APPLICAZIONI BIOLOGICHE DELLE NANOPARTICELLE D’ORO

Le nanoparticelle d’oro con diametri che variano dai pochi a diverse centinaia di nanometri (2-250 nm) sono preparate per riduzione di un sale di oro (III), per esempio AuCl3. La reazione di riduzione e la contemporanea nucleazione in nanoparticelle è svolta di solito in presenza di un agente stabilizzante. Si tratta di solito di una molecola carica (vedi figura parte grigio) che circonda la nanoparticella e fa in modo che esse si respingano e rimangano distanti. Queste molecole stabilizzatrici hanno un’estremità che è adsorbita o chimicamente legata alla superficie d’oro, mentre l’altra estremità è rivolta verso la soluzione.



Figura 1 Schema di una nanoparticella d'oro, dell'agente stabilizzante e di una molecola di legante

 Le molecole biologiche possono essere attaccate alle particelle in diversi modi. Se la molecola biologica ha un gruppo funzionale che si possa legare all’oro (per esempio un tiolo –SH o una specifica sequenza peptidica), essa può prendere il posto della molecola di stabilizzante quando viene aggiunta alla soluzione contenente le nanoparticelle. In questo modo, oligonucleotidi, peptidi sono legati direttamente all’Au. In alternativa, le molecole biologiche possono essere attaccate al guscio di stabilizzatore attraverso una reazione tra l’estremità dello stabilizzatore verso la soluzione e un gruppo funzionale della molecola biologica da legare.

Le nanoparticelle d’oro hanno proprietà ottiche molto particolari, che non sono riscontrabili nel metallo massivo. Trattandosi di un metallo, gli elettroni sono liberi di spostarsi. Quando il cammino libero medio di un elettrone è di circa 50 nm e la luce incidente ha lunghezza d’onda maggiore rispetto alla grandezza della nanoparticella, si creano forti interazioni sulla superficie che portano a condizioni di risonanza. In particolare, succede che la luce incidente può essere assorbita provocando l’oscillazione collettiva degli elettroni liberi nel metallo e determinando un intenso colore rosso delle nanoparticelle. Poiché questo effetto è di superficie, si parla di risonanza plasmonica di superficie. Al cambiare della forma e della grandezza della particella, anche la geometria della superficie cambia e di conseguenza cambia anche la frequenza di oscillazione degli elettroni e quindi si ha una variazione delle proprietà ottiche del materiale.



Figura Spettro di assorbimento di nanoparticelle d'oro supportate su ossido di cerio

Per queste loro peculiari proprietà ottiche le nanoparticelle d’oro sono utilizzate come agente di contrasto e possono essere visualizzate con una grande varietà di tecniche spettroscopiche differenti.

Vediamo di seguito le principali applicazioni

1. LABELLING CON NANOPARTICELLE D’ORO

Immunostaining (Figura 3 a): le nanoparticelle d’oro (core rosso) con il guscio di stabilizzante (grigio) sono coniugate con specifici anticorpi contro le molecole target. Quando sono aggiunte a cellule permeabilizzate, le particelle di Au-modificate con l’anticorpo saranno guidate da uno specifico riconoscimento molecolare e andranno a legarsi alla molecola antigene o a regioni “target” contenenti l’antigene. In questo modo queste regioni vengono messe in evidenza dalla nanoparticella.

Single particle-tracking (Figura 3 b): particelle d’oro coniugate con leganti specifici per recettori di membrana, si legano ad essi all’esterno della cellula e li rendono visibili. È possibile seguire i movimenti e le traiettorie del recettore che diffonde nella membrana, visualizzando la particella di oro.

Agenti di contrasto per raggi X (Figura 3c): particelle di oro coniugate con specifici leganti che si legano all’organo di interesse vengono iniettati nel sangue dell’animale. Poi esse si concentrano nell’organo e ne consentono via imaging la risoluzione della struttura.



Figura 3. Labelling con nanoparticelle d'oro.

1. NANOPARTICELLE D’ORO COME VEICOLO PER LA CONSEGNA DI MOLECOLE

Le molecole da portare dentro la cellula sono adsorbite sulle nanoparticelle d’oro che poi sono introdotte nelle cellule essenzialmente attraverso due meccanismi: in un primo meccanismo esse vengono “sparate” all’interno della cellula, in un secondo meccanismo l’entrata avviene grazie al riconoscimento con recettori specifici (meccanismo simile all’endocitosi della transferrina). Le applicazioni principali sono:

* Terapia genica. DNA (gene) è sparato nella cellula vicino al nucleo. Da esso poi si avrà l’espressione delle corrispondenti proteine
* Terapia antitumorale. In questo caso la nanoparticella trasporta il farmaco antitumorale. Se la sua entrata nella cellula avviene attraverso un riconoscimento recettoriale, si può fare in modo che le nanoparticelle/farmaco si dirigano preferenzialmente sulle cellule malate dove vi è una sovra-espressione dei recettori sulla membrana cellulare. Una volta entrate, le nanoparticelle sono contenute in vescicole che vengono attaccate e rotte consentendo la liberazione del materiale nel citosol.

In questo tipo di applicazioni, la nanoparticella d’oro serve esclusivamente come veicolo perché è piccola, stabile, coniuga facilmente delle molecole, è inerte e biocompatibile. Le sue proprietà ottiche qui non sono sfruttate al momento.



Figura 4. Delivery con nanoparticelle di oro

1. NANOPARTICELLE D’ORO COME SORGENTE DI CALORE

Quando le nanoparticelle d’oro assorbono luce visibile, gli elettroni liberi sono eccitati. La loro successiva interazione con il reticolo cristallino dell’oro fa sì che gli elettroni si rilassino e che l’energia termica sia trasferita al reticolo. Poi il calore è dissipato dalle nanoparticelle d’oro all’ambiente circostante.

Un riscaldamento controllato di particelle d’oro può essere utilizzato per manipolare i tessuti circostanti. Infatti le cellule sono molto sensibili anche a piccoli incrementi di temperatura. Temperature superiori ai 42° sono letali. L’idea è di dirigere nanoparticelle colloidali verso tessuti ammalati di cancro. Come visto sopra, questo può essere fatto coniugando la superficie della particella con leganti specifici per recettori che sono sovra-espressi nelle cellule cancerose. Le particelle possono così concentrarsi e arricchirsi nel tessuto canceroso. Quando sono raggiunte da uno stimolo esterno (cioè illuminate), per effetto della risonanza plasmonica di superficie la temperatura delle cellule legate o adiacente alle particelle d’oro si alza ed in questo modo si ha morte cellulare selettivamente nelle vicinanze delle particelle d’oro senza che l’intero organismo sia esposto a temperature elevate. Questo approccio si chiama Ipertermia.

Esistono ovviamente difficoltà nella realizzazione dell’illuminazione, perché anche i tessuti normali possono assorbire luce visibile. Qui sarebbe utile organizzare particelle d’oro di dimensioni adatte da spostare l’assorbimento verso l’IR. Tuttavia il potere penetrante delle radiazioni infrarosse non è molto elevato quindi l’ipertermia con particelle d’oro funziona bene per tessuti abbastanza superficiali (vicini alla pelle).

1. NANOPARTICELLE D’ORO COME SENSORI

Fino ad ora abbiamo visto applicazioni in cui le nanoparticelle d’oro sono utilizzate come veicoli passivi. In realtà ci sono esempi di applicazioni in cui esse hanno ruolo attivo come sensori. Lo scopo di un sensore è mettere in evidenza la presenza di una specie detta analita e di fornire una misura della sua concentrazione attraverso una variazione misurabile di una proprietà tipica del sensore. Da questo punto di vista variazioni delle proprietà ottiche delle nanoparticelle possono essere sfruttate in sensoristica. Infatti, la frequenza di risonanza plasmonica nelle nanoparticelle d’oro è una caratterisitica intrinseca del materiale. Essa cade tra 510-530 nm per particelle di Au delle dimensioni di 4-40 nm. Il legame di molecole sulla superficie delle nanoparticelle può cambiare la frequenza di risonanza plasmonica direttamente. Tale variazione è facilmente rilevabile. Inoltre, la frequenza subisce variazioni molto importanti quando la distanza media tra le particelle di Au è ridotta consentendo la formazione di aggregati. Vediamo gli esempi di figura 5a, 5b, 5d

 Il primo saggio fu sviluppato per detectare il DNA. Le nanoparticelle d’oro sono coniugate ad oligonucleotidi (Figura 5a, verdi) che sono complementari ad una sequenza target da mettere in evidenza (in blu). In mancanza della sequenza target, le particelle sono liberamente disperse e la soluzione colloidale appare rossa. In presenza della sequenza target, le due catene complementari si legano. Dato che ogni nanoparticella ha più di un oligonucleotide legato, l’ibridizzazione provoca un avvicinamento delle particelle con formazione di aggregati. La frequenza di risonanza plasmonica cambia e la soluzione colloidale appare blu/viola.

In Figura 5 b1 e b2, sono mostrati i casi in cui si sfrutta lo spegnimento del processo fotochimico di fluorescenza. In b1, le nanoparticelle sono coniugate con leganti (verdi) che legano l’analita (blu) in modo specifico. Inizialmente, i leganti delle nanoparticelle si trovano saturati con molecole che hanno una parte che dà fluorescenza (arancio). La fluorescenza in queste condizioni è spenta perché i fluorofori sono troppo vicini alla nanoparticella di oro. La presenza dell’analita sposta in modo competitivo la molecola con il fluoroforo, che trovandosi lontano dalla nanoparticella ristabilisce la fluorescenza (raggi gialli). Quindi un aumento di fluorescenza è un indice di presenza dell’analita.

In b2, i fluorofori (arancio) sono attaccati alla nanoparticella attraverso un linker (verde) la cui lunghezza è tale da mantenere la distanza necessaria per avere fluorescenza. La presenza dell’analita (blu) cambia la conformazione del linker, avvicinando il fluoroforo alla nanoparticella e determinando uno spegnimento della fluorescenza.

In figura 5d, leganti specifici all’analita da rivelare sono immobilizzati su una superficie e coniugati a nanoparticelle d’oro. La presenza dell’analita provoca il legame delle nanoparticelle alla superficie. La presenza di analita è quantificata dal numero di particelle di Au legate alla superficie.

Infine in Figura 5e, enzimi con attività redox (verdi) sono coniugati alla superficie di nanoparticelle di Au a loro volta immobilizzate sulla superficie di un elettrodo (grigio). In presenza di analita (substrato dell’enzima) si ha reazione di ossidazione e gli elettroni sottratti all’analita sono trasferiti all’elettrodo con la mediazione delle particelle d’oro. Dato che gli elettroni che arrivano si misurano come corrente si può risalire alla quantità di analita convertito.



Figura . Nanoparticelle d'oro come sensori

VANTAGGI E PROSPETTIVE

Sebbene applicazioni simili a quelle viste possano essere effettuate anche da nanoparticelle colloidali di materiale differente, quelle d’oro presentano caratteristiche uniche:

* Non danno problemi di corrosione
* Sono inerti e biocompatibili
* Sono facili da sintetizzare e le loro soluzioni colloidali sono stabili
* Legano facilmente molecole biologiche
* Grazie alle loro proprietà ottiche (in particolare alla frequenza di risonanza plasmonica) possono essere visualizzate con numerose tecniche
* Sensori possono basarsi proprio su variazioni della risonanza plasmonica.

Per questi motivi si presume che esse (specialmente come sensori) saranno oggetto di saggi e kits commerciali per la rivelazione di un numero sempre maggiore di analiti.