

Suolaepätasapainoon perustuva endosomista
vapautuminen: suolan lataaminen huokoiseen piihin

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Fysiikan ja tähtitieteen laitos
Fysiikka
Joulukuu 2018
LuK Lindgren R.R
Tarkastajat:
Prof. Salonen Jarno
Dos. Murtomaa Matti

Turun yliopiston laatujaarjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Lindgren, Rici Rikhard: Suolaepätasapainoon perustuva endosomista vapautuminen: suolan lataaminen huokoiseen piihin

Pro gradu -tutkielma, 65 s.
Fysiikka
Joulukuu 2018

Huokoisesta piistä (PSi) on tehty erittäin paljon tutkimusta. Näistä tutkimuksista suuri osa koskee huokoisen piin kykyä toimia lääkkeiden kantajamateriaalina. Puolimetallisesta piistä valmistetaan huokoista hyvin monella menetelmällä, joista yleisin on sähkökemiallinen anodisointi. Tällä menetelmällä piin huokosrakenne voidaan määrittää hyvin tarkasti halutunlaiseksi. Haluttuja ominaisuuksia lääkkeenkuljettimella ovat suuri ominaispinta-ala ja huokostilavuus, jotka mahdollistavat lääkeaineiden adsorboitumisen helpommin liukenevassa epäjärjestyneessä muodossa huokosrakenteeseen. Tärkeä syy huokoisen piin käyttöön lääkkeiden kuljetuksessa on myös sen hyväksi todettu bioyhteensopivuus ja vähäinen sytotoksisuus. Bioyhteensopivuutta edesautetaan tarkoituksenmukaisilla huokoisen piin pintakemioilla.

Lääkkeenkuljettimet päätyvät usein soluun päästessään solusyödyksi. Solu käynnistää tuntemattoman partikkelin havaitessaan endosytoosin ja muodostaa huokoisen piin ympärille rakkulan, josta voi kehittyä endosomi. Endosomin tehtävänä on hajottaa tuntematon aine harmittomaksi tai poistaa se solusta käänteisellä solusyönnillä ja lääkeaineiden halutaan poistuvan ennen kuin näin käy. Endosomista poistumiseen on kehitetty lukuisia menetelmiä, joista yksi on protonipumppumenetelmä. Tässä menetelmässä endosomiin joutunut partikkeli sisältää pH-bufferoivaa materiaalia, mikä aiheuttaa solun ja endosomin välille ioniepätasapainon ja siten osmoottisen paineen. Osmoottinen paine kasvaa lopulta endosomissa niin isoksi, että rakkulan rakenne hajoaa.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää voiko huokoisen piin partikkeleita ladata $MgCl_2$ -suolalla, mittaamalla huokosista vapautuvan suolan aiheuttamaa johtavuuden nousua. Perimmäisenä tarkoituksena aiheuttaa edellämainittu endosomin hajoaminen suolaepätasapainon aiheuttaman osmoottisen paineen avulla. Tutkimuksessa käytettiin termisesti karbidoitua huokoista piitä (TCPSi), jonka on havaittu olevan hyvin bioyhteensopiva. TCPSi-partikkeli päällystettiin alhaisessa pH:ssa liukenevalla asetyloidulla dextraanilla (AcDEX), hallitun vapautumisen aikaansaamiseksi. Suolalatauksen lisäksi tutkittiin urean ja boorihapon vaikutusta johtavuuteen vapautuessaan TCPSi:n huokosista.

Suolalatauksista havaittiin ettei päällystymateriaali estä ionien liikkuvuutta ja hallittua johtavuuden nousua ei havaittu. Urean ja boorihapon mittauksissa ei puolestaan havaittu selkeitä tuloksia johtavuudessa mittalaitteiston tarkkuuden riittämättömyyden vuoksi. Jatkossa tutkimusta voisi laajentaa muihin pintakemioihin, suoloihin ja mahdollisesti tiiviimpiin päällystysaineisiin.

Asiasanat: huokoinen pii, terminen oksidointi, terminen karbidointi, suolalataus, endosomal escape, asetyloitu dextraani

Sisältö

| | |
|--|-----------|
| Johdanto | 1 |
| 1 Huokoinen pii | 3 |
| 1.1 Huokoisen piin lyhyt historia | 4 |
| 1.2 Valmistus | 4 |
| 1.2.1 Sähkökemiallinen syövytys anodisoimalla | 5 |
| 1.2.2 Huokosten muodostuminen ja rakenne | 7 |
| 1.2.3 Pintakemian stabilointi | 11 |
| 1.3 Huokoisen piin käyttö lääkekuljettimena | 12 |
| 1.3.1 Huokoisen piin bioyhteesopivuus | 13 |
| 1.3.2 Lääkkeiden lataus ja vapautuminen | 14 |
| 2 Solututkimus | 15 |
| 2.1 Endosomal escape | 16 |
| 2.1.1 Protonipumppumenetelmä | 16 |
| 3 Kokeellinen tutkimus | 17 |
| 3.1 Mesohuokoisen piin valmistus | 19 |
| 3.1.1 Kokokontrolli ja partikkelien parametrit | 19 |
| 3.2 Kalibrointimittaukset | 20 |
| 3.2.1 Johtavuuden pH-riippuvuus | 20 |
| 3.2.2 Magnesiumkloridin vaikutus johtavuuteen | 22 |
| 3.3 Näytteiden valmistus | 24 |
| 3.3.1 Näytteiden valmistukseen käytetyt liuokset | 25 |
| 3.3.2 Näytteet | 26 |
| 3.4 Suolalataukset | 28 |
| 3.5 Lisämittaukset | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 4 Tulokset ja pohdintaa | 30 |
| 4.1 Suolalataukset | 30 |
| 4.1.1 Lataamattomien partikkelien johtavuusmittaukset | 31 |
| 4.1.2 Suolaladattujen partikkelien johtavuusmittaukset | 32 |
| 4.1.3 Suolalatausten pH-mittaukset | 44 |
| 4.2 Lisämittaukset | 46 |
| 4.2.1 Johtavuusmittaukset | 47 |
| 4.2.2 pH-mittaukset | 51 |
| 5 Yhteenveto | 53 |
| 5.1 Huokosista vapautumisen havaitseminen johtavuudesta | 53 |
| 5.2 Parannusmahdollisuuksia ja mahdollisia lisätutkimuksia | 55 |
| Viitteet | 58 |

Johdanto

IUPAC eli International Union of Pure and Applied Chemistry luokittelee huokokset niiden halkaisijan mukaan kolmeen eri luokkaan seuraavan taulukon I mukaisesti. Huokosten halkaisijalla ja muodolla on merkitystä huokoisen piin eri sovelluksissa [1, 2].

Taulukko I. Huokosten kokoluokat [2].

| Kokoluokka | huokosten halkaisija [nm] |
|---------------|---------------------------|
| Mikrohuokonen | ≤ 2 |
| Mesohuokonen | 2-50 |
| Makrohuokonen | >50 |

Huokoista piitä on tutkittu viime vuosina hyvin paljon etenkin lääketieteen sovelluksissa. Mesohuokoisen piin on havaittu olevan hyvin bioyhteensopiva. Kehoon joutuessaan huokoinen pii liukenee ja ajan kanssa poistuu vaarattomasti virtsan mukana [3–6]. Huokoinen pii voidaan ladata halutuilla lääkeaineilla, minkä jälkeen pintakemian käsittelyillä ja partikkelien päällystämällä voidaan nanokoluokan lääkekuljetin manipuloida kulkeutumaan kehossa halutulle alueelle. Partikkeli pääsee soluun sisälle, mutta solu tunnistaa sen ulkopuoliseksi ja muodostaa partikkelin ympärille solukalvosta rakkulan. Tämä rakkula, eli endosomi, estää lääkeaineen vapautumisen solulimaan estäen lääkkeen vaikutuksen. Tästä johtuen endosomirakkulan kalvon hajottamista on tutkittu runsaasti. Rakkulan kalvoraikentamiseen on kehitetty useita eri tapoja, joista yksi perustuu pH-bufferointiin. Tässä menetelmässä rakkulan sisään työntyy vettä ja kloridi-ioneja pH-bufferoinnista johtuvan H^+ -ionin ylimäärän aiheuttaman suolaepätasapainon vuoksi. Vedestä syntyvä osmoottinen paine aiheuttaa endosomirakkulan hajoamisen. Menetelmässä käytetty pH-bufferointi saadaan yleensä aikaan päällystämällä partikkeli bufferoivalla polymeerillä [7]. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää vaihtoehtois-

ta menetelmää endosomirakkulan rakenteen rikkomiseen. Vaihtoehtoisessa menetelmässä piihiukkasen huokosiin ladataan kehossa vähemmän esiintyviä ioneja kuten Mg^{2+} ja Ca^{2+} .

Menetelmän toimintahypoteesi perustuu huokosista vapautuneiden ionien aiheuttamaan konsentraatioeroon solulimaan nähden. Konsentraatioerosta johtuva ionien epätasapaino ja veden osmoottinen paine aiheuttaisi veden ja kloridi-ionien työntymisen endosomiin mahdollisesti hajottaen rakkulan rakenteen.

Tutkimuksessa keskitytään mahdollisen vaihtoehtoisen menetelmän periaatteen tutkimiseen ja tutkitaan yksinkertaisuuden vuoksi vain $MgCl_2$ -suolan latautumista ja vapautumista huokosista. Termisesti karbidoidut P*Si*-hiukkaset ladataan suolalla ja hiukkaset päällystetään asetyloidylla dextraanilla. Asetyloitua dextraania on käytetty monissa tutkimuksissa päällystysaineena sen ominaisuuksien vuoksi [8]. Asetyloitu dextraani hajoaa vesiliukoiseksi dextraaniksi happamammissa liuksissa, mutta ei neutraalissa [9, 10]. Tämän vuoksi asetyloidulla dextraanilla päällystettyjen partikkelien on teoriassa mahdollista kulkeutua pH-arvoltaan lähellä neutraalia olevassa veressä ilman latautuneiden aineiden vapautumista, samaan aikaan tehden mahdolliseksi ladattujen aineiden vapautumisen matalassa pH-arvossa kuten endosomeissa. Suolan vapautuminen endosomiin ja sen mahdollisen hajoamisen havaitseminen solututkimuksissa on vaihtoehtoisen menetelmän toimintahypoteesin tutkimisen seuraava askel.

1 Huokoinen pii

Lääketieteellisissä diagnosoinneissa ja hoidoissa käytettäviin monitoimisiin nanopartikkeleihin kohdistuva mielenkiinto on kasvanut huomattavasti viime vuosina [11–15]. Mielenkiinnon nousun vuoksi mikro- ja nanopartikkeleiden valmistus- ja karakterisointimenetelmiä on myös kehitetty huomattavasti. Varsinkin lääketieteessä tavanomaisesti käytettäviin materiaaleihin verrattuna mikro- ja nanoteknologia on pärjännyt hyvin [16].

Tutkimuksessa käytetty huokoinen pii (PSi) voi nanokokoluokassa toimia monipuolisena alustana diagnosointi- ja hoitomenetelmissä. PSi voidaan valmistaa yhteensopivaksi monipuolisten kuvantamismenetelmien kanssa ja siitä valmistettuihin nanopartikkeleihin voidaan ladata huomattavia määriä jopa useaa eri lääkeainetta samanaikaisesti. Piihiukkasten huokoisuudesta johtuva suuri pinta-ala ja vapaa tilavuus mahdollistaa lääkeaineiden lataamisen muun muassa upottamalla hiukkaset lääkeainetta sisältävään liuokseen tai liittämällä lääkeaineet hiukkasen rakenteeseen kemiallisella konjugaatioreaktiolla [17–24].

Huokoisesta piistä valmistetuilla nanokokoisilla hiukkasilla on havaittu olevan monia haluttuja ominaisuuksia varsinkin biolääketieteen kannalta. Materiaalin on havaittu olevan lääkeaineen kuljetuksen kannalta turvallinen, bioyhteensopiva ja biohajoava [1, 4, 5, 25–31] sekä pystyvän vaikuttamaan pintakemiallaan lääkeaineiden vapautumisnopeuteen ja päätekohteeseen kehossa. Nanokokoisten huokoisten piihiukkasten pintakemian muokattavuus onkin yksi lääketieteellisen tekniikan kannalta mielenkiintoisimpia ominaisuuksia. Eri pintakemiat mahdollistavat lääkeaineen vapautusmäärän, -tavan ja nopeuden säätämisen halutuksi, minkä vuoksi myös haastavat lääkeaineet saadaan ladattua huokosiin tai adsorboitumaan hiukkasen pintaan [1, 16, 22, 25, 31–34].

1.1 Huokoisen piin lyhyt historia

Huokoinen pii on materiaalina ja ilmiönä vanha. Ensimmäisen kerran huokoista piitä havaittiin Uhlirin pariskunnan 1956 tehdyissä kokeissa [35], joissa tarkoituksena oli tutkia piin rakenteen muokkaamista elektrolyyttisellä anodisoinnilla. Uhlirit havaitsivat piin pinnalle muodostuvan tumman kerroksen, jonka epäilivät olevan piin oksidia, mutta eivät huomanneet sen huokoisuutta. Huokoisuutta alettiin epäilemään ensimmäisen kerran kaksi vuotta myöhemmin, kun Turner huomasi edellämämainitun mustan kerroksen lähtevän irti piin anodisointivirran kasvaessa tietyn raja-arvon yli [36]. Seuraavan kymmenen vuoden ajan tutkittiin saman tumman kalvon erilaisia valmistusmenetelmiä. Näitä menetelmiä olivat muun muassa piin syövyttäminen vetyfluoridihapon (HF) ja typpihapon (HNO_3) vesiliuoksissa ja anodinen hapetus. Ensimmäisen kerran huokoisen piin tutkimus sai lisäpontta Watanaben tutkimusryhmän varmistettua tumman kerroksen huokoisuus vuonna 1971 [37]. Tällöin tutkimuksen pääpaino oli vielä elektroniikan eristemateriaalina [38].

Huokoisen piin tutkimusta kasvatti huomattavasti Leigh Canham 1990-luvulla. Canham havaitsi huokoisuuden aiheuttavan fotoluminesenssia huoneenlämmössä. Ilmiön havaitseminen lisäsi tutkimusta huokoiseen piihin ja vuonna 1995 Canham löysi ensimmäisiä viitteitä huokoisen piin bioyhteesopivuudesta [6]. Bioyhteesopivuus avasi huokoiselle pille tien lääketieteellisiin sovelluksiin ja siten entistäkin laajempaan tutkimukseen.

1.2 Valmistus

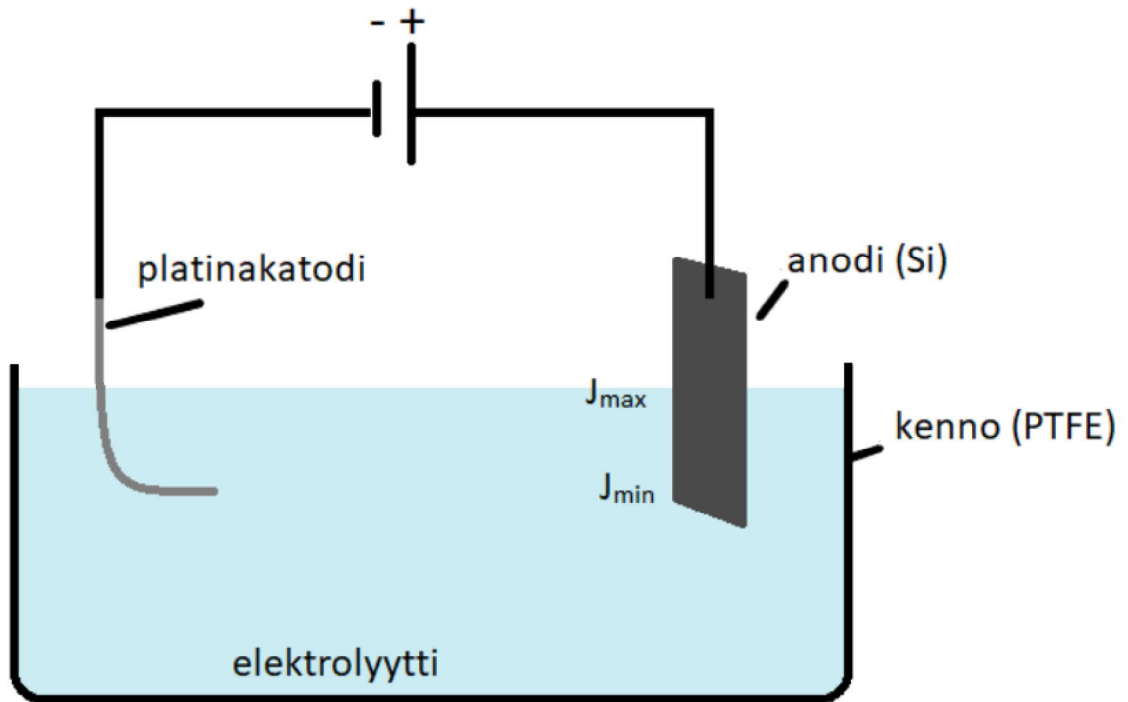
Puhtaasta piistä voidaan valmistaa huokoisia nanopartikkeleita hyvin monella eri tavalla, mutta selvästi yleisin ja tässäkin tutkimuksessa käytetty menetelmä on sähkökemiallinen syövytys anodisoimalla piisubstraattia vetyfluoridihapon (HF) vesi-etanoliliuoksessa. Muita tapoja ovat muun muassa höyrösyövytys, laseravusteinen syövytys, kemiallinen syövytys, metalliavusteinen syövytys ja plasmasyövytys [1, 3,

5, 16, 25]. Eri valmistusmenetelmissä pitää hallita monia olosuhteita ja parametreja hyvin tarkkaan. Mahdollisia parametreja ovat lämpötila, piikiekon ominaisuudet, valoisuus, syövytysaika ja ultraäänen käyttö. Näiden parametrien ja olosuhteiden tarkka hallinta mahdollistaa myös valmistetun huokoisen piin ominaisuuksien, kuten huokosten koon, muodon ja huokoisuuden, tarkan muokkauksen halutunlaisiksi. Lääketieteellisissä sovelluksissa käytetyt piihiukkaset ovat yleensä mesohuokoisia eli 2-50 nm suuruusluokassa (taulukko I) ja huokoisuus 53-77 % [23, 39]. Nämä ominaisuudet ovat monien parametrien muokattavuudella hyvin saavutettavissa [16, 21, 22, 24, 25, 30, 32, 40–44].

Syövytyksen jälkeen piikalvojen pinta on vetyterminoitunutta ja siten reaktiivista. Pinta stabiloidaan käyttötarkoituksen mukaan vaihtuvalla menetelmällä, kuten karbidoinnilla [32, 45], yksinkertaisella oksidoinnilla [40, 42] tai tarkemmin erikoistuneilla pintakemioilla [43]. Pinnan stabiloinnin eli passivoinnin jälkeen kalvot jauhetaan nanokokoluokan hiukkasiksi. Viimeisessä vaiheessa sentrifuugin avulla kontrolloidaan hiukkasten lopullinen kokojakauma [16].

1.2.1 Sähkökemiallinen syövytys anodisoimalla

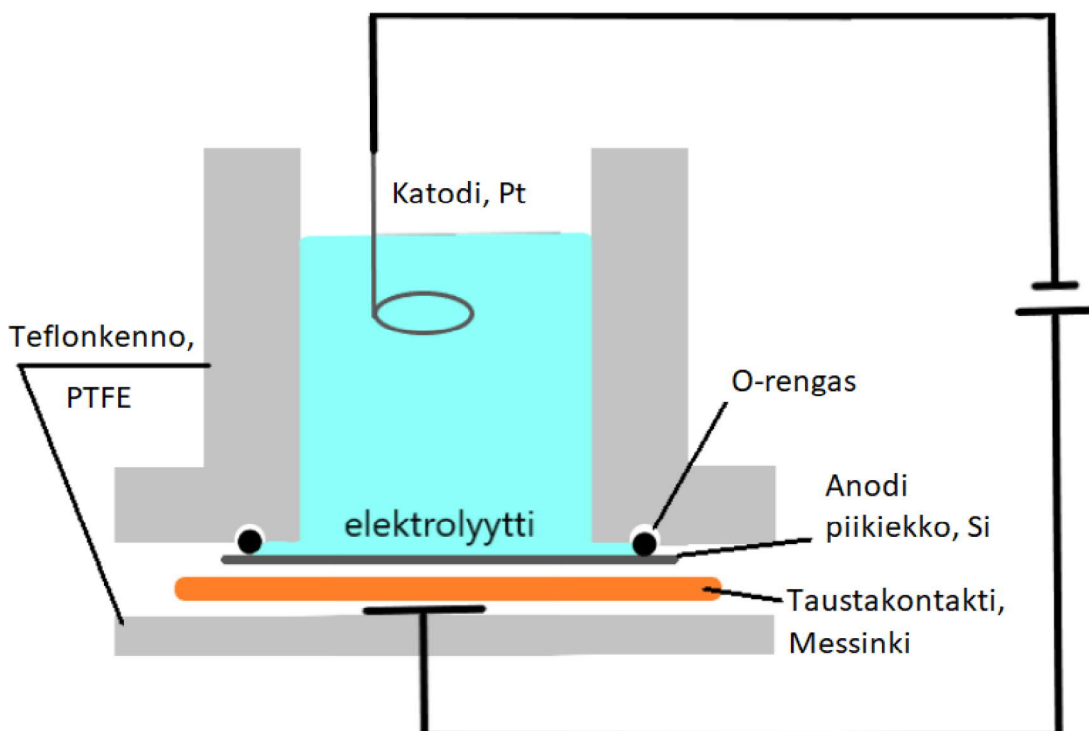
Sähkökemiallisella syövytyksellä anodisoimalla tarkoitetaan piin anodisointia HF-elektrolyytissä joko tasaisen tai väliajoin vaihtuvan virtatiheyden avulla. Tasaisella virralla saadaan aikaan yksi tasalaatuinen ohut kerros huokoista piitä. Vaihtamalla virran arvoa jaksoittain saadaan huokoiseen piikerrokseen aiheutettua herkästi murtuvia korkean huokoisuuden alueita, millä saadaan vaikutettua hiukkasten kokojakaumaan [16, 22, 46]. Vakiovirran eli galvanostaattisen syövytyksen sijaan voidaan myös käyttää vakiojännitettä, jolloin käytetään käsitettä potentiostaattinen syövytys. Näistä edeltävä on toistettavuutensa vuoksi suositumpi. Anodisointiin käytetään siihen suuuniteltua anodisointikennoa, joita on kolmea perustyyppiä.



Kuva 1. Yksinkertaisen syövytyskennon kaaviokuva ja elektrolyytin syvyydestä johtuva jännitehäviön maksimi ja minimi J_{\max} ja J_{\min} .

Yksinkertaisimmassa kennossa anodina toimiva piisubstraatti on kennossa kuvan 1 mukaisesti pystysuorassa osittain upotettuna elektrolyyttiin. Piisubstraatin upottaminen elektrolyyttiin aiheuttaa syöymistä jokaisella elektrolyyttiin kosketuksissa olevalla pinnalla, mutta syöyminen ei ole tasaista. Elektrolyytin syvyydestä johtuva kasvava jännitehäviö aiheuttaa substraatin pinnassa virtatiheyden pienenemisen ja siten substraatin pinnan kalvoo syntyy huokoisuuden ja paksuuden gradientteja. Gradientteja voidaan pienentää käyttämällä matalaa upotussyvyyttä, mutta homogeenisen huokoisen piin kalvon valmistukseen suositumpi kennotyyppe on yksikammioinen syövytyskenno, jonka rakenne on esitetty kuvassa 2.

Yksikammioisessa kennossa piisubstraattina voi toimia kokonainen piikiekkö, joka on kosketuksissa elektrolyyttiin vain toiselta puolelta. Koska piisubstraatti on elektrolyyttiin nähden vakiosyvyydellä, saadaan tällä kennorakenteella hyvin homogeeninen huokoisuus ja kalvon paksuus. Toispuolinen kosketus elektrolyyttiin mahdollistaa myös metallisen taustakontaktin käytön. Taustakontakti voi olla esimer-



Kuva 2. Yksikammioisen syövytyskennon kaaviokuva

kiksi alumiinia, mutta tässäkin tutkimuksessa käytetyn kennorakentaan taustana käytettiin messinkistä levyä. Taustakontakti mahdollistaa tasaisen sähkökentän syntymisen katodin ja anodin välille, kun piikiekon ja kontaktin pinnat ovat puhtaita ja tasaisia. Tässä rakenteessa on käytön suosiosta huolimatta ongelmina muun muassa teflonkennon tiivistäminen HF-elektrolyytin vuotojen estämiseksi. Elektrolyytin vuotaessa tiivisteen ohi, se voi aiheuttaa vahinkoja myös taustakontaktiin.

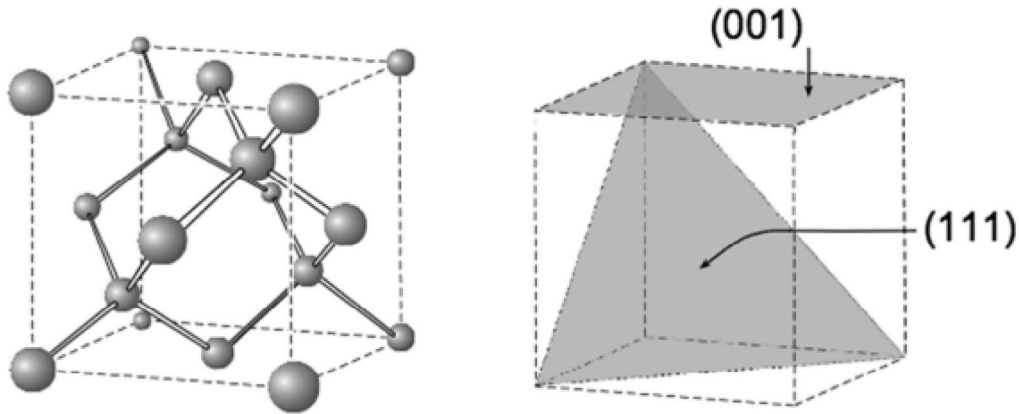
Kolmas kennotyyppi on kaksikammioinen kenno, jossa piilevy erottaa kammiot toisistaan toimien sekä anodina, että katodina. HF-elektrolyytin kierrättäminen mahdollistaa tasaisen konsentraation ja siten tasaisen syöpymisen. Osittain tähän vaikuttaa myös molemminpuolinen elektrolyyttinen sähkökontakti.

1.2.2 Huokosten muodostuminen ja rakenne

Huokosten rakennetta ja kokoa hallitaan virtatiheydellä, piikiekon hilarakenteen suunnalla ja vetyfluorihappo (HF) elektrolyytin konsentraatiolla [47]. Näitä pa-

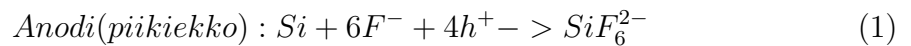
rametreja muuttamalla voidaan valmistaa kooltaan yhdestä nanometristä muutama mikrometriin olevia huokosia. Huokosten muodostumisen kannalta tärkeä ominaisuus on valmistuspohjana käytetyn piikiekon douppaustyyppi. Piikiekon douppaus aiheuttaa tietyn varauksenkuljettajan ylimäärän, kun taas douppaamattomassa piikiekossa on molempia varauksenkuljettajia saman verran. Douppaustyyppit voidaan jakaa varauksenkuljettajan tyyppin ja konsentraation mukaan neljään luokkaan: n-tyyppi, konsentroitunut n-tyyppi, p-tyyppi ja konsentroitunut p-tyyppi. Näissä ”n” viittaa negatiiviseen varauksenkuljettajaan ja ”p” positiiviseen, eli elektroniin ja positiiviseen aukkoon puolijohteessa. Douppaustyyppi vaikuttaa huokosten muodostumismekanismiin, valoherkkyyteen ja kokoon. N-tyypin piikiekkoja käytettäessä on syövyttämisen aikana prosessia valaistava, jotta piin pintaan muodostuu riittävästi varauksenkuljettajina toimivia virittyneitä aukkoja. P-tyypin kiekkoja ei tarvitse valaista, mutta valolla voidaan suurentaa huokosia syövytyksen jälkeen [3, 25]. Konsentroiduissa douppaustyypeissä piikiekon johtavuus kasvaa ja on lähempänä metallia kuin puolijohdetta [2].

Piikiekon hilarakenteen suunta vaikuttaa huokosten muodostussuuntaan. Hilasuunta $\langle 100 \rangle$ viittaa piikiekon hilarakenteen Miller indekseihin. Kuvassa 3 on esitetty piin hilayksikkö. Millerin indeksit määrittelevät hilayksikön tasosuunnat kolminumeroisilla sarjoilla, jotka muodostuvat käänteisesti halutun tason x,y,z-akselien leikkauspisteistä. Täten tason Miller-indeksien ollessa $\langle 111 \rangle$ taso leikkaa akselit koordinaattipisteessä (1,1,1), jolloin Miller-indeksit olisivat $1/x$, $1/y$, $1/z$ eli (111). Äärettömyyden käänteisarvona käytetään sovitusti arvoa 0, mistä johtuen akselin suuntaisesti kulkevan tason Miller-indeksit ovat akselista riippuen $\langle 100 \rangle$, $\langle 010 \rangle$ tai $\langle 001 \rangle$. Käytännöllisyyden vuoksi näistä kaikista käytetään merkintää $\langle 100 \rangle$. Käytännössä piikiekon hilasuunta kertoo mihin suuntaan kyseinen kiekko on kiillotettu. Hilasuunta $\langle 100 \rangle$ aiheuttaa huokosten muodostumisen kohtisuoraan pintaa kohden.



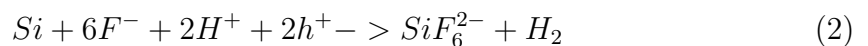
Kuva 3. Piin hilayksikkö ja kaksi tärkeintä hilasuuntaa Miller-indekseineen. Katkoviivalla erotetut tasot kuvaavat (100) hilasuuntia ja diagonaalit (111) suuntia. Muokattu lähteestä [2]

Sähkökemiallisessa syövytyksessä tapahtuvat reaktiot voidaan jakaa pääosin kahteen: neljän elektronin hapetusreaktioon ja kahden elektronin hapetusreaktioon. Hapettajina reaktiossa käsitellään piin valenssivyöllä olevia aukkoja (h^+). Seuraavassa kaavassa 1 esitetään piikiekolla (anodilla) tapahtuva hapettumisen puolireaktio. Tämän lisäksi samanaikaisesti platinakatodilla tapahtuu elektroneja kuluttava pelkistymisen puolireaktio, mikä on yleensä veden pelkistyminen vetykaasuksi.

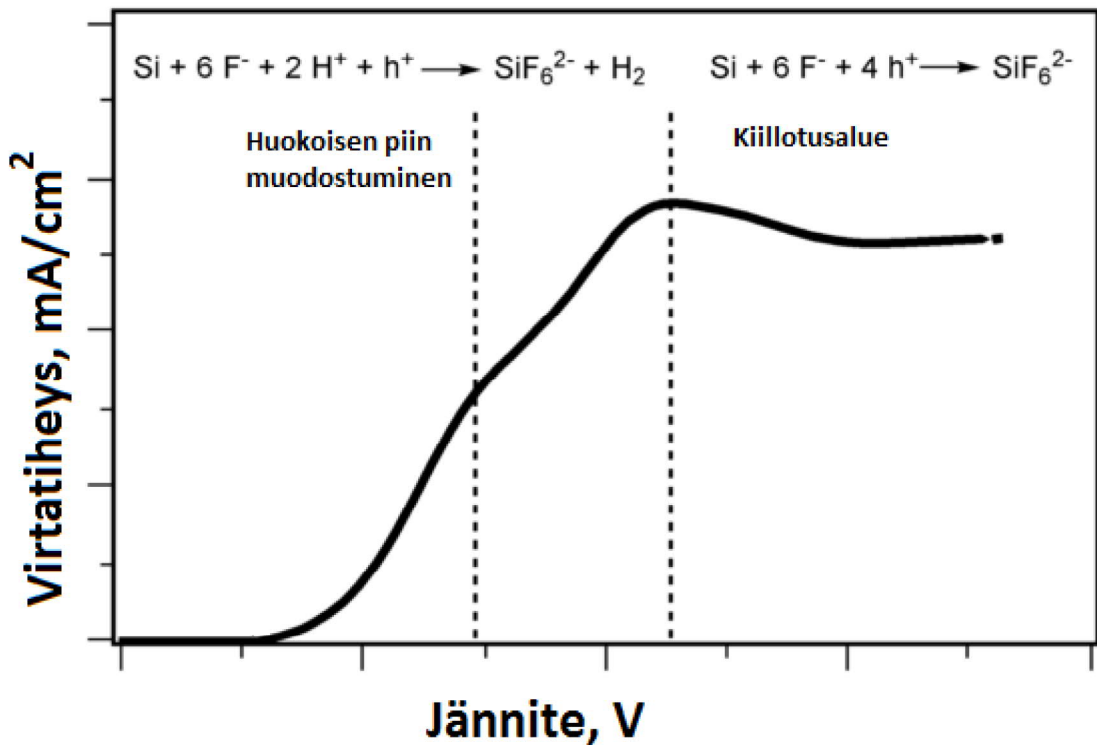


Puolireaktio 1 on piin pääasiallinen hapetusreaktio, kun laitteistoon syötetty jännite ja virtatiheys on niin kutsutulla ”kiillotus” alueella. Tällöin ei muodostu huokoista piitä vaan reagoiva alue liukenee elektrolyyttiin kokonaan. Puolireaktion 1 mukaisten yhdisteiden lisäksi liuoksessa esiintyy myös muita piin ja vetyfluorihapon yhdisteitä, kuten SiF_2 , SiF_4 . Muut yhdisteet ovat kuitenkin vähäisiä pääasialliseen reaktioon nähden.

Huokoista piitä muodostuu pääasiallisesti kahden elektronin hapettumisreaktiossa 2, joka on pääasiallinen piin hapettumisreaktio pienemmällä jännitteellä ja virtatiheydellä kuin kiillotusalue.



Kuvassa 4 näkyy kuinka virran kasvaessa jännitteen funktiona, syövytyksessä tapahtuva pääasiallinen reaktio vaihtuu huokoista piitä muodostavasta reaktiosta 2 kiillottavaan reaktioon 1.



Kuva 4. Tavanomainen jännite/virtatiheys kuvaaja sähkökemiallisessa syövytyksessä HF-elektrolyytissä. Kuva muokattu lähteestä [2]

Syövytyksen aikana virta kulkee huokosten pohjasta eikä aiheuta muutoksia jo syntyneiden huokosten rakenteeseen. Passivoituneiden huokosseinämien vuoksi hapettuminen tapahtuu pääasiallisesti huokoisen piin ja hilarakenteellisen piin kohtaamis-pinnassa.

Kasvavan huokoskerroksen huokoisuus on verrannollinen syötettyyn virtatiheyteen ja on yleensä 40-80 % välillä. Vaikka jo muodostuneiden huokosten rakenteeseen ei pysty pääasiallisesti syövytystilanteessa vaikuttamaan, voidaan virtaa muuttamalla vaikuttaa muodostuvan kerroksen huokoisuuteen. Suuri virtatiheys aiheuttaa suuremmat huokokset, mikä on lääkkeiden latauksessa hyödyllistä. Huokosten koon ja huokoisuuden hallinnalla vaikutetaan myös piirakenteen liukenemisominaisuuks-

siin vesiliuoksissa. Virtatiheyden kiillotusalueita käytetään syövytyksen jälkeisessä nanokalvojen irrotuspulssissa. Irrotuspulssi aiheutetaan joko kasvattamalla virtatiheyttä tai vaihtamalla elektrolyytti matalampaan HF-konsentraatioon. Kiillotusalueella piirakenteen hapettumisreaktio siirtyy puolireaktiosta 2 puolireaktioon 1 ja huokoisen piin kalvo irtoaa, kun reagoiva osuus liukenee elektrolyyttiin [1, 2].

1.2.3 Pintakemian stabilointi

Kuten aiemmin mainittiin, huokoisen piin pinta on valmistuksen jälkeen vetyterminoitunutta ($\text{Si} - \text{H}_x$, $x = 1 - 3$) ja reaktiivista. Tämän vuoksi piin pinta on muokattavissa eri menetelmin. Pintakemian stabilointi eli passivointi estää lääketieteellisissä sovelluksissa mahdollisesti käytettävien ladattavien lääkeaineiden ei-haluttuja reaktioita $\text{Si} - \text{H}_x$ ryhmien kanssa [45, 48]. PSi:n pintakemiaa voidaan muokata joko ennen tai jälkeen jauhannon ja kokokontrollin. Kemiallinen pintakemian stabilointi voidaan aiheuttaa myös piihiukkasten reaktioilla dispersanttiliuoksen kanssa. Stabiileja pintakemioita ovat muun muassa termisesti oksidoitu (TO), termisesti hydrokarbidoitu (THC) ja termisesti karbidoitu (TC) pinta. Stabiileja pintakemioita on kehitetty myös jatkokäsittelmällä edellämainittuja pintakemioita orgaanisilla yhdisteillä, kuten käsittelemällä THC:tä undekyleenihapolla (UnTHC) tai APSTC:n tapauksessa käsittelemällä TC-partikkelit 3-aminopropyli triethoxysilaanilla. Stabiloimaton pintakemia oksidoiduu ilmassa olevan kosteuden vaikutuksesta ajan myötä ja pintaan muodostuu natiivi oksidikerros [16].

Natiivin oksidikerroksen muodostuminen vie kuitenkin aikaa ja on hallitsematonta, minkä vuoksi se ei ole luotettava stabilointimenetelmä [25]. Hallittu ja luotettava oksidikerros saadaan aikaan kemiallisesti, sähkökemiallisesti tai termisesti. Termisesti oksidoitu pii (TOPSi) valmistetaan pitämällä huokoisen piin kalvoja ennaltasäädetyssä lämpötilassa tietty aika. Tämä lämpötila riippuu halutun oksidaation laajuudesta [48]. Oksidointi aiheuttaa pinnan muuttumisen hydrofobisesta hydro-

filiseksi. Hydrofiilisen pinnan on havaittu auttavan nanorakenteeseen adsorboituneiden lääkeaineiden irtoamista lääkeainekuljetukseen kohdistuvissa tutkimuksissa [16, 22]. Pinnan hallittu oksidoituminen mahdollistaa myös huokoisen piin fysiologisen liukenemisnopeuden hallinnan [16].

Termisesti hydrokarbidoidun (THC) ja termisesti karbidoidun (TC) pintakemian muodostamisessa käytetään asetyleenia. Asetyleeniä voidaan syöttää laitteistoon jatkuvasti karbidoinnin tapahtuessa matalammassa lämpötilassa kuin asetyleenin hajoamislämpötila (400-650°C). Tällä saavutetaan suuri vaikutuspinta-ala, koska suuri osa pinnasta desorptoituvista vedyistä korvautuu asetyleenimolekyyleillä kovalenttisesti. Pintaan muodostuu täten hydrofobinen CH_x -terminoitunut stabiili pinta. Näin stabiloitu huokoinen pii on THCPSi (thermally hydrocarbonized porous silicon). THC- pintakemia on vakaudestaan huolimatta hyvin muokattavissa. Jatkaessa karbidointia asetyleenin hajoamislämpötilaa korkeammilla lämpötiloilla ($> 650^\circ\text{C}$) saadaan aikaan uusi stabiili pintakemia. Korkea lämpötila saa piirakenteisiin kiinnittyneen asetyleenin hajoamaan desorptoitumisen sijaan. Tällöin myös piirakenne uudelleenjärjestyy ja hajonneet asetyleenimolekyylit absorboituvat piirakenteeseen muodostaen SiC-kerroksen huokosten seinäpintojen alle. Karbidikerroksen päälle muodostuu ohut oksidikerros (SiO), minkä vuoksi termisesti karbidoitu huokoinen pii (TCPSi) on hyvin vakaa ja termisesti oksidoidun piin (TOPSi) tapaan hydrofiilinen [16, 43, 49, 50].

1.3 Huokoisen piin käyttö lääkekuljettimena

PSi-hiukkasten fysiologisesta yhteensopivuudesta ja bioturvallisuudesta on tehty useita tutkimuksia ja sen on havaittu olevan pääosin turvallinen [46, 51, 52]. Mesohuokoisia piihiukkasia käytetään lääkesovelluksissa niiden bioyhteensopivuuden, biohajoavuuden, myrkyttömyytensä, muokattavuuden ja kohtalaisen liukoisuutensa vuoksi [4, 5, 16, 22–28, 28, 30, 46]. Huokoisen piin biohajoavuuteen vaikuttaa

partikkelien huokoisuus, huokoisten koko ja pintakemia [3, 25]. Muokattavuudellaan huokoinen pii antaa mahdollisuuden kuljettaa kemiallisilta ominaisuuksiltaan eriäviä lääkkeitä haluttuun paikkaan. Huokoisten koon ja pintakemian hallinnalla voidaan puolestaan valmistaa helposti ladattavia hiukkasia, joiden latauksen vapautumisai-
kaa ja -tapaa voidaan muokata.

1.3.1 Huokoisen piin bioyhteensopivuus

Bioyhteensopivuudella tarkoitetaan materiaalin kykyä pysyä ihmiskehossa ilman haittavaikutuksia. Huokoisen piin hyvä bioyhteensopivuus selittyy osittain sen biohajoavuudella. PSi-hiukkaset hajoavat ihmiskehossa suurimmaksi osaksi ihmisen soluille harmittomaksi piihapoksi ($\text{Si}(\text{OH})_4$) ja poistuu kehosta virtsan mukana [4, 16, 26, 32, 46]. Eri pintakemioilla on toisistaan eroavat vaikutukset kehossa bioyhteensopivuudestaan huolimatta. Muun muassa Ferreira et al. havaitsi tutkimuksessaan [53] THCPSi:n ja TOPSi:n molempien olevan bioyhteensopivia in vivo testeissä, mutta pintakemioiden aiheuttamien tulehdusarvojen eroavan toisistaan. THCPSi aiheutti huomattavasti suuremman vasteen.

Huokosen piin bioturvallisuus riippuu vahvasti sen pintakemiasta. Pintakemian ominaisuuksista tärkeimpiä bioyhteensopivuuden kannalta ovat sen varaus ja hydrofiilisyy/fobisuus. Shahbazi et al. havaitsi tutkimuksissaan [29] ensisijaisesti partikkelin pintavarauksen vaikuttavan sen sytotoksisuuteen eli solumyrkyllisyyteen. Samankaltaisten varausten pintakemioilla seuraavaksi vaikuttavin ominaisuus oli kuinka hydrofiilinen se on. Hydrofiilisempi partikkeli oli hydrofobista turvallisempi. Tutkimuksessa päädyttiin että hydrofiiliset ja negatiivisesti varautuneet TOPSi ja TCP-Si olivat vähiten sytotoksisia kun taas positiivisesti varautunut APTSPSi havaittiin aiheuttavan huomattavaa vahinkoa soluille. Myös UnTHCPSi:n ja THCPSi:n havaittiin olevan TOPSi:a ja TCPSi:tä sytotoksisempia.

1.3.2 Lääkkeiden lataus ja vapautuminen

Huokoisen piin laaja valikoima valmistus- ja muokkausmenetelmiä mahdollistaa monipuolisen käytön erilaisten lääkkeiden kuljettimina. Lääkkeiden lataustehokkuuteen ja myös lääkkeen vapautumisnopeuteen ja tapaan vaikuttaa nanokokoisten huokoisen piin hiukkasten huokoisuus, huokoisten koko ja pintakemian lisäksi itse lääkkeen mahdolliset fysiokemialliset ominaisuudet. Näiden lisäksi vaikutusta on myös lääkkeen vapautumisen tapahtumapaikalla.

Lääkkeiden lataus tapahtuu yleisesti kapillaari-ilmioon perustuen upottamalla huoneenlämpötilassa P*Si* hiukkaset lääkeainetta sisältävään liuokseen. Upottamalla hiukkaset konsentroituun lääkeaineliuokseen, saadaan lääkemolekyylit joko adsorboitumaan hiukkasten pintaan tai loukkuun hiukkasten huokosiin kapillaari-ilmion avulla [1, 16, 25].

P*Si*-rakenteeseen ladattuna, normaalisti veteen huonoliukoisten lääkkeiden liukoisuuden on havaittu parantuvan, kun taas normaalisti hyvin liukoisten lääkeaineiden vapautumista on saatu P*Si*-rakenteella viivästettyä haluttaessa [25, 32]. P*Si* parantaa myös biologisten esteiden läpäisykykyä. Lääkeaine vapautuu P*Si*-huokosista diffuusion avulla tai itse P*Si*-rakenteen liuetessa pois, jolloin lääke jää jäljelle. P*Si*:n liukenemiseen vaikuttaa sen pintakemia ja ulkopuoliset olosuhteet kuten pH. Monien tutkimusten mukaan erilaisten lääkeaineiden liukeneminen kestää kauemmin puhtaana, kuin P*Si*-rakenteisiin ladattuna [21, 22, 40]. Huokosiin ladatun lääkeaineen parempi liukeneminen selittyy myös osittain sillä, että huokoisissa oleva rajallinen tila estää lääkeainetta muodostamasta hilarakennetta. Tämän sijaan lääkeaine pysyy amorfisessa muodossaan, minkä tiedetään liukenevan hilarakennetta paremmin [32, 33]. Muun muassa nanokokoluokan (170 nm)TOP*Si*- hiukkasten on havaittu parantavan lääkeaineiden kykyä läpäistä ihmisen suoliston epiteelisoluja [16, 32]. Lääkeaineiden vapautumisen kannalta ongelmallista on kuitenkin saada lääkeaine vapautumaan solun sisällä. Nanohiukkasten yleinen tie solun sisälle on endosytoosin

eli solusyönnin kautta, missä hiukkasen ympärille muodostuu solukalvon kaltainen vesikkeli eli rakkula. Tästä rakkulasta vapautumisesta käytetään kirjallisuudessa termiä ”endosomal escape” [34].

2 Solututkimus

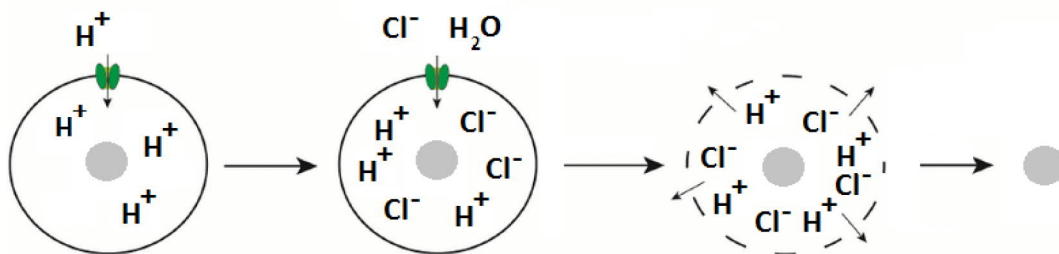
Nanohiukkasten lääketieteellinen tutkimus voidaan jakaa kahteen; in vitro (soluviljelmillä) ja in vivo (elävillä organismeilla) tapahtuviin tutkimuksiin. In vitro tutkimukset ovat pakollinen prosessi, jossa tutkitaan nanohiukkasten sytotoksisuutta ja biohyteensopivuutta yksittäisissä soluviljelmissä ennen in vivo tutkimuksiin siirtymistä. In vitro tutkimuksissa hyvin pärjääminen ei takaa lääkkeenkuljettajina toimineiden nanohiukkasten toimimista olosuhteiltaan vaihtuvassa oikeassa biologisessa ympäristössä. In vivo tutkimuksissa havaittavia ongelmakohtia ovat muun muassa nanohiukkasten ohjaaminen oikeaan paikkaan ja lääkkeen vapautuminen solun sisällä ennen kuin keho ehtii poistamaan tai hajottamaan kuljettajat. Nanohiukkasten takertuessa soluun, solulle ominainen reaktio on aloittaa endosytoosi eli solusyönti. Solusyönnissä solu muodostaa omasta solukalvostaan suojaavan rakkulan eli vesikkelin nanohiukkasen ympärille. Rakkula joko poistaa sisältönsä käänteisellä solusyönnillä tai kuljettaa sen muihin solun sisäisiin organelleihin kuten lysosomeihin, golgin laitteeseen tai mitokondrioon. Vesikkeli voi myös kehittyä endosomiksi tai lysosomiksi ja pyrkiä hajottamaan sisältämänsä partikkelin. Jotta nanohiukkasiin ladattu lääke pääsee vaikuttamaan solun sisällä, lääkkeenkuljettajan on vapauduttava rakkulasta. Rakkulan kehittyessä myöhäisvaiheen endosomiksi tai lysosomiksi, sen pH-arvo laskee nopeasti pH 6:sta pH 4:ään ja rakkulaan kulkeutuu hajottavia entsyymejä. Endosomista vapautumiseen on kehitetty useita eri menetelmiä ja reittejä [7, 34, 54–56].

2.1 Endosomal escape

Endosomirakkulasta vapautuminen on ongelma myös luonnossa esiintyville soluun-tunkeutujille kuten viruksille ja bakteereille. Viruksille ja bakteereille on kehittynyt omat tapansa häiritä endosomirakkulan solukalvoa ja päästä solulimaan [57–60]. Näitä luonnollisia tapoja tutkimalla on kehitetty lääkkeenkuljettajille vapautumis-menetelmiä endosomirakkulasta. Kehitettyjä menetelmiä ovat muun muassa: solu-kalvon kanssa yhdistyminen [55, 61–63], fotokemiallinen kalvon häirintä [64–71] ja pH-bufferointiin perustuva protonipumppu-menetelmä [34, 72–75].

Nanohiukkaset voidaan päällystää alhaisissa pH-arvoissa rakennettaan muuttavil-la synteettisillä peptideillä ja näin aiheuttaa häiriö tai yhdistyminen rakkulan kal-voon. Soluja voidaan altistaa valolle, mikä aiheuttaa endosomin kalvossa olevien valoherkkien molekyylien reagoimisen ja happiradikaalin muodostumisen. Happira-dikaalilla on lyhyt elinikä, joten se ehtii hajottamaan endosomin kalvon vahingoit-tamatta solun tai endosomin sisältöä. Bufferiominaisuudella varustetuilla polymeer-illä päällystetyt nanohiukkaset puolestaan vapautuvat rakkulasta protonipump-puefektiin perustuen. Näitä ja muita menetelmiä on kuvattu tarkemmin lähteissä [7, 34, 55, 61–79]. Tämän tutkimuksen kannalta tärkeintä on ymmärtää protoni-pumppuun perustuvan menetelmän toimintaperiaate.

2.1.1 Protonipumppumenetelmä



Kuva 5. Protonipumppumenetelmän kulku. H^+ ylimäärä aiheuttaa Cl^- -ionien ja veden lisääntymisen sekä endosomin turpoamisen ja puhkeamisen

Protonipumppumenetelmällä tarkoitetaan endolysosomalisen rakkulan hajoamista vapaiden protonien, kloridi-ionien ja veden aiheuttaman osmoottisen paineen aiheuttamana kuten kuvassa 5 havainnollistetaan. Endolysosomalisen rakkulan kehityessä, rakkulan pH-arvo laskee protonipumppujen (ATPases) pumppaamien H^+ -ionien takia. Yleensä protonipumppumenetelmällä toimiva rakkulasta vapautuminen aiheutetaan kationisilla polymeereillä, joilla on H^+ -ioneja bufferoiva vaikutus. Bufferoimalla pH-tasoa, protonipumput jatkavat toimintaansa ja neutraalin varauksen ylläpitämiseksi rakkulan kalvo päästää läpi kloridi-ioneja (Cl^-). Ionien lisääntyne määrä aiheuttaa puolestaan konsentraatioeron rakkulan kalvon eri puolilla, mistä johtuen rakkulaan tunkeutuu myös vettä ja rakkula hajoaa veden aiheuttamasta paineesta [7, 34, 72–75]. Funhoff havaitsi tutkimuksessaan [73], että matalassa pH:ssa bufferoivat polymeerit eivät aina edistäneet endosomista pakenemista toisin kuin oli yleisesti ajateltu. Protonipumppumenetelmän perimmäinen idea on aiheuttaa endosomiin osmoottinen paine suolaepätasapainolla, minkä vuoksi on mielenkiintoista tutkia voidaanko protonipumppumenetelmän mukainen vaikutus saada aikaiseksi muutenkin kuin bufferoivilla polymeereillä. Tässä tutkimuksessa selvitetään vaihtoehtoisen menetelmän perusteita. Uudessa menetelmässä tutkitaan voiko rakkulan hajoamisen aiheuttaa ainoastaan suolaepätasapainosta johtuvan osmoottisen paineen avulla ilman H^+ -ionien bufferointia. Suolaepätasapaino ja suuri konsentraatioero endosomin ja soluliman välille aiheutetaan lataamalla lääkeaineenkuljettajiin ihmiskehossa esiintyviä suoloja.

3 Kokeellinen tutkimus

Tutkimuksessa ladattiin termisesti karbidoidun mesohuokoisen piin nanopartikkeleiden huokosiin suurikonsentraatioista suolaliuosta ja selvitettiin suolan vapautumista elimistön endosomia vastaavassa pH-arvossa. Käytännössä tutkimuksissa käytettiin pH 3 suolahappoliuosta matalan pH:n liuoksena ja neutraalin pH 7:n liuos valmistet-

tiin ionipuhdistetusta vedestä ja kaliumhydroksidistä (KOH) pH-mittarilla. Neutraalin pH:n liuosta käytettiin huuhteluissa, jotta asetyloitu dextraani ei hajoaisi dextraaniksi ja liukenisi ennen matalan pH:n mittaliuosta. Tutkimuksissa käytettiin endosomin fysiologista pH:ta alemmaa pH arvoa varmistamaan tarpeeksi hapan liuos asetyloidun dextraanin (AcDEX) hajoamiseksi ja dextraanin liukenemiseksi. Suolalatauksen väkevä latausliuos valmistettiin VWR:n valmistamasta magnesiumin kloridisuolasta ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Käytetyn suolan valmistuserä oli 10H130010. Suolaliuoksen konsentraatio pyrittiin pitämään suurena, mutta alle kylläisen liuoksen, suolan kiteytymisen estämiseksi. Vapautumistutkimuksessa valmistetut näytteet dispergoitiin 10 ml pH 3 HCl-liuokseen ja vapautuneen suolan määrää arvioitiin liuosten johtavuuden muutoksista. Mittausliuoksen TCPSi-konsentraatioksi päätettiin 0,100 mg/ml. Matalaan TC-konsentraatioon päädyttiin bioyhteensopivuuden lisäksi mahdollisen TC-partikkeleista johtuvan johtavuuden muutoksen minimoimiseksi. Korkeampi partikkelikonsentraatio vaikuttaisi myös AcDEX-päällystyksen määrään ja kasvattaisi mahdollista hajoamisesta johtuvaa pH-vastetta. Liuosten tarkemmat parametrit esitetään myöhemmässä luvussa.

Tutkimuksessa käytettiin termisesti karbidoitua piitä sen hydrofilisyyden ja bioyhteensopivuuden vuoksi solututkimuksia silmällä pitäen. Tähän tarkoitukseen olisi sopinut bioyhteensopivuutensa puolesta osittain myös termisesti oksidoitu pii (TOPSi), mutta TOPSi:sta happamassa liukeneva pii muodostaa ortosilikaattisuolaja (SiO_4^{2-}). Nämä suolat yhdistyvät tutkimuksessa käytetyn MgCl_2 -suolan Mg^{2+} kaltaisiin hapetusluvultaan II oleviin positiivisiin ioneihin sakkautuen. Sakkautuminen aiheuttaa huokosten täyttymistä ja siten sekä suolan että mahdollisten lääkeaineiden latautumisen estymisen [80].

3.1 Mesohuokoisen piin valmistus

Huokoisen piin valmistuksessa käytettiin Siegert-Waferin valmistamia booridoupattuja piikiekkkoja. Piikiekkot olivat tyypiltään prime-laatuluokan p+ kiekkoja, joiden kiteen orientaatio oli $< 100 >$. Siegertin ilmoittama resistiivisyys kiekkoille oli 0,01 - 0,02 Ωcm .

Piin sähkökemiallisessa anodisoinnissa käytettiin kuvan 2 mukaista laitteistoa. Elektrolyyttinä käytettiin 38 % -vetyfluorihapon (HF) ja etanolin 1:1 tilavuussuhteista liuosta. Piikiekkoon aiheutettiin suuren huokoisuuden alueita virtatiheydellä 50 mA/cm². Pienemmän hiukkaskoon takaamiseksi syövytyksessä vuoroteltiin huokoisen alueen lisäksi nelinkertaisella virtatiheydellä muodostettuja helposti murtuvia alueita. Anodisoinnin lopuksi kalvot irrotettiin nostamalla virtatiheys kiillotusalueelle kuten aiemmin esitettiin. Anodisoinnin jälkeen kalvot kuivatettiin HF-jäänteistä uunissa ja pintakemia stabiloitiin termisellä karbidoinnilla ennen jauhatusta.

Termisessä karbidoinnissa kalvot suljettiin kvartsiputkeen huoneenlämmössä typpihuuhteluun (1 l/min) 30 minuutiksi. Huuhtelun jälkeen typen lisäksi putkeen ohjattiin asetyleeniä (1 l/min) 15 minuutin ajan, minkä jälkeen putki sijoitettiin 503 °C:een uuniin 15 minuutiksi. Asetyleenisyöttö katkaistiin ja putken annettiin jäähtyä huoneenlämpöön 15 minuuttia, jonka jälkeen asetyleenisyöttö uusittiin 10 minuutiksi ennen kuin putki asetettiin uuniin 823 °C:een pelkällä typpisyötöllä 10 minuutiksi. Käsittelyn jälkeen kalvojen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön typpihuuhtelussa ennen jauhatusta.

3.1.1 Kokokontrolli ja partikkelien parametrit

Edellisessä kappaleessa mainitulla tavalla valmistetut TCPSi-kalvot jauhettiin planetaarisessa kuulamylyssä etanolissa. Kalvojen jauhatuksessa oli ensin 7 minuutin kestävä aktiivinen jauhatusvaihe, jonka jälkeen huomare jäähtyi 13 minuuttia ennen seuraavaa sykliä. Sykliä määrää asetettiin 40:neen, jolloin kokonaisaika jauhatukses-

sa oli 13 tuntia 20 minuuttia.

Jauhatuksen jälkeen TCPSi-partikkelien kokojakauma on hyvin laaja, minkä vuoksi partikkeleista seulottiin sopivan kokoiset partikkelit sentrifuugilla. Kokojakauma määritettiin Malvern Pananalyticalin Zetasizer laitteella käyttäen hyödyksi dynaamista valonsirontaa (DLS). Koon virheenä on käytetty laitteen määrittämää keskihajontaa. TCPSi-partikkelien huokosten huokostilavuus, ominaispinta-ala ja keskimääräinen halkaisija selvitettiin TriStar 3000 -typpiadsorptiolaitteistolla (Micromeritics). Kyseiset arvot määritettiin Brunauer-Emmett-Teller -menetelmällä saaduista isotermien desorptiokäyrästä. Huokosten tilavuus määritettiin yhdessä pisteessä suhteellisessa ilmanpaineessa 0,96 isotermin desorptiokäyrästä. Lopullisen etanoliin dispergoidun TCPSi-liuoksen parametrit ovat esitettynä taulukossa II. TCPSi-etanoliliuoksen konsentraatio määritettiin kuivaamalla ja punnitsemalla kolme 200 μl näytettä valmistettua liuosta. Näiden keskiarvoa käytetään liuoksen konsentraationa.

Taulukko II. Valmistetun TCPSi-ETOH-liuoksen parametrit

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Koko | 156,4 \pm 6,6 nm |
| Konsentraatio | 13,083 mg/ml |
| Huokostilavuus | 0,59 cm ³ /g |
| Ominaispinta-ala | 249,97 m ² /g |
| Huokosten halkaisija (4V/A) | 9,48 nm |

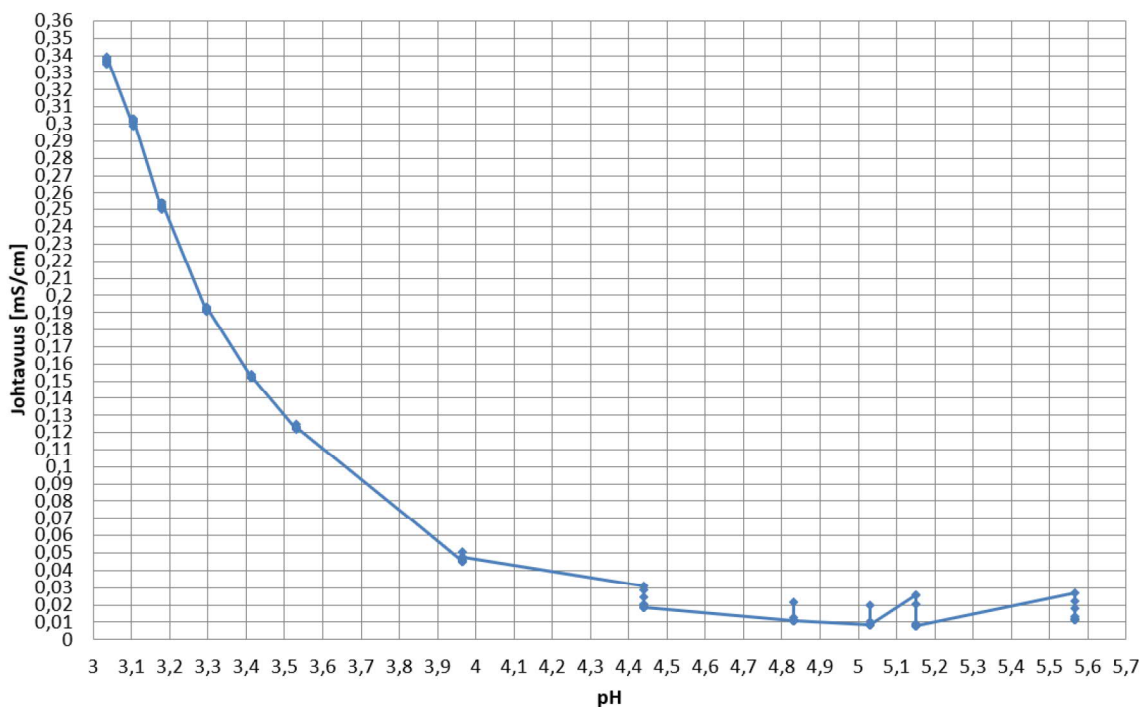
3.2 Kalibrointimittaukset

3.2.1 Johtavuuden pH-riippuvuus

Johtavuuden pH-riippuvuutta selvitettiin nostamalla pH 3 HCl-liuoksen pH-arvoa ionipuhdistetulla vedellä ja mittaamalla sekä uusi pH, että liuoksen johtavuus. Mit-

tauksissa käytetyn ionipuhdistetun veden pH:ksi havaittiin pH-mittarilla 5,645. Kalibraatiomittaus ei tämän vuoksi sisällä korkeampia pH-arvoja. Korkeamman pH-arvon aikaansaaminen vaatii emäksen, kuten kaliumhydroksidin (KOH), lisäämistä, jolloin positiivinen ioni (K^+) olisi vaikuttanut johtavuuden arvoon pH:n muutoksen lisäksi. Johtavuusmittaukset suoritettiin kymmenen mittauksen sarjoina sisäisen mittaustarkkuuden selvittämiseksi.

Mahdollisten pH:n muutosten vaikutus johtavuuden arvoon selviää kuvasta 6. Kuvasta näkyy kuinka johtavuus laskee jyrkästi alhaisessa pH:ssa, mutta vaikutus johtavuuteen pienenee pH-arvon noustessa neutraaliin päin. Kuvasta näkyy myös kuinka mittausten sisäinen tarkkuus pienenee huomattavasti korkeammassa pH-arvossa. Koska pH vaikuttaa johtavuuteen huomattavasti, pyrittiin näytteet valmistamaan matalalla konsentraatiolla minimoiden mahdollisia pH muutoksia.



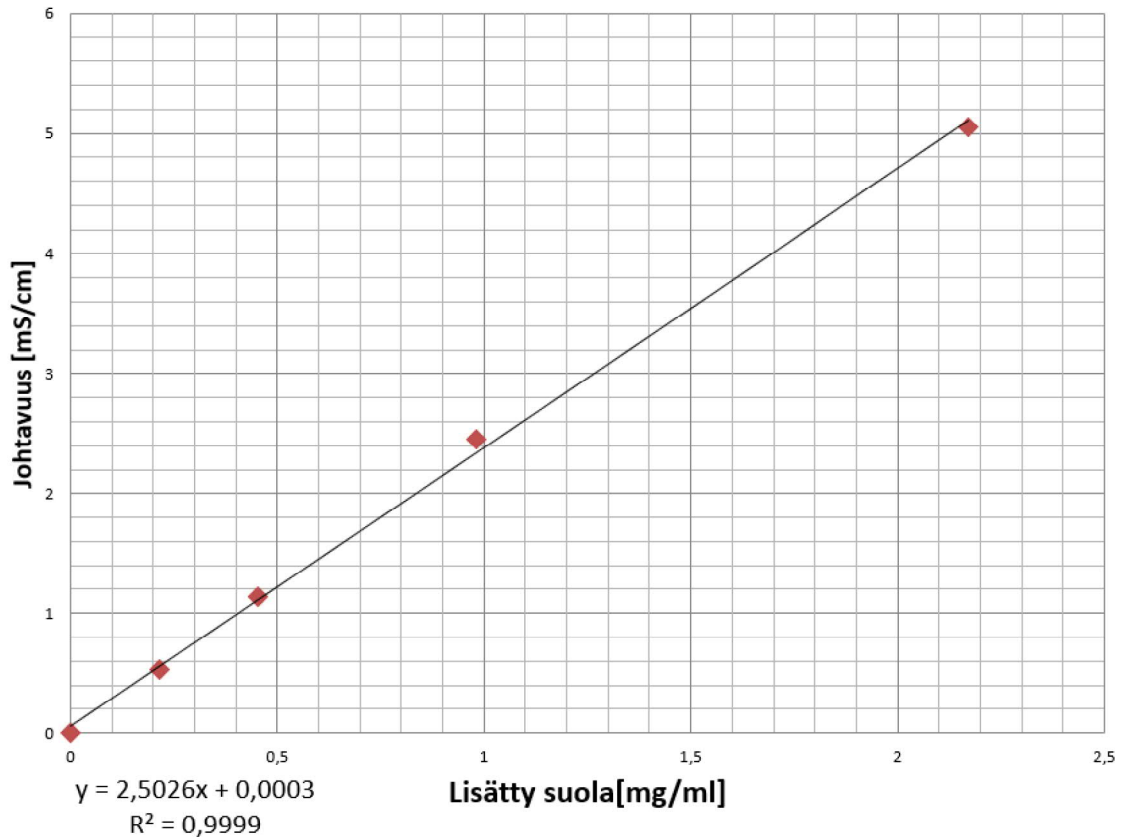
Kuva 6. pH-arvon vaikutus johtavuuteen HCl-liuoksessa

3.2.2 Magnesiumkloridin vaikutus johtavuuteen

Jotta tutkimus olisi mielekäs, tulisi mahdollisesti huokosista vapautuvan MgCl_2 -suolan määrä riittää antamaan mittalaitteiston havaitsevissa oleva tulos. Magnesiumkloridin vaikutus johtavuuteen selvitettiin mittaamalla eri konsentraatioisten MgCl_2 -suolaliuosten johtavuus ja valmistamalla kalibraatioisuora. Johtavuus mitattiin Malvern Panalyticalin Zetasizer-laitteen zeta-potentiaalimittauksen alussa otettavalla johtavuusmittauksella kuten näyteliuoksetkin. Kalibraatioisuuden valmistamisessa käytettiin 10,12 m-% MgCl_2 -suolaliuoksesta laimentamalla valmistettuja konsentraatioita. Kalibraatioisuoraa varten käytettiin suhteellisen matalia suolakonsentraatioita, koska on tutkimuksen kannalta olennaista selvittää miten johtavuus muuttuu juuri matalissa MgCl_2 konsentraatioissa. Taulukon III arvoista tehdyssä kalibraatioisuorassa (kuva 7) on otettu huomioon vain lisätystä suolasta johtuva johtavuuden muutos ja siten arvoista on poistettu suolattoman liuoksen johtavuus.

Taulukko III. MgCl_2 -suolan vaikutus johtavuuteen

| Konsentraatio [mg/ml] | Johtavuus [mS/cm] | Lisääntynyt johtavuus [mS/cm] |
|-----------------------|-------------------|-------------------------------|
| 0 | 0,0187 | 0 |
| 0,214 | 0,548 | 0,529 |
| 0,451 | 1,160 | 1,141 |
| 0,981 | 2,470 | 2,451 |
| 2,170 | 5,070 | 5,051 |



Kuva 7. Lisätyn $MgCl_2$ -suolan vaikutus johtavuuteen

Suolan latautuminen perustuu osittain ionien varausten ja huokosen piin pinnan zeta-potentiaalin välisiin sähköisiin vuorovaikutuksiin, mutta osa suolasta on todennäköisesti liuenneena huokosiin jääneeseen latausliuokseen. Huokosista vapautuvaa $MgCl_2$ -suolaliuosta pystytään siis arvioimaan laskemalla huokosiin kokonaisuudessaan mahtuvan latausliuoksen sisältämän magnesiumkloridin massa. Huokosiin teoriassa mahtuva latausliuos saadaan käytettyjen partikkeleiden vapaan huokostilavuuden avulla. Tutkimuksessa käytettyjen TC-partikkeleiden vapaa huokostilavuus on taulukon II mukaisesti $0,59 \text{ cm}^3/\text{g}$. Käytetyn $MgCl_2$ -latausliuoksen konsentraatio oli 325 mg/ml (taulukko IV). Mittaliuoksessa on $1,0 \text{ mg}$ TCPSi-partikkeleita, jolloin huokosten tilavuudessa olevan suolan massa saadaan laskemalla:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{huokoset}} &= 0,59\text{cm}^3/\text{g} \cdot 0,001\text{g} \\
 &= 5,9 \cdot 10^{-4}\text{cm}^3 \\
 m_{\text{MgCl}_2} &= V_{\text{huokoset}} \cdot c_{\text{MgCl}_2} \\
 &= 5,9 \cdot 10^{-4}\text{cm}^3 \cdot 325\text{mg}/\text{cm}^3 \\
 &= 0,19175\text{mg}
 \end{aligned}$$

Mittaliuokset ovat lopputilavuudeltaan 10 ml, eli teoreettinen huokosiin jäänyt suola olisi 0,019175 mg/ml. Kalibraatiosuoran yhtälöä käyttämällä saadaan lisääntyneeksi johtavuudeksi 0,048 mS/cm. Tämän suuruinen johtavuuden muutos on mittalaitteiston tarkkuuden kannalta hyvin mitattavissa matalilla pH-arvoilla, kuten kuvasta 6 käy ilmi.

3.3 Näytteiden valmistus

Näytteet valmistettiin samasta TCPSi-erästä. Näytteiden valmistaminen sekä mitausten tekeminen pyrittiin suorittamaan lyhyellä aikavälillä mahdollisten ajasta riippuvien haittavaikutusten vähentämiseksi.

Kokokontrolloidusta nanopartikkeleista valmistettiin suolalla ladattuja ja lataamattomia näyteliuoksia. Lataamattomat partikkelit jatkokäsiteltiin eli päällystettiin ladattujen kanssa identtisellä tavalla. Ladatut näyteliuokset valmistettiin lataamalla partikkelit väkevässä suolaliuoksessa, minkä jälkeen ne päällystettiin asetyloidulla dextraanilla (AcDEX). Tutkimuksessa käytetty asetyloitu dextraani hajoaa dextraaniksi ja liukenee merkittävästi jo kahden tunnin sisällä ja täydellisesti kuudessa tunnissa pH 5 -liuoksessa. Neutraalissa pH 7 -liuoksessa puolestaan asetyloidun dextraanin ei ole havaittu hajoavan merkittävästi dextraaniksi [81].

Partikkelien valmistuttua suolan vapautumista tutkittiin matalassa pH-liuoksessa tarkoituksena selvittää latautuuko suola nanopartikkeleihin. HCl-liuoksen pH-arvoksi

päätettiin pH 3. Alhainen pH-arvo simuloi kehon endosomeissa tapahtuvan pH-bufferoinnin aiheuttamaa happamoitumista. Endosomin pH-arvo ei laske aivan näin alas, mutta koska asetyloidun dextraanin hajoaminen happamassa liuoksessa aiheuttaa pH-arvon nousun ja tarpeeksi emäksinen liuos ei hajota asetyloitua dextraania, mittauksen pH-arvoksi päätettiin endosomin pH-arvoa alempi pH. Matalammassa pH-arvossa myös mittalaitteiston sisäinen tarkkuus vaikutti paremmalta kalibrointimittausten perusteella. Näytteiden pesuun valmistettiin ionivaihdetusta vedestä kokeellisesti pH-mittarilla ja laimealla KOH-vesiliuksella pH-arvoltaan 7 oleva vesi+KOH-liuos. Neutraali pH 7 simuloi partikkelin käyttäytymistä verenkierrassa ennen päätesoluun päätymistä.

Suolojen vapautuminen partikkeleista havaittiin edellämainitusti Malvern Analyticalin Zetasizer-laitteen zeta-potentiaalimittauksen alussa otettavalla johtavuusmittauksella. Suolojen vapautumisen havaitsemiseksi Zetasizerillä otettiin referenssimittaukset puhtaasta pH 3 HCl-liuoksesta ilman partikkeleita sekä pelkkien TCPSi-partikkelien kanssa. Tämän lisäksi vertailuarvoina käytetään lataamattomista partikkeleista valmistetuista näyteliuksista (näytteet 0a ja 1a) otettuja mittauksia. Täten tietyssä pH:ssa havaittu johtavuusero ladattujen partikkeleiden ja lataamattomien partikkelien näyteliuksissa oletetaan johtuvan ladatusta suolasta.

3.3.1 Näytteiden valmistukseen käytetyt liuokset

Kaikissa näytteissä on käytetty samasta TCPSi-liuoksesta kymmenkertaisesti laimennettua liuosta. Alkuperäisen TCPSi-liuoksen parametrit taulukossa II. Suolan latausliuksena käytettiin väkevää MgCl_2 -vesiliuosta, joka valmistettiin kidevedellisestä magnesiumin kloridisuolasta ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Näytteissä (0-6) käytettiin partikkeleiden päällystysliuksena asetyloidun dextraanin etanoliliuosta, missä asetyloidun dextraanin määrä on 20 % ladattavien TCPSi-partikkeleiden massasta. Näytteissä 5 ja 6 käytettiin lisäksi melkein kylläiseen MgCl_2 -etanoliliukseen vastaa-

valla massakonsentraatiolla valmistettua asetyloidun dextraanin liuosta. Näytteiden valmistuksessa käytettyjen liuosten tiedot taulukossa IV.

Taulukko IV. Näytteiden valmistuksessa käytettyjen liuosten ominaisuuksia

| | c [mg/ml] | Käytetty V [ml] | Käytetty m [mg] | Liuotin |
|---------------------------|-----------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| TC-liuos | 1,3083 | 0,765 | 1,00 | ETOH |
| MgCl ₂ -lataus | 325 | 5,00 | – | vesi |
| AcDEX-1 | 0,4 | 0,5 | 0,20 | ETOH |
| AcDEX-2 | 0,04 | 5,0 | 0,20 | MgCl ₂ -ETOH |

3.3.2 Näytteet

Tutkimuksessa valmistettiin yhteensä 9 näytettä. Näistä 2 on lataamattomia referenssinäytteitä, jotka valmistettiin muuten samalla tavoin muiden näytteiden kanssa, mutta ilman suolalatausta. Loput eroavat toisistaan päällystyskertojen määrällä ja käytetyillä päällystysliuoksilla. Eri näytteiden erot on tiivistetty taulukkoon V. Taulukossa alaindeksi merkitsee lataamatonta samalla menetelmällä valmistettua näytettä. AcDEX-1 ja AcDEX-2 viittaavat kyseisen päällystysliuoksen käyttökertoihin kullakin näytteellä.

Taulukko V. Näytteiden päällystysliuosten käyttökerrat

| Näyte | Ladattu | Lataamaton | AcDEX-1 | AcDEX-2 |
|-------|---------|------------|---------|---------|
| 0 | X | - | 1 | - |
| 0a | - | X | 1 | - |
| 1 | X | - | 2 | - |
| 1a | - | X | 2 | - |
| 2 | X | - | 2 | - |
| 3 | X | - | 2 | - |
| 4 | X | - | 2 | - |
| 5 | X | - | 1 | 1 |
| 6 | X | - | 1 | 1 |

Kaikkien näytteiden, poislukien lataamattomien referenssinäytteiden eli 0a ja 1a, TC-partikkeleiden annettiin latautua väkevässä suolaliuoksessa 15 minuuttia. Suolan lataamisen jälkeen partikkeleiden päälle pipetoitiin 4,5 ml etanolia ja 0,5 ml AcDEX-1 liuosta. Tällöin dextraanin määrä liuoksessa oli 20 % partikkeleiden massasta. Dextraaniliuoksen annettiin vaikuttaa 15 minuuttia, minkä jälkeen liuos fuugattiin pohjalle näytteissä 0-4. Fuugauksen jälkeen näytteet 0 ja 0a pestiin pH 7 vesi+KOH liuoksella ennen mittausliuoksen tekoa. Näytteet 1-4 päällystettiin uudelleen AcDEX-1 liuoksella 5 minuutin ajan ennen uutta fuugausta ja pH 7 vesipesua. Näytteet 5 ja 6 valmistettiin sekoittamalla AcDEX-1 liuos suoraan suolalatauksen vaikutusajan jälkeen koeputkeen ja odottaen seuraavat 15 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet fuugattiin ja käsiteltiin AcDEX2 liuoksella 5 minuutin ajan. Näyte 5 pestiin tämän jälkeen kerran ja näyte 6 kaksi kertaa pH7 vesi+KOH liuoksella. Näytteiden tekotavat tiivistettynä taulukossa VI.

Taulukko VI. Näytteiden mittaussäiliöiden tekotavat

| Näyte | Suolalataus [min] | AcDEX-1 [min] | AcDEX-2 [min] | pH 7 pesu [krt] |
|-------|-------------------|---------------|---------------|-----------------|
| 0 | 15 | 15 | - | 1 |
| 0a | 0 | 15 | - | 1 |
| 1 | 15 | 15+5 | - | 1 |
| 1a | 0 | 15+5 | - | 1 |
| 2 | 15 | 15+5 | - | 1 |
| 3 | 15 | 15+5 | - | 1 |
| 4 | 15 | 15+5 | - | 1 |
| 5 | 15 | 15 | 5 | 1 |
| 6 | 15 | 15 | 5 | 2 |

Näytteiden 1-4 AcDEX1 liuokset ja pH 7 pesuliuokset otettiin talteen ja niistä mitattiin johtavuuden nousu verrattuna lataamattomien partikkeleiden vastaaviin liuoksiin. Sama vertailu tehtiin myös näytteiden 5 ja 6 pH 7 pesuliuoksille.

3.4 Suolalataukset

Jokainen mittaussäiliö aloitettiin viisi minuuttia liuoksen valmistumisen jälkeen. Mittaliuos asetettiin jatkuvaan magneettisekoitukseen ja liuosta kierrätettiin mittaussäiliössä peristaattisella pumpulla. Jatkuvasti vaihtuva liuos valittiin estämään partikkelien agglomeroituminen säiliön pohjalle ja siten vaikuttavan johtavuuden arvoon muuten, kuin suolan vapautumisella.

Näytteistä otettiin 30 mittaussäiliötä joiden välille asetettiin 60 sekunnin odotusaika. Joidenkin näytteiden kohdalla otettiin useampi mittaussäiliö peräkkäin. Riippuen näytteestä mittaussäiliöitä otettiin myös noin päivän, kahden tai kolmen päivän päästä. Näytteessä 2 mitattiin ensimmäisten mittaussäiliöiden jälkeen kaksi kertaa 24 tunnin jatkuvassa kierrossa olevaa näytettä 15 minuutin välein. Johtavuusmittausten

lisäksi näytteistä mitattiin lopullinen pH-arvo, johon mittausliuokset tasaantuivat.

3.5 Lisämittaukset

Lisätutkimuksissa testattiin urean ja boorihapon latautumista TCPSi:n huokosiin. Käytettyjen kemikaalien valmistaja ja eränumerot taulukossa VII. Urea on amiini-ryhmineen emäksinen molekyyli ja boorihappo puolestaan on nimensä mukaisesti happo, jolla on irtoavia H^+ -ioneja molekyyli-rakenteessaan. Molemmilla näistä voi olla mielenkiintoisia vaikutuksia endosomissa mahdollisen pH-vasteen vuoksi. Molemmista näytteistä otettiin noin puolen tunnin ajalta johtavuusarvoja samalla menetelmällä kuin aiemmin, mutta ilman jatkuvaa kiertoa peristaattisella pumpulla. Mittausohjelma asetettiin ottamaan 10 mittausta yhden mittaussarjan aikana. Mittausarvojen välissä mittanäyte vaihdettiin käsin ja aloitettiin uusi mittaussarja.

Taulukko VII. Urean ja boorihapon valmistustiedot

| | Valmistaja | Valmistuserä |
|-------|-------------------------|--------------|
| Urea | Sigma Aldrich Chemistry | BCBJ5121V |
| Boori | Sigma Aldrich Chemistry | MKBR4251V |

Molemmissa mittauksissa valmistettiin TCPSi-konsentraatioltaan 0,5 mg/ml olevat mittaliuokset pH 5 HCl-vesiliuokseen. Mittaliuosten latausajat pidennettiin 30 minuuttiin, mutta asetyloidun dextraanin päällystysaika pysyi samana 15 minuutissa. Näytteet valmistettiin samantyyllisesti päämittauksen näytteiden 5 ja 6 kanssa lisäämällä päällystysliuos suoraan latausliuokseen vahvassa konsentraatiossa. Mittausliuosten valmistamiseen käytettyjen liuosten parametrit ovat esitettynä taulukossa VIII. Sekä boorihapon, että urean latausliuokset olivat kylläisiä liuoksia ja taulukossa on esitetty kylläisten liuosten konsentraatiot. Tilavuutena esitetään mittausliuoksen valmistuksessa käytetty lataus- ja päällystysliuoksen tilavuus.

Taulukko VIII. Lisämittausten liuosten parametreja

| Liuos | Konsentraatio [mg/ml] | Vaikutusaika [min] | V [ml] |
|--------------------|-----------------------|--------------------|--------|
| Boorihappo | 90,0 | 30 | 2 |
| Urea | 50,0 | 30 | 2 |
| AcDEX | 4,0 | 15 | 0,150 |
| Mittaliuos (TCPSi) | 0,5 | - | 4,0 |

4 Tulokset ja pohdintaa

Suolalataukseen liittyvien mittausten tulokset ja lisämittausten tulokset on esitetty omissa luvuissaan. Kussakin luvussa käsitellään mittausten tuloksia, niihin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä ja tuloksista mahdollisesti pääteltäviä johtopäätöksiä. Mittaustuloksista tehtyihin kuvaajiin käytettiin Microsoft Excelin kuvaajatyökalua.

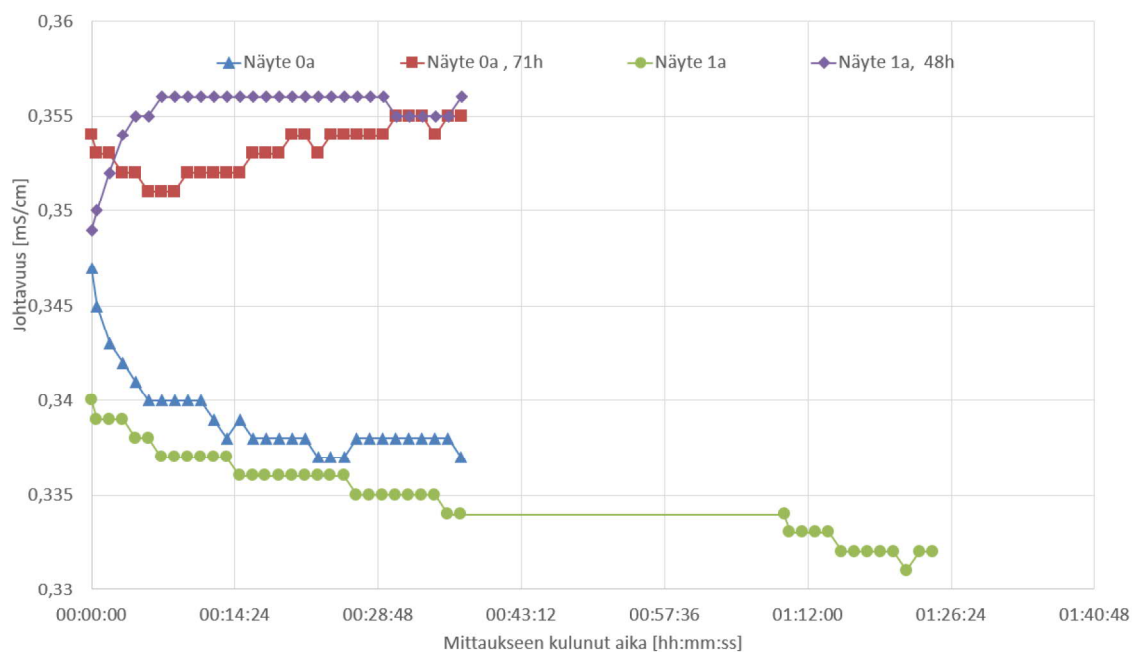
4.1 Suolalataukset

Suolalatausten tulokset on jaettu pH-mittauksiin ja johtavuusmittauksiin. Johtavuusmittaukset ovat lataamattomien partikkeleiden ja ladattujen partikkeleiden mukaan erikseen. Kussakin alaluvussa käsitellään tulosten merkitystä niin kokonaisuutena kuin yksittäisenä mittauksena. Osassa ladattujen partikkelien kuvaajia on käytetty vastaavan käsittelytavan lataamattomien partikkeleiden tuloksia vertailuarvona analysoinnin helpottamiseksi. Tulosten analysoinnissa käytettiin myös taulukossa IX esitettyjä referenssiarvoja.

Taulukko IX. Referenssiarvoja

| | Johtavuus | pH |
|------------------|-----------|-------|
| 0,1 mg/ml TC HCl | 0,3942 | 3,045 |
| pH 3 HCl | 0,3238 | 3,045 |
| pH 7 Vesi | 0,0120 | 7,001 |

4.1.1 Lataamattomien partikkelien johtavuusmittaukset



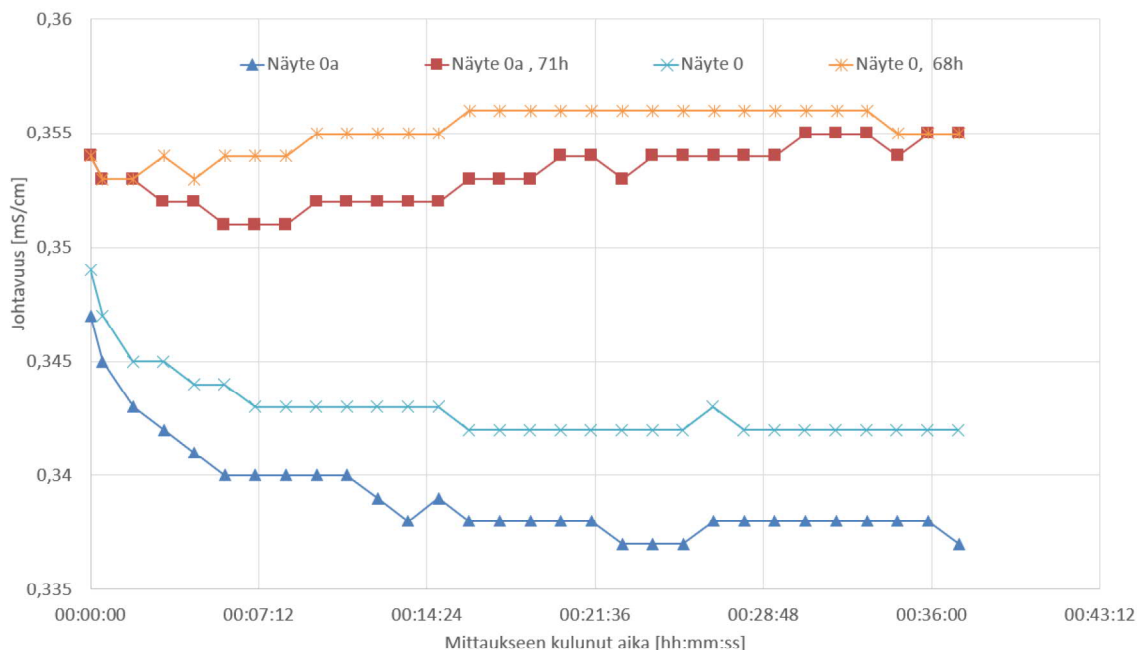
Kuva 8. Lataamattomien näytteiden 0a ja 1a johtavuusarvot

Lataamattomista partikkeleista tehtyjen mittaliuosten tuloksista havaitaan, että yksinkertaisella päällystyksellä ja kaksinkertaisella päällystyksellä liuoksen johtavuudella on selkeä trendi. Kuvasta 8 näkee johtavuuden laskevan ajan myötä, mikä johtunee pääosin asetyloituneen dextraanin hajoamisesta aiheutuvasta pH-arvon noususta. Kun alkuperäisestä mittauksesta on kulunut huomattavasti aikaa, havaitaan molemmissa näytteissä pieni nousu johtavuuden arvossa. Tässä vaiheessa asetyloitunut dextraani on jo hajonnut ja liuokseen on vapautunut puhtaita

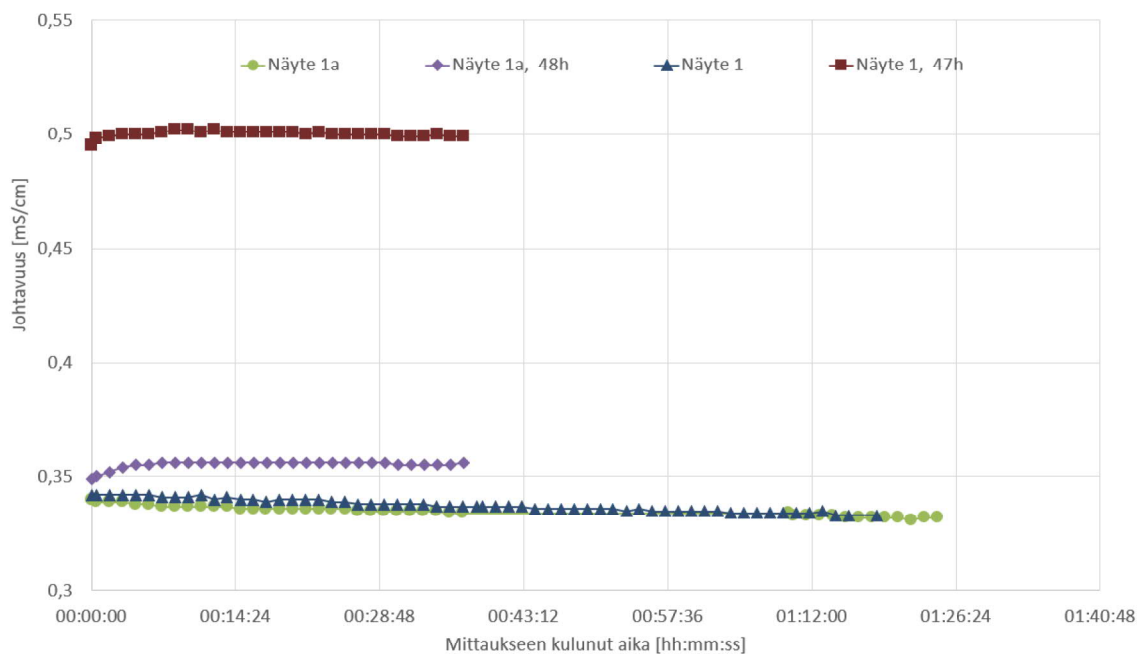
TC-partikkeleita. Taulukosta IX nähdään, pelkästään puhtaiden TC-partikkeleiden nostavan liuoksen johtavuuden arvoon 0,3942 mS/cm. Tästä voidaan päätellä lataamattomien partikkelien johtavuuden nousun johtuvan pääosin puhtaista TC-partikkeleista. Kerran päällystettyjen välittömässä mittauksessa ja pitkän ajan kuluessa suoritettussa mittauksessa on kaksinkertaisesti päällystettyä selkeämpi trendi. Todennäköisesti yksinkertainen AcDEX-päällystys hajoaa siis tasaisemmin ja lyhyemmässä ajassa kuin kaksinkertainen päällystys.

4.1.2 Suolaladattujen partikkelien johtavuusmittaukset

Näytteet 0 ja 0a päällystettiin vain kerran asetyloidulla dextraanilla ja saaduista tuloksista (kuva 9) huomattiin ettei ladattujen partikkeleiden trendi eroa lataamattomista partikkeleista. Näytteissä näkyy pieni johtavuusero, mikä pysyy suhteellisen tasaisena koko mittauksen aikana. Johtavuusero kasvaa kuvaajien alusta loppuun noin 0,02 mS/cm. Tämä johtavuusero sisältyy hyvin teoreettiseen maksimiin 0,048 mS/cm, jos johtavuusero johtuu suolasta. Kuvaajissa näkyvä johtavuuseron kasvu antaa viitteitä hallitusta vapautumisesta, mutta pidemmän aikavälin mittauksissa vastaavaa selkeää eroa ei kuitenkaan havaita. Johtavuusero ei siis todennäköisesti johdu huokosista hiljalleen vapautuvasta suolasta, vaan mahdollisesti ionien kulkeutumisesta päällystyksen lävitse tai liuoksien valmistuksessa tapahtuneesta erosta. Tästä johtuen myöhemmät näytteet päällystettiin kaksinkertaisesti, yrittäen estää mahdollista ionien kulkeutumista AcDEX-kerroksen lävitse.



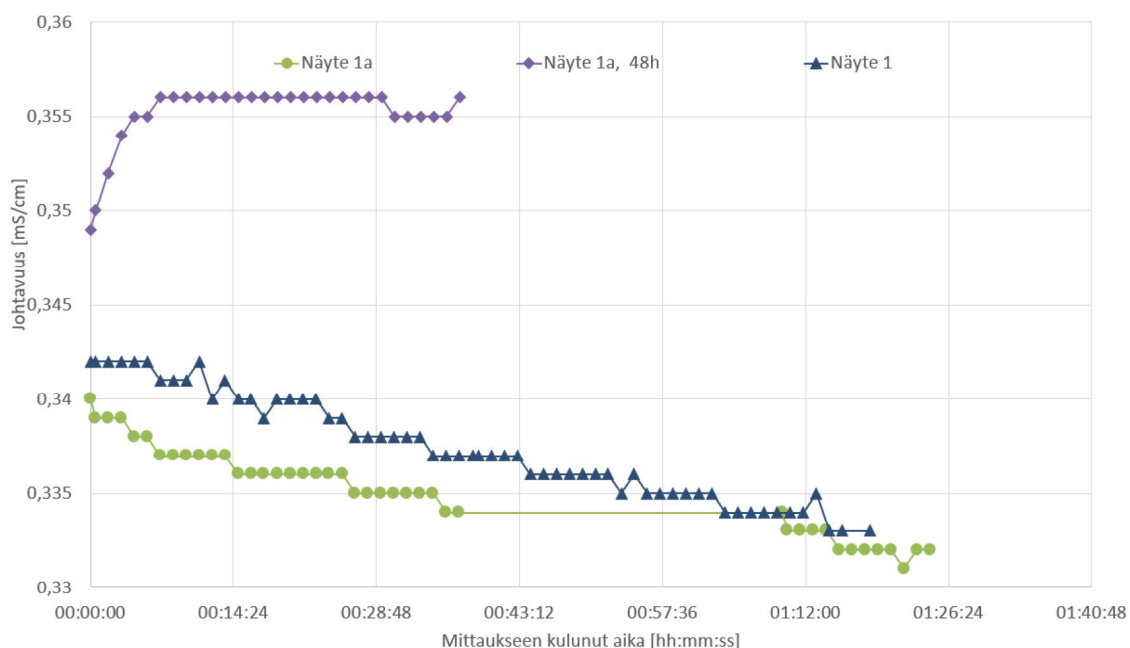
Kuva 9. Näytteen 0 ja 0a johtavuusmittaukset



Kuva 10. Näytteen 1 ja 1a johtavuusmittaukset

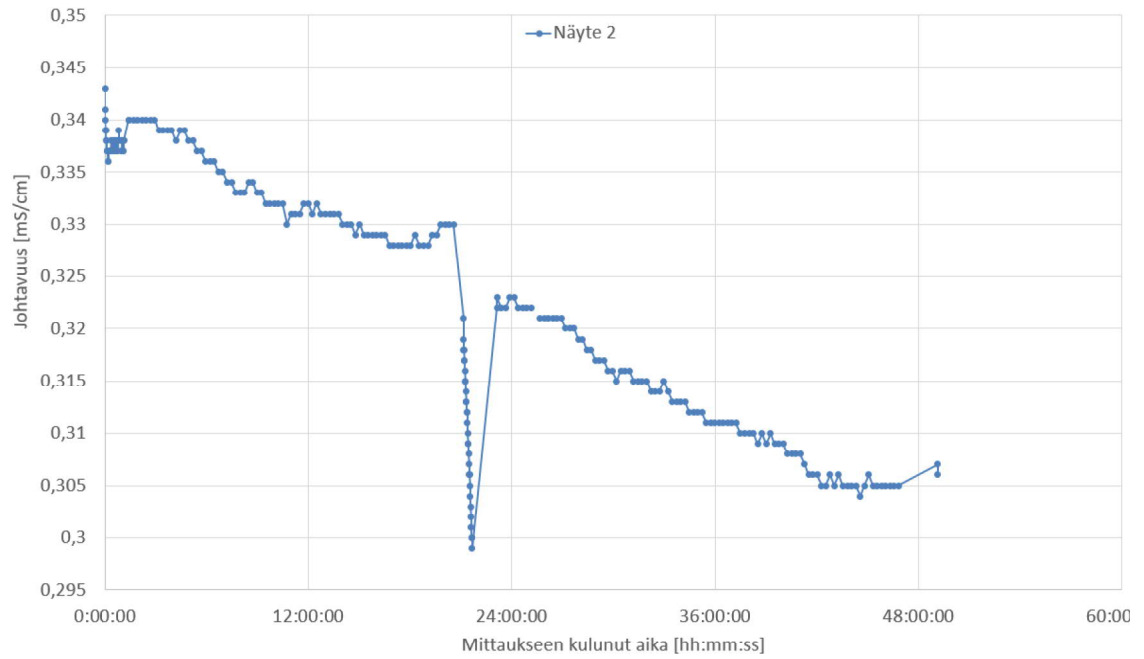
Näytteet 1-4 päällystettiin kaksinkertaisesti ja mittauksista saatiin ristiriitais- ta dataa. Näytteen 1 johtavuus oli noussut 47 tunnin jälkeen huomattavasti (kuva 10) verrattuna muihin näytteisiin, jotka pysyttelivät pääosin samoissa lukemissa keskenään (kuvat 10 ja 11). Myöhemmissä mittauksissa ei vastaavaa tulosta saa-

tu toistettua. Johtavuuden nousu on myös laskettua teoreettista latautumistakin huomattavasti suurempi. Todennäköisesti siis tässä on tapahtunut kontaminaatio, vaikka myös lataamattomassa näytteessä on havaittavissa pieni nousu 48 tunnin jälkeen. Mittausjärjestelmän silikoniletkun puhdistuksessa käytetyistä HCl- ja KOH-liuoksista on voinut jäädä jäämiä vesihuuhteluista huolimatta ja siksi johtavuus on muita korkeampi.

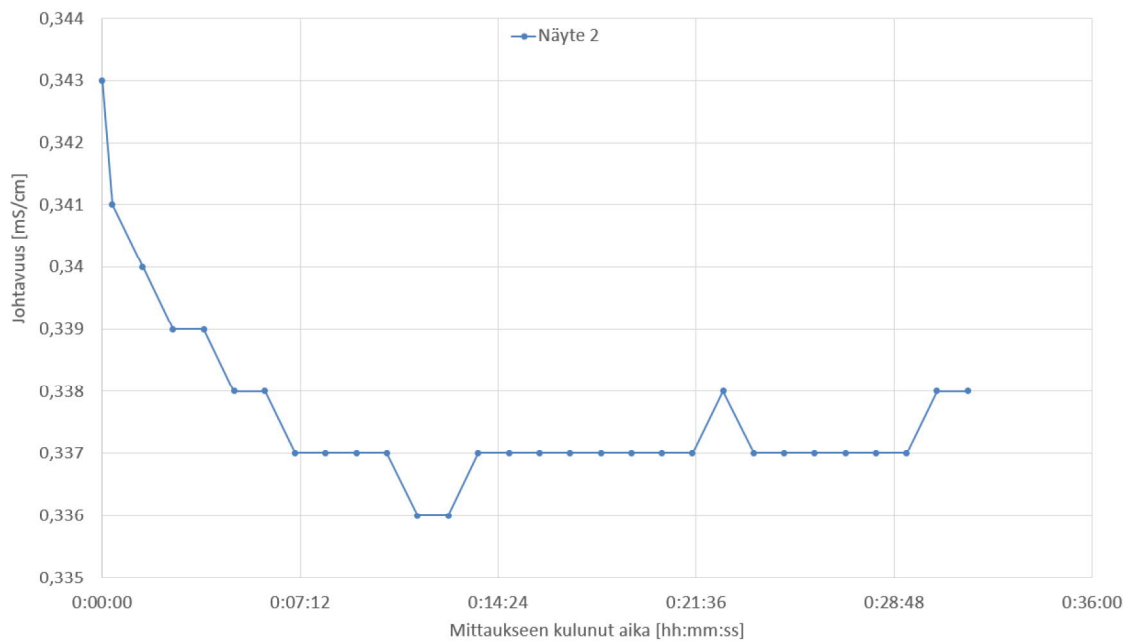


Kuva 11. Tarkempi otos toisiaan lähellä olevista tuloksista näytteissä 1 ja 1a

Näytteestä 2 otettiin ensin puolen tunnin mittasarja, jonka jälkeen näyte jätettiin jatkuvaan mittaukseen melkein vuorokauden ajaksi. Tämän jälkeen otettiin uusi puolen tunnin mittasarja ja näyte jätettiin uudelleen vuorokauden mittaukseen. Kuvasta 12 huomataan pitkien mittauksen välillä tehdyn lyhyen mittauksen selkeästi eroavan arvoineen muusta kuvaajasta.

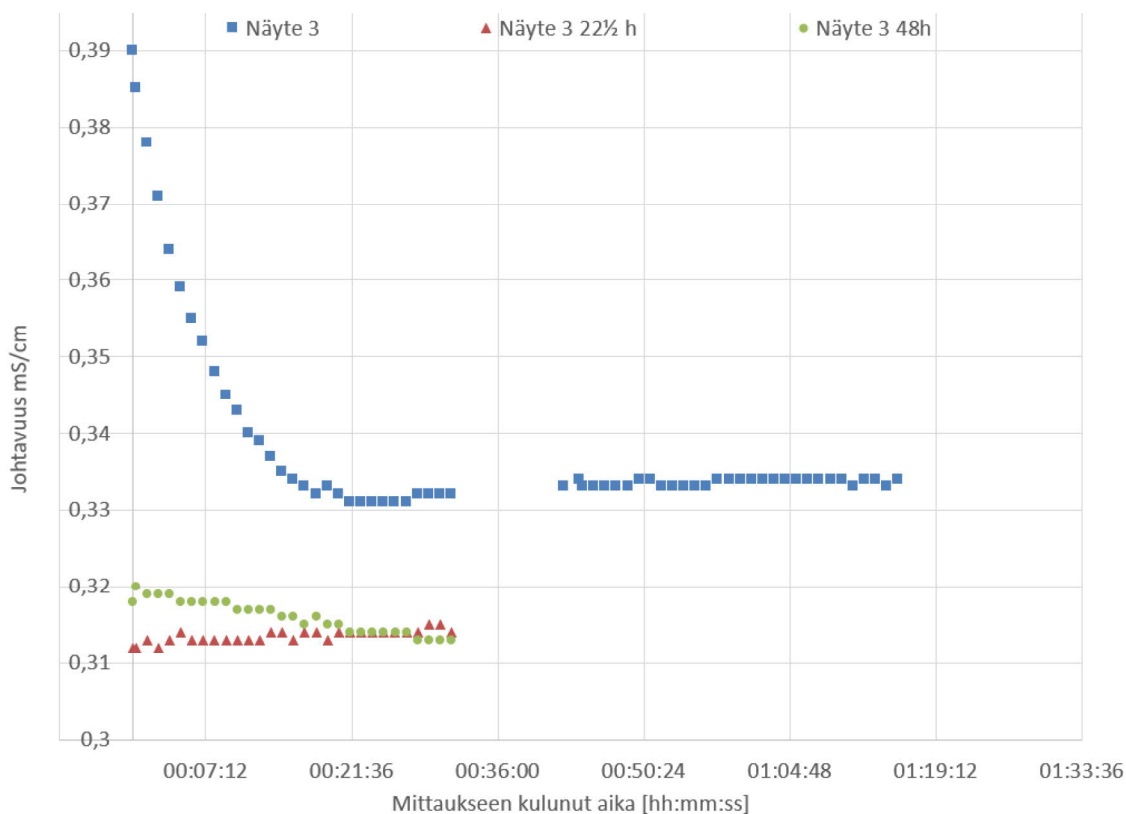


Kuva 12. Näytteen 2 johtavuusmittaukset



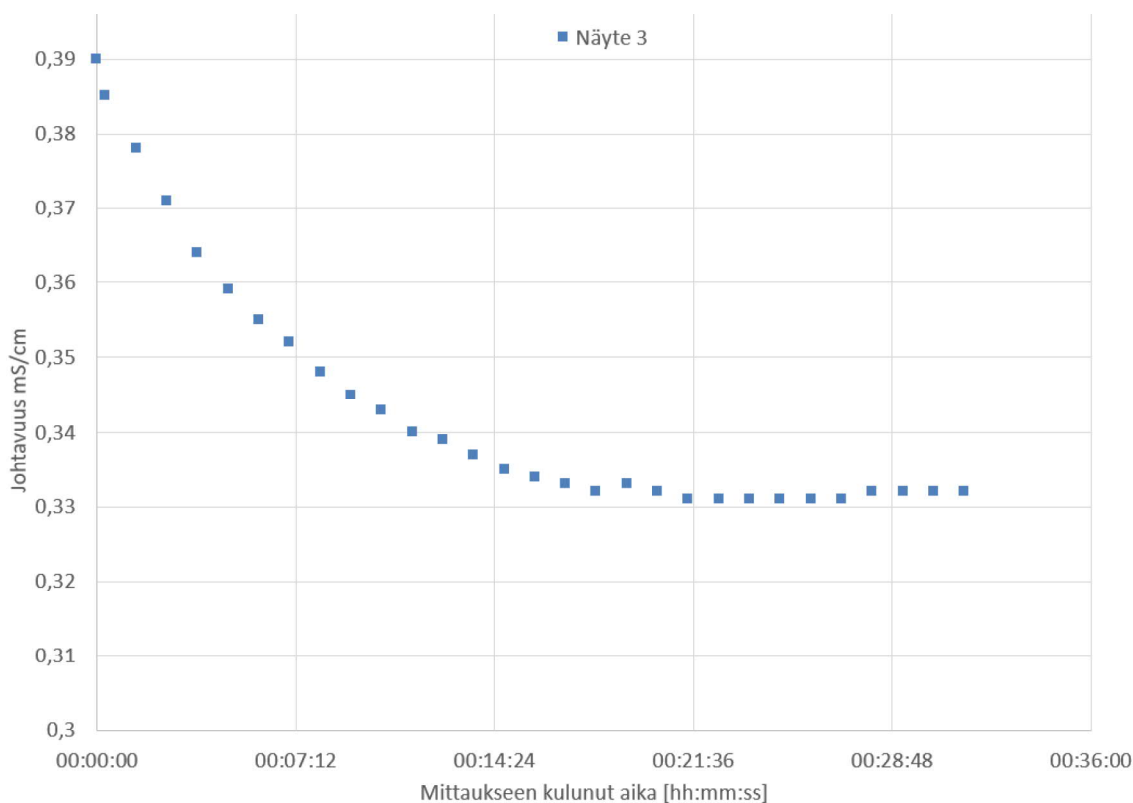
Kuva 13. Näytteen 2 johtavuusmittausten ensimmäinen sarja

Tässä tapauksessa tuskin on kyse kontaminaatiosta, koska mittaus jatkoi vanhaa trendiään uuden mittauksen alkaessa. Kyseessä voi olla mittausjärjestelmässä tapahtunut häiriö, joka poistui uutta mittaussarjaa varten tehdyssä vesihuuhtelussa. Johtavuuden trendi on edellämainittua poikkeusta lukuunottamatta samankaltaisesti laskeva kuin näytteessä 1. Tasaantumattomuus pitkällä ajalla voi johtua mahdollisesti mittauksen aikana silikoniletkuun jääneiden partikkeleiden vuoksi mittaliuoksen konsentraation pienenemisestä. Näytteen 2 ensimmäisen puolen tunnin aikana nähdään kuvassa 13 johtavuudessa selkeämmin samankaltainen nopeasti laskeva tasaantuva trendi kuin muissa näytteissä.



Kuva 14. Näytteen 3 johtavuusmittaukset

Näytteen 3 kuvaajassa (kuva 14) on alussa muita näytteitä selkeämpi laskeva trendi. Johtavuusmittauksen arvot ovat myös muita näytteitä laajemmalla alueella, mutta siitä huolimatta myös näytteen 3 johtavuus arvo tasaantuu samoihin arvoihin muiden näytteiden kanssa suhteellisen nopeasti, kuten kuvasta 15 näkyy.

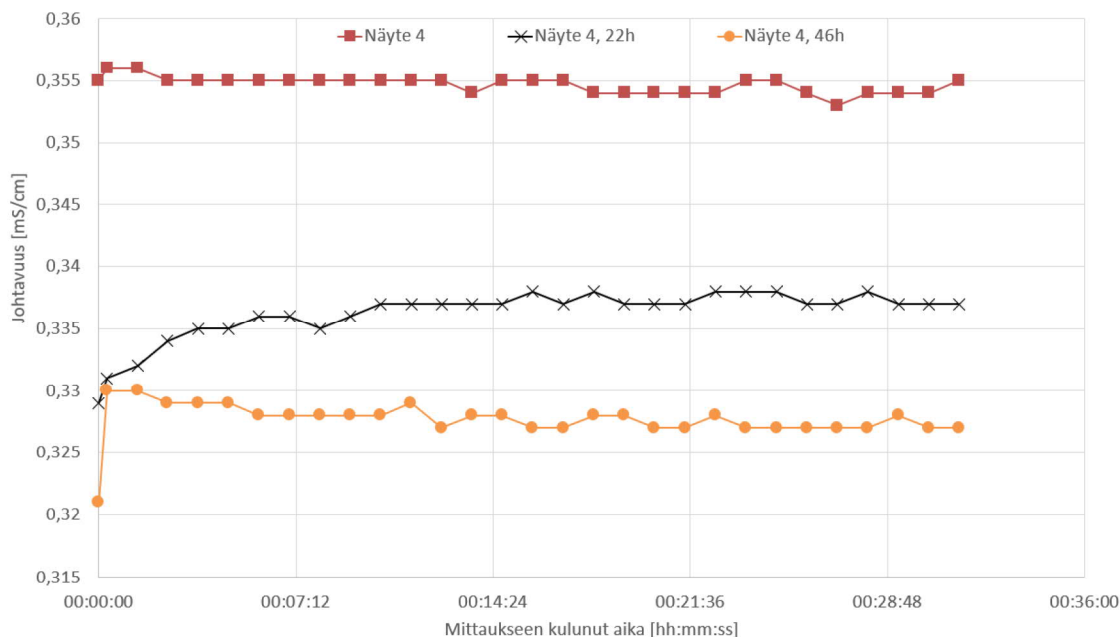


Kuva 15. Näytteen 3 johtavuusmittausten ensimmäinen sarja

Kuvaajan muodon eroavuutta muista näytteistä voi arvioida johtuvan peristaattisen pumpun silikoniletkuun jääneistä jäämistä, tai vaihtoehtoisesti mittauksessa on sattunut satunnaarainen muutos kuten partikkelien huonompi dispersio. Huonompi dispersio on voinut aiheuttaa selkeämmän eron alun ja lopun johtavuusarvoissa partikkelien ollessa suurempina rykelminä mittausliuoksessa ja hiljalleen sekoittuessaan paremmin. Suuremmat partikkelirykelmät aiheuttaisivat AcDEX-päällystyksen hitaamman hajoamisen ja siten hitaamman pH-arvon nousun. Korkeampi alkujohdavuus johtunee koeputken reunoille tai päällystyksen pinnalle jääneistä suolajäämistä. Myös näytteessä 3 nähdään näytteen 2 kaltaisesti pitkän ajan jälkeen johtavuuden arvon laskeneen, toisin kuin näytteessä 1. Mutta toisin kuin näytteen 2 kuvassa 12, johtavuus on pysynyt tasaisempana 22,5 h ja 48 h jälkeen.

Näytteen 4 mittauksessa (kuva 16) ei muodostunut selkeää laskevaa trendiä ensimmäisen sarjan aikana. Myöhemmin 22 tunnin ja 46 tunnin jälkeen otetuista mit-

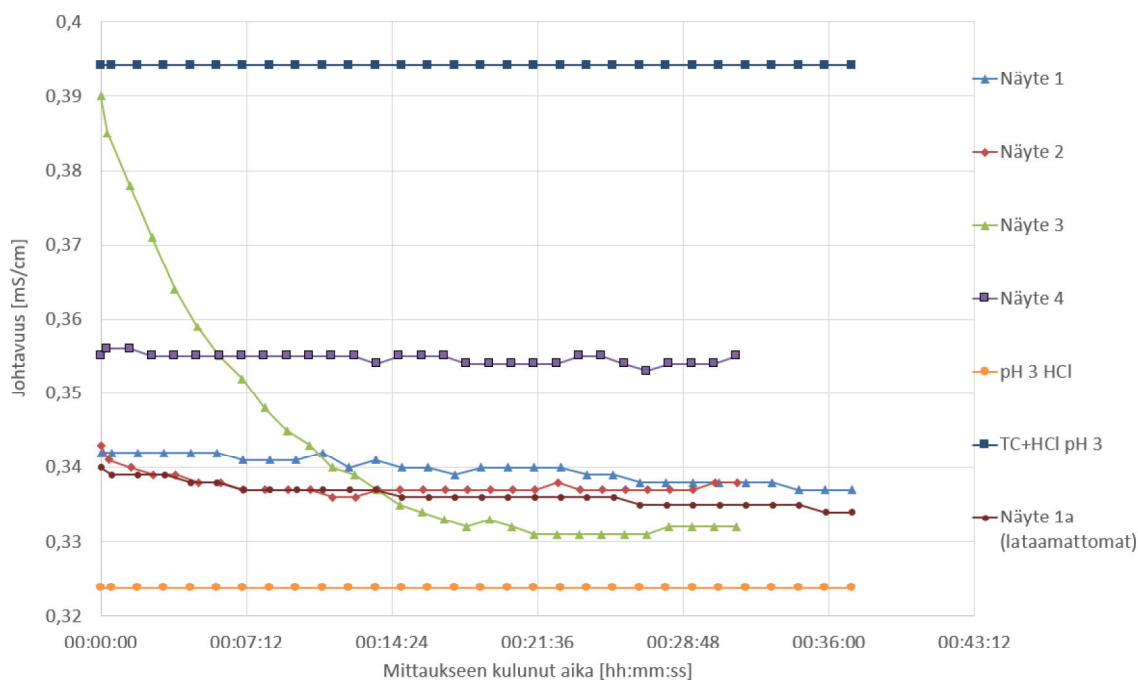
tauksista kuitenkin huomataan myös näytteen 4 johtavuuden jatkaneen laskemistaan, kunnes se on saavuttanut tason jossa oletettavasti asetyloidun dextraanin hajoamisesta aiheutunut johtavuuden lasku on tasapainossa TC-partikkeleista johtuvan johtavuuden nousun kanssa. Johtavuusarvo pysyy hyvin tasaisena ensimmäisen puolen tunnin mittauksen aikana ja on muiden näytteiden johtavuusarvoa suurempi.



Kuva 16. Näytteen 4 johtavuusmittaukset

Kun puhtaan pH 3 HCl- ja 0,1 mg/ml TC-HCl-liuosten johtavuusarvojen keskiarvoista määritetyt vertailusuorat kuvataan samassa kuvassa näytteiden 1-4 ensimmäisten mittaussarjojen kanssa (kuva 17), saadaan selkeä kuva, kuinka näytteiden 1-4 johtavuusarvot pysyvät näiden kahden vertailuarvon välissä. Suurin osa näytteistä myös vaikuttaa tasaantuvan hyvinkin lähelle lataamattomien partikkeleiden johtavuusarvoja. Eniten muista näytteistä eroaa näytteen 4 korkeampi johtavuus ja näytteen 3 muista eroava selkeä laskeva trendi ja korkeampi alkuarvo.

Näytteistä 1-4 otettiin talteen myös AcDEX-1- päällystysliuokset käsittelyn ja partikkeleiden pohjalle fuugauksen jälkeen. Näiden lisäksi otettiin talteen myös viimeisessä työvaiheessa käytetty pH 7 vesi+KOH pesuliuos. Liuoksista otettujen johtavuusmittausten arvot on esitetty taulukossa X.



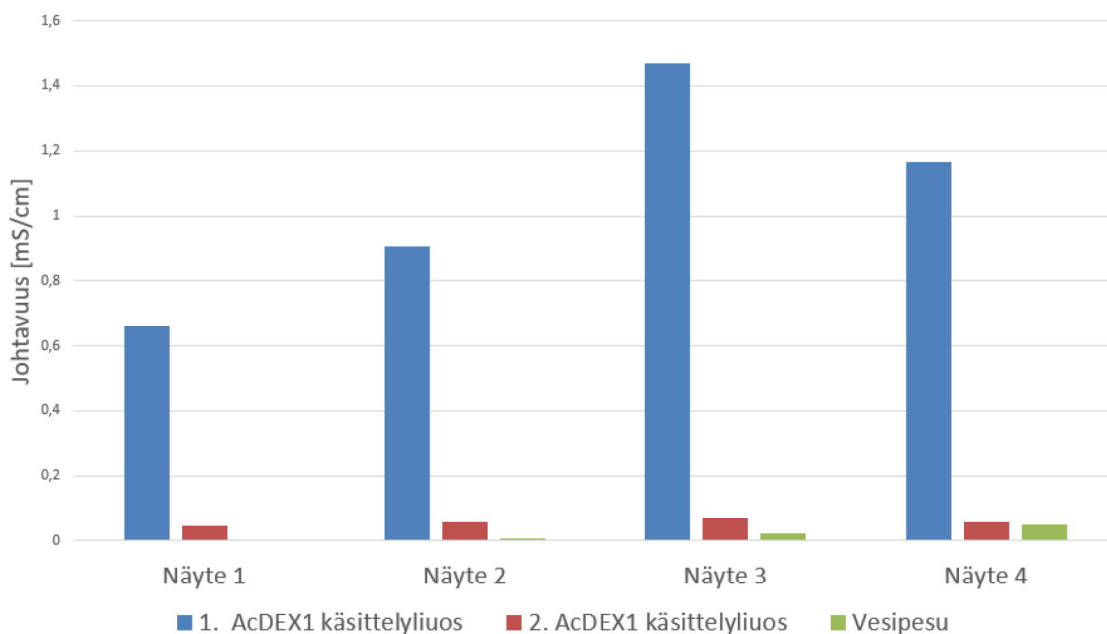
Kuva 17. Näytteiden 1-4 ensimmäiset johtavuusmittaukset ja referenssiarvot

Taulukko X. AcDEX1-käsittelyliuosten ja pH 7 vesi-pesuliuoksen johtavuusarvoja

| Liuos | Lataamaton | Näyte 1 | Näyte 2 | Näyte 3 | Näyte 4 |
|-------------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| 1. AcDEX1 [mS/cm] | 0,0046 | 0,6666 | 0,9140 | 1,4750 | 1,1720 |
| 2. AcDEX1 [mS/cm] | 0,0057 | 0,0519 | 0,0617 | 0,0762 | 0,0634 |
| Vesipesu [mS/cm] | 0,0102 | 0,0102 | 0,0211 | 0,0338 | 0,0611 |

Kuvassa 18 on kunkin näytteen käsittelyliuoksissa tapahtunut johtavuuden nousu verrattuna lataamattomiin partikkeleihin. Histogrammista näkyy selvästi suurimman osan suolasta jäävän heti ensimmäiseen liuokseen suolalatauksen jälkeen. Tässä tapauksessa ensimmäiseen AcDEX-1 päällystysliuokseen, jossa tapahtuu huomattava johtavuuden nousu. Myös seuraavassa päällystysliuoksessa johtavuus on noussut noin kymmenkertaisesti verrattuna lataamattomiin partikkeleihin. Suolalatauksen jälkeen 3. liuoksessa eli vesipesussa johtavuus nousi näytteissä 3 ja 4, mutta ei merkittävästi näytteissä 1 ja 2. Näytteen 4 vesipesu-liuoksen johtavuus nousi muita näytteitä huomattavasti enemmän, mikä on yhteensopiva kuvassa 17 näkyvän mui-

ta näytteitä korkeamman johtavuusarvon kanssa. Käsittelyliuosten johtavuuden erot eri näytteillä voivat mahdollisesti juontua hieman eri sekoitus- ja dispergointiajoista käsittelyn alussa.

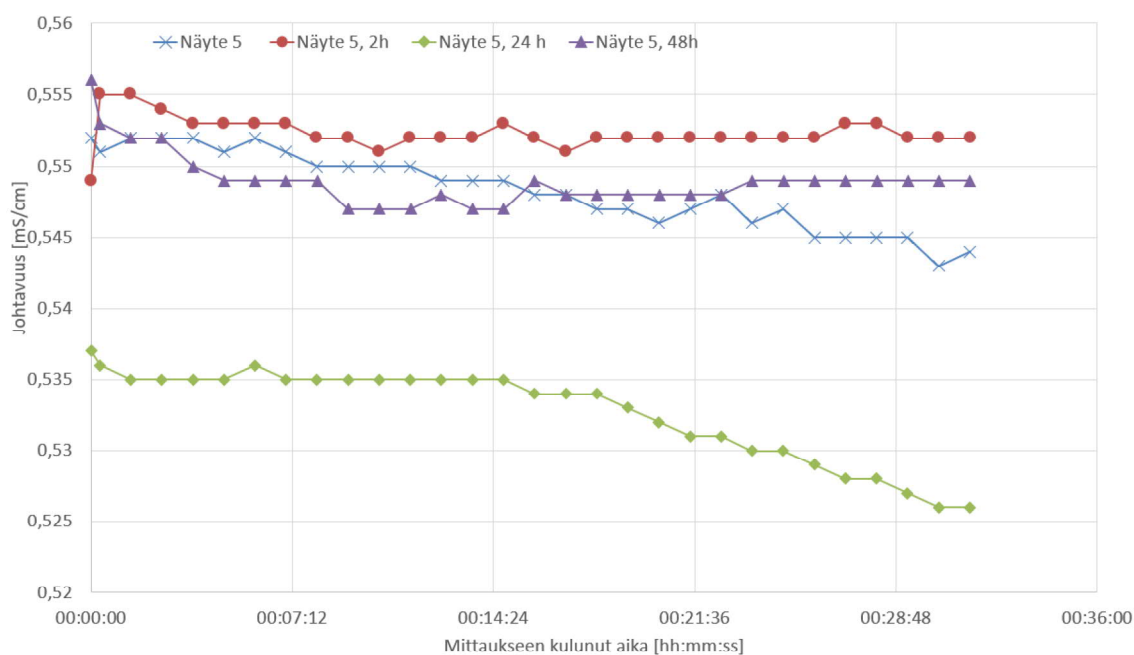


Kuva 18. Näytteiden 1-4 käsittelyliuosten johtavuuden nousu

Koska myös toisen päällystysliuoksen ja vesipesun johtavuudet nousivat, on mahdollista, että suolaionit pystyvät kulkeutumaan suoraan päällystyskerroksen lävitse. Varsinkin näytteissä 3 ja 4 tapahtunut selkeä muutos myös pH 7-vedessä on huoletuttava, koska asetyloitu dextraani ei hajoa neutraalissa pH-arvossa. Vaihtoehtoisesti päällystysliuoksen ja huokosiin latautuneen suolaliuoksen välinen konsentraatioero voi puskea suolaioneja päällystysliuoksen matalampaan suolakonsentraatioon tasapainottaakseen systeemin. Toisen vaihtoehdon tutkimiseksi valmistettiin AcDEX-2 päällystysliuos kyllästämällä etanoli MgCl_2 suolalla ennen asetyloidun dextraanin liuottamista.

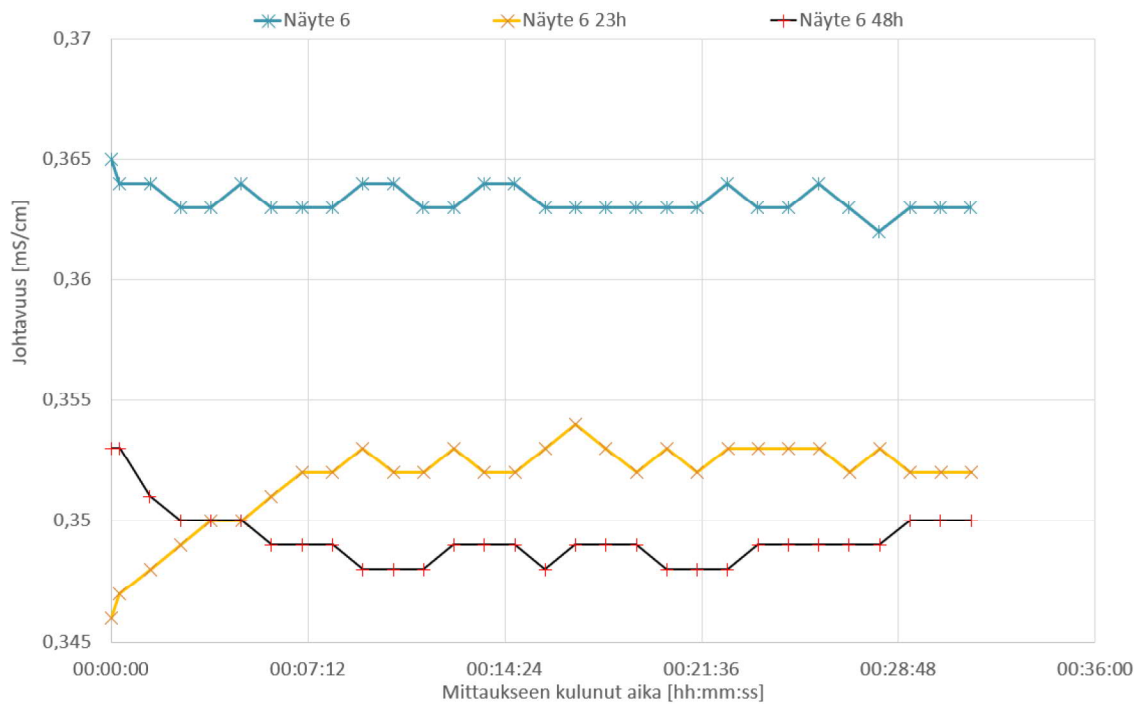
Kyllästettyyn etanoli-liuokseen ei pitäisi suuren konsentraation vuoksi teoriassa liueta suolaa TCPSi-partikkeleiden huokosista. Toisaalta kylläisestä AcDEX-2-liuoksesta voi jäädä suolaa helpommin päällystyskerrokseen ja sen pinnalle, koska

päällystysmateriaalin joukossa on valmiiksi runsaasti liuennutta magnesiumkloridia. Näytteen 5 tuloksista (kuva 19) näkyy aiempien näytteiden kaltainen lievästi laskeva trendi. Pääosin näytteen 5 johtavuusarvot pysyvät suhteellisen tasaisena eikä ajasta riippuvaa johtavuuden nousua ole. Näytteen 5 johtavuus on myös näytteen 1 (47 tunnin mittauksen) lailla huomattavasti korkeampi, kuin mitä lasketusta teoreettisesta suolan maksimimäärästä aiheutuisi. Muista näytteistä eroava johtavuusarvo johtunee siis muusta, kuin huokosista vapautuvasta suolasta.

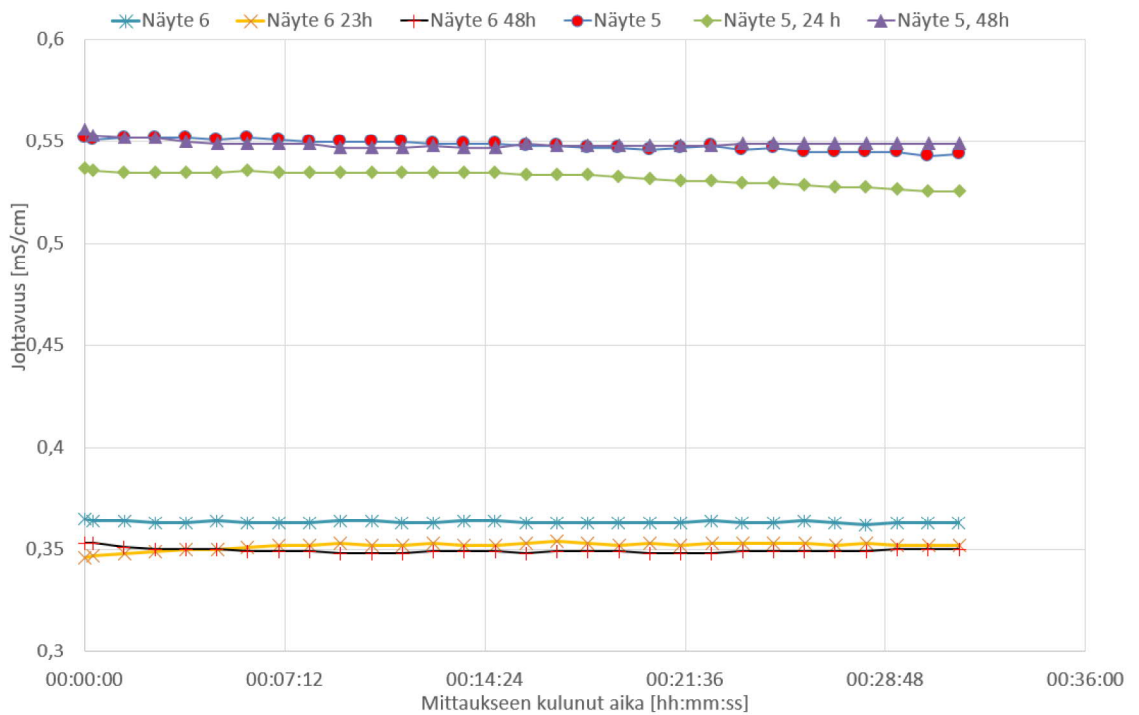


Kuva 19. Näytteen 5 johtavuusmittaukset

Myöskään näytteen 6 tuloksista (kuva 20) ei havaita suolan vapautumisesta johtuvaa johtavuuden nousua ajan mittaan. Kuvassa 21 näkyy selkeästi, kuinka molempien näytteiden johtavuusarvot pysyvät pääasiassa tasaisena lievästä laskevasta trendistä huolimatta.



Kuva 20. Näytteen 6 johtavuusmittaukset



Kuva 21. Näytteiden 5 ja 6 johtavuusmittaukset

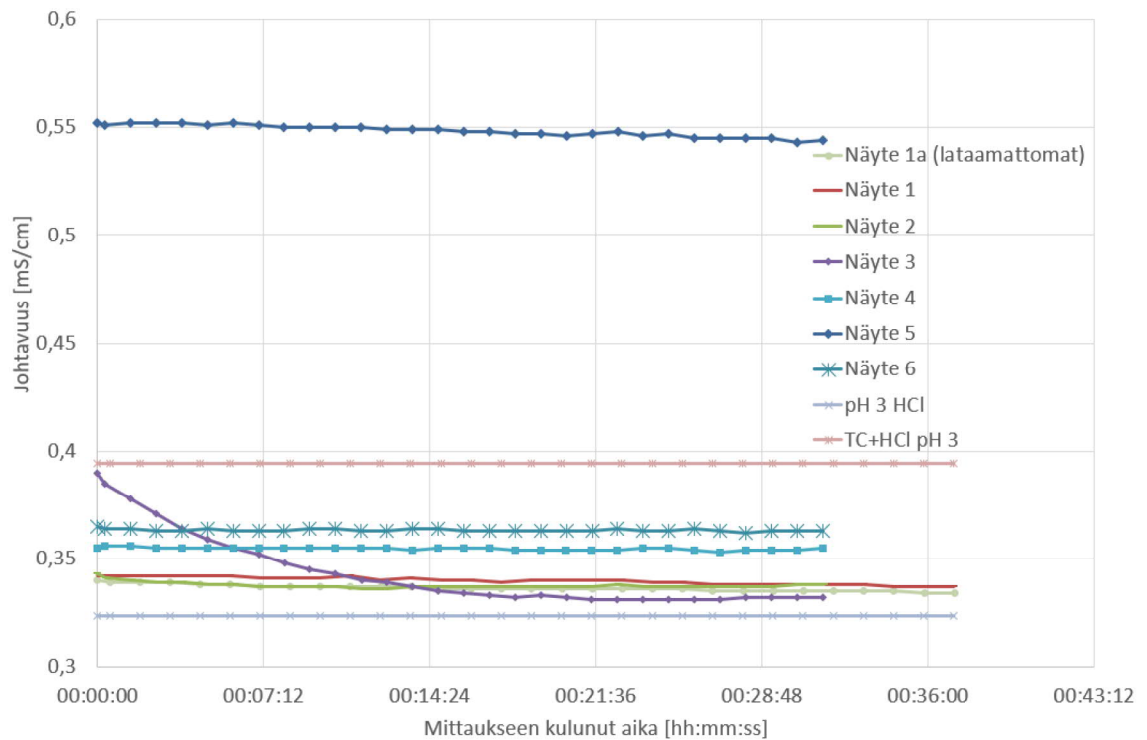
Näytteen 5 johtavuus on selvästi muita näytteitä korkeampi, mutta tämä selittyy sillä, että se huuhdeltiin vain kerran suolaliuoksen jälkeen. Näyte 6, joka pestiin

vedellä kahteen kertaan, on johtavuudeltaan samassa luokassa muiden näytteiden kanssa. Taulukossa XI näkyy näytteiden 5 ja 6 käytettyjen vesipesujen johtavuuden nousu. Näytteen 6 toisessa vesipesussa on vielä havaittavissa huomattava johtavuuden nousu, mutta sekin on merkittävästi pienempi kuin ensimmäisessä pesussa tapahtunut johtavuuden muutos. Näytteen 6 tuloksia verrattaessa muihin näytteisiin, on sen johtavuus kuitenkin hieman korkeampi. Tässäkin näkyy huuhtelukertojen merkitys johtavuuden arvoon. Näytteitä 1-4 käsiteltiin suolalatauksen jälkeen kolmessa suolattomassa liuoksessa, kun taas näytettä 6 käsiteltiin vain kahdessa liuoksessa.

Taulukko XI. Näytteiden 5 ja 6 vesipesujen johtavuuden nousu

| Liuos | Puhdas | Näyte 5 | Näyte 6 |
|---------------------|--------|---------|---------|
| 1. Vesipesu[mS/cm] | 0,0120 | 11,278 | 23,768 |
| 2. Vesipesu [mS/cm] | 0,0120 | - | 0,8596 |

Kun kaikkien kaksinkertaisesti päällystettyjen näytteiden ensimmäinen mittausarja kuvataan samassa kuvassa (kuva 22), nähdään kuinka tasaisena näytteiden johtavuudet pysyivät. Näyte 5 poislukien kaikkien näytteiden johtavuuskäyrät pysyvät myös vertailuarvojen, pH 3 HCl-liuoksen ja TC-HCl-liuoksen, johtavuusarvojen väliin. Myöskään ei havaita ladattujen ja lataamattomien näytteiden välisen johtavuuseron kasvua niinkuin havaittiin kerran päällystetyissä näytteissä. Ajan mukaan tasaisesti vapautuvasta suolasta ei siis ole tuloksien valossa näytteitä.



Kuva 22. Kaikkien näytteiden johtavuusmittaukset sekä pH 3 HCl ja TC-HCl referenssiluosten arvot

4.1.3 Suolalatausten pH-mittaukset

Kaikkien näytteiden mittaussiuoksen pH-arvo nousi oletetun mukaisesti asetyloidun dextraanin hajotessa. Kun ladattujen näytteiden lopullista pH-arvoa vertaa vastaavan lataamattoman näytteen lopulliseen pH-arvoon, havaitaan kuitenkin vain minimaalista muutosta (taulukko XII). Koska pH-arvon nouseminen tarkoittaa vapaiden H^+ -ionien vähenemistä, vaikuttaa noussut pH johtavuuden arvoon negatiivisesti, kuten kalibrointimittauksissa (kuva 6) havaittiin.

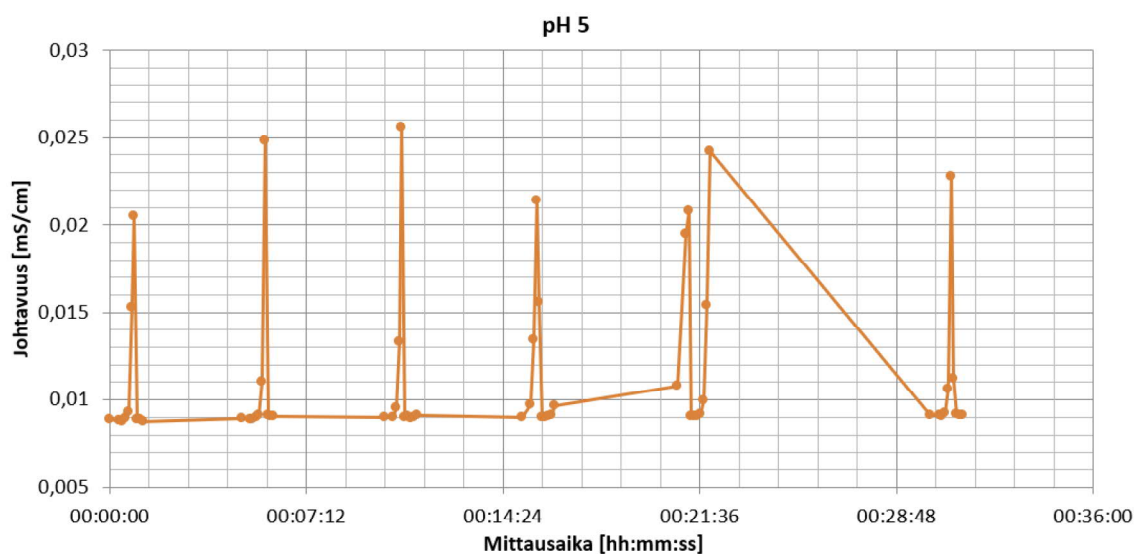
Taulukko XII. Näytteiden ja pH 3 HCl:n pH-arvot

| Näyte | pH | Δ pH (HCl) | Δ pH (Lataamaton) |
|-------|-------|-------------------|--------------------------|
| HCl | 3,045 | - | - |
| 0 | 3,149 | 0,104 | 0,027 |
| 0a | 3,122 | 0,077 | 0 |
| 1 | 3,137 | 0,092 | 0,011 |
| 1a | 3,126 | 0,081 | 0 |
| 2 | 3,192 | 0,147 | 0,066 |
| 3 | 3,189 | 0,144 | 0,063 |
| 4 | 3,124 | 0,079 | -0,002 |
| 5 | 3,123 | 0,078 | -0,003 |
| 6 | 3,111 | 0,066 | -0,015 |

Pelkästään pH:n nousu aiheuttaisi mittaliuosten laskevan johtavuudeltaan keskimäärin noin 0,05 mS/cm, edellämainitusta pH:n kalibraatiokuvaajasta luettuna. TC-partikkeleiden havaittiin nostavan puolestaan johtavuutta noin 0,07 mS/cm, jolloin absoluuttinen muutos johtavuudessa olisi 0,02 mS/cm nousu, mikä on yhteensopiva kuvan 22 kanssa. Tätä suurempi johtavuuden nousu saattaa johtua joko vapautuneesta suolasta tai kontaminaatioista. Esimerkiksi näytteiden 4 ja 6 johtavuus tasaantui noin 0,02 mS/cm ja 0,028 mS/cm korkeammalle kuin edellämainittu absoluuttinen muutos. Jos johtavuuden arvo johtuu suolasta, vastaisi johtavuuden nousu melkein puolta teoreettisesta latautumisesta. Kuvaajista ei myöskään havaittu suolan vapautuvan hitaasti, vaan joka tapauksessa vaikuttaa siltä, että suola vapautuisi huokosista käytännössä heti.

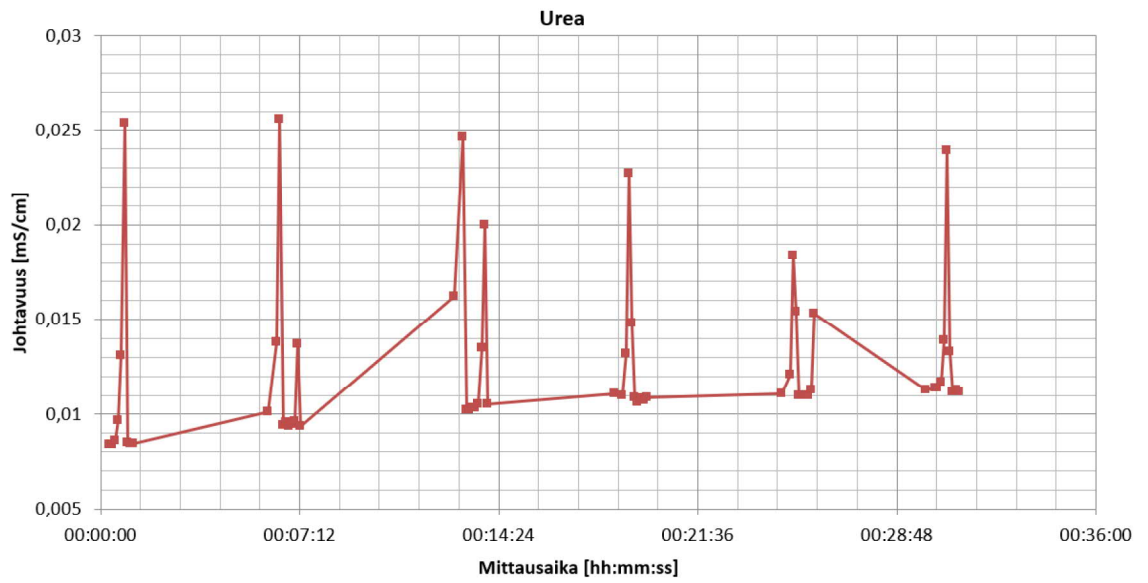
4.2 Lisämittaukset

Lisämittauksissa tavoitteena oli selvittää pystyykö johtavuuden avulla päättelemään boorihapon ja emäksisen urean latautumista huokosiin. Mittauksissa käytettiin suolalatauksiin verrattuna viisinkertaista konsentraatiota TCPSi:n suhteen 0,5 mg/ml, mikä vaikutti selkeästi pH-arvoon. Sekä urean että boorihapon pH-arvo nousi huomattavasti alkuperäisestä, mikä selittyy osittain asetyloidun dextraanin hajoamisella, mutta johtuu myös osittain TCPSi-partikkeleiden aiheuttamasta pH-muutoksesta. Suurin syy muutoksen suuruuteen on todennäköisesti pH-arvon logaritminen luonne. Lisämittauksissa käytetty pH 5 on aiemmissa mittauksissa käytettyä pH 3:sta huomattavasti alttiimpi pienemmillekin muutoksille, mikä käy selväksi jo kalibroitimittauksissa näkyvässä sisäisen tarkkuuden huononemisessa. Korkeammassa pH:ssa myös johtavuus on valmiiksi hyvin pieni, jolloin mittalaitteen erotustarkkuus pienenee ja tuloksissa näkyy selvää kohinaa ellei johtavuuden muutos ole tarpeeksi suuri. Kohina näkyy puhtaan pH 5 liuoksen johtavuuskuvaajasta selvästi (kuva 23).

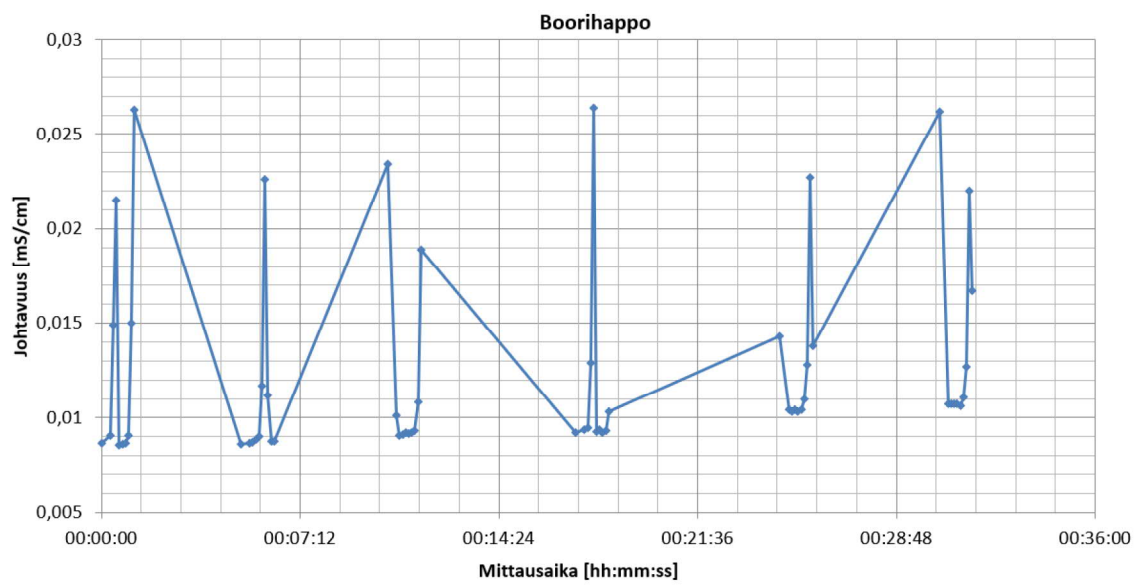


4.2.1 Johtavuusmittaukset

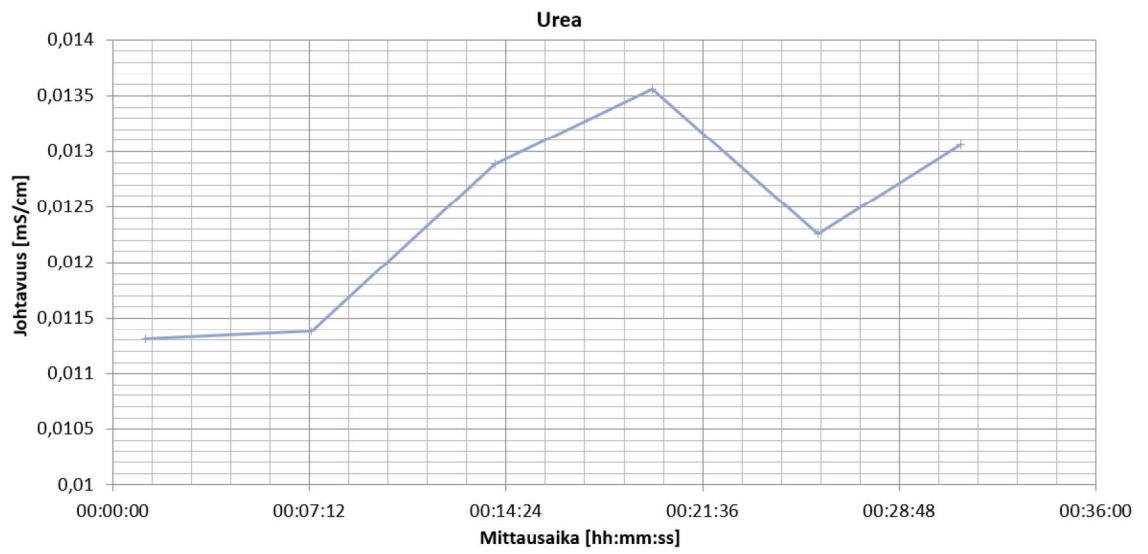
Sekä urean että boorihapon johtavuusarvoissa näkyy myös selvästi mittalaitteesta tai ulkoisesta häiriöstä johtuva kohina (kuvat 24 ja 25). Häiriöstä huolimatta urean ja boorihapon johtavuudet näyttävät nousevan hieman mittauksen loppuun mennessä. Tämä näkyy selvemmin, kun urean ja boorihapon kuvaajat muodostetaan kymmenen mittapisteen mittaussarjojen keskiarvoista kuten kuvissa 26 ja 27. Kohina näkyy myös lataamattomien partikkeleiden kuvaajassa 28, joten suuri arvojen heittely on todennäköisesti laitteistosta tai mittausten menetelmästä johtuva häiriö eikä yksittäisten mittaliuosten ominaisuus. Mittauslaitteisto ei ole tarkoitettu johtavuuden mittaamiseen, joten suuri vaihtelu arvoissa voi johtua myös mittaustarkkuuden riittämättömyydestä. Kun kolmen mittauksen mittaussarjojen keskiarvot kuvataan samassa kuvassa (kuva 29), nähdään kuinka pienistä eroista on kyse. Boorihapon ja urean johtavuus vaikuttaa kuitenkin olevan hieman lataamattomia partikkeleita alhaisempi. Alhaisempi johtavuus voi johtua urean ja boorihapon kemiallisista ominaisuuksista. Ne eivät ole ionien lailla varauksenkuljettajia, joten voi olla ettei johtavuus muutu suoraan verrannollisesti urean ja boorihapon konsentraatioon verrattuna.



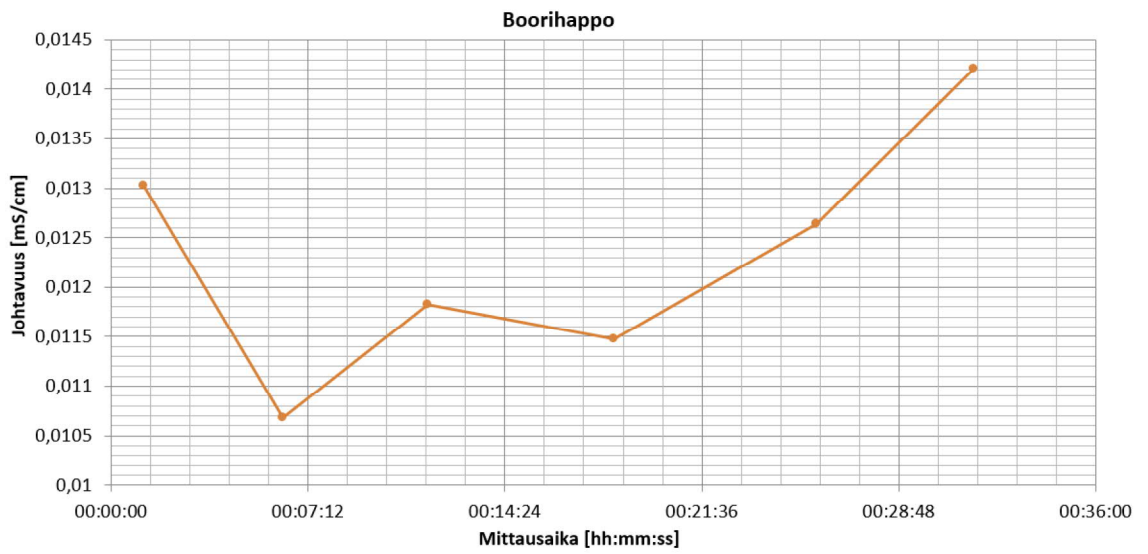
Kuva 24. Urean johtavuusmittaus



Kuva 25. Boorihapon johtavuusmittaus



Kuva 26. Urean johtavuusmittasarjojen keskiarvot



Kuva 27. Boorihapon johtavuusmittasarjojen keskiarvot

4.2.2 pH-mittaukset

Johtavuuden lisäksi lisämittauksissa pyrittiin selvittämään mitä tapahtuu mittausliuoksen pH-arvolle. Taulukossa XIII näkyy kuinka herkästi pH 5 -liuoksen pH-arvo muuttui. Tuloksissa näkyy boorihapon pH-arvon nousevan emäksiseen ureaan tai lataamattomiin partikkeleihin verrattuna vähemmän. Boorihapon happamuus ei silti riittä estämään pH-arvon nousua. Yllättävää tuloksissa puolestaan on puhtaiden TCPSi-partikkeleiden aiheuttama pH muutos. Näin suurta muutosta ei havaittu suolalatauksissa, mikä johtunee mittaliuosten matalammasta pH-arvosta ja TCPSi-partikkeleiden konsentraatiosta. Mittaliuosten pH-arvojen mittaamiseen käytetty pH-mittari on voinut ottaa myös häiriötä käytetyn ampullin pinnoista, koska näyte-liuoksen tilavuus oli pieni. Tulevissa mittauksissa tulisi käyttää suolalatausten lailla suurempia tilavuuksia häiriöiden minimoimiseksi.

Taulukko XIII. Lisämittausten pH-arvot mittausten lopuksi

| Näyte | pH | Δ pH |
|--------------------------|-------|-------------|
| pH 5 HCl | 5,005 | - |
| pH 5 HCl+TCPSi 0,5 mg/ml | 6,464 | 1,459 |
| Lataamaton | 6,635 | 1,630 |
| Urea | 6,495 | 1,490 |
| Boorihappo | 6,304 | 1,299 |

Näiden tulosten perusteella myös suolalatauksissa osa pH-muutoksesta voi johtua päällystyksen alta vapautuvista piipartikkeleista. Lisämittauksissa käytettiin toisaalta pienempää nestemäärää, mikä saattaa aiheuttaa pH-mittarissa virhettä. Tästä huolimatta tuloksien suhteista toisiinsa voi päätellä, että urea nostaa liuoksen emäksisyyttä boorihappoa enemmän ja siten saattaa nopeammin pysäyttää asetyloidun dextraanin hajoamisen dextraaniksi ja lopun urean vapautumisen. Partikkelien sisälle ladatun materiaalin aiheuttama pH-arvon nousu ei välttämättä ole

huono asia endosomista poispääsyn kannalta ja urean sekä boorihapon latauksia on hyvä tutkia enemmän. Endosomin toiminta on osittain pH-arvoa bufferoiva ja siten kumoaisi ainakin osan pH-arvon noususta ja mahdollistaisi lopun materiaalin vapautumisen huokosista. Huomataan kuitenkin ettei tällä mittalaitteistolla saa riittävän tarkkoja eroja materiaalien välille johtopäätösten tekemistä varten. Urea ja boorihappo eivät myöskään ole ionien lailla suoraan varauksenkuljettajia ja siten johtavuuden arvosta ei voida tehdä suoria johtopäätöksiä niiden läsnäolosta.

5 Yhteenveto

5.1 Huokosista vapautumisen havaitseminen johtavuudesta

Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään voidaanko huokoista piitä ladata suolalla ja havaita se johtavuuden nousulla. Tutkielman tuloksien mukaan huokosiin päätyy suolaa aiheuttaen johtavuusvasteen, mutta suola ei vapaudu huokosista hallitusti pölyllistyksen hajotessa, vaan näkyy johtavuudessa heti. Tuloksista voidaan päätellä suurimman osan mahdollisesti latautuneesta suolasta vapautuvan suoraan AcDEX-kerrosten läpi. Nähdään myös, kuinka pH-arvoltaan neutraalissa vedessäkin johtavuus kasvoi merkittävästi, joten pölyllistyksen liukenemisella ei ollut merkitystä suolan vapautumiseen. Tähän tulokseen päädytään myös tarkastelemalla johtavuusmittausten kuvaajia. Kuvaajissa ei esiinny johtavuuden hiljattaista nousua, vaan johtavuusarvo pysyy mittauksen rajoissa hyvin tasaisena. Mahdollisesti asetyloitunut dekstraani on molekyylikooltaan liian suuri estämään yksittäisten ionien kulkua. Tätä oletusta tukee, kun asetyloidun dekstraanin kerrosten määrän ei havaittu vaikuttavan pölyllistyksen kykyyn pitää suola huokosissa.

Näytteissä 1-4 toinen pölyllistys tehtiin puhtaaseen etanoliin valmistetussa pölyllistysliuoksessa. Tällöin partikkelien huokosissa olevan suolaveden ja ulkopuolella olevan pölyllistysliuoksen välillä on suuri ionikonsentraatioero, mikä saattoi aiheuttaa osittain ionien työntyvän pois huokosista laimeampaan liuokseen. Näytteiden 5 ja 6 toinen pölyllistys tehtiin valmiiksi suolakyllästetyssä liuoksessa, jolloin konsentraatioeron ei pitäisi vaikuttaa. Silti havaittiin huomattavaa kasvua vesipesun johtavuudessa, eli kyllästetyssä liuoksessa tehty pölyllistys ei vähentänyt suolan vapautumista huokosista. Koska kyllästetty pölyllistysliuos ei vaikuttanut suolan vapautumiseen, ei suola todennäköisesti vapaudu huokosista huuhteluliuokseen pelkän konsentraatioeron vuoksi.

Laskeva johtavuus on selitettävissä pH-arvon noususta johtuvasta vapaiden H^+ -ionien vähenemisestä, niiden muodostaessa OH^- -ionien kanssa vettä. Myös kalibroinnissa havaittiin johtavuuden muuttuvan rajusti pH:n funktiona matalassa pH-arvossa, kun taas korkeammassa pH-arvossa vaikutus johtavuuteen pienentyi. Korkeassa pH-arvossa puolestaan pH on hyvin altis muutoksille johtavuuden arvon muuttuessa vain hieman.

Kaikki tulokset pysyvät myös puhtaista TC-partikkeleista johtuvan johtavuuden nousun alapuolella, mistä voidaan päätellä, ettei mittaliuoksiin päätynyt suola riitä nostamaan johtavuutta merkittävästi puhtaisiin partikkeleihin verrattuna. Eri näytteidien eroavista tasaantuneista johtavuusarvoista nähdään, että mittausliuosten kokonaissuolamäärät eroavat toisistaan. Suola on siis joko latautunut huokosiin, mutta pääsee vapaasti päällystyskerrosten läpi, tai se on päätynyt mittaliuokseen kontaminaation välityksellä. Mahdollisia lähteitä on valmistusvaiheessa ja mittausjärjestelmän pesussa. Valmistusvaiheessa koeputkiin jää hieman suolarikasta pesuliuosta, koska koeputkea ei saa täysin tyhjäksi. Vaihtoehtoisesti mittausjärjestelmän pesuun käytetyistä HCl- ja KOH-liuoksista on voinut jäädä jäämiä silikoniletkuun.

Lisämittauksissa puolestaan havaittiin mittalaitteiston riittämättömyys kyseiseen tutkimukseen. Lähempänä neutraalia pH-arvoa, johtavuuden arvo on hyvin pieni, minkä vuoksi tuloksissa on merkittävää kohinaa mittalaitteen ottamien häiriöiden vuoksi. Korkeamman pH:n liuos on myös happamampia alttiimpi korkeasta TC- ja AcDEX-konsentraatioista johtuville pH-muutoksille. Mittausliuosten pH-arvo nousi hyvin lähelle neutraalia, jolloin asetyloitu dextraani lopettaa liuokseen hajoamisen ja huokosista vapautuminen saattaa loppua tai ainakin vaikeutua. Kohinan ja nousseen pH-arvon vuoksi tuloksista ei voida tehdä suoria johtopäätöksiä urean tai boorihapon vapautumisesta.

5.2 Parannusmahdollisuuksia ja mahdollisia lisätutkimuksia

Tässä tutkielmassa tutkittiin suolan lataamista termisesti karbidoitujen partikkeleiden huokosiin vain yhdellä latausajalla ja päällystysajalla. Pidentämällä latausaikaa varmistettaisiin suolan latautuminen ja toisaalta pidentämällä asetyloidun dextraanin vaikutusaikaa saataisiin mahdollisesti muodostettua paksumpi ja tiheämpi kerros partikkelin päälle. Paksu ja tiheä kerros voi estää ionien läpikulkua tehokkaammin, mutta myös pidentäisi mahdollista vapautumisaikaa ja lisäisi pH-vaikutusta. Välineistön puutteen vuoksi päällystyskerroksen paksuutta ei tutkittu eksplisiittisesti kuvantamismenetelmillä. Päällystyskerroksen analysointi voisi antaa mielenkiintoisia tuloksia, varsinkin suolalatauksen jälkeen olisi mielenkiintoista nähdä näkyisikö ladattujen ja lataamattomien partikkeleiden välillä eroja päällystyksessä.

Vaikkakin tässä työssä käytetty TC-partikkeleiden konsentraatio mittaliuoksessa (0,100 mg/ml) on todistetusti turvallinen ihmiselle [29] ja huokosiin latautuvan suolan määrä teoriassa mitattavissa käytetyillä laitteilla, voisi lisätutkimuksissa käyttää urea- ja boorihappomittausten lailla korkeampaa konsentraatiota suurempien erojen saamiseksi. Suurempi konsentraatio on myös perusteltavissa endosomin käyttäytymisellä. Endosomi kerää soluun tarttuneita partikkeleita ja siten sen sisällä on todennäköisemmin korkeampi konsentraatio partikkeleita kuin solun ulkopuolella. Suuremmalla konsentraatiolla myös partikkeleiden aiheuttama johtavuuden ja pH-arvon muutos kasvaa, joten sekään ei ole täysin ongelmatonta. Suuri konsentraatio TC-partikkeleita kasvattaisi myös asetyloidun dextraanin määrää mittaliuoksessa huomattavasti. Asetyloidun dextraanin havaittiin aiheuttavan jo pienellä konsentraatiolla suuria muutoksia pH-arvoon, joten suuremmalla konsentraatiolla pitäisi pH-muutoksesta johtuvat seuraukset johtavuudessa ja päällystysen hajoisissa ottaa huomioon. Osittain pH-arvon muuttumista voisi estää käyttämällä mittaliuoksen pohjana esimerkiksi McIlvaine buffereita pH 4:ssä ja mahdollisesti neutraalissa pH 7:ssä. Bufferin johtavuus ei tosin pysy vakiona, mutta mahdollisen

eron ladattujen ja lataamattomien välillä saattaisi havaita.

Mittausvälineistönä Malvern Pananalyticalin Zetasizer-laitteisto ei ole ideaali johtavuuden mittaamiseen. Johtavuusarvo heitteli rajusti mittaussarjojen sisällä varsinkin pienissä arvoissa. Mahdollisia parempia tapoja selvittää johtavuutta olisi ioniselektiiviset elektrodit. ISE-laitteistolla saisi suoraan halutun ionin konsentraation mittaliuoksessa ajan mukaan. Laitteistolla ei tosin pysty tutkimaan montaa eri ionia, joten siinäkin on ongelmansa. Johtavuus ei välttämättä ole myöskään ainut mitattava suure, millä selvittää ionien vapautumista. Jatkotutkimuksiin voisi mahdollisesti valita saostettavissa olevia suoloja, jolloin mittausliuoksiin liuenneet ionit havaittaisiin epäsuorasti saostuneen materiaalin määrästä.

Mahdollisista lisätutkimuksista mielenkiintoisimpia ovat eri päällystysmateriaalien tai vaihtoehtoisesti ladattavan materiaalin vaihtaminen. Partikkeleita voisi päällystää jollakin tiheämmällä päällystysaineella kuin asetyloitu dextraani. Tehtyjen lisätutkimusten mukaisesti huokosiin ladattava materiaali voi myös olla happo tai emäs, mikä oletettavasti aiheuttaisi endosomissa pH-vasteen ja mahdollisesti osmoottisesta paineesta aiheutuvan rakkulan hajoamisen. Myös pohjana toimivan huokosen piin stabilointimenetelmää voisi vaihtaa toiseen bioyhteensopivaan pintakeemiaan. Termisesti oksidoidun piin tapauksessa happamassa liuoksessa tapahtuva liukeneminen ja Mg^{2+} -kaltaisten ionien kanssa sakkautuminen voisi mahdollistaa huokosten osittaisen tukkiutumisen ja siten auttaa sakkautumattomien ionien, kuten Cl^- , pysymistä huokosissa. Riskinä on huokosten tukkiutuminen täysin. Tässä tutkimuksessa tähän ei pyritty, joten päädyttiin termisesti karbidoituun piihin. Tästä huolimatta TOPSi voi olla tutkimisen arvoinen vaihtoehto.

Mahdollisten lisätutkimuksien jälkeen seuraava askel on viedä valmistetut partikkelit solututkimuksiin. Partikkeleihin lisättäisiin merkkiainetta kuten fluoresceiniä, osoittamaan partikkeliin sijainti soluissa ja mahdollinen endosomin hajoaminen havaittaisiin spektrometrillä. Endosomista vapautumiselle on kehitetty lukuisia keino-

ja, joten tutkimusvaihtoehtoja huokosiin ladattaville materiaaleille on myös lukuisia. Tässä tutkielmassa keskityttiin vain kapealle alalle mahdollisista keinoista aiheuttaa endosomaalisen rakkulan hajoaminen. Toimiessaan, suolaepätasapainoon perustuva menetelmä saattaisi olla halpa ja yksinkertainen muihin menetelmiin verrattuna. Lisätutkimuksia tarvitaan.

Viitteet

- [1] E. J. Anglin, L. Cheng, W. R. Freeman ja M. J. Sailor, *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1266 (2008).
- [2] M. J. Sailor, *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications* (Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011), p. 262.
- [3] J. Salonen ja V. P. Lehto, *Chemical Engineering Journal* **137**, 162 (2008).
- [4] O. Keinänen, E. M. Mäkilä, R. Lindgren, H. Virtanen, H. Liljenbäck, V. Oikonen, M. Sarparanta, C. Molthoff, A. D. Windhorst, A. Roivainen, J. J. Salonen ja A. J. Airaksinen, *ACS Omega* **2**, 62 (2017).
- [5] D. J. Savage, X. Liu, S. A. Curley, M. Ferrari ja R. E. Serda, *Current Opinion in Pharmacology* **13**, 834 (2013).
- [6] L. T. Canham, *Advanced Materials* **7**, 1033 (1995).
- [7] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm ja H. J. Haisma, *Journal of Controlled Release* **151**, 220 (2011).
- [8] E. M. Bachelder, E. N. Pino ja K. M. Ainslie, *Chemical Reviews* **117**, 1915 (2017).
- [9] K. E. Broaders, J. A. Cohen, T. T. Beaudette, E. M. Bachelder ja J. M. J. Fre, **106**, 5497 (2009).
- [10] K. J. Kauffman, C. Do, S. Sharma, M. D. Gallovic, E. M. Bachelder ja K. M. Ainslie, *ACS Applied Materials and Interfaces* **4**, 4149 (2012).
- [11] Z. Cheng, A. Al Zaki, J. Z. Hui, V. R. Muzykantov ja A. Tsourkas, *Science* (New York, N.Y.) **338**, 903 (2012).

- [12] R. E. Serda, B. Godin, E. Blanco, C. Chiappini ja M. Ferrari, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1810**, 317 (2011).
- [13] R. Duncan ja R. Gaspar, *Molecular Pharmaceutics* **8**, 2101 (2011).
- [14] E. Blanco, A. Hsiao, A. P. Mann, M. G. Landry, F. Meric-Bernstam ja M. Ferrari, *Cancer Science* **102**, 1247 (2011).
- [15] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink ja G. Storm, *Molecular Pharmaceutics* **7**, 1899 (2010).
- [16] H. A. Santos, E. Mäkilä, A. J. Airaksinen, L. M. Bimbo ja J. Hirvonen, *Nanomedicine* **9**, 535 (2014).
- [17] H.-C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S. K. Dey ja K. Rege, *Journal of Controlled Release* **155**, 344 (2011).
- [18] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim ja I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2656 (2012).
- [19] C. F. Wang, E. M. Mäkilä, M. H. Kaasalainen, D. Liu, M. P. Sarparanta, A. J. Airaksinen, J. J. Salonen, J. T. Hirvonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **35**, 1257 (2014).
- [20] P. J. Kinnari, M. L. K. Hyvönen, E. M. Mäkilä, M. H. Kaasalainen, A. Rivinoja, J. J. Salonen, J. T. Hirvonen, P. M. Laakkonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **34**, 9134 (2013).
- [21] L. M. Bimbo, E. Mäkilä, J. Raula, T. Laaksonen, P. Laaksonen, K. Strommer, E. I. Kauppinen, J. Salonen, M. B. Linder, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **32**, 9089 (2011).
- [22] L. M. Bimbo, E. Mäkilä, T. Laaksonen, V.-P. Lehto, J. Salonen, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **32**, 2625 (2011).

- [23] M. P. Sarparanta, L. M. Bimbo, E. M. Mäkilä, J. J. Salonen, P. H. Laaksonen, K. A. M. Helariutta, M. B. Linder, J. T. Hirvonen, T. J. Laaksonen, H. A. Santos ja A. J. Airaksinen, *Biomaterials* **33**, 3353 (2012).
- [24] D. Liu, L. M. Bimbo, E. Mäkilä, F. Villanova, M. Kaasalainen, B. Herranz-Blanco, C. M. Caramella, V. P. Lehto, J. Salonen, K. H. Herzig, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Journal of Controlled Release* **170**, 268 (2013).
- [25] J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen ja V. P. Lehto, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**, 632 (2008).
- [26] S. H. C. Anderson, H. Elliott, D. J. Wallis, L. T. Canham ja J. J. Powell, *Physica Status Solidi (A) Applied Research* **197**, 331 (2003).
- [27] L. T. Canham, C. L. Reeves, J. P. Newey, M. R. Houlton, T. I. Cox, J. M. Buriak ja M. P. Stewart, *Advanced Materials* **11**, 1050 (1999).
- [28] N. K. Hon, Z. Shaposhnik, E. D. Diebold, F. Tamanoi ja B. Jalali, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **100 A**, 3416 (2012).
- [29] M. A. Shahbazi, M. Hamidi, E. M. Mäkilä, H. Zhang, P. V. Almeida, M. Kaasalainen, J. J. Salonen, J. T. Hirvonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **34**, 7776 (2013).
- [30] D. Liu, E. Mäkilä, H. Zhang, B. Herranz, M. Kaasalainen, P. Kinnari, J. Salonen, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Advanced Functional Materials* **23**, 1893 (2013).
- [31] H. Zhang, D. Liu, M. A. Shahbazi, E. Mäkilä, B. Herranz-Blanco, J. Salonen, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Advanced Materials* **26**, 4497 (2014).
- [32] J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä,

- K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen ja V. P. Lehto, *Journal of Controlled Release* **108**, 362 (2005).
- [33] A. M. Kaukonen, L. Laitinen, J. Salonen, J. Tuura, T. Heikkilä, T. Linnell, J. Hirvonen ja V. P. Lehto, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **66**, 348 (2007).
- [34] L. Y. T. Chou, K. Ming ja W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 233 (2011).
- [35] A. Uhlir, *Bell System Technical Journal* **35**, 333 (1956).
- [36] D. R. Turner, *Journal of the electrochemical Society* **105**, 402 (1958).
- [37] Y. Watanabe ja T. Sakai, *Review of The Electrical Communications Laboratories* **19**, 899 (1971).
- [38] M. Kaasalainen, *Characterization of Porous Silicon Nanoparticles for Biomedical Applications*, 2017.
- [39] E. Secret, K. Smith, V. Dubljevic, E. Moore, P. Macardle, B. Delalat, M. L. Rogers, T. G. Johns, J. O. Durand, F. Cunin ja N. H. Voelcker, *Advanced Healthcare Materials* **2**, 718 (2013).
- [40] P. Kinnari, E. Mäkilä, T. Heikkilä, J. Salonen, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *International Journal of Pharmaceutics* **414**, 148 (2011).
- [41] N. Vale, E. Mäkilä, J. Salonen, P. Gomes, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81**, 314 (2012).
- [42] M. Tahvanainen, T. Rotko, E. Mäkilä, H. A. Santos, D. Neves, T. Laaksonen, A. Kallonen, K. Hämäläinen, M. Peura, R. Serimaa, J. Salonen, J. Hirvonen ja L. Peltonen, *International Journal of Pharmaceutics* **422**, 125 (2012).

- [43] E. Mäkilä, L. M. Bimbo, M. Kaasalainen, B. Herranz, A. J. Airaksinen, M. Heinonen, E. Kukk, J. Hirvonen, H. A. Santos ja J. Salonen, *Langmuir* **28**, 14045 (2012).
- [44] V. Lehmann, R. Stengl ja A. Luigart, *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* **69**, 11 (2000).
- [45] J. Salonen, V. P. Lehto, M. Björkqvist, E. Laine ja L. Niinistö, *Physica Status Solidi (A) Applied Research* **182**, 123 (2000).
- [46] L. M. Bimbo, M. Sarparanta, A. Santos, A. J. Airaksinen, E. Ma, H. A. Santos, A. J. Airaksinen, E. Mäkilä, T. Laaksonen, L. Peltonen, V. P. Lehto, J. Hirvonen ja J. Salonen, *ACS Nano* **4**, 3023 (2010).
- [47] J. Remes, S. Beke, T. Hu ja S. Leppa, *Applied Surface Science* **178**, 190 (2001).
- [48] J. Riikonen, M. Salomäki, J. Van Wonderen, M. Kemell, W. Xu, O. Korhonen, M. Ritala, F. MacMillan, J. Salonen ja V. P. Lehto, *Langmuir* **28**, 10573 (2012).
- [49] J. Salonen, M. Björkqvist, E. Laine ja L. Niinistö, *Applied Surface Science* **225**, 389 (2004).
- [50] J. Salonen ja E. Mäkilä, *Advanced Materials* **1703819**, (2018).
- [51] H. A. Santos, J. Riikonen, J. Salonen, E. Mäkilä, T. Heikkilä, T. Laaksonen, L. Peltonen, V. P. Lehto ja J. Hirvonen, *Acta Biomaterialia* **6**, 2721 (2010).
- [52] L. A. Osminkina, A. L. Nikolaev, A. P. Sviridov, N. V. Andronova, K. P. Tamarov, M. B. Gongalsky, A. A. Kudryavtsev, H. M. Treshalina ja V. Y. Timoshenko, *Microporous and Mesoporous Materials* **210**, 169 (2015).
- [53] P. A. Ferreira, S. M. Kinnunen, J. Rys, R. E. Serpi, P. J. Ohukainen, A. M. R. Correia, J. J. Salonen, J. T. Hirvonen ja H. J. Ruskoaho, **35**, 8394 (2014).

- [54] J. Fominaya ja W. Wels, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10560 (1996).
- [55] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, O. Press, N. Murthy, C. A. Lackey, C. Cheung, F. Black, J. Campbell, N. Fausto, T. R. Kyriakides ja P. Bornstein, *Polymers for Advanced Technologies* **13**, 992 (2002).
- [56] J. Gruenberg ja F. G. van der Goot, *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 495 (2006).
- [57] O. Meier ja U. F. Greber, *Journal of Gene Medicine* **5**, 451 (2003).
- [58] J. M. Hogle, *Annual Review of Microbiology* **56**, 677 (2002).
- [59] M. Mandal ja K. D. Lee, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1563**, 7 (2002).
- [60] R. A. Parente, S. Nir ja F. C. Szoka, *Journal of Biological Chemistry* **263**, 4724 (1988).
- [61] S. Kobayashi, I. Nakase, N. Kawabata, H. H. Yu, S. Pujals, M. Imanishi, E. Giralt ja S. Futaki, *Bioconjugate Chemistry* **20**, 953 (2009).
- [62] M. Horth, B. Lambrecht, M. C. Khim, F. Bex, C. Thiriart, J. M. Ruyschaert, a. Burny ja R. Brasseur, *The EMBO journal* **10**, 2747 (1991).
- [63] D. C. Wiley ja J. J. Skehel, *Annual Review of Biochemistry* 365 (1987).
- [64] L. Prasmickaite, A. Høgset ja K. Berg, *Photochemistry and photobiology* **73**, 388 (2001).
- [65] M. M. Fretz, A. Høgset, G. A. Koning, W. Jiskoot ja G. Storm, *Pharmaceutical Research* **24**, 2040 (2007).
- [66] S. Oliveira, M. M. Fretz, A. Høgset, G. Storm ja R. M. Schiffelers, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1768**, 1211 (2007).

- [67] H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W. D. Jang, N. Nishiyama ja K. Kataoka, *Pharmaceutical Research* **26**, 82 (2009).
- [68] T. Endoh ja T. Ohtsuki, *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 704 (2009).
- [69] T. Endoh, M. Sisido ja T. Ohtsuki, *Bioconjugate Chemistry* **19**, 1017 (2008).
- [70] K. Berg, P. K. Selbo, L. Prasmickaite, T. E. Tjelle, K. Sandvig, J. Moan, G. Gaudernack, Ø. Fodstad, S. Kjølrsrud, H. Anholt, G. H. Rodal, S. K. Rodal ja A. Høgset, *Cancer Research* **59**, 1180 (1999).
- [71] P. J. Lou, P. S. Lai, M. J. Shieh, A. J. MacRobert, K. Berg ja S. G. Bown, *International Journal of Cancer* **119**, 2692 (2006).
- [72] M. V. Yezhelyev, L. Qi, R. M. O. Regan ja S. Nie, *Journal of American Chemical Society* **130**, 9006 (2008).
- [73] A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, D. J. Crommelin ja W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **5**, 32 (2004).
- [74] D. W. Pack, D. Putnam ja R. Langer, *Biotechnology and Bioengineering* **67**, 217 (2000).
- [75] C. Lin ja J. F. J. Engbersen, *Journal of Controlled Release* **132**, 267 (2008).
- [76] T. F. Martens, K. Remaut, J. Demeester, S. C. De Smedt ja K. Braeckmans, *Nano Today* **9**, 344 (2014).
- [77] J. E. Fuller, G. T. Zugates, L. S. Ferreira, H. S. Ow, N. N. Nguyen, U. B. Wiesner ja R. S. Langer, *Biomaterials* **29**, 1526 (2008).
- [78] M. Thomas ja A. M. Klibanov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9138 (2003).

- [79] D. K. Miller, E. Griffiths, J. Lenard ja R. A. Firestone, *Journal of Cell Biology* **97**, 1841 (1983).
- [80] J. Kang, J. Joo, E. J. Kwon, M. Skalak, S. Hussain, Z. G. She, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia ja M. J. Sailor, *Advanced Materials* **28**, 7962 (2016).
- [81] D. Liu, H. Zhang, E. Mäkilä, J. Fan, B. Herranz-Blanco, C. F. Wang, R. Rosa, A. J. Ribeiro, J. Salonen, J. Hirvonen ja H. A. Santos, *Biomaterials* **39**, 249 (2015).