

Kultananopartikkeleiden toksisuus

TkK-tutkielma
Turun Yliopisto
Materiaalitekniikan laitos
Materiaalitekniikka

Laatija:
Janette Pihlaja

14.5.2025
Turku

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

Kandidaatintutkielma

Tutkinto-ohjelma, oppiaine: Materiaalitekniikka

Tekijä: Janette Pihlaja

Otsikko: Kultananopartikkeleiden toksisuus

Ohjaaja: Väitöskirjatutkija Johanna Suni

Sivumäärä: 22 sivua

Päivämäärä: 14.5.2025

Tässä tutkielmassa käsitellään kultananopartikkelien toksisuutta ja esitellään kultananopartikkeleiden ominaisuuksia ja valmistusmenetelmiä. Tutkielmassa esitellään yleisimmät toksisuustutkimukset *in vitro* ja *in vivo* -menetelmät, sekä niiden avulla yleisesti tunnetut partikkeleiden toksisuusvaikutukset. Tutkielman tarkoitus on vastata kysymyksiin: mitä on kultananopartikkeleiden toksisuus, miten se ilmenee, miten toksisuutta tutkitaan ja mitkä kultananopartikkeleiden ominaisuudet erityisesti vaikuttavat toksisuuteen sekä millä tavoilla toksisuutta voidaan vähentää tai hallita.

Kultananopartikkeleiden koolla ja pinnan ominaisuuksilla on havaittu olevan vaikutusta niiden aiheuttamaan toksisuuteen soluissa ja koko elimistössä. Kultananopartikkeleiden kertyminen elimiin on yksi yleisimmistä toksisuuden piirteistä. Soluun päässyt kultananopartikkeli voi aiheuttaa laajaa tuhoa solussa ja muokata solun geeniperimää. Toksisuuden vähentämiseksi kultananopartikkeleiden ominaisuudet on tunnettava tarkasti, jotta toksisuustekijöihin voidaan vaikuttaa. Toksisuuteen voidaan vaikuttaa esimerkiksi hallitsemalla partikkelin pintavarausta, jotta partikkelin pääsy soluun voidaan estää. Toksisuuteen voidaan vaikuttaa muun muassa pinnoittamalla partikkeli polymeerillä, jolloin partikkelin päästyä elimistöön se reagoisi mahdollisimman vähän ei-toivottujen aineiden kanssa.

Kultananopartikkeleita voidaan kuitenkin hyödyntää monella tavalla eri sovelluksissa, esimerkiksi lääketieteessä lääkeaineen kuljettajina. Syöpälääkkeiden kohdentaminen syöpäsoluihin tai -kasvaimiin on kiinnostava tutkimuksen kohde, jonka vuoksi toksisuustekijät on tiedostettava, jotta partikkeleita voidaan käyttää ihmiskehossa. Kultananopartikkeleiden aiheuttaman toksisuuden vähentäminen ja partikkeleiden testaaminen ihmiskehossa vaatii vielä paljon tutkimusta ja resursseja.

Avainsanat: kultananopartikkeli, toksisuus, *in vitro*, *in vivo*

Sisällysluettelo

1	Johdanto	4
2	Kultananopartikkeleiden ominaisuudet	6
2.1	Fysikaaliset ominaisuudet	6
2.2	Kemialliset ominaisuudet	7
2.3	Biologiset ominaisuudet	7
2.4	Sovellukset	8
3	Kultananopartikkeleiden valmistus	10
3.1	Kemialliset menetelmät	10
3.2	Fysikaaliset menetelmät	11
3.3	Biologiset menetelmät	11
4	Toksisuus ja sen tutkiminen	13
4.1	Toksisuus	13
4.2	Toksisuustutkimukset	14
4.2.1	Karakterisointi	15
4.2.2	<i>In vitro</i> -menetelmät	16
4.2.3	<i>In vivo</i> -menetelmät	18
4.3	Toksisuuteen vaikuttaminen	20
4.3.1	Kultananopartikkeleiden ominaisuuksien vaikutus toksisuuteen	21
4.3.2	Toksisuuteen vaikuttaminen	21
5	Pohdinta ja yhteenveto	24
6	Lähteet	26

1 Johdanto

Metallinanopartikkelit ovat osa nanoteknologiaa, joka koki suuren teknologian kehityksen 2000 luvulla [1]. Metallinanopartikkeleiden ympärillä on valtavasti tutkimusta ja niiden sovelluskäyttömahdollisuuksia tutkitaan jatkuvasti. Sovelluskohteita ovat esimerkiksi biologinen diagnostiikka, lääketieteessä syövän hoito ja lääkeaineiden kuljetus. Metalleista kulta, hopea, platina, titaani, cerium, kupari, sinkki, rauta, alumiini ja nikkeli ovat yleisimmät metallit, joista valmistetaan nanopartikkeleita. Metallinanopartikkeleita voidaan valmistaa myös erilaisista metalliseoksista [1]. Tässä tutkielmassa perehdytään kultananopartikkeleihin, niiden käyttöön ja ominaisuuksiin.

Kultananopartikkelit ovat kooltaan noin 1–100 nm [1]. Niiden valmistusmenetelmät ovat yksinkertaisia ja helppoja synteesisimenetelmiä. Kultananopartikkeleille ominaisia fysikaaliskemiallisia piirteitä ovat esimerkiksi pieni koko, suuri pinta-ala-tilavuus-suhde, korkea pintareaktiivisuus, liukoisuus ja tietynlainen muoto, jotka voivat olla sovelluksesta riippuen joko hyödyksi tai haitaksi.

Kultananopartikkeleiden laajamittainen käyttö on herättänyt kysymyksiä niiden turvallisuudesta biologisissa ja ekologisissa järjestelmissä [1]. On havaittu, että kultananopartikkelit voivat aiheuttaa toksisuutta soluissa ja häiriöitä elimistön toiminnassa. Kultananopartikkeleiden päästyä elimistöön, ne voivat aiheuttaa muutoksia jopa solujen perimässä ja pahimmillaan partikkelin pääsy soluun voi johtaa solukuolemaan [1].

Kultananopartikkeleiden aiheuttamaa toksisuutta tutkitaan sekä solulinjoissa että koe-eläimissä [1]. Toksisuustutkimuksia hyödyntämällä saadaan tietoa kultananopartikkeleiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien vaikutuksista toksisuuteen. Kultananopartikkeleiden pinnan ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa pinnoittamalla tai funktionalisoimalla partikkelit, millä voidaan vähentää toksisia vaikutuksia tai lisätä tiettyjä ominaisuuksia [2]. Funktionalisoinnin avulla kultananopartikkelin pinta voi adsorboida pintaansa esimerkiksi syöpälääkeaineita. Kulta on myös hyvin bioyhteensopiva materiaali, jonka ansiosta biolääketieteen ja lääketieteen sovellukset ovat mahdollisia [1, 2].

Tässä tutkielmassa esitellään kultananopartikkeleiden ominaisuuksia ja valmistusmenetelmiä. Työn tavoitteena on esitellä ja käsitellä, mitä on kultananopartikkeleiden toksisuus ja miten sitä tutkitaan erilaisten *in vitro*- ja *in vivo* -menetelmien avulla. Lisäksi tutkielmassa käsitellään, mitkä kultananopartikkeleiden ominaisuudet vaikuttavat toksisuuteen, miten niihin ja muihin

toksisuustekijöihin voidaan vaikuttaa. Tutkielman lopuksi on myös pohdintaa kultananopartikkeleiden ja niiden käytön tulevaisuuden näkymistä.

2 Kultananopartikkeleiden ominaisuudet

Kultananopartikkeleiden ominaisuudet jaotellaan fysikaalisiin, kemiallisiin ja biologisiin ominaisuuksiin. Kultananopartikkeleiden toksisuuteen vaikuttaa eniten fysikaalisista ominaisuuksista partikkelin koko ja kemiallisista ominaisuuksista pinnan kemia sekä vuorovaikutukset. Biologisista ominaisuuksista toksisuuden kannalta merkittävimmät ovat bioyhteesopivuus ja proteiinikorona.

2.1 Fysikaaliset ominaisuudet

Kultananopartikkelit jaetaan koon puolesta pieniin (< 5nm), keskikokoisiin ja suuriin (>50 nm) nanopartikkeleihin [3]. Yksittäisellä nanopartikkelilla on ydin, jonka ympärillä on pintapinnoite [2]. Kultananopartikkelit jaetaan muodoltaan yksiulotteisiin, kaksiulotteisiin ja kolmiulotteisiin nanopartikkeleihin [1]. Yksiulotteisiin nanopartikkeleihin kuuluvat esimerkiksi nanojohdot, nanotangot ja nanoputket. Kaksiulotteisiin nanopartikkeleihin kuuluvat esimerkiksi nanotähdet, viisikulmioiset ja suorakulmion muotoiset nanopartikkelit. Kolmiulotteisiin nanopartikkeleihin puolestaan luokitellaan esimerkiksi pallon muotoiset ja haarautuneet nanopartikkelit. Pallon muotoiset nanopartikkelit ovat yksi yleisimmistä muodoista, jota käytetään lääketieteellisissä sovelluksissa [2]. Kullalla on symmetrinen kuutiokeskeinen (engl. face-centered cubic, fcc) rakenne [4].

Kultananopartikkeleiden tärkeä optinen ominaisuus on pintaplasmoniresonanssi, jolla tarkoitetaan valon sähkömagneettisen kentän resonointia kultananopartikkelin pintaan liittyvien vapaiden elektronien kanssa [5]. Kultananopartikkelin kokoa ja muotoa säätelemällä, voidaan vaikuttaa partikkelin absorptio- ja sironta -spektreihin, joita hyödynnetään partikkelin väliaineen muutosten tutkimiseen [3]. Absorptio ja sironta ilmenevät eri väreinä, joiden avulla saadaan tietoa esimerkiksi kultananopartikkelin muodosta, koosta ja ympäröivästä väliaineesta.

Kultananopartikkeleilla on suuri pinta-ala-tilavuus-suhde, mikä vaikuttaa niiden reaktiokykyyn. Suuri pinta-ala-tilavuus-suhde tarkoittaa sitä, että nanopartikkeleilla on suuri pinta-ala verrattuna sen tilavuuteen [6]. Tämä ominaisuus lisää pintahiukkasten aktiivisuutta ja mahdollistaa useiden biomolekyylien kuljettamisen niiden pinnalla [5, 7]. Pinta-alan lisäksi kultananopartikkelin pinnan varaus vaikuttaa partikkelin käyttäytymiseen elimistössä ja solussa [3]. Kultananopartikkelin varaus voi olla positiivinen, neutraali tai negatiivinen, riippuen siitä miten se on valmistettu. Pintavarauksen voi muuttua veressä olevien elektrolyyttien ja proteiinien vaikutuksesta. Positiivisesti varautuneet kultananopartikkelit ovat alttiimpia aggregoitumiselle

kuin negatiiviset. Solukalvon varaus on negatiivinen, mikä edistää vuorovaikutusta erityisesti positiivisesti varautuneiden kultananopartikkeleiden kanssa [3].

2.2 Kemialliset ominaisuudet

Kemiallisiin ominaisuuksiin kuuluvat kultananopartikkelin pintakemia ja funktionalisaatio [8]. Partikkeli voidaan funktionalisoida sovelluskohteen mukaan. Kultananopartikkelin pinnan funktionalisoinnilla voidaan saavuttaa parempi biologinen yhteensopivuus ja stabiloida partikkeli. Partikkelin pintaa voidaan modifioida sitomalla siihen esimerkiksi tioleja ja proteiineja [8, 9]. Pintakemialla ja funktionalisoinnilla voidaan lisäksi pidentää nanopartikkelin elinikää tai estää sen hajoamista elimistössä [1].

Stabiiliudella tarkoitetaan nanopartikkeleiden kykyä säilyttää muotonsa, kokonsa ja dispersionsa, kun nanopartikkelin elinikä kasvaa ja ympäristö vaihtelee [9]. Stabiiliutta voidaan parantaa esimerkiksi käyttämällä natriumsitraattia kultananopartikkeleiden valmistuksessa. Pinnan stabilointi estää kultananopartikkeleiden aggregoitumista eli kasautumista. Agregoitumiseen voidaan vaikuttaa muokkaamalla myös kultananopartikkeleita sisältävän liuoksen pH:ta ja ionivahvuutta [9].

Kultananopartikkelit vuorovaikuttavat helposti muiden aineiden kanssa, kuten esimerkiksi solujen kasvatusalustoilla aminohappojen tai vitamiinien kanssa [3]. Vuorovaikutusten seurauksena partikkelin koko tai pintavaraus voi muuttua [3, 9]. Kultananopartikkelit voivat myös vuorovaikuttaa solujen kanssa tai läpäistä solukalvon vuorovaikutusten seurauksena.

2.3 Biologiset ominaisuudet

Fysikaaliskemialliset ominaisuudet vaikuttavat suoraan kultananopartikkeleiden biologisiin ominaisuuksiin. Biologisiin ominaisuuksiin kuuluvat kultananopartikkeleiden solutoksisuus ja genotoksisuus sekä sisäänotto soluihin. Nämä ovat kaikki riippuvaisia partikkelin kemiallisista ja fysikaalisista ominaisuuksista. Esimerkiksi kultananopartikkelin koko vaikuttaa kultananopartikkelin toksisuuteen, vaikka kulta on inertti metalli eikä itsessään toksinen.

Kultananopartikkelien bioyhteensopivuus on tärkeä ominaisuus biolääketieteellisten sovellusten kuten biosensoreiden kannalta [5]. Bioyhteensopivuudella tarkoitetaan materiaalin yhteensopivuutta elävien kudosten ja järjestelmien kanssa ilman haittavaikutuksia. Bioyhteensopivuuteen ja stabiiliuteen voidaan vaikuttaa erityisesti kultananopartikkeleiden pinnan funktionalisoinnilla [5]. Kultananopartikkeli voidaan pinnoittaa esimerkiksi

polyetyleeniglykolilla (PEG) tai fosfolipideillä, paremman bioyhteensopivuuden saavuttamiseksi [3].

Proteiinikorona on kultananopartikkelin yksi biologinen ominaisuus. Proteiinikoronalla tarkoitetaan reaktiota, jossa biologisissa nesteissä olevat molekyylit adsorboituvat kultananopartikkelin pintaan. Kun kultananopartikkelit pääsevät ihmiskehoon, proteiinit adsorboituvat niiden pintaan nopeasti [10]. Proteiineja, joita on adsorboitunut nanopartikkelin pintaan, kutsutaan proteiinikoronaksi. Proteiinikorona voi myös muuttaa partikkelin koostumusta ja vaikuttaa siten sen pääsyyn solun sisälle. Proteiinien sitoutuminen nanopartikkelin pintaan muokkaa siitä solunmukaisen, jolloin sen soluun pääsy on helpompaa.

2.4 Sovellukset

Kultananopartikkeleita hyödynnetään muun muassa lääketieteessä ja biolääketieteessä. Kultananopartikkelien soveltuvuus lääketieteeseen perustuu kullan inerttiin ja bioyhteensopivaan luonteeseen [8]. Kultananopartikkeleiden pintaa funktionalisoimalla, sitä voidaan hyödyntää syöpälääkkeiden kuljetuksessa [9]. Biotekniikassa kultananopartikkeleita hyödynnetään esimerkiksi biosensoreissa [5]. Kultananopartikkeleiden pintaplasmoniresonanssi, bioyhteensopivuus ja suuri pinta-ala tekevät niistä potentiaalisen ehdokkaan biosensorisovelluksille, joita käytetään esimerkiksi lääketieteellisessä diagnostiikassa.

Syöpälääkkeiden kohdentaminen syöpäsoluihin kultananopartikkeleiden avulla on merkittävä tutkimuksen kohde [9]. Syöpähoidoissa yleisesti käytetyt hoitomuodot vahingoittavat usein terveitä kudoksia ja soluja. Kultananopartikkelisovelluksilla pyritään suojaamaan terveitä soluja ja kudoksia DNA- tai muilta vaurioilta, kohdentamalla lääkeaineet ainoastaan syöpäsoluihin ja -kasvaimiin [11, 9]. Kultananopartikkeleiden funktionalisoinnin avulla syöpälääkkeet voidaan kiinnittää kultananopartikkelin pintaan, jolloin ne kulkeutuvat suoraan kohde-elimeen. Kun kultananopartikkeli ja sen pintaan funktionalisoitu syöpälääke pääsevät syöpäsoluun, syöpälääkeaineen on tarkoitus irrota kohdesoluun.

Pinnoittamalla kultananopartikkeli voidaan estää sen enneaikainen poistuminen kehosta [6]. Negatiivinen pintavaraus voi parantaa lääkkeenkantajana toimivan kultananopartikkelin mahdollisuuksia päästä syöpäalueelle ennen kuin elimistön retikuloendotelialijärjestelmä poistaa sen verenkierrosta [6]. Retikuloendotelialinen järjestelmä on osa elimistön immuunipuolustusta ja koostuu soluista, jotka poistavat kuolleita ja normaalista poikkeavia

aineita, kuten kultananopartikkeleita elimistöstä. Ulkoisilla ärsykkeillä, kuten valolla tai pH-muutoksilla, voidaan vaikuttaa syöpälääkkeen irtoamiseen kultananopartikkelista oikeaan kohde-elimeen ja -soluun [9].

Kultananopartikkeleiden käyttö syöpälääkkeiden kuljettajina vaatii vielä paljon kehitettävää ja tutkimusta [9]. Erityisesti ongelmat stabiiliuden ja aggregoitumisen kanssa rajoittavat toistaiseksi kultananopartikkeleiden käyttöä syöpähoidoissa. Kultananopartikkeliin pinnoittamiseen liittyviä riskejä ei tunneta täysin ja ne voivat aiheuttaa sivuvaikutuksia, joihin ei osata varautua. Tutkimustietoa on vielä vähän partikkeleiden pitkäaikaisista testauksista tai vaikutuksista elimistössä.

Biosensoreissa kultananopartikkeleihin voidaan funktionalisoida biomolekyylejä, joiden avulla voidaan havaita kohdeanalyyttejä esimerkiksi verestä [5]. Kultananopartikkeliin pinnan funktionalisointi vahvistaa kohdeanalyyttien sitoutumista partikkeleihin. Funktionalisoinnilla pyritään parantamaan kultananopartikkeleiden stabiiliutta ja bioyhteensopivuutta biosensoreissa, jolloin ne pysyvät toimintakykyisenä esimerkiksi veressä. Kultananopartikkeleiden käyttö biosensoreissa perustuu niiden herkyyteen tunnistaa erilaisia kohdeanalyyttejä [5].

Kultananopartikkeleita hyödyntäviä biosensoreita käytetään oikeuslääketieteessä, saasteiden havainnoinnissa, lääketieteen alalla, elintarviketeollisuudessa ja virusten havainnoinnissa [5]. Oikeuslääketiede soveltaa kultananopartikkeleita käyttäviä biosensoreita rikosteknisissä tutkimuksissa kuten huumeiden tunnistamisessa rikosteknisissä todisteissa. Lääketieteessä kultananopartikkeleita sovelletaan biosensoreihin, joilla tunnistetaan erilaisia sairauksia kuten syöpää. Syövän tunnistus voi tapahtua pienistäkin pitoisuuksista [5].

3 Kultananopartikkeleiden valmistus

Kultananopartikkelit voidaan valmistaa fysikaalisilla, kemiallisilla tai biologisilla tavoilla [7]. Kemialliset menetelmät ovat pelkistysmenetelmiä, joihin kuuluvat vihreät menetelmät, sitraattipelkistys eli Turkevich-menetelmä, Brust-Schifferin menetelmä ja polymeeripohjainen synteesi. Kemialliset menetelmät koostuvat pelkistysvaiheesta ja stabilointivaiheesta. Fysikaalisia valmistustapoja ovat sähkökemiallinen menetelmä, kylvökasvatusmenetelmä, ultravioletti-indusoitu fotokemiallinen synteesi ja laserablaatio. Kemialliset valmistustavat ovat edullisempia fysikaalisiin valmistustapoihin verrattuna [12]. Biologisia valmistusmenetelmiä ovat mikrobisynteesi ja kasviviliteinen synteesi [7].

Synteesiprosessit perustuvat top-bottom- ja bottom-top-menetelmiin [5]. Bottom-top-menetelmän periaatteena on rakentaa kultananopartikkelit alusta asti, jonka lopputuloksena ovat kultananopartikkelit. Kemiallinen pelkistys, mikrobisynteesi ja kasviviliteinen synteesi ovat bottom-top-menetelmiä. Top-bottom-menetelmän periaatteena on hajottaa suurista partikkeleista nanokokoisia partikkeleita. Laserablaatio on esimerkki top-bottom-menetelmästä [5].

3.1 Kemialliset menetelmät

Turkevichin ja Frensin menetelmän avulla voidaan valmistaa eri kokoisia kultananopartikkeleita pelkistysmenetelmän avulla [13]. Pelkistys tehdään kaksiseinäisessä reaktorissa, jossa kultananopartikkelit pelkistetään natriumsitraatilla, askorbiinihapolla ja UV-valon avulla kultahydroklooraattiliuoksesta.

Brust Schiffrin -menetelmällä tarkoitetaan kaksivaiheista pelkistysmenetelmää, jonka avulla voidaan valmistaa kultananopartikkeleita [14]. Kaksivaiheinen pelkistysmenetelmä on yksinkertainen valmistustapa, jossa on runsas saanti ja se mahdollistaa funktionaalisten ryhmien kiinnittämisen suoraan kultananopartikkelin pintaan. Brust Schiffrin -menetelmässä kultaionien kemiallinen pelkistäminen tapahtuu nopeasti öljyn ja veden rajapinnalla. Tämän jälkeen molekyylit, jotka sisältävät tioliryhmän adsorboituivat kultananopartikkeleiden pintaan stabiloidakseen nanopartikkelin. Molekyylit, jotka sisältävät tioliryhmän muodostavat vahvoja sidoksia kultananopartikkelin kanssa [14].

Myrkylliset kemikaalit ovat yleisiä kemiallisissa valmistusmenetelmissä ja niiden vähentämiseksi on kehitelty vihreitä, ympäristöystävällisiä, synteesisimenetelmiä [12]. Myrkyttömien synteesisimenetelmien avulla voidaan ehkäistä haitallisten sivutuotteiden syntymistä.

3.2 Fysikaaliset menetelmät

Sähkökemialliset menetelmät kuuluvat yleisimpiin kultananopartikkeleiden valmistusmenetelmiin. Esimerkiksi kultananosauvoja voidaan valmistaa sähkökemiallisesti. Sähkökemiallinen menetelmä perustuu hapetus- ja pelkistysreaktioihin [15]. Kultananosauvoja voidaan valmistaa kahden elektrodin kennolla, jossa anodina on kulta ja katodina platinalevy, jotka ovat upotettuina pinta-aktiiviseen elektrolyyttiliuokseen. Sähkövirta on kontrolloitua ja usein käytetään ultraäänihaudetta [15]. Sähkökemiallinen valmistusmenetelmä on edullinen ja sen laitteisto on yksinkertainen, mikä tekee siitä suositun menetelmän [7].

Kylvökasvatusmenetelmää käyttämällä voidaan hallita kultananopartikkeleiden kokoa ja muotoa [4]. Kylvökasvatusmenetelmää käytetään esimerkiksi monihaaraisten kultananopartikkeleiden syntetisoinnissa. Menetelmä voidaan toteuttaa huoneenlämmössä käyttämällä vesipitoisia siemenliuoksia. Liuoksen sekoittamisella ja siihen käytettävällä ajalla on vaikutusta kultananopartikkeleiden kokoon ja muotoon.

Laserablaatiolla voidaan valmistaa myös kultananopartikkeleita [9]. Menetelmällä tarkoitetaan kulta-atomien höyrystämistä ja tiivistämistä silloin, kun kulta-atomit ovat nestemäisessä väliaineessa. Tämän jälkeen partikkeleihin kohdistetaan lasersäde. Menetelmä mahdollistaa kultananopartikkelin koon ja morfologian hallinnan. Laserablaatio ei vaadi kemiallisia reagensseja, mikä tekee siitä puhtaan ja ympäristöystävällisen valmistusmenetelmän [9].

3.3 Biologiset menetelmät

Biologiset valmistustavat ovat ympäristöystävällisiä ja perustuvat kultananopartikkeleiden syntetisointiin entsyymeillä, mikro-organismeilla, kuten bakteereilla ja sienillä tai kasveilla [16, 7]. Biologisilla valmistusmenetelmillä kultananopartikkeleita voidaan valmistaa esimerkiksi mikrobisynteetillä, jossa kultananopartikkeleiden valmistus tapahtuu solunsisäisesti mikrobeissa [16].

Mikrobisynteesi perustuu myös muiden synteesisimenetelmien tavoin Au^{3+} -ionien pelkistämiseen, jolloin syntyy kultananopartikkeleita [16]. Mikrobisynteetissä mikro-

organismit erittävät entsyymiä, joiden avulla metalli-ionit voidaan pelkistää. Valmistusmenetelmänä tämä on yksi uusimmista, jonka vuoksi tutkimusta on vielä vähän.

4 Toksisuus ja sen tutkiminen

4.1 Toksisuus

Toksisuudella tarkoitetaan nanopartikkeleiden aiheuttamaa haittaa biologisiin ja ekologisiin järjestelmiin [1]. Nanoteknologiasovellusten räjähdysmäinen kasvu on johtanut kriittiseen ajatteluun ja tarkempiin tutkimuksiin keskittyen nanomateriaalien toksisuuteen sekä ympäristövaikutuksiin. Nanopartikkeleiden toksisuuden vaikutusta elimiin tutkitaan molekyyllitasolla sekä erilaisten ominaisuuksien näkökulmasta.

Toksisuudesta käytetään erilaisia käsitteitä kuvaamaan sitä, missä toksisuus ilmenee tai miten se ilmenee [17]. Sytotoksisuudella tarkoitetaan toksisuutta, mikä ilmenee soluissa vaurioitteen tai tuhoten solun. Solun perimän vaurioitumisesta käytetään termiä genotoksisuus. Synergistinen toksisuus tarkoittaa reaktiota, jossa vähintään kahden aineen yhteisvaikutus on myrkyllisempi kuin niiden yksittäisten vaikutusten summa. Synergisessä toksisuudessa aineet siis vahvistavat toistensa toksisuutta.

Kultananopartikkeleiden toksisuus voidaan jakaa kahteen ryhmään sen perusteella, mikä on toksisuuden aiheuttaja [1]. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat reaktiiviset happilajit ja toiseen ryhmään kuuluvat niiden ulkopuolelle jäävät toksisuuden aiheuttajat. Reaktiiviset happilajit syntyvät solujen hapetusmetaboliassa eli kun solut tuottavat energiaa happea käyttämällä. Reaktiivisten happilajien korkea pitoisuus voi johtaa solukuolemaan. Reaktiivisia happilajeja ovat muun muassa hydroperoksyyli ($\text{HO}_2\cdot$), superoksidi ($\text{O}_2\cdot^-$) ja hiilidioksidiradikaali ($\text{CO}_2\cdot^-$) [1].

Soluhengitys tapahtuu mitokondrioissa, joissa tapahtuu myös reaktiivisten happilajien ensimmäiset kehitysvaiheet mitokondrioiden elektronien siirroissa [1]. Solu voi joutua hapetusstressiin, kun solussa on liian paljon reaktiivisia happilajeja verrattuna solun kykyyn neutraloida niitä. Kultananopartikkelit lisäävät reaktiivisten happilajien tuotantoa, mikä johtaa solujen hapetusstressiin. Reaktiiviset happilajit voivat vaurioittaa esimerkiksi solukalvoja, DNA:ta ja pysäyttää solusyklin.

Reaktiivisten happilajien ulkopuolelle jääviä toksisuuden aiheuttajia ovat muun muassa nanopartikkelien adsorboituminen solujen pintaan, metallinanopartikkeleista vapautuneiden ionien vaikutus soluun ja nanopartikkeleiden sitoutuminen solun pintareseptoreihin, mikä voi käynnistää apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman [1]. Metallinanopartikkelit aiheuttavat

toksisuutta kertymällä yksittäisiin elimiin, kuten maksaan tai keuhkoihin. Osa soluihin liuenneista metallinanopartikkeleista voi emittoida eli vapauttaa metalli-ioneja soluihin. Korkeampi metalli-ionien pitoisuus solussa kasvattaa toksisuutta.

Kun kultananopartikkelit pääsevät soluun, ne voivat aiheuttaa merkittäviä haittoja [10]. Elimistön mononukleaarinen fagosyyttijärjestelmä pyrkii puhdistamaan ja hajottamaan vieraita aineita verenkierrosta. Se ei pysty tunnistamaan kultananopartikkeleita, jotka ovat adsorboineet proteiineja pintaansa ja tällöin kultananopartikkelit pääsevät solun sisään. Solun sisällä kultananopartikkelit voivat aiheuttaa muutoksia esimerkiksi DNA:han [10].

Genotoksisuus, jota kultananopartikkelit voivat aiheuttaa, ilmenee esimerkiksi DNA-juosteen katkoksina ja mutaatioina [1]. Kultananopartikkeleiden aiheuttama genotoksisuus voi ilmentyä kahdella tavalla, joista toinen ilmenee tulehduksina. Tulehdukset aiheuttavat radikaalien happilajien syntymistä. Toinen genotoksisuuden muoto jaetaan suoraan ja epäsuoraan tyyppiin. Kumpikaan niistä ei muodosta radikaaleja happilajeja. Suorassa tavassa metallinanopartikkelit vaikuttavat DNA:han suoraan tunkeutumalla ja häiritsemällä DNA:n toimintaa ja sen prosesseja. Epäsuorassa tavassa metallinanopartikkelit vuorovaikuttavat ydinproteiinin kautta adsorboitumalla proteiinin pintaan, minkä kautta se voi aiheuttaa muun muassa replikaatio- tai korjauspoikkeamia [1].

4.2 Toksisuustutkimukset

Toksisuuden tutkiminen elimistössä alkaa nanopartikkeleille altistumisesta [1]. Toksisuutta tutkitaan selvittämällä, miten nanopartikkelit kulkeutuvat kohde-eliimiin ja millaisia vaikutuksia niillä on kulkeutumisen aikana. Nanopartikkelit voivat adsorboida molekyyliä pinoilleen, jolloin ne kulkeutuvat helposti ihmiskehon läpi kohde-eliimeen. Nanopartikkeleiden vuorovaikutukset biologisten järjestelmien kanssa ovat monimutkaisia ja ne tarvitsevat laajoja tutkimuksia toksisuuden tutkimiseksi.

Toksisuutta voidaan tutkia soluviljelmien avulla, joita kutsutaan *in vitro* -menetelmiksi tai eläinkokeilla, joista käytetään nimeä *in vivo* -menetelmät [1]. Soluviljelmä on tutkimusmenetelmänä edullisempi kuin *in vivo* -menetelmä. *In vitro* -menetelmän suoritusajat ovat usein lyhyitä. Eläimillä testaaminen puolestaan kuluttaa paljon resursseja, kuten aikaa ja rahaa. Eläinkokeet herättävät eettisiä kysymyksiä ja koe-eläinten käyttö vaatii erilaisia lupia. *In vivo* -tutkimukset ovat laajoja ja työläitä verrattuna *in vitro* -tutkimuksiin. *In vitro* -tutkimuksilla voidaan tutkia esimerkiksi reaktiivisten happilajien vaikutuksia solumorfologiaan ja

morfologiamuutosten vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen [18]. Kultananopartikkelit absorboivat hyvin näkyvää valoa ja siksi niillä saadut tulokset eivät ole yksiselitteisiä. *In vitro*-menetelmillä tehdään yleensä runsaasti kokeita ennen koe-eläimillä testaamiseen siirtymistä.

Kultananopartikkeleiden toksisuustutkimukset ovat tärkeitä, koska partikkelin päästyä biologiseen järjestelmään, se voi aiheuttaa toksisuutta reagoimalla muiden aineiden kanssa [19]. Kun kultananopartikkeli pääsee elimistöön, se voi liittyä eri molekyyliin solun sisällä tai sen ulkopuolella. Kultananopartikkelien kanssa voimakkaasti vuorovaikuttavia elimistön molekyyliä ovat esimerkiksi lipidit, nukleotidit, pienmolekyyliset yhdisteet ja proteiinit. Nämä molekyyliit voivat heikentää kultananopartikkelin stabiiliutta. Kultananopartikkelit vaikuttavat myös edellä mainittujen molekyylien toimintaan [19].

Nanomateriaaleille on määritetty ISO-standardeja, joiden avulla määritetään materiaalin bioturvallisuus [20]. Esimerkiksi ISO/TR 10993-22:2017 osassa 22 edellytetään nanomateriaalien testausta sytotoksisuuden, genotoksisuuden, karsinogeenisuuden, lisääntymistoksisuuden, immunotoksisuuden, ärsytyksen ja herkistymisen, hemokompatibiliteetin, systemaattisen myrkyllisyyden, pyrogeenisuuden ja implantaation osalta. Näillä standardeilla varmistetaan hoitoa saavien potilaiden ja valmisteita valmistavien työntekijöiden turvallisuus.

4.2.1 Karakterisointi

Karakterisoimalla kultananopartikkeleita, saadaan merkittävää tietoa niiden koosta, muodosta ja pintaominaisuuksista, joilla on vaikutusta niiden aiheuttamaan toksisuuteen [9]. Koon, muodon ja pinnan analysointi antaa tietoa myös kultananopartikkeleiden käyttäytymisestä erilaisissa ympäristöissä. Kokoa ja muotoa voidaan tutkia läpäisyelektroni- ja pyyhkäisyelektronimikroskopiolla. Näillä menetelmillä saadaan nanopartikkeleista kuvia, joiden avulla analysoidaan partikkelien morfologiaa, joita voidaan vertailla mahdollisesti altistuksen aiheuttamiin muutoksiin.

Kultananopartikkeleiden pinnan koostumusta voidaan analysoida pyyhkäisyelektronimikroskopian avulla [9]. Pinnan ominaisuuksista liganditiheys, funktionaaliset ryhmät ja pintatiheys antavat tietoa niiden vuorovaikutuksista muiden aineiden kanssa. Pintavarauksen voi määrittää zeta-potentiaalin avulla. Pintaan kiinnittyneitä funktionaalisia ryhmiä voidaan tunnistaa pintavahvistetulla Raman-spektroskopiolla tai röntgenfotoelektronispektroskopiolla.

Toksisuuden näkökulmasta on merkittävää tutkia kultananopartikkeleiden absorptio- ja sirontaominaisuuksia, joita voidaan tutkia UV-Vis-spektrofotometrillä [9]. Kultananopartikkeleiden muoto, koko ja väliaine aiheuttavat eroavaisuuksia UV-Vis-spektroskopiomittauksissa. Kultananopartikkeleiden stabiiliutta voidaan tutkia altistusmenetelmillä, kuten altistamalla niitä pH- ja ionivahvuusmuutoksille, muuttamalla niiden olosuhteita ja varastoimalla pitkäaikaisesti.

4.2.2 *In vitro* -menetelmät

In vitro -menetelmiä pidetään merkityksellisenä toksikologisten vaikutusten selvittämisen vuoksi. *In vitro* -tutkimuksissa tutkitaan kultananopartikkeleiden ominaisuuksia, jotka vaikuttavat niiden aiheuttamaan toksisuuteen [21]. Tutkimuksissa halutaan selvittää esimerkiksi reaktiivisista happilajeista johtuvan oksidatiivisen stressin aiheuttamaa genotoksisuutta, annoksen sekä pitoisuuden merkitystä toksisuuteen sekä altistusajan vaikutusta kultananopartikkeleiden kulkeutumiselle ja hajoamiselle [19].

In vitro -tutkimuksissa käytetään ihmisten, eläinten ja kasvien solulinjoja. Ihmisen soluissa sytotoksisuutta tutkitaan usein erilaisilla syöpäsolulinjoilla. Tutkimuksia on suoritettu esimerkiksi kohdunkaulan (HeLa), rintasyövän (MCF-7) ja maksasyövän (HepG2) solulinjoissa [11, 22]. Toksisuustutkimuksia voidaan tehdä myös ihmisen sikiön munuaisen (HEK293T) solulinjoissa [23]. Solulinjatutkimuksissa mielenkiintoisia ovat myös maksan solut, koska elimistön verenpuhdistusjärjestelmän vuoksi kultananopartikkelit päätyvät helposti maksaan [8]. *In vitro* -menetelmillä halutaan selvittää mihin soluelimeen kultananopartikkelit kulkeutuvat tai kasaantuvat. Tämä on tärkeää selvittää, koska haitalliseen kulkeutumiseen on mahdollista puuttua.

In vitro -menetelmissä genotoksisuutta tutkitaan esimerkiksi komeettatestin (*engl.* comet assay) avulla [8]. Genotoksisuutta voidaan mitata esimerkiksi ihmisen HepG2 maksasyöpäsoluilla. Syöpäsolulinjat ovat tärkeä tutkimuksen kohde syöpähoitojen parantamiseksi. Sytotoksisuutta tutkitaan esimerkiksi MTT-testillä sekä LDH-vapautumistestillä, jotka mittaavat solujen elinkykyisyyttä [8]. Aggregoitumista ja kultananopartikkeleiden morfologisia muutoksia voidaan tutkia soluviljelmissä valomikroskopiolla. Samoilla menetelmällä tutkitaan kultananopartikkeleiden morfologisia muutoksia.

In vitro -tutkimuksissa on huomattu, että solun tumaan ajautuneet pienet kultananopartikkelit aiheuttavat haitallista tuhoa [7]. Soluviljelmämittauksissa huomattiin pienimpien

kultananopartikkeleiden aiheuttavan suuria vahinkoja esimerkiksi DNA:ssa, soluun tunkeutumisen seurauksena [7]. Tutkimusten perusteella keskikokoiset kultananopartikkelit ovat vähemmän toksisia kuin pienet ja suuret kultananopartikkelit [23]. Tutkimustuloksia on myös keskikokoisten kultananopartikkeleiden aiheuttamasta toksisuudesta [24]. Ristiriitaisiin tuloksiin voi vaikuttaa esimerkiksi kultananopartikkeleiden muoto ja pitoisuus altistusannoksessa tai partikkeleiden pintavaraus [23, 24].

Kultananopartikkeleiden pitoisuuksien ja erilaisten muotojen yhteisvaikutuksista toksisuuteen on tehty tutkimuksia. Wozniakin ym. (2017) tutkimuksessa havaittiin, että pallomaiset kultananopartikkelit ovat pienillä pitoisuuksilla bioyhteensopivampia kuin suurina pitoisuuksina [23]. Suurissa pitoisuuksissa kultananopallot aggregoituivat ja aiheuttivat solukuolemaa. Toksisuus johtui partikkeleiden pitoisuudesta ja altistusajasta, sillä kolmantena päivänä altistuksesta kultananopallot aiheuttivat täydellisen solukuoleman, kun ensimmäisen 24 tunnin jälkeen 47 % oli eläviä. Tutkimuksessa mitattiin nanopallojen lisäksi kultananokukkien, -tähtien ja -prismojen aiheuttamaa toksisuutta. Tulosten perusteella nämä muodot eivät aiheuttaneet toksisuutta. Tutkimukset suoritettiin HEK293T alkion munasoluilla ja HeLa kohdunkaulansyöpäsoluilla [23].

Kultananopartikkeleiden soluun ottoa mitataan *in vitro* -menetelmillä [8]. Solut altistetaan kultananopartikkeliliuokselle tietyksi ajoiksi, jonka jälkeen liuos poistetaan. TEM-analyysillä tutkitaan kultananopartikkeleiden kulkeutumista ja kertymistä soluun. TEM -analyysillä voidaan selvittää, missä kultananopartikkelit sijaitsevat ja ovatko ne kertyneet johonkin tiettyyn soluelimeen.

In vitro -tutkimuksissa solut voidaan altistaa joko lyhytkestoisesti tai pitkäkestoisesti. Altistusajalla on merkitystä, kun halutaan seurata kultananopartikkelin liikehdintää ja partikkeleiden hajoamista soluissa [19]. Lyhytkestoinen altistuminen on yleensä 24, 48 tai 72 tuntia ja puolestaan pitkäkestoinen eli krooninen altistus voi kestää esimerkiksi 20 viikkoa [25, 8]. Falagan-Lottsch ym. (2016) tutkivat pitkäaikaisen ja lyhyt kestoisen altistuksen seurauksena tulleita muutoksia ihmissolulinjoissa [26]. Pitkäkestoinen altistus kesti 20 viikkoa ja lyhytkestoinen altistus 72 tuntia. Tutkimuksessa tutkittiin solujen morfologiaa, geenien ilmentymistä, erilaisten kultananopartikkeleiden soluunottoa ja solujen elinkykyä. Tuloksista huomattiin, että polyakryylihapolla (PAA) pinnoitetut kultananopartikkelit pääsivät soluun paremmin kuin sitraattikultapallot. PAA-pinnoitetut kultasauvat pääsivät myös soluun paremmin kuin polyetyleeniglykolilla (PEG) pinnoitetut kultananosauvat [26].

Falagan-Lottschin ym. (2016) tutkimustuloksista huomataan, että kultananopartikkeleiden kertymistasot kohosivat enemmän pitkäkestoisen altistuksen aikana kuin lyhytkestoisessa altistuksessa [26]. Lyhytkestoisen altistuksen jälkeen kultananopartikkeleita ei havaittu soluissa, mutta pitkäkestoisen altistuksen jälkeen partikkeleita löydettiin. Tämän ajatellaan johtuvan siitä, että pitkäkestoisessa altistuksessa partikkelit ehtivät kerääntyä ja puolestaan lyhytkestoisessa altistuksessa ne ehtivät hajota tai poistua soluista [26].

4.2.3 *In vivo* -menetelmät

In vivo -tutkimusten tavoitteena on saada tietoa siitä, miten suonensisäisesti annostellut kultananopartikkelit jakautuvat eri soluihin ja sisäelimiin [18]. *In vivo* -tutkimuksissa käytetään koe-eläimiä, yleisimpiä ovat hiiret, rotat ja seeprakalat [17, 18]. Erilaisten pitoisuuksien, partikkelikokojen, pinnoitteiden ja surfaktanttien vaikutusta toksisuuteen tutkitaan *in vivo* -menetelmää hyödyntämällä. Koe-eläimillä tutkitaan edellä mainittujen tekijöiden vaikutusta niiden kehitykseen.

Koe-eläinten valintaan vaikuttavat muun muassa näytteiden ja tutkimusten toistettavuus, eläinten saatavuus ja testeihin kuluva aika. Seeprakalojen alkioit kehittyvät ulkoisesti, mikä mahdollistaa tehokkaan koe-eläinten saannin [17]. Suuri määrä alkioita mahdollistaa isojen näyte-erien suorittamisen. Ginzburgin ym. (2018) seeprakalatutkimuksessa annosteltavat kultananopartikkeliannokset ovat hyvin pieniä ja tutkimukset voidaan suorittaa parin päivän aikana [17]. Pienet annosmäärät ja suuri näytteiden valmistusmahdollisuus tekevät seeprakaloista tehokkaan koe-eläimen. *In vivo* -menetelmä on monimutkaisempi tutkimusmenetelmä kuin *in vitro* -menetelmä [21].

Toksisuustutkimukset aloitetaan partikkeleiden karakterisoinnilla, jonka jälkeen koe-eläin altistetaan kultananopartikkeliliuokselle [18]. Annostelun jälkeen seurataan partikkeleiden pitoisuutta veressä ja partikkeleiden kertymistä sisäelimiin, kuten maksaan ja pernaan. *In vivo* -menetelmässä kultananopartikkeleiden altistusannos voidaan määrittää eläimen keskipainon tai kuolleisuuden perusteella.

In vivo -tutkimusten tuloksissa on tehty samoja havaintoja kuin *in vitro* -tutkimuksissa, mutta *in vivo* -menetelmällä on saatu myös ristiriitaisia tuloksia esimerkiksi partikkelin koon vaikutuksista toksisuuteen [7, 24]. Eläin kokeissa on myös havaittu kultananopartikkeleiden kertymistä elimiin, kuten maksaan ja pernaan [3]. Minkä on pohdittu johtuvan retikuloendoteliaalijärjestelmästä. Kultananopartikkeleiden kertyminen aiheuttaa koe-

eläimissä tulehduksia [3]. Injektoinnin yhteydessä kultananopartikkeleita jää myös pistokohtaan [7].

In vivo -toksisuustutkimuksissa on havaittu, että pienillä kultananopartikkeleilla voi esiintyä sytotoksisuutta suurempia partikkeleita enemmän [7]. Sytotoksisuutta voivat aiheuttaa ligandit, jotka eivät suojaa kultananopartikkelin pintaa katalyyttisiltä reaktioilta tai molekyyteiltä. Ligandit saattavat tarjota esimerkiksi biologisille molekyyille suoran reitin kultananopartikkeleiden pinnalle. *In vivo* -tutkimuksissa on havaittu, että pienimmät kultananopartikkelit tuottavat enemmän radikaaleja happilajeja kuin suuremmat partikkelit [7]. Tämä osoittaa, että partikkeleiden koolla, muodolla ja pinnoitteella on tärkeä rooli solutoksisuudessa.

In vivo -menetelmillä on saatu myös ristiriitaisia tuloksia kultananopartikkeleiden koon vaikutuksesta toksisuuteen verrattuna *in vitro* -menetelmiin [24]. Esimerkiksi Chenin ym. (2009) tutkimuksessa havaittiin, että samanlaiset keskikokoiset kultananopartikkelit olivat toksisia hiirille, mutta ei HeLa-soluille [24]. Chenin ym. (2009) tulokset konkretisoivat, että solulinjoissa tehdyt tutkimukset eivät aina ole verrattavissa koko elimistössä tapahtuviin reaktioihin. Tutkimuksessa toksisuus ilmeni hiirillä sairauksina, ruokahaluttomuutena, painon putoamisena, turkin värin muutoksina ja kuolemana [24].

Toksisuustutkimuksissa tutkitaan kultananopartikkeleiden annostelutekniikan ja muodon vaikutusta [3, 7, 17]. Kultananopartikkeliliuos voidaan annostella koe-eläimeen digitaalisen annostelujärjestelmän avulla, käsin pipetoimalla tai injektoimalla ihon alle. Injektointi suoraan verenkiertoon voi aiheuttaa esimerkiksi veren hyytymistä [3]. Kultananopartikkeleiden pinnoitteiden ja muodon avulla voidaan vähentää verihiutaleiden aggregoitumista [3, 7]. Keskikokoiset pallon muotoiset kultananopartikkelit ovat yhteensopivampia veren kanssa, jolloin ne eivät aiheuta verihiutaleiden aggregoitumista [3].

Ginzburginin ym. (2018) tutkimuksen tulosten perusteella havainnoitiin, että seeprakalatutkimuksen mukaan toksisuuteen vaikutti, miten kultananopartikkelit annosteltiin eläimeen [17]. Tutkimuksessa digitaalisen annostelujärjestelmän lisäksi kultananopartikkeliannokset pipetoitiin manuaalisesti käsin koe-eläimeen. Havaittiin, että digitaalisen annostelujärjestelmän (Hewlett-Packard D300) avulla annostellut annokset aiheuttivat enemmän toksisuutta kuin käsin pipetoidut annokset [17].

Ginzburginin ym. (2018) tutkimuksessa digitaalisesti annostellut kultananopartikkelit johtivat seeprakaloilla 88 %:n kuolleisuuteen, kun puolestaan käsin pipetoidut annokset johtivat vain 3 %:n kuolleisuuteen [17]. Suuri kuolleisuusero johtui digitaalisessa annostelujärjestelmässä käytettävästä polysorbaatti (PS20) -surfaktantista. PS20:ta käytetään liuoksen pintajännityksen rikkomiseen tarkan annostelumäärän saavuttamiseksi. PS20 on itsessään myrkytön surfaktantti, mutta johti kultananopartikkeleiden kanssa yhdessä synergiseen toksisuuteen [17].

Toksisuustutkimuksissa altistusajalla on merkitystä myös *in vivo* -tutkimuksissa. *In vivo* -tutkimuksissa lyhytkestoiset altitukset käsittävät ajat tunneista muutamisiin päiviin ja pitkäkestoisella altistuksella voidaan tarkoittaa 120 päivää. Kroonisia altistuksia voidaan suorittaa esimerkiksi 10 viikon ikäisille uros hiirille [27]. Kultananopartikkelin kiertoajat ovat mielenkiintoinen tutkimuksen kohde [7]. Kiertoajalla tarkoitetaan sitä aikaa, kun partikkeli kiertää verenkierrossa ennen kuin ne poistuvat elimistöstä.

Eri pituisilla altistusajoilla, halutaan selvittää, millaisia vaikutuksia kultananopartikkeleilla on eläimiin. Kiinnostavia tutkimuksia ovat partikkeleiden kertyminen elintärkeisiin elimiin, ja nanopartikkeleiden hajoaminen ja elimistöstä poistuminen. Jakicin ym. (2023) tutkimuksessa tutkittiin naudan seerumin albumiinilla (BSA) päällystettyjen kultananopartikkeleiden pitkäaikaisia (120 päivän) vaikutuksia hiiren maksassa, pernassa ja munuaisissa. Maksan ja pernan kudosten puhdistautuminen on hidasta [27]. Tulosten mukaan BSA:lla pinnoitettujen kultananopartikkeleiden määrä oli tasainen maksassa ensimmäisen kuukauden aikana, mutta niiden määrä oli koholla pernassa. Munuaisista tehtiin vain pieniä kultananopartikkelilöydöksiä. Toisen ja neljännen tutkimuskuukauden aikana kultananopartikkeleiden määrä maksassa väheni, mutta kasvoi noin 30 % pernassa. Munuaisissa BSA pinnoitettujen kultananopartikkeleiden määrä kasvoi 100 %. Tämän pohdittiin johtuvan siitä, että partikkelit vapautuvat maksasta hitaasti ja voivat sen jälkeen kertyä muihin elimiin, kuten pernaan, sen sijaan että ne poistuisivat elimistöstä. Uudelleenkeräytyminen voi hidastaa partikkeleiden poistumista kehosta [27].

4.3 Toksisuuteen vaikuttaminen

Kultananopartikkeleiden toksisuustekijöiden tunnistaminen auttaa keksimään ratkaisuja, joiden avulla ei-toivottuja vaikutuksia voidaan vähentää. Sytotoksisuuteen vaikuttavat kultananopartikkeleiden ominaisuudet, kuten koko, muoto ja pinnan ominaisuudet [23]. Näiden ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa esimerkiksi partikkeleiden valmistusmenetelmien, pitoisuuksien ja altistusaikojen avulla. Partikkelin ominaisuuksien lisäksi solutyypeillä on

vaikutusta toksisuuteen [28]. Esimerkiksi syöpäsolujen käyttäytyminen voi olla erilaista kuin terveiden solujen käytös. Eniten tutkimuksia on tehty koon, muodon ja pinnan vaikutuksista toksisuuteen.

4.3.1 Kultananopartikkeleiden ominaisuuksien vaikutus toksisuuteen

Partikkelin koko on suoraan yhteydessä sen biologisiin vaikutuksiin. Useiden tutkimusten mukaan erittäin pienet ja erittäin suuret partikkelit aiheuttavat toksisuutta soluissa keskikokoisia partikkeleita enemmän [18]. Pienet partikkelikoot voivat tunkeutua esimerkiksi solujen sisälle pintareseptorien kautta ja aiheuttaa sen myötä laajoja vaurioita solussa. Suuret partikkelikoot ovat herkempiä kertymään elimiin, mikä aiheuttaa toksisuutta esimerkiksi tulehduksina.

Yksi tutkituimmista ominaisuuksista on kultananopartikkelin pinnan ominaisuudet [28]. Kultananopartikkeleilla on suuri pinta-ala-tilavuus-suhde [1]. Suuren pinta-alansa vuoksi muiden aineiden on helppo adsorboitua kultananopartikkelin pintaan. Useiden tutkimusten perusteella positiivisesti varautunut kultananopartikkeli pääsee neutraaleja ja negatiivisia partikkeleita helpommin soluun [6, 28]. Varautuneen kultananopartikkelin vaikutuksia solukuolemaan on tutkittu ja se voi osoittautua tulevaisuudessa tärkeämmäksi toksisuustekijäksi kuin partikkelin koko.

Koon, suuren pinta-alan ja pintavaruksen lisäksi toksisuuteen vaikuttavat kultananopartikkelin elinikä ja vuorovaikutukset muiden molekyylien kanssa [1]. Kultananopartikkelit monimutkaistavat usein biologisten järjestelmien toimintaa, minkä vuoksi kultananopartikkelin pitkällä eliniällä voi olla toksisia vaikutuksia [7]. Kultananopartikkelin vuorovaikutusten seurauksena partikkelin ympärille voi muodostua proteiinikorona [17]. Vuorovaikutusten myötä kultananopartikkelit voivat aggregoitua keskenään tai muiden aineiden kanssa, mikä voi aiheuttaa muun muassa tukoksia verenkierron ja erilaisia tulehdustiloja [1]. Vuorovaikutuksiin vaikuttaa partikkelin koko, sillä liian pienet tai suuret kultananopartikkelit eivät esimerkiksi kulkeudu soluun yhtä hyvin kuin keskikokoiset partikkelit.

4.3.2 Toksisuuteen vaikuttaminen

Koon ja muodon aiheuttamaan toksisuuteen voidaan vaikuttaa valmistusmenetelmien avulla [13]. Valmistusmenetelmien rooli on merkittävä kokoon vaikuttava tekijä. Esimerkiksi Turkevichin menetelmässä lämpötilan laskulla voidaan vaikuttaa valmistettävien

kultananopartikkeleiden kokoon, muotoon ja laatuun. Lämpötilan laskeminen sitraattipelkistyksen aikana vaikuttaa kiteiden muodostumiseen, jolla on suora yhteys partikkelin muotoon ja laatuun. Kimlingin ym. (2006) tutkimuksen mukaan lämpötilan lasku aiheutti partikkeleiden halkaisijoiden kasvun ja muotojen epäsäännöllisyyden [13]. Laserablaation avulla muotoon ja kokoon voidaan vaikuttaa käytettävän valonlähteen aallonpituutta ja intensiteettiä muuttamalla. Laserablaation etuna on tasakokoisten partikkelien valmistaminen [9]. Kylvökasvatusmenetelmällä voidaan vaikuttaa monihaaraisten kultananopartikkeleiden kokoon ja muotoon [4].

Kultananopartikkelin pintaan vaikuttamalla, voidaan vaikuttaa toksisuuteen [2, 10]. Pinnan reaktiivisuutta voidaan hallita pinnoittamalla kultananopartikkeli esimerkiksi polymeerillä. Polymeeriketjujen käyttö perustuu proteiinien adsorption estämiseen. Polymeerin tulee olla bioyhteensopiva, jotta sitä voidaan käyttää bio- ja lääketieteellisissä sovelluksissa. Polymeeripinnoite stabiloi ja estää aggregoitumisen. Kultananopartikkelin pintavaraukseen vaikuttamalla voidaan myös vähentää toksisuutta [28]. Negatiivinen pintavaraus estää soluun pääsyä, millä on suora vaikutus sytotoksisuuteen ja genotoksisuuteen.

PEG on yksi yleisimmistä pinnoitteista, jota käytetään kultananopartikkelin pinnoittamiseen. Se estää partikkelin imeytymisen fagosyytteihin eli syöjäsoluihin, mikä on merkityksellistä esimerkiksi lääkeainekuljetuksessa [10]. PEG-pinnoite ei päästä epäsuotuisia proteiineja adsorboitumaan kultananopartikkelin pintaan [2, 10]. Walkeyn ym. (2011) tutkimustulosten mukaan epäsuotuisien proteiinien adsorptio väheni, kun kultananopartikkeli oli PEG-pinnoitettu [10]. Tutkimuksen mukaan PEG-pinnoitetut partikkelit eivät estä kokonaan partikkelin soluihin imeytymistä, vaikka pinnoitetiheys olisi korkea.

Partikkelin pinta voi reagoida veren proteiinien kanssa muodostamalla proteiinikoronan [20]. Siihen liittyvien vuorovaikutusten tutkimisella voidaan mahdollisesti vaikuttaa toksisuuteen. Proteiinikoronan toiminnan ymmärtäminen mahdollistaa lääketieteellisten sovellusten kehittämisen ja biologisen yhteensopivuuden parantamisen. Proteiinikoronalla on vaikutusta esimerkiksi kultananopartikkelien liukenemisnopeuteen, millä voi olla vaikutusta toksisuuteen.

Pinnoitteiden lisäksi kultananopartikkelin pintaan voidaan sitoa surfaktanteja partikkelin stabiilisuuden parantamiseksi [29]. Yksi tunnetuimmista ja kaupallistetuista surfaktanteista on setyylitrimetyyliammoniumbromidi (CTAB). Se on kationinen surfaktantti, joka aiheuttaa desorptiota. Desorptio on vastakohtainen reaktio adsorptiolle eli sitoutunut aine irtoaa pinnasta, johon se on aiemmin sitoutunut. CTAB muodostaa kullan pintaan kaksoiskerroksen. Alkilanyn

ym (2009) tutkivat CTAB kaksoiskerroksen polymeroinnin vaikutusta desorptioon [29]. Tutkimustulosten perusteella surfaktantin polymerointi kultananopallojen pinnalle vähensi desorptiota ja lisäsi kultananopartikkeleiden stabiiliutta. Polymeroitu kaksoiskerros vähensi adsorptiota.

Ginzburgin ym. (2018) tutkimuksessa käytettiin digitaalista annostelujärjestelmän yhteydessä polysorbaatti (PS20) -surfaktanttia [17]. Polysorbaatin yhteydessä käytettävä numero kertoo rasvahappokomponentista, mikä on surfaktantin rakenteessa. Digitaalisessa annostelujärjestelmässä käytetään PS20, koska se rikkoo kultananopartikkeleita sisältävän liuoksen pintajännityksen tarkan annoskoon saavuttamiseksi. PS20 ei ole itsessään myrkyllinen surfaktantti, mutta sen synergiatoksisuusmahdollisuuksia kultananopartikkeleiden kanssa on tutkittu.

Annostuksella ja annosten pitoisuuksilla voidaan vaikuttaa toksisuuteen [23, 17]. Annostelumenetelmään vaikuttamalla voidaan vaikuttaa siihen, miten partikkelit lähtevät liikkeelle: menevätkö ne suoraa verenkiertoon, josta ne leviävät nopeasti vai jäävätkö ne pistokohtaan [1, 3, 7]. Annoksen pitoisuuteen vaikuttamalla, voidaan vaikuttaa partikkelin aiheuttamaan krooniseen toksisuuteen tai solukuolemaan.

5 Pohdinta ja yhteenveto

Kultananopartikkeleiden toksisuutta on tutkittu valtavasti. Pienen kokonsa ja helppojen muokkausmenetelmien avulla niiden sovelluskohteet ovat lääketieteessä ja biotekniikassa. Kultananopartikkeleiden bioyhteensopivuus tarjoaa laajoja käyttömahdollisuuksia esimerkiksi lääkeainekuljetuksissa. Kultananopartikkeleiden toksisuuden tutkiminen on osa lääkeaineiden kuljetuksen ja biosensoreiden tulevaisuutta. Ennen kultananopartikkeleiden laaja käyttöä, on tiedettävä mistä mahdolliset toksiset vaikutukset johtuvat ja miten toksisuuteen voidaan vaikuttaa.

Kultananopartikkeleiden ominaisuuksista koko ja pinnan ominaisuudet ovat tutkituimmat toksisuuden aiheuttajat. Koon merkitys korostuu erityisesti nanopartikkelien soluun pääsyssä ja kertymisessä eri elimiin. Muokkaamalla kultananopartikkelin pintaa, voidaan vaikuttaa aggregoitumiseen ja partikkelin stabiiliuteen. Pinnoittamalla ja kokoa hallitsemalla, partikkelista voidaan muokata vähemmän haitallinen elimistölle ja lisätä bioyhteensopivuutta solujen ja elimistön kanssa.

Toksisuuteen vaikuttavista ominaisuuksista on saatu ristiriitaisia tutkimustuloksia, eivätkä kaikki tutkimustulokset ole verrattavissa toisiinsa. Kultananopartikkeleiden toksisuustutkimuksiin vaikuttavat useat eri tekijät, kuten kultananopartikkeleiden valmistusmenetelmät, kultananopartikkeleiden pitoisuudet liuoksissa ja pinnan funktionalisointi. Pienet erot valmistusmenetelmissä voivat johtaa merkittäviin muutoksiin partikkelin muodossa tai dispersiossa, jolla on suora vaikutus toksisuuteen.

Tulevaisuudessa kultananopartikkeleiden pintavarauksen, muodon ja vuorovaikutusten tutkimiseen tulee panostaa, jotta toksisuustutkimus laajenee. Pintavarauksen merkityksestä toksisuuteen on tehty havaintoja, ja sen on ennustettu olevan yksi merkittävimmistä toksisuustekijöistä erityisesti soluun pääsyn kannalta. Eri muotoisilla partikkeleilla on erilaisia toksisia vaikutuksia, joita ei tunneta vielä tarkasti. Muoto vaikuttaa myös vuorovaikutuksiin ja kulkeutumiseen soluissa. Näiden ominaisuuksien tutkiminen laajentaisi kuvaa kultananopartikkeleiden toksisuudesta.

Toksisuuden tutkiminen soluissa ja koe-eläimillä ovat antaneet paljon tietoa toksisuustekijöistä. On tärkeää, että nanopartikkelit ja solut karakteriosoidaan huolellisesti, jotta niiden tarkat ominaisuudet ovat selvillä ennen kokeiden suorittamista. Karakterisointi antaa tärkeää tietoa niiden ominaisuuksista, johon saatuja tuloksia verrataan. Ominaisuuksien lisäksi

tutkimusmenetelmien avulla on huomattu, että toksisuuteen vaikuttaa partikkelien pitoisuus liuoksissa, testausolosuhteet ja annostelumenetelmät.

Erilaisilla standardeilla ja säädöksillä kultananopartikkeleiden toksisuustutkimuksista saadaan järjestelmällisempää. Standardien määrittäminen tekee tutkimuksista yhtenäisiä, jolloin tulokset ovat helpommin verrattavissa toisiinsa. Toksisuustutkimusten yhdistäminen ja laajentaminen voivat tulevaisuudessa auttaa toksisuusongelmien ratkaisussa, jotta partikkeleita voidaan testata ihmiskehossa. Se vaatii vielä paljon aikaa ja resursseja, sillä solulinjoilla tehtävät tutkimukset ovat suositumpia, ja niitä suoritetaan enemmän suhteessa eläinkokeisiin. Eläinkokeet vaativat enemmän rahaa ja aikaa, sillä tutkimukset ovat yleensä pitkäkestoisempia. Solulinjoilla tai koe-eläimissä suoritettut tutkimukset eivät kuitenkaan ole suoraan verrattavissa ihmiskehoon.

Kultananopartikkeleilla on potentiaalia tehdä tulevaisuudessa suuri läpimurto lääketieteessä syöpälääkkeiden kuljettajina. Tällä hetkellä syöpähoidoissa on paljon ikäviä sivuvaikutuksia, joita pyritään ratkaisemaan syöpälääkkeiden kohdentamisella. Ennen sitä toksisuutta täytyy tutkia laajemmin ja järjestelmällisemmin, jotta mahdolliset toksisuustekijät ja -vaikutukset tunnetaan paremmin.

6 Lähteet

- [1] A. Malik, J. M. Khan, A. S. Alhomida, M. S. Ola, M. A. Alshehri, ja A. Ahmad, "Metal nanoparticles: biomedical applications and their molecular mechanisms of toxicity", *CHEMICAL PAPERS*, vsk. 76, nro 10, ss. 6073–6095, loka 2022, doi: 10.1007/s11696-022-02351-5.
- [2] G. T. Sen, G. Ozkemahli, R. Shahbazi, P. Erkekoglu, K. Ulubayram, ja B. Kocer-Gumusel, "The Effects of Polymer Coating of Gold Nanoparticles on Oxidative Stress and DNA Damage", *INTERNATIONAL JOURNAL OF TOXICOLOGY*, vsk. 39, nro 4, ss. 328–340, heinä 2020, doi: 10.1177/1091581820927646.
- [3] A. M. Alkilany ja C. J. Murphy, "Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?", *Journal of Nanoparticle Research*, vsk. 12, nro 7, ss. 2313–2333, syys 2010, doi: 10.1007/s11051-010-9911-8.
- [4] G. Kawamura ja M. Nogami, "Application of a conproportionation reaction to a synthesis of shape-controlled gold nanoparticles", *JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH*, vsk. 311, nro 19, ss. 4462–4466, syys 2009, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2009.08.002.
- [5] A. Karnwal *ym.*, "Gold Nanoparticles in Nanobiotechnology: From Synthesis to Biosensing Applications", *ACS Omega*, vsk. 9, nro 28, ss. 29966–29982, heinä 2024, doi: 10.1021/acsomega.3c10352.
- [6] N. Zahin *ym.*, "Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery", *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH*, vsk. 27, nro 16, SI, ss. 19151–19168, kesä 2020, doi: 10.1007/s11356-019-05211-0.
- [7] A. Sani, C. Cao, ja D. Cui, "Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review", *Biochemistry and Biophysics Reports*, vsk. 26, s. 100991, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>.
- [8] S. Fraga *ym.*, "Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells", *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY*, vsk. 33, nro 10, ss. 1111–1119, loka 2013, doi: 10.1002/jat.2865.
- [9] S. Shamim, S. Ali, T. Ali, H. Sharma, B. N. Kishor, ja S. K. Jha, "Recent Advances in Monodisperse Gold Nanoparticle Delivery, Synthesis, and Emerging Applications in Cancer Therapy", *PLASMONICS*, tammi 2025, doi: 10.1007/s11468-024-02732-4.

- [10] C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, ja W. C. W. Chan, "Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake", *J. Am. Chem. Soc.*, vsk. 134, nro 4, ss. 2139–2147, helmi 2012, doi: 10.1021/ja2084338.
- [11] A. Carolina Martinez-Torres, D. G. Zarate-Trivino, H. Yarimet Lorenzo-Anota, A. Avila-Avila, C. Rodriguez-Abrego, ja C. Rodriguez-Padilla, "Chitosan gold nanoparticles induce cell death in HeLa and MCF-7 cells through reactive oxygen species production", *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*, vsk. 13, ss. 3235–3250, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165289.
- [12] K. Narayanan ja D. Gnanaprakash, "Branched Gold Nanostructures Through a Facile Fructose Mediated Microwave Route", *JOURNAL OF CLUSTER SCIENCE*, vsk. 33, nro 1, ss. 227–240, tammi 2022, doi: 10.1007/s10876-020-01969-3.
- [13] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, ja A. Plech, "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited", *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, vsk. 110, nro 32, ss. 15700–15707, elo 2006, doi: 10.1021/jp061667w.
- [14] L. M. Liz-Marzan, "Gold nanoparticle research before and after the Brust-Schiffrin method", *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, vsk. 49, nro 1, ss. 16–18, 2013, doi: 10.1039/c2cc35720h.
- [15] P. M. Lakhani, V. K. Rompicharla, B. Ghosh, ja S. Biswas, "An overview of synthetic strategies and current applications of gold nanorods in cancer treatment", *NANOTECHNOLOGY*, vsk. 26, nro 43, loka 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/43/432001.
- [16] U. Shedbalkar, R. Singh, S. Wadhvani, S. Gaidhani, ja B. A. Chopade, "Microbial synthesis of gold nanoparticles: Current status and future prospects", *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vsk. 209, ss. 40–48, heinä 2014, doi: 10.1016/j.cis.2013.12.011.
- [17] A. L. Ginzburg, L. Truong, R. L. Tanguay, ja J. E. Hutchison, "Synergistic Toxicity Produced by Mixtures of Biocompatible Gold Nanoparticles and Widely Used Surfactants", *ACS Nano*, vsk. 12, nro 6, ss. 5312–5322, kesä 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b00036.
- [18] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, ja M. A. El-Sayed, "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine", *CHEMICAL SOCIETY REVIEWS*, vsk. 41, nro 7, ss. 2740–2779, 2012, doi: 10.1039/c1cs15237h.

- [19] C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, ja C. Sanchez-Gonzalez, "Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies", *NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE*, vsk. 14, nro 1, ss. 1–12, tammi 2018, doi: 10.1016/j.nano.2017.08.011.
- [20] T. R. Kyriakides *ym.*, "Biocompatibility of nanomaterials and their immunological properties", *BIOMEDICAL MATERIALS*, vsk. 16, nro 4, heinä 2021, doi: 10.1088/1748-605X/abe5fa.
- [21] V. De Matteis ja R. Rinaldi, "Toxicity Assessment in the Nanoparticle Era", teoksessa *CELLULAR AND MOLECULAR TOXICOLOGY OF NANOPARTICLES*, vsk. 1048, Q. Saquib, M. Faisal, A. AlKhedhairi, ja A. Alatar, Toim., teoksessa *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1048. , 2018, ss. 1–19. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8_1.
- [22] P. Balashanmugam, P. Durai, M. D. Balakumaran, ja P. T. Kalaichelvan, "Phytosynthesized gold nanoparticles from *C. roxburghii* DC. leaf and their toxic effects on normal and cancer cell lines", *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY*, vsk. 165, ss. 163–173, joulu 2016, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.10.013.
- [23] A. Wozniak *ym.*, "Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications", *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE*, vsk. 28, nro 6, kesä 2017, doi: 10.1007/s10856-017-5902-y.
- [24] Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liau, ja G. S. Huang, "Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles", *Nanoscale Research Letters*, vsk. 4, nro 8, s. 858, touko 2009, doi: 10.1007/s11671-009-9334-6.
- [25] A. M. Alkilany ja C. J. Murphy, "Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?", *Journal of Nanoparticle Research*, vsk. 12, nro 7, ss. 2313–2333, syys 2010, doi: 10.1007/s11051-010-9911-8.
- [26] P. Falagan-Lotsch, E. M. Grzincic, ja C. J. Murphy, "One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vsk. 113, nro 47, ss. 13318–13323, marras 2016, doi: 10.1073/pnas.1616400113.
- [27] K. Jakic *ym.*, "Long-Term Accumulation, Biological Effects and Toxicity of BSA-Coated Gold Nanoparticles in the Mouse Liver, Spleen, and Kidneys", *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*, vsk. 19, ss. 4103–4120, 2024, doi: 10.2147/IJN.S443168.

- [28] X. Liu, N. Huang, H. Li, Q. Jin, ja J. Ji, "Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells", *LANGMUIR*, vsk. 29, nro 29, ss. 9138–9148, heinä 2013, doi: 10.1021/la401556k.
- [29] A. M. Alkilany ja C. J. Murphy, "Gold Nanoparticles with a Polymerizable Surfactant Bilayer: Synthesis, Polymerization, and Stability Evaluation", *Langmuir*, vsk. 25, nro 24, ss. 13874–13879, joulu 2009, doi: 10.1021/la901270x.