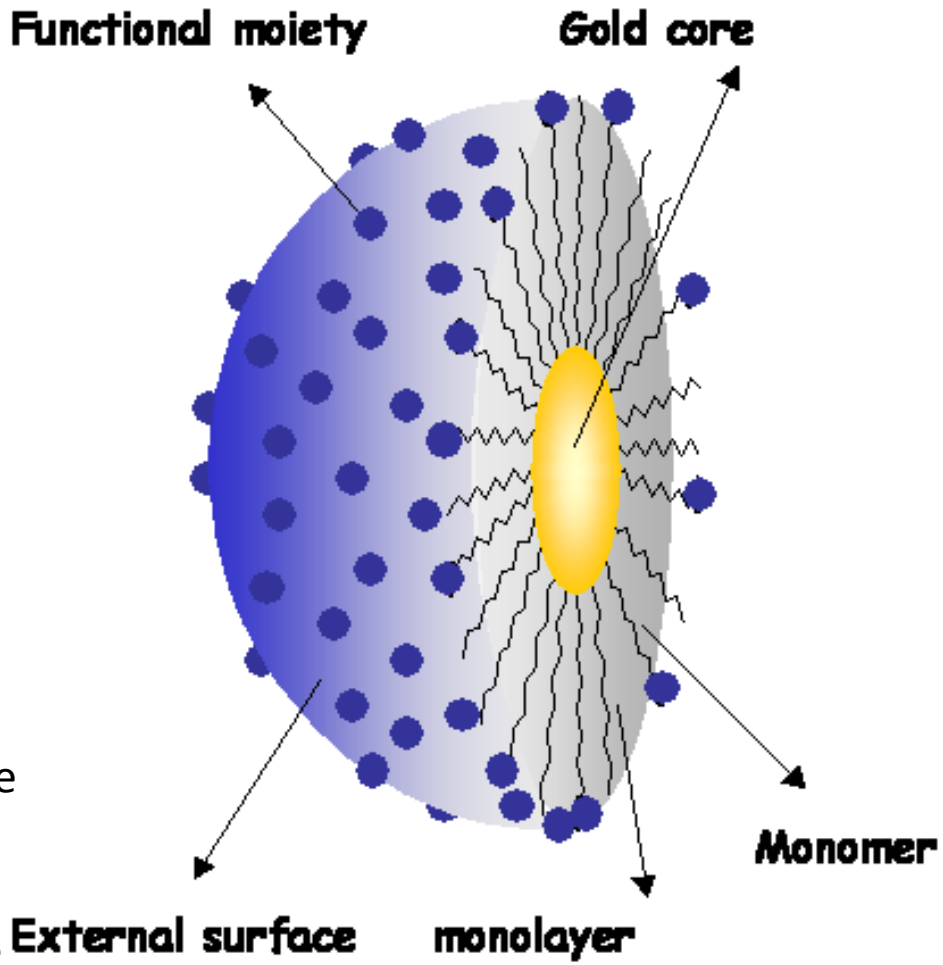
Aggregazione controllata di nanoparticelle d'oro col DNA





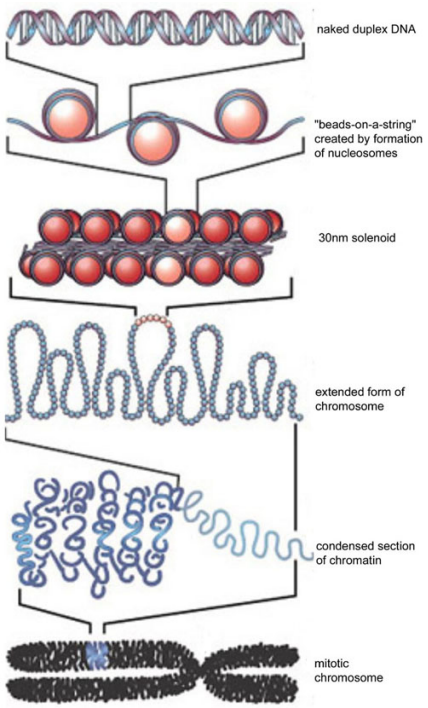
Nanoparticelle d'oro funzionalizzate





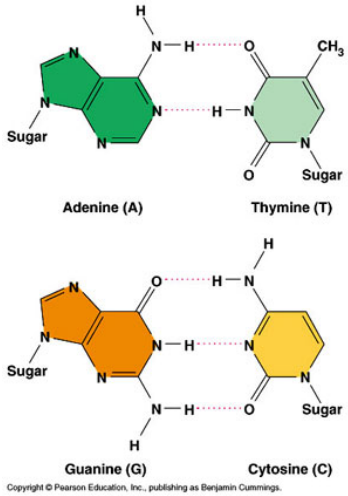
L'anima metallica:
la dimensione determina le proprietà ottiche e elettroniche del materiale
Il Self-Assembled Monolayer:
è responsabile della stabilità, della solubilità e delle interazioni delle NP con l'ambiente (funzionalità)

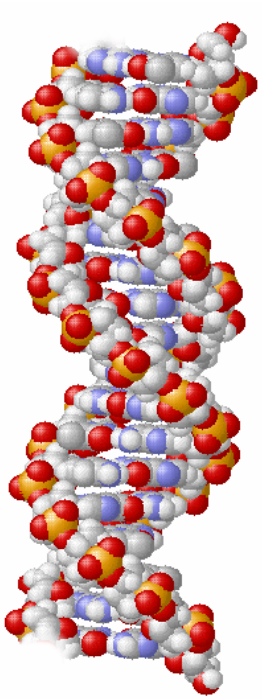
DNA paring come linker

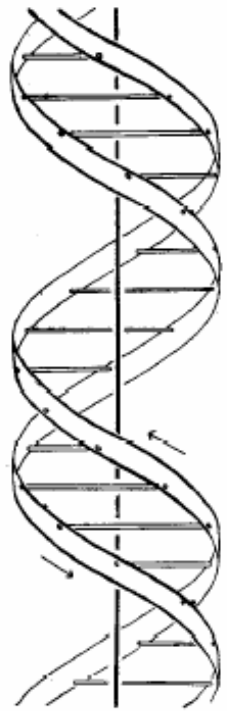


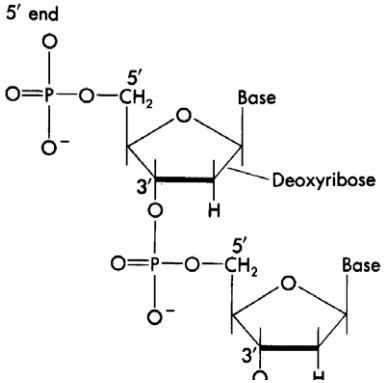
Base pairing

5' TAGACTACGCATACGCCT 3'
3' ATCTGATGCGTATGCGGA 5'

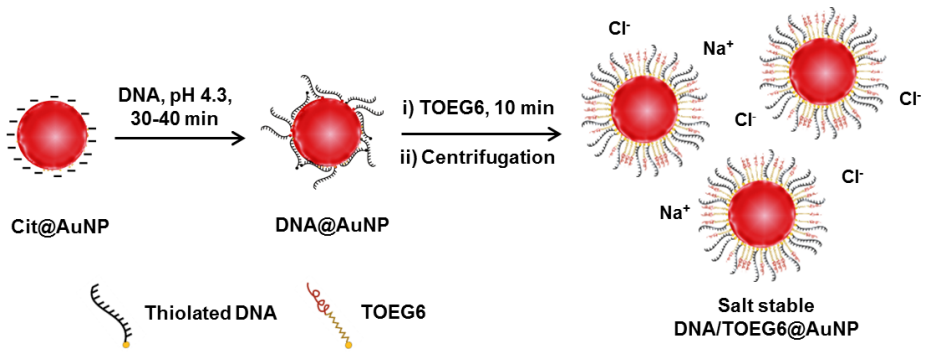




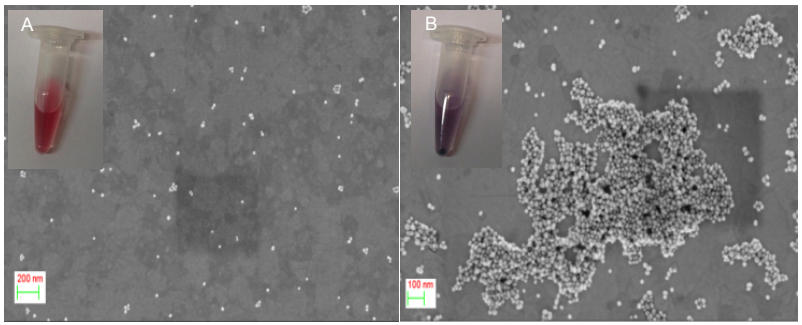


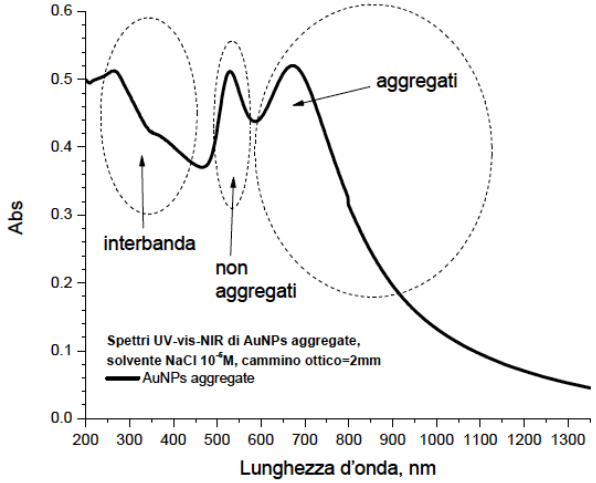


Aggregati di nanoparticelle d'oro

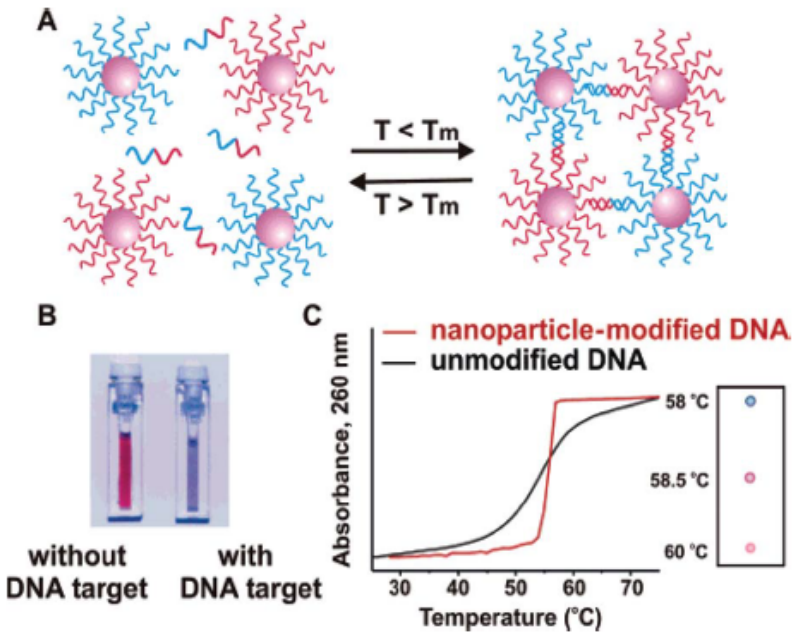


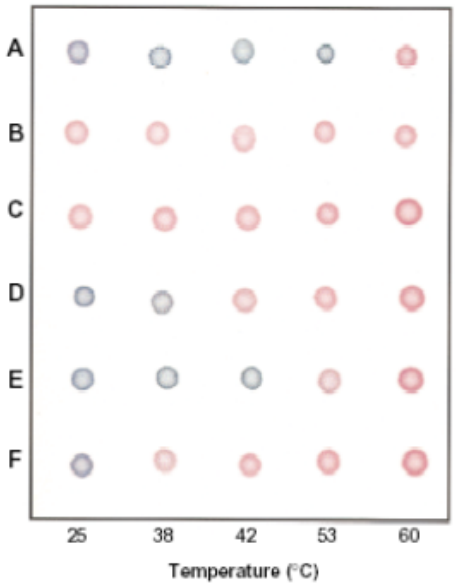
In generale, aggregati di NP si comportano come una NP più grossa.
Il DNA puo' essere utilizzato per aggregare in modo controllato le NP





Gold nanoparticles: detection

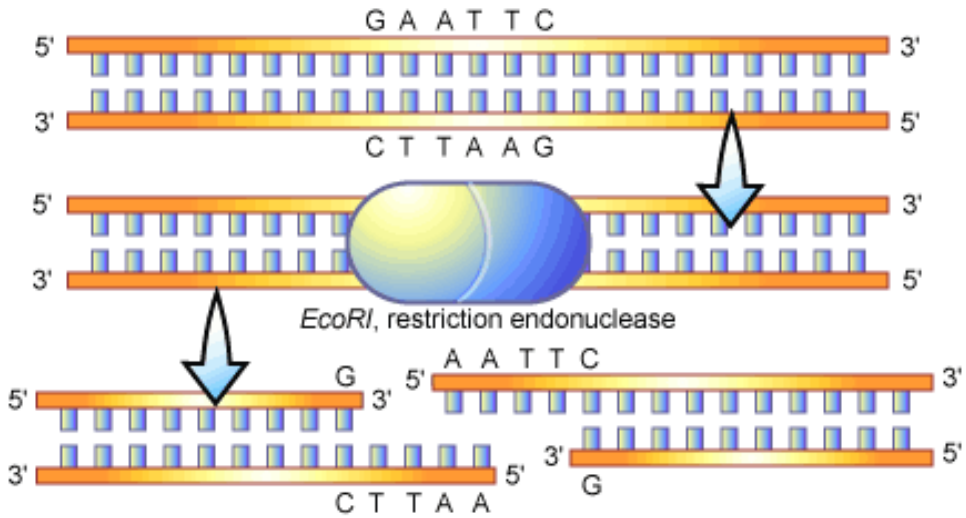


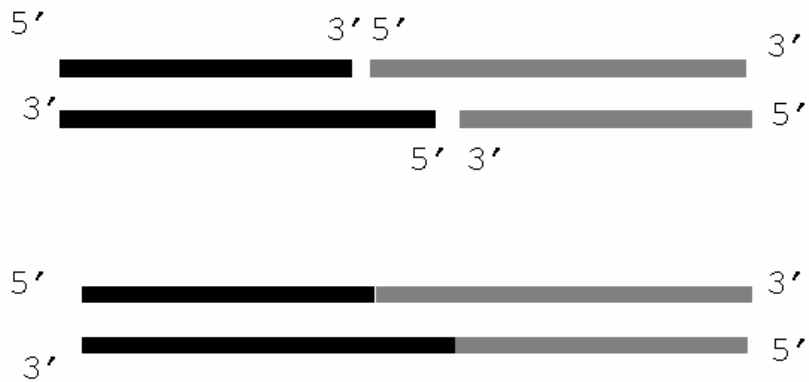


Selective polynucleotide detection for the target probes : (**A**) complementary target; (**B**) no target; (**C**) complementary to one probe; (**D**) a 6-bp deletion; (**E**) a 1-bp mismatch; and (**F**) a 2-bp mismatch. Nanoparticle aggregates were prepared in a 600-µl thin-walled Eppendorf tube by addition of 1 µl of a 6.6µM oligonucleotide target to a mixture containing 50 µl of each probe (0.06 µM final target concentration). The mixture was frozen (5 min) in a bath of dry ice and isopropyl alcohol and allowed to warm to room temperature. Samples were then transferred to a temperature controlled water bath, and 3-µl aliquots were removed at the indicated temperatures and spotted on a C_{18} reverse phase plate.

Operazioni sul DNA

- **restriction enzymes:**
cut DNA at specific sequences
- **ligases:**
link two DNA pieces covalently
- **helicase:**
unwinds DNA
- **topoisomerases:**
Change topology (linking, winding number)
- **DNA/RNA polymerases:**
make copies
- **DNA binding proteins:**
help in recombination, function as transcriptional modulators, etc.



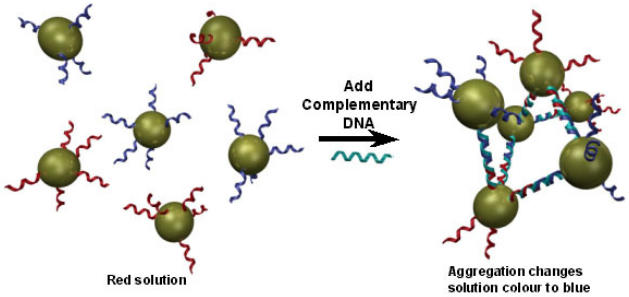


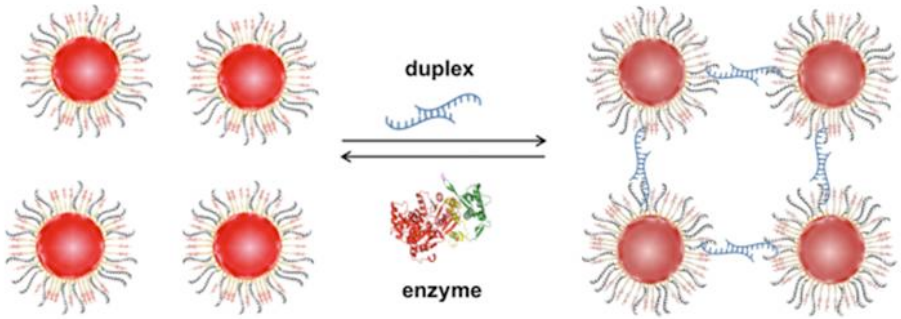
Ligation of sticky ends

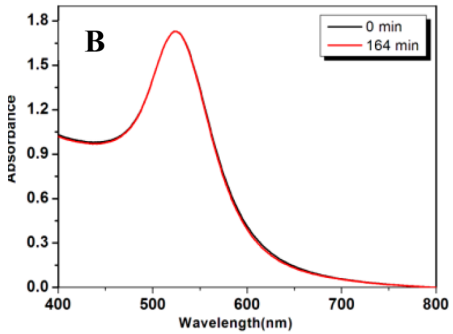
Courtesy of Friedrich C. Simmel, LMU, Munich

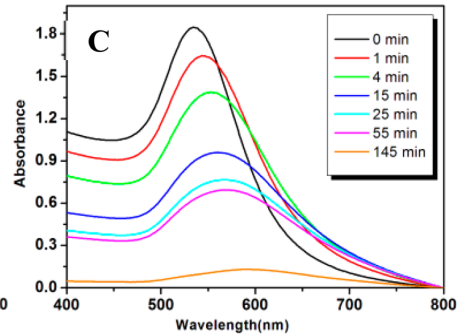
Aggregati di nanoparticelle d'oro

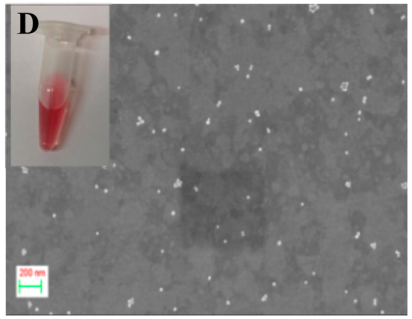
Formazione di assemblati di NP: diminuizione del picco a 524 nm,
aumento del picco a 650 nm

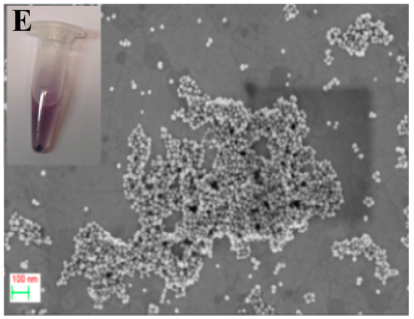




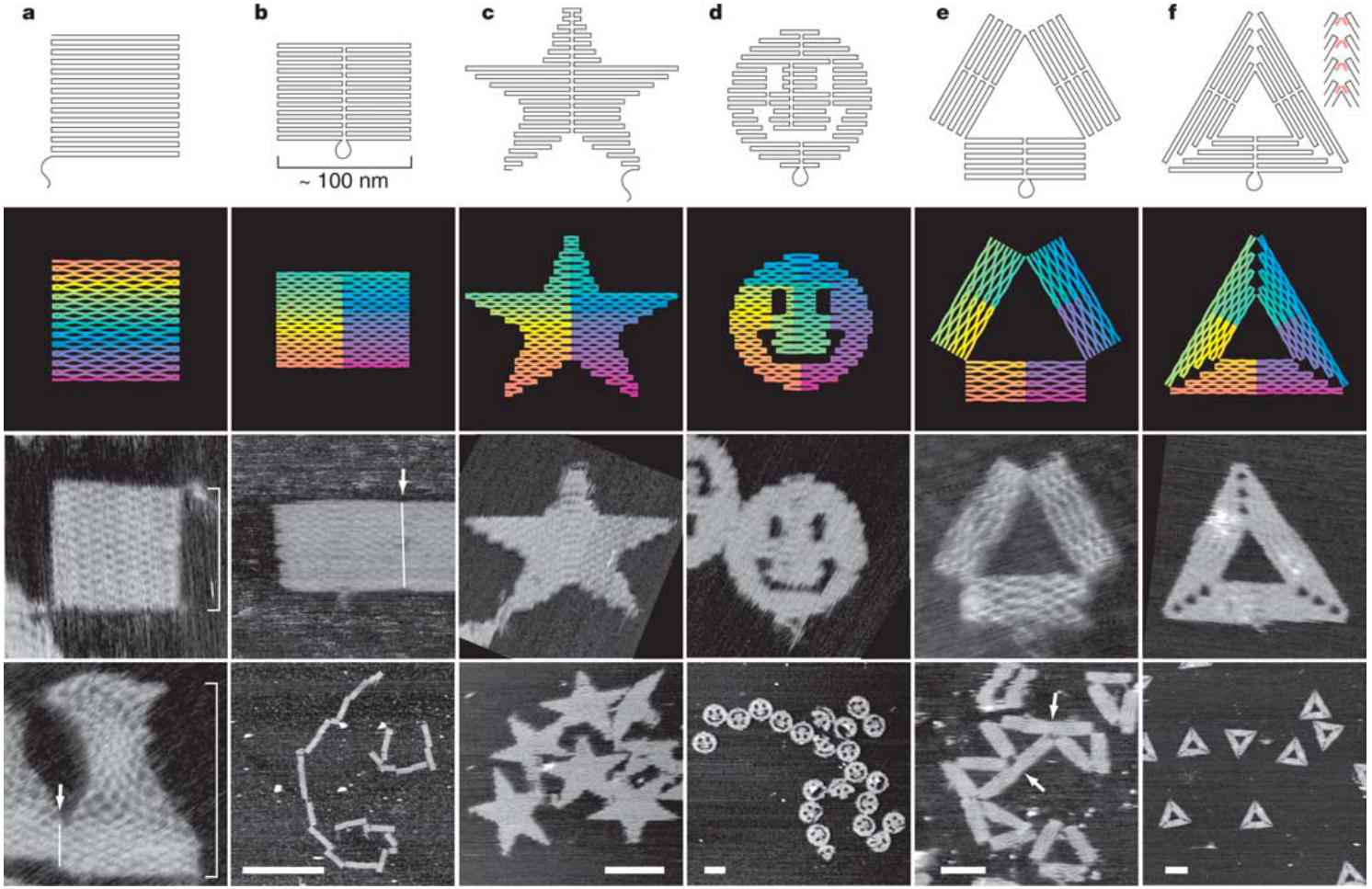








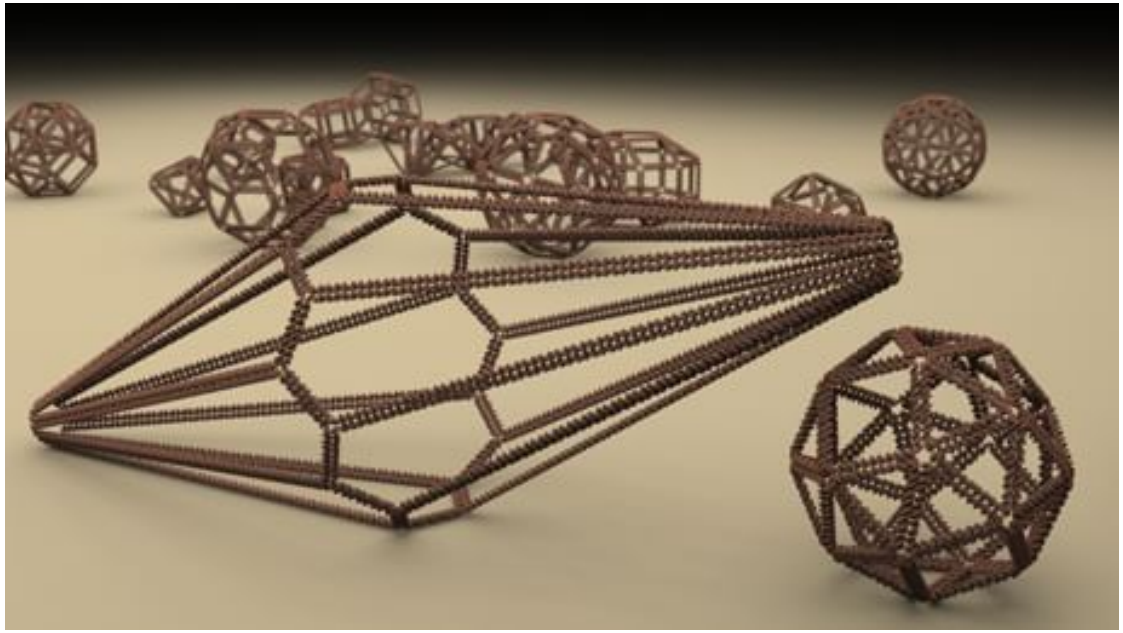
DNA Origami



https://www.youtube.com/watch?v=Trg2__Lgnc0

DNA Origami

L'evoluzione ha dotato il DNA di una capacità straordinaria di **codificare le informazioni**: **un solo grammo di DNA** può memorizzare circa **700 terabyte**, cioè 700.000 gigabyte d'informazione, corrispondente a circa 14.000 Blu-ray disc.
E questo può durare milioni di anni, come dimostrano le ricerche di recupero e di sequenziamento del DNA di antiche specie animali e vegetali.
Ecco perché, una delle applicazioni più interessanti, anche se di là da venire, degli origami a DNA è la memorizzazione di dati. (Le Scienze, 2016)

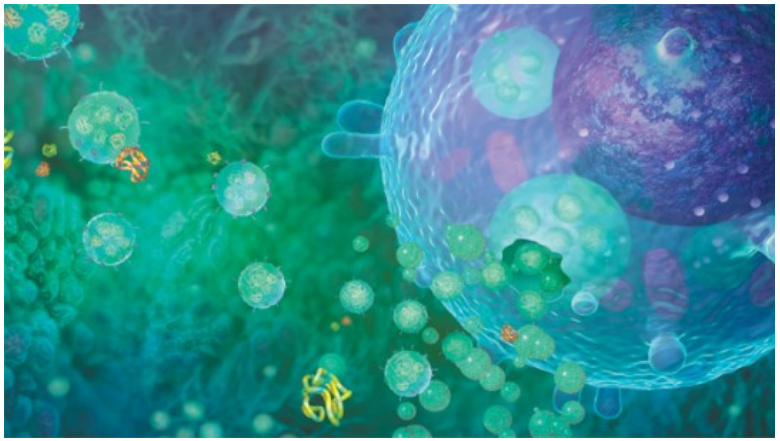


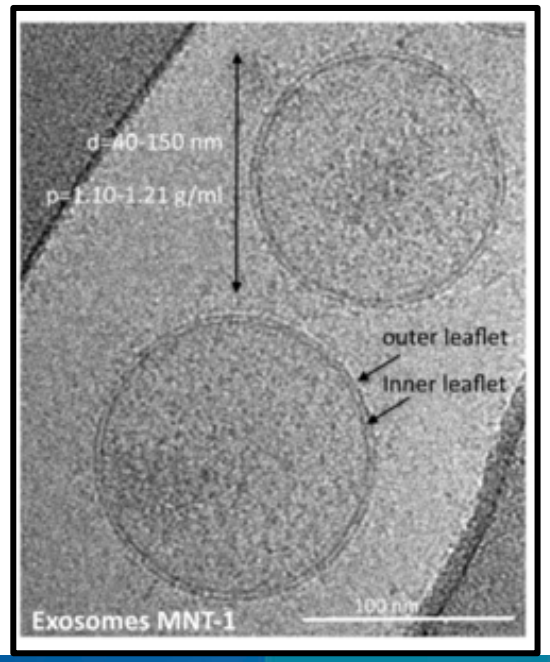
Pages 4_Evento#4_NANOLAB_EXP#2

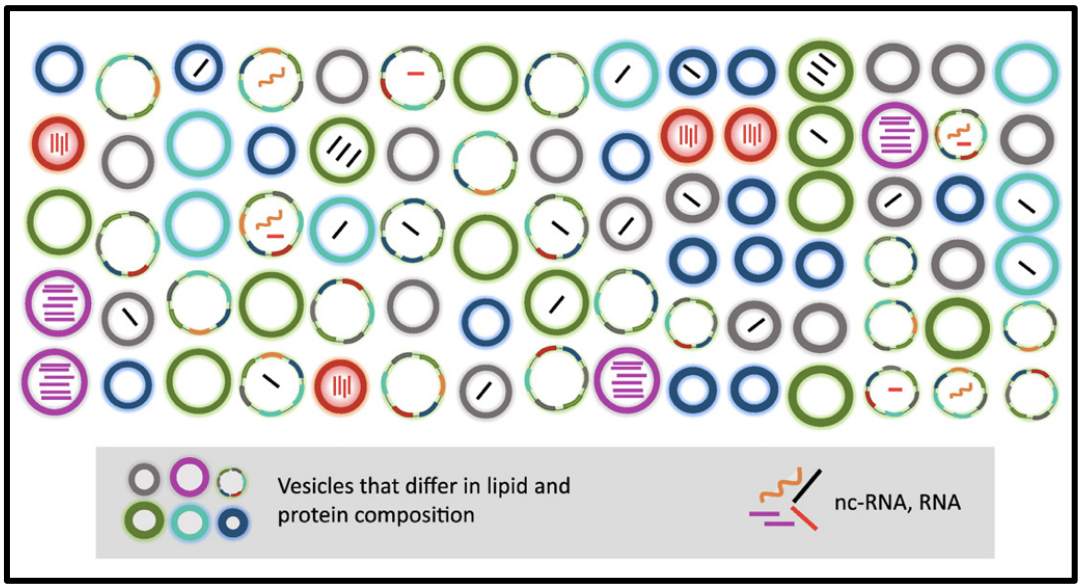
Le promesse della nanomedicina

Esosomi

Esiste una famiglia di liposomi naturali, di dimensioni "nano" (tra 20 e 200 nm) chiamati **ESOSOMI** che sfugge al sistema immunitario e che ha un ruolo fondamentale nello scambio di molecole tra cellule nel corpo

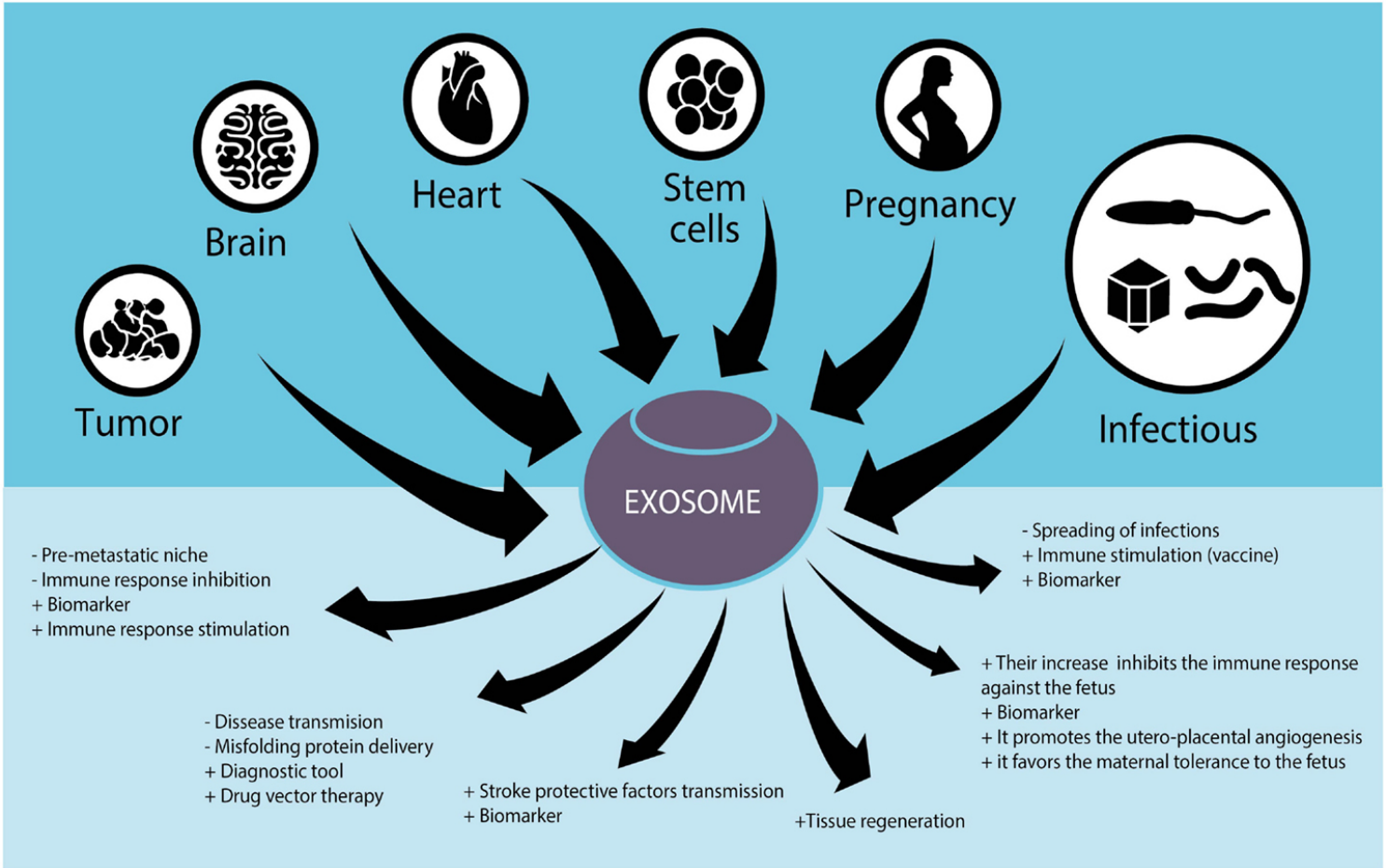




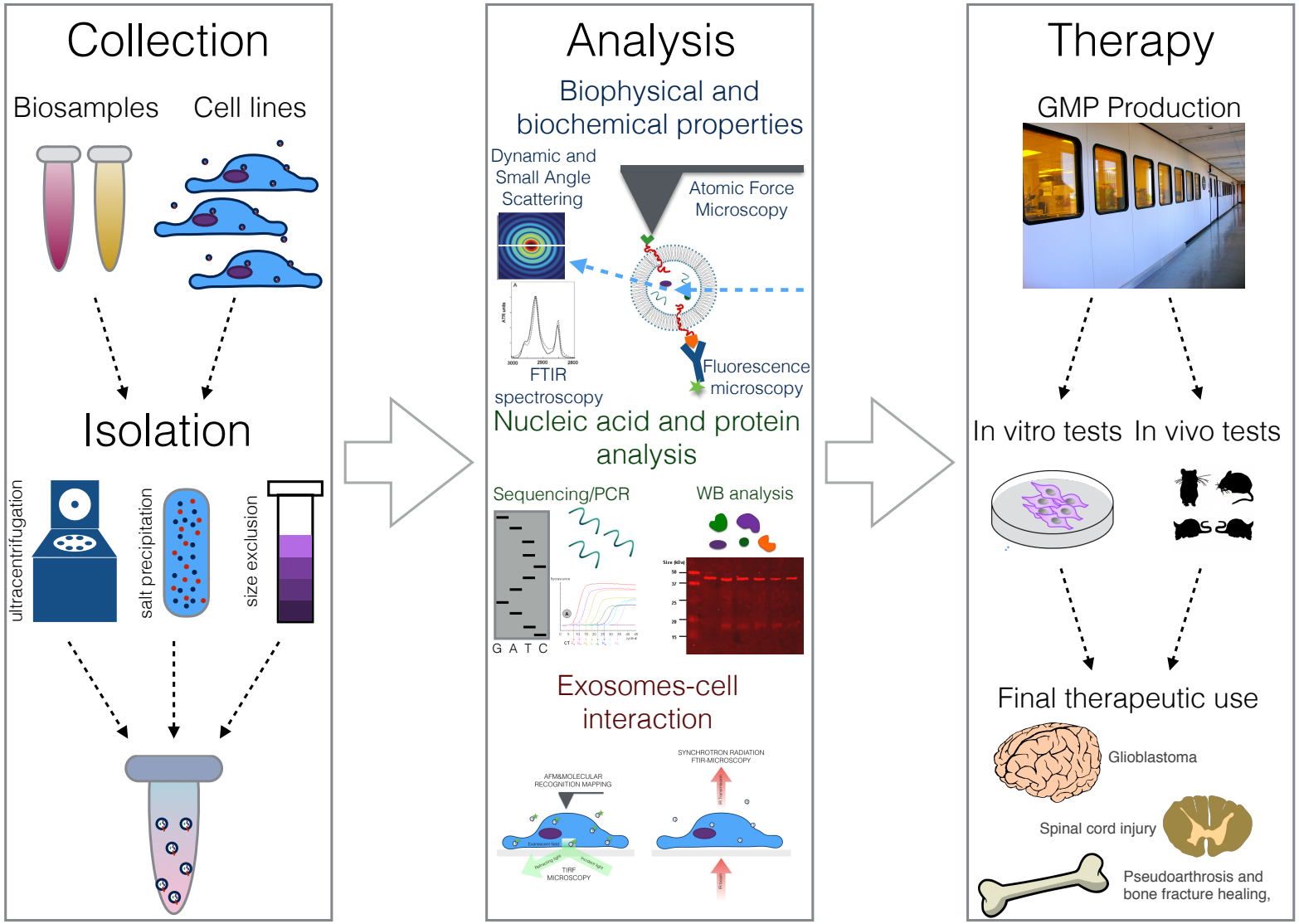


Le promesse della nanomedicina

Esosomi



Liposomi, esosomi e nanoparticelle a ELETTRA



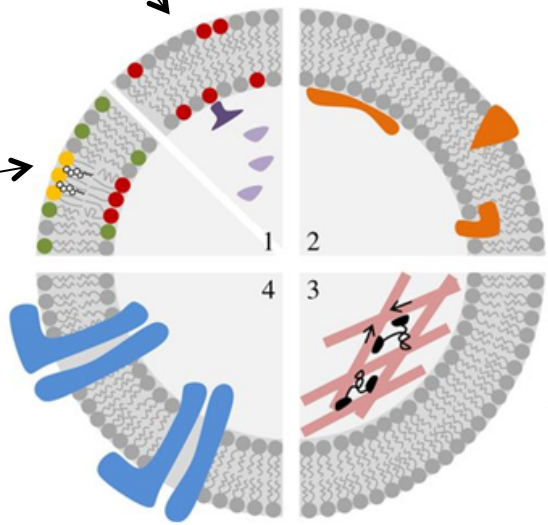
Liposomi come sistemi di trasporto biomimetici

I liposomi possono essere formati in vitro con composizioni lipidiche controllate e in intervalli di dimensioni discrete

Incorporazione di proteine purificate per studiare la loro capacità e specificità di legarsi ai lipidi

Le proteine possono essere esaminate e studiate sulla loro capacità di indurre o affinità verso la curvatura della membrana

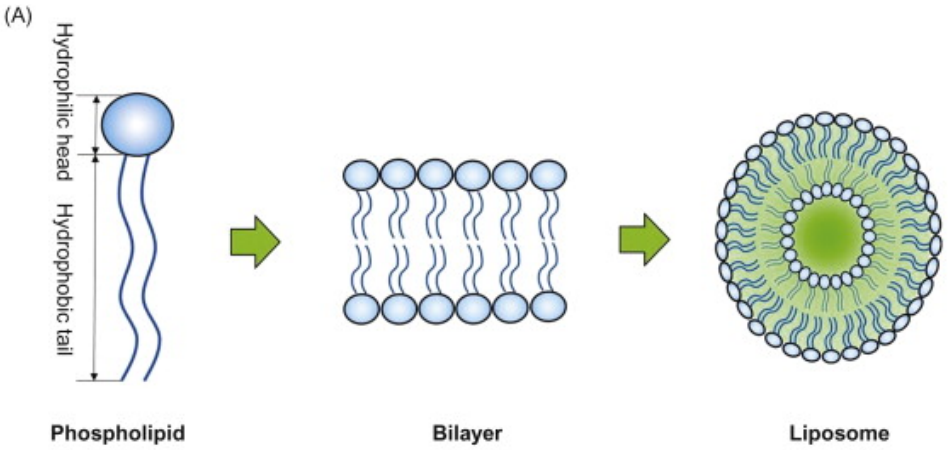
I liposomi possono anche essere ottenuti dalle cellule, permettendo lo studio delle proprietà della membrana



Metodi avanzati consentono l'incorporazione di complessi proteici transmembrana, ad es. canali ionici o trasportatori

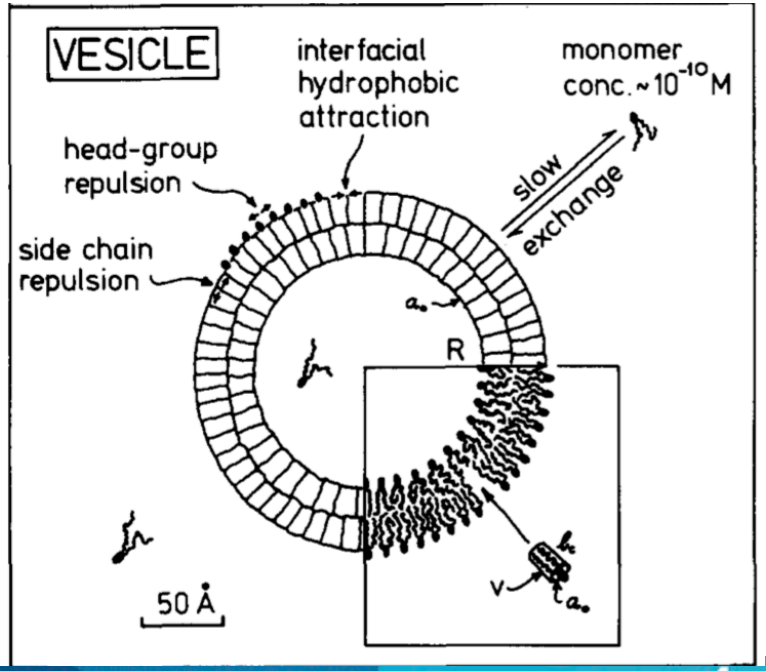
Le caratteristiche citoscheletriche possono essere ricapitolate in sistemi minimi, ad es. una rete acto-miosina alla membrana

Liposomi



I fosfolipidi hanno un gruppo di testa idrofilo e due lunghe code idrofobiche che li rendono poco solubili in acqua a meno che non si autoassemblino in bilayer.
Il principio base alla base della formazione dei liposomi, indipendentemente dal metodo di preparazione, è l'interazione idrofila / idrofobica tra le molecole lipidi-lipidi e lipidi-acqua.

L'immissione di energia (ad esempio sotto forma di sonicazione, omogeneizzazione, riscaldamento, ecc.) determina la disposizione delle molecole lipidiche, sotto forma di vescicole a doppio strato lipidico, per ottenere un equilibrio termodinamico nella fase acquosa. Tale energia aggiuntiva è necessaria per compensare il costo energetico necessario per curvare il doppio strato lipidico fino a richiudersi su se stesso.



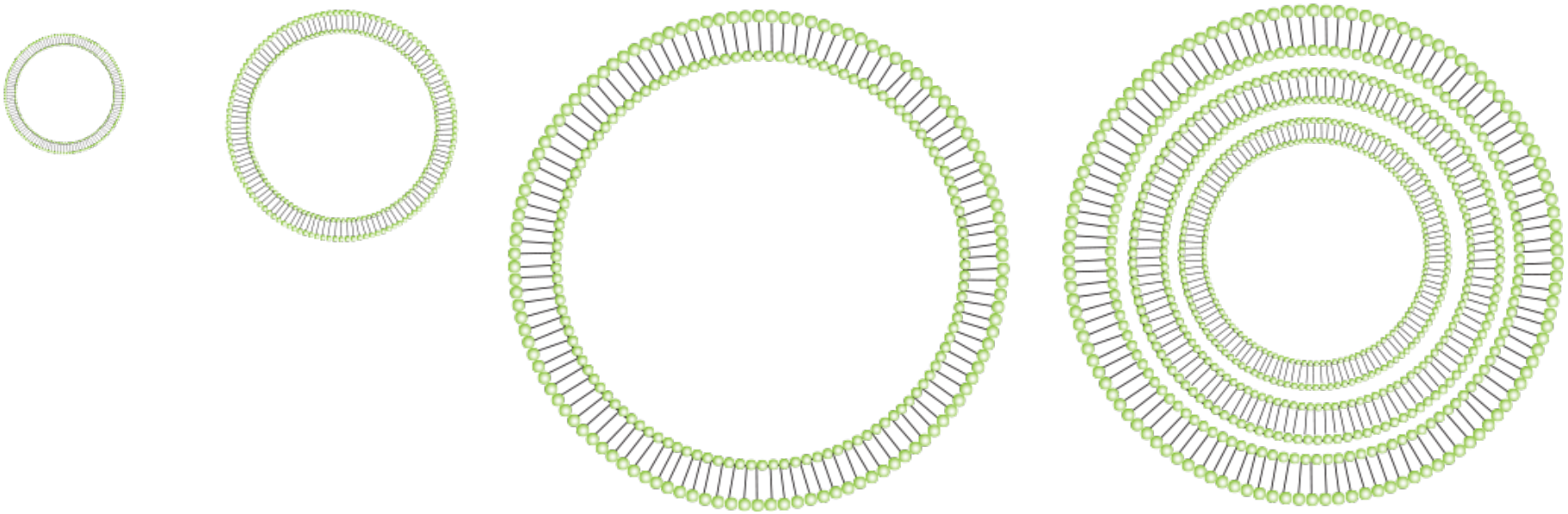
Liposomi: classificazione

Small Unilamellar Vesicle (SUV) <100 nm

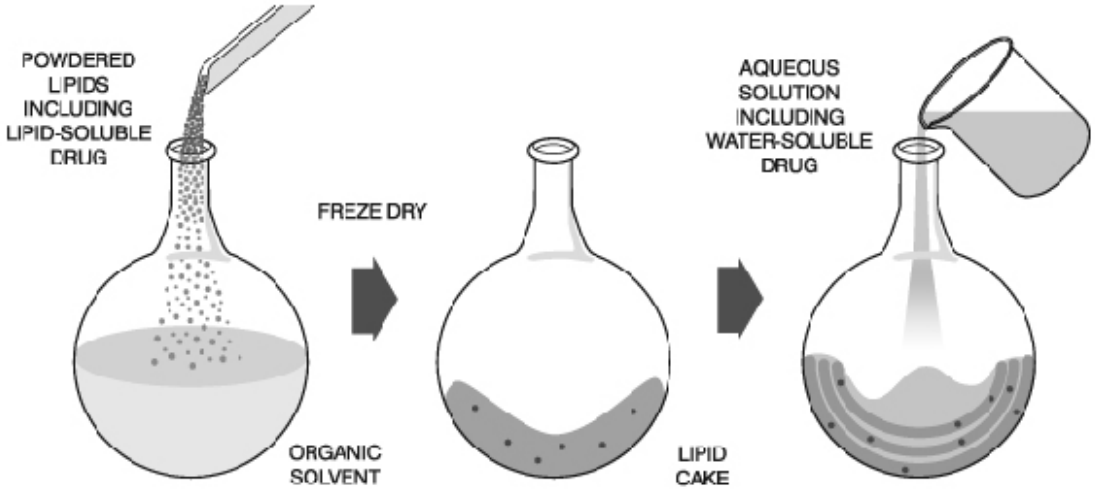
Large Unilamellar Vesicle (LUV) 100-1000 nm

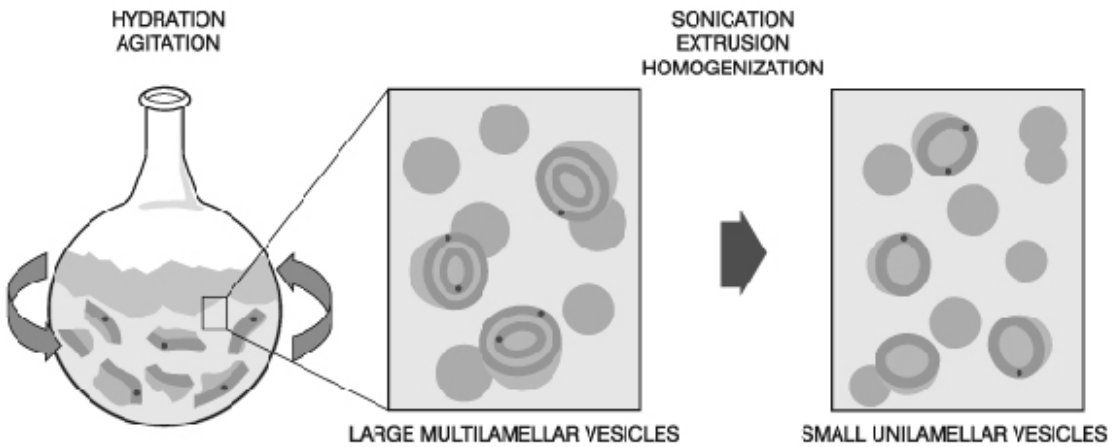
Giant Unilamellar (GUV) >1 µm

Multilamellar

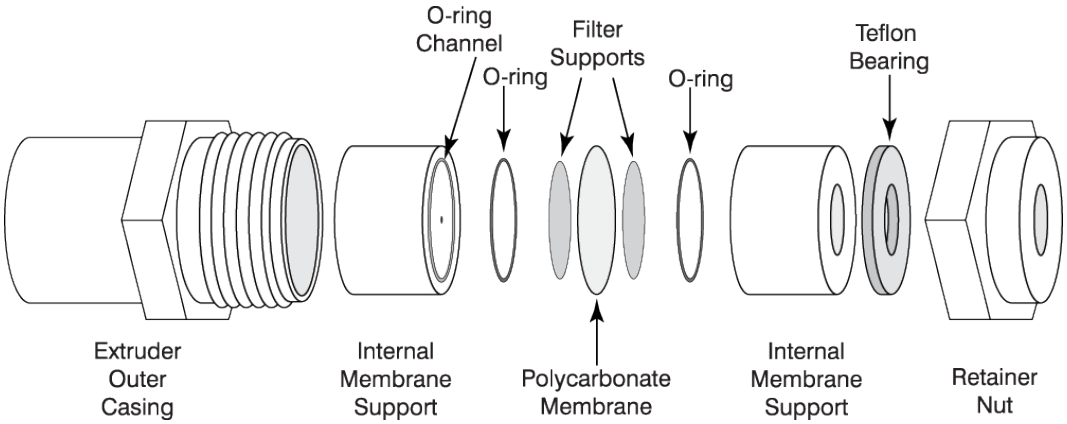


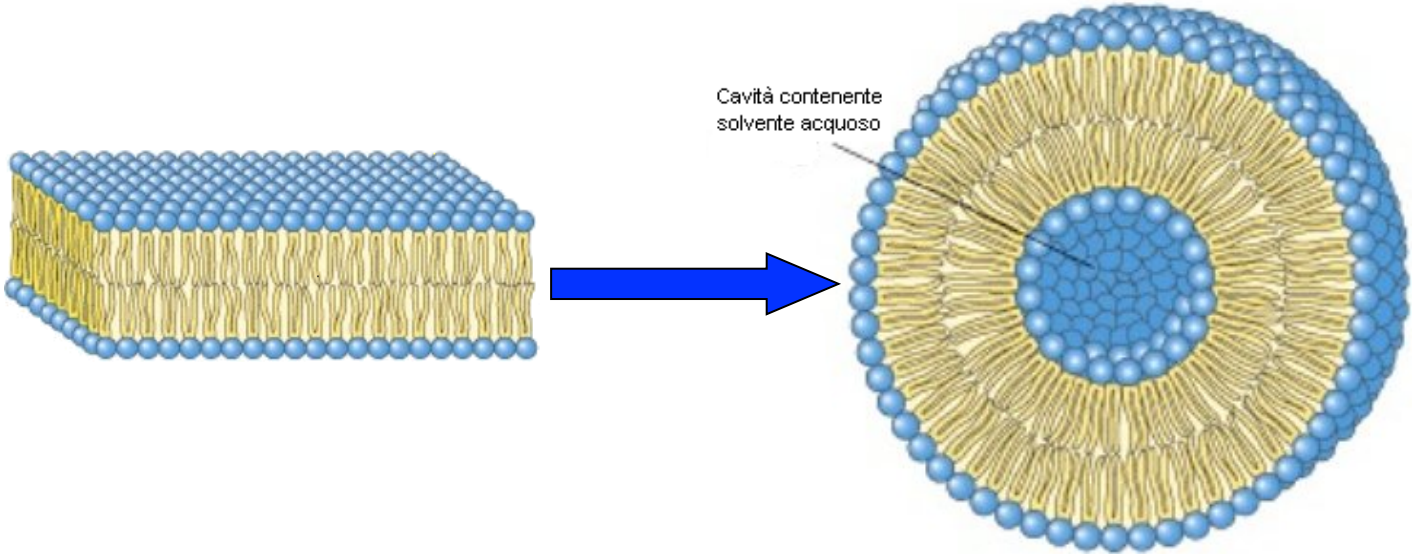
Preparazione liposomi (SUVs)

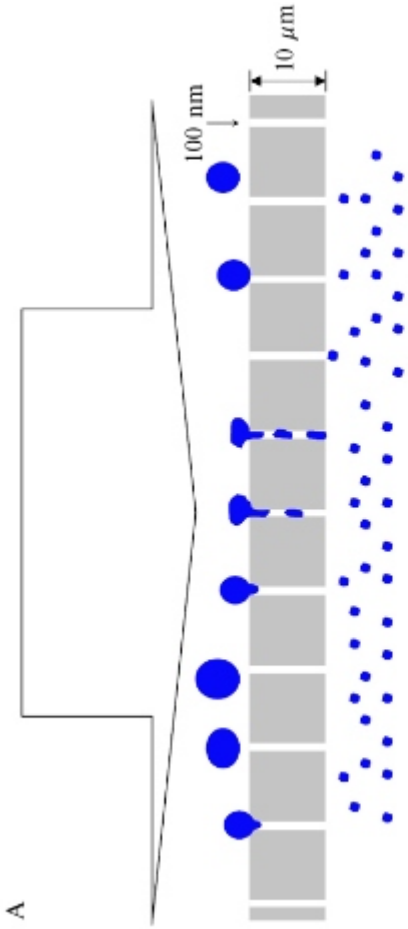




Estrusione liposomi

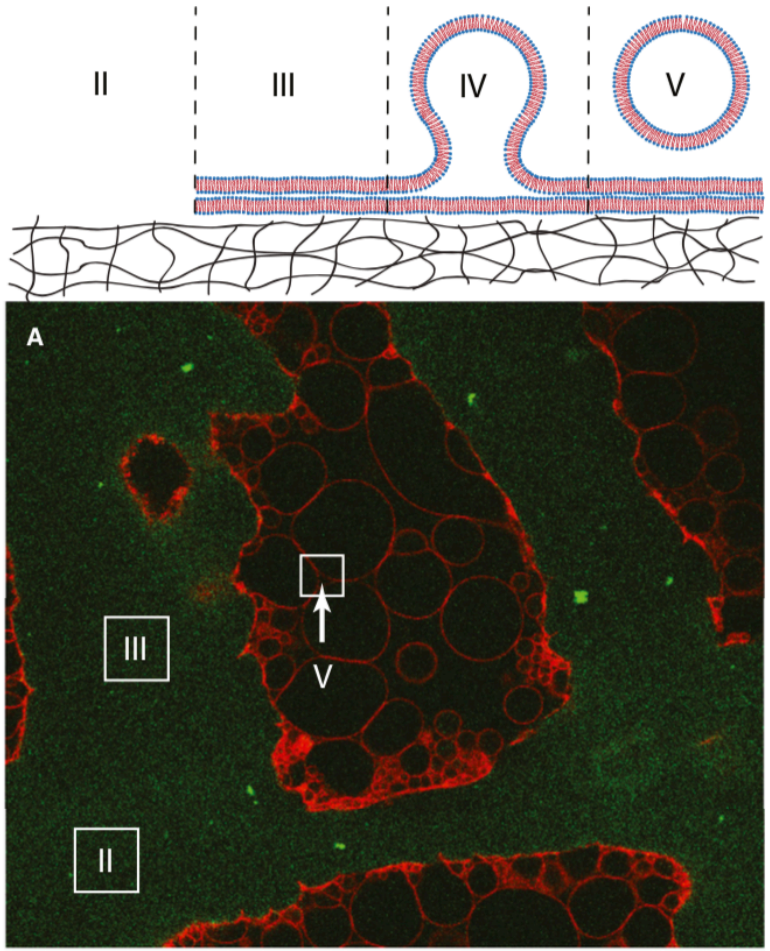


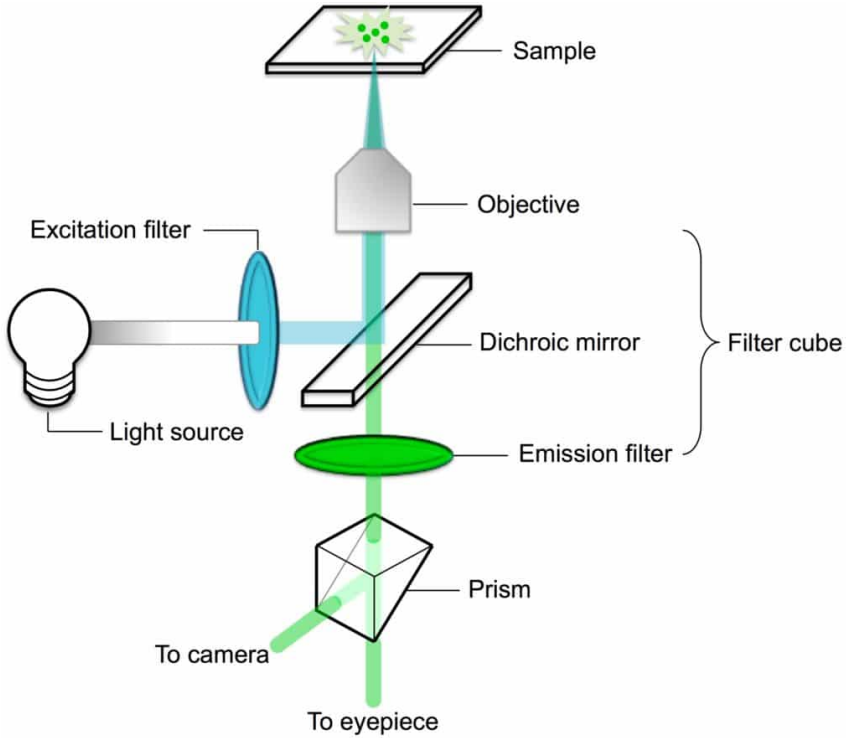




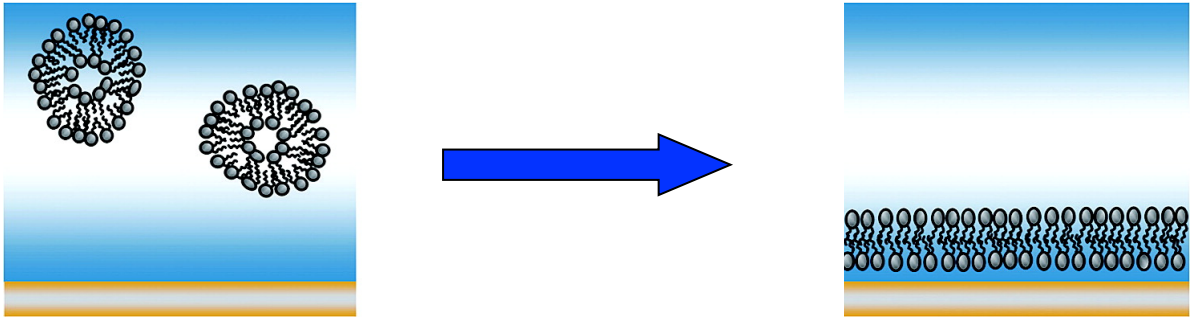
Liposomi, esosomi e nanoparticelle a ELETTRA

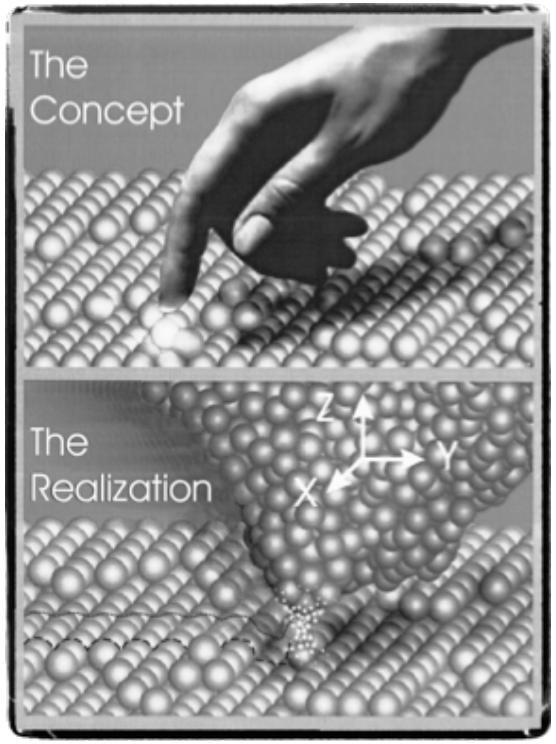
GUVs e microscopia a fluorescenza



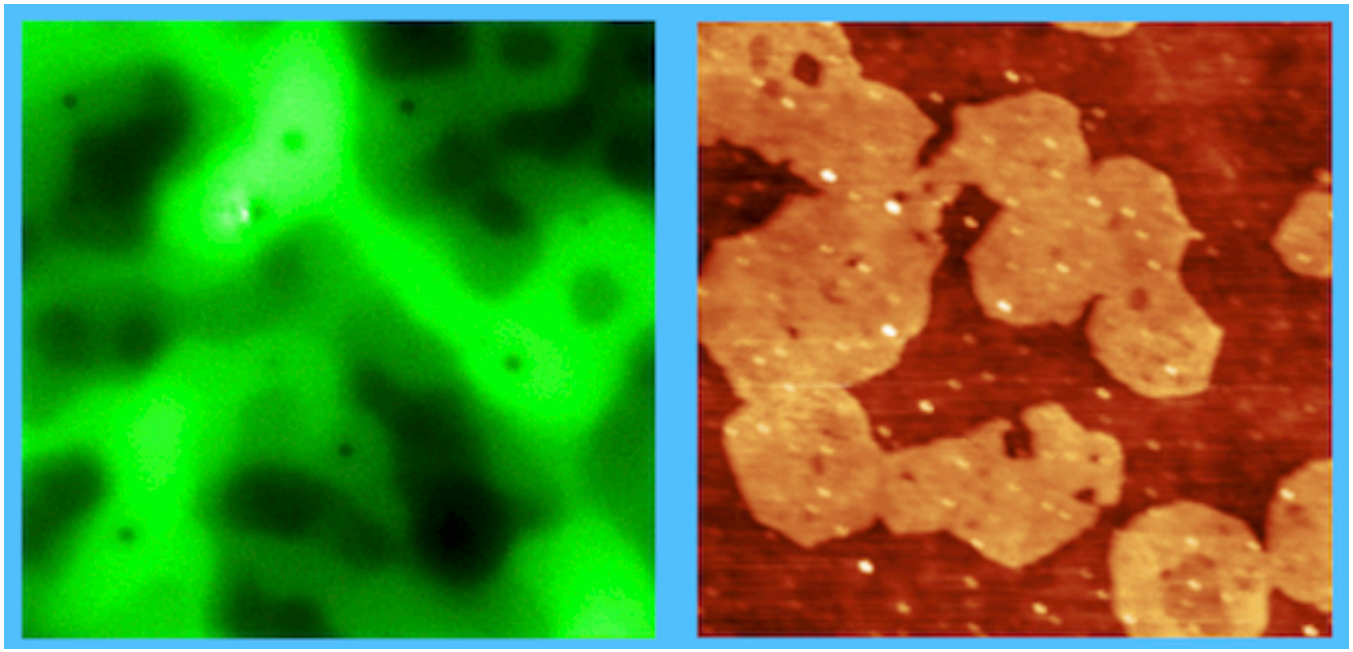


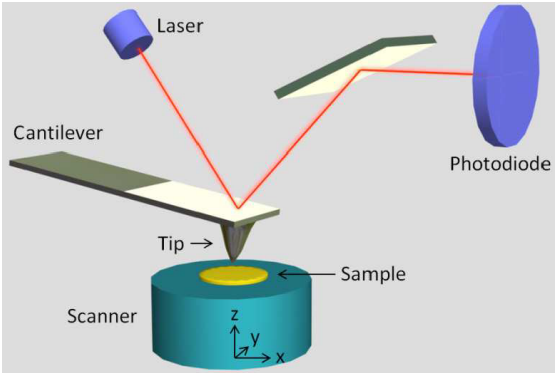
Liposomi per formare membrane modello





Microscopia a fluorescenza Microscopia a forza atomica





CERIC

PaGES4

Pianificazione, Gestione ed esecuzione di un Esperimento Scientifico in un centro di ricerca internazionale

Interreg Italia-Österreich
European Regional Development Fund

EUROPEAN UNION

EXOTHERA