

Valoa tehokkaasti absorboivien pii nanopartikkelien valmistus ja bioyhteensopivuuden verifiointi

Juuso Kari

Pro gradu -tutkielma

Fysiikan koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Sovelletun fysiikan laitos

14. toukokuuta 2020

Itä-Suomen yliopisto, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Fysiikan koulutusohjelma, Lääketieteellinen fysiikka

Juuso Kari: Valoa tehokkaasti absorboivien pii nanopartikkelien valmistus ja bioyhteensopivuuden verifiointi

Pro gradu -tutkielma, 51 sivua

Tutkielman ohjaajat: Professori Vesa-Pekka Lehto ja FT Simo Näkki

Toukokuu 2020

Avainsanat: Musta huokoinen pii, bioyhteensopivuus, PEG, kolloidinen stabiilisuus

Mustien huokoisen pii (BPSi) nanopartikkelien on osoitettu olevan korkealla valosta lämmöksi siirron hyötysuhteella lupaava materiaali sovellettavaksi fototermisessä terapiassa. Lisäksi huokoisen pii nanopartikkelien funktionalisointi molekyyleillä, bioyhteensopivuus, biohajoavuus ja mesokokoisten huokosten käyttäminen esimerkiksi lääkkeen kuljetusalustana mahdollistavat sen kehityksen useisiin muihin lääketieteellisiin sovelluksiin.

Tässä tutkielmassa BPSi nanopartikkelit funktionalisoitiin fluoresoivalla syaniini 5,5 -väriaineella kuvantamista varten, ja modifioitiin sitten 0,5 ja 2,0 kDa:n polyetyleeniglykoli (PEG) molekyyleillä ja karboksyyliyhmillä (-COOH) kolloidisen stabiilisuuden ylläpitämiseksi veren plasmassa ja seerumissa.

Funktionalisoitujen BPSi nanopartikkelien bioyhteensopivuutta tutkittiin in vitro solujen internalisointi- ja elinkykykokeilla CT26 ja RAW264.7 solulinjoilla. Voimakkaimmin internalisointia näytti Cy 5,5 -väriaineella konjugoidut nanopartikkelit, ja internalisointi ja sytotoksisuus laski COOH-modifioinnin ja erityisesti PEGyloinnin myötä. Myös nanopartikkelien koko vaikutti bioyhteensopivuuteen siten, että internalisoituminen ja sytotoksisuus kasvoi suuremmilla nanopartikkeleilla.

Lyhenteet

BPSi	Musta huokoinen pii
$c_{\text{Cy,part}}$	Partikkeleihin konjugoidun Cy 5,5 -väriaineen konsentraatio
c_{Cy}	Vapaan Cy 5,5 -väriaineen konsentraatio
c_{part}	Partikkelien konsentraatio
$C_{\text{ym}\%}$	Cy 5,5 -väriaineen massaprosenttiosuus partikkeleissa
COOH	Karboksyyliryhmä
CT26	Hiirten paksusuolensyöpäsolulinja
Cy5,5	Syaniini 5,5 -väriaine
DLS	Dynaaminen valosironta
H ₂	Vetykaasu
H ₂ O	Vesi
H ₂ O ₂	Vetyperoksidi
HBSS	Hankin tasapainotettu suolaliuos
HCl	Suolahappo
HF	Vetyfluoridi
I_{Cy}	Vapaan Cy 5,5 -väriaineen fluoresenssin intensiteetti
I_{part}	Partikkeleihin konjugoidun Cy 5,5 -väriaineen fluoresenssin intensiteetti
NaSi	Natriumsilisidi
NH ₂	Aminoryhmä
NH ₃	Ammoniakki
NH ₄	Ammoniumioni
OH	Hydroksyyliiryhmä
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PEG	Polyetyleeniglykoli
PSi	Huokoinen pii
RAW264.7	Hiirten makrofagisolulinja
Si	Pii
Si/H	Vetyterminoitu pii
Si-H ₄	Silaani
TGA	Termogravimetrinen analyysi

Sisällysluettelo

1	Johdanto	6
2	Huokoinen pii	8
2.1	Mustan huokoisen piin valmistus.....	8
2.2	Kemialliset muokkaukset.....	9
2.3	Bioyhteensopivuus.....	11
2.4	Kolloidinen stabiilisuus	14
2.5	Leimaaminen.....	16
3	Fysikokemialliset karakterisointimenetelmät	18
3.1	Termogravimetrinen analyysi	18
3.2	Fluoresenssimikroskopia.....	18
3.2.1	Väriaineen osuuden kvantifiointi	19
3.3	Dynaaminen valosironta	20
3.4	Zeta potentiaali.....	21
4	Materiaalit ja menetelmät	22
4.1	Partikkelien muokkaukset.....	22
4.1.1	Jauhaminen.....	22
4.1.2	Oksidointi.....	22
4.1.3	Väriaineen leimaus.....	23
4.1.4	PEGylointi.....	24
4.1.5	COOH-modifiointi	24
4.2	Fysikokemialliset karakterisoinnit	25
4.2.1	Termogravimetrinen analyysi.....	25
4.2.2	Leimauksen kvantifiointi.....	25
4.2.3	Kolloidinen stabiilisuus ja zeta potentiaali.....	26
4.3	Solukokeet.....	27
4.3.1	Partikkelien internalisointi	27
4.3.2	Solujen elinkyky.....	28
5	Tulokset ja pohdinta	29
5.1	Fysikokemialliset karakterisoinnit	29
5.1.1	Termogravimetrinen analyysi.....	29

5.1.2	Leimauksen kvantifointi.....	30
5.1.3	Kolloidinen stabiilisuus ja zeta potentiaali.....	32
5.2	Solukokeet.....	39
5.2.1	Partikkelien internalisointi	39
5.2.2	Solujen elinkyky.....	45
6	Johtopäätökset.....	48
	Lähdeluettelo	49

1 JOHDANTO

Musta huokoinen pii (eng. black porous silicon, BPSi) on Xu et al. kehittämä (2018) mesohuokoinen materiaali, jonka nanopartikkeleita on sovellettu fototermiseen terapiaan [1] ja LED-fotoakustiseen tomografiaan [2]. Huukoista piitä (PSi) on tutkittu sen suotuisten materiaaliominaisuuksien, kuten bioyhtheensopivuuden ja biohajoavuuden, vuoksi myös useissa muissa lääketieteellisissä sovelluskohteissa [3]. PSi:llä on huokoisuudesta johtuen korkea ominaispinta-ala, ja sen pinta voidaan konjugoida lukuisilla molekyyileillä muokaten PSi:n ominaisuuksia erityyppisiä tehtäviä varten. Lääketieteellisissä sovelluskohteissa PSi:n huukoista rakennetta on hyödynnetty esimerkiksi lääkeaineiden kuljetusalustana [4] ja magneetikuvauksen tehostamisessa huokosiin pakatuilla rautanopartikkeleilla [5].

Mustan huukoisen piin erityisen korkea valosta lämmöksi siirron hyötysuhde on osoittanut sen potentiaalin sovellettavaksi syöpäkasvainten hoitoon fototermisessä terapiassa [1]. Hoitomenetelmässä syöpäkasvaimessa olevien nanopartikkelien infrapunasäteilyn absorbointi välittyy syöpäsolujen lämpötilan kohoamiseksi ja eri mekanismien kautta solukuolemiin [6]. Lisäksi useilla fototermistä terapiaa varten kehitettävillä materiaaleilla on ollut heikkouksia, josta esimerkkinä useiden epäorgaanisten nanopartikkelien mahdollinen toksisuus ja orgaanisten photobleaching. Huukoisen piin käyttöä on aiemmin tutkittu fototermisessä terapiassa myös sähkökemiallisella syövytyksellä valmistetuilla nanopartikkeleilla, mutta terapeuttista käyttöä ajatellen näiden partikkelien valosta lämmöksi siirron hyötysuhde oli kuitenkin matala [7].

Syöpäkasvainten hoitoa ja kuvantamista varten nanopartikkelit on saatava kulkeutumaan kasvaimeen ja syöpäsoluihin, esimerkiksi verenkierron välityksellä, jota aktiivisessa kohdentamisessa voidaan pyrkiä tehostamaan nanopartikkeleihin konjugoitujen molekyylien vaikutuksesta. Lisäksi nanopartikkelit voivat kertyä myös EPR-ilmiön (eng. enhanced permeability and retention effect) vaikutuksesta passiivisesti verenkierrosta syöpäkasvaimiin, joka on seurausta kasvainten uusien epätäydellisten verisuonien ”tihkumisesta” [8]. Useita nanopartikkelien terapeuttisia käyttökohteita varten nanopartikkelien tulee kuitenkin säilyä verenkierrossa tunneista päiviin [9]. Mikäli nanopartikkelit aggregoituvat muodostaen suurempia partikkeleita, ne voivat kertyä nopeasti esimerkiksi pernan kapeisiin verisuoniin. Lisäksi elimistön puolustusjärjestelmän syöjäsolut, kuten makrofagit, pyrkivät poistamaan verenkierrosta vierasaineita fagosytoimalla, jonka seurauksena nanopartikkelit kuljetetaan hajotusta varten esimerkiksi maksaan ja pernaan. Nanopartikkelien verenkiertoaikaa voidaan

kasvattaa konjugoimalla niiden pintaan pitkäketjuisia polyetyleeniglykoli (PEG) molekyyliä, jotka vähentävät nanopartikkelien aggregoitumista ja myös estävät syöjäsolujen fagosytointia [10].

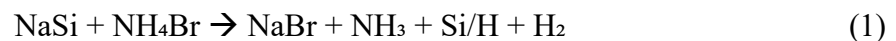
Tässä tutkielmassa pyrittiin valmistamaan alle 100 nm:n mustia huokoisen piin nanopartikkeleita, jotka konjugoitiin sitten 0,5 ja 2,0 kDa:n PEG-silaaneilla parantaen nanopartikkelien kolloidista stabiilisuutta veren plasmassa ja seerumissa. Nanopartikkelit funktionalisoitiin lisäksi fluoresoivalla syaniini 5,5 -väriaineelle niiden internalisoitumisen tutkimiseksi RAW264.7 makrofagi- ja CT26 syöpäsolulinjalla in vitro. Bioyhteensopivuutta määritettiin myös tutkimalla funktionalisoitujen nanopartikkelien toksista vaikutusta CT26 solujen elinkykykokeilla. Lisäksi nanopartikkelien fysikokemiallisia ominaisuuksia karakterisoitiin termogravimetrisellä analyysillä, dynaamisella valonsironnalla ja fluoresenssimikroskopiolla.

2 HUOKOINEN PII

Tässä kappaleessa on esitetty asioita huokoisen piin nanopartikkelien ominaisuuksista ja muokkauksesta biolääketieteellisiä sovelluskohteita varten.

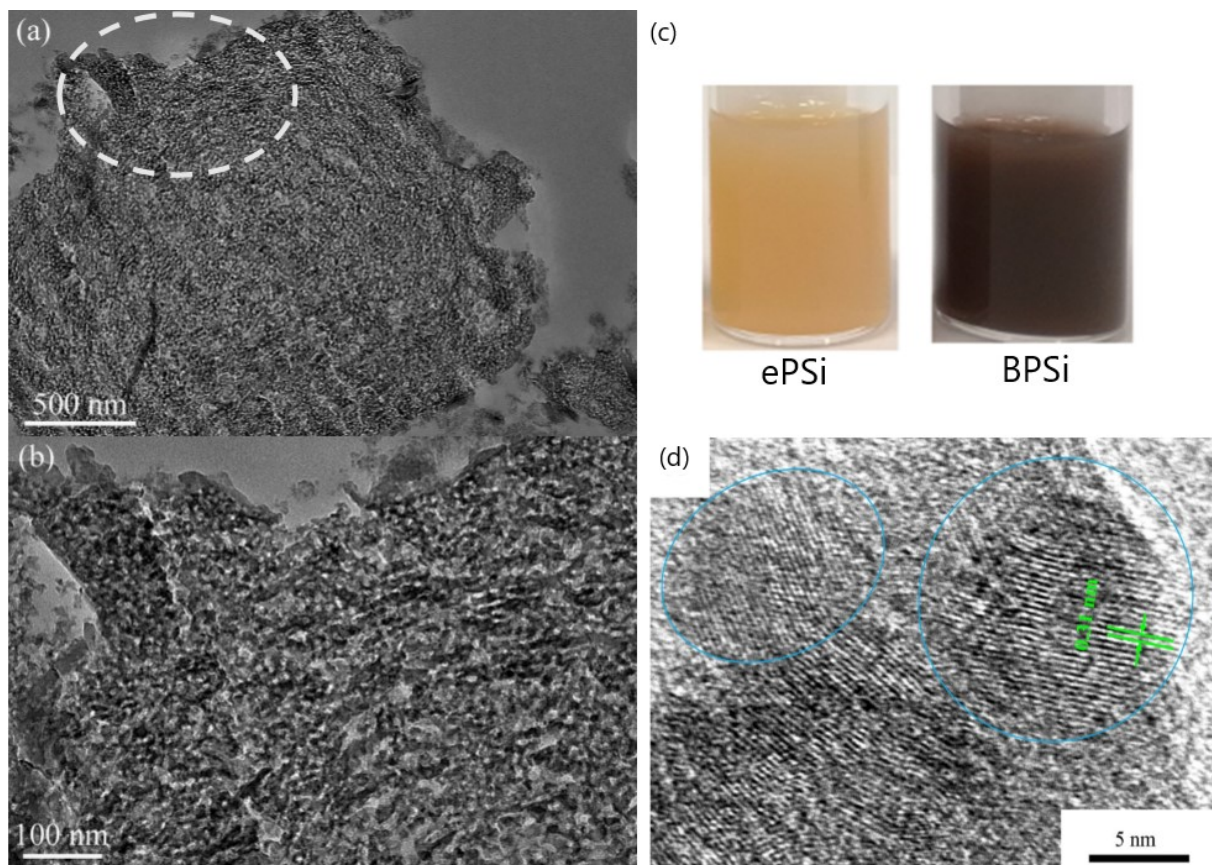
2.1 MUSTAN HUOKOISEN PIIN VALMISTUS

Mustan huokoisen piin (BPSi) valmistusmenetelmä [1] perustuu reaktioon natriumsilisidin, ammoniumbromidin ja natriumbromidin välillä (NaSi/NH₄Br/NaBr, 1:4:4, m/m/m), jossa noin 5 nm:n pii nanopartikkelit [11] aggregoituvat muodostaen mesohuokoista piitä. Lähtöaineet jauhetaan ensin argonkaasun alla ja reagoivat sitten yhtälön



mukaisesti 240 celsiusasteessa typpikaasussa 5 tunnin ajan, josta lopputuotteena saadaan vetyterminoitua huokoista piitä (Si/H), ja sivutuotteena syntyvät vetykaasu (H₂) ja ammoniakki (NH₃) haihtuvat pois. Natriumbromidi toimii sivutuotteena reaktiossa mallina huokosten muodostumiselle, joka poistetaan mikropartikkelien rakenteesta huuhtelemalla HCl- ja HF-liuoksilla.

Muodostettujen BPSi nanopartikkelien vesisuspensio näyttäytyy selvästi tummempana sähkökemiallisella syövytyksellä valmistettujen PSi nanopartikkelien kellertävään sävyyn verrattuna (Kuva 1 c), ja lisäksi BPSi:n valmistuksen hyötysuhde (80-90 %) on selvästi sähkökemiallista syövytystä (<30 %) parempi. BPSi:n huokoisuus on 49 %, ja huokosten halkaisija noin 8-15 nm:n välillä, maksimi 9,5 nm:n arvolla. Huokoinen rakenne on selvästi erotettavissa läpäisyelektronimikroskoopin (TEM) kuvasta (Kuva 1 b), ja nanopartikkeleiden kidekoon vaihtelu noin 10-20 nm:n välillä havaitaan HR-TEM kuvasta (Kuva 1 d). BPSi:llä on myös korkea valon massavaimennuskerroin (13,2 L/g/cm) 808 nm:n aallonpituudella ja valosta lämmöksi siirron hyötysuhde (33,6 %), mikä tekee siitä potentiaalisen materiaalin fototermistä terapiaa varten. [1]

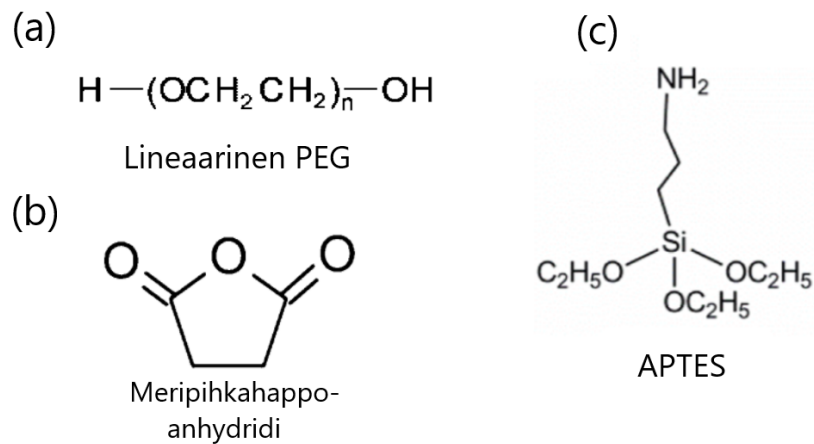


Kuva 1: (a) Lämpäsyelektronimikroskoopin (TEM) kuva BPSi mikropartikkelin leikkeestä ja (b) suurennos ympyröidyltä alueelta. (c) BPSi partikkelien vesisuspensio näyttäytyy selvästi tummempana sähkökemiallisella syövytyksellä valmistettuun PSi suspensioon (ePSi) verrattuna. (d) BPSi partikkeleissa kidekoko vaihtelee noin 10-20 nm:n välillä. Kuvat muokattu lähteistä [1] ja [12].

2.2 KEMIALLISET MUOKKAUKSET

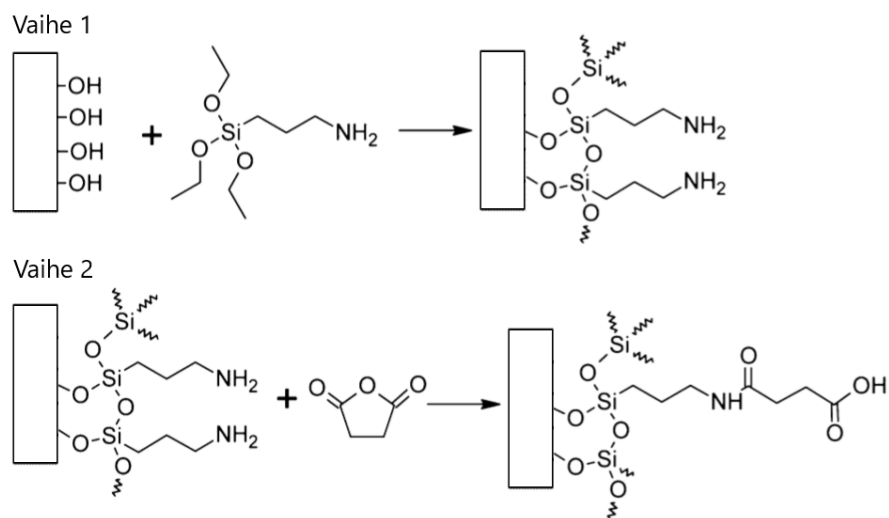
Huokoisten pii partikkelien funktionalisointi erilaisilla molekyyileillä mahdollistaa partikkelien muokkaamisen erityyppisiä tehtäviä varten. Valikoivassa modifioinnissa funktionalisointi kohdistuu joko partikkelien huokosten pinnoille tai partikkelien ulkoisille pinnoille, verrattuna epäselektiiviseen, jossa modifiointia pintojen välillä ei ole eroteltuna [13].

Hydroksyyliyhymien (-OH) konjugoiminen PSi partikkelien pinnoille stabiloi pinnan rakennetta ja mahdollistaa useiden molekyylien liittämisen partikkeliin. OH-ryhmiä voidaan muodostaa partikkelin pinnoille kemiallisena oksidointina pihin liittyneiden vetyatomien (-H) hapettamisella OH-ryhmiksi esimerkiksi vetyperoksidilla. [14]



Kuva 2: Molekyylirakennekaava (a) lineaarisesta n etyleenietteri yksikköä sisältävästä polyetyleeniglykolista [15], (b) meripihkahappoanhydridistä [16] ja (c) APTES aminosilaanista [14].

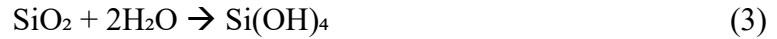
Partikkelien pinnan OH-ryhmiin voidaan silanisaatiossa liittää esimerkiksi PEG-silaaneja ja aminoryhmän ($-\text{NH}_2$) sisältäviä aminosilaaneja [14]. PEG-molekyylien rakenne koostuu toistuvista etyleenietteri yksiköistä (Kuva 2 a), ja eri pituisia PEG-molekyylejä voidaan käyttää eri sovelluskohteissa. Aminosilaanien (Kuva 2 c) positiivinen NH_2 -ryhmä mahdollistaa konjugoinnin lukuisten molekyylien, kuten useiden väriaineiden kanssa [14]. NH_2 -ryhmä voidaan konjugoida myös meripihkahappoanhydridin (Kuva 2 b) kanssa muodostaen meripihkahapon semialdehydin, jolloin karboksyyli-ryhmä ($-\text{COOH}$) jää vapaaksi partikkelin pinnalle (Kuva 3) [16].



Kuva 3: Hydroksyyli-ryhmiin ($-\text{OH}$) konjugoituu ensin silanisaatiossa APTES-molekyylejä, ja näiden vapaisiin aminoryhmiin ($-\text{NH}_2$) liittyy sitten meripihkahappoanhydridi molekyylejä. Kuva muokattu lähteestä [16].

2.3 BIOYHTEENSOPIVUUS

Elimistössä huokoinen pii on biohajoavaa ja piitä löytyy myös hivenaineena useista kudoksista. Huokoisen piin biohajoaminen johtaa yhtälöiden (2) ja (3) mukaisesti ortopiihapon Si(OH)_4 muodostumiseen, joka erittyy munuaisten erittämänä virtsan mukana pois elimistöstä.



Elimistössä huokoinen pii voi olla biohajoavaa, mutta myös bioinertiä tai bioaktiivista, jota voidaan säädellä piin huokoisuusasteella. Huokoisuuden laskiessa alle 70 prosentin, on PSi ensin bioaktiivista ja sitten biohajoavaa, ja korkeammalla huokoisuudella PSi liukenee simuloituissa kehon nesteissä [17]. BPSi nanopartikkelien (huokoisuus 49 %) on myös osoitettu olevan biohajoavaa fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS), ja hajoamisnopeuteen vaikuttavan nanopartikkelien funktionalisoinnin [1]. PEG-molekyylien konjugointi nanopartikkelien pintaan oli kasvattanut BPSi:n puoliintumisajan PBS-liuoksessa 0,8 päivästä 3,0 päivään.

PSi:lla on myös myrkyllisiä vaikutuksia elimistössä, sillä PSi partikkelien pinnalla pii on sitoutunut vetyatomeihin (Si-H , Si-H_2 ja Si-H_3). Nämä voivat edelleen reagoida muodostaen silaaneja (Si-H_4), jotka ovat elimistössä reaktiivisia ja myrkyllisiä. PSi:n Si-H_x sidoksiin voidaan kuitenkin vaikuttaa esimerkiksi oksidoimalla piiatomeihin happea, muodostaen Si-OH sidoksia, ja estäen näin silaanien kehitystä. [18]

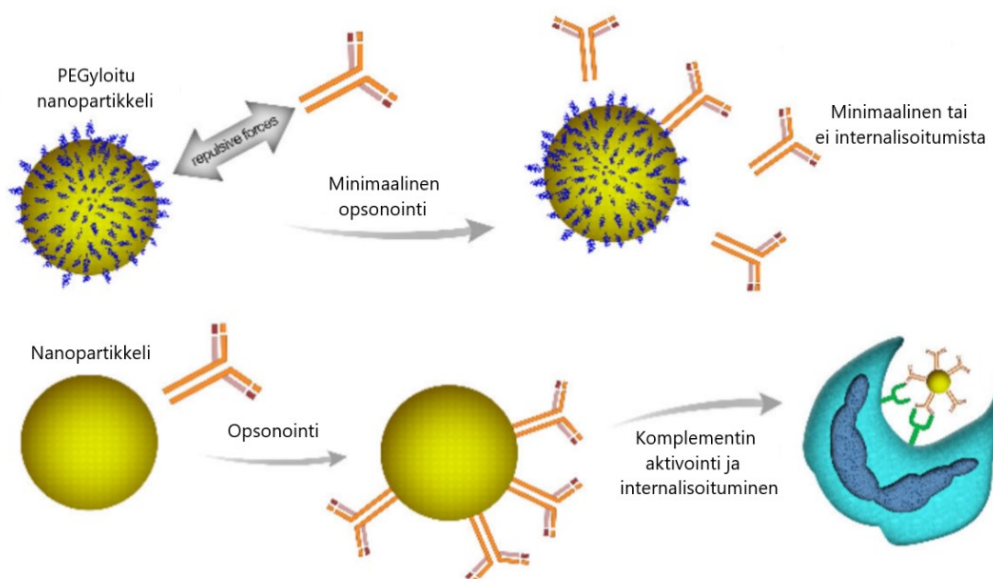
Nanopartikkelien toksisuutta voidaan tutkia in vitro esimerkiksi solujen elinkykykokeilla, joissa partikkelien sytotoksisuus havaitaan solukuolleisuutena. Solujen elinkykyä voidaan tutkia mittaamalla Promegan CellTiter-glow reagenssilla käsiteltyjen solujen luminenssia, joka on verrannollinen metabolisesti aktiivisten solujen ATP-molekyylien määrään [19]. Elinkykykokeiden lisäksi sytotoksisuutta voidaan tutkia mekaanisilla analyyseilla selvittäen partikkelien vaikutusta solun sisäisiin prosesseihin [20].

Nanopartikkelien sytotoksisuuden määrittäminen in vitro ei kuitenkaan välttämättä vastaa nanopartikkelien toksisuutta in vivo, sillä elimistössä solut ovat asemoituneet 3D-tilavuuteen toisin kuin esimerkiksi elinkykyä mitattaessa kuoppalevyllä kuoppien pohjalle poissa solujen luonnollisesta ympäristöstä. Epävarmuutta toksisuuden määrittämiseen tuo myös se, että partikkelien toksisuudessa voi olla eroa eri solulinjoilla. [20]

Lisäksi elimistön nesteet ovat yleensä kontrolloidussa virtauksessa, kun puolestaan in vitro solukokeet suoritetaan tyypillisesti staattisessa ympäristössä. Dynaamista menetelmää solujen inkuboimiseen partikkelien kanssa on tutkittu esimerkiksi pitäen kuoppalevyä keinuttelevassa liikkeessä inkuboinnin ajan, jolloin nesteen ollessa jatkuvassa sekoituksessa partikkelit eivät pääse sedimentoitumaan solujen pinnalle samoin kuin staattisessa tilanteessa [21].

Useita terapeuttisia käyttökohteita varten nanopartikkelit injektoidaan verenkiertoon, kuten esimerkiksi nanopartikkelien kohdentamiseksi verenkierron välityksellä syöpäkasvaimen soluihin. Verenkierrossa nanopartikkelien käyttäytymiseen ja kohde-elimeen kertymiseen vaikuttaa retikuloendoteliaalijärjestelmä (RES), joka koostuu verenkierrossa olevista makrofageista ja monosyyteistä ja useiden elinten, kuten maksan ja pernan fagosytoivista soluista. RES toimii osana elimistön puolustusjärjestelmää, joka pyrkii poistamaan vierasaineita verenkierrosta fagosytoivien solujen välityksellä. RES-järjestelmän toiminta perustuu verenkierrossa biomolekyylien, kuten proteiinien, opsonointiin partikkelien pinnalle, jotka RES-solut tunnistavat johtaen partikkelien fagosytoosiin. [10]

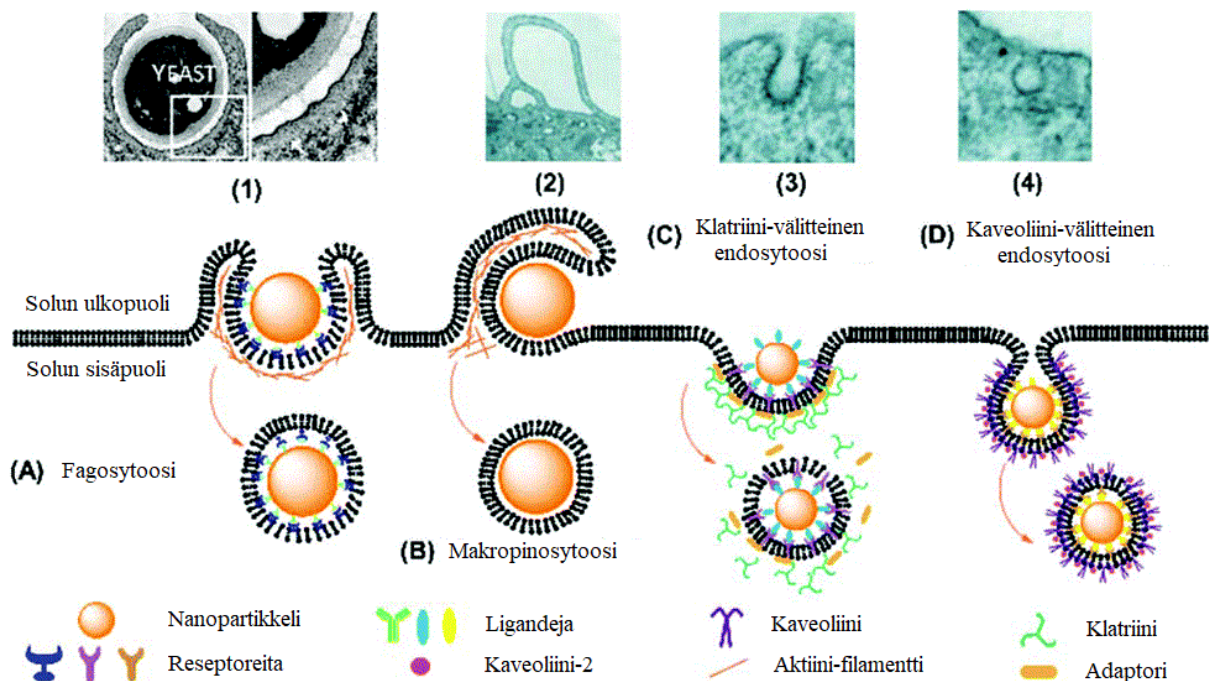
Fagosytoosia voidaan pyrkiä vähentämään liittämällä partikkelien pinnoille esimerkiksi pitkäketjuisia PEG-molekyylejä (Kuva 2 a) heikentäen proteiinien opsonoitumista. Tyypillisesti suuremman koon nanopartikkeleihin liitetään lyhyempiä PEG-molekyylejä, jotta nanopartikkelien koko ei kasvaisi merkittävästi PEGyloinnin seurauksena, ja joka voisi johtaa myös nopeampaan verenkierrosta poistumiseen. [9]



Kuva 4: PEGylointi heikentää opsonointi proteiinien liittymistä nanopartikkelin pintaan, ja johtaa vähäisempään internalisointiin. Kuva muokattu lähteestä [22].

Partikkelien soluun sisäänottoa eli internalisoitumista voidaan tutkia esimerkiksi in vitro makrofageilla, minkä perusteella voidaan arvioida muun muassa partikkelien mahdollista pakenemista RES järjestelmältä. Partikkelien internalisoinnin kannalta solujen solukalvolla on suuri merkitys, sillä se säätelee molekyylien kulkua soluun ja ulos solusta. Solukalvo on fosfolipidien muodostama kaksoiskalvo, joka myös antaa soluille rakenteellista tukea ja pitää solun homeostaasia yllä. [22]

Solut voivat internalisoida partikkelit useilla eri tavoilla, jotka ovat riippuvaisia niin solusta, partikkelista kuin solun mikroympäristöstä. Internalisointitavat voidaan karkeasti jakaa neljään eri päämekanismiin (Kuva 5): fagocytoosiin, klatriini- ja kaveoliini-välitteisiin endosytooseihin ja makropinosytoosiin [23].



Kuva 5: Partikkelien internalisointitavat jaettuna neljään eri päämekanismiin: (a) fagocytoosiin, (b) makropinosytoosiin, (c) klatriini- ja (d) kaveoliini-välitteisiin endosytooseihin, ja niihin osallistuvia proteiineja. Kuva muokattu lähteestä [23].

Fagosyyteillä, kuten makrofageilla, internalisointi perustuu tyypillisesti fagocytoosiin solukalvon reseptorien tunnistuessa partikkeliin opsonoituneen molekyylin. Esimerkiksi opsonoituneet vasta-aineet, komplementti- ja muut proteiinit voivat näin johtaa solukalvon kuroutumiseen aktiinisäikeiden välityksellä partikkelin ympärille ja sen internalisointiin, vieden aikaa partikkelista ja solutyypistä riippuen 30 minuutista useisiin tunteihin [22].

Fagosytoosi on usein suurempien partikkelien (> 500 nm) internalisoitumismenetelmä, mutta suuret partikkelit voivat internalisoitua myös makropinosytoosilla epäspesifisten vuorovaikutuksien kautta solukalvon muodostaessa ulkoneman aktiini-proteiinien välityksellä partikkelin ympärille [23].

Klatriini- ja kaveoliini-välitteisissä endosytooseissa nanopartikkeli internalisoituu solukalvon kuroutuessa sisäänpäin klatriini- tai kaveoliini-proteiinien avustamana. Klatriini-välitteinen endosytoosi voi alkaa reseptori välitteisesti opsonoidun nanopartikkelin kiinnittyessä reseptoriin solukalvolla, mutta myös epäspesifisesti esimerkiksi hydrofobisten tai sähköisten vuorovaikutusten kautta solukalvon kanssa. Klatriini-välitteisen internalisoinnin muodostamassa kalvorakkulassa nanopartikkeli tyypillisesti kuljetetaan lysosomiin hajotusta varten, toisin kuin kaveoliini-välitteisessä internalisoinnissa. [23]

Lisäksi partikkelien vuorovaikutuksen solujen kanssa on havaittu riippuvan useista näiden ominaisuuksista, kuten esimerkiksi partikkelien varauksesta. Solukalvon ollessa varautunut negatiivisesti, on sen havaittu johtavan positiivisesti varautuneiden partikkelien voimakkaampaan internalisoitumiseen [24]. Nanopartikkelien internalisointiin vaikuttaa myös niiden koko, sillä esimerkiksi silika nanopartikkeleilla pienemmät nanopartikkelit (50 nm) näyttivät merkittävästi enemmän internalisoitumista suurempiin kokoihin (100 ja 300 nm) verrattuna [25]. Koon merkitys on kuitenkin osittain partikkeli ja solulinja kohtainen, ja vaikuttava tekijä voi myös olla pienempien partikkelien aggregointi suuremmiksi solukalvon pinnalla voimistaen vuorovaikutusta solukalvon kanssa [22]. Koon lisäksi myös nanopartikkelin muodolla on osoitettu olevan vaikutusta internalisoitumiseen, sillä sauvamaisten nanopartikkelien on havaittu internalisoituvan pyöreitä nopeammin [24].

2.4 KOLLOIDINEN STABIILISUUS

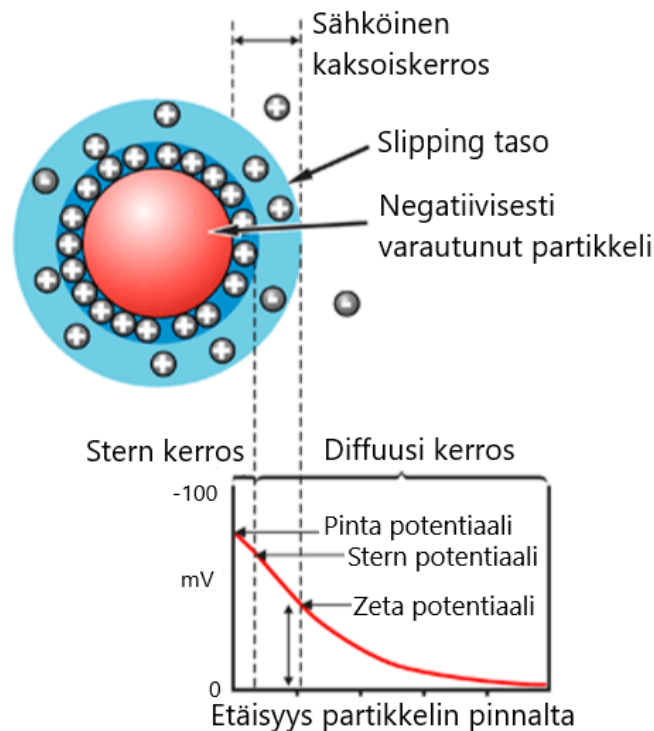
Verenkiertoon injektoidujen nanopartikkelien on oltava riittävän pieniä (< 200 nm) [26], jotta ne mahtuvat kulkeutumaan useiden elinten, kuten pernan, kapeimpien verisuonten läpi. Sen lisäksi, että nanopartikkelit ovat injektoidessa halutun kokoisia, tulee niiden myös säilyttää koko riittävän pitkään. Verenkierrossa partikkelimäärän puoliintumisajan tulisi olla noin 2-6 tuntia kuvantamista varten ja terapeuttiseen käyttöön useita päiviä [9].

Partikkelien kolloidinen stabiilisuus tarkoittaa dispergoitujen partikkelien käyttäytymistä nesteessä. Mikäli ne aggregoituvat muodostaen suurempia partikkelien ryppäitä kasvattaen

partikkelien kokoa, ne ovat epästabiileja. Nesteen virtauksen, Brownin liikkeen tai sedimentoitumisen vaikutuksesta partikkelit aggregoituvat niiden törmäillessä ja kiinnittyessä toisiinsa sähköisten voimien vaikutuksesta. Aggregointia edistäviä eli partikkeleja puoleensavetäviä voimia on esimerkiksi Van der Waalsin voima ja hydrofobinen vetovoima. Van der Waalsin puoleensavetävä voima, joka tunnetaan myös London voimana, aiheutuu partikkelien välisessä nesteessä sähkömagneettisen kentän vaihtelusta. Vaihtelu johtuu molekyylien hetkellisistä ja spontaaneista sähköisten ja magneettisten polarisaatioiden suuntautumisista, mutta vaikuttaa merkittävästi vain partikkelien ollessa hyvin lähekkäin toisiaan. [27]

Mikäli partikkelit hylkivät toisiaan ja pysyvät nesteeseen dispergoituneena ilman aggregoitumista, ne ovat stabiileja. Tällöin partikkelien väliset repulsiiviset voimat ovat suuremmat kuin partikkeleja yhteen vetävät voimat. Repulsiivisia voimia on esimerkiksi sähköinen tai steerinen repulsio. [27]

Sähköiset vetovoimat johtavat niin sanotun sähköisen kaksoiskerroksen muodostumiseen partikkelin ympärille, mikä aiheutuu partikkelien ollessa usein varautuneena liuoksissa. Partikkelien varaus voi johtua esimerkiksi partikkelin pinnalla olevien funktionaalisten ryhmien ionisoitumisesta, joka vesiliuoksessa voi olla seurausta protonin vastaanottamista tai luovutuksesta vesimolekyylien kanssa. Varautuneena partikkelit vetävät näin puoleensa ioneita johtaen vastakkaismerkkisten ionien liittymiseen sähköisten voimien vaikutuksesta partikkelin ympärille. Näiden ympärille liittyy edelleen löyhemmin ulompi kerros ioneita, jossa varaus liikkuu neutraalin suuntaan (Kuva 6). Zeta potentiaaliksi määritellään potentiaali löyhästi liittyneiden ionien kerroksen ulkopinnalla, ja zeta potentiaalin ollessa riittävän suuri, voivat partikkelit hylkiä toisiaan saman merkkisinä johtaen kolloidisesti stabiilimpaan dispersioon. [28]



Kuva 6: Zeta potentiaali määritellään potentiaaliksi partikkelin ympärille löyhästi liittyneiden ionien kerroksen ulkopinnalla. Kuva muokattu lähteestä [29].

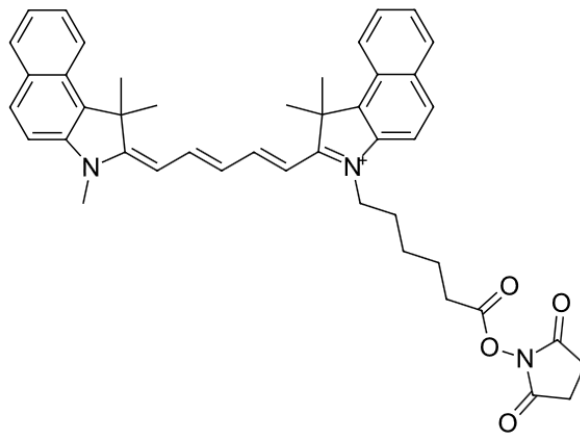
Partikkelien kolloidista stabiilisuutta voidaan parantaa hyödyntäen steeristä vuorovaikutusta partikkelien välillä konjugoiden partikkelit esimerkiksi polymeereillä, kuten PEG-molekyyleillä, näiden muodostaessa ulomman molekyylien kerroksen partikkelien pinnalle [9]. Kun polymeerien toinen pää on kiinnittynyt partikkeliin ja toinen on suuntautunut hydrofiilisenä partikkeleista poispäin, johtaa näiden kerroksien kosketukseen joutuminen polymeerikerroksen dehydraatioon ja repulsiivisiin voimiin partikkelien välille. Kun steerinen repulsiio pitää partikkelien pinnat riittävän kaukana toisistaan, eivät esimerkiksi Van der Waalsin voimat pääse muodostamaan yhtä vahvasti aggregoituneita partikkeleita. Suuremmat partikkelit tarvitsevat stabiloimiseksi myös paksumman steerisen kerroksen, sillä Van der Waalsin voimat ovat verrannollisia partikkelien kokoon. [27]

2.5 LEIMAAMINEN

Nanopartikkelien käyttäytymisen tutkimiseksi in vitro soluilla ja in vivo elimistössä, tulee niiden kulkeutumista ja jakaantumista pystyä seuraamaan. Huokoisen piin nanopartikkelit voidaan esimerkiksi leimata radioaktiivisilla aineilla, kuten ^{111}In :llä, verenkierrossa säilymisen ja eri elimiin kertymisen selvittämiseksi SPECT/CT:llä [30]. Nanopartikkelit voidaan leimata

myös fluoresoivilla molekyyeillä, kuten FITC:llä [1], joiden etuna radioaktiivisiin verrattuna on, etteivät ne kohdistu elimistöön ionisoivaa säteilyä. Fluoresoivilla molekyyeillä leimattujen nanopartikkelien jakaantumista elimistössä voidaan tutkia in vivo elävillä eläimillä IVIS-järjestelmällä (in vivo imaging system) [31], ja in vitro soluilla fluoresenssimikroskopiolla.

Fluoresenssin kannalta merkitystä on myös fluoresoivia molekyyeitä virittävän ja niiltä emittoitun säteilyn aallonpituudella, sillä kudokset ovat paremmin säteilyä läpäisevämpiä lähi-infrapunalla alueella (650-900 nm) [32]. Orgaanisista fluoresoivista molekyyeistä esimerkiksi syaniini-perheen väriaineet ovat yleisesti käytettyjä, kuten esimerkiksi syaniini 5,5 (Kuva 7), jonka virittävän säteilyn maksimi on 684 nm:n ja emission 710 nm:n aallonpituudella [33].



Kuva 7: Syaniini 5,5 NHS esterin väriaineen rakennekaava [33].

3 FYSIKOKEMIAALLISET KARAKTERISOINTIMENETELMÄT

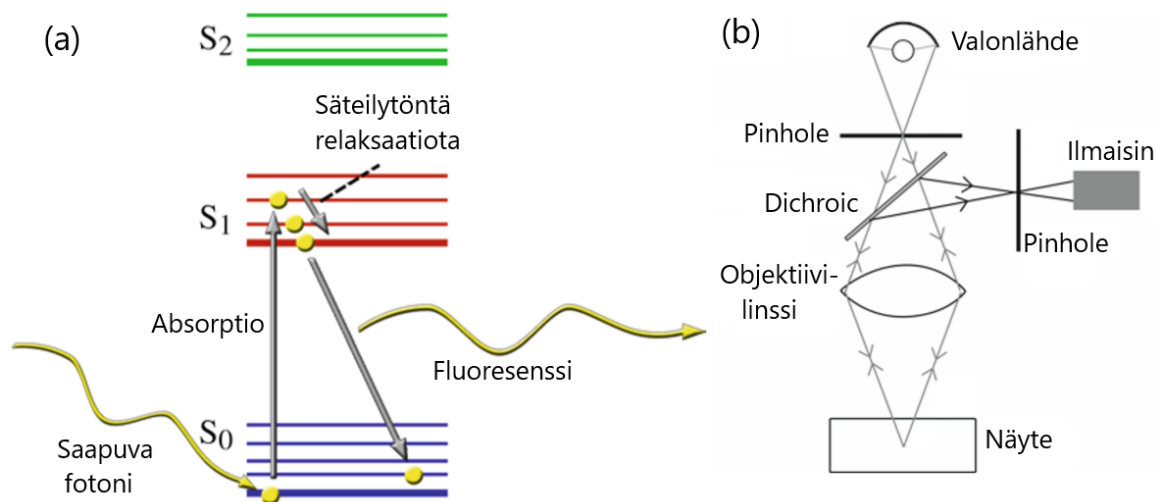
3.1 TERMOGRAVIMETRINEN ANALYYSI

Termogravimetrinen analyysi (TGA) on lämpöanalyysiin kuuluva menetelmä, jolla voidaan tutkia lämpöenergian vaikutusta materiaalin koostumukseen. TGA perustuu näytteen massan jatkuvaan mittaamiseen, samalla kun näytteen lämpötilaa nostetaan hallitusti esimerkiksi 1000 celsiusasteeseen. Lämpöenergian seurauksena materiaali voi hajota ja palaa, joka johtaa näytteen massan häviöön. Mikäli näytteen koostumus on tunnettu, voidaan massan häviön perusteella määrittää tietyn komponentin massaprosenttiosuus näytteessä. Näytteen analysointi voidaan suorittaa esimerkiksi ilmassa tai typpikaasussa näytteen hapettumisen välttämiseksi. Esimerkiksi huokoiseen piihin kemiallisten muokkausten seurauksena konjugoitujen orgaanisten molekyylien osuus voidaan määrittää vertaamalla yksittäisen näytteen massan häviötä näytteeseen, johon molekyyliä ei ole liitetty.

3.2 FLUORESENSSIMIKROSKOPIA

Fluoresenssi konfokaalimikroskopia perustuu valon absorboitumiseen tutkittavaan näytteeseen ja sen fluoresenssin havaitsemiseen, josta konfokaalimikroskopointi menetelmin voidaan poistaa fokuksen ulkopuolelta tulevaa valoa. Näytteessä fluoresenssi on lähtöisin niin sanotusta fluorokromi molekyylistä, jonka energiatila on huoneenlämmössä tyypillisesti matalimmalla tasolla S_0 . Virittävän säteilyn fotonien vaikutuksesta fluorokromin energiatila voi nousta korkeammalle tasolle, kuten tasolle S_1 (Kuva 8 a). Energiatason sisäiset purkautumiset johtavat usein lämmön siirtymiseen molekyylin ympäristöön, mutta korkeammalta tasolta matalammalle (esim. $S_1 \rightarrow S_0$) siirtyminen voi johtaa fotonien emittoitumiseen fluoresenssina. Emittoituvan fotonin energia on absorboituvaa pienempi, joka johtaa näin fluoresenssin aallonpituuden kasvamiseen virittävään säteilyyn verrattuna (Stokes-siirtymä). [34]

Fluoresenssi konfokaalimikroskopiaa varten on kehitetty erilaisia mittaussjärjestelmiä, josta esimerkkinä on epi-illuminaatio (Kuva 8 b). Järjestelmässä pinholen tarkoitus on ensin fokusoida virittävä säteily näytteellä valittuun pisteeseen, ja vastaavasti pinholen avulla fluoresenssi fokusoidaan myös ilmaisimelle. Pinholet poistavat näin näytteellä polttopisteen ylä- ja alapuolelta tulevaa valoa ja parantavat merkittävästi kontrastia. Objektiivilinssin ja dichroic-peilin välityksellä fluoresenssi ohjataan näytteeltä ilmaisimelle, jolla saadaan muodostettua näytteestä kuva myös syvyys suunnassa skannattaessa näytteen läpi. [34]



Kuva 8: (a) Fluoresoivan molekyylin (fluorokromin) fluoresenssi syntyy molekyylin palatessa korkeammalta energiatasolta matalammalle. (b) Yksinkertaistettu havainnekuva epi-illuminaatio konfokaalimikroskoopin toimintaperiaatteesta. Kuva muokattu lähteestä [34].

3.2.1 Väriaineen osuuden kvantifiointi

Fluoresenssimikroskopiaa voidaan käyttää myös nanopartikkeleihin konjugoidun väriaineen määrän estimoimiseen, menetelmän perustuessa vapaan ja nanopartikkeleihin konjugoidun väriaineen fluoresenssin määrittämiseen suspensiossa. Vapaalle väriaineelle (Cy 5,5) mitattuihin fluoresenssin intensiteetteihin I_{Cy} voidaan väriaineen konsentraation c_{Cy} funktiona sovittaa suora pienimmän neliösumman menetelmällä (PNS), jolloin suoran yhtälö on muotoa

$$I_{Cy} = \theta_1 c_{Cy} + \theta_2 \quad (4)$$

ja tuntemattomat θ_1 ja θ_2 ovat suoran kulmakerroin ja vakio. Olettamalla vapaan väriaineen ja vastaavan määrän partikkeleihin konjugoituna tuottavan yhtä voimakkaan fluoresenssin, voidaan partikkeleihin konjugoidun väriaineen fluoresenssin intensiteetti I_{part} esittää vastaavasti suoran yhtälön muodossa

$$I_{part} = \theta_1 c_{Cy,part} + \theta_2 \quad (5)$$

jossa $c_{Cy,part}$ vastaa emission aiheuttaman partikkeleihin konjugoidun väriaineen konsentraatiota ja θ_1 ja θ_2 ovat vapaan väriaineen suoran sovitukselta estimoidut suoran kulmakerroin ja vakio. Ratkaisemalla edellisestä kaavasta konjugoidun väriaineen konsentraatio $c_{Cy,part}$ suspensiossa saadaan

$$c_{Cy,part} = \frac{I_{part} - \theta_2}{\theta_1} \quad (6)$$

ja jakamalla edellinen kaava partikkelien konsentraatiolla c_{part} partikkeleihin konjugoidun väriaineen massaprosenttiosuuden $Cy_{m\%}$ määrittämiseksi saadaan

$$Cy_{m\%} = \frac{I_{part} - \theta_2}{\theta_1 c_{part}} \quad (7)$$

Virhettä väriaineen massaprosentti osuudelle voidaan estimoida keskivirheen kasautumislailalla kaavalla

$$\Delta f = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \Delta x_i \right)^2} \quad (8)$$

jossa Δf on funktion f virhe ja Δx_i yksittäisen muuttujan x_i virhe. Massaprosenttiosuuden virheeksi saadaan näin

$$\Delta Cy_{m\%} = \sqrt{\left(\frac{1}{\theta_1 c_{part}} \Delta I_{part} \right)^2 + \left(\frac{\theta_2 - I_{part}}{\theta_1 c_{part}^2} \Delta c_{part} \right)^2 + \left(\frac{\theta_2 - I_{part}}{\theta_1^2 c_{part}} \Delta \theta_1 \right)^2 + \left(\frac{1}{\theta_1 c_{part}} \Delta \theta_2 \right)^2} \quad (9)$$

kun ΔI_{part} on partikkelin intensiteetin virhe, Δc_{part} on partikkelin konsentraation virhe ja $\Delta \theta_1$ ja $\Delta \theta_2$ ovat suoran sovituksen kulmakertoimen ja vakion virheet.

3.3 DYNAAMINEN VALOSIRONTA

Dynaaminen valosironta on menetelmä, jolla voidaan määrittää nanopartikkelien kokoa perustuen niiden Brownin liikkeeseen liuoksessa. Partikkeleihin kohdistettu laserin monokromaattinen valo siroaa partikkeleista eri suuntiin, joka on riippuvainen partikkelien koosta ja muodosta. Ilmaisimen mittaama siroavan valon intensiteetti voidaan menetelmästä riippuen mitata alkuperäiseen valonsäteeseen nähden 90 asteen kulmassa tai takaisinsironnassa 158 tai 173 asteen kulmassa. Takaisinsironta menetelmän etu on sen mahdollistaessa konsentroituneemman näytteen kokoanalyysin, sillä valonsäteen ei tarvitse kulkea koko näytteen läpi ilmaisimelle. Takaisinsironnassa sironta muuttuu myös riippumattommaksi aallonpituudesta, jolloin esimerkiksi suurten pölyhiukkasten vaikutus pienempiin partikkeleihin nähden pienenee näiden sirottaessa valoa voimakkaammin eteenpäin. [35]

Brownin liike riippuu partikkelien koosta, mutta myös liuoksen lämpötilasta ja viskositeetista. Koska pienemmät partikkelit liikkuvat suuria nopeammin, niin liikkeen seurauksena siroava valo kokee Dopplerin levenemis -ilmiön takia vaiheessa vahvistumia ja destruktoita. Siroavan valon intensiteetin vaihtelun perusteella partikkelien diffuusiokerroin ja edelleen partikkelien niin sanottu hydrodynaaminen koko voidaan määrittää. [35]

3.4 ZETA POTENTIAALI

Partikkelien dispergoituessa nesteeseen, varautuneina ne vetävät puoleensa ioneita, jolloin osa ioneista voi muodostaa liikkumattoman kerroksen partikkelin ympärille. Partikkelin zeta potentiaali määritellään potentiaaliksi niin sanotussa slipping tasossa, joka on partikkelin ympärille hakeutuneiden ionien ja vapaan liuoksen rajalla (Kuva 6). Partikkelien zeta potentiaali voidaan määrittää mittaamalla ulkoisessa sähkökentässä partikkelien elektroforeettisen liikkuvuuden määrittämää laservalon keskitaajuuden siirtymää, jonka perusteella zeta potentiaali voidaan laskea. [36]

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työn tavoitteena oli kehittää valmistustapa funktionalisoida BPSi nanopartikkelit Cy 5,5 -väriaineella ja polyetyleeniglykolilla (PEG) siten, että ne säilyttävät riittävän kolloidisen stabiilisuuden PBS:ssä ja plasmassa/seerumissa.

Työn kokeellisesta osasta on esitettyä menetelmä nanopartikkelien muokkausten suorittamiseksi, nanopartikkelien fysikokemialliset karakterisoinnit, kolloidisen stabiilisuuden määritykset sekä suoritettut solukokeet nanopartikkeleilla. Fysikokemiallisia analysointeja varten nanopartikkelit valmistettiin pääosin samasta erästä BPSi lähtömateriaalia, mutta solukokeita varten nanopartikkeleita valmistettiin useista eristä.

4.1 PARTIKKELIEN MUOKKAUKSET

BPSi nanopartikkelien muokkaus ja funktionalisointi on jaettuna viiteen työvaiheeseen, joista on alla kerrottu tarkemmin.

4.1.1 Jauhaminen

Yhtenä työn tavoitteista oli valmistaa alle 100 nm:n BPSi nanopartikkeleita, jotta ne verenkiertoon injektoiduna mahtuvat kulkemaan eri elinten kapeiden hiussuonten läpi. Lähtömateriaalin mahdollisimman pienen koon saavuttamiseksi mikrokokoisia BPSi partikkeleita jauhettiin planetaarisella kuulamylyllä (Fritsch Pulverisette 7) halkaisijaltaan 1 mm:n zirkonium kuulilla etanolissa 4 ml:n näytepulloissa. Myllyn toimintanopeutena käytettiin 1000 RPM:ää, ja jauhamista jatkettiin yhteensä 60 minuutin ajan. Jauhamisen jälkeen BPSi nanopartikkelit eroteltiin kuulien joukosta etanolilla huuhtelemalla, ja nanopartikkelit säilöttiin etanolisuspensiona.

4.1.2 Oksidointi

BPSi nanopartikkelit oksidoitiin jäljempänä kuvattujen PEG- ja aminosilaanien konjugoimiseksi nanopartikkelien pinnalle. Oksidaatiota varten 100 mg etanoliin säilöttyjä nanopartikkeleita poistettiin etanolista sentrifugoimalla veteen laimennettuna (1:1), kunnes nanopartikkelit olivat sedimentoituneet, ja supernatantti poistettiin.

Sedimentoituneita nanopartikkeleita sonikoitiin kaksi minuuttia ultraäänilaitteella (Hielscher UP400S) 15 ml:ssä suolahappo-vesi laimennosta ($\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$, 5:1, m/m) aggregoituneiden BPSi nanopartikkelien irrottamiseksi toisistaan ja homogeenisen dispersion saamiseksi. BPSi nanopartikkelien joukkoon lisättiin 3 ml:a vetyperoksidia (H_2O_2), joka hapettaa nanopartikkelien ja huokosten pintaa ja muodostuu hydroksyyliiryhmiä (-OH). Reaktiossa aineet olivat tällöin suhteessa ($\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$, 5:1:1, m/m/m), ja reaktiota jatkettiin yhteensä 30 minuutin ajan 90 °C:ssa magneettisekoituksessa.

Reaktion jälkeen nanopartikkeleja sentrifugoitiin niiden sedimentoimiseksi ja supernatantin poistamiseksi, ja nanopartikkelit dispergoitiin veteen sonikoimalla. Edellistä, eli nanopartikkelien pesemistä, suoritettiin yhteensä kolme kertaa vedellä ja kaksi kertaa etanolilla, jonka jälkeen nanopartikkelit säilöttiin etanoliin ja suspensiota sonikoitiin edelleen 10 minuutin ajan. Oksidoituihin nanopartikkeleihin viitataan jatkossa lyhenteellä BPSi-OH.

4.1.3 Väriaineen leimaus

Seuraava vaihe nanopartikkelien funktionalisoinnissa oli liittää BPSi-OH nanopartikkelien OH-ryhmiin aminosilaanien NH_2 -ryhmien välityksellä syaniini 5,5 (Cy 5,5) -väriainetta. Väriaineen konjugointia varten 0,25 mg Cy 5,5 -väriainetta, 13,2 mg BPSi-OH nanopartikkeleita ja 10 μl aminosilania (APTES) dispergoitiin 2,5 ml:ssa etanolia, ja reaktiota pidettiin 20 minuuttia 65 °C:een lämpötilassa magneettisessa sekoituksessa. Tämän jälkeen reaktioastian reunoille kiinnittyneet nanopartikkelit irrotettiin sonikoimalla vesihauteessa, ja reaktiota jatkettiin sitten edelleen 20 minuuttia 65 °C:een lämpötilassa.

Reaktion jälkeen suspensio sentrifugoitiin nanopartikkelien sedimentoimiseksi ja supernatantin poistamiseksi, ja nanopartikkelit dispergoitiin etanoliin sonikoimalla yhden minuutin ajan. PEG-molekyylien konjugointiin eli PEGylointiin nanopartikkelit jatkettiin suoraan edellisen työvaiheen jälkeen, ja fysikokemiallisia karakterisointeja varten olevat Cy 5,5 konjugoidut nanopartikkelit pestiin vielä 3 kertaa etanolilla. Cy 5,5 konjugoituihin nanopartikkeleihin viitataan jatkossa lyhenteellä Cy5,5-BPSi.

Lisäksi fysikokemiallisia karakterisointeja varten valmistettiin NH_2 -BPSi nanopartikkeleita vastaavalla tavalla kuin Cy5,5-BPSi nanopartikkelit, mutta reaktiossa ei ollut mukana Cy 5,5 -väriainetta.

4.1.4 PEGylointi

PEGyloinnissa nanopartikkelien OH-ryhmiin konjugoitiin 0,5 ja 2,0 kDa:n polyetyleeniglykoli (PEG) silaaneja. Reaktiota varten keittopullossa yhdistettiin Cy5,5-BPSi nanopartikkelit noin 2 ml:ssa etanolia ja niiden alkuperäisten konjugoimattomien BPSi-OH nanopartikkelien massa (13,2 mg) nähden noin 10-kertainen määrä eli 130 mg 2,0 kDa:n PEG-silaaneja 1,5 ml:aan toluenia liuotettuna ja 20-kertainen määrä eli 260 µl 0,5 kDa:n PEG-silaaneja. Keittopulloa sonikoitiin yhden minuutin ajan vesihauteessa, ja asetettiin sitten magneettiseen sekoitukseen ja lämpenemään 65 °C:een lämpötilaan. Typpikaasun alla 20 minuutin ajan suspensiosta haihdutettiin etanolia ja toluenia, minkä jälkeen 2 ml uutta toluenia lisättiin reaktioon mukaan, ja keittopullo suljettiin ja pidettiin noin 18 tuntia 65 °C:een lämmössä.

Nanopartikkelien 18 tunnin PEGyloinnin jälkeen keittopullostsa haihdutettiin typpikaasun alla 65 °C:ssa toluenia 30 minuutin ajan, jolloin keittopullossa edelleen vapaiden PEG-silaanien osuus suspension tilavuudesta kasvoi ja niillä oli korkeampi todennäköisyys vielä liittyä BPSi nanopartikkelien vapaisiin OH-ryhmiin. PEGyloinnin jälkeen nanopartikkelit pestiin kolme kertaa etanolilla, säilöttiin etanoliin ja niitä sonikoitiin vielä yhden minuutin ajan suspensiota vedellä jäähdyttäen. PEGyloituihin nanopartikkeleihin viitataan lyhenteellä PEG-Cy5,5-BPSi.

4.1.5 COOH-modifiointi

PEGyloitujen nanopartikkelien korkean zeta potentiaalin (vedessä ~25-30 mV) takia niiden pinnoilla pääteltiin olevan jäljellä vapaita NH₂-ryhmiä, jotka vesi liuoksessa nostivat nanopartikkelien pintavarausta ja johtivat kolloidisen stabiilisuuden heikkenemiseen etenkin veren plasmassa verrattuna PBS:ssään (Kuva 14). COOH-modifioinnissa NH₂-ryhmiin liittyvien meripihkahapon semialdehydien karboksyyli-ryhmät (-COOH) laskevat nanopartikkelien zeta potentiaalia lähemmäksi neutraalia ja parantavat näin stabiilisuutta. COOH-modifioinnissa 20 mg meripihkahappoanhydridiä liuotettiin etanoliin sonikoimalla, ja yhdistettiin PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kanssa (alkuperäisten konjugoimattomien BPSi-OH nanopartikkeleiden massa noin 13,2 mg) ja annettiin reagoida yhteensä 2 ml:ssa etanolia noin 18 tunnin ajan sekoituksessa huoneen lämmössä. COOH-modifioituihin nanopartikkeleihin viitataan jatkossa lyhenteellä COOH-PEG-Cy5,5-BPSi.

COOH-modifiointi suoritettiin myös Cy5,5-BPSi nanopartikkeleille, jossa aineiden suhteet olivat samat kuin PEGyloitetun nanopartikkelien modifioinnissa. Näihin nanopartikkeleihin viitataan jatkossa lyhenteellä COOH-Cy5,5-BPSi.

4.2 FYSIKOKEMIALLISET KARAKTERISOINNIT

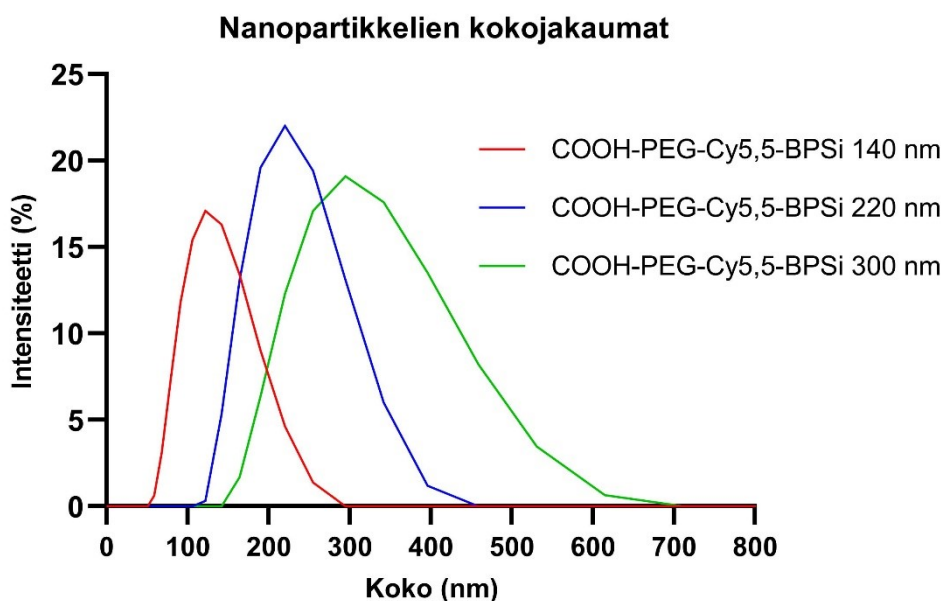
4.2.1 Termogravimetrinen analyysi

Orgaanisten ainesosien osuuden määrittämiseksi funktionalisoiduissa nanopartikkeleissa, nanopartikkelien massan muutos mitattiin TGA:lla (Netzsch TG 209 F1 Libra) lämpötilan funktiona. Näytteiden lähtömassa mittauksissa oli 5 mg, ja mittaukset suoritettiin typpikaasussa. Näytteiden lämpötila nostettiin 20 °C/min nopeudella huoneenlämmöstä ensin 80 °C:seen 20 minuutiksi mahdollisen nesteen haihuttamiseksi nanopartikkelien huokosista, jonka jälkeen lämpötilan nostamista jatkettiin 900 °C:seen saakka.

4.2.2 Leimauksen kvantifointi

Nanopartikkeleihin konjugoidun Cy 5,5 -väriaineen massaprosentti osuutta tutkittiin laser-skannaus fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss LSM 700), sillä TGA mittauksilla sen määrää ei onnistuttu selvittämään. Fluoresenssimikroskoopilla nanopartikkeleihin konjugoidun ja vapaan Cy 5,5 -väriaineen emissoiman fluoresenssin intensiteetti mitattiin mikroskoopin asetuksilla: Cy 5,5 -kanava, laserin teho 10 %, gain 890 ja pinhole 1 AU.

Ensin etanoliin sekoitetun vapaan Cy 5,5 -väriaineen fluoresenssin intensiteetti mitattiin neljällä eri konsentraatiolla (0.1, 0.5, 1.0 ja 2.0 µg/ml), ja lisäksi mittaus suoritettiin puhtaassa etanolissa, joka toimi nolla arvona väriaineelle. Jokaiselle väriaineen konsentraatiolle suoritettiin kolme mittausta, joista laskettiin keskiarvot. Cy 5,5 konjugoituina partikkeleina käytettiin COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleita, sillä niiden tiedettiin olevan kolloidisesti stabiileimpia ja säilyttävän näin tasaisen konsentraation pisimpään. Konjugoiduille nanopartikkeleille suoritettiin myös kolme mittausta, joista laskettiin keskiarvot. Fluoresenssin intensiteettiä näille nanopartikkeleille mitattiin kolmelta eri kokokeskiarvona määritetyltä kokojakaumalta (140, 220 ja 300 nm (Kuva 9)), joiden erottelu oli suoritettu sentrifugoimalla nanopartikkeleita eri sentrifugointi parametreillä.



Kuva 9: Sentrifugoimalla eroteltujen COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kokojakaumat keskiarvoilla 140, 220 ja 300 nm.

Sekä Cy 5,5 konjugoitujen nanopartikkelien että vapaan Cy 5,5 -väriaineen intensiteetit mitattiin 8-kuoppavevyllä 0,2 ml:ssa suspensiota. Aivan kuopan pohjalla intensiteetin havaittiin olevan korkeampi kuin nestekerroksessa pohjan yläpuolella, ilmeisesti pohjalle aivan pohjan lähetyviltä hakeutuneiden nanopartikkelien ja väriaineen takia, mistä syystä intensiteetti mitattiin 60 µm pohjan yläpuolelta eri kohdilta kuoppaa.

Mitattuihin väriaineen intensiteetteihin sovitettiin suora PNS-menetelmällä, ja suoran kulmakertoimen ja vakion perusteella määritettiin väriaineen osuus nanopartikkeleissa.

4.2.3 Kolloidinen stabiilisuus ja zeta potentiaali

Nanopartikkelien kolloidista stabiilisuutta määritettiin seuraamalla nanopartikkelien koon muutosta ajan funktiona vedessä, fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) ja veren plasmassa/seerumissa. Kolloidisen stabiilisuuden mittauksia varten etanoliin säilötyt nanopartikkelit pestiin ensin kaksi kertaa vedellä etanolin poistamiseksi suspensiosta, jonka jälkeen nanopartikkelit dispergoitiin veteen.

Nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus mitattiin tyypillisesti noin 130-150 nm keskiarvona määritetyiltä kokojakaumilta, jota varten nanopartikkeleita sentrifugoitiin vedessä ja

supernatantti eroteltiin mittaukseen. Kolloidinen stabiilisuus mitattiin näin vedessä, ja PBS-mittausta varten supernatantti laimennettiin PBS-liuoksella (H₂O/PBS, 1:4), ja suspensioiden koon muutosta seurattiin ajan funktiona (Malvern Zetasizer Nano ZS). Kolloidinen stabiilisuus veren plasmassa ja seerumissa mitattiin senrifugoimalla nanopartikkeleita PBS-liuoksessa, ja laimentamalla supernatantti plasmalla tai seerumilla (1:1).

Mittausten välillä näyte-kyvetit säilytettiin 37 °C:een lämpötilassa vastatessa sen ihmisen kehon lämpötilaa, ja ennen koon mittausta kyvettien annettiin jäähtyä noin viiden minuutin ajan huoneenlämmössä.

Zetasizerilla mitattiin myös nanopartikkelien zeta potentiaali vedessä ja PBS:ssä (H₂O/PBS, 1:1).

4.3 SOLUKOKEET

Funktionalisoitujen nanopartikkelien internalisoitumista tutkittiin hiirten CT26 paksusuolensyöpäsolulinjalla ja hiirten RAW264.7 makrofagisolulinjalla, ja nanopartikkelien sytotoksista vaikutusta solujen elinkykyyn CT26 solulinjalla. Nanopartikkelien koon vaikutusta tuloksiin selvitettiin kolmella nanopartikkelien keskiarvokokona määritetyltä kokojakaumalta (esimerkkinä COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kokojakaumat (140/220/300 nm) (Kuva 9)).

4.3.1 Partikkelien internalisointi

Internalisaatiokokeilla tutkittiin nanopartikkelien internalisoitumista CT26 ja RAW264.7 solulinjoilla kolmella eri funktionalisoidulla partikkelityypillä: Cy5,5-BPSi, COOH-Cy5,5-BPSi ja COOH-PEG-Cy5,5-BPSi.

CT26 soluilla soluravintonesteenä käytettiin RPMI 1640:a ja RAW264.7 soluilla DMEM:ä, joita molempia oli täydennetty tilavuuteen nähden 10 %:lla naudan sikiön seerumia (FBS) ja 1,2 %:lla antibioottiliuosta. Soluja siirrettiin ensin 8-kuoppalevyille omiin kuoppiin (20000/kuoppa) 0,2 ml:ssa soluravintonestettä solujen 24 tunnin kiinnittymistä varten inkubaattorissa (37 °C:een lämpötila, 5 %:n CO₂-pitoisuus), jonka jälkeen solut huuhdeltiin 0,2 ml:lla bufferiliuosta (HBSS, Hankin tasapainotettu suolaliuos) ja 0,2 ml:lla soluravintonestettä. Soluravintonesteseen dispergoituneet nanopartikkelit lisättiin kuoppiin, ja soluja inkuboitettiin näin

nanopartikkelien kanssa inkubaattorissa noin 24 tuntia. Ennen inkubointia etanoliin säilötyt nanopartikkelit oli pesty kaksi kertaa vedellä ja laimennettu sitten soluravintoneesteellä 0,05 mg/ml konsentraatioon. Inkuboinnin jälkeen solut huuhdeltiin kaksi kertaa bufferiliuoksella internalisoimattomien nanopartikkelien poistamiseksi, jonka jälkeen solujen kalvorakenteet värjättiin 0,15 ml:lla CellMask Green plasma membrane stain -väriaineella 8 minuuttia valolta suojattuna huoneenlämmössä. Värjäyksen jälkeen solut huuhdeltiin sekä bufferiliuoksella että soluravintoneesteellä ja lopuksi soluille lisättiin soluravintonestettä. Soluja tarkasteltiin laser-skannaus fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss LSM 700) kerroskuvauksena nanopartikkelien internalisoitumisen selvittämiseksi kahdella eri kanavalla, toinen nanopartikkeleihin konjugoidun väriaineen havaitsemiseksi (Cy 5,5 -kanava) ja toinen värjättyjen solukalvonrakenteiden havaitsemiseksi (FITC-kanava).

4.3.2 Solujen elinkyky

Solujen elinkykykokeilla tutkittiin kolmen eri nanopartikkelityypin, BPSi-OH, COOH-Cy5,5-BPSi ja COOH-PEG-Cy5,5-BPSi, toksista vaikutusta CT26 syöpäsoluihin. CT26 solujen kiinnittymistä 96-kuoppalevyllä parannettiin käsittelemällä kuoppien pohjat 25 µl:lla Poly-L-Lysiiniä (0,01 %) ja kuivattamalla levyjä kahden tunnin ajan inkubaattorissa. Kuopat huuhdeltiin sitten 0,1 ml:lla bufferiliuosta (HBSS), ja CT26 solut lisättiin kuoppiin (5000/kuoppa) 0,1 ml:ssa RPMI 1640 soluravintonestettä, joka oli valmisteltu samoin kuin soluravintoneeste internalisointikokeita varten. Solujen annettiin kiinnittyä 48 tunnin ajan inkubaattorissa (37 °C:een lämpötila, 5 %:n CO₂-pitoisuus), jonka jälkeen vanha soluravintoneeste poistettiin, ja kaksi kertaa vedellä pestyt nanopartikkelit lisättiin 0,1 ml:ssa soluravintonestettä kuoppiin konsentraatioilla 0.05, 0.1, 0.2 ja 0.5 mg/ml (toistomittauksia: n=4). Negatiivisena kontrollina (kontrolli) toimivat solut käsiteltynä pelkällä soluravintoneesteellä (n=8), ja positiivisena kontrollina solut käsiteltynä Triton X-100:lla (1 %) (n=4). 24 tunnin kuluttua nanopartikkelien laitosta solut huuhdeltiin 0,1 ml:lla soluravintonestettä irtonaisten nanopartikkelien poistamiseksi ja 0,1 ml:a uutta soluravintonestettä lisättiin kuoppiin. Soluja inkuboitii edelleen 24 tuntia, jonka jälkeen solut huuhdeltiin soluravintoneesteellä ja kuoppiin lisättiin 0,05 ml soluravintonestettä ja 0,05 ml CellTiter-glow:ta. Välittömästi edellisen jälkeen solujen elinkyky mitattiin mikrolevynlukijalla (Biotek Synergy H1) mitaten elinkykyisten solujen määrään verrannollista luminenssia.

5 TULOKSET JA POHDINTA

5.1 FYSIKOKEMIAALLISET KARAKTERISOINNIT

5.1.1 Termogravimetrinen analyysi

Taulukko 1 esittää termogravimetrisellä analyysillä (TGA) eri tavalla funktionalisoiduille nanopartikkeleille mitattujen massan häviöiden (Kuva 10) perusteella määritettyjen komponenttien osuuden COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleissa.

Taulukko 1: TGA:lla mitattujen näytteiden massan häviön perusteella laskettujen komponenttien osuus COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien koostumuksessa.

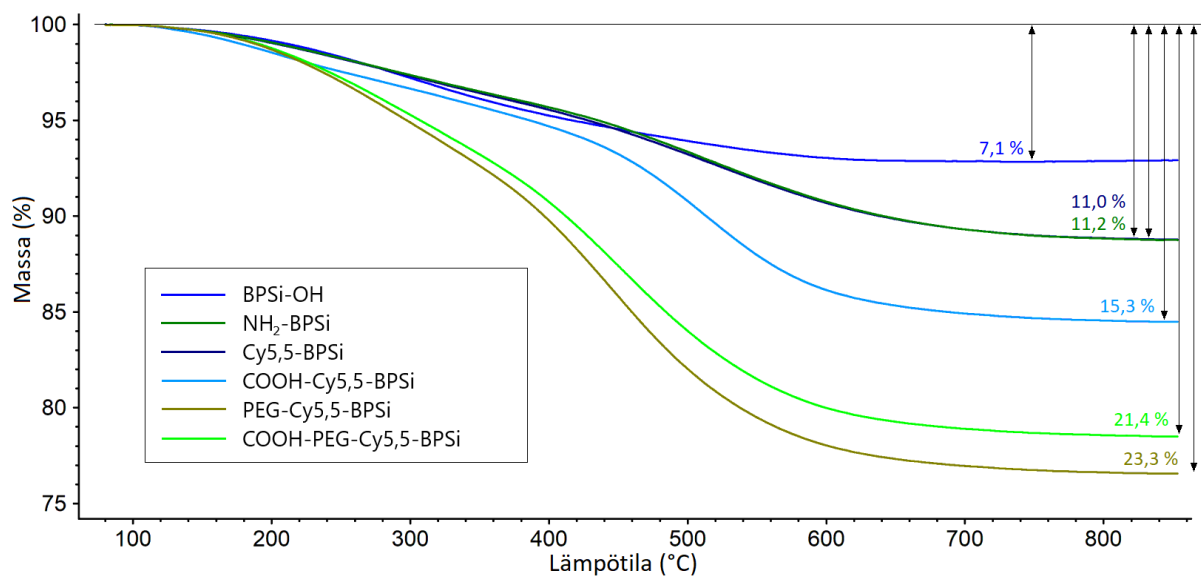
Partikkelin komponentti	Massa (%)
APTES	$3,8 \pm 0,1$
0,5 ja 2,0 kDa:n PEG-silaanit	$7,3 \pm 0,5$
Meripihkahapon semialdehydi	$3,1 \pm 0,5$

TGA:lla massan häviötä ei mitattu oksidoimattomille BPSi nanopartikkeleille, joten hydroksyyliyhmiin (-OH) osuus ei mahdollisesti vastaa koko massan häviötä BPSi-OH näytteellä ($7,1 \pm 0,1$ m%). TGA:lla Cy 5,5:n osuutta ei myöskään onnistuttu määrittämään Cy5,5-BPSi nanopartikkeleille, sillä NH₂-BPSi näytteellä havaittiin tätä suurempi massan muutos ($11,2 \pm 0,2$ m%). Kappaleessa 5.1.2 fluoresenssimikroskopian perusteella määritetyksi Cy 5,5:n osuudeksi saatiin myös alle 0,01 m%, joka menisi alle TGA:n mittaustarkkuuden. Cy5,5-BPSi näytteen massan häviön ($11,0 \pm 0,1$ m%) perusteella APTES:in osuudeksi saatiin $3,8 \pm 0,1$ m% COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleissa.

PEG-Cy5,5-BPSi näytteen massan muutoksen perusteella ($23,3 \pm 0,1$ m%) määritetty PEG-molekyylien osuus oli 12,3 m%, joka olisi näin suurempi kuin COOH-PEG-Cy5,5-BPSi näytteen massan muutoksen ($21,4 \pm 0,1$ m%) perusteella määritetty PEG-silaanien ja meripihkahapon semialdehydin (-COOH) 10,4 m% yhteisosuus. Tähän todennäköisin syy on se, että PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleiden TGA mittauksessa oli PEGyloinnin jäljiltä mukana vapaita PEG-silaaneja, joiden massa näkyi myös mitatussa massan häviössä. Toisessa erässä valmistettujen PEG-Cy5,5-BPSi ja COOH-PEG-Cy5,5-BPSi näytteiden välinen ero

massan häviönä oli $3,1 \pm 0,5$ m%, joka vastaisi näin meripihkahapon semialdehydin osuutta nanopartikkeleissa. Vähentämällä se edellä havaitun COOH-PEG-Cy5,5-BPSi näytteen PEG-silaanien ja meripihkahapon semialdehydin 10,4 m%:n yhteisosuudesta, antaisi näin PEG-silaanien osuudeksi $7,3 \pm 0,5$ m%.

Eri erässä konjugoitujen nanopartikkelien välillä havaittiin myös vaihtelua TGA:n tuloksissa, johon todennäköisesti vaikutti sekä lähtömateriaalina käytetty BPSi että kemiallisten muokkausten onnistuminen nanopartikkelien valmistuksessa.



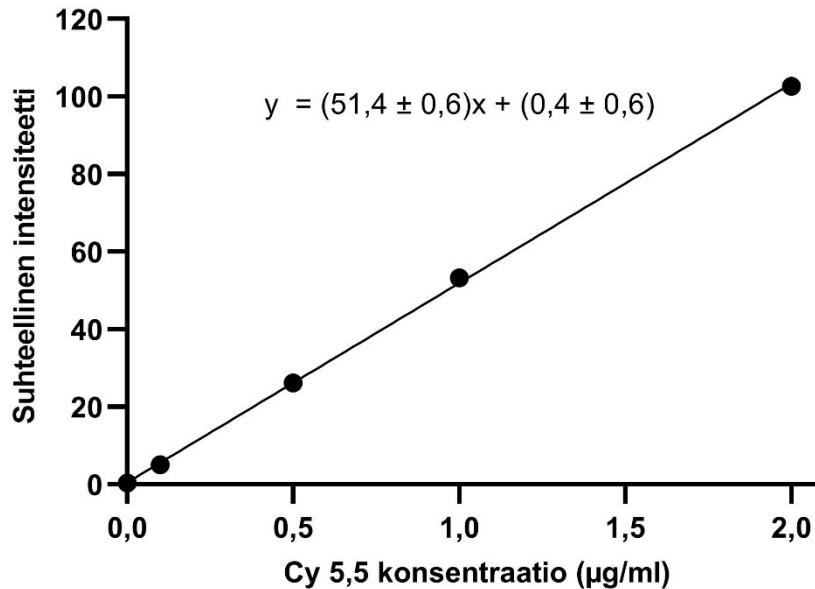
Kuva 10: TGA:lla mitatut näytteiden massan muutokset lämpötilan funktiona.

PEG-silaanien osuus nanopartikkeleissa jäi lopulta matalammaksi kuin Xu et al. [1] olivat raportoineet BPSi nanopartikkeleilla (~ 12 m%). Koska PEG- ja APTES-molekyylit konjugoituvat silanisaatiossa nanopartikkelien pinnan OH-ryhmiin, vaikutti konjugointi ensin APTES:in kanssa mahdollisesti laskien PEG-silaanien lopullista osuutta nanopartikkeleissa. Toinen PEG-silaanien osuuteen mahdollisesti vaikuttava tekijä saattoi olla se, että PEGylointi suoritettiin tässä työssä 65 °C:een lämpötilassa 110 °C:een sijaan.

5.1.2 Leimauksen kvantifiointi

Nanopartikkeleihin konjugoitun Cy 5,5 -väriaineen määrän selvittämiseksi vapaan väriaineen (konsentraatiot: 0, 0.1, 0.5, 1.0 ja 2.0 $\mu\text{g/ml}$) ja Cy 5,5 konjugoitujen nanopartikkeleiden (COOH-PEG-Cy5,5-BPSi) fluoresenssin intensiteetti mitattiin laser-skannaus

fluoresenssimikroskoopilla, joista määritettiin kolmelle mittaukselle keskiarvot. Vapaan väriaineen intensiteetteihin konsentraation funktiona on sovitettu suora PNS-menetelmällä, jonka kulmakerroin on $\theta_1 = (51,4 \pm 0,6) \frac{1}{\mu\text{g/ml}}$ ja vakio $\theta_2 = (0,4 \pm 0,6)$ (Kuva 11).



Kuva 11: Havainnot vapaan Cy 5,5 -väriaineen fluoresenssin intensiteetistä konsentraation funktiona, ja havaintoihin PNS-menetelmällä sovitettu suora. Suoran yhtälö on $y = (51,4 \pm 0,6)x + (0,4 \pm 0,6)$.

Nanopartikkeleille mitattujen fluoresenssin intensiteettien perusteella kaavalla (7) laskettiin Cy 5,5 -väriaineen massaprosenttiosuus nanopartikkeleissa, ja virhe keskivirheen kasautumislailalla kaavalla (9), jossa nanopartikkeleille mitatun intensiteetin ja konsentraation (m/V) virheinä käytettiin mittausten keskihajontoja ΔI_{part} ja ΔC_{part} .

Taulukko 2 esittää 140, 220 ja 300 nm:n kokojakauman COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleille määritetyt konjugoidun Cy 5,5 -väriaineen massaprosenttiosuudet, josta havaitaan väriaineen osuuden laskevan nanopartikkelikoon kasvaessa. Tuloksissa ilmenneen virhemarginaalin vuoksi ero nanopartikkelikokojen välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä, joka aiheutui suurimmaksi osaksi suoran sovituksen vakiotermin virheestä (noin 90-95 prosenttia kokonaisvirheestä).

Taulukko 2: Nanopartikkeleiden kolmessa keskiarvokokona lasketussa kokojakaumassa fluoresenssimikroskopian avulla määritetyn konjugoidun Cy 5,5 -väriaineen massaprosenttiosuudet.

Partikkeli ja koko	Cy 5,5 väriaineen m%
COOH-PEG-Cy5,5-BPSi 140 nm	0,03 ± 0,05 (0,031)
COOH-PEG-Cy5,5-BPSi 220 nm	0,01 ± 0,05 (0,012)
COOH-PEG-Cy5,5-BPSi 300 nm	0,01 ± 0,05 (0,007)

Eroa konjugoidun väriaineen määrässä voi selittää se, että nanopartikkelit ovat huokoisia ja näin ollen väriainetta on konjugoituneena nanopartikkelien pinnan lisäksi myös huokosiin. Mitä suurempia partikkelit ovat, sitä suurempi osa virittävästä säteilystä absorboituu partikkelien rakenteeseen ennen partikkelien syvempiin osiin pääsyä. Vastaavasti partikkelien syvemmistä osista lähtöisin oleva väriaineen emissiosäteily vaimenee enemmän suuremmilla partikkeleilla. Kuitenkin myös pienemmän koon partikkeleissa tapahtuu säteilyn vaimenemista, jolloin väriaineen massaprosenttiosuus voi olla suurempi kuin mitä tällä menetelmällä pystyttiin määrittämään. Mikäli ero väriaineen osuuksissa eri koon nanopartikkeleilla johtuisi säteilyn vaimenemisesta partikkelin rakenteeseen, olisi tällöin mahdollisesti myös suurempien kokojakaumien nanopartikkelien väriaineen osuus lähempänä vähiten vaimenemista kokoneiden 140 nm:n kokojakauman partikkelien väriaineen osuutta. Määritetyt osuudet voivat kuitenkin antaa tietoa eri kokoisten nanopartikkelien fluoresoinnin suhteellisesta voimakkuudesta.

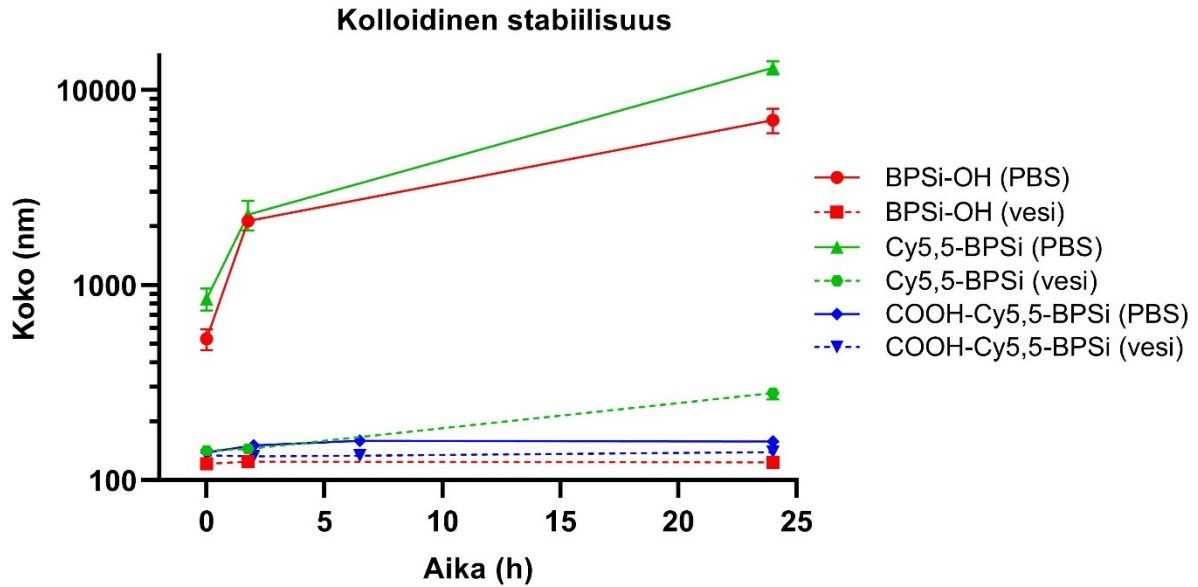
5.1.3 Kolloidinen stabiilisuus ja zeta potentiaali

Eri tavalla funktionalisoiduille nanopartikkeleille mitatuista zeta potentiaaleista (Taulukko 3) havaitaan konjugoitujen molekyylien vaikutus nanopartikkelien pintavaraukseen vedessä ja PBS:ssä.

Taulukko 3: Funktionalisoitujen nanopartikkelien eri tyypeille vedessä ja PBS:ssä mitatut zeta potentiaalit.

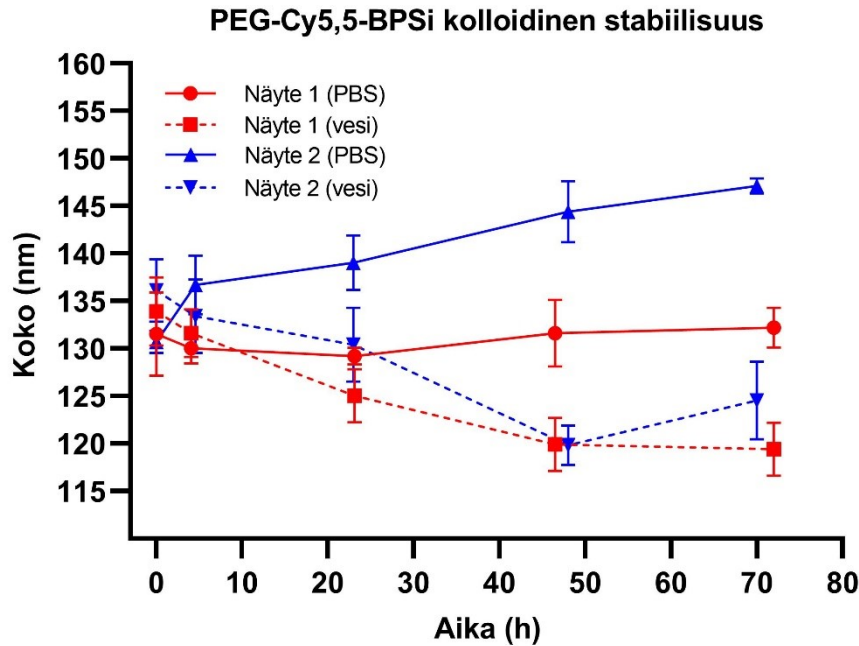
Partikkeli	Vedessä (mV)	PBS:ssä (mV)
BPSi-OH	$-24,4 \pm 0,9$	$-16,3 \pm 1,5$
NH ₂ -BPSi	$32,2 \pm 0,7$	$3,8 \pm 1,1$
Cy5,5-BPSi	$32,5 \pm 0,7$	$6,8 \pm 0,3$
COOH-Cy5,5-BPSi	$18,5 \pm 0,6$	$-11,1 \pm 0,7$
PEG-Cy5,5-BPSi	$25,6 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,8$
COOH-PEG-Cy5,5-BPSi	$-7,6 \pm 0,4$	$-1,4 \pm 0,6$

Kolloidisen stabiilisuuden mittauksilla tutkittiin funktionalisoitujen BPSi nanopartikkelien keskiarvokokoa ajan funktiona eri liuoksissa. BPSi-OH, Cy5,5-BPSi ja COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien koon muutoksesta vedessä ja PBS-liuoksessa havaitaan, että Cy5,5-BPSi nanopartikkeleita lukuun ottamatta muut nanopartikkelityypit säilyttivät koon lähellä lähtökokoja 24 tunnin ajan vedessä (Kuva 12). PBS:ssä BPSi-OH ja Cy5,5-BPSi nanopartikkelien koko kasvoi nopeasti mittauksen aloituksen jälkeen, mutta COOH-modifioinnin myötä stabiilisuuden havaitaan paranevan merkittävästi. Nanopartikkelien pinnalle tehdyt modifioinnit havaitaan myös zeta potentiaalin muutoksina aminosilaanien konjugoinnin viedessä oksidoitujen nanopartikkelien zeta potentiaalia positiivisen puolelle (PBS: $6,8 \pm 0,3$ mV), jota COOH-modifiointi kuitenkin laskee negatiiviseksi (PBS: $-11,1 \pm 0,7$ mV).



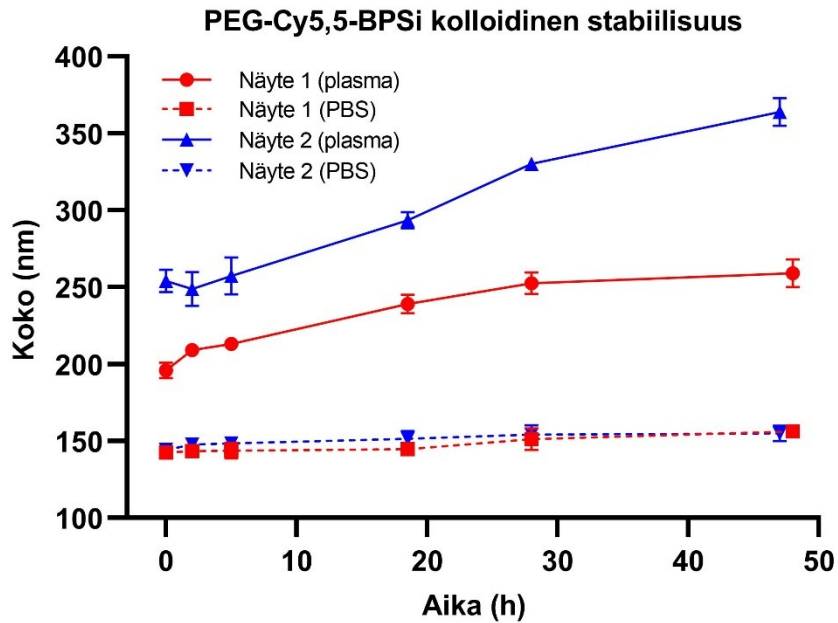
Kuva 12: BPSi-OH, Cy5,5-BPSi ja COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus vedessä ja PBS:ssä.

Nanopartikkelien internalisointikokeissa (kappale 5.2.1) CT26 ja RAW264.7 soluilla havaittiin, ettei pelkästään COOH-modifiointi riittänyt estämään nanopartikkelien internalisoitumista solujen sisään, vaan vasta PEGylointi vähensi internalisoitumista merkittävästi. PEGyloinnin myötä nanopartikkelien havaitaan säilyttävän koon vain pienin muutoksin sekä vedessä että PBS:ssä 72 tunnin ajan (Kuva 13). Stabiilisuus kuvaajassa näytteet 1 ja 2 viittaavat kahteen eri erässä valmistettuihin nanopartikkeleihin. Vedessä havaittava nanopartikkelikoon lasku on selitettävissä todennäköisesti 2,0 kDa:n PEG-molekyylien taittumisena nanopartikkelin pintaa kohden [37].



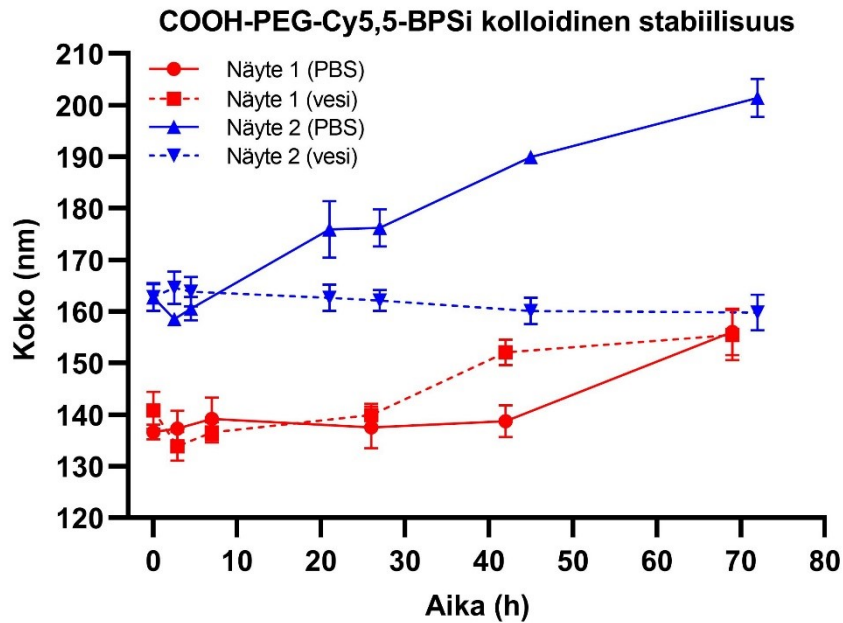
Kuva 13: PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus vedessä ja PBS:ssä.

PEGyloitujen nanopartikkelien (PEG-Cy5,5-BPSi) stabiilisuutta tutkittiin myös veren plasmassa (Kuva 14), joka on punasolujen poistamisen jälkeen jäävä veren nestemäinen osa. Plasman sisältämät proteiinit voivat johtaa PBS-liuokseen verrattuna partikkelien nopeampaan aggregoitumiseen ja näin stabiilisuuden heikkenemiseen, joka havaitaan PEGyloitujen nanopartikkelien koon noustessa plasmassa noin 50-70 nm jo ensimmäisen 28 tunnin aikana. Plasma mittauksissa nanopartikkelien lähtökoko on selvästi suurempi kuin nanopartikkeleilla PBS:ssä, mikä aiheutuu plasman sisältämien proteiinien koon näkymisestä keskiarvona laskettujen partikkelien koossa. Plasmassa stabiilisuuden heikentymisen pääteltiin liittyvän korkeaan zeta potentiaaliin (vedessä: $25,6 \pm 0,9$ mV), joka johtui todennäköisesti osan aminosilaanien NH_2 -ryhmien jäädessä vapaaksi Cy 5,5 -väriaineen konjugoinnin jälkeen. PEGyloitujen nanopartikkelien konjugoinnin meripihkahappoanhydridillä (COOH-modifiointi) havaitaan laskevan nanopartikkelien (COOH-PEG-Cy5,5-BPSi) zeta potentiaalia negatiivisen puolelle (vedessä: $-7,6 \pm 0,4$ mV), tukien myös väitettä vapaista NH_2 -ryhmistä, joihin meripihkahappoanhydridi molekyylit liittyvät.



Kuva 14: PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus PBS:ssä ja veren plasmassa.

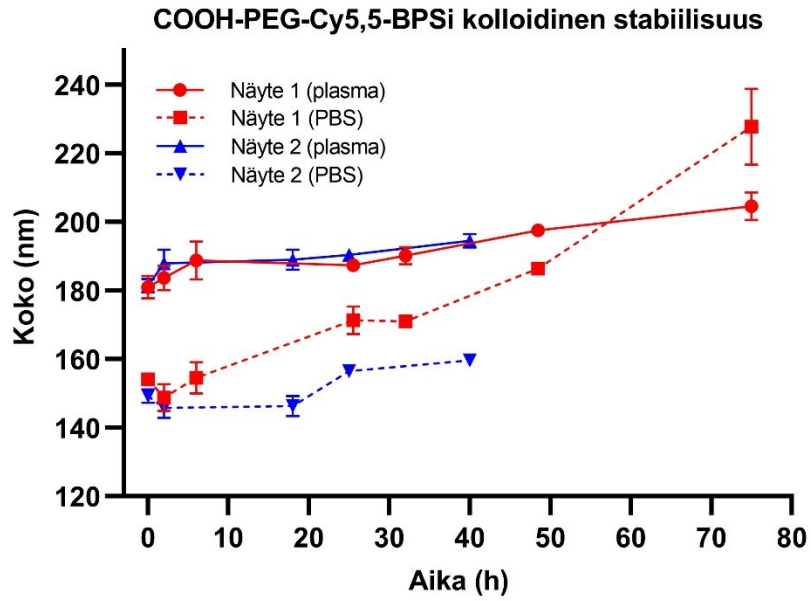
COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien stabiilisuudessa PBS:ssä on havaittavissa vaihtelua kahdessa eri erässä valmistetuilla näytteillä 1 ja 2 (Kuva 15), joista suurempikin partikkelikoon nousu jää kuitenkin alle 15 nm:n ensimmäisen 24 tunnin ajalta. Näytteiden väliset erot stabiilisuudessa voivat selittyä esimerkiksi PEGyloinnin tai muiden modifiointien heikommalla onnistumisella partikkeleissa. Toinen vaikuttava tekijä voi olla näytteen valmistelu mittausta varten, mikäli mittaukseen olisi päätyttyä mukaan myös selkeästi keskiarvoa suurempia nopeammin aggregoituvia partikkeleita. Näkki et al. [37] olivat havainneet sähkökemiallisella syövytyksellä valmistetuilla PSi nanopartikkeleilla eri kokojakaumien (keskiarvot 120-190 nm välillä) käyttäytyvän hyvin samankaltaisesti PBS:ssä useiden päivien ajan, joten todennäköisesti myöskään COOH-PEG-Cy5,5-BPSi näytteiden 1 ja 2 välinen ero stabiilisuudessa ei ole selitettävissä vajaan 30 nm erolla nanopartikkelien lähtökoossa.



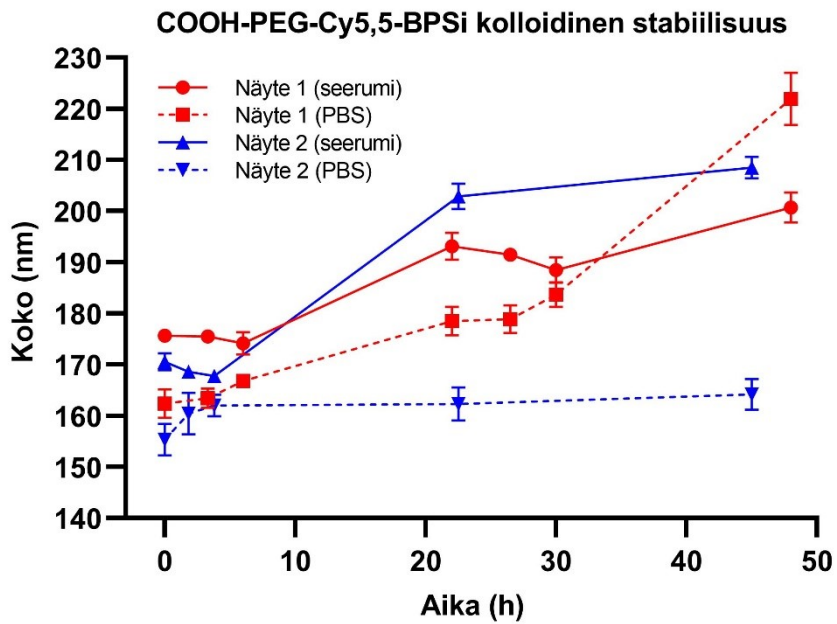
Kuva 15: COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus vedessä ja PBS:ssä.

COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidisesta stabiilisuudesta plasmassa (Kuva 16) kuitenkin havaitaan COOH-modifioinnin selvästi parantavan PEGyloitujen nanopartikkelien stabiilisuutta, ja koon nousun jäädessä 24 tunnissa alle 10 nm:n. Stabiilisuutta tutkittiin myös seerumissa, joka on veren hyytymisen jälkeen nestemäiseksi jäävä veren osa. Seerumissa stabiilisuus heikkenee hieman plasmassa verrattuna, ja COOH-PEG-Cy5,5-BPSi:n partikkelikoon havaitaan nousevan 24 tunnissa noin 15-30 nm (Kuva 17).

Osa plasma ja seerumi mittauksille suoritetuista referenssi mittauksista PBS:ssä COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleilla (Kuva 16 ja Kuva 17) osoittaa kuitenkin jopa voimakkaampaa aggregoitumista kuin plasmassa tai seerumissa mitattaessa. Vaikka COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien stabiilisuus plasmassa paranee PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkeleihin verrattuna, voi PBS:ssän ionikoostumus olla sille epäsuotuinen heikentäen stabiilisuutta COOH-modifioinnin jälkeen.



Kuva 16: COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus PBS:ssä ja plasmassa.



Kuva 17: COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus PBS:ssä ja seerumissa.

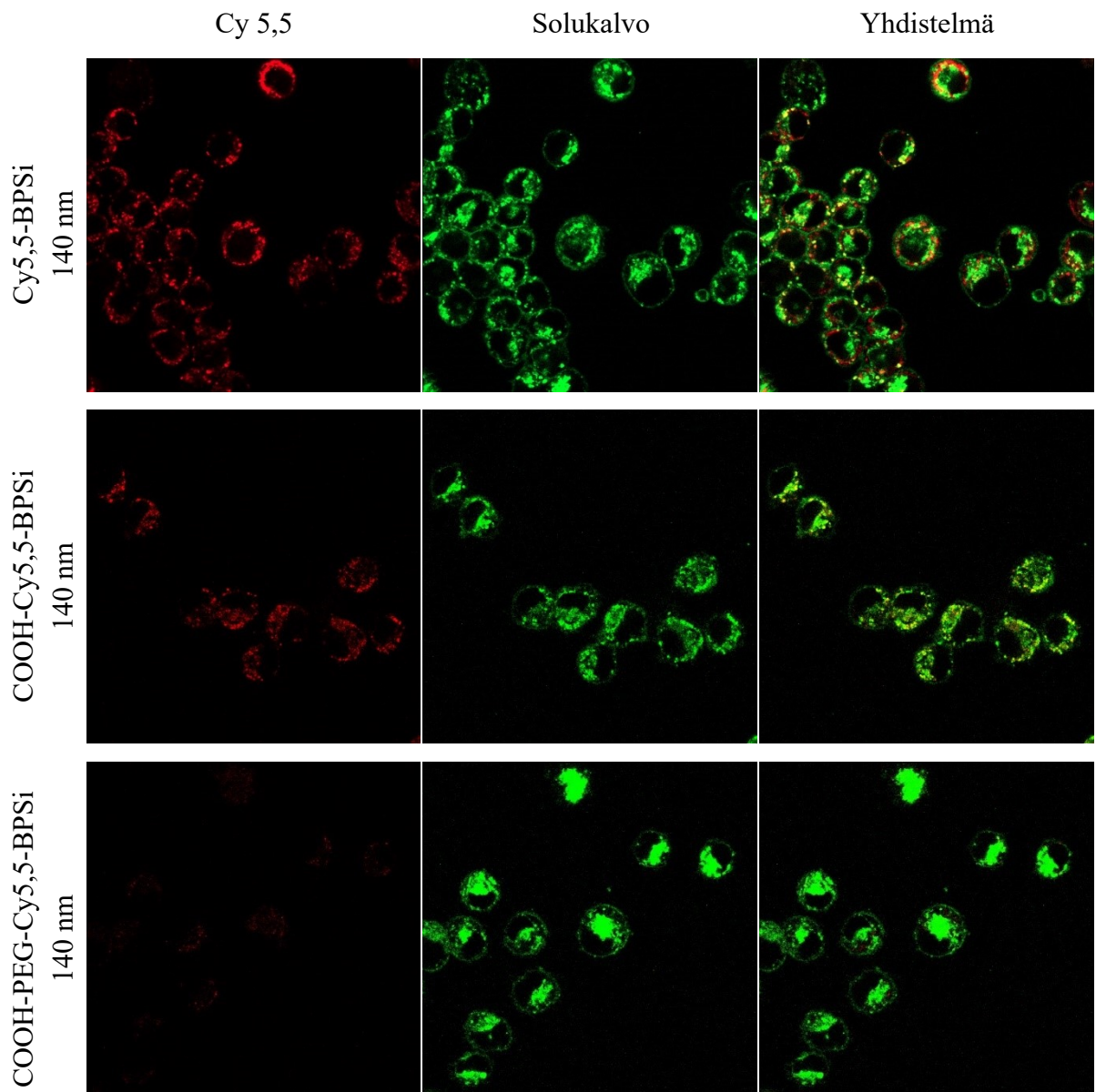
5.2 SOLUKOKEET

5.2.1 Partikkelien internalisointi

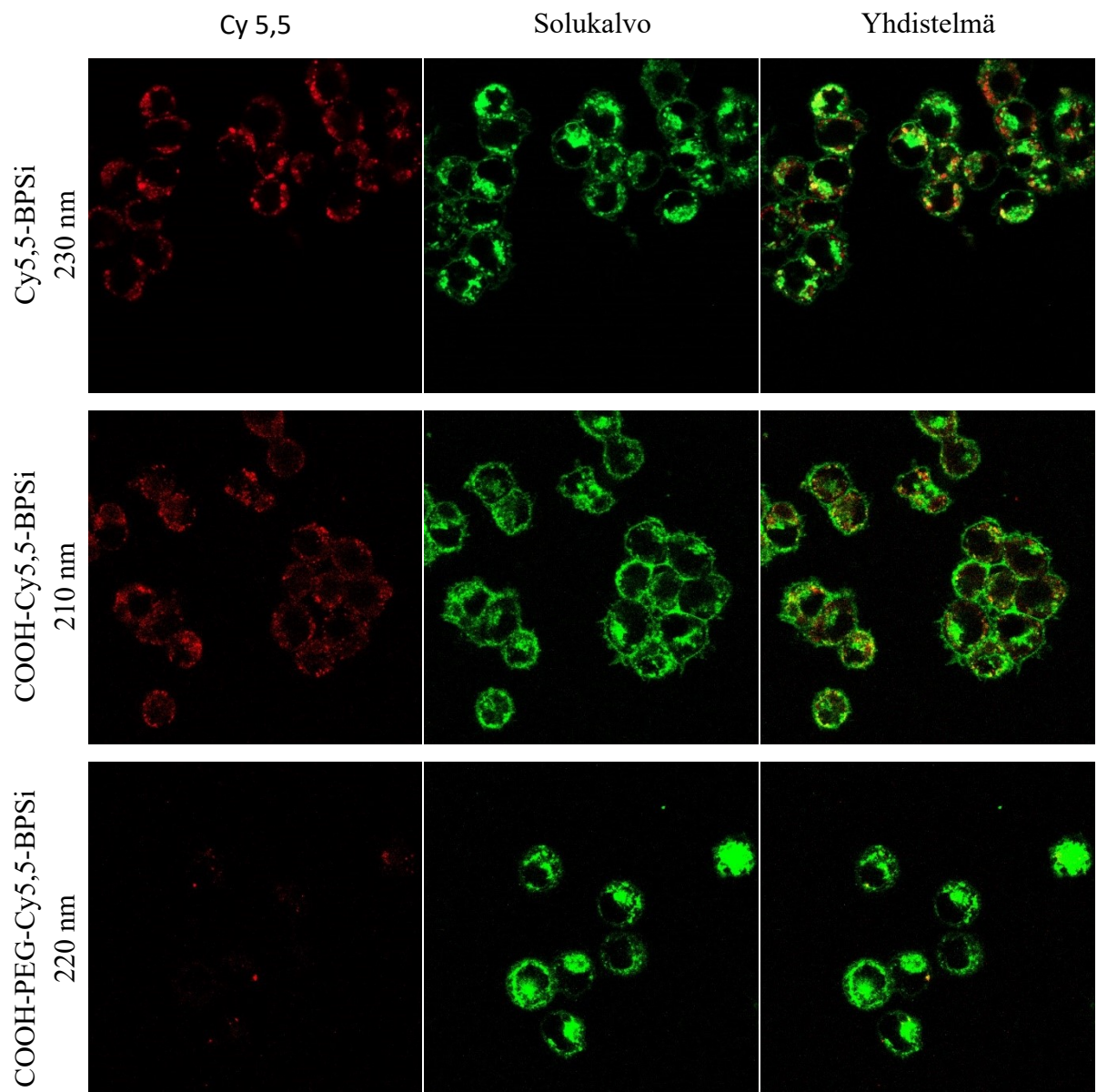
Nanopartikkelien internalisointikuvissa on esitettynä punaisella funktionalisoidut nanopartikkelit (vasemmalla), vihreällä solukalvon rakenteet (keskellä) ja edellisten yhdistetty kuva (oikealla). Soluista kerroskuvauksena otetut kuvat valittiin siten, että nanopartikkelien internalisoinnin määrä olisi vertailtavissa eri nanopartikkelityyppien välillä.

RAW264.7 soluilla eri tavalla funktionalisoitujen nanopartikkelien internalisointikuvat on ryhmitelty nanopartikkelien kokojakaumien keskiarvon 140 nm (Kuva 18), 220 ± 10 nm (Kuva 19) ja 315 ± 15 nm (Kuva 20) mukaan. Tulosten perusteella nanopartikkelien internalisointiin vaikuttaa merkittävästi nanopartikkelien funktionalisointi. Nanopartikkelityypeistä voimakkaimmin internalisoitumista näytti Cy5,5-BPSi nanopartikkelit ja seuraavaksi COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelit, joiden välinen ero on osittain selitettävissä COOH-ryhmän tuomalla zeta potentiaalin laskulla (Taulukko 3) ja heikommalla vuorovaikutuksella negatiivisesti varautuneen solukalvon kanssa. Lisäksi COOH-modifiointi tuo selvän parannuksen nanopartikkelien kolloidiseen stabiilisuuteen (Kuva 12). Vähiten internalisointia näytti PEGyloidut COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelit, joka johtuu parantuneen stabiilisuuden lisäksi PEG-molekyylien vähentämästä opsonointi proteiinien liittymisestä nanopartikkeleihin. Tulosten perusteella internalisoinnin on myös havaittavissa kasvavan partikkelijakaumien keskiarvokoon kasvun myötä.

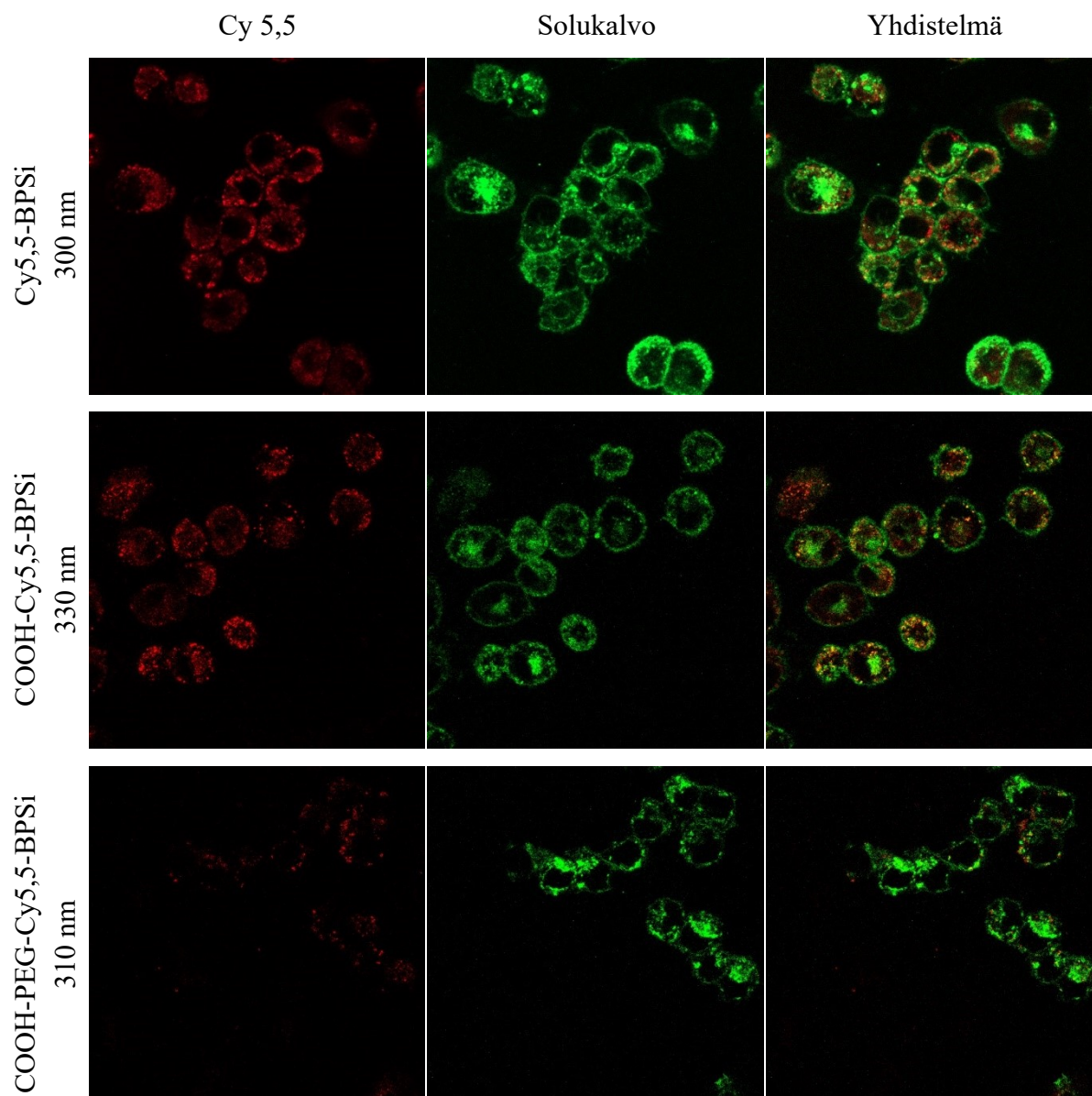
Internalisoitujen nanopartikkelien havaitaan kertyneen solujen sisällä pallomaisiksi tihentymiksi, joka viittaa niiden päätyneen lysosomi organellien sisäistämiksi. Tämä myös vahvistaa käsitystä siitä, että nanopartikkelit ovat internalisoituneet solujen sisälle pelkästään solukalvon kiinnittymisen sijasta.



Kuva 18: 140 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 140 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 140 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi RAW264.7 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.



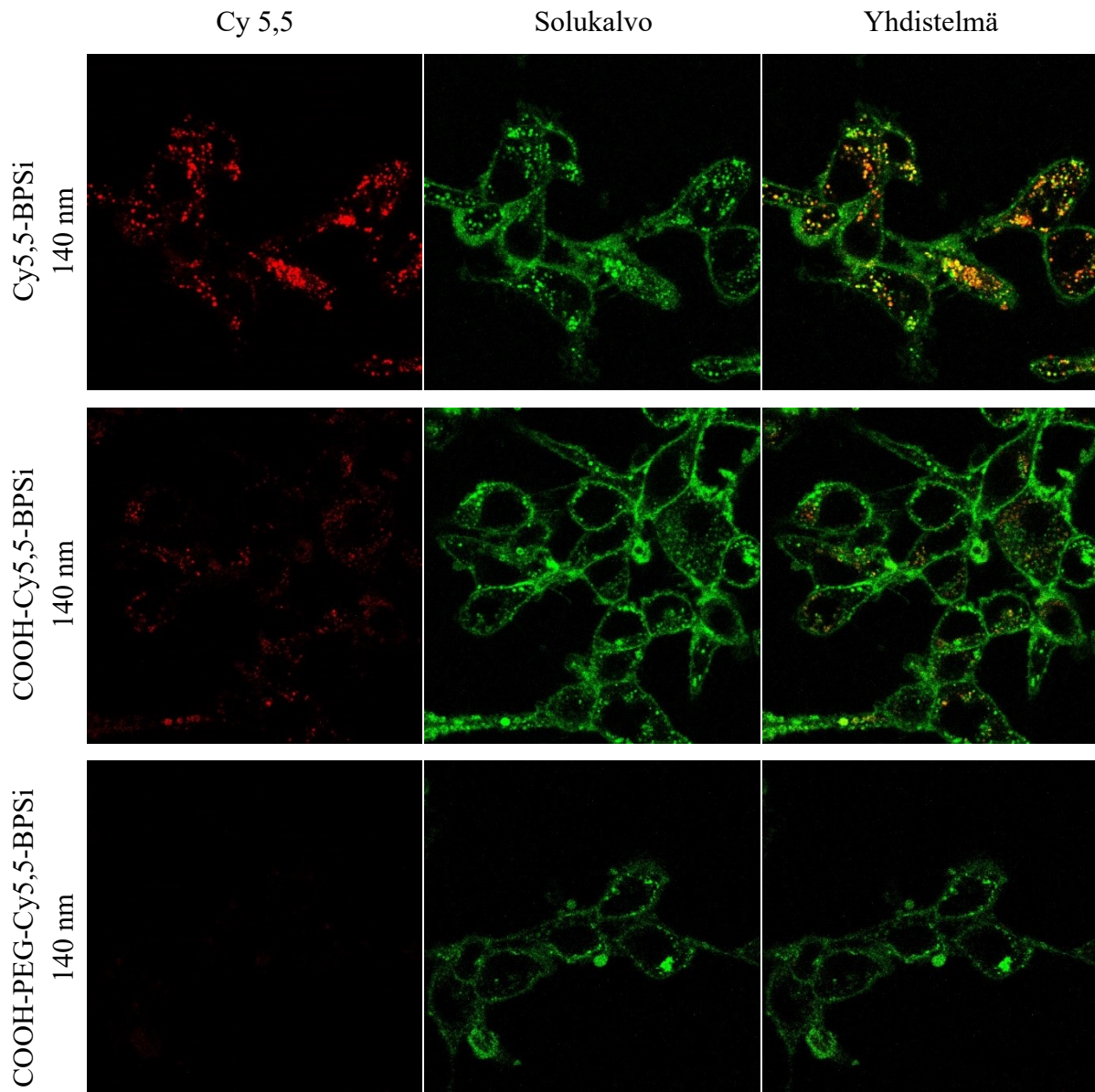
Kuva 19: 230 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 210 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 220 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi RAW264.7 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.



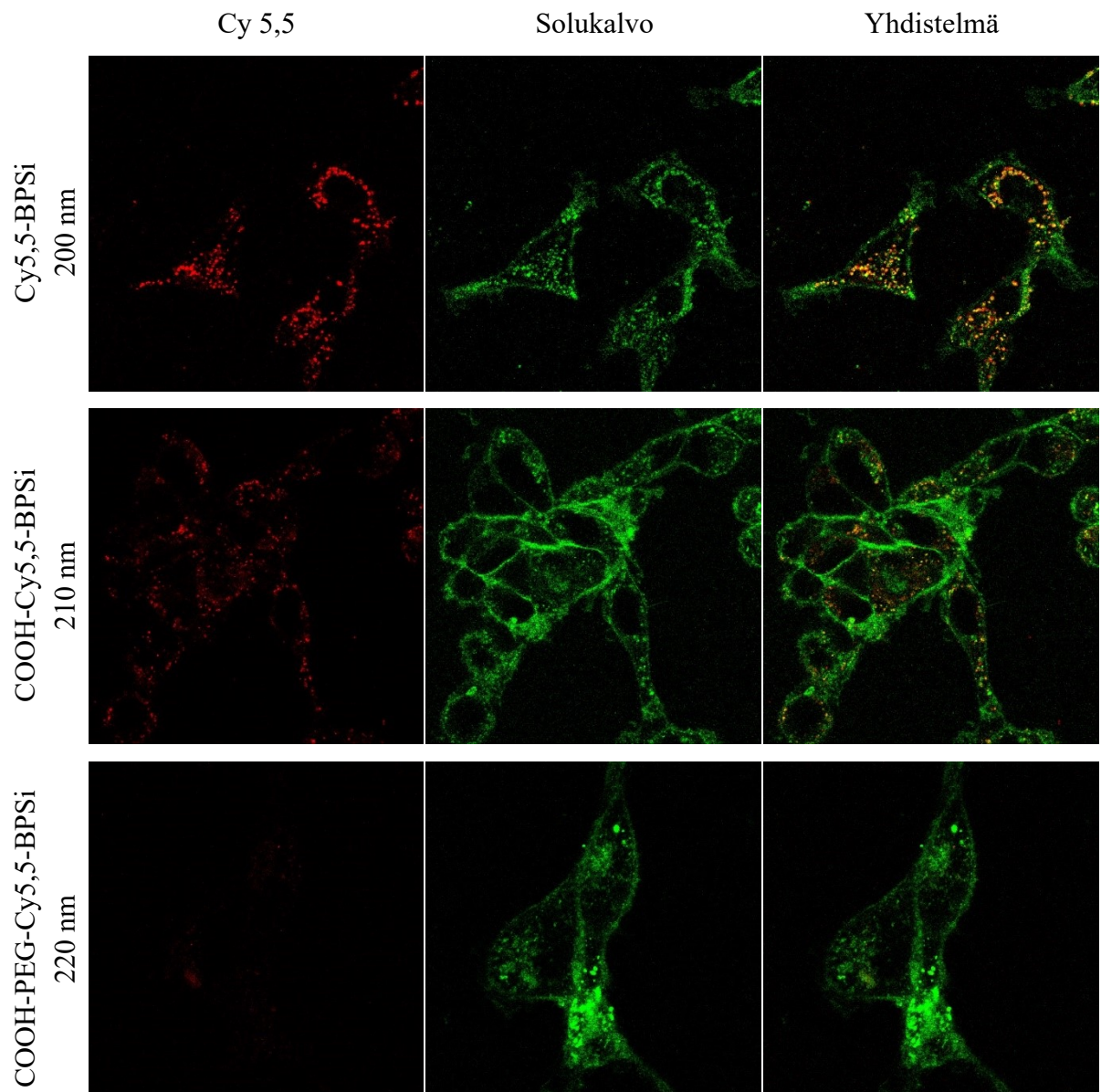
Kuva 20: 300 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 330 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 310 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi RAW264.7 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.

CT26 soluilla eri tavalla funktionalisoitujen nanopartikkelien internalisointikuvat on ryhmitelty nanopartikkelien kokojakaumien keskiarvokoon 140 nm (Kuva 21), 210 ± 10 nm (Kuva 22) ja 315 ± 15 nm (Kuva 23) mukaan. Tulokset ovat melko samankaltaiset kuin RAW264.7 soluilla, eli selvästi vähiten internalisoitumista näyttivät COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelit, vaikka ero Cy5,5-BPSi ja COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien internalisoinnin välillä oli hieman suurempi. Lisäksi myös CT26 soluilla suuremmat nanopartikkelit johtivat internalisoinnin lievään voimistumiseen. Melko vastaavasti Xu et al. [1] olivat myös havainneet

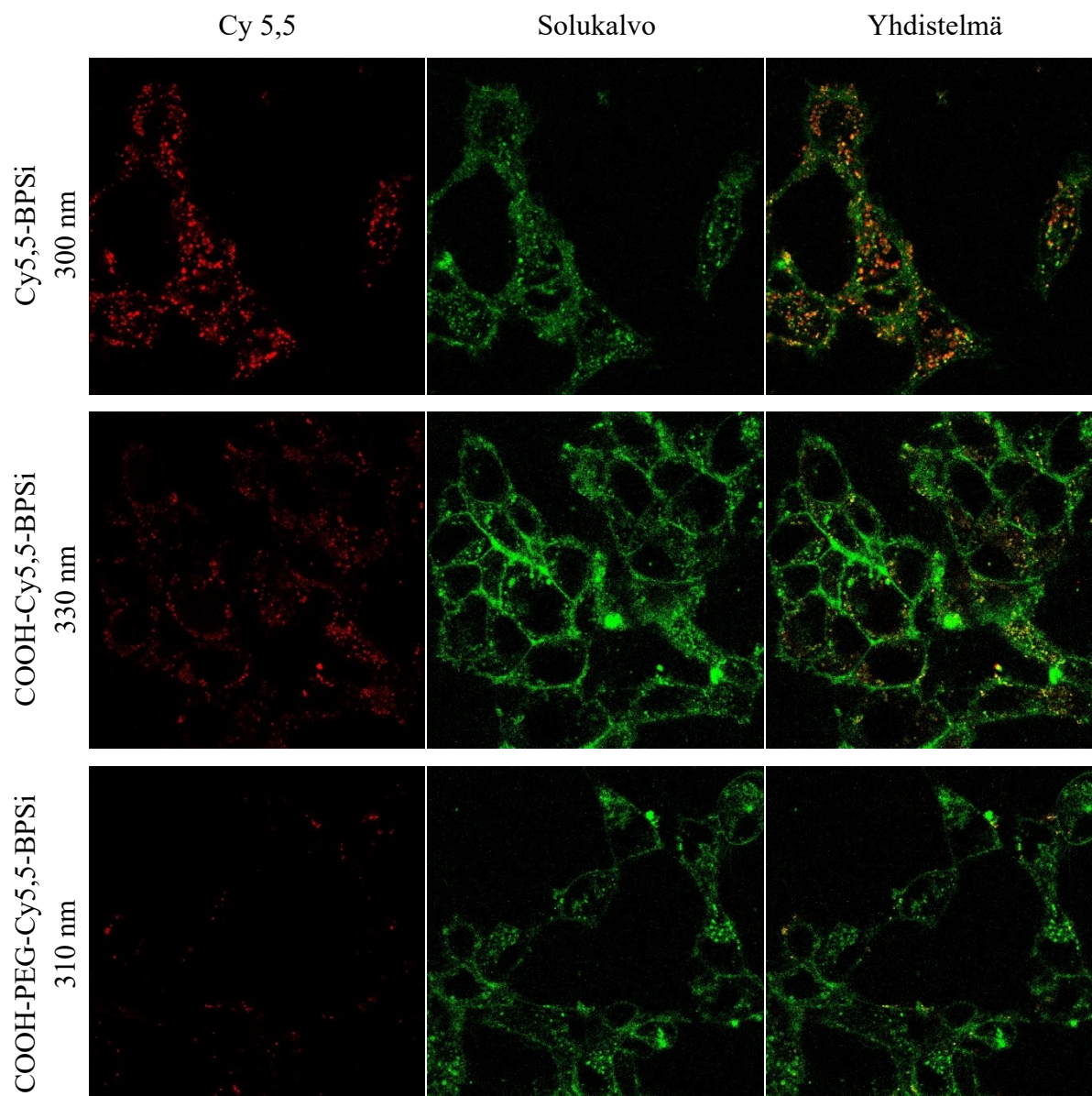
CT26 solulinjalla FITC-väriaineella konjugoiduilla 156 nm:n BPSi nanopartikkeleilla PEGyloinnin vaikutuksen, sen laskiessa internalisointia merkittävästi 24 tunnin inkuboinnilla.



Kuva 21: 140 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 140 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 140 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi CT26 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.



Kuva 22: 200 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 210 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 220 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi CT26 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.

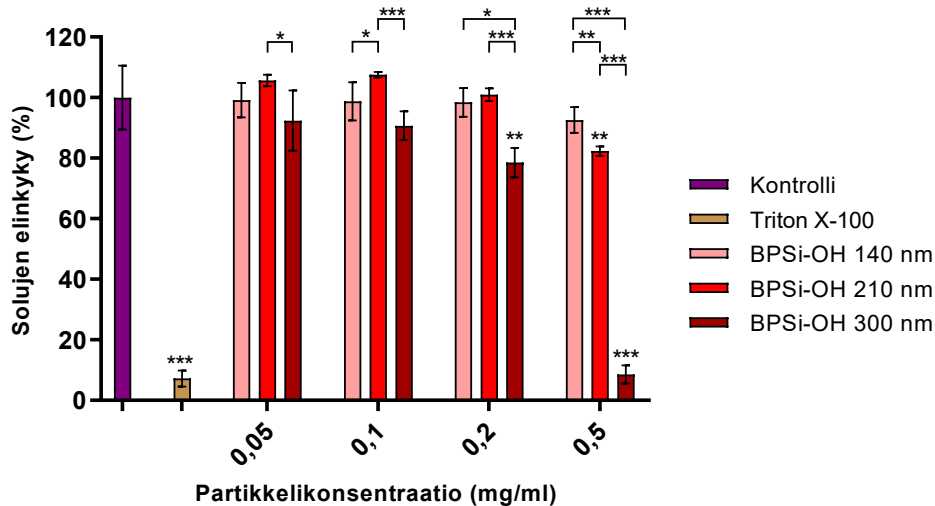


Kuva 23: 300 nm:n Cy5,5-BPSi (yllä), 330 nm:n COOH-Cy5,5-BPSi (keskellä) ja 310 nm:n COOH-PEG-Cy5,5-BPSi (alla) nanopartikkelien internalisointi CT26 soluilla 24 tunnin inkuboinnin vaikutuksesta.

5.2.2 Solujen elinkyky

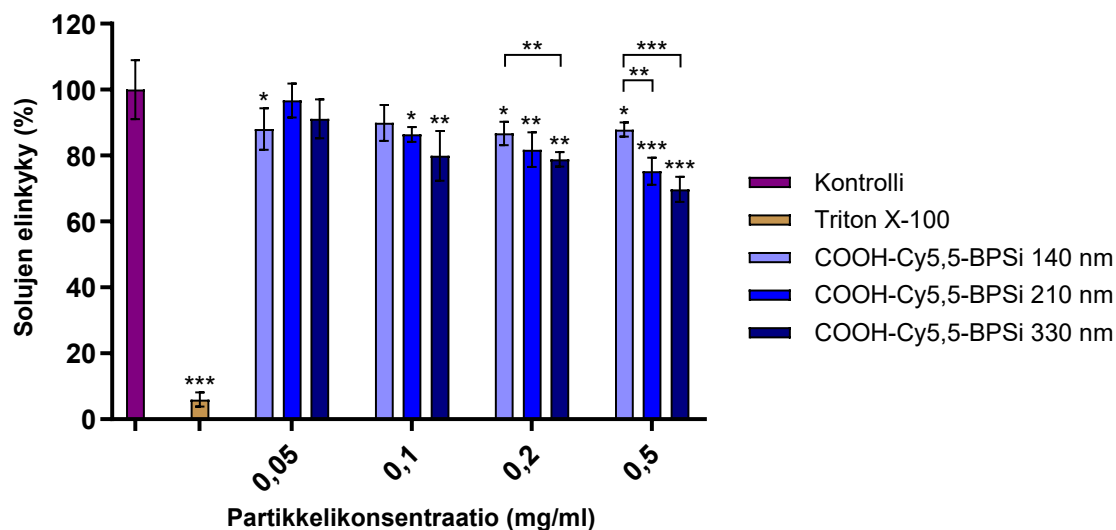
CT26 solujen elinkykykokeiden tulokset esittävät mitatut solujen elinkyvyt eri nanopartikkelien funktionalisoinneilla. Tuloksissa tilastollinen merkitsevyys p-arvona ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ ** ja $p < 0,001$ ***) havaintojen välillä (viiva pylväiden välillä) on laskettu kaksisuuntaisena kahden otoksen Studentin t-testinä. Vastaavasti on laskettu tilastollinen merkitsevyys negatiivisen kontrolliryhmän ja yksittäisten mittausten (pylväiden) välillä, jotka on merkitty *::llä kyseenomaisen pylvään yläpuolelle.

BPSi-OH nanopartikkeleiden kanssa 24 tunnin ajan inkuboitujen CT26 solujen elinkytytuloksista (Kuva 24) havaitaan erityisesti suurimman nanopartikkeli kokojakauman (300 nm) suurimman konsentraation (0,5 mg/ml) toksisuus hyvin vähäisenä elinkykyisten solujen määränä. Puolestaan pienimmän nanopartikkelikoon (140 nm) vaikutus solujen elinkykyyn oli vain vähäinen suurimmallakin konsentraatiolla. Ero suurimman ja pienimmän kokojakauman tulosten välillä voi selittyä sillä, että isommat nanopartikkelit aggregoituvat nopeammin ja painavampina painavat solun pintaa voimakkaammin. Erityisesti BPSi-OH nanopartikkelien koolla 300 nm kuoppien pohjien väri oli inkuboinnin jälkeen selvästi tummempi kuin muilla partikkelityypeillä, joka voi viitata suurempien nanopartikkelien voimakkaampaan internalisoitumiseen tai kiinnittymiseen solukalvoon vaikuttaen sytotoksisuuteen.



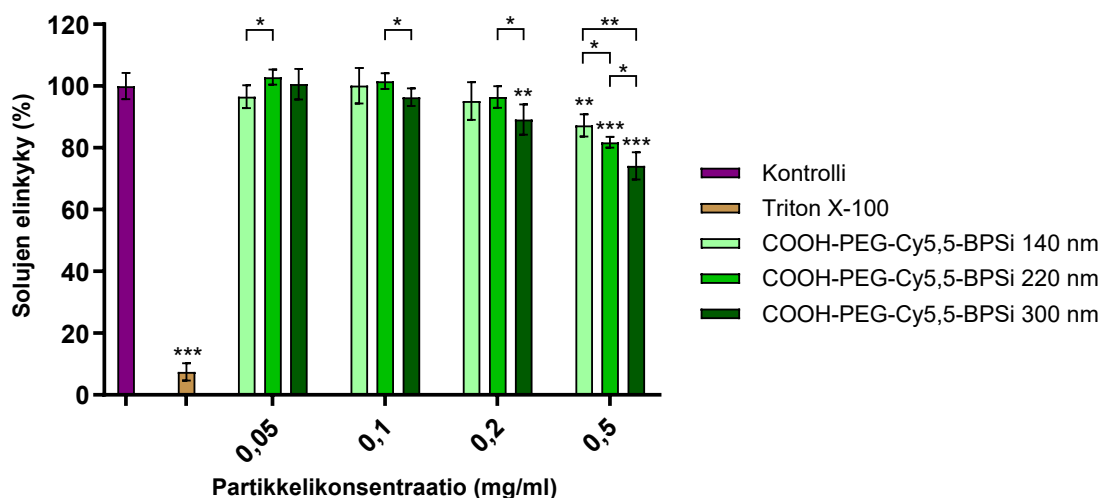
Kuva 24: CT26 solujen elinkyky, kun soluja oli inkuboitu 24 tuntia BPSi-OH nanopartikkelien kanssa.

Myös COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien vaikutus CT26 solujen elinkykyyn (Kuva 25) osoitti partikkelikoon ja konsentraation kasvun johtavan voimakkaampaan toksisuuteen. BPSi-OH nanopartikkeleihin verrattuna COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelit näyttivät selvästi vähäisempää toksisuutta soluilla erityisesti suurimmalla konsentraatiolla (0,5 mg/ml) suurimmalla partikkelikoolla (330 nm), joka on todennäköisesti seurausta COOH-ryhmien vaikutuksesta nanopartikkeleiden pinnoilla vähentäen aggregointia (Kuva 12).



Kuva 25: CT26 solujen elinkyky, kun soluja oli inkuboitu 24 tuntia COOH-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kanssa.

Myös PEGyloitujen COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kanssa inkuboitujen CT26 solujen elinkyvyn (Kuva 26) havaitaan laskevan partikkelikoon kasvaessa ja suuremmilla konsentraatioilla. Vastaavanlaista elinkyvyn laskua ei kuitenkaan havaita isoimmallakaan kokojakaumalla (300 nm) kuin mitä BPSi-OH (300 nm) näytti. PEGyloinnin seurauksena nanopartikkelien kolloidinen stabiilisuus merkittävästi paranee verrattaessa BPSi-OH nanopartikkeleihin, mutta PEG-molekyylit myös vähentävät nanopartikkelien internalisoitumista solujen sisään.



Kuva 26: CT26 solujen elinkyky, kun soluja oli inkuboitu 24 tuntia COOH-PEG-Cy5,5-BPSi nanopartikkelien kanssa.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Konjugointi PEG-molekyyleillä ja COOH-ryhmillä merkittävästi paransi syaniini 5,5 -väriaineella funktionalisoitujen mustan huokoisen pii nanopartikkelien kolloidista stabiilisuutta veren plasmassa ja seerumissa, vaikka nanopartikkelien koon havaittiinkin hieman lähtevän nousemaan jo 2-3 päivän aikana. PEG-silaanien osuus (7,3 m%) nanopartikkeleissa jäi lopulta tavoiteltua matalammaksi, mikä jättää nyt spekuloitavaksi olisiko stabiilisuus vielä parantunut onnistuneemmalla PEGyloinnilla. PEG-silaanien osuutta nanopartikkeleissa olisi mahdollisesti voinut kasvattaa, mikäli BPSi nanopartikkelit olisi konjugoitu ensin PEG-silaanien ja vasta sen jälkeen APTES:in kanssa.

Vaikka Cy 5,5 -väriaineen osuutta ei onnistuttu luotettavasti eri kokoisilla nanopartikkeleilla selvittämään, erot internalisoinnissa nanopartikkelien eri funktionalisointityypeillä tulivat kuitenkin näkyviin. Isompien nanopartikkelien voimakkaampi internalisoituminen voi osaltaan johtua in vitro mittausasetelmasta, mutta PEGyloinnin havaittiin silti sekä isoilla että pienillä nanopartikkeleilla vähentävän internalisointia merkittävästi. PEGyloinnin ja COOH-modifioinnin vaikutus sytotoksisuuteen havaittiin myös, sillä BPSi-OH nanopartikkelien suurimman koon kaltaista solujen elinkyvyn laskua ei muilla partikkelien funktionalisointityypeillä esiintynyt. Solukokeiden perusteella parempaa bioyhteensopivuutta osoittivat pienemmän koon nanopartikkelit funktionalisoinnista riippumatta, mikä kannustaisi jatkossa tutkimaan myös selvästi alle 100 nm:n BPSi nanopartikkeleiden hyödyntämistä biolääketieteellisissä sovelluskohteissa. Yhdeksi haasteeksi tässä työssä nousi juuri BPSi mikropartikkelien jauhaminen alle 100 nm:n kokoon, joka jää näin edelleen jatkokehityksen kohteeksi.

LÄHDELUETTELO

- [1] W. Xu, K. Tamarov, L. Fan, S. Granroth, J. Rantanen, T. Nissinen, S. Peräniemi, O. Uski, M. R. Hirvonen ja V.-P. Lehto, "Scalable Synthesis of Biodegradable Black Mesoporous Silicon Nanoparticles for Highly Efficient Photothermal Therapy," *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(28), 23529-23538, 2018.
- [2] W. Xu, J. Leskinen, E. Happonen, T. Tarvainen ja V.-P. Lehto, "Black Mesoporous Silicon as a Contrast Agent for LED-Based 3D Photoacoustic Tomography," *ACS Applied Material & Interfaces*, 12(5), 5456-5461, 2020.
- [3] H. A. Santos, *Porous silicon for biomedical applications*, Woodhead Publishing, 2014.
- [4] J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen ja V.-P. Lehto, "Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs," *Journal of Controlled Release*, 108(2-3), 362-374, 2005.
- [5] J. M. Kinsella, S. Ananda, J. S. Andrew, J. F. Grondek, M.-P. Chien, M. Scadeng, N. C. Gianneschi, E. Ruoslahti ja M. J. Sailor, "Enhanced Magnetic Resonance Contrast of Fe₃O₄ Nanoparticles Trapped in a Porous Silicon Nanoparticle Host," *Advanced Materials*, 23(36), 248-253, 2011.
- [6] D. Jaque, M. L. Martinez, B. Del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez ja J. García Sol, "Nanoparticles for photothermal therapies," *Nanoscale*, 6(16), 9494-9530, 2014.
- [7] C. Hong, J. Lee, H. Zheng, S.-S. Hong ja C. Lee, "Porous silicon nanoparticles for cancer photothermotherapy," *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 1-8, 2011.
- [8] J. D. Byrne, T. Betancourt ja L. Brannon-Peppas, "Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1615-1626, 2008.
- [9] J. Jokerst, T. Lobovkina, R. Zare ja S. Gambhir, "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy," *Nanomedicine*, 6(4), 715-728, 2011.
- [10] S. Nie, "Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine," *Nanomedicine*, 5(4), 523-528, 2010.
- [11] D. Neiner, W. Chiu ja S. M. Kauzlarich, "Low-Temperature Solution Route to Macroscopic Amounts of Hydrogen Terminated Silicon Nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, 128(34), 11016–11017, 2006.
- [12] W. Xu, K. Tamarov, L. Fan, S. Granroth, J. Rantanen, T. Nissinen, S. Peräniemi, O. Uski, M. R. Hirvonen ja V.-P. Lehto, "Supporting Information: Scalable Synthesis of Biodegradable Black Mesoporous Silicon Nanoparticles for Highly Efficient

Photothermal Therapy,” 2018. [Online].
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.8b04557>.

- [13] W. Xu, J. Rytönen, S. Rönkkö, T. Nissinen, T. Kinnunen, M. Suvanto, A. Näränen ja V.-P. Lehto, ”A Nanostopper Approach To Selectively Engineer the Surfaces of Mesoporous Silicon,” *American Chemical Society*, 26(23), 6734–6742, 2014.
- [14] W. Xu, J. Riikonen, T. Nissinen, M. Suvanto, K. Rilla, B. Li, Q. Wang, F. Deng ja V.-P. Lehto, ”Amine Surface Modifications and Fluorescent Labeling of Thermally Stabilized Mesoporous Silicon Nanoparticles,” *The Journal of Physical Chemistry*, 116(42), 22307–22314, 2012.
- [15] C. Fishburn, ”The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), 4167–4183, 2008.
- [16] M. D'almeida, J. Amalric, C. Brunon, B. Grosogeat ja B. Toury, ”Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance,” *Applied Surface Science*, 327, 296–306, 2015.
- [17] H. A. Santos, E. Mäkilä, L. M. Bimbo, P. Almeida ja J. Hirvonen, ”Porous Silicon Nanoparticle,” *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*, New York, Springer, 2013, 235–276.
- [18] E. Anglin, L. Cheng, W. Freeman ja M. Sailor, ”Porous silicon in drug delivery devices and materials,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1266–1277, 2008.
- [19] Promega, ”CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay,” [Online]. <https://ch.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>. [Haettu 13.4.2020].
- [20] V. Sutariya, V. Pathak, A. Groshev, M. Chougule, S. Naik, D. Patel ja Y. Pathak, ”Introduction - Biointeractions of Nanomaterials: Challenges and Solutions,” *Biointeractions of Nanomaterials*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2015, 1–48.
- [21] M. Björnmalm, M. Faria, X. Chen, J. Cui ja F. Caruso, ”Dynamic Flow Impacts Cell-Particle Interactions: Sedimentation and Particle Shape Effects,” *Langmuir*, 32(42), 10995–11001, 2016.
- [22] S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M. Hamaly, M. Alkawareek, E. Dreaden, D. Brown, A. Alkilany, O. Farokhzad ja M. Mahmoudi, ”Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell,” *Chemical Society Review*, 46(14), 4218–4244, 2017.
- [23] J. Zhao ja M. H. Stenzel, ”Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties,” *Polymer Chemistry*, 9(3), 259–272, 2018.
- [24] S. E. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier ja J. M. Desimore, ”The effect of particle design on cellular internalization pathways,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11613–11618, 2008.

- [25] K. Shapero, F. Fenaroli, I. Lynch, D. C. Cottell, A. Salvati ja K. A. Dawson, "Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells," *Molecular Biosystems*, 7(2), 371-378, 2011.
- [26] S. M. Moghimi, A. C. Hunter ja J. C. Murray, "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice," *Pharmacological reviews*, 53(2), 283-318, 2001.
- [27] M. Elimelech, J. Gregory, X. Jia ja R. A. Williams, *Particle Deposition and Aggregation*, Wildwood: Butterworth-Heineman, 1995.
- [28] R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, London: Academic Press, 1981.
- [29] T. A. Mohd, M. Z. Jaafar, A. A. Rasol ja M. F. Hamid, "Measurement of Streaming Potential in Downhole Application: An Insight for Enhanced Oil Recovery Monitoring," *MATEC Web of Conferences*, 2017.
- [30] D. Lumen, S. Näkki, S. Imlimthan, E. Lambidis, M. Sarparanta, W. Xu, V.-P. Lehto ja A. J. Airaksinen, "Site-Specific ¹¹¹In-Radiolabeling of Dual-PEGylated Porous Silicon Nanoparticles and Their In Vivo Evaluation in Murine 4T1 Breast Cancer Model," *Pharmaceutics*, 11(12), 2019.
- [31] G. Mendoza, I. Ortiz De Solorzano, I. Pintre, S. Gracia-Salinas, V. Sebastian, V. Andreu, M. Gimeno ja M. Arruebo, "Near infrared dye-labelled polymeric micro- and nanomaterials: in vivo imaging and evaluation of their local persistence," *Nanoscale*, 10(6), 2970-2982, 2018.
- [32] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Josserand, E. Neumann, J. Bibette ja F. Vinet, "Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging," *Journal of Biomedical Optics*, 14(5), 2009.
- [33] Lumiprobe, "Cyanine5.5 NHS ester," [Online]. <https://www.lumiprobe.com/p/cy55-nhs-ester>. [Haettu 15.4.2020].
- [34] R. L. Price ja W. G. Jerome, *Basic Confocal Microscopy*, New York: Springer, 2011.
- [35] J. Stetefeld, S. A. McKenna ja T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427, 2016.
- [36] T. F. Tadros, *Nanodispersions*, De Gruyter, 2016.
- [37] S. Näkki, J. Rytönen, T. Nissinen, C. Florea, J. Riikonen, P. Ek, H. Zhang, H. Santos, A. Närvänen, W. Xu ja V.-P. Lehto, "Improved stability and biocompatibility of nanostructured silicon drug carrier for intravenous administration," *Acta Biomaterialia*, 13, 207-215, 2015.