

Au-nano-delci in njihova uporaba

Au-nano particles and their application

Rebeka Rudolf^{1,2*}, Lidija Zorko² in Ivan Anžel²

¹Zlatarna Celje d.d. / Kersnikova ulica 19, 3000 Celje

²Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo / Smetanova ul. 17, 2000 Maribor

E-Mails: rebeka.rudolf@uni-mb.si ; lidija.zorko@uni-mb.si ; ivan.anzel@uni-mb.si

* Avtor za korespondenco; Tel.: +386-2-220-7865; Fax: +386-2-220-7990

Povzetek: Razvoj tehnik za sintezo Au-nano delcev z določeno velikostjo, obliko in sestavo je izziv in pomembno področje raziskav v nanotehnologiji. Zlati nanodelci so namreč atraktivni zaradi potencialne uporabe v elektrokemiji in medicini, kot tudi za proizvodnjo različnih nano-naprav.

Ključne besede: Au; nano-delci; nano-tehnologije; uporabnost

Abstract: The development of synthesis technology for the production of Au nano-particles with defined size, shape and composition, is a challenge and an important research field in nano-technology. Namely, gold nano-particles are very attractive because of their potential use in electro-chemistry and medicine, and also for the production of different nano-devices.

Key words: Au; nano-particles; nano-technology; applicability

1. Uvod

Zlato je bilo že v davni preteklosti kot kovina predmet ene najatraktivnejših tem preiskav v znanosti. Tudi v današnjem času je situacija podobna, le da so te raziskave danes prvenstveno usmerjene v področje nano-znanosti, nano-tehnologij v kombinaciji z nanodelci in monoplastmi. Zlati (Au) nanodelci so eni izmed najbolj stabilnih kovinskih nanodelcev. Sodobne študije zato vključujejo pojasnjevanje kemijske sestave Au nanodelcev in njihovih strukturnih zgradb, razumevanje stabilnosti posameznih delcev, poznavanje njihovih elektronskih, magnetnih in optičnih lastnosti (kvantno- velikostni učinek), ter študije uporabe nano-delcev za različne aplikacije. Tudi strateška usmeritev temeljnih raziskav v EU prostoru uvršča navedeno problematiko med prioriteta področja. Nanomateriali so pridobili velik pomen v biologiji in medicini, saj se lahko uporabljajo kot nosilci za prenos majhnih molekul, kot so npr. droge, proteini in geni. V tem segmentu je tako zelo poznana vezava hormona insulin na zlate nano-delce.

Razvoj tehnik za sintezo Au-nanodelcev z določeno velikostjo, obliko in sestavo je izziv ter pomembno področje raziskav v nanotehnologiji. Glede na prej opisane

možne in že poznane aplikacije Au-nano delcev je potrebno upoštevati še dejstvo, da ima mnogo mikroorganizmov lastno sposobnost proizvodnje anorganskih nano-struktur in kovinskih nanodelcev z lastnostmi podobnimi kemično sintetiziranim snovem. Ta alternativni pristop h kemijski sintezi postopkov uporabe mikrobnih sistemov za izdelavo nano-velikostnih materialov, predstavlja nov izziv. Najnovejša odkritja namreč kažejo, da je mogoča notranja celična sinteza zlatih nanodelcev, kakor tudi ekstra-celularni nastanek nanodelcev v prisotnosti glivičnih celičnih ekstraktov. Posledično so raziskave na tem področju ciljanje v možnost spreminjanja velikosti in oblike zlatih nanodelcev s spreminjanjem ključnih parametrov rasti.

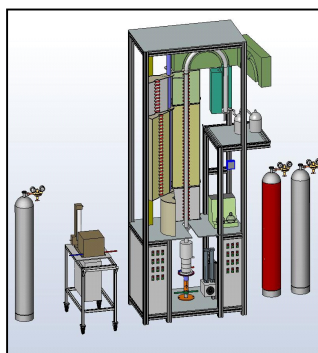
V tem prispevku bomo predstavili preliminarne rezultate raziskovalnega dela na Eureka projektu E! 4953, kjer smo se osredotočili na študije Au-nano-delcev za različne potrebe v medicini, kemiji, biologiji idr. Izvedli smo preliminarne eksperimente izdelave Au-nano-delcev s piezoelektrično pirolizo in prve teste biokompatibilnosti. Vse navedene rezultate smo uspešno predstavili na mednarodni konferenci FRONTIERS IN IMMUNOLOGY RESEARCH 2009 INTERNATIONAL CONFERENCE v ZDA s prispevkom Biocompatibility of Gold Nanoparticles

Prepared by Ultrasonic Spray Pyrolysis From the Gold Scrap, kjer je bila svetovni javnosti prvič predstavljena biokompatibilnost Au nano-delcev. V navedeni raziskavi smo obravnavali biokompatibilnost Au nanodelcev, ki ni določena z nobenim standardom in predstavlja velik raziskovalni potencial za bodoče preiskave. Pod pojmom biokompatibilnost namreč razumemo interakcijo med materialom, vključujoč njegovo funkcijo, ki jo opravlja, v povezavi z organizmom, v katerega se material vgrajuje oziroma se uporablja za zdravljenje. Zaradi tega je osnovna zahteva pri uporabi materialov v medicinsko/stomatološki praksi dokazovanje njihovih negativnih vplivov na celice, tkiva ali celo organizem. Pod pojmom neškodljivost razumemo, da vgradni material ne povzroča lokalno ali sistemsko citotoksičnost, iritacijo ali alergijo, da ni mutagen ali kancerogen. Da bi lahko nek material definirali kot biokompatibilnega, morajo biti vsi trije dejavniki (tkivo, material in pričakovana funkcija materiala) v medsebojni harmoniji. Pri tem je potrebno poudariti, da nobeden material ni biološko popolnoma inerten, zaradi tega vedno govorimo o stopnji biokompatibilnosti. Kako razumeti biokompatibilnost za nano-delce je glede na navedeno problematiko, v tem momentu težko pojasniti.

2. Rezultati in diskusija

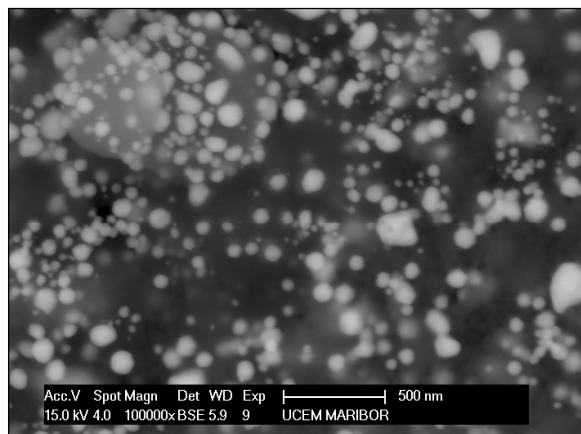
2.1. Izdelava Au-nano delcev

Za preliminarne preizkuse smo uporabili staro belo in rumeno 14 karatno zlato zlitino. Eksperimentalna naprava je prikazana na sliki 1. Vse vzorce izhodnih materialov – surovin smo raztopili v klorovi oz. dušični kislini. Toplotnodekompozicijo smo naredili pri temperaturah 300°C in 800°C v vodikovi in dušikovi atmosferi. Aerosole smo proizvedli s frekvenco 2.5 MHz. Le-ti so v naslednji stopnji potovali skozi električno ogrevano reakcijsko komoro, kjer so med kapljicami začeli potekati procesi: sušenje, raztopinskoprenasičenje, termoliza in sintranje nastalih sferičnih delcev.

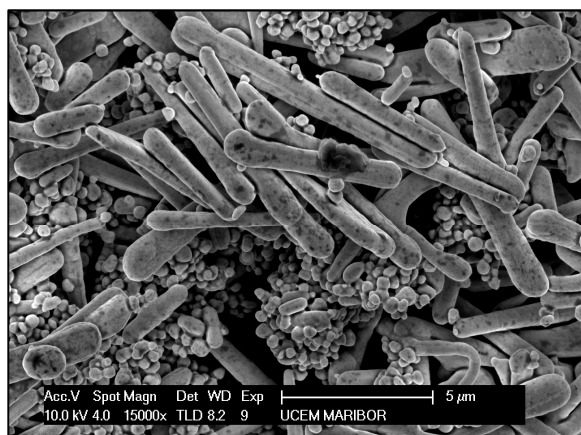


Slika 1. Eksperimentalna naprava za izdelavo Au nano-delcev

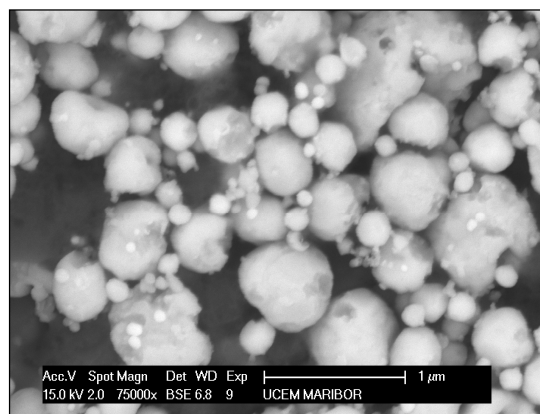
Mikrostruktura, morfologija in velikostna porazdelitev nastalih delcev je ustrezala 5 frakcijam.



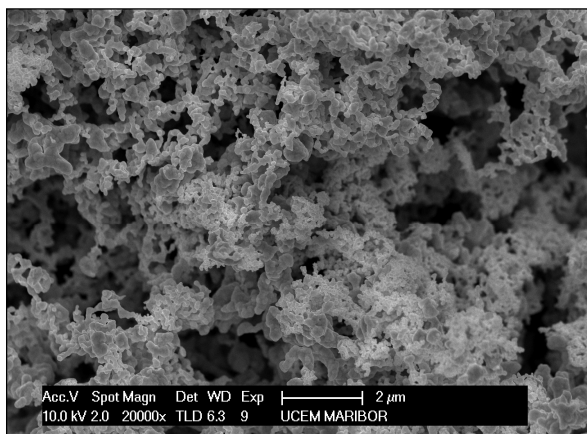
Slika 2. Frakcija 1 (100 m.% Au)



Slika 3. Frakcija 2 (100 m.% Au)



Slika 4. Frakcija 3 (97 m.% Au, 3 m.% Cu)



Slika 5. Frakcija 4 (Au/Ag)



Slika 6. Frakcija 5 (Au/Cu/Ni/Zn)

2.1. Izvedba testov biokompatibilnosti

Izvedba testov biokompatibilnosti je vključevala naslednja testiranja na ciljanih celicah L929 fibroblastov in na podganjih timocitih:

- Preizkušanje metabolične aktivnosti: MTT test
- Preizkušanje profileracije: vgradnja 3H-THYMIDINE
- Preizkušanje apoptoze: pobarvanje propustnih celic z PROPIDIUM IODIDE (tokovno-citometrična analiza)

- Nekroza: pobarvanje ne-propustnih celic z PROPIDIUM IODIDE
- Dodatni potrditveni eksperiment: pobarvanje celic z 1% TRIPAN modrim barvilom in opazovanje z optično mikroskopijo

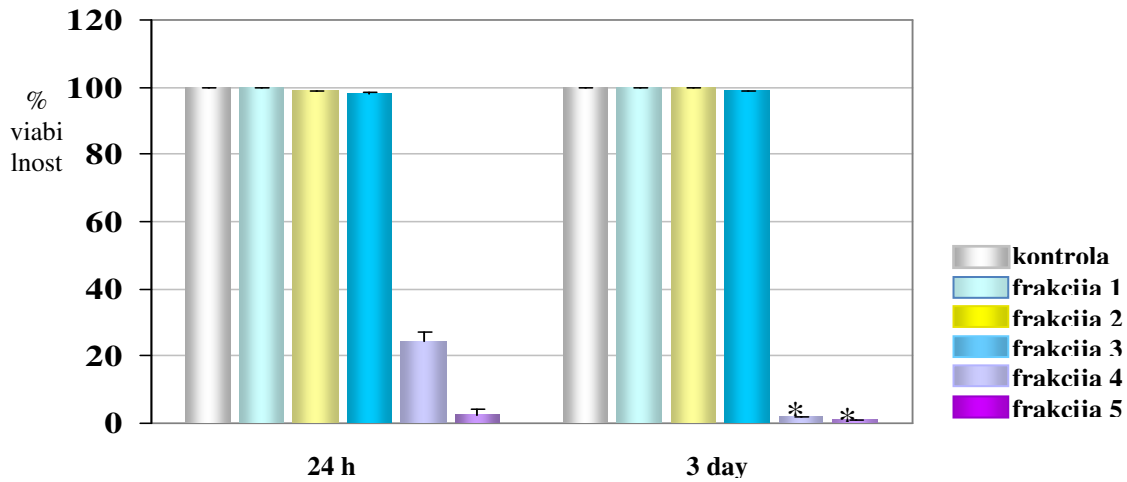
V vseh eksperimentih je bila koncentracija Au-nano delcev: 100μg/ml. Pogoji kultur so bili sledeči: kultivacija ciljanih celic z različnimi frakcijami Aunano-delcev je potekala 24 ur oziroma 3 dni v RPMI mediju z 10% telečjim serumom. Kontrolo so predstavljale celice brez Au-nano delcev.

Rezultate preiskav lahko strnemo v naslednjih stavkih. Frakciji 1 in 2 z Au-nanodelci ne povzročata viabilnosti L929 Celic (Slika 7), medtem pa po drugi strani zmanjšujeta metabolično aktivnost po daljšem časovnem obdobju t.j. po treh dneh (Slika 8). Ta efekt je posledica zmanjšane profileracije na L929 celicah (Slika 9). Sicer pa sta obe frakciji ne-citotoksični za podganje timocite (Slika 10).

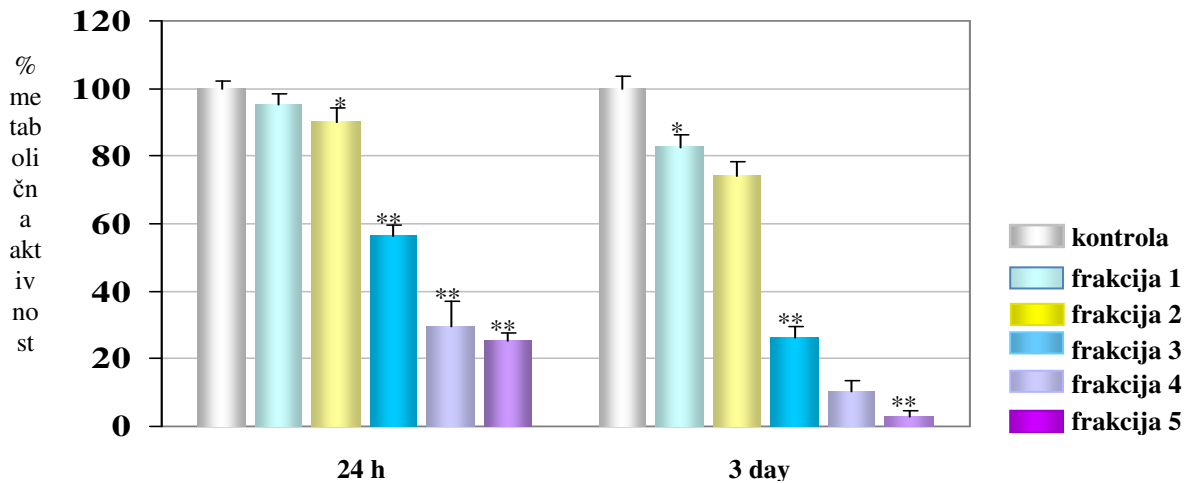
Frakcija 3 Aunano-delcev ne modificira viabilnosti na L929 celicah (Slika 7), nasprotno temu pa močno inhibira metabolično aktivnost (Slika 8) ter profileracijo na L929 celicah (Slika 9). Frakcija 3 je ne-citotoksična za podganje timocite (Slike 10-12).

Frakcije 4 in 5 Aunano-delcev so citotoksične za L929 celice. To nakazujejo testi, ki kažejo izgubo viabilnosti (Slika 7) in močno inhibicijo metabolične (Slika 8) in profileracijske aktivnosti (Slika 9). Obe frakciji sta citotoksični za timocite, kar se posledično kaže tudi z jasnim zmanjšanjem metabolične aktivnosti (Slika 10).

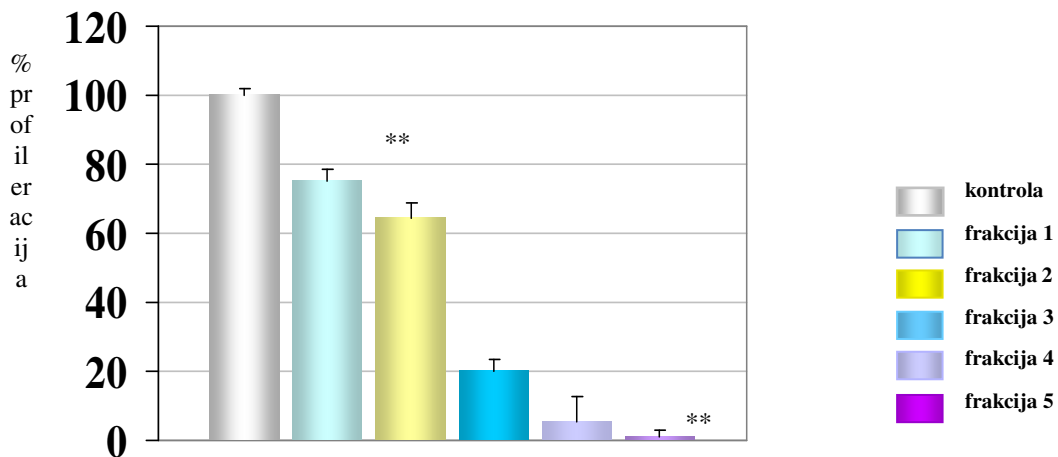
Frakcija 4 povzroča močnejšo apoptozo timocitov (Slika 11) medtem, ko frakcija 5 prvenstveno inducira nekrozo (Slika 12).



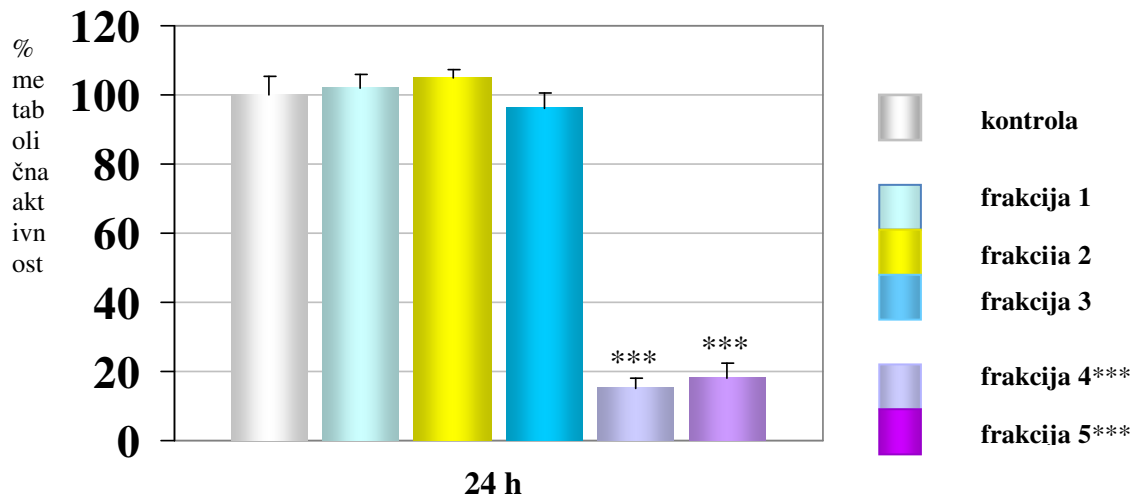
Slika 7. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na viabilnost L929 celic z uporabo Tripanblue testa, *** $p < 0.005$ primerjava s kontrolo



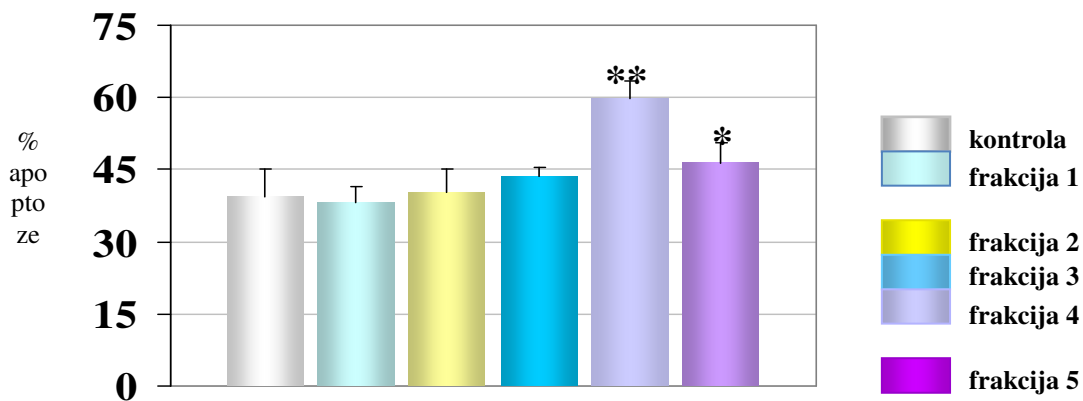
Slika 8. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na metabolično aktivnost L929 celic, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ primerjava z ustrežno kontrolo



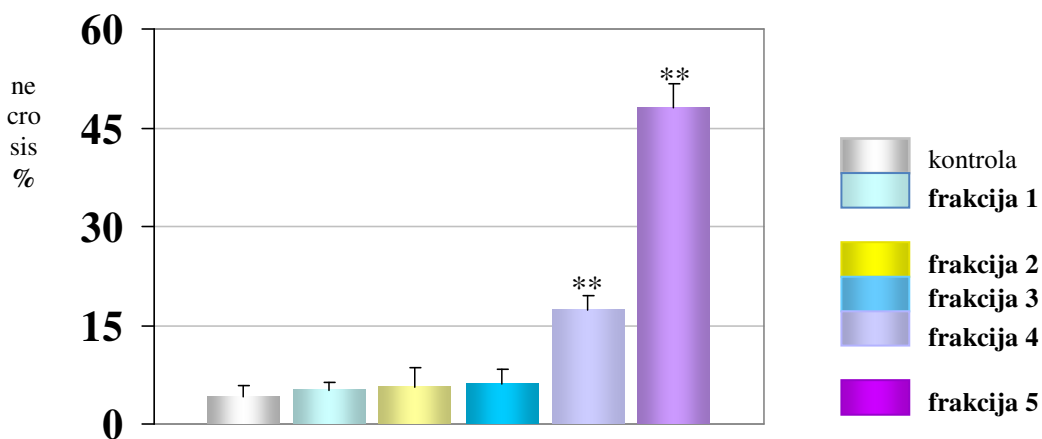
Slika 9. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na proliferacijo L929 celic, *** $p < 0.005$ primerjava z ustrežno kontrolo



Slika 10. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na metabolično aktivnost podganjih timocitov, *** $p < 0.005$ primerjava z ustrežno kontrolo



Slika 11. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na apoptozo podganjih timocitov, ** $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ primerjava z ustrežno kontrolo



Slika 12. Vpliv različnih frakcij nano-delcev na nekrozo podganjih timocitov, *** $p < 0.005$ primerjava z ustrežno kontrolo

3. Zaključki

Zaključki raziskave so sledeči:

- Frakciji 1 in 2, ki sta sestavljeni iz delcev čistega zlata, nista citotoksični za podganje timocite. Obe frakciji zmerno zmanjšata proliferacijsko aktivnost L929 celic.
- Inhibitorski efekt frakcije 2, ki vsebuje manjše delce kot frakcija 1, je na L929 celicah močnejši v primerjavi z delci frakcije 1.
- Frakcija 3, ki je sestavljena iz 97% Au in 3% Cu je ne-citotoksična za timocite, medtem, ko je citotoksična za L929 celice.
- Frakcija 4, sestavljena iz Au in Ag nano-delcev, kakor tudi frakcija 5 s sestavo Au/Cu/Ni/Zn sta nekoliko citotoksični za podganje timocite in L929 celice.
- Frakcija 4 povzroča prvenstveno apoptozo timocitov, medtem, ko frakcija 5 inducira nekrozo na obeh celicah.

Zahvala

Zahvaljujemo se Ministrstvu za visoko šolstvo znanost in tehnologijo Republike Slovenije, ki je finančno podprlo raziskovalni projekt v okviru iniciative Eureka E!4953. Za izvedbo testov biokompatibilnosti in interpretacijo rezultatov se zahvaljujemo Vojno medicinski akademiji v Beogradu in sicer prof. dr. Miodrag Čoliću.

Literatura

1. X. Xiong, A. Busnaina, *Journal of Nanoparticle Research* 2008, 10, 947.
2. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. Chan, *Nano Lett* 2006, 6, 662.
3. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, *Small* 2007, 3, 1941.
4. X. Huang, I. H. El-Sayed, X. Yi, M. A. El-Sayed, *J Photochem Photobiol B* 2005, 81, 76.
5. L. Y. Chan, J. J. Sung, F. K. Chan, K. G. To, J. Y. Lau, S. C. Chung, *Gastrointest Endosc* 1998, 48, 291.
6. M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* 1998, 281, 2013.
7. M. Karhanek, J. T. Kemp, N. Pourmand, R. W. Davis, C. D. Webb, *Nano Lett* 2005, 5, 403.
8. T. A. Taton, G. Lu, C. A. Mirkin, *J Am Chem Soc* 2001, 123, 5164.
9. J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv Drug Deliv Rev* 2003, 55, 329.
10. P. H. Yang, X. Sun, J. F. Chiu, H. Sun, Q. Y. He, *Bioconjug Chem* 2005, 16, 494.
11. N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Zhang, *Langmuir* 2005, 21, 8858.
12. E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* 2005, 1, 325.
13. A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen, D. L. Feldheim, *Bioconjug Chem* 2004, 15, 482.
14. R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, M. Sastry, *Langmuir* 2005, 21, 10644.
15. M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid, *Small* 2005, 1, 841.
16. S. L. De Wall, C. Painter, J. D. Stone, R. Bandaranayake, D. C. Wiley, T. J. Mitchison, L. J. Stern, B. S. DeDecker, *Nature Chemical Biology* 2006, 2, 197.
17. S. Stopic, B. Friedrich, K. Raic, T. Vulkov-Husovic, M. Dimitrijevic, *Journal of Metallurgy* 2008, 14, 41.
18. S. Stopic, B. Friedrich, R. Rudolf, I. Anžel, (2009): *The 5th international conference on gold science, technology and its applications*, Heidelberg, July 2009, 385.
19. M. Colic, D. Stamenkovic, I. Anzel, G. Lojen, R. Rudolf, *Gold Bulletin* 2009, 42, 34.

