

Biosensoryczne właściwości nanocząstek półprzewodnikowych

Bożena Sikora

Promotor: prof. Danek Elbaum

Zespół Fizyki Biologicznej

Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

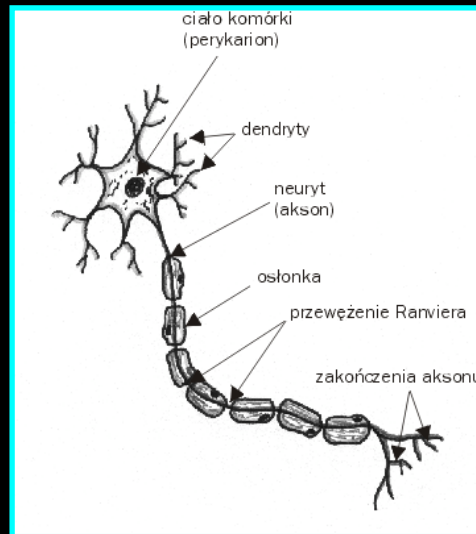
Cel badań

Wczesne wykrywanie chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona)

Choroby neurodegeneracyjne

grupa wrodzonych lub nabytych postępujących chorób układu nerwowego, w których podstawowym zjawiskiem patologicznym jest utrata komórek nerwowych. W wyniku procesu chorobowego dochodzi do wystąpienia szeregu uszkodzeń neurologicznych (np. uszkodzenia związane z funkcją motoryczną, uszkodzenia związane z pamięcią). Proces prowadzący do wystąpienia objawów choroby neurodegeneracyjnej rozpoczyna się znacznie wcześniej i przebiega przez długi czas (często latami) bezobjawowo. Pierwsze objawy pojawiają się kiedy znacząca ilość neuronów ulegnie uszkodzeniu lub uszkodzenie dotyczy określonej części ośrodkowego układu nerwowego.

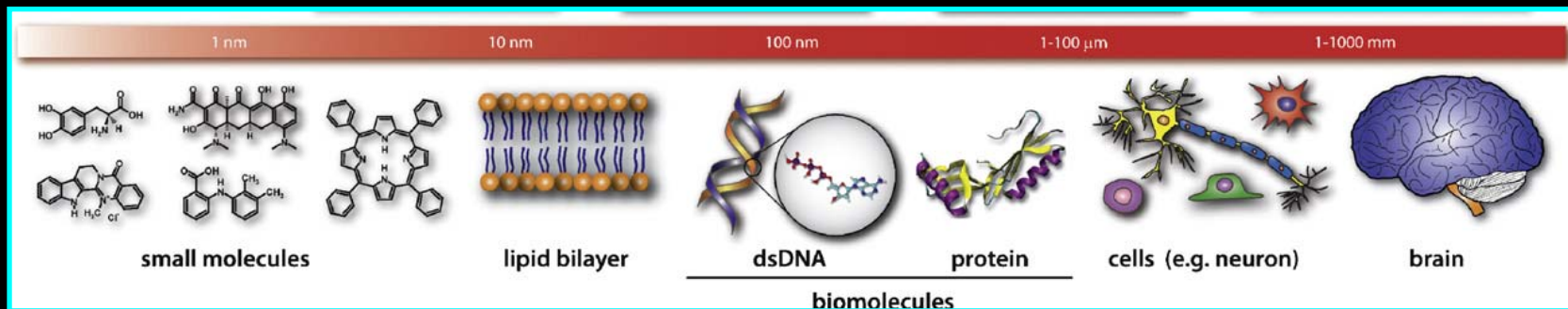
Neurony – komórki nie dzielące się



Brak diagnostyki na wczesnym etapie rozwoju choroby, dlatego brak jest skutecznych leków

Koloidalne nanocząstki półprzewodnikowe (nanokryształy, kropki kwantowe)

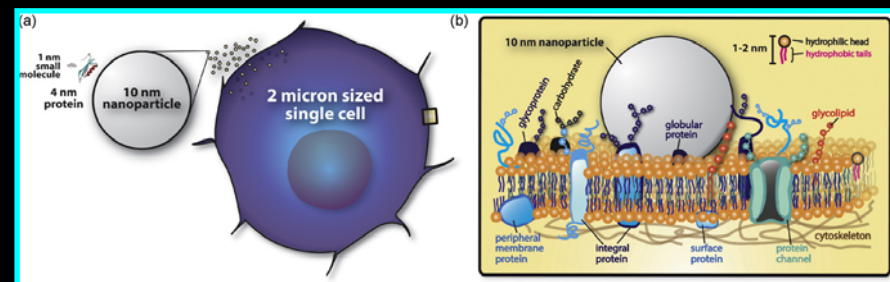
- kryształy o rozmiarach nanometrowych
- ograniczenia kwantowe (quantum confinement effect)



Rysunek: W. H. Suh, K. S. Suslick, G. D. Stucky, Y. H. Suh, *Progress in Neurobiology*, 2009, 87, 133-170.

- interesujące właściwości optyczne
 - możliwość regulowania długości fali luminescencji poprzez rozmiar
 - duży współczynnik ekstynkcji
 - wysoka wydajność kwantowa
 - duży stosunek powierzchni do objętości
 - brak fotowysparowania (utrata zdolności do luminescencji po wyemitowaniu określonej liczby fotonów)

Wady: brak specyficzności w systemach biologicznych, niska czułość na środowisko = brak „inteligencji” biologicznej

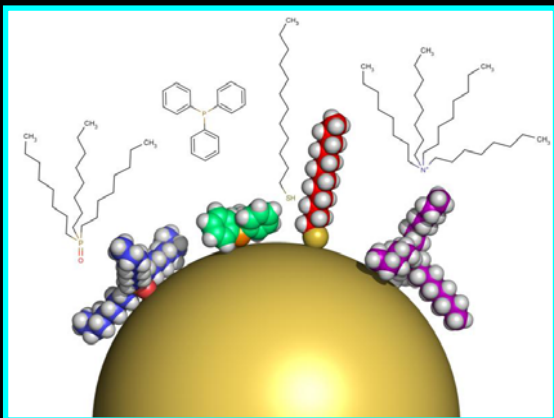


Rysunek: W. H. Suh, K. S. Suslick, G. D. Stucky, Y. H. Suh, *Progress in Neurobiology*, 2009, 87, 133-170.

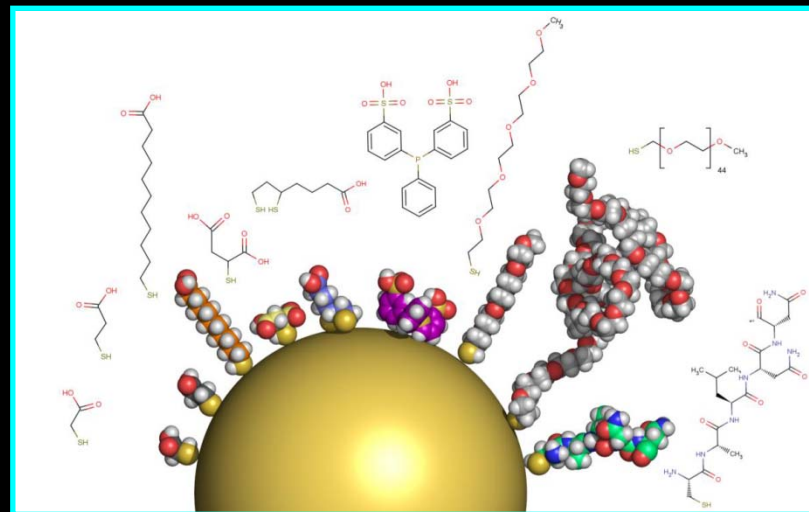
„Inteligencja” koloidalnych nanocząstek półprzewodnikowych

Pokrywanie nanocząstek związkami organicznymi

- stabilizacja przeciw agregacji
- modyfikacja właściwości powierzchni (hydrofobowe, hydrofilowe, amfifilowe)
- Grupy funkcyjne wykorzystywane do przyłączania innych molekuł (np. molekuł biologicznie aktywnych)



Nanocząstka (5 nm) pokryta różnymi hydrofobowymi ligandami: TOPO (tlenek trioktylofosfiny), TPP (trifenyllofosfina), DDT (dodekanotiol), TOAB (bromek tetrabutylamonowy)

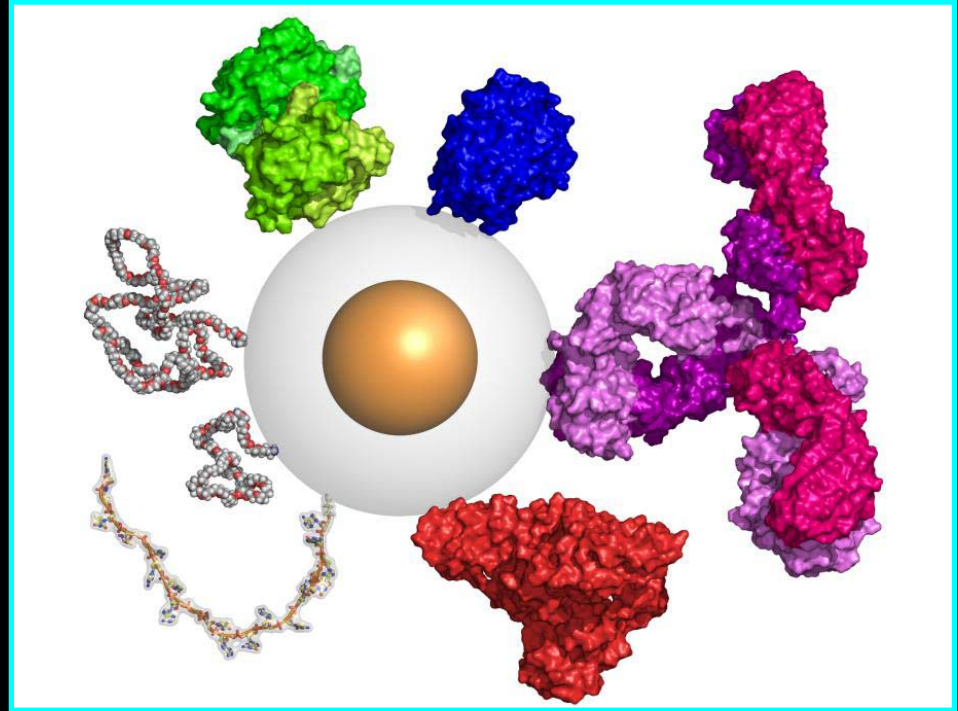


Nanocząstka (5 nm) pokryta różnymi hydrofilowymi ligandami: MAA (kwas merkaptooctowy), MPA (kwas merkaptopropionowy), MUA (kwas merkaptoundekanowy), MSA (kwas merkaptobursztynowy) DHLA (kwas dihydroliponowy), bis-sulfonowana trifenyllofosfina, mPEG₅-SH, mPEG₄₅-SH (2000 g/mol), krótki peptyd (CALNN)

„Inteligencja” koloidalnych nanocząstek półprzewodnikowych

Przyłączanie biologicznie aktywnych molekuł nadaje biologiczną „inteligencję”

- lipidy (składniki błon komórkowych)
- witaminy
- peptydy
- cukry
- białka (np. przeciwciała)
- enzymy
- DNA i RNA



Nanocząstka (5 nm) pokryta warstwą organiczną (10 nm) z aktywnymi grupami, do których mogą być przyłączone: molekuły poliglikolu etylenowego PEG (2000 g/mol), PEG (5000 g/mol), streptoawidyna, transferyna, przeciwciało (IgG), albumina, pojedyncza nić DNA



Toksyczność koloidalnych nanocząstek półprzewodnikowych

Toksyczność nanocząstek półprzewodnikowych CdSe/ZnS:

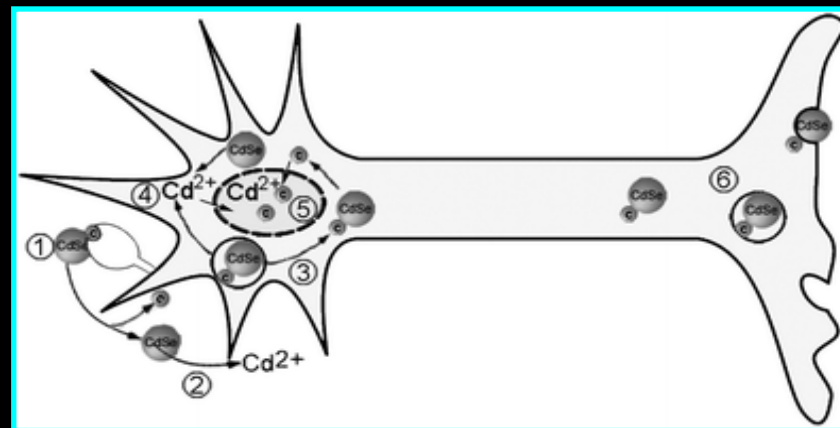
➤ wysoka toksyczność spowodowana dysocjacją metali ciężkich^{[1],[2]} powodujących śmierć komórek

Toksyczność nanocząstek metali (Ag, Au)

➤ średnia toksyczność spowodowana przyłączaniem się do nici DNA^[3]

Toksyczność nanocząstek tlenków i nanocząstek polimerowych

➤ najmniejsza → rozpadają się całkowicie w ciele, sugerując, że są one najbardziej biokompatybilne ^{[4],[5]}



Nanocząstki CdSe z przyłączoną molekułą biologiczną, specyficzną dla danego receptora:

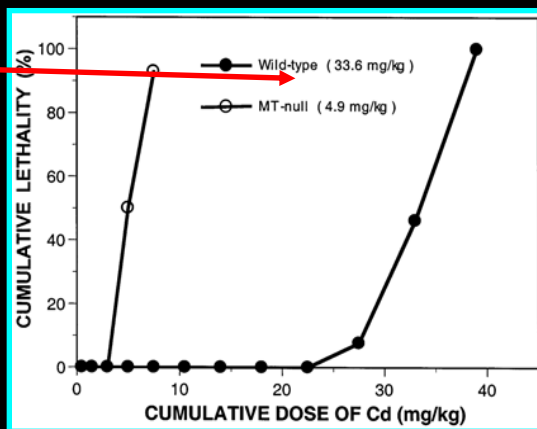
- mogą być rozłożone do nanocząstek i biomolekuł przed przyłączeniem się receptora. Takie CdSe mogą uwalniać jony Cd^{2+} , które są pochłaniane przez komórkę.
- rozkład kompleksu może zachodzić wewnątrz komórki, gdzie są uwalniane jony Cd^{2+}
- jony Cd^{2+} i biologiczne cząsteczki mogą wchodzić do jądra komórkowego ^[6]
- jony Cd^{2+} wiążą się z atomami siarki, tlenu i wodoru zmieniając strukturę elementów komórki
- jony Cd^{2+} zaburzają obieg mikroelementów: Fe, Cu, Mg, Ca, Se, Zn

[1] E. Chang, E. Thekkekk, W. W. Yu, V. L. Colvin, R. Drezek, *Small*, 2006, 2, 1412–1417, [2] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S.N. Bhatia, *Nano Lett.* 2004, 4, 11–18, [3] M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid, *Small*, 2005, 1(8-9), 841-844, [4] R. Weissleder, D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, *American Journal of Roentgenology*, 1989, 152, 167-173, [5] E. I. Altinoglu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, B. C. Eklund, M. Kester, J. H. Adair, *ACS Nano*, 2008, [6] D. R. Cooper, J. L. Nadeau, *Nanoscale*, 2009

Dlaczego nanocząstki ZnO i Fe₂O₃?

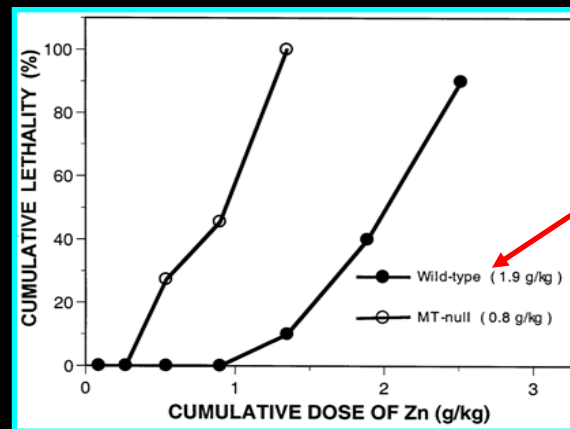
1. Niska toksyczność

33,6 mg/kg
Cd²⁺/mysz



Zależność śmiertelności myszy od dawki jonów Cd²⁺

1,9 g/kg
Zn²⁺/mysz



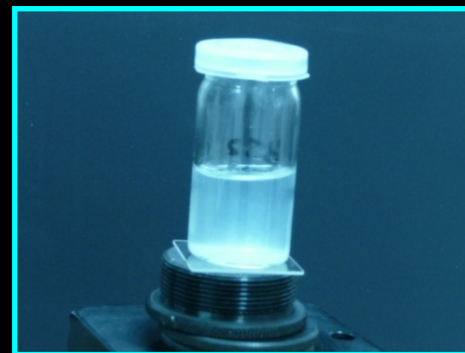
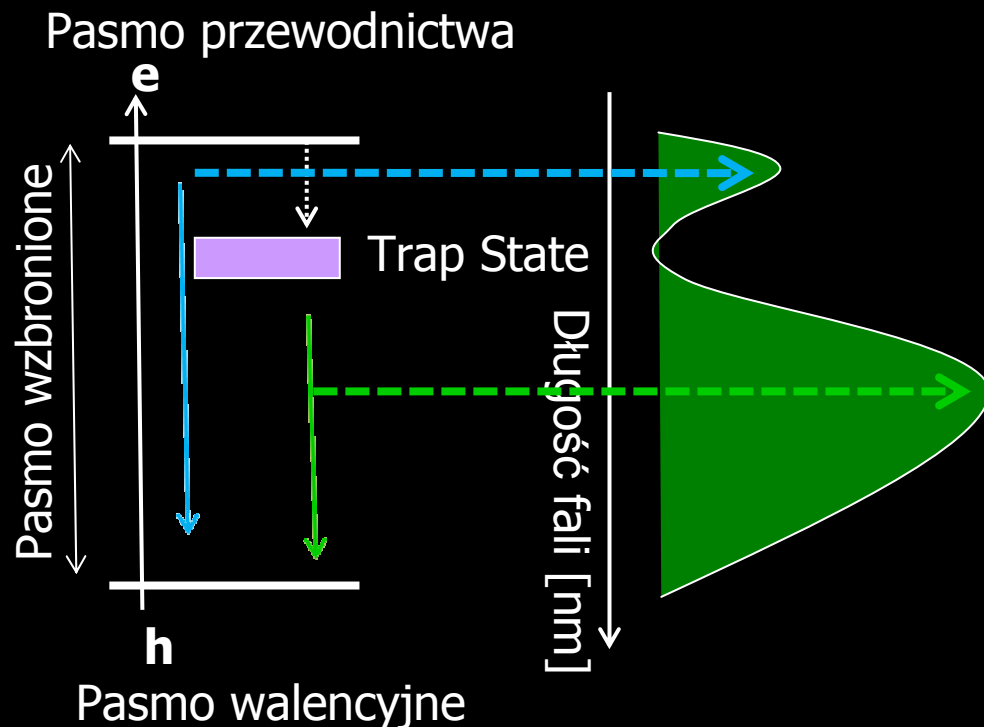
Zależność śmiertelności myszy od dawki jonów Zn²⁺

Jung D. Park et.al., *Toxicology*, 2001, 163, 93–100

2. Ciekawe właściwości optyczne nanocząstek ZnO i magnetyczne nanocząstek Fe₂O₃

3. Bardzo wydajna, niedroga, „łatwa” i bezpieczna procedura otrzymywania w koloidach

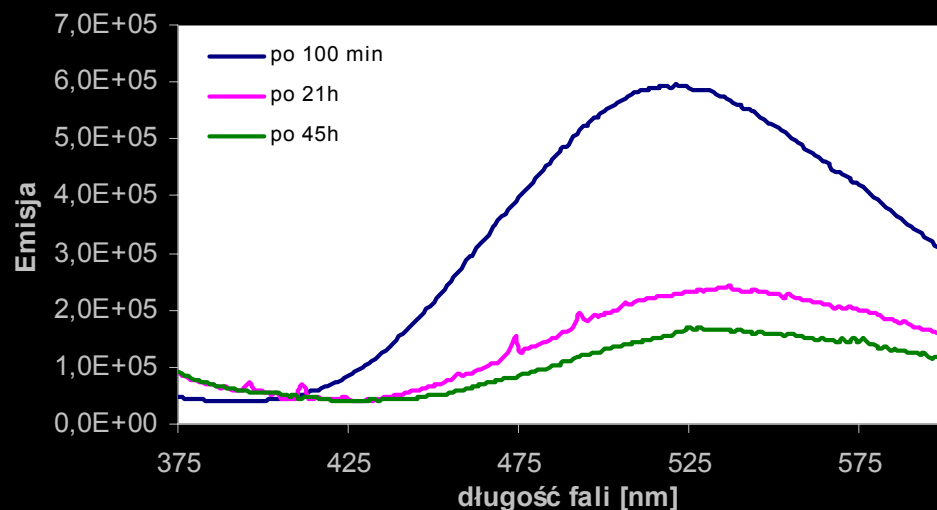
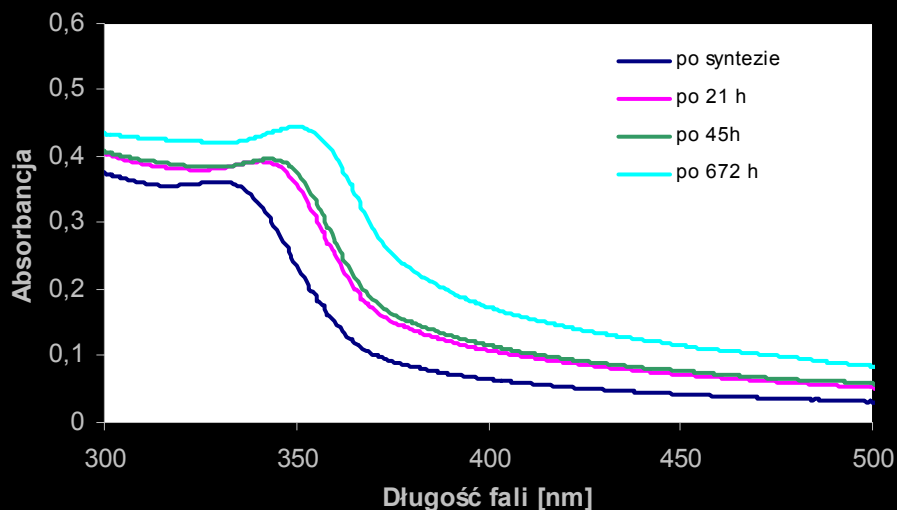
Właściwości luminescencyjne



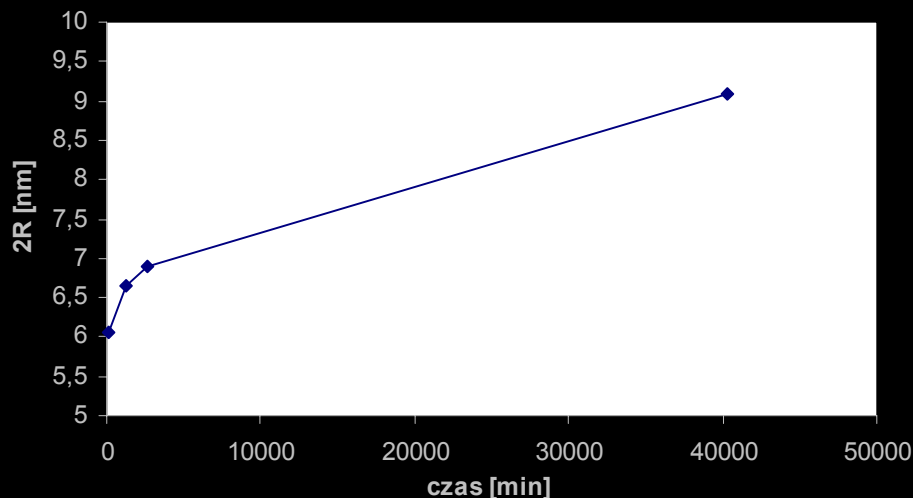
Nanocząstki ZnO mają dwa pasma emisyjne:

- Wąskie pasmo emisji ekscytonowej przy długości fali około 380 nm,
- Szerokie, intensywne pasmo przy długości fali około 535 nm przypisane stanom defektowym (trap state) np. luki tlenowe.

Dalszy wzrost nanocząstek ZnO w roztworach

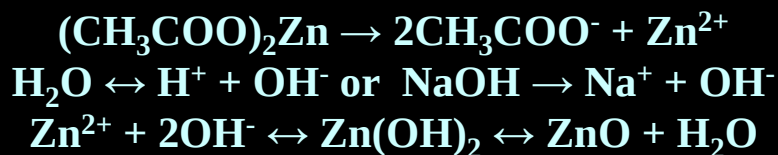
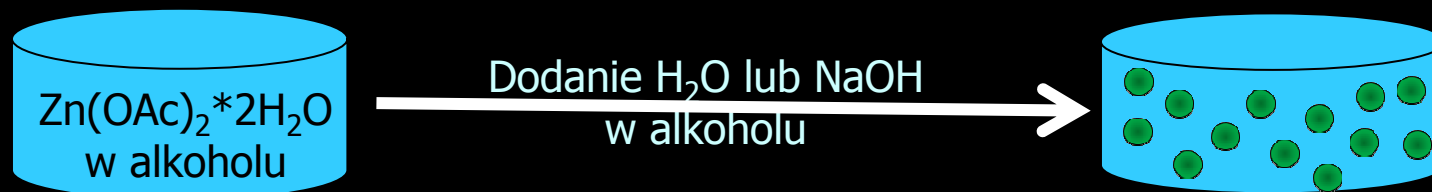


Widma absorbancji i luminescencji nanocząstek ZnO otrzymanych z octanu cynku (1 mM) oraz wody (407 mM) w temperaturze 35 °C w izopropanolu w zależności od czasu przechowywania.

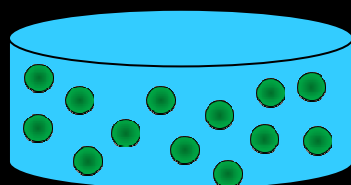


Wykres zależności promienia nanocząstek ZnO od czasu ich przechowywania w temperaturze pokojowej.

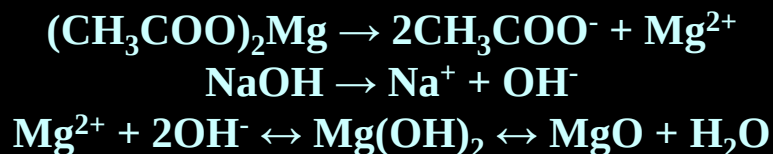
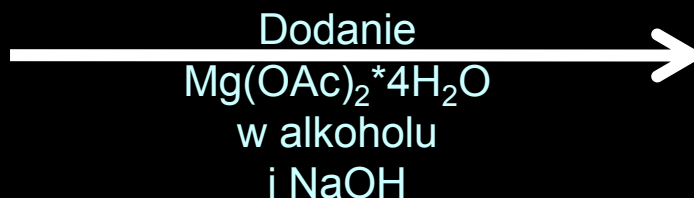
Synteza nanocząstek ZnO/MgO rdzeń/powłoka



● ZnO



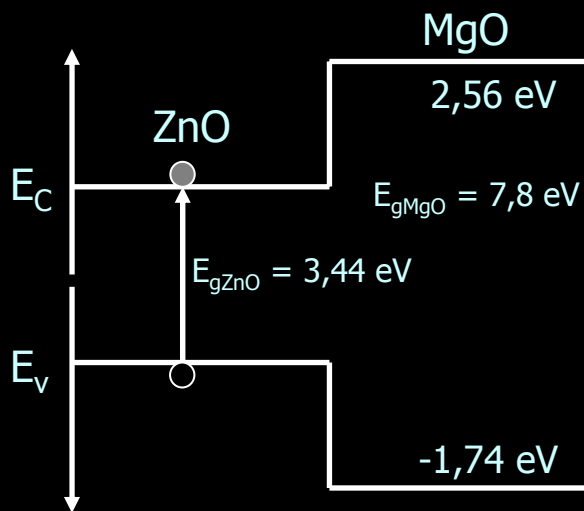
● ZnO



● ZnO/MgO
rdzeń/powłoka

Dlaczego powłoka MgO?

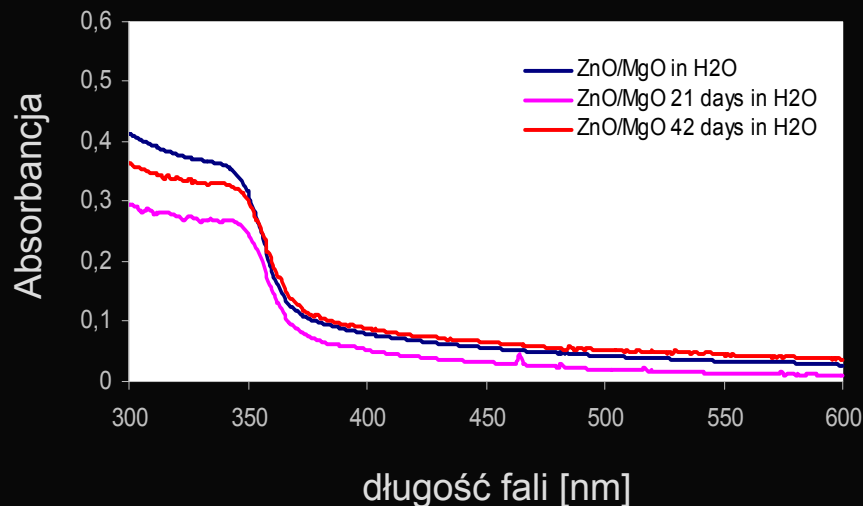
1. Doświadczalnie wykazano zapobieganie dalszego wzrostu nanocząstek ZnO [1] – potwierdzenie B. Sikora
2. Jest nietoksyczna i biokompatybilna
3. Powoduje znaczny wzrost luminescencji pochodzącej od defektów rdzenia ZnO [1][2] i wzrost luminescencji ekscytonowej rdzenia ZnO [2]



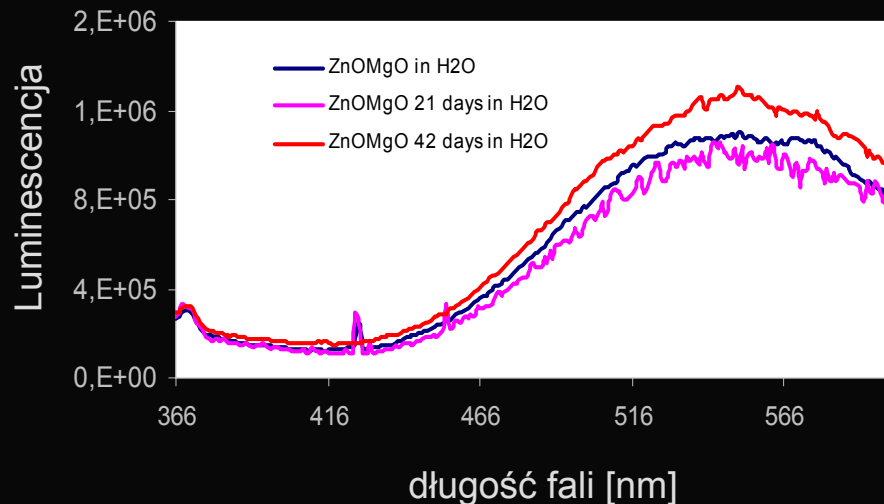
Heterozłącze I rodzaju systemu rdzeń/powłoka:

- 1). Minimum poziomu przewodnictwa powłoki ma energię wyższą niż energia poziomu przewodnictwa rdzenia
- 2). Maksimum poziomu walencyjnego powłoki ma energię niższą niż energia poziomu walencyjnego rdzenia
- 3). W tym systemie ekscyton jest ograniczony do materiału rdzenia, powłoka pasywuje defekty odpowiadające za przejścia niepromieniste na powierzchni ZnO i przeciwdziała narażeniu ekscytonu na środowisko zewnętrzne

Charakteryzacja nanocząstek ZnO/MgO rdzeń/powłoka



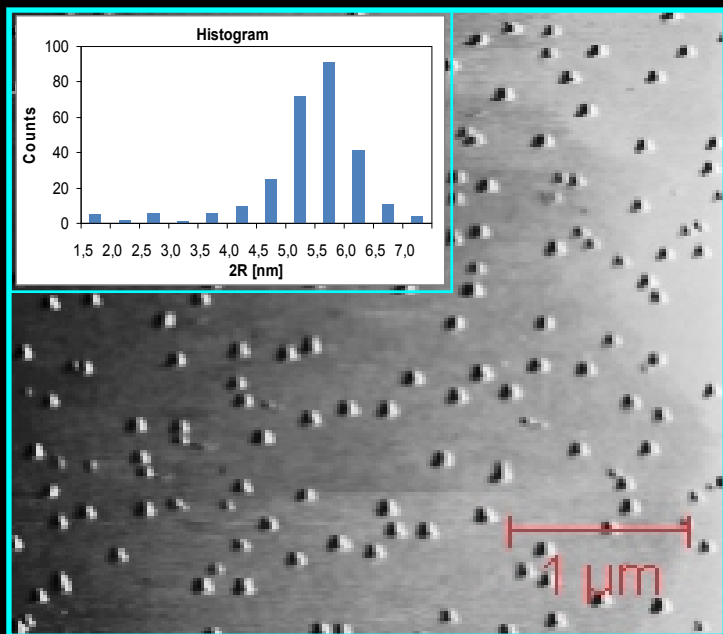
Wykresy zależności absorbancji i emisji nanocząstek ZnO/MgO w wodzie w zależności od czasu przechowywania (stosunek Mg/Zn wynosi 37 %).



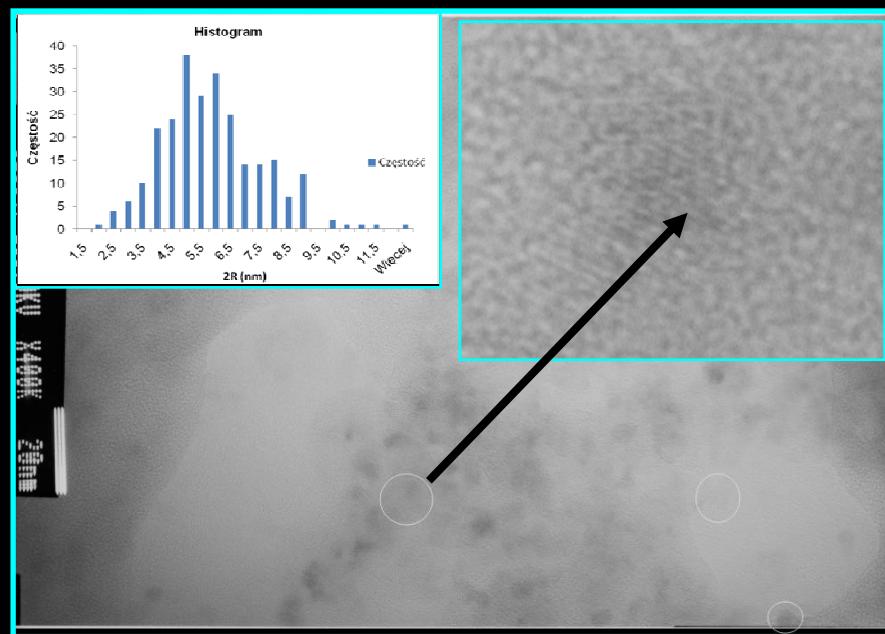
Średnia średnica nanocząstek ZnO/MgO core/shell wyznaczona z początku widm absorbancji korzystając z przybliżenia masy efektywnej.

t [dni]	2R [nm]
rozpuszczone w wodzie	6,2
21	5,9
42	5,9

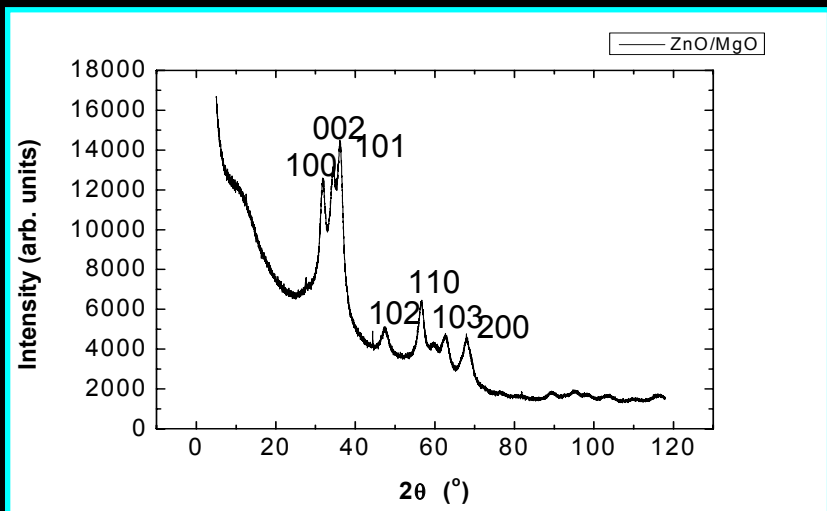
Pomiar AFM



Pomiar TEM



Pomiar X-Ray



$$t = \frac{0.9\lambda}{B \cos \theta}$$

t – średnica cząstki (Å)
 λ – długość fali (1,54 Å)
 B – szerokość połówkowa (radiany)

$2R_{X\text{-ray}}$ [nm]	$2R_{\text{opt}}$ [nm]	$2R_{\text{TEM}}$ [nm]	$2R_{\text{AFM}}$ [nm]
~7.9	~6.0	~5,5	~5,4

Ale po co to wszystko?

Trzy strategie budowania biosensorów:

1. Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne
2. Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimerera)
3. FRET między nanocząstką ZnO pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona

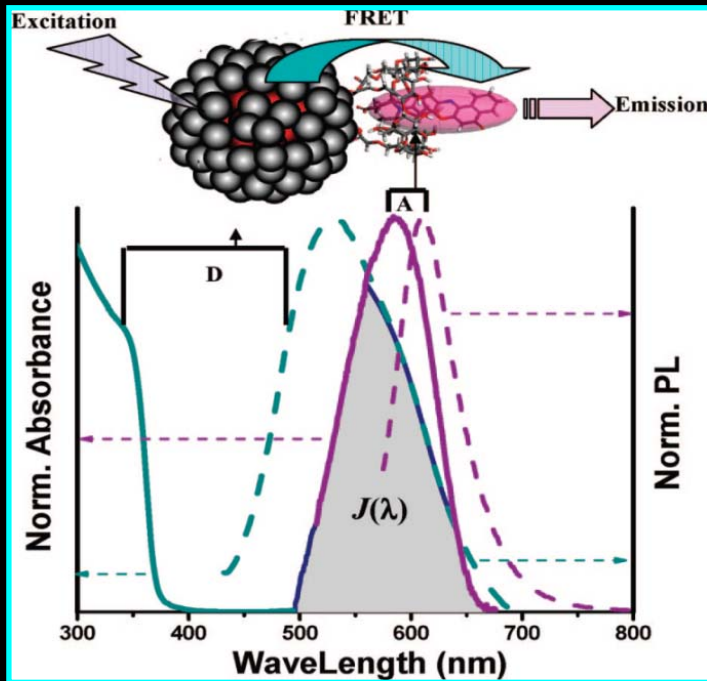
Ale po co to wszystko?

Trzy strategie budowania biosensorów:

1. Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne
2. Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimerera)
3. FRET między nanocząstką ZnO pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona

Pierwsza strategia budowania biosensorów

Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne



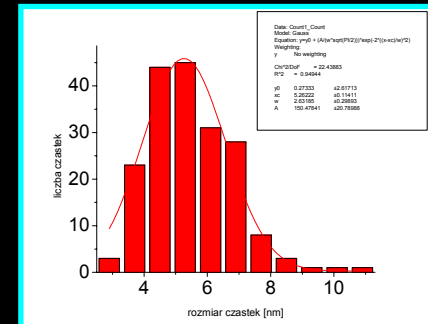
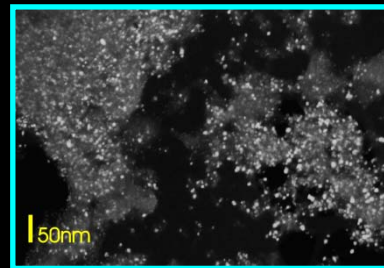
FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

mechanizm przenoszenia energii między dwoma chromoforami na drodze innej niż promieniowanie.

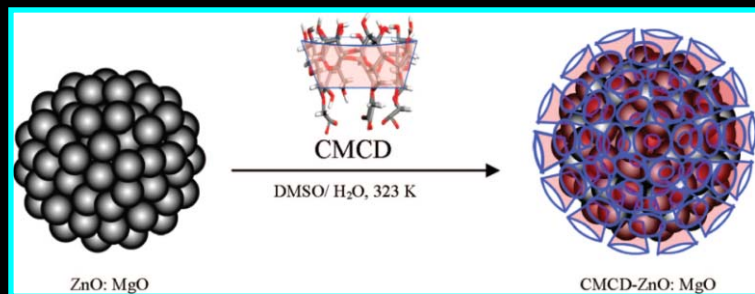
Donor w stanie wzbudzonym może przekazywać energię wzbudzenia akceptorowi znajdującemu się w odległości nie większej niż 10 nm.

Obraz TEM i histogram wielkości ZnO/MgO

S. Rakshit et al., *ACS Nano*, vol. 2, no. 7, 2008, 1473-1479



FRET: nanocząstka ZnO/MgO rdzeń/powłoka pokryta CMCD (donor) i Czerwień Nilu (akceptor)

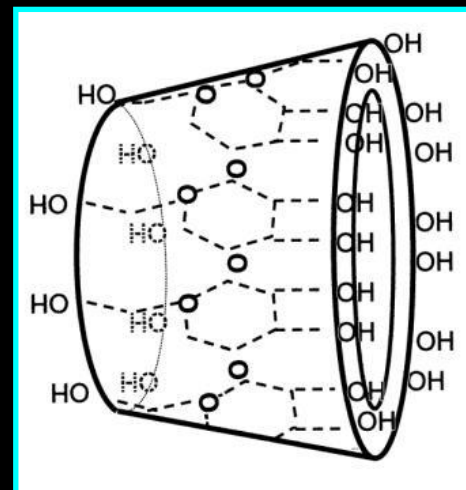


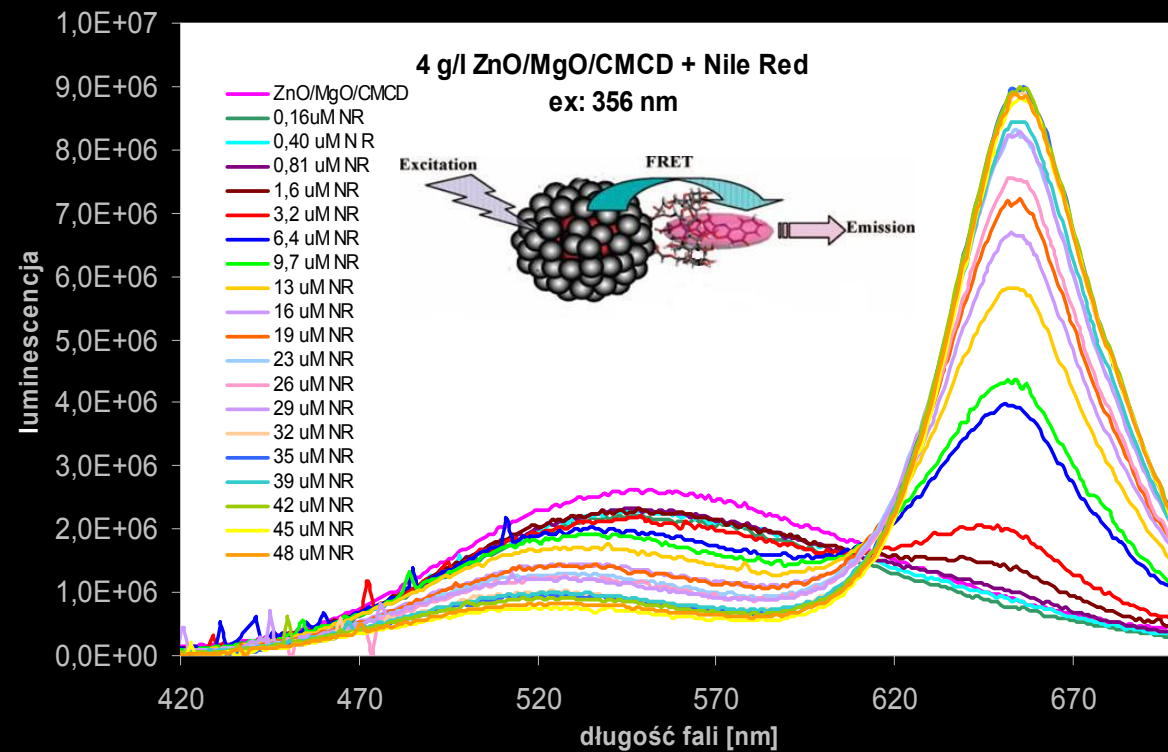
Schemat syntezy nanocząstek ZnO/MgO pokrytych karboksymetylo-beta-cyklodekstryną.

- 1). Zmiana rozpuszczalności nanocząstek w wodzie (zwiększenie hydrofilowości)
- 2). Nie zmienia absorpcji i emisji nanocząstek ZnO/MgO

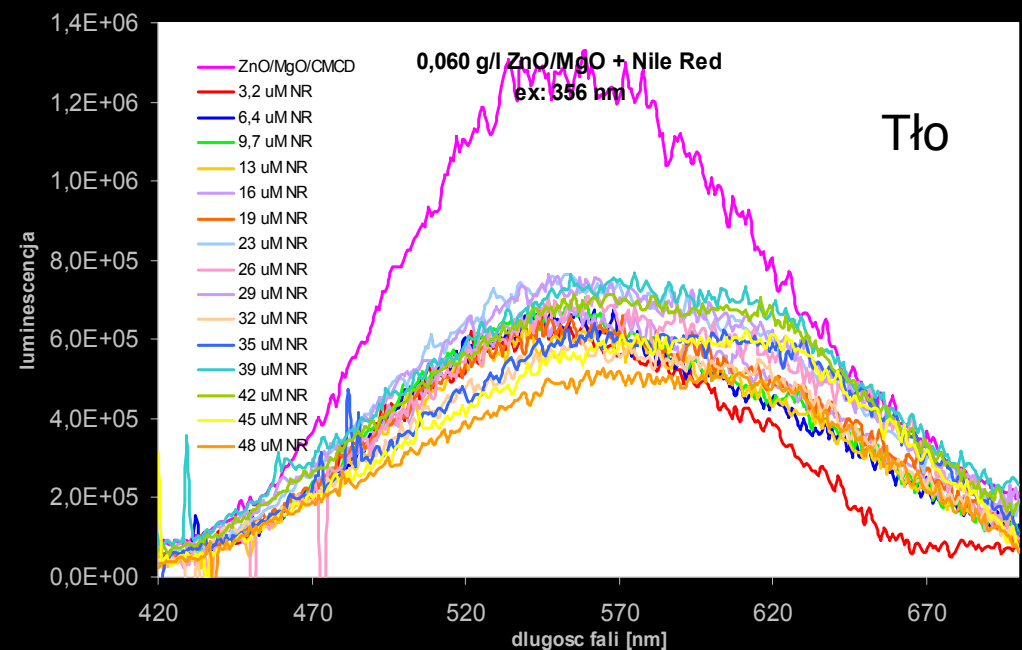
β – cyklodekstryna

- składa się z 7 merów glukozy tworzących strukturę cykliczną
- wnętrze otworu – hydrofobowe
- całość cząsteczki - hydrofilowa
- tworzy kompleksy inkluzyjne typu „gość – gospodarz” (funkcja gospodarza)

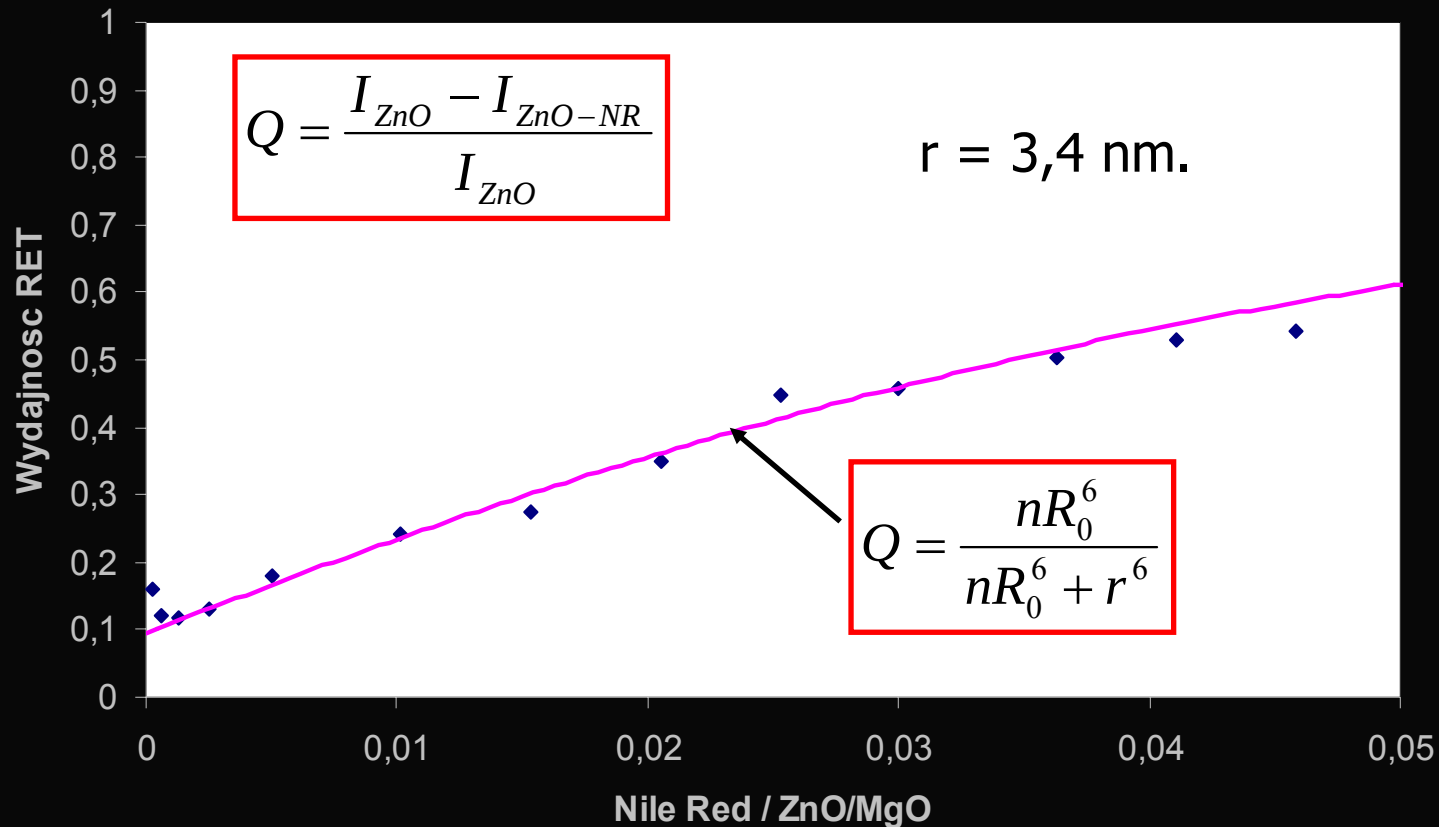




FRET:
ZnO/MgO/CMCD
→ Czerwień Nilu



FRET: ZnO/MgO/CMCD i Czerwień Nilu



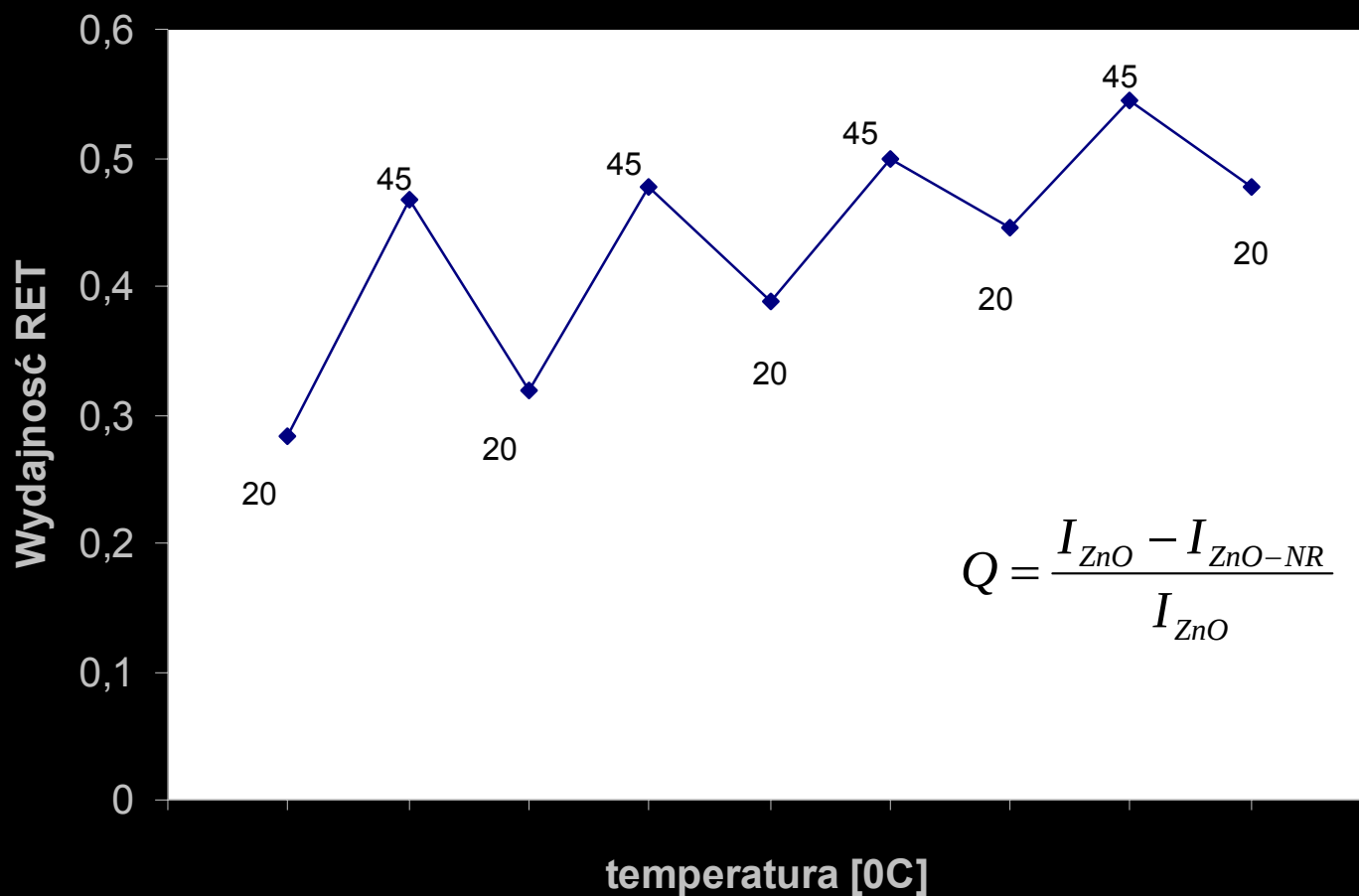
I_{ZnO} – intensywność luminescencji donora ZnO/MgO/CMCD w wodzie w przypadku braku Czerwieni Nilowej

I_{ZnO-NR} - intensywność luminescencji donora ZnO/MgO/CMCD w wodzie w obecności różnych stężeń Czerwieni Nilowej (stężenie donora jest stałe)

r – odległość między donorem a akceptorem

R_0 – krytyczna odległość (promień Forster'a), przy której transfer i spontaniczny zanik ekscytowanego donora są równie prawdopodobne, $k_{ZnO-NR} = \tau_{ZnO}^{-1}$.

Wpływ temperatury na wydajność FRET

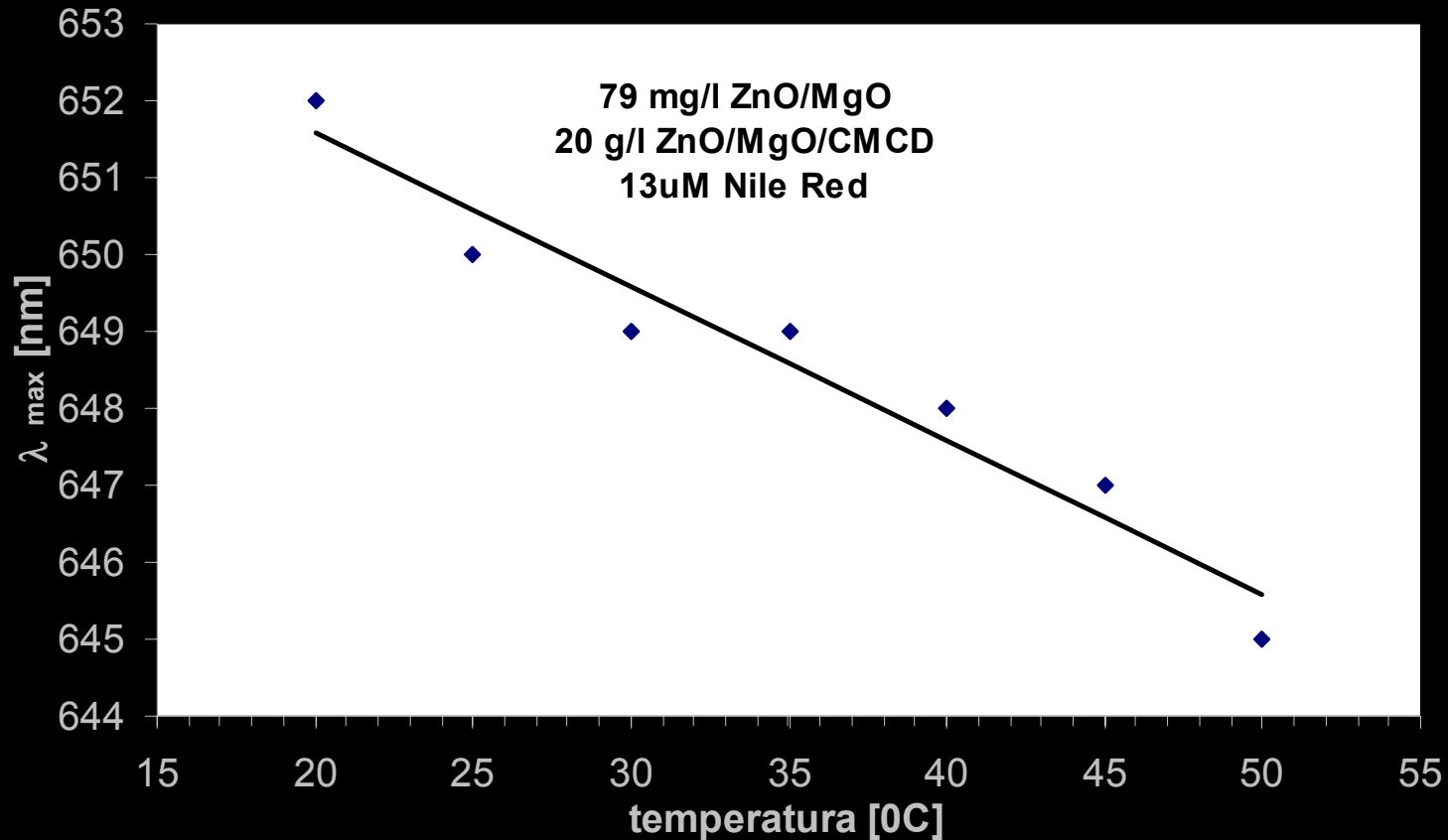


Q – efektywność FRET

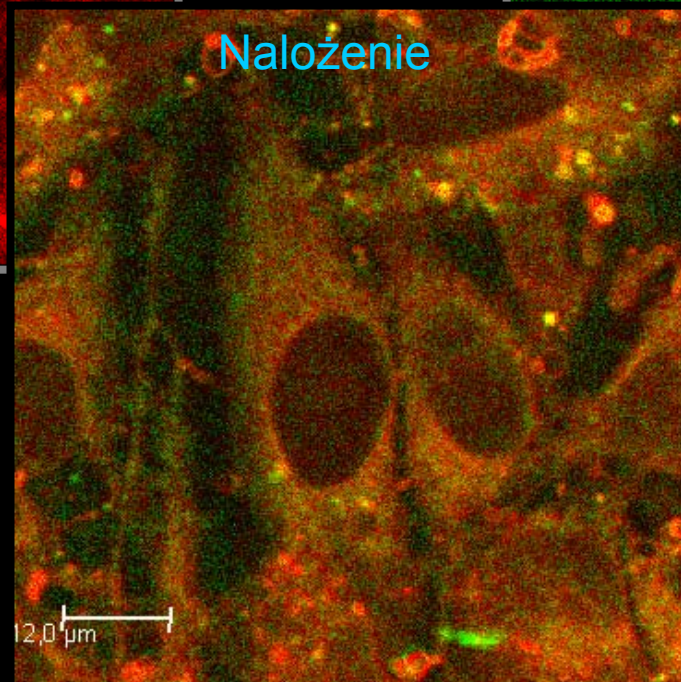
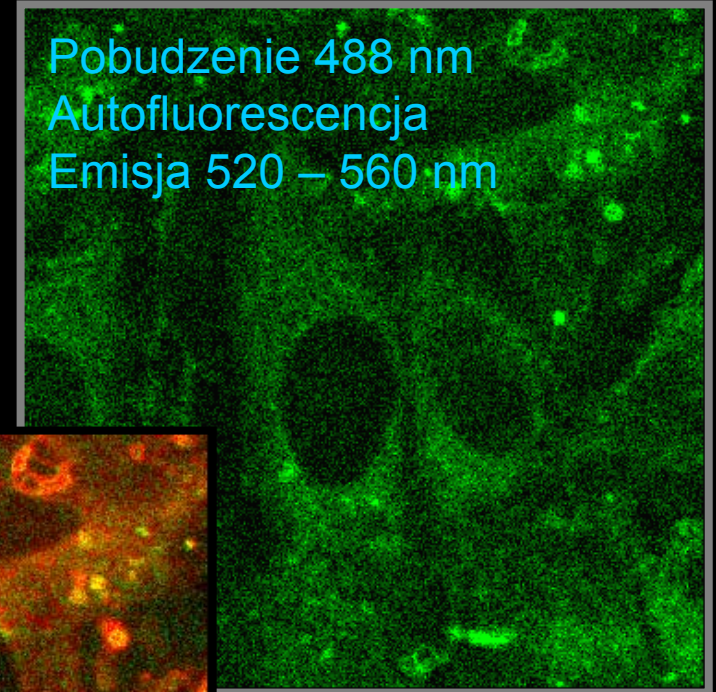
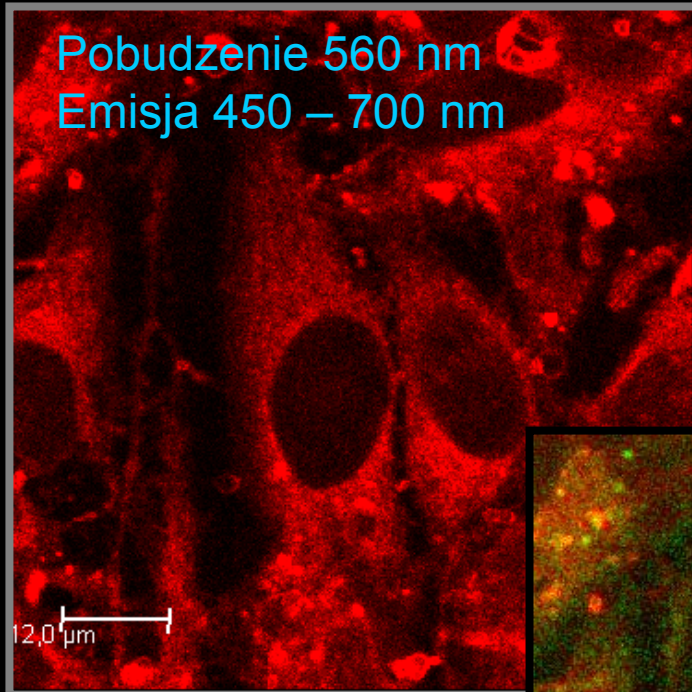
I_{ZnO} – intensywność ZnO/MgO/CMCD w danej temperaturze

I_{ZnO-NR} – intensywność ZnO w układzie ZnO/MgO/CMCD/NR

Wpływ temperatury na położenie pików luminescencji Czerwieni Nilu



ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu w komórkach HeLa

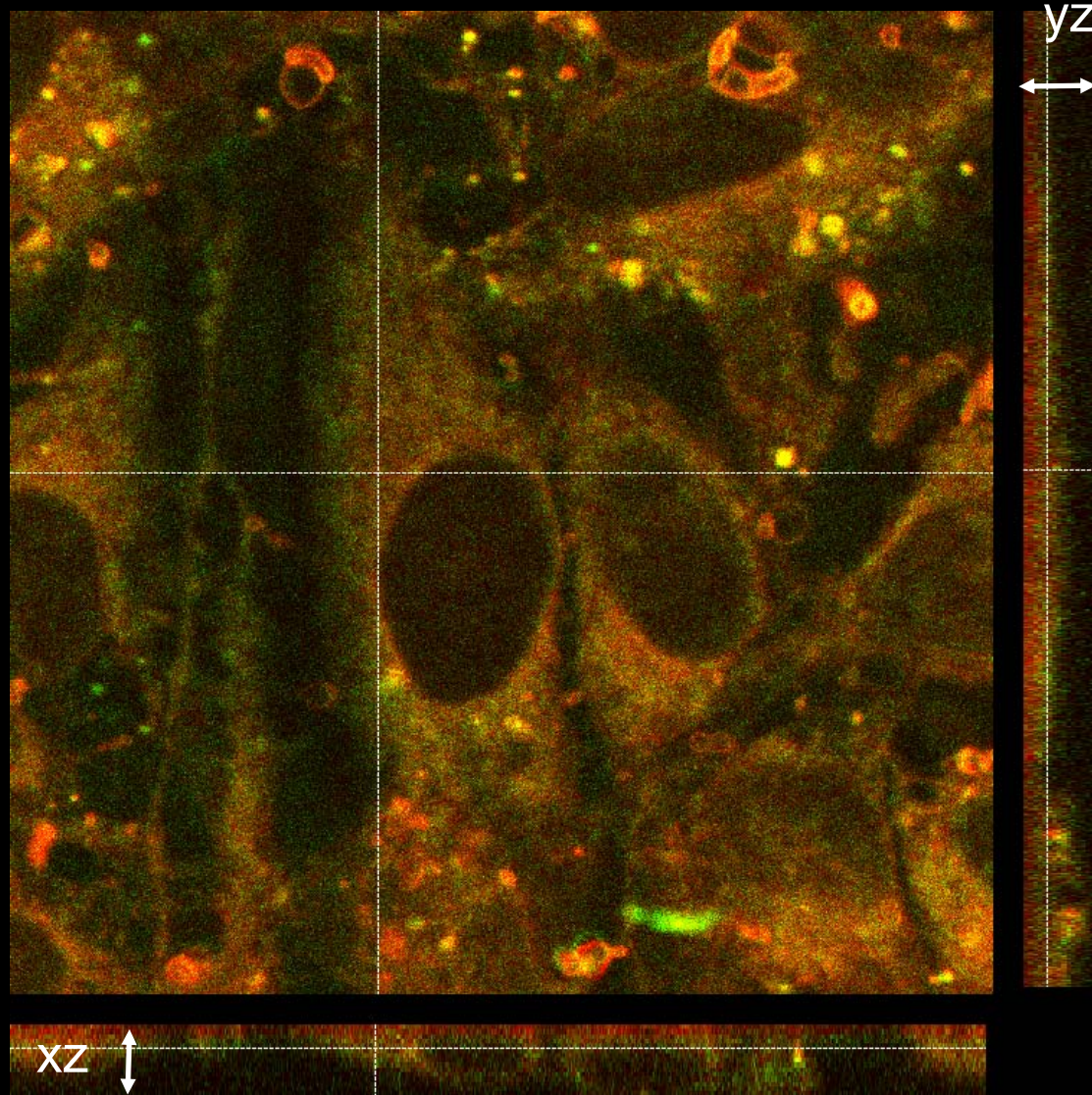


Skład:
20 g/l ZnO/MgO/CMCD
(w tym 79 mg/l ZnO/MgO) i
13 umol/l Czerwieni Nilowej w wodzie

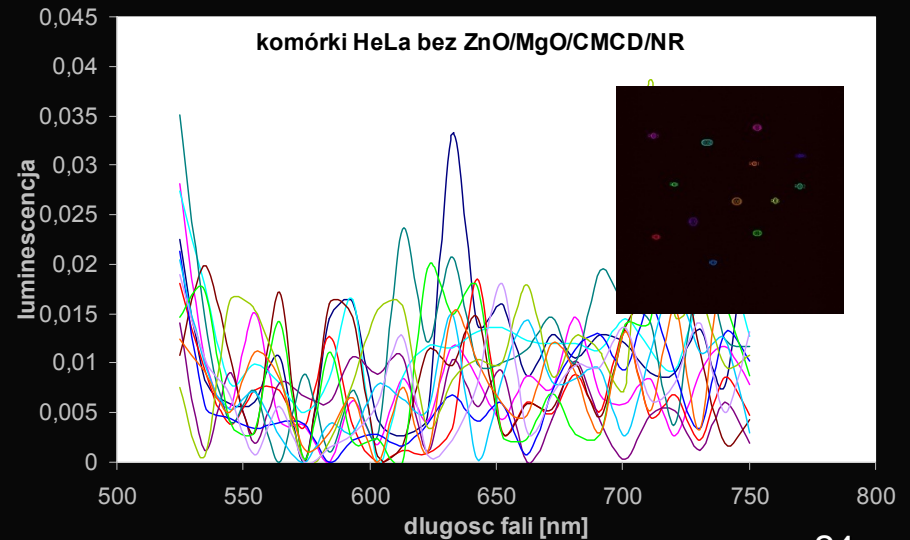
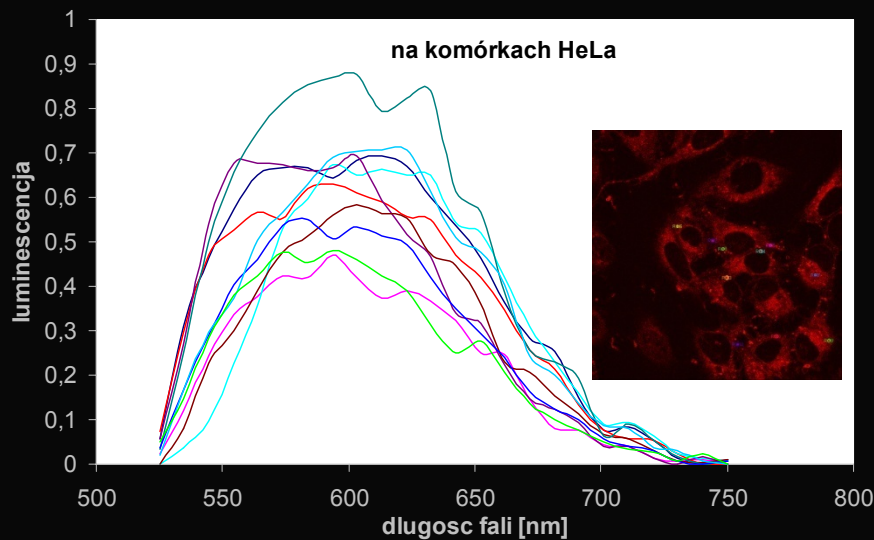
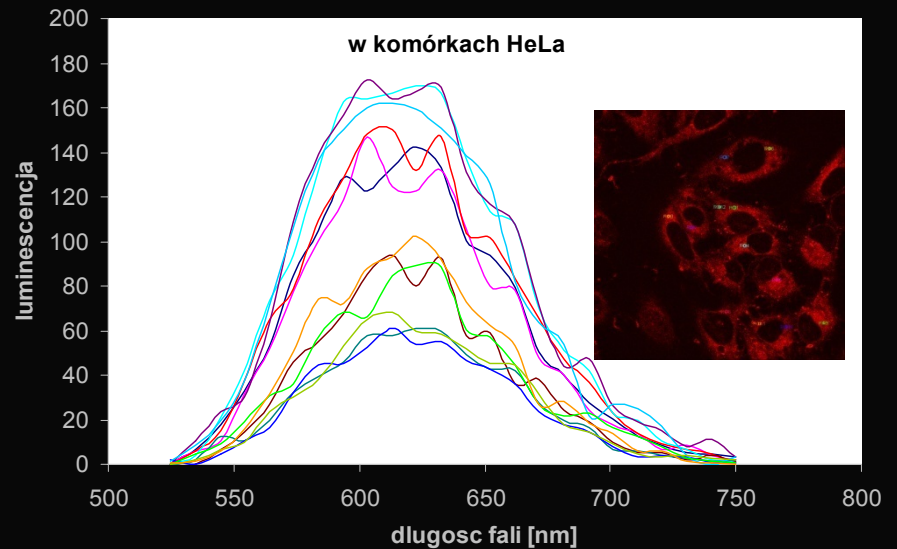
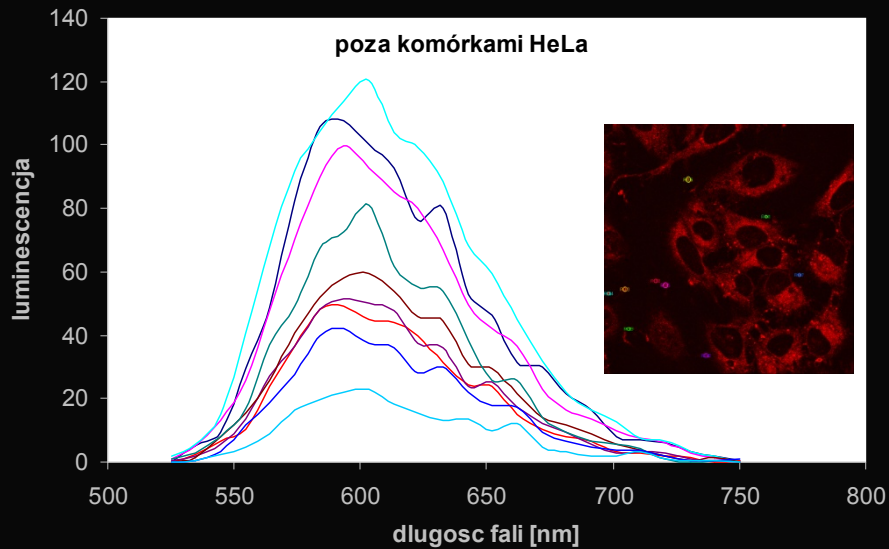
Do komórek HeLa zostało
dodane 20 ul roztworu kompleksu

Inkubacja 48 h z lipofektaminą

ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu w komórkach HeLa



Widma luminescencji pobudzenie 560 nm w zależności od miejsca na/w komórce HeLa

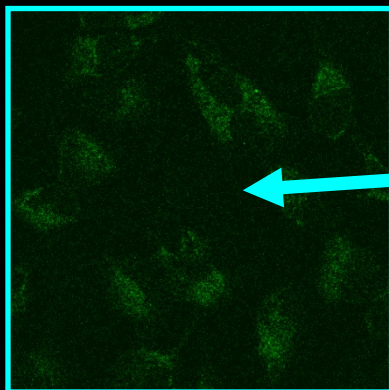
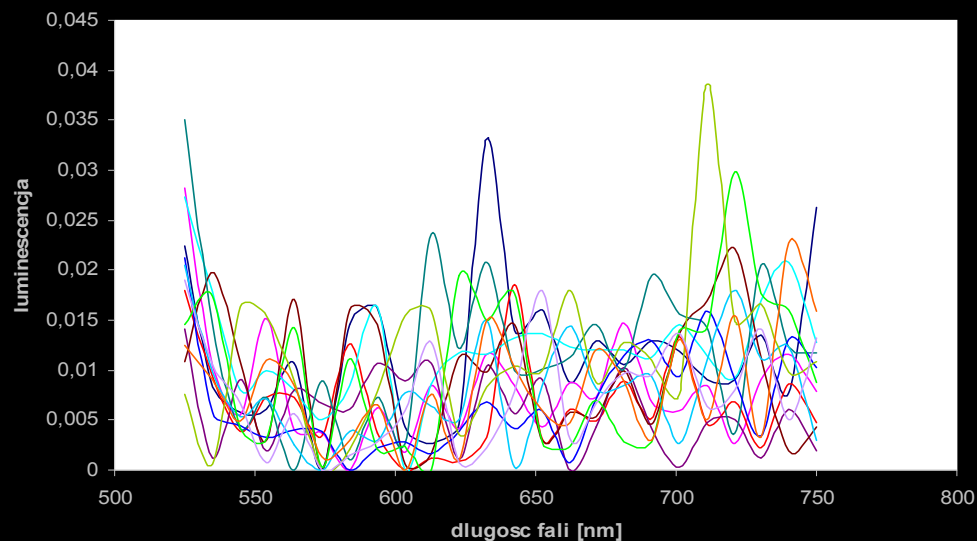
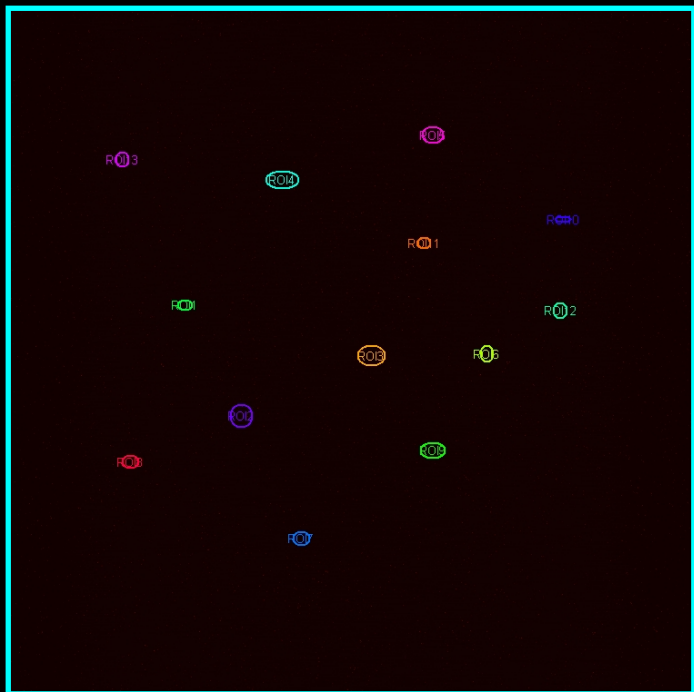


Zestawienie

$\lambda_{\max} \pm SD$ poza komórką	$\lambda_{\max} \pm SD$ na komórcie	$\lambda_{\max} \pm SD$ w komórcie
$600 \pm 3 \text{ nm}$	$597 \pm 9 \text{ nm}$	$619 \pm 3 \text{ nm}$

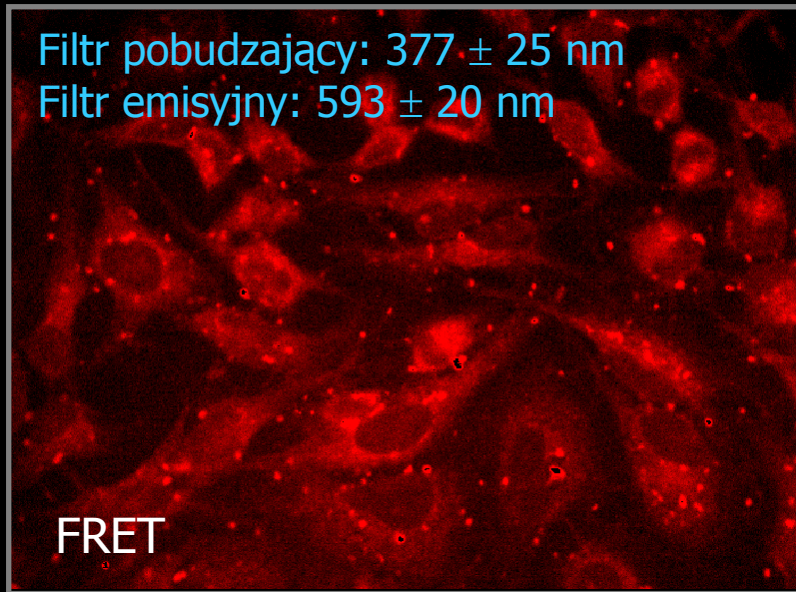
$I_{\max}$ poza komórką	$I_{\max}$ na komórcie	$I_{\max}$ w komórcie
23 – 120 arb. units	0,47 – 0,87 arb. units	54 – 167 arb. units

Widma luminescencji pobudzenie 560 nm Komórki bez ZnO/MgO/CMCD/NR



Autofluorescencja komórek
Pobudzenie 405 nm

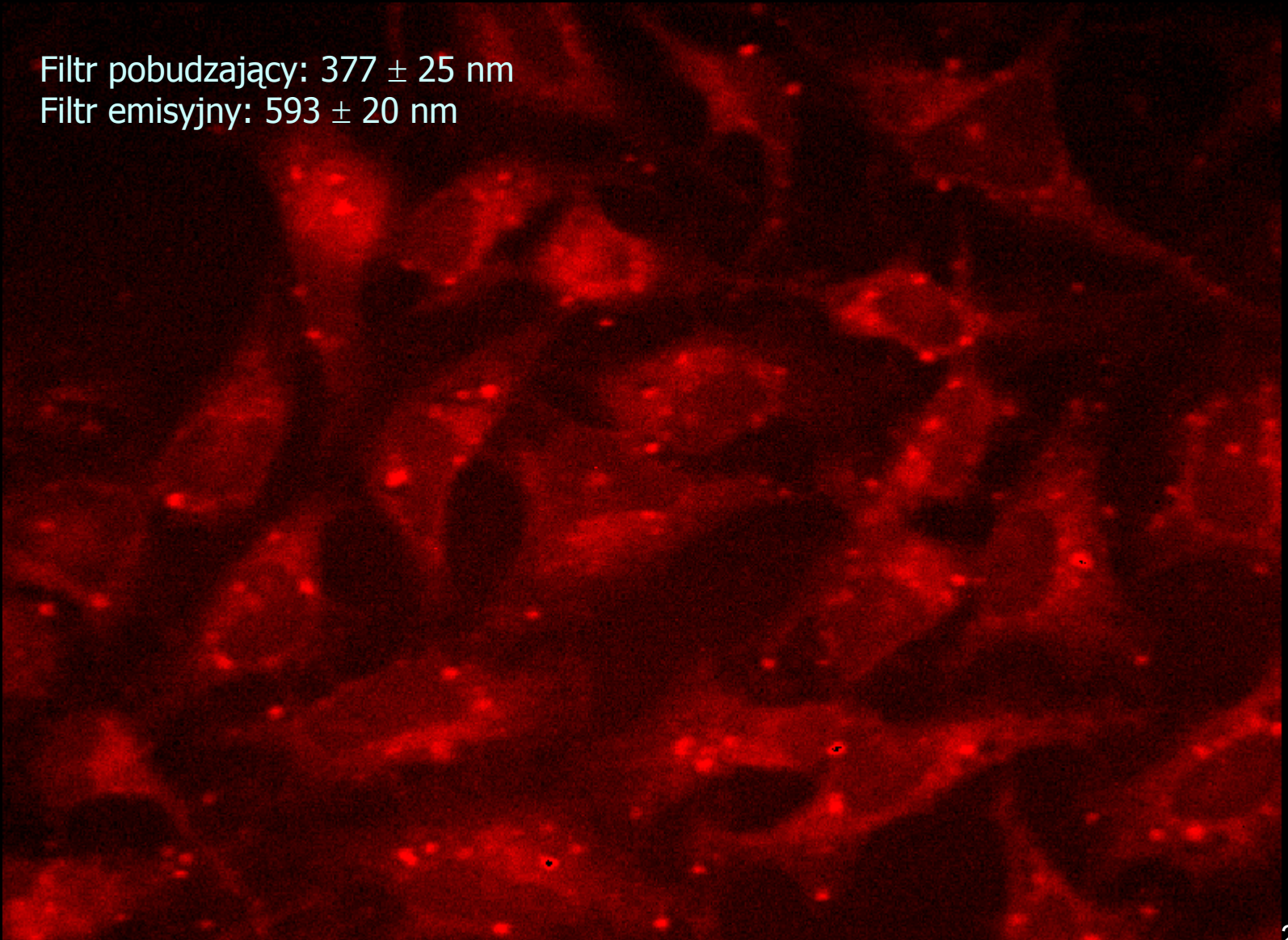
ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu w komórkach HeLa



ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu w komórkach HeLa

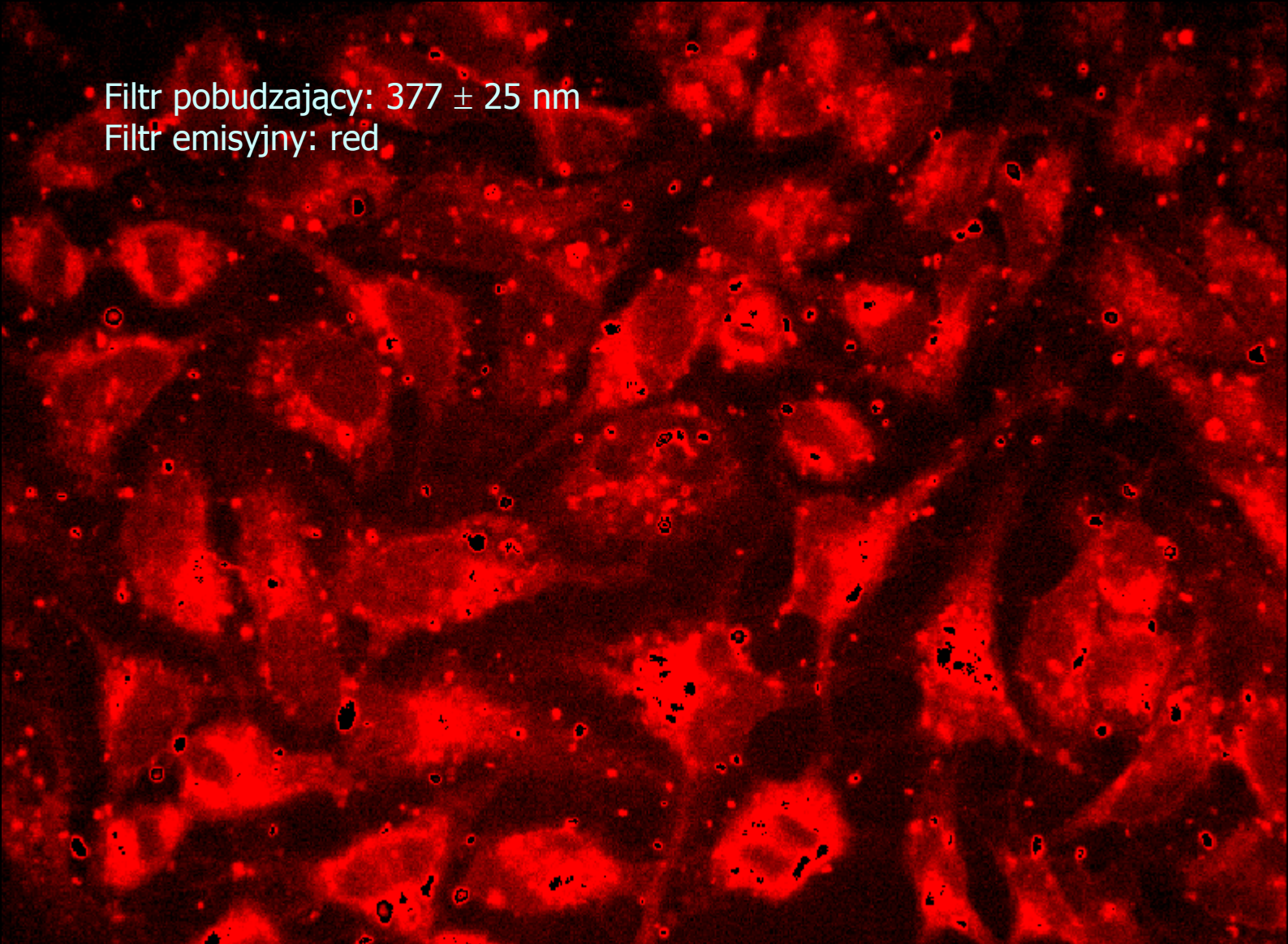
Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm

Filtr emisyjny: 593 ± 20 nm



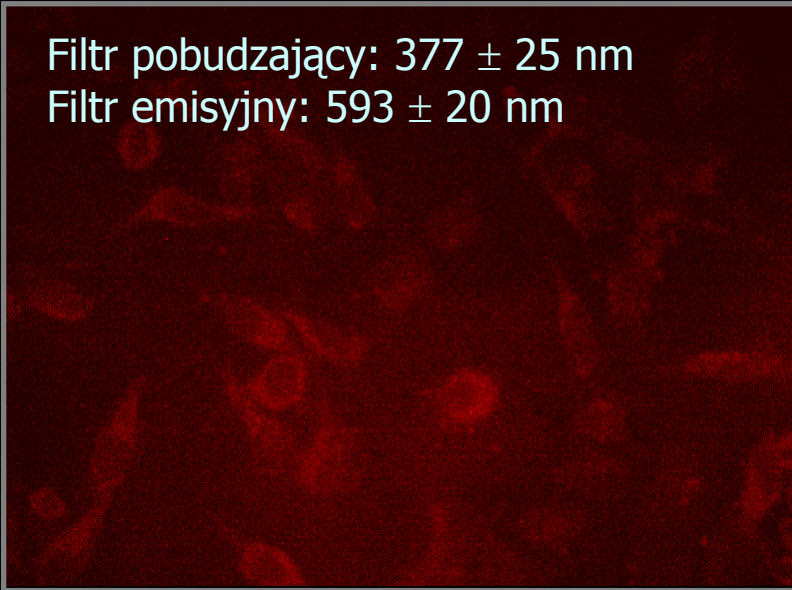
ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu w komórkach HeLa

Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm
Filtr emisyjny: red



Komórki HeLa - kontrola

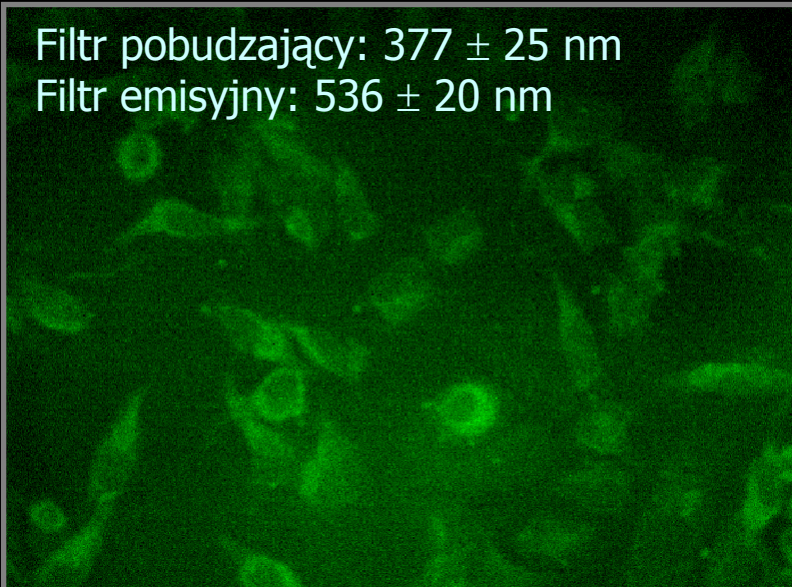
Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm
Filtr emisyjny: 593 ± 20 nm



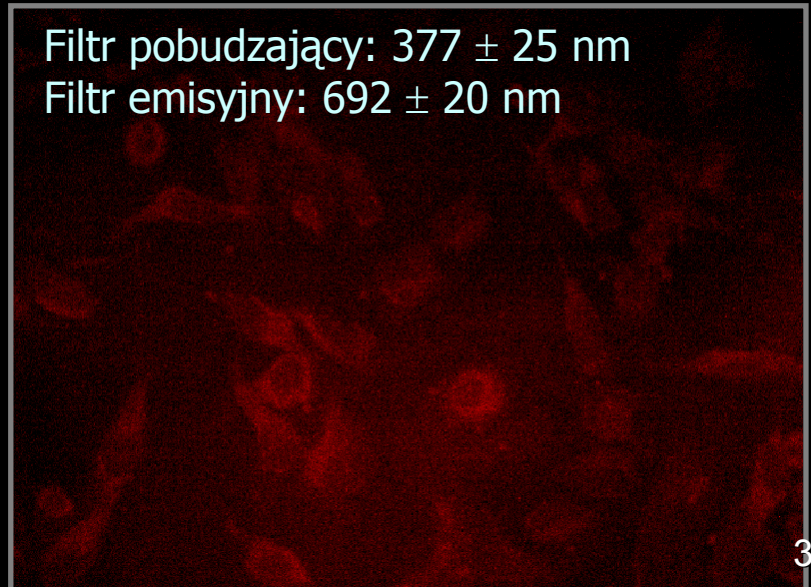
Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm
Filtr emisyjny: red



Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm
Filtr emisyjny: 536 ± 20 nm



Filtr pobudzający: 377 ± 25 nm
Filtr emisyjny: 692 ± 20 nm



Kolejny etap:

Zmiana sondy (Czerwień Nilu) na sondę czułą na
rodniki → znaczenie w chorobach
neurodegeneracyjnych

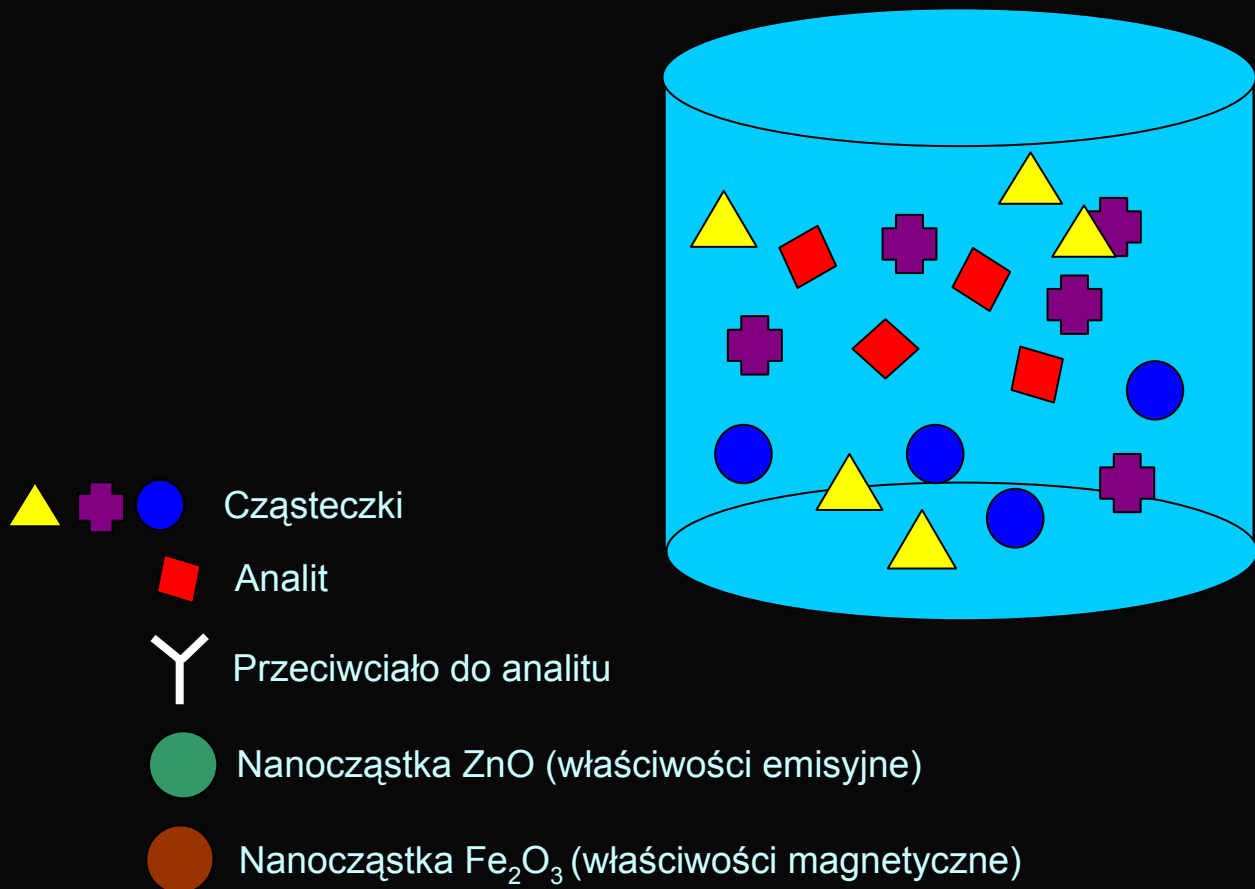
Ale po co to wszystko?

Trzy strategie budowania biosensorów:

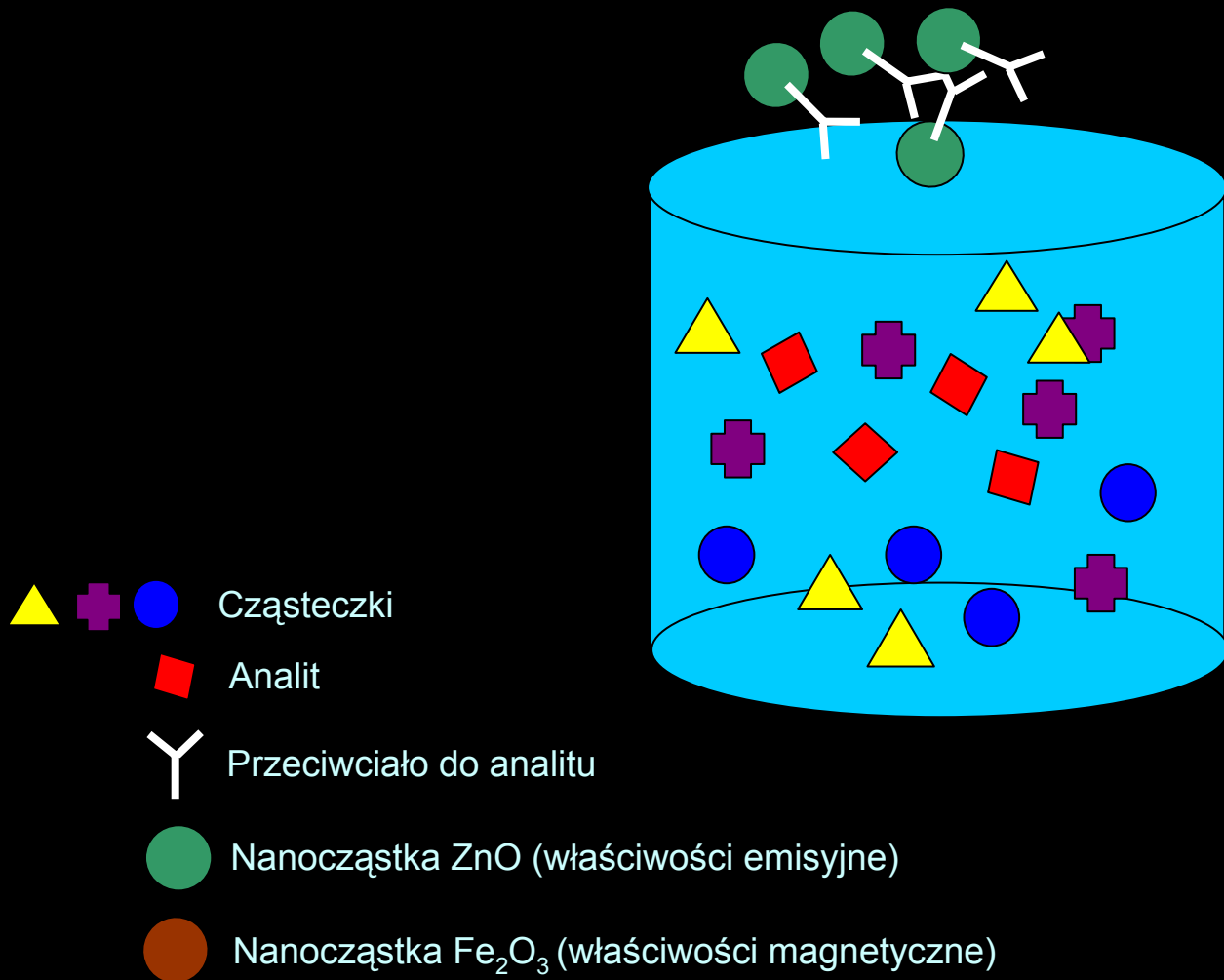
1. Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne
2. Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimerera)
3. FRET między nanocząstką ZnO pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona

Druga strategia budowania biosensorów

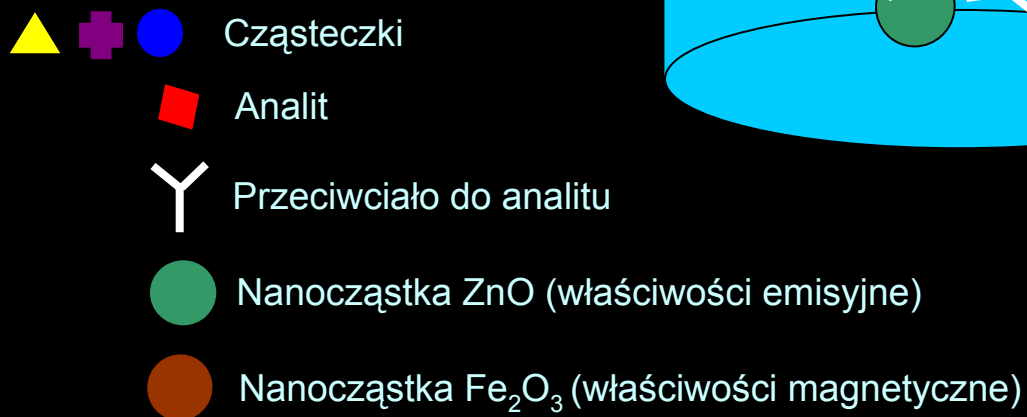
Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimera)



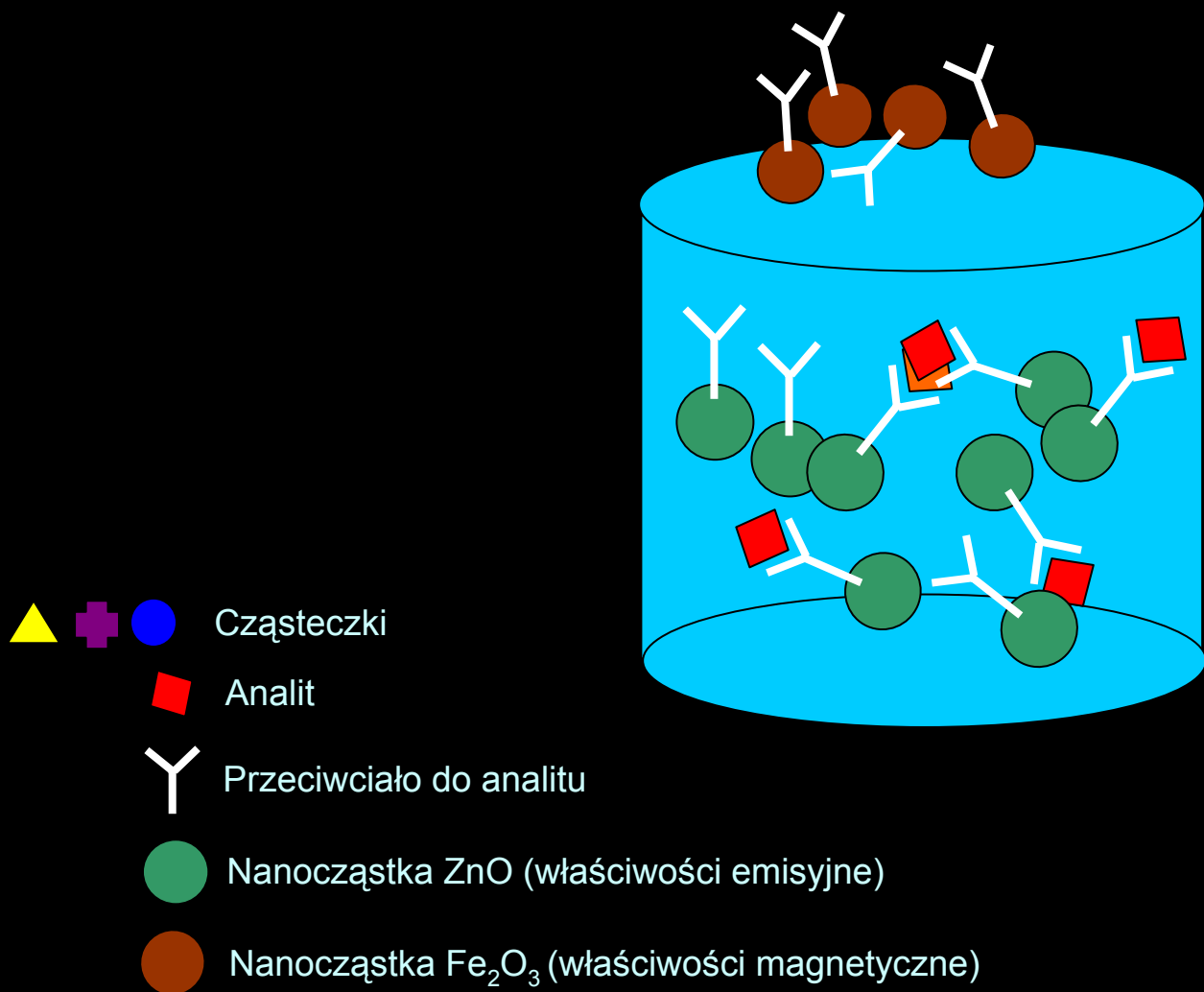
Druga strategia budowania biosensorów



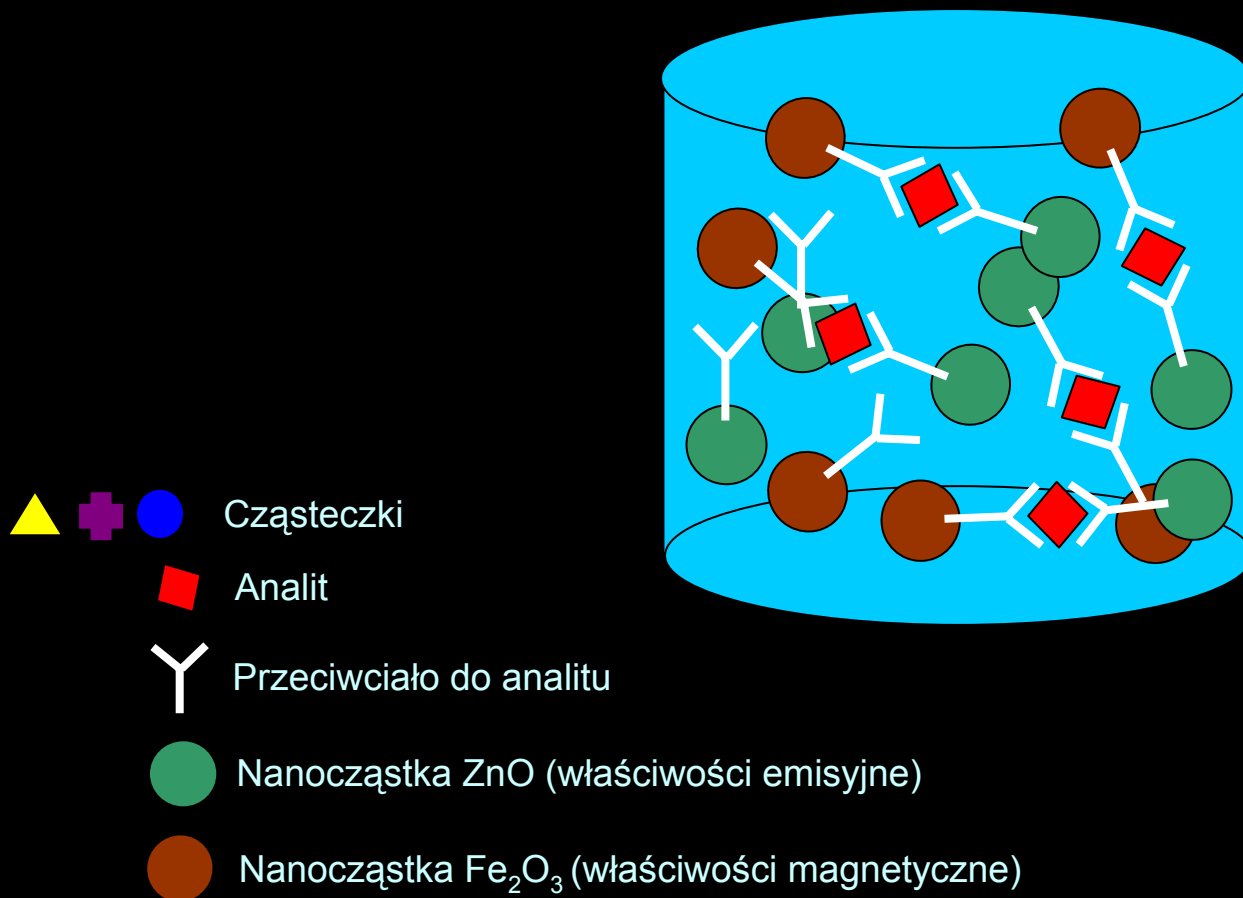
Druga strategia budowania biosensorów



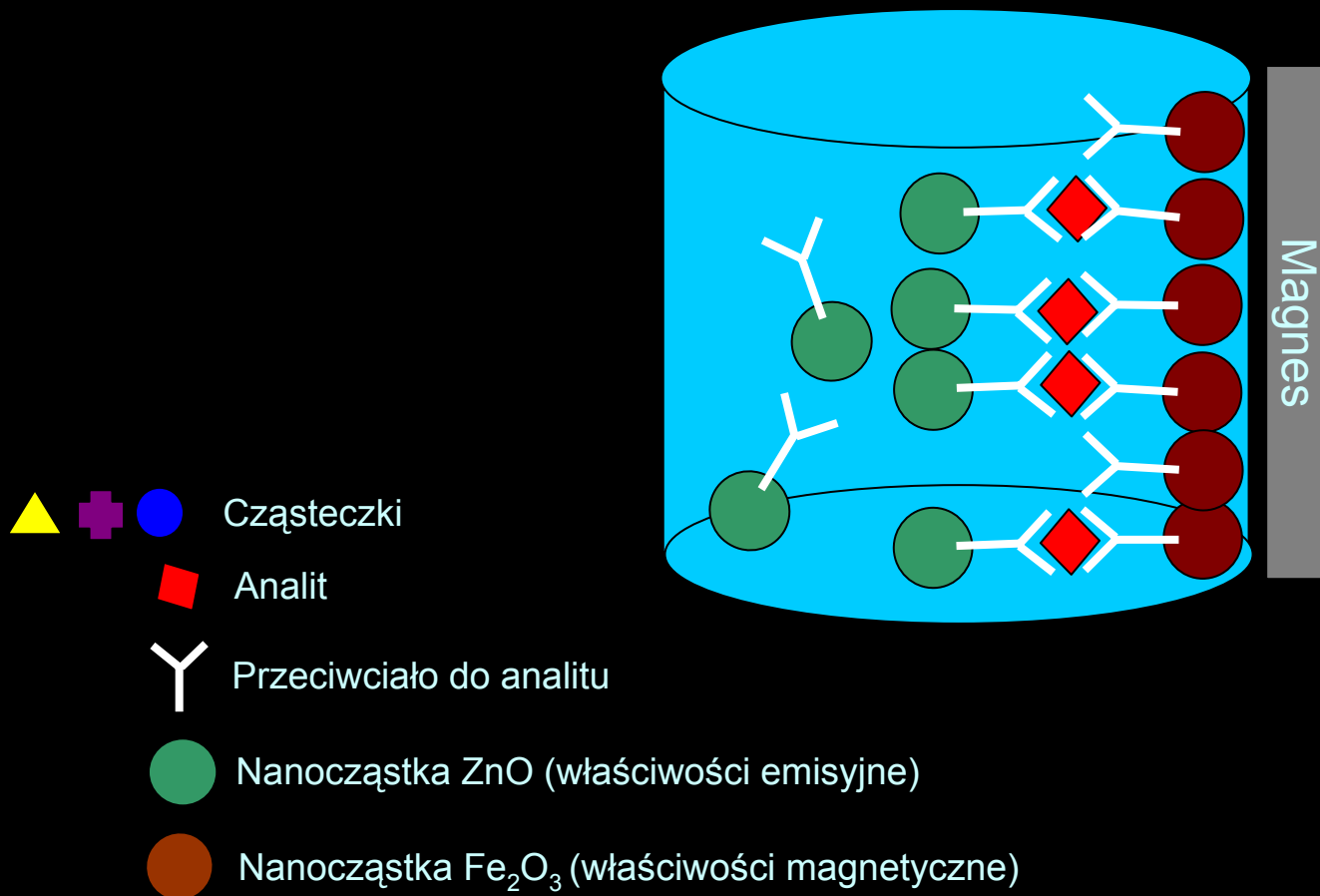
Druga strategia budowania biosensorów



Druga strategia budowania biosensorów

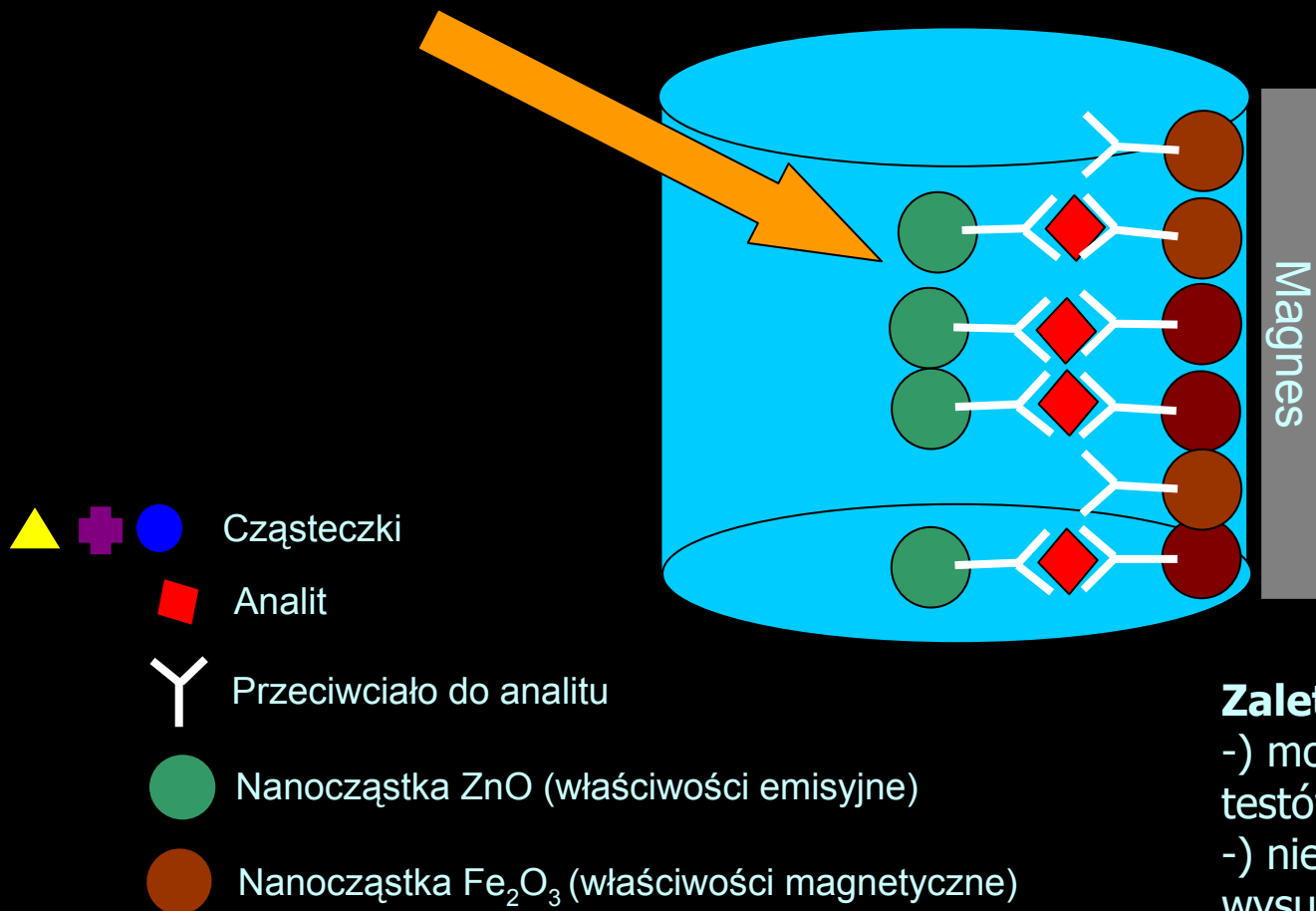


Druga strategia budowania biosensorów



Druga strategia budowania biosensorów

Detekcja luminescencji nanocząstek ZnO/MgO



Zalety:

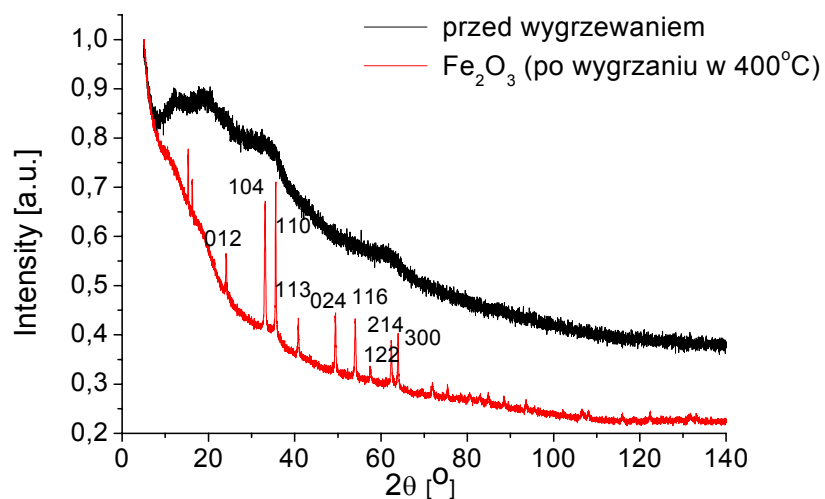
-) możliwość wykonywania testów w warunkach polowych
-) nie potrzebny jest wysublimowany sprzęt laboratoryjny

Nanocząstki Fe_2O_3

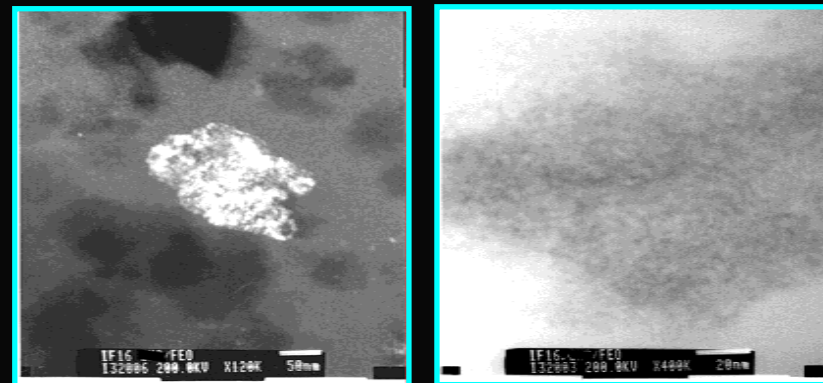
Właściwości strukturalne

Potwierdzenie romboedrycznej struktury Fe_2O_3 (hematyt)

Pomiar X-Ray



Pomiar TEM



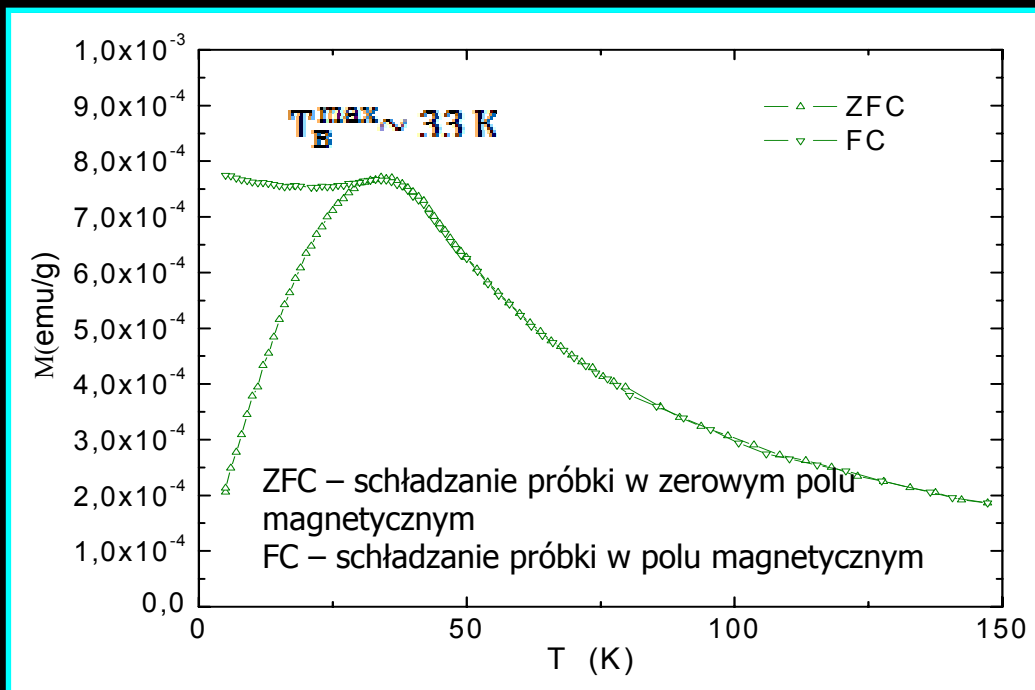
2R TEM [nm]	2R x-Ray [nm] (przed wypaleniem)	2R x-Ray [nm] (po wypaleniu)
~2,8	~ 2,5	~ 37,5

Nanocząstki Fe_2O_3

Właściwości magnetyczne

Nadprzewodnikowy interferometr kwantowy (SQUID)

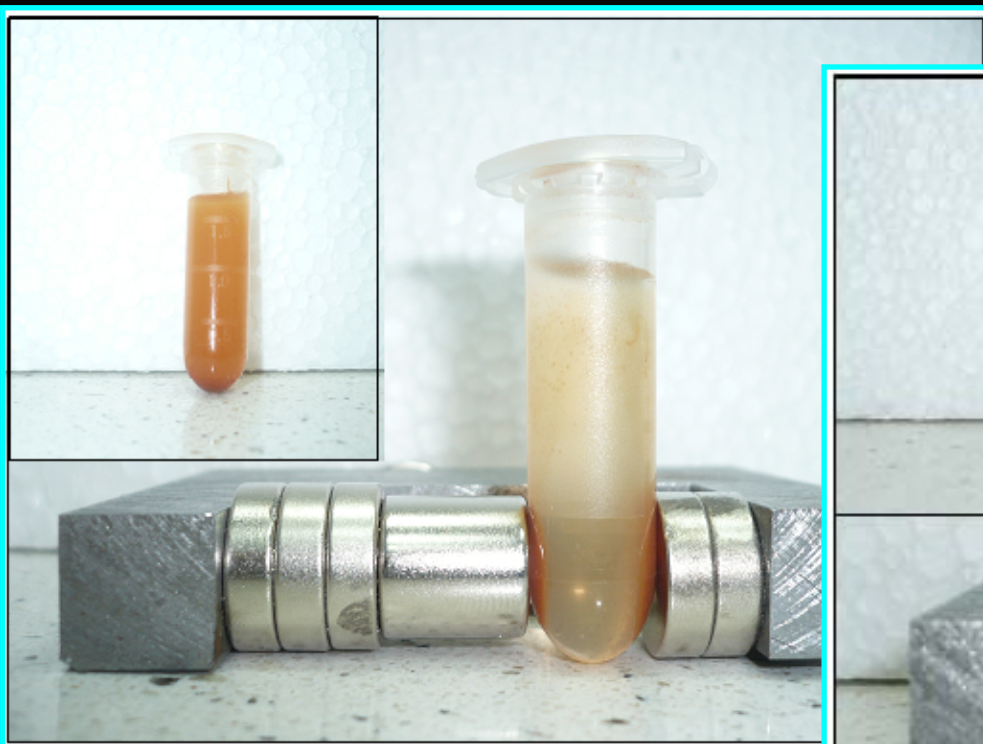
Temperaturowa zależność magnetyzacji ZFC-FC zmierzona dla kropek kwantowych Fe_2O_3 w polu magnetycznym o wartości 10 Oe.



Powyżej $T_B^{\max}$ (temperatura blokowania) cząstki wykazują zachowanie superparamagnetyczne, czego przejawem jest superpozycja krzywych ZFC i FC oraz spadek wartości magnetyzacji w miarę wzrostu temperatury

Nanocząstki Fe_2O_3

Właściwości magnetyczne



Nanocząstki przed wygrzaniem
($2R = 2,5 \text{ nm}$)



Nanocząstki Fe_2O_3 po wygrzaniu
($2R = 37,5 \text{ nm}$)

Kolejny etap: Pokrywanie nanocząstek ZnO/MgO i Fe_2O_3 związkami organicznymi w celu przyłączenia przeciwciał do oligomerów β -amyloidu

Ale po co to wszystko?

Trzy strategie budowania biosensorów:

1. Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne
2. Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimerera)
3. FRET między nanocząstką ZnO pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona



- pokrycie nanocząstek ZnO/MgO związkami organicznymi zakończonymi grupami karboksylowymi (-COOH), np. kwas oleinowy
- przyłączenie przeciwciała specyficznego do danego miejsca w komórce bez denaturacji białka

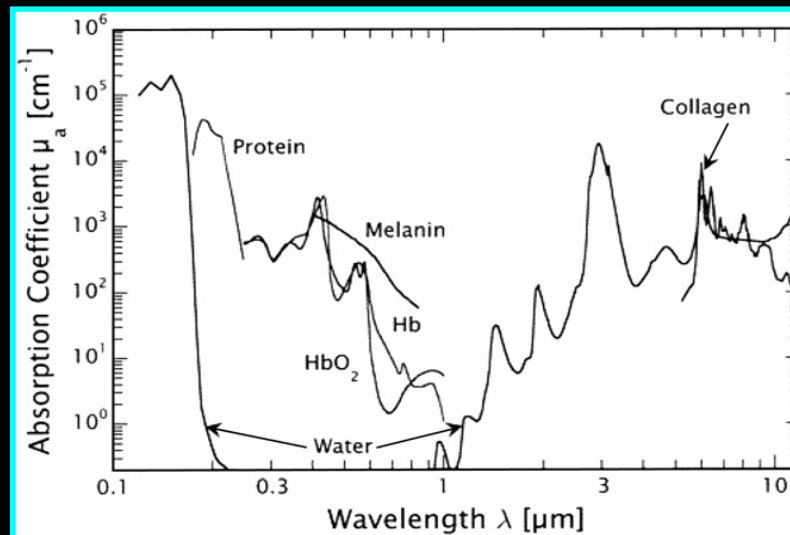
Ale po co to wszystko?

Trzy strategie budowania biosensorów:

1. Fluorescencyjny Rezonansowy Transfer Energii (FRET) między nanocząstką ZnO a barwnikiem organicznym czułym na środowisko zewnętrzne
2. Biosensor optyczno – magnetyczny do wykrywania krótkich oligomerów β -amyloidu (wczesne wykrywanie choroby Alzheimerera)
3. FRET między nanocząstką ZnO pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona
4. FRET między nanocząstką NaYF_4 : Er, Yb wykazującą właściwości „upconvertujące” pokrytą przeciwciałem a białkiem do którego zostaje przyłączona lub barwnikiem przyczepionym do jej powierzchni

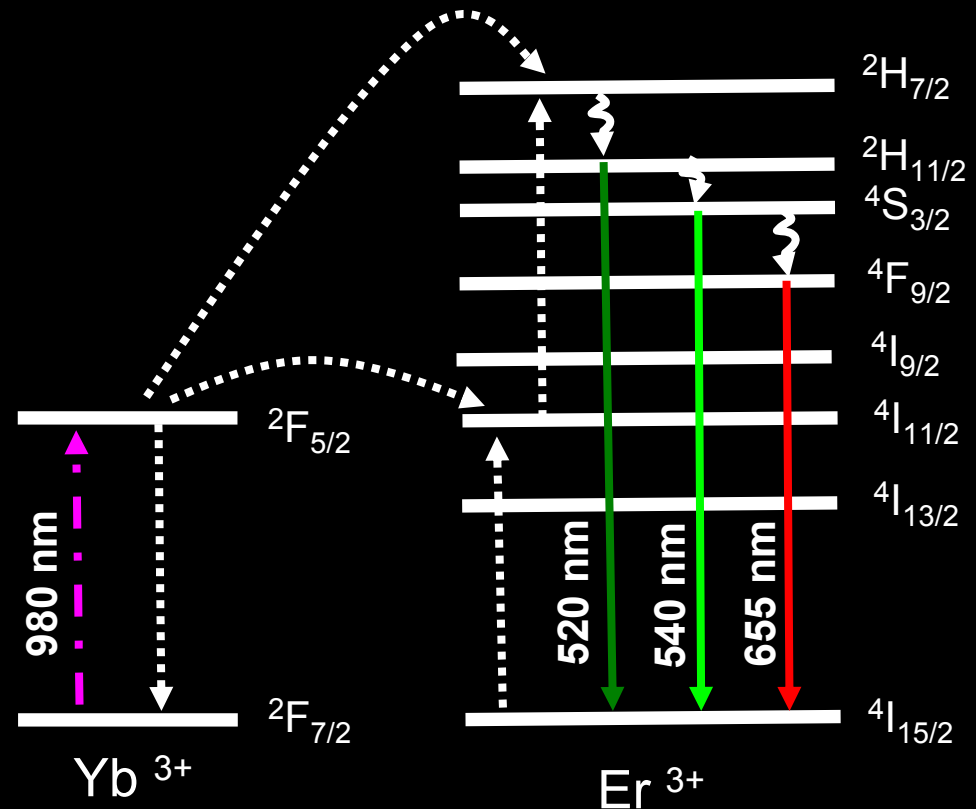
Upkonwersja

1. Upkonwersja opisuje konwersję promieniowania o niskiej energii (bliska podczerwień) do wyższego energetycznie promieniowania (widzialnego Er oraz ultrafioletu Gd) przez multifotonową absorpcję i późniejszą luminescencję.
2. Większość biologicznych struktur absorbuje światło w paśmie widzialnym i ultrafioletowym. Bliska podczerwień (długość fali 700 – 1000 nm) jest mało absorbowana przez molekuły biologiczne.
3. Układy biologiczne pobudzane bliską podczerwienią wykazują także mniej autofluorescencji niż pobudzane promieniowaniem ultrafioletowym.
4. Emisja w świetle widzialnym pozwala obserwować procesy życiowe wewnątrz komórek, a emisja w świetle UV pozwala na selektywne uśmiercanie komórek rakowych.



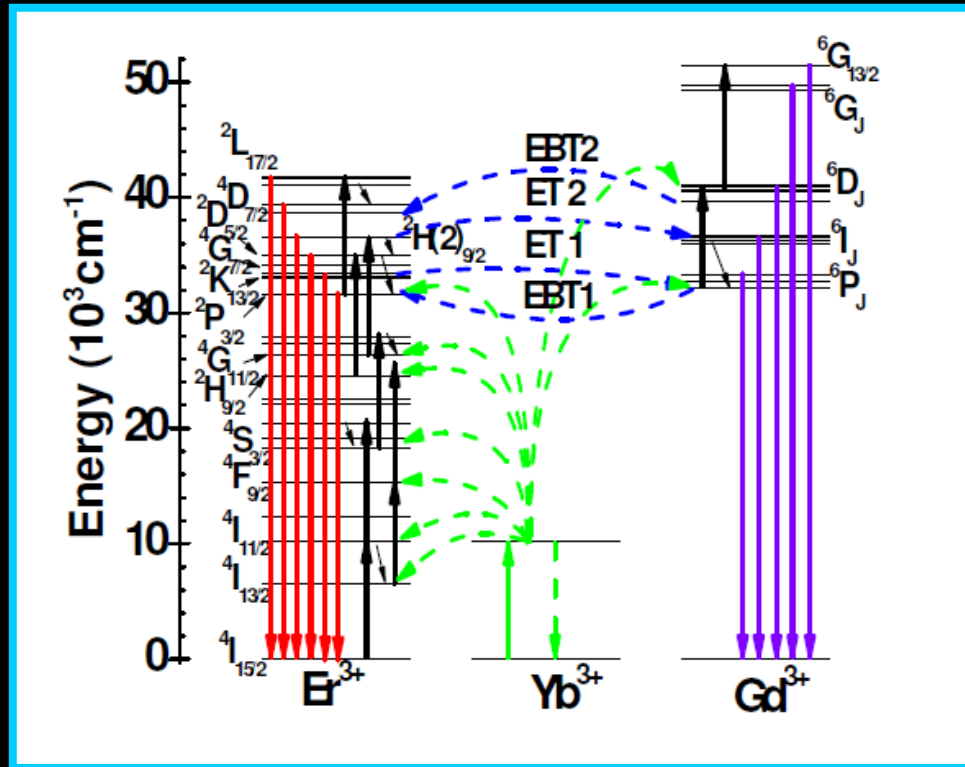
Mechanizm upkonwersji z transferem energii (ang. Energy transfer upconversion ETU)

Mechanizm jest oparty na sekwencyjnej absorpcji dwóch fotonów powodującej obsadzenie wyższego poziomu. Pobudzenie odbywa się przez transfer energii między dwoma sąsiadującymi jonami ziem rzadkich (między iterbem a erbem). Jeden jon działa jako absorber (donor energii) - iterb a drugi jako aktywator (akceptor energii) – erb. Aktywator jest pobudzany do stanu wyższego przez pierwszy niepromienisty transfer energii podczas gdy absorber relaksuje do stanu podstawowego. Drugie pobudzenie aktywatora i kolejny transfer energii umożliwia powstanie stanu emitującego.



Mechanizm upkonwersji z transferem energii (ang. Energy transfer upconversion ETU)

ET – Energy Transfer
EBT – Energy Back Transfer



Mechanizm:

-) Transfer energii między erbem (aktywator) a gadolinem (aktywator) (ET1 i ET2)
-) Transfer energii między iterbem (absorber) a gadolinem (aktywator)
-) Obserwujemy luminescencję przy długości fali 246 nm, 252 nm, 276 nm, 311 nm

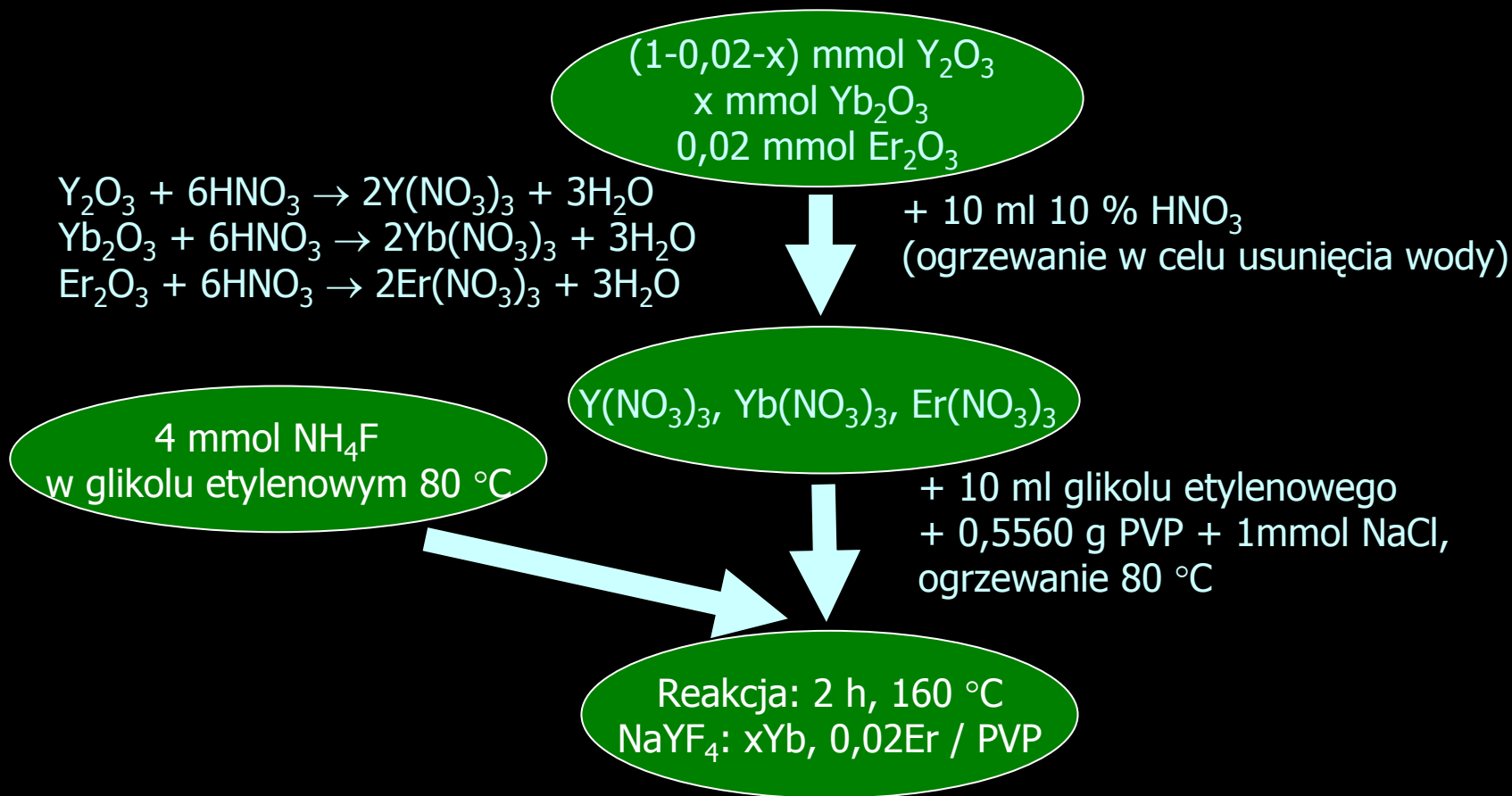
Dlaczego NaYF₄?

Wydażność upkonwersji zależy od:

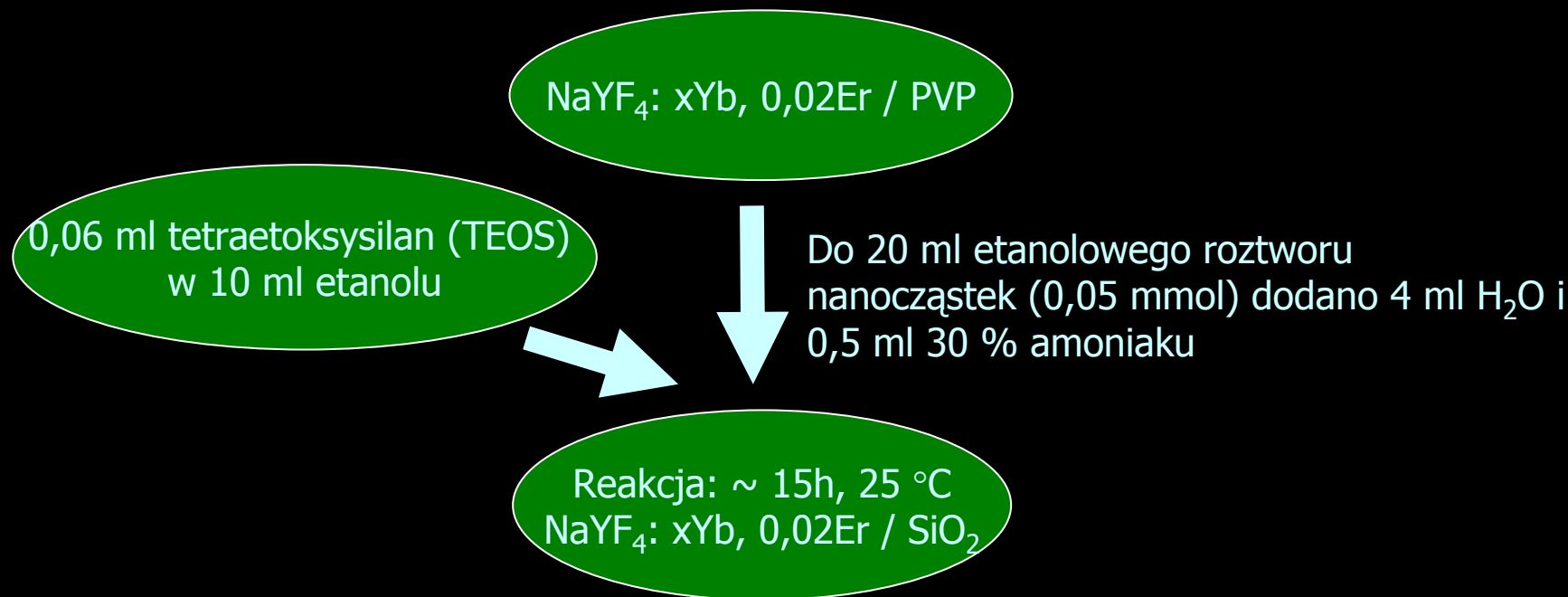
-) stężenia absorbera i aktywatora (stężenia domieszek, co determinuje odległość między sąsiadującymi jonami domieszkowymi)
-) struktury krystalicznej kryształu matrycowego
-) wielkości nanocząstek (im większa średnica tym większa intensywność emisji) – ze względu na mniejszy stosunek powierzchni do objętości. Na powierzchni nanocząstki atomy metali ziem rzadkich nie wykazują właściwości upkonwertujących.

Kryształ matrycowy powinien mieć sieć krystaliczną dopasowaną do jonów domieszkowych i niską energię fononową, aby zminimalizować niepromieniste procesy relaksacji. Te wymagania spełniają fluorki.

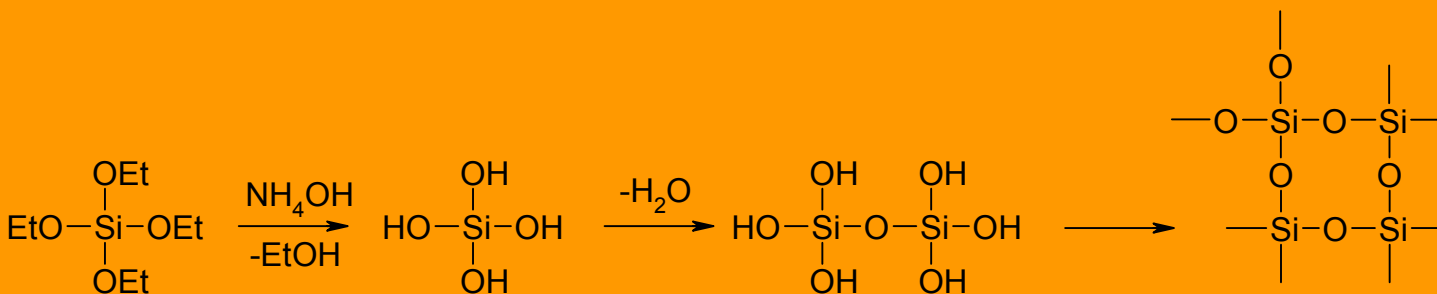
Synteza nanocząstek NaYF₄: Er, Yb, Gd



Pokrywanie nanocząstek $\text{NaYF}_4\text{: Er, Yb, Gd}$ warstwą SiO_2



Hydroliza TEOS w obecności wodorotlenku amonu jako katalizatora



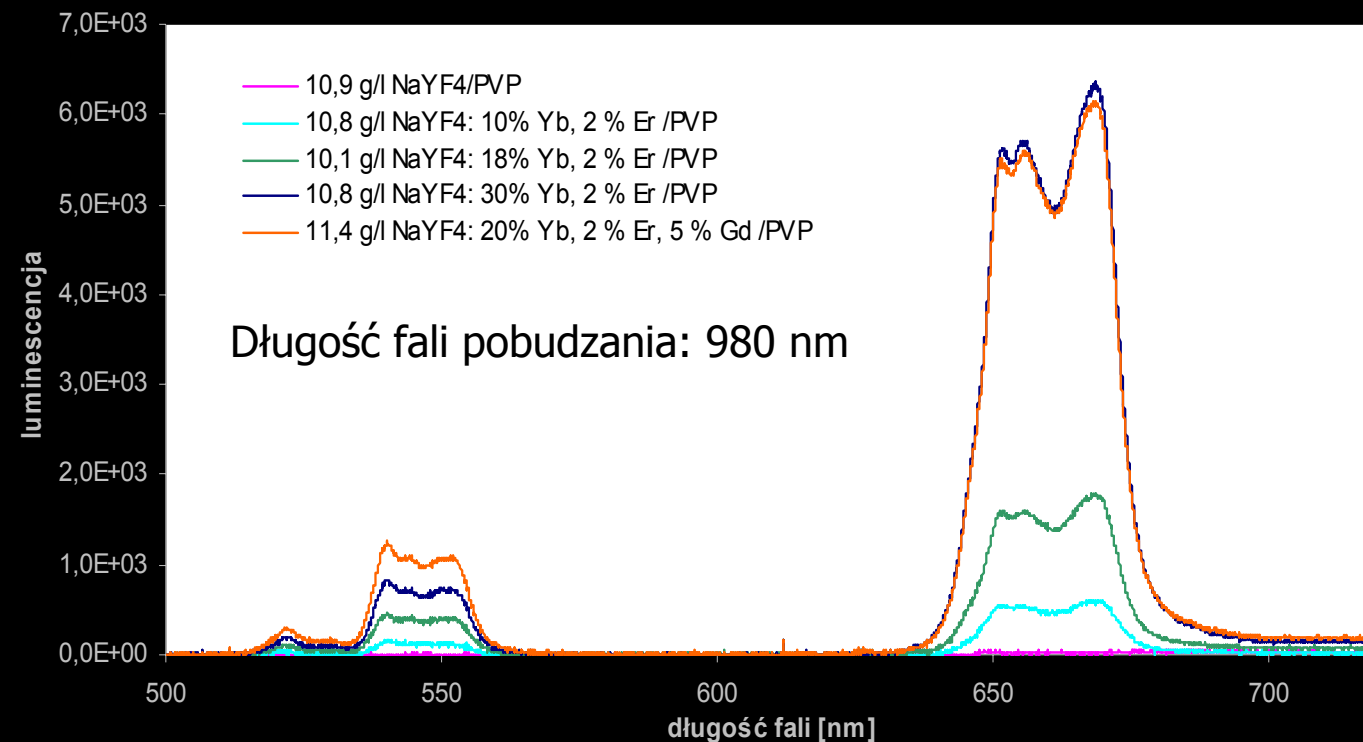
TEOS

Kwas monosilanowy

Kwas disilanowy

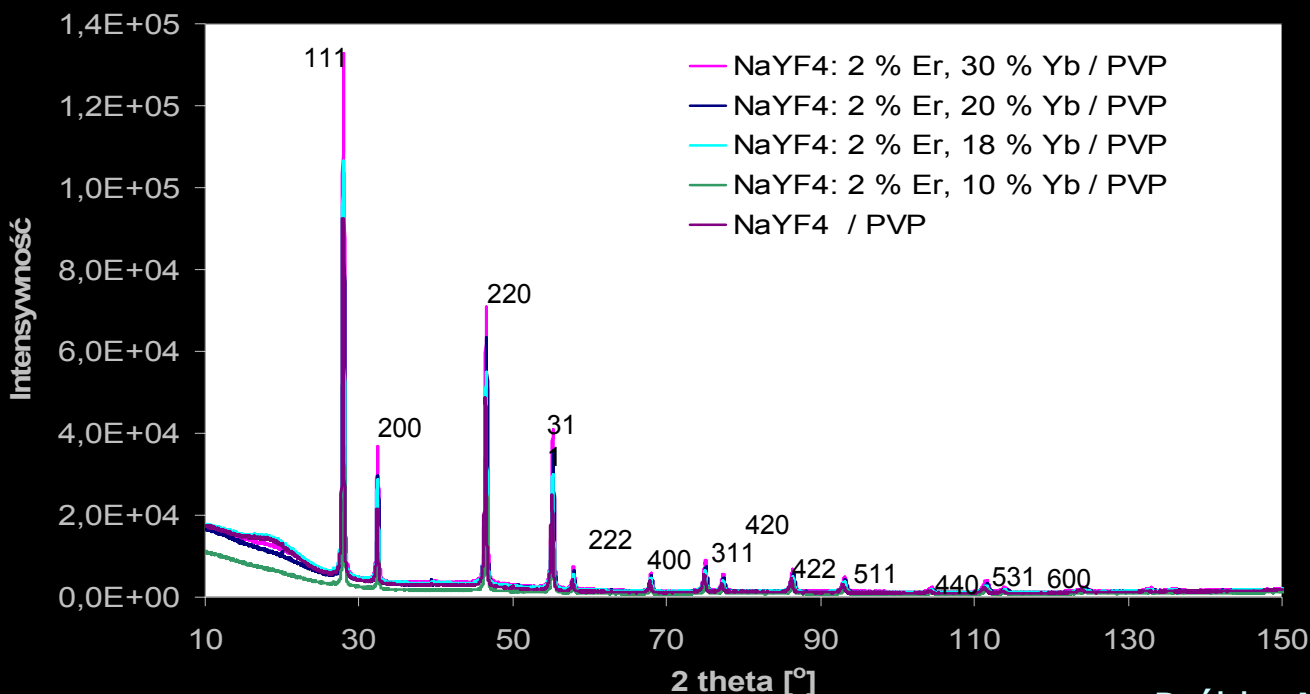
SiO₂

Luminescencja nanocząstek NaYF₄: Er, Yb, Gd



Próbka	Stosunek powierzchni pod pikiem 660 nm do 540 nm (średnia 3 pomiarów)
2 % Er, 10 % Yb	6,4
2 % Er, 18 % Yb	5,9
2 % Er, 30 % Yb	11,4
20 % Yb, 2% Er, 5 % Gd	7,4

Wielkość i struktura nanocząstek NaYF₄: Er, Yb, Gd

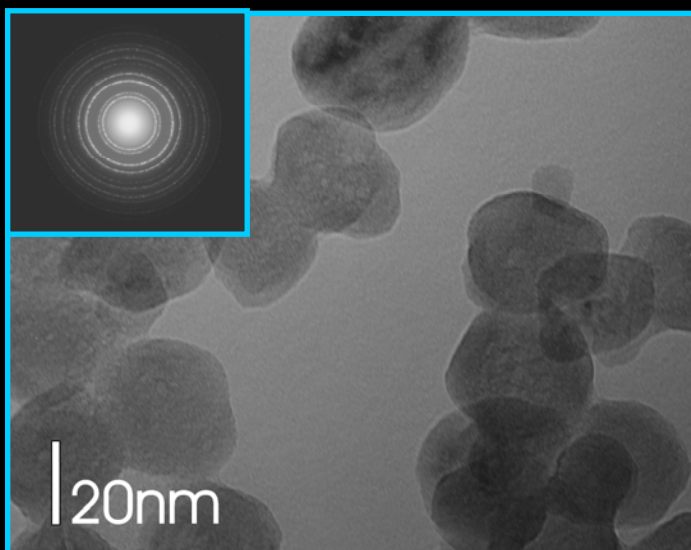


**Dyfrakcja rentgenowska –
potwierdzenie kubicznej struktury**

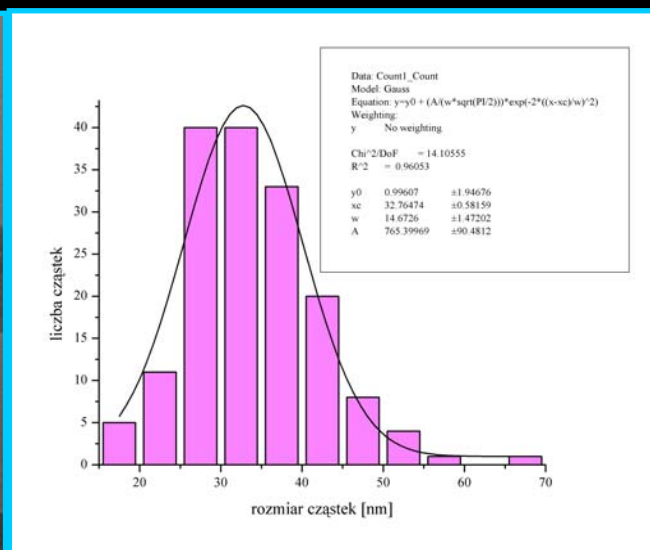
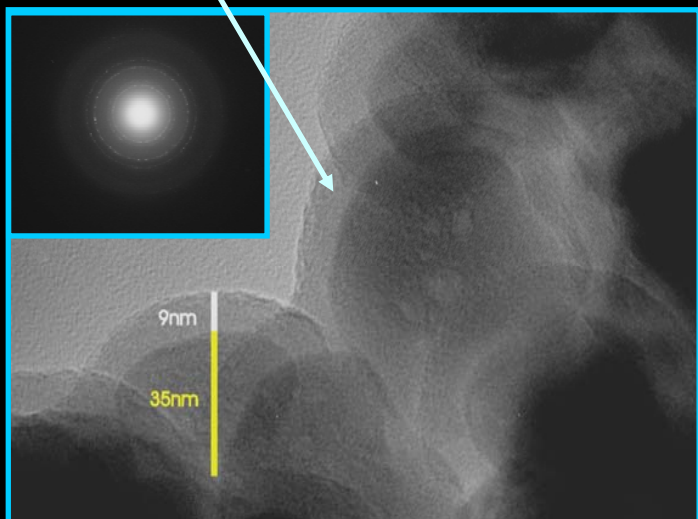
Próbka NaYF ₄	Średnica [nm]
0 % Er, 0 % Yb	~30
2 % Er, 10 % Yb	~30
2 % Er, 18 % Yb	~30
2 % Er, 20 % Yb	~36
2 % Er, 30 % Yb	~28
20 % Yb, 2 % Er, 5 % Gd	~32

Wielkość i struktura nanocząstek NaYF_4 : Er, Yb, Gd

Transmisyjny Mikroskop Elektronowy
Obraz nanocząstek NaYF_4 : 30 % Yb, 2 % Er / PVP
Potwierdzenie kubicznej struktury



Otoczka SiO_2

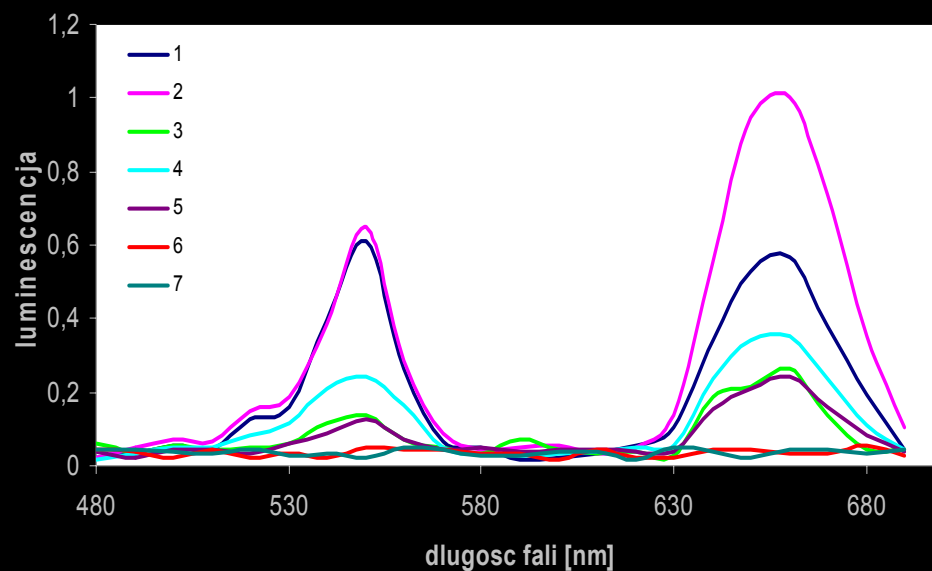
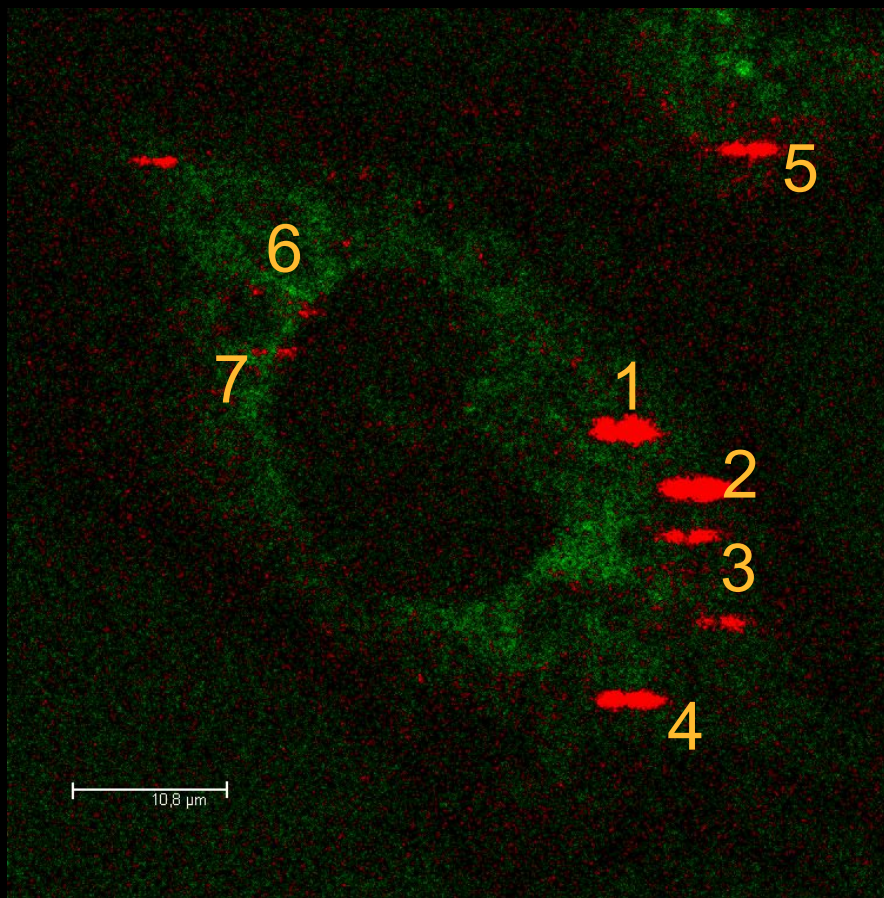


Próbka NaYF_4	Średnica [nm]
0 % Er, 0 % Yb	~35
2 % Er, 10 % Yb	~45
2 % Er, 18 % Yb	~45
2 % Er, 20 % Yb	~55
2 % Er, 30 % Yb	~35
20 % Yb, 2 % Er, 5 % Gd	~50

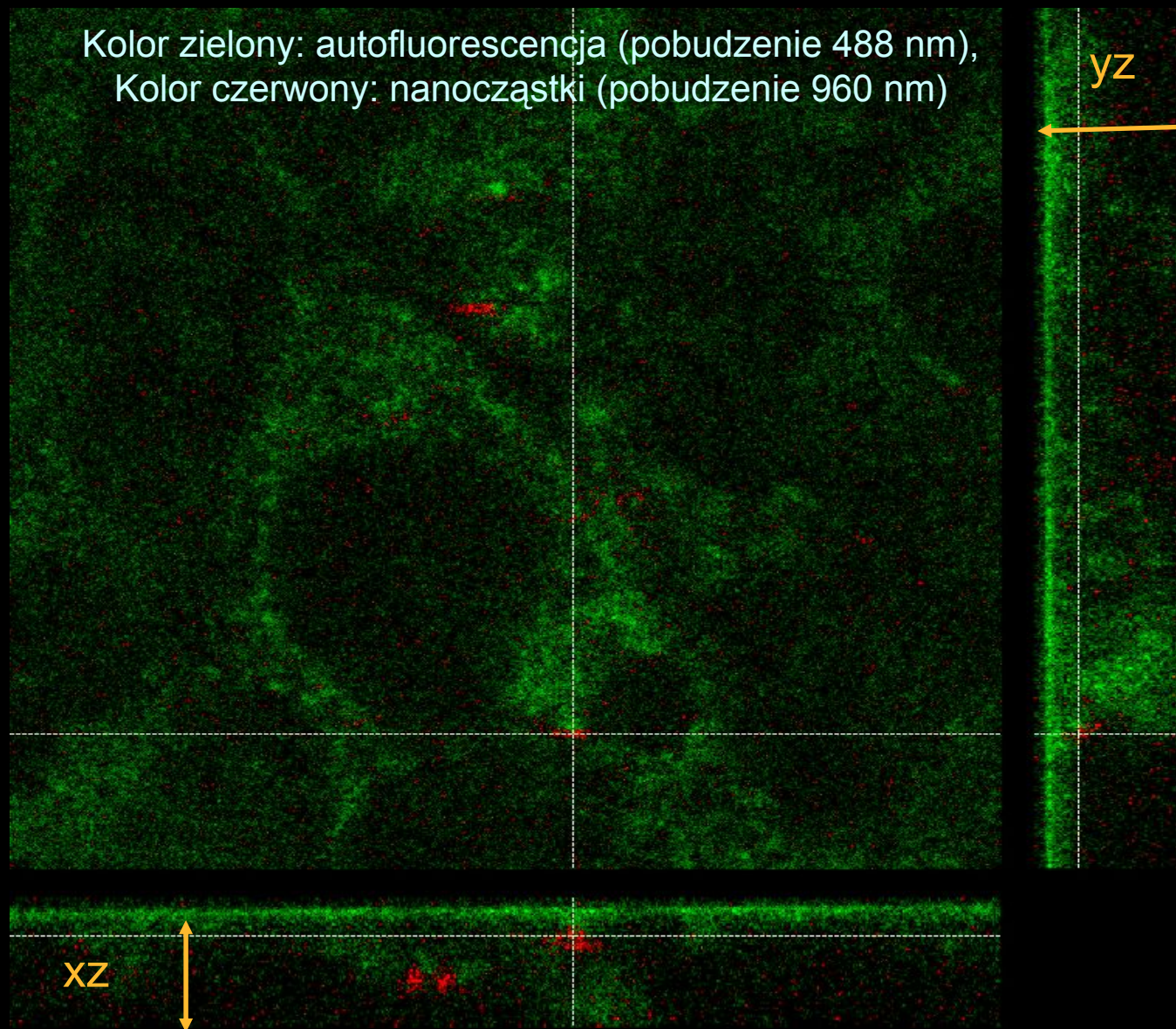
Nanocząstki NaYF_4 : Er, Yb, Gd wewnątrz komórek HeLa

Kolor zielony: autofluorescencja (pobudzenie 488 nm),

Kolor czerwony: nanocząstki (pobudzenie 960 nm)



Nanocząstki NaYF_4 : Er, Yb, Gd wewnątrz komórek HeLa



Kolejny etap:
Pokrycie nanocząstek NaYF_4 warstwą organiczną w celu przyłączenia białka lub barwnika organicznego czułego na środowisko

Podsumowanie

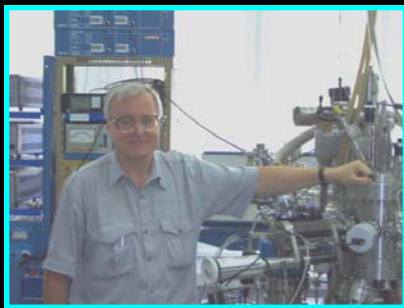
1. Nanocząstki ZnO/MgO/CMCD użyto do zbudowania biosensora czułego na środowisko zewnętrzne dzięki fluorescencyjnemu rezonansowemu transferowi energii między nanocząstkami ZnO/MgO (donor) a Czerwienią Nilu (akceptor) ulokowaną wewnątrz cyklodekstryny
2. Nanocząstki ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilu zostały wprowadzone do komórek nowotworowych HeLa i zaobserwowano zmianę luminescencji Czerwieni Nilu w zależności od miejsca ulokowania w/na/obok komórkach HeLa.
3. Prawdopodobnie zaobserwowano FRET wewnątrz komórek HeLa.
4. Utworzono nanocząstki Fe₂O₃ wykazujące właściwości superparamagnetyczne w temperaturze pokojowej w celu użycia ich razem z nanocząstkami ZnO/MgO do budowy biosensora do wykrywania krótkich oligomerów β - amyloidu (znaczenie w chorobie Alzheimera)
5. Zsyntetyzowano i scharakteryzowano nanocząstki NaYF₄: Er, Yb, Gd wykazujące właściwości upkonwertujące i wprowadzono je do wnętrza komórek HeLa.

Podziękowanie

Zespół Fizyki Biologicznej



Prof. Danek Elbaum



Dr Krzysztof Fronc



Mgr Anna
Baranowska - Korczyk



Mgr Izabela Kamińska

Instytut Fizyki PAN

Mgr Kamil Sobczak – pomiary TEM
Mgr Piotr Dziawa – pomiary SQUID
Dr Roman Minikayev – pomiary X-ray
Prof. Wojciech Paszkowicz – pomiary X-ray

Wydział Fizyki UAM

Sebastian Szewczyk – synteza $\text{NaYF}_4: \text{Er}, \text{Yb}$

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Kamil Koper – wprowadzanie cząstek do komórek
Prof. Piotr Stępień

Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

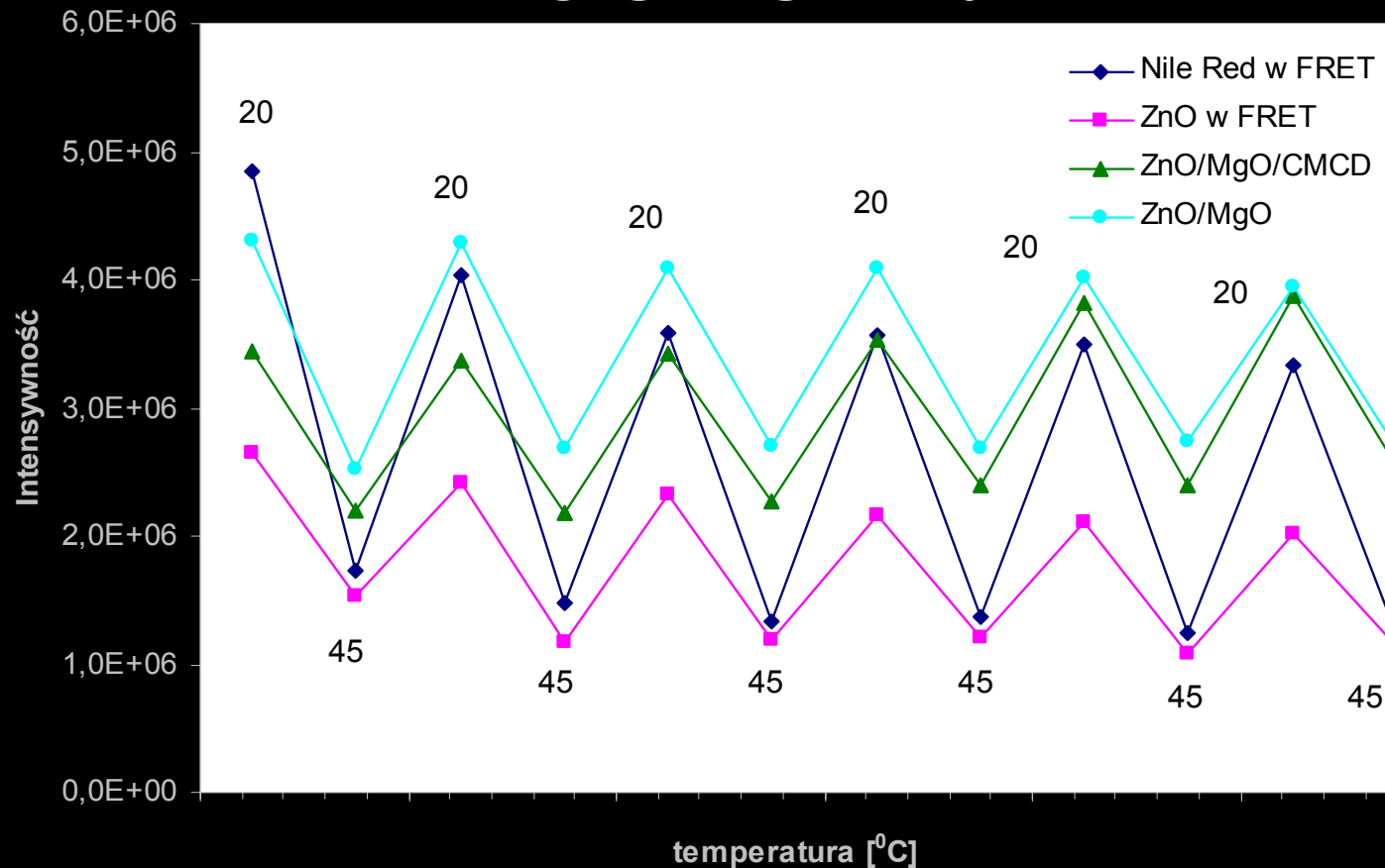
Dr Piotr Krakowian – mikroskop konfokalny
Prof. Tomasz Kowalewski
Dr Sławek Błoński, Mgr Krzysztof Zembrzycki –
pomoc

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN

Prof. Grzegorz Wilczyński – mikroskop konfokalny
Dr Jakub Włodarczyk – mikroskop konfokalny



Wpływ temperatury na intensywność luminescencji w układzie ZnO/MgO/CMCD i Czerwień Nilu



$\Delta \text{intNRwFRET}$	$\Delta \text{intZnOwFRET}$	$\Delta \text{intZnO/MgO/CMCD}$	$\Delta \text{intZnO/MgO/CMCD}$
$2,3 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$

FRET: ZnO/MgO/CMCD i Czerwień Nilu

Równanie Fostera pozwala na określanie odległości między donorem a akceptorem, dlatego też jest używane przez chemików jako „elektroniczna suwmiarka”

Przyjmując założenia:

- 1). Donor oddziałuje z wieloma akceptorami
- 2). Transfer energii do każdego z akceptorów można rozważać jako niezależne zdarzenie to wydajność transferu energii może być wyrażona równaniem:

$$Q = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + r^6}$$

n – liczba molekuł akceptora

Dla układu ZnO/MgO/CMCD → Czerwień Nilowa $R_0 = 3,4$ nm [1]

Wartość r , odległość donora od akceptora w układzie ZnO/MgO/CMCD → Czerwień Nilowa, może być wyznaczona przez dopasowanie powyższego równania do eksperymentalnie obserwowanych zależności między wydajnością rezonansowego transferu energii a stężeniem akceptora

FRET: ZnO/MgO/CMCD i Czerwień Nilu

Wydajność rezonansowego transferu energii:

$$Q = \frac{I_{ZnO} - I_{ZnO-NR}}{I_{ZnO}}$$

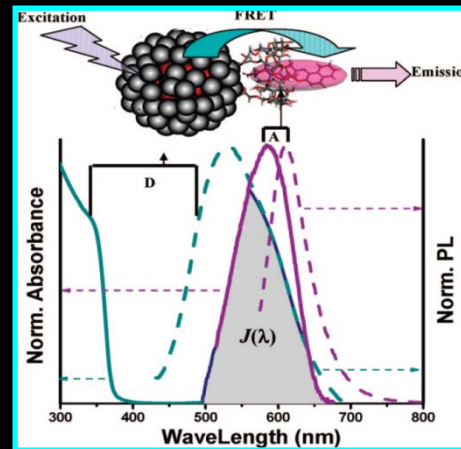
I_{ZnO} – intensywność luminescencji donora ZnO/MgO/CMCD w wodzie w przypadku braku Czerwieni Nilowej
 I_{ZnO-NR} – intensywność luminescencji donora ZnO/MgO/CMCD w wodzie w obecności różnych stężeń Czerwieni Nilowej (stężenie donora jest stałe)

$$R_0 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\gamma_D^0}{128\pi^5 N_A \eta^4} J(\lambda)$$

κ^2 – czynnik orientacyjny, który wynosi 2/3 dla losowo zorientowanych dipoli donor – akceptor,
 γ_D^0 – wydajność kwantowa donora w nieobecności akceptora
 N_A – liczba Avogadro
 η – współczynnik załamania światła
 $J(\lambda)$ – spektralne nałożenie emisji donora i absorpcji akceptora:

$$Q = \frac{k_{ZnO-NR}}{k_{ZnO-NR} + \tau_{ZnO}^{-1}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

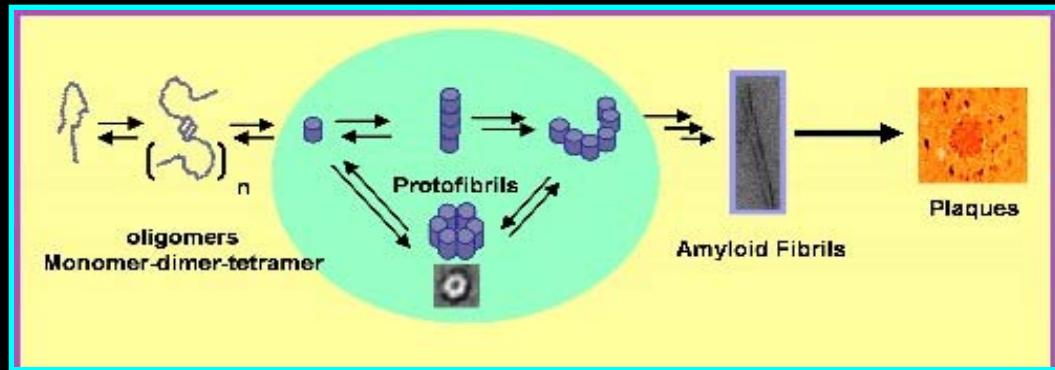
τ_{ZnO} – czas zaniku emisji donora ZnO/MgO w nieobecności Czerwieni Nilowej
 k_{ZnO-NR} – stała szybkości emisji donora ZnO/MgO/CMCD w obecności akceptora Czerwieni Nilowej
 r – odległość między donorem a akceptorem
 R_0 – krytyczna odległość (promień Forster'a), przy której transfer i spontaniczny zanik ekscytowanego donora są równie prawdopodobne, $k_{ZnO-NR} = \tau_{ZnO}^{-1}$.



$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Toksyczność krótkich oligomerów β -amyloidu

Zaobserwowano, po przebadaniu surowicy 20 pacjentów z Chorobą Alzheimera (AD) i 18 pacjentów zdrowych, zwiększoną ilość oligomerów i krótkich włókien amyloidowych w obecności surowicy z AD w porównaniu do populacji kontrolnej. Ma to potencjalna wartość diagnostyczną.



Nowicka, et.al., JAD, 2010

Struktura Czerwieni Nilu

