

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2017

Linda Puskala

# BIOHAJOAVAN PIIDIOKSIDIN BIOYHTEENSOPIVUUS VALKOSOLUJEN KANSSA

Linda Puskala

## BIOHAJOAVAN PIIDIOKSIDIN BIOYHTEENSOPIVUUS VALKOSOLUJEN KANSSA

Opinnäytetyön toimeksiantaja oli DelSiTech Oy, jonka lääkeannosteluteknologia perustuu patentoituun biohajoavaan biomateriaaliin, piidioksiidiin eli silikaan. Biomateriaalien täytyy olla bioyhteensopivaa, sillä ne ovat kontaktissa kudoksen, veren tai kudosten kanssa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia kuinka veren valkosolut, erityisesti neutrofiilit, reagoivat amorfiseen sooli-geeli-menetelmällä tuotettuun silikaan sen eri muodoissa: sooli, hydrogeeli, mikropartikkelit, soolin ja mikropartikkelien seos, sekä hydrogeelin ja mikropartikkelien yhdistelmäateriaali eli komposiitti. Opinnäytetyössä tutkittiin myös, vaikuttaako silikamikropartikkelien koko, muoto tai partikkelipitoisuus valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagositointiin.

Silikan bioyhteensopivuutta veren valkosolujen kanssa tutkittiin kahdella menetelmällä: luminolilla vahvistetulla kemiluminesenssimäärityksellä sekä virtausytometrisellä menetelmällä. Kemiluminesenssimäärityksellä voitiin mitata neutrofiilien oksidatiivisen aineenvaihdunnan aktivoitumista luminometrillä. Virtausytometrinen menetelmä mahdollisti neutrofiilien spesifisen tutkimisen erottamalla neutrofiilien populaation muista veren valkosoluista. Virtausytometrillä mitattiin emittoituvaa fluoresenssivaloa, joka oli peräisin fagositoiduista fluoreseiinisilikamikropartikkeleista.

Silikasooli ja silikahydrogeeli eivät aktivoineet veren valkosoluja, vaan näillä materiaaleilla todettiin olevan jopa inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen. Kaikki tutkittavat silikamikropartikkelit aktivoivat veren valkosoluja ja niitä fagositointiin neutrofiilien toimesta. Silikamikropartikkelien tuottamat vasteet olivat kuitenkin alhaisia verrattuna zymosaanipartikkelien aiheuttamaan vasteeseen, joka vastaa valkosolujen aktivoitumista, kun ne kohtaavat ja puolustautuvat keholle vieraita mikro-organismeja vastaan. Partikkelipitoisuudella sekä mikropartikkelien koolla havaittiin olevan vaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen. Näistä partikkelipitoisuudella oli suurempi vaikutus partikkelien fagositointiin. Silikasoolilla ja hydrogeelillä todettiin olevan inhiboiva vaikutus mikropartikkelien fagositointiin. Tulosten perusteella voidaan todeta, että silikasoolin/hydrogeelin ja mikropartikkelien yhdistelmäateriaali on bioyhteensopivampaa veren valkosolujen kanssa kuin pelkät silikamikropartikkelit.

### ASIASANAT:

Silika, bioyhteensopivuus, neutrofiilit, fagositointi, hengitysröyppäisy, kemiluminesenssi, virtausytometria

Linda Puskala

## BIOCOMPATIBILITY OF BIODEGRADABLE SILICA WITH WHITE BLOOD CELLS

This thesis was carried out in collaboration with DelSiTech Ltd. Their drug delivery technology is based on a patented biodegradable biomaterial, silicon dioxide, also called silica. Since all biomaterials are in contact with tissues, blood, or tissue fluid, they should be compatible with organic tissues and fluids.

The aim of this thesis was to study the reactions of white blood cells, especially neutrophils, to amorphous sol-gel produced silica. The silica was introduced to white blood cells in its different forms: sol, hydrogel, microparticles, sol-microparticle mixture and hydrogel-microparticle composite. Also, the impact of the size, shape and dosage of the microparticles on the activation of white blood cells and particle phagocytosis was studied.

The biocompatibility of silica with white blood cells was studied by two different methods: a chemiluminescence assay amplified with luminol and a flow cytometry method. The chemiluminescence assay measured the activation of the oxidative metabolism of the neutrophils with a luminometer, and the flow cytometry method was used to specifically study the neutrophils by separating them from the other white blood cells. The emittance of fluorescence light originating from the ingested fluorescein silica microparticles was measured with the flow cytometer.

The silica sol and the silica hydrogel did not activate the white blood cells; on the contrary, they were observed inhibiting the activation of the white blood cells. All of the studied silica microparticles activated the white blood cells and were ingested by neutrophils. The responses generated by silica microparticles were lower than responses generated by zymosan particles, which were comparable to the natural defensive response of white blood cells to foreign microorganisms. The dosage and the size of the microparticles were observed to have an impact on the activation of white blood cells. Of the two, dosage was observed to have a greater impact on the phagocytosis of the particles than did the size of the microparticles. The presence of silica sol and the hydrogel inhibited the phagocytosis of the microparticles. The results of the experiments show that the composite materials of silica microparticles and silicasol or hydrogel were more biocompatible with white blood cells than the silica microparticles alone.

### KEYWORDS:

silica, biocompatibility, neutrophils, phagocytosis, respiratory burst, chemiluminescence, flow cytometry

# SISÄLTÖ

<b>LYHENTEET JA SANASTO</b>	<b>8</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>9</b>
<b>2 BIOMATERIAALIT</b>	<b>11</b>
<b>3 BIOHAJOAVA PIIDIOKSIDI</b>	<b>13</b>
3.1.1 Amorfisen silikan valmistaminen sooli-geeli-menetelmällä	14
<b>4 IMMUNOLOGIA</b>	<b>17</b>
4.1 Immuunipuolustus	17
4.2 Veren valkosolut	18
4.2.1 Neutrofiilit	19
4.3 Fagosytoosi ja ”hengitystryöpsäys”	20
4.4 Neutrofiilien kemiluminesenssi	22
<b>5 PARTIKKELIEN OMINAISUUKSIEN VAIKUTUS FAGOSYTOOSIIN</b>	<b>23</b>
<b>6 VIRTAUSSYTOTOMETRIA</b>	<b>25</b>
<b>7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>30</b>
7.1 Materiaalit	31
7.2 Menetelmät	33
7.2.1 Silikasoolin valmistaminen sooli-geeli-menetelmällä	33
7.2.2 Silikamikropartikkelien valmistaminen sumukuivaamalla	34
7.2.3 Valkosolujen erottaminen kokoverestä ja solujen laskeminen Bürkerin laskukammiolla	35
7.2.4 Silikamikropartikkelien sekä soolin/geelin laimennossarjojen valmistus	36
7.2.5 Luminolilla vahvistetun kemiluminesenssin määrittäminen	38
7.2.6 Virtausytometrinen menetelmä	39
<b>8 TULOKSET JA POHDINTA</b>	<b>42</b>
8.1 Kemiluminesenssimäärityksen tulokset	42
8.1.1 Valkosolujen vaste tuoreeseen silikasooliin sekä hajotettuun silikahydrogeeliin	42
8.1.2 Valkosolujen vaste silikamikropartikkeleihin	46

8.1.3 Pienet silikamikropartikkelit	48
8.1.4 Keskikokoiset silikamikropartikkelit	51
8.1.5 Suuret silikamikropartikkelit	53
8.1.6 Partikkelikoon vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen	55
8.1.7 Sonikoinnin vaikutus mikropartikkelien fagosytointiin	56
8.1.8 Donitsin muotoiset silikamikropartikkelit	57
8.1.9 Silikasoolin ja silikamikropartikkelien seos	59
8.1.10 Yhdistelmäateriaali	60
8.2 Virtausytometriset tulokset	62
<b>9 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>70</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>73</b>

## LIITTEET

Liite 1. Liuosten valmistusohjeet

## KUVAT

Kuva 1. Hengitysryöpsäys.	21
Kuva 2. Partikkelien muodon ja fagosytoinnin aloittamiskohdan vaikutus fagosytoosiin.	24
Kuva 3. Virtausytometrin nestevirtausjärjestelmä ja partikkelien hydrodynaaminen fokuointi.	25
Kuva 4. Virtausytometrin toimintaperiaate kaavamaisessa muodossa.	26
Kuva 5. Valon siroaminen soluun osuessa.	27
Kuva 6. Histogrammi.	28
Kuva 7. 2D-pistekaavio.	29
Kuva 8. Punasolujen, valkosolujen ja veriplasman erottuminen dekstraani-sedimentaatiolla.	35
Kuva 9. Bürkerin laskukammio laskuruudukko.	36
Kuva 10. Pipetointikaavio KL-menetelmän reaktioseoksille eri partikkelipitoisuuksia käytettäessä.	39
Kuva 11. Tuoreen R400-silikasoolin eri %-osuuksien (V/V) kemiluminesenssikäyrien vertailua.	43
Kuva 12. Tuoreen R400-silikasooliosuuksien suhteelliset kemiluminesenssit.	44
Kuva 13. Hajotetun R400-hydrogeelin suhteelliset kemiluminesenssit.	45
Kuva 14. Tuoreen R400-silikasoolin ja hajotetun R400-silikahydrogeelin suhteellisten KL-arvojen vertailua.	46

Kuva 15. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien kemiluminesenssikäyrien vertailua.	49
Kuva 16. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien kemiluminesenssikäyrien vertailua positiivisen kontrolliin eli zyмосааnin kemiluminesenssiin.	50
Kuva 17. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien suhteelliset kemiluminesenssit.	50
Kuva 18. Keskikoisten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua.	51
Kuva 19. Keskikoisten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua positiiviseen kontrolliin eli zyмосааniin.	52
Kuva 20. Keskikokoisten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua solutaustaan.	52
Kuva 21. Suurten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua solutaustaan.	53
Kuva 22. Suurten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua positiiviseen kontrolliin eli zyмосааnin kemiluminesenssiin.	54
Kuva 23. Suurten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua solutaustaan.	54
Kuva 24. Pienten, keskikoisten ja suurten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua.	55
Kuva 25. Sonikoitujen silikamikropartikkelien suhteelliset KL-arvot.	56
Kuva 26. "Donitsin" muotoisten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua.	58
Kuva 27. Donitsin muotoisten mikropartikkelien suhteellisten KL-arvojen vertailua pyöreisiin mikropartikkeleihin.	59
Kuva 28. Tuoreen R400-silikasoolin eri sooliosuuksien vaikutus silikamikropartikkelien fagosytointiin.	60
Kuva 29. Lääkeainetta sisältävän komposiitin suhteelliset kemiluminesenssit.	61
Kuva 30. Neutrofiilipopulaation rajaaminen CD16-leimattujen neutrofiilien avulla.	63
Kuva 31. Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien fluoresenssin vertaamista partikkeleita fagosytoimattomiin neutrofiileihin (CD16 solutausta).	63
Kuva 32. Neutrofiilien fluoresenssia esittävät histogrammit ja niiden statistiikat.	64
Kuva 33. Eri partikkelipitoisuuksien fagosytointiprosenttien kasvun vertailua ajan funktiona.	67
Kuva 34. R400-silikasooliosuuksien (%) inhiboivien vaikutusten vertailua.	68

## TAULUKOT

Taulukko 1. Silikamikropartikkelien kokojakauma.	32
Taulukko 2. Fluoreseiinisilikamikropartikkelien kokojakauma.	32
Taulukko 3. Silikamikropartikkelien laimennossarjat.	37
Taulukko 4. R400-silikasoolin/geelin laimennossarjat.	37
Taulukko 5. Yhtä silikan muotoa sisältävän näytteen reagenssit / kuoppa.	38
Taulukko 6. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit / kuoppa.	38
Taulukko 7. Positiivisen kontrollinäytteen reagenssit / kuoppa.	38
Taulukko 8. Sooli-mikropartikkeliseoksen reagenssit / kuoppa.	39
Taulukko 9. Partikkelinäytteen reagenssit / näyteputki.	40
Taulukko 10. Sooli-mikropartikkeliseoksen reagenssit / näyteputki.	40
Taulukko 11. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit / näyteputki.	40
Taulukko 12. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit (CD16) / näyteputki.	40

Taulukko 13. Silikamikropartikkelien kokojakauma.	47
Taulukko 14. Reaktioseosten partikkelipitoisuudet ja partikkeliannokset.	48
Taulukko 15. Fluoreseiinisilikamikropartikkelien kokojakauma.	65
Taulukko 16. Partikkelipitoisuudet ja partikkeliannokset.	65
Taulukko 17. Fluoreseiinisilikamikropartikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosenttiosuus.	66
Taulukko 18. Eri partikkelipitoisuuksien fagosyointiprosenttien vertailua.	66
Taulukko 19. R400-silikasoolin vaikutus silikamikropartikkelien fagosyointiin.	67
Taulukko 20. Silikamikropartikkelien kokoerojen, reaktiolämpötilan sekä R400-silikasoolin vaikutukset partikkelien fagosyointiprosenttiin.	68

## LYHENTEET JA SANASTO

Silika	Piidioksidi (SiO <sub>2</sub> )
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
PE	Fykoerytriini
HCl	Suolahappo
NaOH	Natriumhydroksidi
Vaste	Elimistön, elimen, kudoksen tai solun reaktio ärsykkeeseen
KL	Kemiluminesenssi
MPO	Myeloperoksidaasi-entsyymi
R-arvo	Veden ja TEOS:n ainemäärien suhde
CMF	Calcium and magnesium free
FITC	Fluoreseiini-isotiosyanaatti
Plasebo	Materiaali, joka ei sisällä lääkeainetta



# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi DelSiTech Oy, joka on PharmaCityssä toimiva 2001 vuonna perustettu turkulainen lääkeannostelu- ja lääkekehitysyritys. DelSiTech on johtava biohajoavan piidioksidi-pohjaisen teknologian asiantuntija, joka mahdollistaa pienmolekyylisten lääkkeiden, biolääkkeiden ja virusvektoreiden kontrolloidun vapauttamisen. Yritys keskittyy lääkkeiden parenteraaliseen ja paikalliseen antoon. DelSiTech kehittää ja kaupallistaa lääkeannosteluteknologiaa, joka perustuu omaan patentoituun biohajoavaan biomateriaaliin, piidioksidiin eli silikaan.

Biomateriaaleiksi kutsutaan synteettisiä tai luontoperäisiä materiaaleja, joista valmistettuja tuotteita, kuten implantteja, käytetään mm. lääketieteellisiin tai biotekniikan sovelluksiin siten, että ne eivät häiritse tai haittaa elävän organismin toimintaa. Biomateriaalien pitää olla biohyhteensopivaa, sillä ne ovat kontaktissa kudoksen, veren tai kudosten kanssa. Biomateriaaleista valmistettuja tuotteita käytetään hoitamaan sairauksia tai vaurioita kuten esimerkiksi kudosteknologiassa korvaamaan tai parantamaan kudosta, sekä lääkeannosteluteknologiassa vapauttamaan lääkeainetta kehoon hallitusti.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia biohajoavan piidioksidin biohyhteensopivuutta veren valkosolujen, erityisesti neutrofiilien kanssa. Neutrofiilit ovat runsaslukuisimpia valkosoluja verenkierrossa ja ne muodostavat kehon ensimmäisen puolustuslinjan patogeenejä vastaan. Sooli-geeli-menetelmällä valmistettua amorfista silikaa käytetään hydrogeelin, mikropartikkelien tai niiden yhdistelmämuodossa eli komposiitin muodossa DelSiTechin lääkeannosteluteknologiassa silikan biohyhteensopivuuden ja monipuolisten ominaisuuksien vuoksi. Valmiste joutuu kosketuksiin veren valkosolujen kanssa, joten valkosolujen reaktiota on tärkeää tutkia. Opinnäytetyössä tutkittiin kuinka veren valkosolut, erityisesti neutrofiilit reagoivat sooli-geeli-menetelmällä tuotettuun silikaan, joka on tuoreen soolin tai hajotetun hydrogeelin, mikropartikkelien, soolin ja mikropartikkelien seoksen, tai hydrogeelin ja mikropartikkelien yhdistelmämuodossa. Opinnäytetyössä tutkittiin myös vaikuttaako mikropartikkelien koon vaihtelu mikrometrikokoluokassa ja seosten eri partikkelipitoisuudet neutrofiilien aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Lisäksi tutkittiin vaikuttaako partikkelien erilainen muoto valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Tätä tutkittiin ”donitsin” muotoisilla silikamikropartikkeleilla, jotka sisälsivät muista partikkeleista poiketen lääkeainetta, joka oli rakenteellisesti peptidi.

Silikan biohyteensopivuutta veren valkosolujen kanssa tutkittiin kahdella menetelmällä. Ensimmäiseksi neutrofiilien aktivoitumista tutkittiin luminolilla vahvistetulla kemiluminesenssimäärityksellä, jolla on mahdollista seurata neutrofiilien oksidatiivisen aineenvaihdon aktivoitumista reaaliaikaisesti. Käytännön osuuden toisessa vaiheessa kehitettiin virtausytometrinen menetelmä tukemaan kemiluminesenssimäärityksen tuloksia sekä tutkimaan spesifisemmin neutrofiilien kykyä fagosytoida silikamikropartikkeleita. Virtausytometrisessä menetelmässä käytettiin fluoresoivia fluoreseiinisilikamikropartikkeleita.

## 2 BIOMATERIAALIT

Biomateriaaleiksi kutsutaan synteettisesti valmistettuja tai luontoperäisiä materiaaleja, joista valmistettuja tuotteita, kuten implantteja tai proteeseja, käytetään mm. lääketieteellisissä, terapeuttisissa, diagnostisissa sekä biotekniikan sovelluksissa siten, että ne eivät häiritse tai haittaa elävän organismin toimintaa. Biomateriaalien pitää olla bioyhteensopivaa, sillä ne ovat kontaktissa kudoksen, veren tai kudosten kanssa. Biomateriaaleista valmistettuja tuotteita käytetään vahvistamaan, korjaamaan tai korvaamaan kudosta, elimiä tai kehon toimintaa, joka on menetetty trauman, sairauden tai tapaturman takia (Bandyopadhyay 2013, Törmälä et al. 2003).

Biomateriaalit voidaan jakaa synteettisiin ja luontoperäisiin eli biologista alkuperää oleviin materiaaleihin kemiallisen koostumuksen perusteella. Synteettisiin materiaaleihin kuuluvat polymeerit, metallit, keraamit ja komposiitit eli yhdistelmäateriaalit. Luontoperäiset materiaalit voivat olla alkuperältään ihmisestä tai eläimestä. (Törmälä et al. 2003. (Törmälä et al. 2003) Polymeerit muodostavat suurimman luokan biomateriaaleista ja niitä voidaan käyttää sekä pehmeään että kovan kudoksen sovelluksissa kudosteknologiassa. Polymeerejä käytetään laajalti myös lääkeannostelutekniikan sovelluksissa. Polymeerit voivat olla luontaisia (esim. kollageeni ja selluloosa) tai synteettisiä (esim. silikoni, PMMA). Metalleja käytetään enimmäkseen hammaslääketieteellisissä tai ortopedisissä sovelluksissa, joissa yleisimmin käytetään titaania tai sen metalliseoksia, ruostumatonta terästä tai koboltin ja kromin metalliseosta. Keraameja käytetään pääasiassa kovan kudoksen korjaamisessa, uudistamisessa ja vahvistamisessa ja esimerkiksi metalli-implanttien päällystämässä. Yleisempiä käytettyjä keraameja ovat kalsiumfosfaatti, alumiinioksidi ja biolasit. Polymeerin ja keraamin yhdistelmäateriaalit edustavat pääosaa biomateriaalien komposiiteista. (Bandyopadhyay 2013)

Biomateriaalien ja kudoksen välisten reaktioiden vasteet voidaan jakaa neljään erilaiseen tyyppiin: toksiseen, bioinertiin, bioaktiiviseen ja bioresorboituvaan. Toksisessa reaktiossa myrkyllinen materiaali aiheuttaa ympäröivän kudoksen kuolemaa. Bioinertin vasteen aiheuttaa myrkyttömät mutta biologisesti inaktiiviset materiaalit, jotka aiheuttavat ns. ”normaalin” vierasesinereaktion eli kudostavasteen, jossa keho pyrkii eristämään materiaalin muusta elimistöstä kapseloimalla materiaalin fibroottisen kudoksen sisään. Tämä kapseloituminen voi estää implantin toimimisen, jota esiintyy yleisemmin metalli-implanteilla. Metallimplantin päällystäminen bioaktiivisella materiaalilla voi estää sen

kapseloitumisen. Bioaktiivista vastetta esiintyy sellaisilla biomateriaaleilla, jotka ovat myrkyttömiä ja biologisesti aktiivisia. Nämä materiaalit voivat muodostaa yhteisen rajapinnan kudoksen kanssa, esimerkiksi luun pinnan kanssa. Bioaktiivisiin biomateriaaleihin kuuluu mm. bioaktiiviset lasit, monet polymeerit ja useat keraamit (esim. kalsiumfosfaatti). Bioresorboituvat materiaalit ovat myrkyttömiä ja liukunevat *in vivo*. Näihin materiaaleihin kuuluu mm. bioaktiiviset lasit, PLGA, kalsiumsulfaatti ja trikalsiumfosfaatti. Resorboivat biomateriaalit liukenevat ja syrjäytyvät uusiutuvan kudoksen tieltä osittain tai jopa kokonaan, jolloin kudoks voi korvata synteettisen materiaalin. (Törmälä et al. 2003, Bandyopadhyay et al. 2013)

Mikäli biomateriaalista valmistetun tuotteen on tarkoitus olla hajoamaton, se ei saa hajota elimistön olosuhteissa ja sen läsnäolo ei saa vaurioittaa kudosta, elimiä tai elimistöä. Jos biomateriaali on biohajoavaa, sen hajoamistuotteet eivät saa olla haitallisia elimistölle, kudoksille tai elimille. Tuotteiden elimistövaikutuksien ja käytön aiheuttamien mahdollisten vaurioiden tutkiminen on tärkeää ja yhdistää monien eri tieteen ja tekniikan alojen osaamista, kuten kemian, fysiikan, lääketieteen, materiaalitieteen, anatomian, immunologian ja solu- ja molekyylibiologian tuntemusta. (Migonney et al. 2014.)

### 3 BIOHAJOAVA PIIDIOKSIDI

Pii on yksi runsaiten maanpäällä esiintyvistä aineista ja sitä tavataan maapallolla tavallimmin piidioksidin eli silikan muodossa ( $\text{SiO}_2$ ). Luonnossa esiintyvää silikaa kutsutaan biosilikaksi ja sitä löytyy maaperästä, vesipohjaisista ympäristöistä, kasveista ja eläimistä. Silikan pinta sisältää funktionaalisia ryhmiä, jotka ovat ihanteellisia proteiinien adsorptioille ja entsyymien stabilointiin. Biomolekyylit, jotka ovat kapseloituneena biosilikan sisälle, ovat suojassa kemialliselta denaturoitumiselta ja hajottavilta entsyymeiltä, proteaaseilta. Silika on välttämätön aineosa luonnossa ja erityisesti meressä eläville lajeille kuten sienieläimille ja piilevälle. Nämä lajit ja monet levät rakentavat tukirankansa liuenneen silikan yksinkertaisimmasta muodosta, piihaposta. Biosilikaa voidaan valmistaa synteettisesti myös laboratorioissa, jonka ansiosta silikaa voidaan soveltaa monissa teknologioissa. (Tiwari et al. 2012)

Silika eli piidioksidi on monipuolinen materiaali ja sitä voidaan valmistaa synteettisesti moniin eri muotoihin, jotka voivat sisältää vaihtelevan määrän vettä. Silika liukenee kehon nesteisiin ja sitä jäljitteleviin vesipohjaisiin liuoksiin (pH 7,4 ja +37 °C) harmittomiksi yhdisteiksi, jotka poistuvat kehosta liukoisessa muodossa virtsan mukana. Erityisesti sooli-geeli-menetelmällä valmistetun amorfisen, enemmän tai vähemmän huokoisen silikan liukenemisnopeutta pystytään säätämään tunneista jopa useisiin kuukausiin. Amorfisen ja vesiliukoinen silika on bioyhteensopivaa ja sillä on havaittu olevan jopa positiivista vuorovaikutusta elävien organismien ja biomolekyylien kanssa. Kuitenkin tietyt silikan kiteiset muodot voivat olla keholle haitallisia ja aiheuttaa silikoosia eli kivipölykeuhkoa, joka on keuhkojen fibroottinen sairaus. (Viitala et al. 2007)

Sooli-geeli-menetelmä on yksi tutkituimmista menetelmistä valmistaa silikaa. Tässä menetelmässä silikaa valmistetaan nestefaasissa, joka tekee siitä potentiaalisen vaihtoehdon monenlaisiin sovelluksiin (Jokinen Mika, Koskinen Mika et al. 2010). Amorfisen sooli-geeli-menetelmällä valmistetun silikan tiedetään muodostavan nanoluokan huokoisen rakenteen, joka sisältää vaihtelevan määrän hydroksyyli-ryhmiä (-OH) ja vettä. OH-ryhmien määrään ja niiden pinta-alaan (tiheästä geelistä erittäin huokoiseen) on mahdollista vaikuttaa vaihtelemalla valmistusprosessin parametreja. OH-ryhmät vaikuttavat silikan biohajoavuusnopeuteen ja mitä enemmän silika sisältää OH-ryhmiä, sitä nopeampaa hajoaminen on. Silika hajoaa kehon nesteisiin hitaasti pääasiallisesti eroosiomekanismin välityksellä ja jossakin tapauksissa osittain diffuusiolla. Biohajoamisprosessi ei muuta

silikan tai ympäröivän kudoksen pH:ta. (DelSiTech Oy 2017) Amorfisen silikan liukoisuus kehon nesteitä jäljitteleviin liuoksiin (pH noin 7) on 130-150 ppm in sink-olosuhteissa (olosuhteet, jossa silika voi liueta vapaasti) (Jokinen et al. 2008).

Sooli-geeli-menetelmällä valmistettua silikaa ja muita amorfisia silikapohjaisia materiaaleja käytetään monissa biomateriaaliovelluksissa ja kudosteknologiassa. Matalassa lämpötilassa tapahtuva ja nestemäisen olomuodon prosessi mahdollistaa erilaisten biologisesti aktiivisten aineiden kapseloinnin silikan sisälle. Silikan sisälle voidaan kapseloida pienen molekyyli-massan lääkkeitä, proteiineja, soluja, viruksia ja biologisesti aktiivisia aineita, jotka ovat herkkiä ympäröiville olosuhteille. Myös eläviä soluja, bakteereja ja alkueläimiä voidaan kapseloida silikan sisälle, jolloin ne voivat toimia ikään kuin ”bio-reaktoreina” tuottamalla esimerkiksi terapeuttisia proteiineja tai jotain muita molekyyliä. (Viitala et al. 2007, Jokinen et al. 2013)

### 3.1.1 Amorfisen silikan valmistaminen sooli-geeli-menetelmällä

Sooli-geeli-menetelmä nimi viittaa prosessiin, jossa sooli muuttuu geeliksi (Jokinen et al. 2013). Sooli-geeli-menetelmää sovelletaan laajalti tuottamaan mm. silikaa, lasia ja keraamisia materiaaleja, koska menetelmällä pystytään valmistamaan puhdasta ja homogeenistä tuotetta suotuisissa olosuhteissa, kuten alhaisessa lämpötilassa. (Rahman et al. 2012)

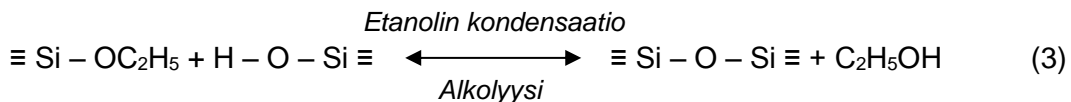
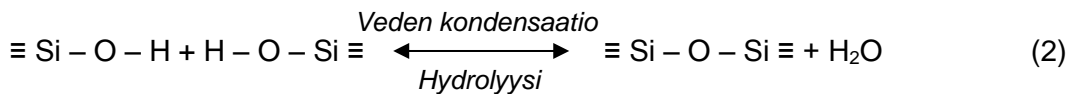
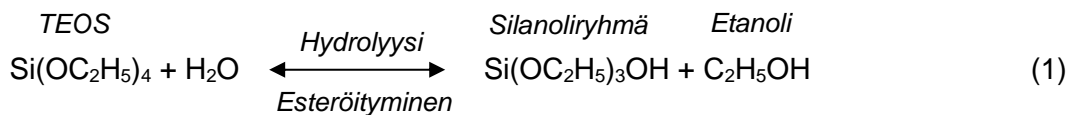
Sooli on homogeeninen seos, joka koostuu vähintään yhdestä nestemäisestä faasista sekä kiinteästä faasista. Sooli on kolloidinen dispersio, jossa jatkuvana faasina toimii neste, esimerkiksi vesi tai etanoli, ja dispergoituneena faasina kiinteä aine, esimerkiksi silikan kolloidiset partikkelit. Geelissä puolestaan jatkuvana faasina toimii kiinteä aine, esimerkiksi osittain tai täysin hydrolysoitunut silika ja dispergoituneena faasina esimerkiksi vesi tai etanoli. Geeliä, jossa dispergoituneena faasina toimii vesi, kutsutaan hydrogeeliksi. (Jokinen et al. 2013)

Sooli-geeli-prosessin lähtöaineena käytetään yleisesti metallialkoksiedeja kuten TEOS:a (tetraetyyliortosilikaatti), koska ne reagoivat helposti veden kanssa. Niiden hajoamistuotteiden haittavaikutukset pystytään myös minimoimaan, jolloin ne ovat harmittomia keholle sekä turvallisia erilaisille kapseloitaville molekyylielle, proteiineille, soluille ja viruksille. Käytettäessä TEOS:a silikan valmistuksessa, sivutuotteena muodostuu vain

etanolia, jonka elävät organismit kestävät hyvin. Mikäli etanolin tai alkoksidin hajoamistuotteiden oletetaan aiheuttavan haittaa kapseloitavalle proteiinille, niiden suhteellista määrää voidaan pienentää haiduttamalla ja lisäämällä vettä prosessin eri vaiheissa. (Jokinen et al. 2008)

Sooli-geeli-prosessissa lähtöaineen hydrolyysi- ja kondensaatioreaktioiden vaikutuksesta muodostuu sooli, joka joko muuntuu geeliksi tai muodostaa stabiilin soolin. (Jokinen Mika, Koskinen Mika et al. 2010) Mikäli reaktioita halutaan nopeuttaa, katalyytteina voi käyttää mineraalihappoa (esimerkiksi HCl) tai emästä (esimerkiksi NaOH tai NH<sub>3</sub>) (Rahman et al. 2012). Silikasoolien veden ja TEOS:n ainemäärien suhdetta,  $n(\text{H}_2\text{O}) / n(\text{TEOS})$ , kuvataan R-arvolla.

Kolmea seuraavaa reaktiota käytetään kuvaamaan sooli-geeli-prosessissa tapahtuvia hydrolyysi- ja kondensaatioreaktioita käytettäessä TEOS:a lähtöaineena:



Hydrolyysireaktiossa (1) alkoksyyliryhmä (OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) korvautuu hydroksyyliyhdyllä (OH), jolloin syntyy silanoliryhmiä ja etanolia. Seuraavissa kondensaatioreaktioissa (2 ja 3) silanoliryhmät muodostavat siloksaanisidoksia (Si – O – Si) ja samalla vapautuu vettä tai etanolia. (Brinker et al. 1990, Rahman et al. 2012) Kokonaisreaktiossa TEOS muodostaa veden kanssa reagoidessaan etanolia ja piidioksia (4).

Kondensaatioreaktioissa syntyneet monomeerit voivat alkaa muodostamaan isompia ja isompia molekyyliä polymerisaatioreaktiossa, jolloin muodostuu partikkeleita. Geeliytymisessä nämä partikkelit kasvavat ja/tai aggregoituvat ja yhdistyvät yhtenäiseksi verkostoksi. Geeli muodostuu, kun verkosto on laajentunut kauttaaltaan nesteeseen. (Brinker et al. 1990, Rahman et al. 2012)

Geelin muodostuminen voi tapahtua itsenäisesti happamissa silikasooleissa tai geelytyminen voidaan tehdä pakottamalla ja nopeuttamalla prosessia. Nopeuttaminen voidaan tehdä esimerkiksi sumukuivaamalla sooleja, missä soolin kuivuminen tapahtuu samanaikaisesti geelytyymisen ja muodonannon kanssa. Stabiilit soolit valmistetaan yleensä emäksisistä silikasooleista, joissa partikkelien koko ja määrä voivat kasvaa vain tiettyyn pisteeseen asti. Emäksisissä sooleissa partikkelit eivät aggregoidu tai aggregoituvat vain jonkin verran, kuitenkin pysyen yhä soolin muodossa. Stabiilit soolit voidaan myös pakottaa muuttamaan geeliksi lisäämällä siihen esimerkiksi suolaa, toista soolia, toista liuotinta ja/tai nestettä ja/tai säätämällä pH:ta. Syntyvä geelin rakenne on kuitenkin erilainen kuin happamista sooleista valmistetuilla geeleillä, sillä ne sisältävät isompia partikkeleita. Happamien soolien jo valmiiksi itsenäisesti tapahtuvaa geelytyymistä pystytään nopeuttamaan lisäämällä suolaa tai emästä. Soolin pH:n nostaminen emäksellä (kuten NaOH) lähelle neutraaleja olosuhteita (pH 5-7) on hyödyllistä ja jopa pakollista kun kapseloidaan biologisesti aktiivisia aineita (esim. proteiinit, virukset ja solut), jotka ovat herkkiä liian alhaiselle pH:lle. Myös olosuhteita muuttamalla, esimerkiksi haihduttamalla, lämpötilan muutoksella tai muita nesteitä lisäämällä, voidaan nopeuttaa geelin muodostumista. (Jokinen et al.2013)

Sooli-geeli-prosessilla valmistetusta silikasta voidaan valmistaa erilaisia kolmiulotteisia rakenteita kuten monoliitteja, kuituja, pinnoitteita, kalvoja ja partikkeleita. Monoliitteja voidaan valmistaa mm. valamalla muotteihin, kuituja kehräämällä sekä pinnoitteita ja kalvoja upotuspinnointusmenetelmällä. Partikkeleita valmistetaan tavallisesti sumukuivaamalla, jolloin muodostuneet partikkelit ovat pyöreitä ja mikrometrikokoluokassa. Partikkeleita voidaan valmistaa myös antamalla partikkelien koon ja määrän kasvaa soolissa emäksisissä olosuhteissa, jolloin liukseen syntyy kolloidinen silika dispersio (partikkelit <1 µm). Kolloidaalisen dispersion neste voidaan haiduttaa, jolloin syntyy nanopartikkeleista koostuva jauhe. (Jokinen et al. 2013)



## 4 IMMUNOLOGIA

Ihmisille on kehittynyt monitahoinen immuunipuolustusjärjestelmä, joka suojaa kehoa taudeilta. Lääketieteellisesti immunologia tarkoittaa oppia puolustus- ja suojausjärjestelmistä, jotka suojaavat kehoamme infektioitaudeilta. Immunologisissa järjestelmissä voi kuitenkin esiintyä häiriötä, jotka voivat altistaa infektioille tai aiheuttaa ns. immuunitauteja. (Hedman et al. 2011)

### 4.1 Immuunipuolustus

Keholle on kehittynyt suojautumismekanismeja, jotka suojaavat elimistöä sinne tunkeutuvilta patogeeneilta kuten viruksilta, bakteereilta, alkueläimiltä, sieniltä ja erilaisilta loisilta. Näissä mekanismeissa vieraat organismit tunnistetaan ja tuhoetaan sekä niitä vastaan kehittyä immunitetti. Immuunijärjestelmän toiminta perustuu valkosolujen ja molekyylien kykyyn erottaa omia ja vieraita rakenteita. Immuunijärjestelmä koostuu useista tarkoin säädellyistä, tarkoituksenmukaisista ja oikein kohdistetuista reaktioista. (Hedman et al. 2011)

Patogeenien vastainen puolustus voidaan jakaa luontaiseen eli synnynnäiseen ja hankittuun eli adaptiiviseen immunitettiin. Luontainen ja adaptiivinen immunitetti toimivat yhdessä tuhotakseen kehoon tunkeutuneita patogeeneja. Luontainen immunitetti kohottaa yleensä ensimmäisenä kehoon tunkeutuneen vieraan patogeenin, joten infektion alkuvaiheessa se kantaa päävastuun kehon immuunipuolustuksesta. Luontaisen immunitetin toimiessa kehon puolustuksen etulinjassa täytyy reaktioiden tapahtua nopeasti ja ne toistuvat yleensä samankaltaisina jättämättä muistijälkeä. Järjestelmään kuuluvia osia ovat kudosten yleispuolustusmekanismit (esim. suojaavat epiteelit, limakalvot, eritteet, monet entsyymit, matala pH-arvo) ja spesifisemmin järjestelmään kuuluvat molekyylit (esim. komplementtijärjestelmä, tunnistinmolekyylit, mikrobeja tuhoavat peptidit, monet viestittäjä-molekyylit ja tulehduksen välittäjäaineet), syöjäsolut eli fagosyytit ja eräät tappajasolut. Luontaisen puolustuksen molekyyleillä on vain rajallinen kyky tunnistaa kohderakenteita. Ne kykenevät karkeasti tunnistamaan ihmiskehelle vieraita rakenteita kuten bakteerien soluseinärakenteita (esim. peptidoglykaani, lipopolysakkaridi, flagellat), hiivan soluseinärakenteita (zymosaani), erilaisia sieniä sekä tiettyjä sokeriraken-

teita. Fagosyytit pystyvät tunnistamaan näitä immunostimulanteiksi kutsuttuja molekyy-  
lejä reseptoreillaan, jotka aktivoivat fagosytoosin eli solusyönnin. Komplementtijärjestel-  
mien ja fagosyyttien toimiessa yhdessä ne voivat tuhota kohteensa minuuteissa. Luon-  
tainen immunitetti on lähes samanlainen selkärangaisilla, selkärangattomilla ja jopa  
kasveilla. (Hedman et al. 2011)

Selkärangaisille eläimille on kehittynyt myös paljon pidemmälle kehittynyt spesifinen  
puolustuskeino, jota kutsutaan adaptiiviseksi immunitetiksi. Adaptiivinen immunitetti  
aktivoituminen on hidasta, joten infektion alussa suurimman vastuun immuunipuolustuk-  
sesta kantaa luontainen immunitetti. Adaptiivinen immunitetti kehittää suojan luontai-  
sen immunitetin tunnistamien patogeenien aiheuttamaa uusintainfektiota vastaan.  
Adaptiivisen immunitetin pääosassa toimivat lymfosyyteiksi kutsutut valkosolut, jotka  
jaetaan T- ja B-lymfosyytteihin. Kokonaisuudessaan B-lymfosyyttien tuottamat vasta-ai-  
neet ja T-lymfosyytit muodostavat monimuotoisen tunnistusvalikoiman, jonka avulla  
keho pystyy puolustautumaan aikaisemmin kohtaamiaan taudinaiheuttajia vastaan.  
(Hedman et al. 2011)

#### 4.2 Veren valkosolut

Selkärankaisten immuunipuolustukseen osallistuu verenkierrossa ja kudoksessa useita  
eri solutyyppejä. Veri sisältää monenlaisia soluja, joiden toiminnot vaihtelevat hapen kul-  
jetuksesta vasta-aineiden tuotantoon. Osa näistä soluista pysyy jatkuvasti verenkierr-  
rossa ja osa käyttää verisuonia vain kulkureittinä suorittaen tehtävänsä muualla ke-  
hossa. Kaikki veren solut ovat kehittyneet luuytimen varhaisista kantasoluista. (Alberts  
et al. 2008)

Veren solut jaetaan puna- ja valkosoluihin. Punasolut pysyvät pelkästään verenkierrossa  
kuljettaen hemoglobiiniin sitoutunutta happea ja hiilidioksidia. Valkosolut eli leukosyytit  
taistelevat taudinaiheuttajia vastaan tärkeänä osana immuunipuolustusjärjestelmää.  
Veri sisältää myös suuren määrän verihutaleita, jotka osallistuvat vaurioituneiden veri-  
suonten korjaamiseen ja veren hyytymiseen. (Alberts et al. 2008)

Valkosolut jaetaan yleisesti granulosyytteihin, monosyytteihin ja lymfosyytteihin.  
Granulosyyttien eli jyväsolujen tärkein tehtävä akuutissa tulehdusreaktiossa on tuhota  
patogeeniä fagosytoimalla. Granulosyytit sisältävät lukuisia lysosomeja ja jyväsiä.

Granulosyytit jaetaan kolmeen luokkaan morfologian ja soluelinten värjäytymisominaisuuksien mukaan: neutrofiileihin, basofiileihin ja eosinofiileihin. Basofiilit edesauttavat tulehdusreaktion syntymistä vapauttamalla tulehdusta aiheuttavia aineita kuten histamiinia. Eosinofiilit ovat neutrofiilien kokoisia soluja ja ne auttavat tuhoamaan parasitteja ja ovat tärkeitä välittäjäsoluja allergisissa reaktioissa. Eosinofiilit sisältävät runsaasti lysosomaalisia rakkuloita, jotka sisältävät voimakkaita entsyymejä ja solukalvoja vaurioittavia proteiineja. Granulosyyteistä runsaslukuisimpia ovat luontaisessa immuniteetissa avainasemassa olevat neutrofiilit, jotka tuhoavat mikro-organismeja fagosytoimalla ja tuottamalla reaktiivisia happiyhdisteitä. (Alberts et al. 2008, Hedman et al. 2011, Hervonen 2012) Seuraavassa kappaleessa tutustutaan tarkemmin neutrofiileihin ja niiden toimintaan niiden kohdatessa keholle vieraita partikkeleita.

#### 4.2.1 Neutrofiilit

Neutrofiilit eli polymorfonukleaariset leukosyytit ovat runsaslukuisimpia valkosoluja veressä ja ne muodostavat kehon luontaisen immuunijärjestelmän ensimmäisen puolustuslinjan patogeenejä vastaan. Neutrofiilit ovat lyhytikäisiä ja niiden keskimääräinen elinikä verenkierrossa on noin 5 vuorokautta. Neutrofiilit vaeltavat ympäri kehoa etsien vieraita partikkeleita tai vaurioitunutta kudosta sekä reagoivat laajaan valikoimaan tulehdusvälittäjäaineita. Neutrofiilit kuuluvat fagosyytteihin eli ne pystyvät fagosytoimaan patogeenejä tai vaurioituneen kudoksen osia (solusyönti) ja tuhoamaan ne tuottamallaan reaktiivisilla happiyhdisteillä, antimikrobisilla peptideillä ja entsyymeillä. Neutrofiilit vaeltavat infektiopaikalla erilaisten infektiopaikalla vapautuvien molekyylien kuten kemokiinien ja sytosiinien houkuttelemina. Neutrofiilit ovat erityisen tärkeitä, kun puolustaudutaan mikro-organismeja kuten bakteereja ja sieniä vastaan.

Neutrofiilit ovat varustettu useilla antimikrobisilla järjestelmillä, joiden avulla neutrofiilit pystyvät taistelemaan bakteereja, sieniä ja alkueläimiä vastaan. Neutrofiileille on tyypillistä monilohkoinen tuma ja ne sisältävät runsaasti solun sisäisiä rakkuloita, joiden sisällön eksosytoosi on ratkaisevassa asemassa neutrofiilien varhaisesta aktivoitumisesta fagosytoitujen mikro-organismien tuhoamiseen asti. Rakkuloita on kolmea eri päätyyppiä: atsuofiiliset (primääriset), spesifiset (sekundaariset) ja gelatinaasirakkulat (tertiääriset). Atsuofiiliset rakkulat ovat peroksidaasipositiivisia, jotka sisältävät runsaasti myeloperoksidaasi-entsyymiä (MPO). MPO on peroksidaasipositiivisissa rakkuloissa pääasemassa oleva proteiini ja sitä vapautetaan fagosomin sisälle tai solun ulkopuolelle

neutrofiilien aktivoitumisen aikana. MPO reagoi neutrofiilien tuottamien happiradikaalien kanssa nostamalla niiden toksisuutta. Atsurofiiliset rakkulat sisältävät myös antibakteerisia peptidejä ja proteolyyttisiä entsyymejä, joita ovat esimerkiksi elastaasi, proteinaasi-3 ja katepsiini G. (Faurichou et al. 2003)

Peroksidaasinegatiiviset rakkulat voidaan jakaa spesifisiin (sekundaarisiin) ja gelatinaasirakkuloihin (tertiäärisiin). Rakkulat eroavat toisistaan huomattavasti niiden proteiinisisältönsä ja proteiinien eritysominaisuuksiltaan. Suuremmat spesifiset rakkulat sisältävät runsaasti antibioottisia aineita toisin kuin pienemmät gelatinaasirakkulat. Spesifiset rakkulat sisältävät runsaasti laktoferriniä ja vain vähän gelatinaasia, kun taas gelatinaasirakkulat sisältävät runsaasti gelatinaasia ja vähemmän laktoferriniä. (Faurichou et al. 2003)

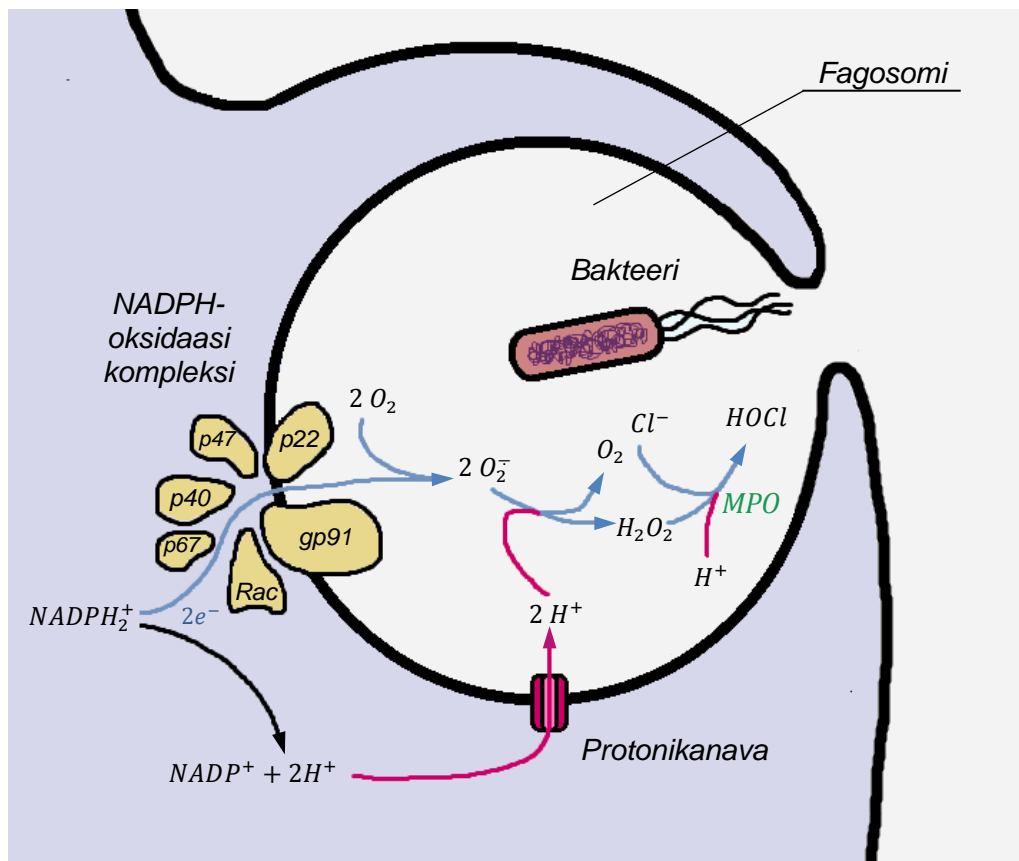
Neutrofiilit voivat fagosytoida opsonoituja ja opsonoimattomia partikkeleita, jotka tunnistetaan spesifisillä reseptoreilla. Pääasiallisia opsonoituja partikkeleita tunnistavia reseptoreita ovat Fc-reseptorit ja  $\beta$ 2-integrinien alaryhmät, jotka sitovat immunoglobuliineja (IgG) tai komplementtijärjestelmän päällystämiä partikkeleita. (Lee et al. 2003) Opsonoimattomien partikkelien tunnistamisessa toimivat CR1- ja CR3-reseptorit. Näillä reseptoreilla on mahdollisesti lektiinin kaltaisia ominaisuuksia ja ne pystyvät olemaan vuorovaikutuksessa bakteerien pinnan kanssa, joka käynnistää opsoni-riippumattoman neutrofiilien aktivoitumisen. Neutrofiilien CR1- ja CR3-reseptoreilla on monitoiminen rooli, sillä ne sitovat opsonoituja sekä opsonoimattomia ligandeja. (Leino et al. 1991)

#### 4.3 Fagosytoosi ja ”hengitysryöpsäys”

Neutrofiilien fagosytoidessa vieraita partikkeleita sisäänsä yhdistyvät neutrofiilien solun sisäiset rakkulat fagosomiin. Fuusioituneen fagosomin sisällä partikkelit tuhoetaan rakkuloista eritettujen entsyymien, antimikrobisten peptidien ja reaktiivisten happiyhdisteiden avulla.

Näiden sytotoksisten aineiden tuottaminen voidaan jakaa happiriippuvaiseen tai hapesta riippumattomaan mekanismiin, jotka toimivat yhteistyössä tuhotakseen mikrobeja. Hapesta riippumattomassa mekanismissa toimii neutrofiilin atsurofiiliset, spesifiset ja gelatinaasirakkulat. Nämä rakkulat sisältävät mikrobittapoon erikoistuneita entsyymejä, antimikrobisia proteiineja ja peptidejä. Toinen neutrofiilien tappomekanismeista on hapesta riippuvainen reaktio ja sen pääosassa esiintyy NADPH-oksidaasi ja MPO-entsyymit.

NADPH-oksidaasi on 6 proteiinista koostuva kompleksi, joka sijaitsee joko neutrofiilin solukalvolla, fagosomin, gelatanaasirakkuloiden tai spesifisten rakkuloiden kalvolla. Fagosytoinnin aikana tapahtuu rakkuloiden solunsisäinen fuusiotapahtuma, jossa rakkulat yhdistyvät syntyvän fagosomin kalvoon tuoden MPO:n ja NADPH-oksidaasin samaan reaktiopaikkaan. Fagosytoinnin aikana elektronit siirtyvät NADPH-oksidaasilta happimolekyylille, jolloin syntyy superoksidia ( $O_2^-$ ) fagosomin sisälle sekä solun ulkopuolelle. Superoksidi muunnetaan nopeasti entsyymien avulla toksisiksi happiyhdisteiksi kuten vetyperoksidiksi ( $H_2O_2$ ). Tätä NADPH-oksidaasin katalysoimaa hapettumisreaktiota kutsutaan ”hengitysyöpsäykseksi”. Tämän jälkeen atsuofiillisten rakkuloiden MPO reagoi vetyperoksidin kanssa muuntaen sen vielä myrkyllisempään muotoon, hypokloorihapokkeksi ( $HOCl$ ), joka on avainasemassa bakteeritapossa (Kuva 1). (Mayer-Scholl et al. 2004, DeLeo et al. 1996)



Kuva 1. Hengitysyöpsäys.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-järjestelmä luo myös muita toksisia aineita hapettamalla mm. kloridia, tyrosiinia ja nitriittiä, jolloin syntyy hypokloorihapoketta (HOCl), tyrosiiniradikaaleja ja reaktiivisia tyren välimuotoja. Näistä kaikki voivat hyökätä ja hajottaa mikro-organismien solukalvon. (Faurichou et al. 2003)

Neutrofiilien tehtävänä on poistaa infektoivia aineita, vieraita partikkeleita ja vaurioitunutta kudosta kehosta, mutta neutrofiilien tuottamat reaktiiviset happiyhdisteet voivat myös vaurioittaa tulehdusalueen lähellä olevaa tervettä kudosta. Reaktiivisten happiyhdisteiden onkin todettu olevan osallisena kudonvaurioissa, jotka liittyvät useisiin tulehdussellisiin sairauksiin, kuten reumaattiseen niveltulehdukseen, iskemia-reperfuusiovaurioon ja aikuisilla tavattavaan hengenahdistusoireyhtymään. (DeLeo et al. 1996)

#### 4.4 Neutrofiilien kemiluminesenssi

Osa neutrofiilien tuottamista reaktiivisista happiyhdisteistä ovat muodostuessaan energialtaan virittyneessä tilassa ja niiden viritystilan laskiessa takaisin alemmalle energiatasolle ne emittoivat fotoneja. Tätä emissiovaloa kutsutaan kemiluminesenssiksi (KL). Neutrofiilien tuottama luontainen kemiluminesenssi on kuitenkin liian alhainen mitattavaksi, joten sitä voidaan vahvistaa luminolilla (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-ftaaliatsiinidioni) jopa 1000-10000-kertaisesti. Luminolilla vahvistetun KL:n on osoitettu olevan lähes kokonaan riippuvainen MPO:sta. Luminoli vahvistaa solunsisäistä ja ulkoista emissiovaloa. (Dahlgren et al. 1999, Lilius et al. 2006)

Luminolin tiedetään emittoivan valoa 425 nm:n aallonpituudella, joten sillä vahvistettua kemiluminesenssiä voidaan mitata tällä aallonpituudella luminometrillä. Tämä luminolilla vahvistettu kemiluminesenssimääritys on todella herkkä, nopea ja toistettava menetelmä, jolla voidaan mitata oksidatiivisen aineenvaihdunnan aktiivisuutta, joka on yhteydessä fagosytoosiin. (Leino et al. 1991)

## 5 PARTIKKELIEN OMINAISUUKSIEN VAIKUTUS FAGOSYTOOSIIN

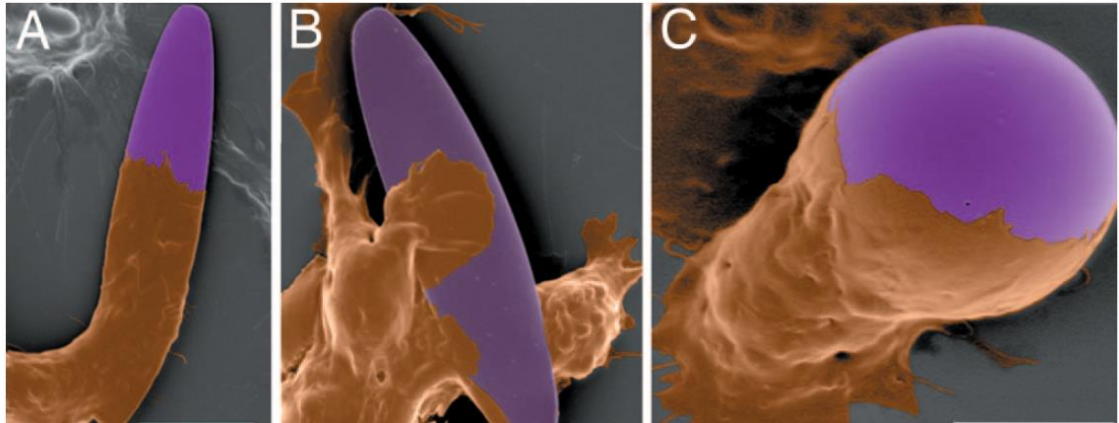
Partikkelien fagosytointiin valkosolujen toimesta voi vaikuttaa partikkelien erilaiset ominaisuudet kuten pintarakenteet, koko, muoto ja partikkelimäärä.

Partikkelien pintarakenteet ja fysikaaliset ominaisuudet voivat vaikuttaa fagosytoosiin. Esimerkiksi silikaa esiintyy kiteisessä sekä amorfisessa muodossa, joiden fysikaaliset ominaisuudet eroavat toisistaan, vaikka molemmat muodostuvatkin samasta molekyyli-rakenteesta ( $\text{SiO}_2$ ). Kiteisen silikan, joka on hiekan ja kivien pääainesosa, on arvioitu aiheuttavan vakavamman tulehdusreaktion keuhkoissa kuin amorfisen silikan. Tämän ansiosta amorfista silikaa pidetäänkin turvallisempana vaihtoehtona kuin kiteistä silikaa. Amorfista silikaa käytetäänkin monissa materiaaleissa kuten lääkkeissä, maaleissa, kosmetiikassa ja elintarvikkeissa. Amorfista silikaa käytetään myös muissa lääketieteen ja biotekniikan sovelluksissa, sekä lääkeannosteluteknologiassa. (Kusaka et al. 2014)

Nanoteknologian kehittyessä amorfisten silikananopartikkelien käyttö on noussut suosi-oon silikan ainutlaatuisten ominaisuuksien ansiosta. Monissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että nanopartikkelit aiheuttavat suuremman tulehdusvasteen kuin mikropartikkelit eli valkosolut aktivoituvat ja fagosytoivat nanopartikkeleita herkemmin. (Kusaka et al. 2014) Partikkelien koolla on näin ollen todettu olevan merkitystä fagosytointiin ja syn-tyvän tulehdusreaktion voimakkuuteen. Nanopartikkeleiksi kutsutaan usein 1-100 nm:n kokoisia partikkeleita ja mikropartikkelit ovat suurempia kuin 1  $\mu\text{m}$ . Partikkelin koolla on merkitystä myös silloin, kun fagosytoinnin kohteeksi joutunut partikkeli on suurempi kuin fagosytoiva valkosolu (Champion et al. 2006). Tämä vaikeuttaa ja hidastaa huomatta-vasti fagosytointia tai estää sen kokonaan. Myös partikkelimäärällä voi olla merkitystä fagosytoinnin tehokkuuteen, sillä esimerkiksi silikapartikkeleilla on ominaista aggregoi-tua. Näin ollen partikkelien määrän kasvaessa partikkelit alkavat kiinnittyä toisiinsa muo-dostaen yhä suurempia partikkeleita. Tämä ilmiö voi vaikuttaa partikkelien fagosytointiin hidastaen, vähentäen tai estäen sen jopa kokonaan.

Fagosytointiin valkosolujen toimesta vaikuttaa myös partikkelien muoto sekä partikkelin kohta, johon valkosolu kiinnittyy aloittaessaan fagosytoinnin. Esimerkiksi pyöreiden par-tikkelien fagosytointi tapahtuu helposti niiden symmetrisen muodon ansiosta. Partikkelin

ollessa esimerkiksi sauvamainen sen fagosytointiin vaikuttaa fagosytoinnin aloittamis-kohta. Fagosytointi tapahtuu tehokkaammin valkosolun kiinnittyessä sauvamaisen partikkelin päätyyn, joka on pinta-alaltaan kapeampi kuin partikkelin suoraviivainen keski-kohta. (Kuva 2)



Kuva 2. Partikkelien muodon ja fagosytoinnin aloittamiskohtan vaikutus fagosytoosiin. (Champion et al. 2006)

Champion et al. toteaa artikkelissaan, että partikkelin muodolla ja fagosytoinnin aloitus-kohtalla on suurempi merkitys partikkelien fagosytointiin kuin itse partikkelin koolla. Partikkelin koolla on vaikutusta fagosytointiin sellaisissa tapauksissa, missä partikkelin koko ylittää solun koon. (Champion et al. 2006)

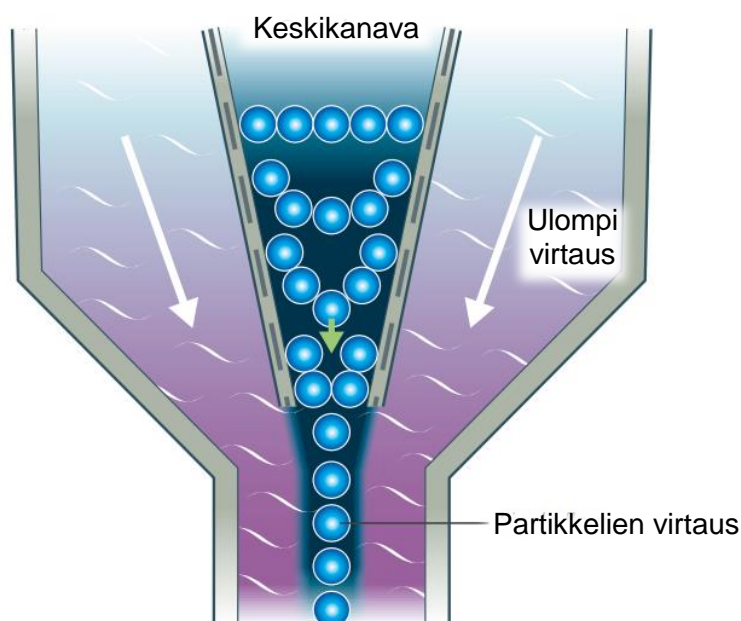
DeSiTechin lääkeannosteluteknologiassa käytetään vain amorfisia silikamikropartikkeleita, jotka ovat keskimäärin 3  $\mu\text{m}$ :n kokoluokkaa. Amorfisen silikan on todettu olevan biohyhteensopivaa, mutta amorfisten silikamikropartikkelien aiheuttamaa vastetta veren valkosoluissa on kuitenkin tärkeää tutkia lisää.



## 6 VIRTAUSSYTOTOMETRIA

Virtausytometrillä pystytään samanaikaisesti mittaamaan ja analysoimaan yksittäisten partikkelien, useimmiten solujen ominaisuuksia niiden virratessa lasersäteen läpi. Partikkelien mitattavia ominaisuuksia ovat suhteellinen koko ja granulaarisuus (sisäinen monimutkaisuus), sekä suhteellinen fluoresenssin voimakkuus. Näitä ominaisuuksia määritetään optisella ja sähköisellä järjestelmällä, jotka ovat kytköksissä toisiinsa. Tämä järjestelmä arkistoi partikkeleista tai soluista siroavaa valoa ja fluoresenssin emissiota. (Jose San 2000, Weaver 2000)

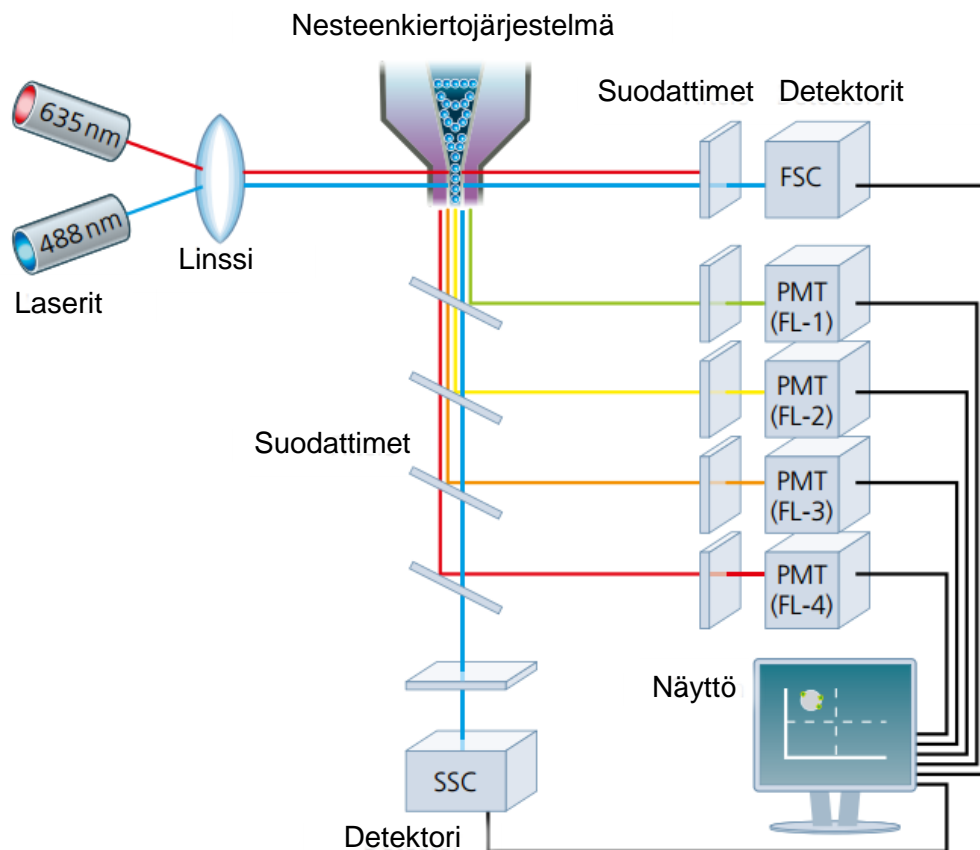
Virtausytometri toimii nestekiertojärjestelmällä, jonka avulla partikkelit pystytään johtamaan virran mukana yksitellen lasersäteen läpi. Analysoitava näyteliuos imetään virtausytometrin näytteenottoputken sisään, joka sisältää ulomman vaippakerroksen ja kapenevan keskikanavan jonne nestemäinen näyte injektoidaan. Partikkelit järjestäytyvät sattumanvaraisesti keskikanavassa. Näytteenottoputken vaippakerroksessa virtaavalla nesteellä on suurempi virtausnopeus kuin näytteellä keskuskanavassa, jolloin se luo voimakkaan vetovaikutuksen kapenevasta keskuskanavasta virtaavalle nesteelle. Tämän nestevirtausjärjestelmän ansiosta partikkelit järjestäytyvät jonoon, jolloin ne voidaan tutkia yksitellen. Tätä ilmiötä kutsutaan hydrodynaamiseksi fokuksiksi (Kuva 3). (Jose San 2000, Weaver 2000)



Kuva 3. Virtausytometrin nestevirtausjärjestelmä ja partikkelien hydrodynaaminen fokuksointi (Weaver 2000).

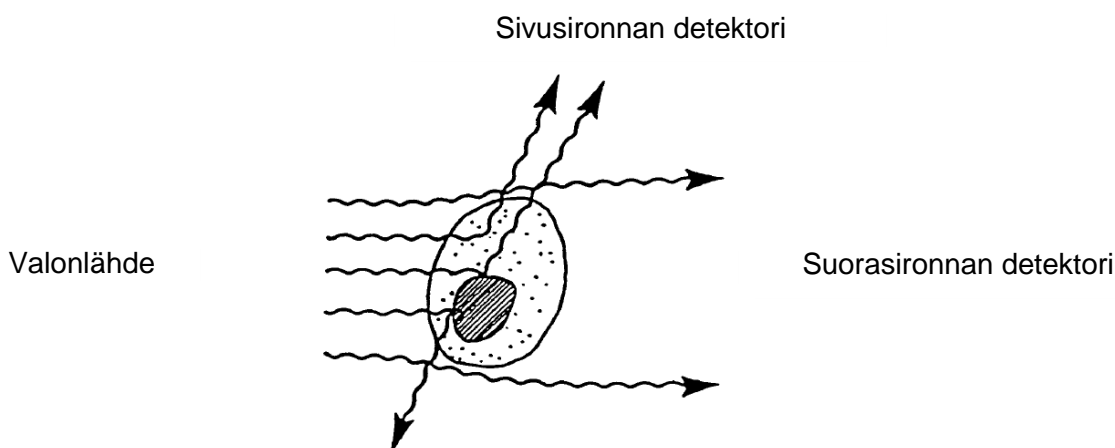
Hydrodynaamisen fokuosoinnin jälkeen partikkelit johdetaan yksitellen yhden tai useamman valonlähteen (laserin) läpi. Valon siroaminen tai fluoresenssin emissio antavat tietoa partikkelien/solujen ominaisuuksista. Laser ja kaarilamppu ovat yleisimmin käytettyjä valonlähteitä virtausytometreissä. (Weaver 2000)

Virtausytometri sisältää kolme pääjärjestelmää, joita ovat nestekierto, optinen ja sähköinen järjestelmä. Nestekierto järjestelmä kuljettaa määrittettävät partikkelit virran mukana lasersäteen läpi. Optinen järjestelmä sisältää laserin ja optiset suodattimet, joilla partikkeleista siroava valo ohjataan sopiviin detektoreihin. Detektorien tarkkuutta kontrolloidaan optisilla suodattimilla, jotka estävät toisien aallonpituuksien läpäisyä, mutta päästävät kuitenkin tietyt aallonpituudet läpi. Sähköinen järjestelmä muuntaa detektoidut valonsäteet sähköisiksi signaaleiksi, joita tietokone pystyy käsittelemään. Seuraava kuva tiivistää tyypillisen virtausytometrin toimintajärjestelmän (Kuva 4). (Jose San 2000, Weaver 2000)



Kuva 4. Virtausytometrin toimintaperiaate kaavamaisessa muodossa (Weaver 2000).

Lasersäteen osuessa yksittäiseen partikkeliin tapahtuu valonsirontaa, jota voidaan detektoida. Valon siroaminen antaa tietoa partikkelin fysikaalisista ominaisuuksista kuten koosta ja granulaarisuudesta eli sisäisestä monimutkaisuudesta. Valoa, jota mitataan 90-asteen kulmassa, kutsutaan sivusironnaksi. Sivusironnan valo kerätään objektiivilla, jota kutsutaan sivusirontakanavaksi (The side scatter channel, SSC). Sivusironta kertoo solun tai partikkelin granulaarisuudesta. Suorasironta eli suoraan kulkeva valonsäde mitataan objektiivilla, jota kutsutaan suorasirontakanavaksi (The forward scatter channel, FSC). Suorasironta antaa puolestaan tietoa solun tai partikkelin koosta ja sen avulla pystyy myös esimerkiksi erottamaan elävät solut hajonneiden solujen palasista. Jokaisella partikkelilla ja solulla on ainutlaatuinen sivu- ja suorasironta, joiden avulla pystytään mm. erottelemaan erilaiset solutyypit heterogeenisestä näytteestä (Kuva 5).



Kuva 5. Valon siroaminen soluun osuessa (Jose San 2000).

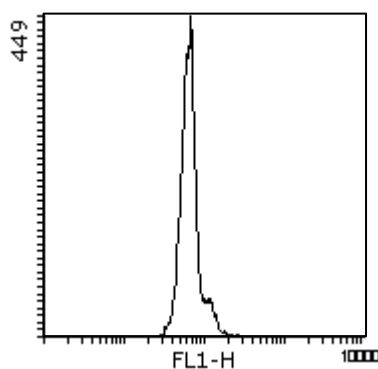
Fluoresoiva yhdiste absorpoo valoenergiaa aallonpituudella, joka on ominainen tälle yhdisteelle. Tämä valon absorptio aiheuttaa fluoresoivan yhdisteen elektronien siirtymisen korkeammille energiatasolle (eksikaatio). Virittyneet elektronit palautuvat nopeasti takaisin alemmille energiatasolle, jolloin ylimääräinen energia emittoituu valofotoneina (emissio). Aallonpituuden aluetta, jolla fluoresoiva yhdiste voidaan virittää, kutsutaan absorptiospektriksi. Koska absorptio siirtymävaiheissa kuluu enemmän energiaa kuin emissiossa, emission aallonpituus on pidempää kuin absorboidut aallonpituudet. Partikkeliyhdisteiden emission aallonpituuksia kutsutaan emissiospektriksi. (Weaver 2000)

Virtaussytometrissä on erillisiä fluoresenssikanavia (FL-), joiden avulla detektoidaan emissiovaloa. Opinnäytetyössä käytettiin virtaussytometriä, joka sisälsi kaksi Argon-

laseria (488 nm sininen ja 635 nm punainen). Näiden avulla pystytään mittaamaan fluorokromien emissiovaloa neljällä eri detektorilla, joista kolme mittaa sinisestä laserista ja yksi punaisesta laserista siroavaa valoa. Fluoresenssi 1-kanavalla (FL-1) voidaan detektoida emissiovaloa 530 nm:n aallonpituudella (Fluoreseiini, FITC, PE), fluoresenssi 2-kanavalla (FL-2) voidaan puolestaan 585 nm:n (mm. PE) ja fluoresenssi 3-kanavalla (FL-3) 670 nm:n aallonpituudella. Neljäs detektori virittyy punaisesta laserista ja emissiovalo detektoidaan 661 nm:n aallonpituudella (FL-4). (Turku Centre for Biotechnology, haettu 02.04.2017.)

Virtausytometrisessä mittauksessa voidaan käyttää useampia fluorokromeja, jos ne pystytään virittämään samalla aallonpituudella (448 nm) ja niiden emission aallonpituudet eivät ole liian lähellä toisiaan. Fluoreseiinin ja PE:n yhdistelmä täyttää nämä kriteerit, sillä niiden emission aallonpituudet ovat tarpeeksi kaukana toisistaan, jolloin ne pystytään mittaamaan eri detektoreilla (FL-1, FL-2). (Jose San 2000) Mutta PE on siitä erikoinen, että se emittoi sekä vihreää (kuten fluoreseiini) että punaista fluoresenssivaloa (Leino et al. 1991). PE voidaan detektoida siten molemmilla fluoresenssikanavilla, joista FL-1 mittaa emissiovaloa 530 nm:n aallopituudella (vihreä valo) ja FL-2 585 nm:n aallopituudella (punainen valo).

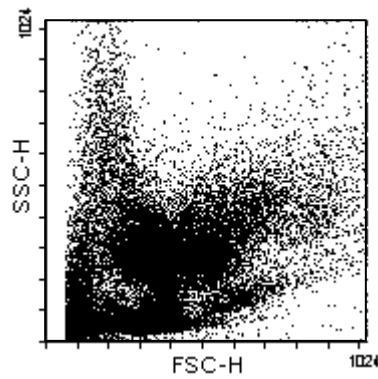
Sen jälkeen, kun valosignaalit on muutettu sähköisiksi pulsseiksi ja tietokoneella luettavaksi lukuarvoiksi, ne tallennetaan tietojärjestelmään. Mittaustulokset partikkeleista/soluista voidaan esittää usealla eri esitystavalla, joita on esimerkiksi histogrammi (pylväsdiagrammi) ja 2D- tai 3D-pistekaavio (Dot plot). Yksittäinen parametri, esimerkiksi fluoresenssi, voidaan esittää histogrammilla, jossa x-akseli kuvaa fluoresenssin voimakkuutta (kasvaa oikealle mentäessä) ja y-akseli esittää mitattujen tapahtumien määrän (Kuva 6). (Jose San 2000, Weaver 2000)



Kuva 6. Histogrammi.

Jokainen tapahtuma sijoittuu x-akselilla sille kohdalle, joka vastaa sen tuottamaa signaalia (fluoresenssia). Saman intensiteetin omaavat tapahtumat järjestäytyvät samalle kohdalle x-akselilla ja mitä kirkkaampia signaalit ovat, sitä oikeammalle ne sijoittuvat x-akselilla.

Kahta parametria voidaan kuvata samanaikaisesti pistekaaviossa, jossa yksi parametri kuvataan x-akselilla ja toinen y-akselilla. Näitä parametreja voi olla esimerkiksi solujen koko (FSC) ja granulaarisuus (SSC) (Kuva 7).



Kuva 7. 2D-pistekaavio.

## 7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Käytännön osuudessa silikan bioyhteensopivuutta veren valkosolujen kanssa tutkittiin kahdella eri menetelmällä: luminolilla vahvistetulla kemiluminesenssimäärityksellä (KL-määritys) ja virtaussytometrisellä menetelmällä.

KL-määritys on todella herkkä, nopea ja toistettava menetelmä. Tällä menetelmällä voidaan mitata neutrofiilien oksidatiivisen aineenvaihdunnan aktiivisuutta, joka tapahtuu fagosytoosin yhteydessä. KL-mittauksissa tutkittiin kuinka silika tuoreen soolin (R400), hajotetun hydrogeelin (R400), erikokoisten mikropartikkelien, soolin ja mikropartikkelien seoksen sekä hydrogeelin ja partikkelien yhdistelmäperiaalein (komposiitin) muodossa aktivoi veren valkosoluja ja erityisesti neutrofiilejä. Mikropartikkelien koon lisäksi tutkittiin kuinka reaktioseosten eri partikkelipitoisuudet ja sooliosuudet vaikuttavat valkosolujen aktivoitumiseen ja mikropartikkelien fagosytointiin neutrofiilien toimesta. Menetelmällä tutkittiin myös vaikuttaako silikamikropartikkelien erilainen muoto partikkelien fagosytointiin ja valkosolujen vasteen voimakkuuteen käyttämällä donitsin muotoisia silikamikropartikkeleita. Neutrofiilien luontaista ja heikkoa kemiluminesenssia vahvistettiin luminolilla. Luminolilla vahvistettua kemiluminesenssia mitattiin luminometrillä valmiiksi asetetulla ohjelmalla: 425 nm:n aallonpituudella, +37 °C:ssa ja 40–60 minuutin ajan. Tällä menetelmällä pystyttiin tutkimaan valkosolujen aktivoitumista reaaliaikaisesti.

Käytännön osuuden toisessa vaiheessa kehiteltiin virtaussytometrinen menetelmä, jonka tarkoituksena oli tukea KL-määrityksestä saatuja tuloksia. Näissä mittauksissa keskityttiin tutkimaan neutrofiilien kykyä fagosytoida fluoreseiinisilikamikropartikkeleita ja silikasoolin vaikutusta silikapartikkelien fagosytointiin. Virtaussytometrillä on mahdollista määrittää silikamikropartikkelien fagosytointia mittaamalla spesifisesti neutrofiileistä emittoituvaa fluoresenssivaloa. Tämä valo on peräisin fluoreseiinisilikamikropartikkeleista. Virtaussytometrillä ei kuitenkaan pysty suorittamaan reaaliaikaisia mittauksia, joten valkosolujen annettiin reagoida silikan kanssa tiettyihin aikapisteisiin asti. Reaktiot pysäytettiin asettamalla näytteet jäähäuteeseen. Reaktioiden annettiin tapahtua +37 °C:ssa, mutta menetelmällä tutkittiin myös kuinka reaktiolämpötilan lasku +4 °C:seen vaikuttaa neutrofiilien kykyyn aktivoitua ja fagosytoida partikkeleita.

Virtaussytometrisessä mittauksessa neutrofiilit pystyttiin erottamaan muista veren valkosoluista leimaamalla ne fluoresoivalla monoklonaalisella vasta-aineella (PE Anti-human

CD16), joka sisältää fykoerytriini-fluorokromeja. Näin pystyttiin erottamaan neutrofiilien populaatio muista veren valkosoluista ja keräämään spesifisesti tietoa neutrofiileistä.

Käytännön osuuden aikana yritettiin myös valmistaa fluoreseiinisilikamikropartikkeleita päällystämällä sumukuivaamalla valmistettuja silikamikropartikkeleita fluoreseiiniliuosella, mutta tuloksetta. Käytännön osuudessa yritettiin myös erottaa fluoreseiinisilikamikropartikkeleita fagocytoineet neutrofiilit mahdollisesti vain partikkeleita pintaansa sitoneista neutrofiileistä sammuttamalla pintaan sitoutuneiden partikkelien fluoresenssi Trypan Blue:lla (TB). Fluoresenssin sammuttaminen ei onnistunut, koska partikkelien fluoresenssi oli luultavasti liian voimakas ja fluoresoiva aine sijaitsi partikkelien sisällä, minne TB ei päässyt tunkeutumaan partikkelien tiiviin pinnan takia.

## 7.1 Materiaalit

Valkosolujen kanssa työskenneltäessä käytettiin HBSS-puskuriliuoksia (Hanks' Balanced Salt solution) kalsiumin ja magnesiumin kanssa, sekä ilman kalsiumia ja magnesiumia (CMF = calcium and magnesium free). Puskureihin liuotettiin gelatiinia 0,1 % (w/V). Kalsiumia ja magnesiumia sisältävää HBSS-puskuria käytettiin reaktioseoksissa, jotta valkosolut saivat optimaalisen ympäristön aktivoitumiseen ja fagocytointiin. HBSS-CMF-puskuria, joka ei sisältänyt kalsiumia ja magnesiumia, käytettiin valkosolujen pesussa sekä partikkeli-, sooli- ja hydrogeelilaimennoksissa.

Työssä käytetyt valkosolut eristettiin tuoreesta kokoverestä, jonka luovuttajina toimivat terveet henkilöt (DeSiTechin työntekijät). Verenluovutus ja näytteenotto tehtiin CRST:n toimesta (Clinical Research Services Turku). Valkosolut eristettiin kokoverestä dekstraani-sedimentaatiomenetelmällä, jota varten valmistettiin 6 %:n (w/V) dekstraani-liuos.

KL-mittauksissa käytettiin 10 mM:sta luminolia vahvistamaan kemiluminesenssia ja zymosaanipartikkeleita positiivisena kontrollina. Liuosten valmistusohjeet ja reagenssitiedot löytyvät opinnäytetyön lopusta liitteenä (Liite 1). Neutrofiilien leimaamiseen virtausytometrisessä menetelmässä käytettiin monoklonaalista vasta-ainetta (PE anti-human CD16, lot. B200653, BioLegend®).

Tuoreet silikasoolit valmistettiin sooli-geeli-menetelmällä mittauspäivän alussa. Hydrogeeliä saatiin säilyttämällä soolia huoneenlämmössä 7 päivän ajan. Silikasoolien ja hydrogeelien lähtöaineena käytetyn veden ja TEOS:n ainemäärien suhde vakioitiin moolisuhteeseen 400 (R-arvo).

KL-mittauksissa käytetyt erikokoiset pyöreät silikamikropartikkelit valmistettiin ennen käytännön osuuden aloittamista sumukuivaamalla silikasooletta. Pienimmät partikkelit oli valmistettu sumukuivaamalla ennen opinnäytetyön aloittamista DelSiTechin toimesta. Keskikokoiset ja suuret partikkelit valmistettiin sumukuivaamalla R10-50-silikasooletta. Seuraavassa taulukossa esitetään mikropartikkelien kokojakauma (Taulukko 1).

Taulukko 1. Silikamikropartikkelien kokojakauma.

Silikamikropartikkelit	D10	D50	D90
Pienet	1,51 µm	2,79 µm	4,79 µm
Keskikokoiset	1,54 µm	4,28 µm	12,47 µm
Suuret	1,99 µm	8,51 µm	29,08 µm

KL-mittauksissa tutkittiin myös vaikuttaako partikkelien erilainen muoto fagosytointiin. Tätä tutkittiin "donitsin" muotoisilla silikamikropartikkeleilla, jotka oli valmistettu DelSiTechin toimesta sumukuivaamalla. Partikkelit olivat keskimäärin 7,0 µm:n kokoluokkaa. Partikkelit sisälsivät myös lääkeainetta, joka oli rakenteellisesti peptidi.

Virtasytometrisessä menetelmässä käytetyt fluoreseiinisilikamikropartikkelit oli valmistettu ennen opinnäytetyön aloittamista DelSiTechin toimesta sumukuivaamalla silikasooletta, jotka sisälsivät fluoreseiiniliuosta. Seuraavassa taulukossa esitetään fluoreseiinisilikamikropartikkelien kokojakaumat (Taulukko 2).

Taulukko 2. Fluoreseiinisilikamikropartikkelien kokojakauma.

Silikamikropartikkelit	D10	D50	D90
R5	1,34 µm	3,14 µm	10,21 µm
R10	1,73 µm	5,40 µm	58,25 µm
R15	1,63 µm	4,45 µm	34,12 µm

Silikamikropartikkelien ja R400-soolin yhteisvaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin tutkittiin näiden materiaalien seoksella. Materiaaleja ei sekoitettu yhteen ennen mittauksen aloittamista, vaan molemmat materiaalit lisättiin erikseen mitattavaan reaktioseokseen.

Mittauksia suoritettiin myös yhdistelmämaalilla (komposiitti), jossa silikamikropartikkelit ja silikahyogeeli muodostavat geelimäisen materiaalin. Tässä maalissa sili-



kamikropartikkelit sekoitetaan silikasooliin, jolloin muodostuu geeli, joka kapseloi partikkelit sisäänsä muodostaen yhtenäisen materiaalin. Komposiitti oli valmistettu DelSi-Techin toimesta ennen opinnäytetyön aloittamista ja materiaali sisälsi lisäksi lääkeainetta, joka oli rakenteeltaan peptidi.

## 7.2 Menetelmät

Päivittäistä mittausta varten valmistettiin aina tuoret gHBSS- ja gHBSS-CMF-puskurit, R400-silikasooli, sekä valkosolut erotettiin tuoreesta kokoverestä dekstraani-sedimentaatiolla. Erotettujen valkosolujen määrä laskettiin Bürkerin laskukammion avulla, jotta valkosolujen määrä reaktioseoksissa pystyttiin pitämään vakiona. Myös silikamikropartikkelien määrä (partikkeliannos) laskettiin käyttäen Bürkerin laskukammiota. Tarvittavat laimennokset mikropartikkeleista sekä soolista/hydrogeelistä valmistettiin reaktioita varten.

KL-mittauksissa reaktiot tapahtuivat mustilla 96-kuoppalevyillä (VWR, lot E160239E). Reaktioseosten kokonaistilavuus oli 200 µl ja reaktioiden KL mitattiin luminometrillä (Victor<sup>2</sup> Multilabel) 425 nm:n aallonpituudella valmiiksi ohjelmoidulla ohjelmalla 40–60 minuutin ajan + 37 °C:ssa. Virtausytometrisessä menetelmässä reaktioseosten kokonaistilavuus oli 500 µl ja reaktiot tapahtuivat 15 ml:n Falcon-putkissa. Reaktioille optimaaliset olosuhteet luotiin lämpövesihauteessa + 37 °C:ssa ja hitaassa ravistuksessa. Myös alhaisen lämpötilan vaikutusta fagosytoosiin tutkittiin + 4 °C:ssa. Näytteet mitattiin virtausytometrillä (BD FACSCalibur) BTK:n toimipisteellä (Turku Centre for Biotechnology).

KL-menetelmän ja virtausytometrisen menetelmän työvaiheet erosivat loppuvaiheessa toisistaan, joten ensin perehdytään yhteisiin työvaiheisiin kappaleissa 7.2.1, 7.2.3 ja 7.2.4.

### 7.2.1 Silikasoolin valmistaminen sooli-geeli-menetelmällä

Silikasoolit valmistettiin sooli-geeli-menetelmällä. Soolin veden ja TEOS:n ainemäärien suhde (R) pidettiin vakiona koko käytännön osuuden ajan (R400). Ensimmäiseksi valmistettiin silikasooli sekoittamalla haluttu määrä tetraetyyliortosilikaattia (TEOS, 98 %, Aldrich, lot. WXBB785V), milli-Q-vettä (tuotettu MILLI-Q Academic (USA) vedenpuhdis-

tus-systeemillä) ja suolahappoa (0,1 M HCL, Merck Titripur, lot. HC54318360) ja liuoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 25 minuutin ajan suljetussa laboratorio-astiasassa magneettisekoittimella sekoittaen (1100 rpm).

Tämän jälkeen soolin pH (alkuperäinen pH  $2,2 \pm 0,1$ ) säädettiin natriumhydroksidilla (0,1 M NaOH, Merck Titripur, HC55619041) 6,2:een ( $\pm 0,1$ ).

Mittauksissa käytettiin tuoretta soolia sekä hydrogeeliä. Tuore sooli käytettiin mittauksissa muutaman tunnin sisällä valmistuksesta. Soolin annettiin ikääntyä 7 päivän ajan huoneenlämmössä, jolloin siitä muodostui hydrogeeliä.

Tuoreen soolin ja hydrogeelin rakenteet poikkesivat toisistaan. Tuore sooli oli juoksevaa ja hydrogeeli oli kiinteää. Tuoreen soolin juokseva rakenne sisältää silikananopartikkeleita ( $<1 \mu\text{m}$ ), jotka ovat dispergoituneena nestemäiseen jatkuvaan faasiin. Hydrogeelissä silikananopartikkelit ovat aggregoituneet suuremmiksi partikkeleiksi, jotka ovat liittyneet toisiinsa muodostaen yhtenäisen verkoston eli geelin. Geelissä neste on dispergoituneena jatkuvassa kiinteässä faasissa. Ennen mittauksia hydrogeeli hajotettiin ravistamalla, jolloin geelin rakenne rikkoutui partikkeliaggregaateiksi. Mittauksia varten soolista/geelistä valmistettiin tietyt laimennokset HBSS-CMF-puskuriin. Tarkemmat tiedot esitetään kappaleessa 7.2.4.

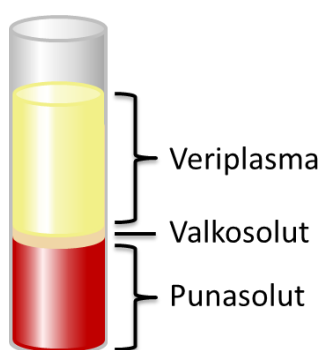
### 7.2.2 Silikamikropartikkelien valmistaminen sumukuivaamalla

Kaikki partikkelit valmistettiin sumukuivaamalla silikasooleja sumukuivaimella (Büchi mini Spray Dryer B-290). Pienimmät silikamikropartikkelit oli valmistettu DelSiTechin toimesta ennen opinnäytetyön aloittamista. Keskikokoiset ja suuret partikkelit valmistettiin sumukuivaamalla R10-50-silikasooleja. Partikkelien kokotaulukko esitettiin kappaleesta 7.1.

R10-50-soolien valmistus sisälsi kaksi vaihetta. Ensin valmistettiin R10-sooli, jonka pH säädettiin 6,2:een ( $\pm 0,1$ ). Tämän jälkeen sooliin R-arvo nostettiin 50:een lisäämällä tietty määrä etanolia soolin sekaan. Valmis sooli asetettiin jäähautteeseen ja sumukuivattiin. Partikkelien kokoerot saatiin muuttamalla sumukuivaamisen prosessiparametreja, joita olivat sisääntulolämpötila, ilman virtausnopeus ja pumpun teho. Tuotetut partikkelit olivat pyöreitä, mikrometrikokoluokkaa ja amorfisia.

### 7.2.3 Valkosolujen erottaminen kokoverestä ja solujen laskeminen Bürkerin laskukammiolla

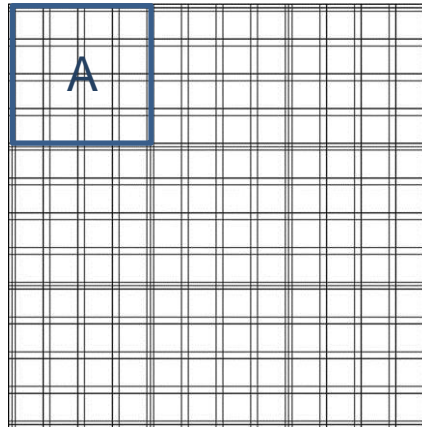
Valkosolut erotettiin dekstraani-sedimentaatiolla tuoreesta 9 ml:n kokoverinäytteestä. Tuore veri kaadettiin 15 ml:n Falcon-putkeen ja 1 ml huoneenlämpöistä 6 % (w/V) dekstraani-liuosta lisättiin veren sekaan ja sekoitettiin. Sekoittamisen jälkeen veren annettiin seistä tunnin ajan huoneenlämmössä (ilman korkkia). Tämän tunnin aikana punasolut sedimentoituvat Falcon-putken pohjalle ja valkosolut sekä veriplasma erottuivat punasolujen yläpuolelle (Kuva 8).



Kuva 8. Punasolujen, valkosolujen ja veriplasman erottuminen dekstraani-sedimentaatiolla.

Veriplasman ja valkosolujen seos (noin 5 ml) siirrettiin uuteen Falcon-putkeen pipetoiden varovasti ja gHBSS-CMF-puskuria lisättiin 10 ml:n merkkiviivaan asti ja sekoitettiin edestakaisin pipetoimalla. Seuraavaksi valkosolut erotettiin veriplasmasta sentrifugoiden suspensiota 400 g:n voimalla 10 minuutin ajan huoneenlämmössä (Sentrifugi Thermo Scientific, SL16R). Sentrifugoinnin aikana valkosolut vajosivat Falcon-putken pohjalle, jonka jälkeen supernatantti (veriplasman ja gHBSS-CMF-puskurin seos) pipetoitiin pois. Sentrifugointi suoritettiin kaksi kertaa ja ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen supernatantin tilalle lisättiin puhdasta gHBSS-CMF-puskuria 10 ml:n merkkiviivaan asti, jonka jälkeen valkosolut sekoitettiin puskuriiin varovasti edestakaisin pipetoiden. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja tilalle lisättiin 1 ml puhdasta gHBSS-CMF-puskuria ja sekoitettiin edestakaisin pipetoimalla.

Seuraavaksi valkosolujen määrä yhtä millinä kohden määritettiin Bürkerin laskukammion avulla mikroskopoiden. Valkosolut laskettiin valomikroskoopilla (Olympus CK40) ja 10x suurentavalla objektiivilla. Soluseoksesta tehtiin 100-kertainen laimennos (10 µl soluseosta + 990 µl gHBSS-CMF-puskuria), jotta valkosolut pystyttiin laskemaan helposti. Solujen määrä määritettiin laskemalla viiden A ruudun sisältä solut (Kuva 9). Luvuista laskettiin keskiarvo ja se kerrottiin soluseoksen laimennoskerroimella sekä 10 000:lla. Yhden A ruudun tilavuus on 0,1 µl, joten kertomalla tulos 10 000:lla saadaan solujen määrä yhtä millinä kohden.



Kuva 9. Bürkerin laskukammio laskuruudukko (Brand, haettu 09.05.2017).

Valkosolujen määräksi reaktioseoksissa vakioitiin noin 750 000 solua kuoppalevyn kuoppaa tai virtaussytomertin näyteputkea kohden. 1 ml:n solususpensiolle tehtiin yleisesti 2-kertainen laimennos lisäämällä siihen 1 ml gHBSS-CMF-puskuria. Näin lisättäessä 20 µl soluseosta reaktioseokseen saatiin valkosolujen määräksi noin 750 000.

#### 7.2.4 Silikamikropartikkelien sekä soolin/geelin laimennossarjojen valmistus

Eri partikkelipitoisuudet reaktioseokseen tehtiin valmistamalla laimennoksia perusliuoksesta, jonka partikkelipitoisuus oli 312,5 mg/ml. Perusliuos valmistettiin punnitsemalla 312,5 mg silikamikropartikkeleita ja ne sekoitettiin 1 ml:n HBSS-CMF-puskuria vorteksoimalla. Seuraavaksi perusliuoksesta tehtiin 10-kertainen laimennos, jolloin partikkelipitoisuudeksi saatiin 31,25 mg/ml. Seuraavat pitoisuudet saatiin laimentamalla seoksia 5-kertaisesti. KL-menetelmässä kuoppalevyillä tapahtuvien reaktioiden reaktioseokseen lisättiin 50 µl tutkittavaa partikkelilaimennosta. Jokaista laimennosta tarvittiin vähintään

200 µl mittausta kohden, sillä reaktioista tehtiin aina 3 rinnakkaista näytettä. Virtaussy-  
tomerisessä menetelmässä ei valmistettu rinnakkaisia näytteitä. Seuraavassa taulu-  
kossa on esimerkki laimennoksista, joista riittää partikkeleita yhteen KL-mittaukseen  
(Taulukko 3)

Taulukko 3. Silikamikropartikkelien laimennossarjat.

Partikkelipitoisuus (mg/ml)	Reagenssit	
312,5 (Perusliuos)	312,5 mg partikkeleita + 1000 µl HBSS-CMF	10 x
31,25	50 µl perusliuos + 450 µl gHBSS-CMF	5 x
6,25	100 µl (31,25) + 400 µl gHBSS-CMF	5 x
1,25	100 µl (6,25) + 400 µl gHBSS-CMF	5 x
0,25	100 µl (1,25) + 400 µl gHBSS-CMF	5 x
0,05	100 µl (0,25) + 400 µl gHBSS-CMF	5 x
0,01	100 µl (0,05) + 400 µl gHBSS-CMF	5 x

Soolin sekä hajotetun hydrogeelin vaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen tutkittiin vaih-  
televilla reaktioseosten sooli/geeliosuuksilla (% , V/V). KL-menetelmässä soolia/geeliä li-  
sättiin kuoppalevyn kuopassa olevaan reaktioseokseen aina vakiomäärä 50 µl. Lisättä-  
essä laimentamatonta soolia/geeliä reaktioseokseen, saatiin soolin/geelin osuudeksi 25  
%:a (50 µl on 25 %:a reaktioseoksen 200 µl:n kokonaistilavuudesta). Laimennokset val-  
mistettiin tekemällä ensimmäiseksi 2-kertainen laimennos soolista/geelistä HBSS-CMF-  
puskuriin. Näin lisättäessä 2-kertaisesti laimennettua soolia/hydrogeeliä reaktioseok-  
seen saatiin sooli/geeliosuudeksi 12,5 %:a. Laimennossarjaa jatkettiin tekemällä 2-ker-  
taisia laimennoksia kuten seuraavassa taulukossa esitetään (Taulukko 4).

Taulukko 4. R400-silikasoolin/geelin laimennossarjat.

Osuus reaktioseoksesta	Reagenssit	
12,50 %	400 µl soolia + 400 µl HBSS-CMF	2 x
6,25 %	400 µl soolia (12,5 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
3,13 %	400 µl soolia (6,25 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
1,56 %	400 µl soolia (3,13 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,80 %	400 µl soolia (1,56 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,40 %	400 µl soolia (0,8 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,20 %	400 µl soolia (0,4 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,10 %	400 µl soolia (0,2 %)+ 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,05 %	400 µl soolia (0,05 %) + 400 µl gHBSS-CMF	2 x
0,025 %	400 µl soolia (0,025 %)+ 400 µl gHBSS-CMF	2 x

### 7.2.5 Luminolilla vahvistetun kemiluminesenssin määrittäminen

KL-mittauksissa reaktiot tapahtuivat mustilla 96-kuoppalevyillä ja reaktioseosten kokonaistilavuus oli 200 µl/kuoppa. Reaktioseokset sisälsivät tuoreesta verestä erotettuja valkosoluja, silikaa eri muodossa (sooli / geeli / mikropartikkelit / komposiitti), gHBSS-puskuria ja 10 mM:sta luminolia vahvistamaan kemiluminesenssia (Taulukko 5).

Taulukko 5. Yhtä silikan muotoa sisältävän näytteen reagenssit / kuoppa.

105 µl	gHBSS
50 µl	Silika
25 µl	Luminoli
20 µl	Soluja

Tulosten analysointia varten valmistettiin negatiivinen ja positiivinen kontrollinäyte. Negatiivinen kontrolli (solutausta) ei sisältänyt silikaa vaan pelkästään valkosoluja, luminolia ja gHBSS-puskuria (Taulukko 6).

Taulukko 6. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit / kuoppa.

155 µl	gHBSS
25 µl	Luminoli
20 µl	Soluja

Positiivisessa kontrollissa valkosolujen aktivoimisessa käytettiin zymosaanipartikkeleita, jotka ovat hiivan soluseinästä tuotettuja partikkeleita (Taulukko 7). Zymosaanista aiheutuva valkosolujen aktivoituminen vastaa valkosolujen aktivoitumista kun ne kohtaavat vieraita mikro-organismeja. Silikanäytteiden aiheuttamia vasteita ja niiden voimakkuutta voitiin verrata näin zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen.

Taulukko 7. Positiivisen kontrollinäytteen reagenssit / kuoppa.

130 µl	gHBSS
25 µl	Zymosaani
25 µl	Luminoli
20 µl	Soluja

Tutkittaessa kuinka sooli/hydrogeeli vaikuttaa valkosolujen aktivoitumiseen ja silikapartikkelien fagosytointiin reaktioseoksiin lisättiin molempia materiaaleja erikseen (Taulukko 8).

Taulukko 8. Sooli-mikropartikkeliseoksen reagenssit / kuoppa.

55 µl	gHBSS
50 µl	Sooli
50 µl	Partikkeleita
25 µl	Luminoli
20 µl	Soluja

### Reaktioiden kemiluminesenssin mittaaminen

Kuoppalevyn kuoppiin pipetoitiin ensimmäiseksi gHBSS-puskuri, seuraavaksi silika, luminoli ja viimeiseksi juuri ennen mittaustauksen aloittamista valkosolut. Näytteet pipetoitiin kuoppalevylle tietyssä järjestyksessä. Seuraava kuva esittää, missä järjestyksessä eri partikkelipitoisuuksia sisältävät reaktioseokset sijaitsivat kuoppalevylle (Kuva 10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	N	P	P	P	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml
B	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml	6,25 mg/ml	6,25 mg/ml	6,25 mg/ml	31,25 mg/ml	31,25 mg/ml	31,25 mg/ml
C												

Kuva 10. Pipetointikaavio KL-menetelmän reaktioseoksille eri partikkelipitoisuuksia käytettäessä. Jokaisesta näytteestä tehtiin 3 rinnakkaisnäytettä. N=negatiivinen kontrolli, P=positiivinen kontrolli.

Ennen näytteiden pipetointia luminometri laitettiin esilämpenemään + 37 °C:seen. Mittaus aloitettiin heti valkosolujen lisäämisen jälkeen ja sitä jatkettiin 40 – 60 minuutin ajan yhtäjaksoisesti. Luminolilla vahvistetun kemiluminesenssia mitattiin 425 nm:n aallonpituudella luminometrillä ja tulokset käsiteltiin Excelillä.

### 7.2.6 Virtausytometrinen menetelmä

Virtausytometrinen näytteiden valmistaminen oli työläämpää kuin aikaisemmin kuvatussa KL-menetelmässä, sillä virtausytometrillä ei pysty suorittamaan reaaliaikaista mittausta. Näytteet voidaan mitata vain kerran yhdessä aikapisteessä. Virtausytomerisessä menetelmässä reaktioseosten kokonaistilavuus oli 500 µl. Reaktioissa käytettävät sooli- ja partikkelilaimennokset valmistettiin samaan tapaan kuin aikaisemmin kuvailtiin

kappaleessa 7.2.5, mutta partikkeleina käytettiin fluoreseiinisilikamikropartikkeleita. Partikkeleita lisättiin reaktioseoksiin 50 µl, valkosoluja 20 µl ja sooli-mikropartikkeliseoksissa soolia lisättiin 125 µl (25 %:a 500 µl:n kokonaistilavuudesta) ja gHBSS-puskuria lisättiin 500 µl:n tilavuuteen asti. (Taulukko 9, Taulukko 10)

Taulukko 9. Partikkelinäytteen reagenssit / näyteputki.

430 µl	gHBSS
50 µl	Partikkeleita
20 µl	Soluja

Taulukko 10. Sooli-mikropartikkeliseoksen reagenssit / näyteputki.

305 µl	gHBSS
50 µl	Partikkeleita
125 µl	Soolia
20 µl	Soluja

Reaktiot tapahtuivat 15 ml:n Falcon-putkissa, jotta näytteiden loppukäsittely oli mahdollisimman helppoa (sentrifugoiminen ja vasta-aineella leimaaminen). Tulosten analysointia varten valmistettiin kaksi negatiivista kontrollia eli solutaustaa, joista toinen sisälsi leimaamattomia valkosoluja ja gHBSS-puskuria (Taulukko 11), ja toinen vasta-aineleimat-  
tuja (PE Anti-human CD16) valkosoluja ja gHBSS-puskuria (Taulukko 12).

Taulukko 11. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit / näyteputki.

480 µl	gHBSS
20 µl	Soluja

Taulukko 12. Negatiivisen kontrollinäytteen reagenssit (CD16) / näyteputki.

480 µl	gHBSS
20 µl	Soluja

Jotta neutrofiilien silikamikropartikkelien fagosytointia pystyttiin tutkimaan ajan funktiona, näytteitä inkuboitiin vesilämpöhauteessa ravistuksessa + 37 °C:ssa eri aikapisteitä (mm. 5, 15, 30, 45, 60 min). Reaktiot pysäytettiin asettamalla näyteputket jäihin. Menetelmällä tutkittiin myös kuinka reaktiolämpötilan lasku + 4 °C:seen vaikuttaa neutrofiilien kykyyn



aktivoitua ja fagosytoida partikkeleita. Tässä tapauksessa näytteitä inkuboitii jäissä 60 minuutin ajan.

Inkuboinnin jälkeen suoritettiin valkosolujen leimaaminen monoklonaalisella vasta-aineella (PE Anti-human DC16). Ensimmäiseksi näytteet pestiin kylmällä gHBSS-CMF-puskurilla sentrifugoimalla niitä 400 g:n voimalla 10 minuutin ajan + 4 °C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja tilalle lisättiin 50 µl vasta-ainetta sisältävää liuosta ja näyte sekoitettiin varovasti pipetoimalla edestakaisin. Vasta-aineen lisäämisen jälkeen näytteitä inkuboitii jäähauteessa (pimeässä) 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin kylmää gHBSS-CMF-puskuria 500 µl, sekoitettiin ja pestiin sentrifugoimalla 400 g:n voimalla 10 minuutin ajan + 4 °C:ssa. Pesun jälkeen supernatantti poistettiin ja tilalle lisättiin 500 µl kylmää gHBSS-CMF-puskuria ja sekoitettiin varovasti. Lopuksi näytteet pipetoitiin virtaussytometriin sopiviin näyteputkiin ja niitä säilytettiin jäähauteessa mittaukseen asti.

Mittaukset suoritettiin FACSCalibur-virtaussymetrillä huoneenlämmössä ja 488 nm:n argonlaserilla (sininen) BTK:n toimipisteellä. Neutrofiilipopulaatio määriteltiin ja laite säädettiin keräämään ja mittaamaan 10 000 vasta-ainepositiivista neutrofiilia. Fluoresenssia mitattiin käyttämällä logaritmista asteikkoa ja tulokset käsiteltiin Flowing Software 2.5.1-ohjelmalla.

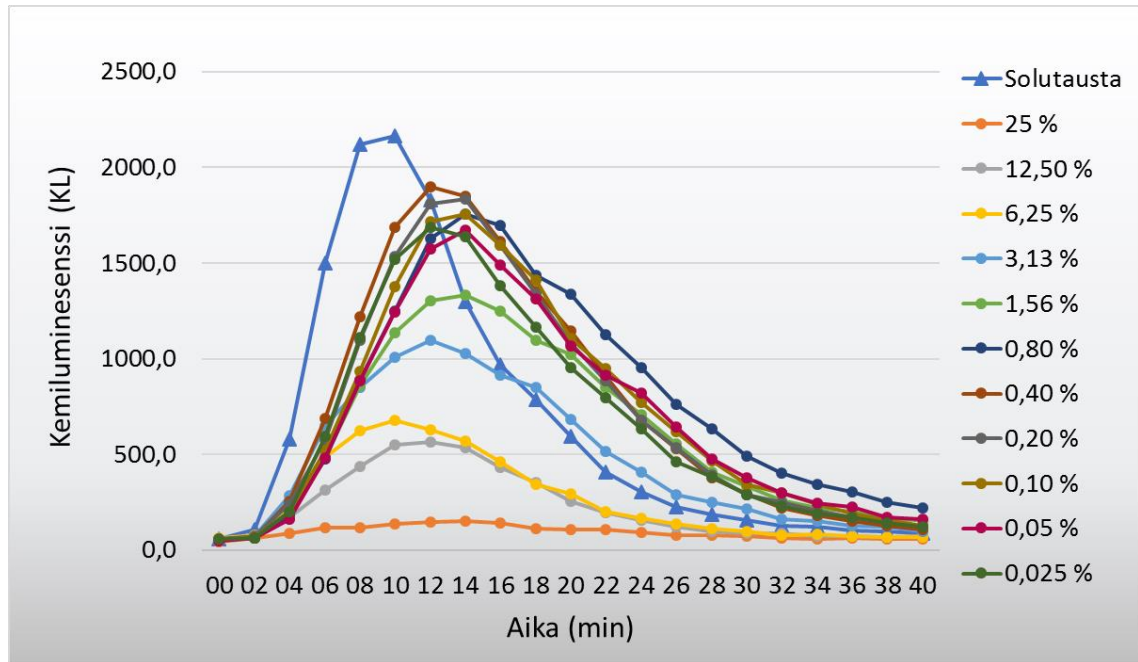
## 8 TULOKSET JA POHDINTA

Ensimmäiseksi esitetään kemiluminesenssimäärityksen tulokset, jotka sisältävät tuoreen silikasoolin sekä hajotetun hydrogeelin, partikkelimittausten, sooli-mikropartikkeli-seosten ja komposiittinäytteiden mittaustulokset. Näiden jälkeen käsitellään virtaussytometrisen menetelmän tulokset, joiden tarkoituksena oli tukea KL-menetelmällä saatuja mittaustuloksia. Virtaussytometrisellä menetelmällä pystyttiin tutkimaan spesifisesti partikkelien fagosytointia neutrofiilien toimesta.

### 8.1 Kemiluminesenssimäärityksen tulokset

#### 8.1.1 Valkosolujen vaste tuoreeseen silikasooliin sekä hajotettuun silikahydrogeeliin

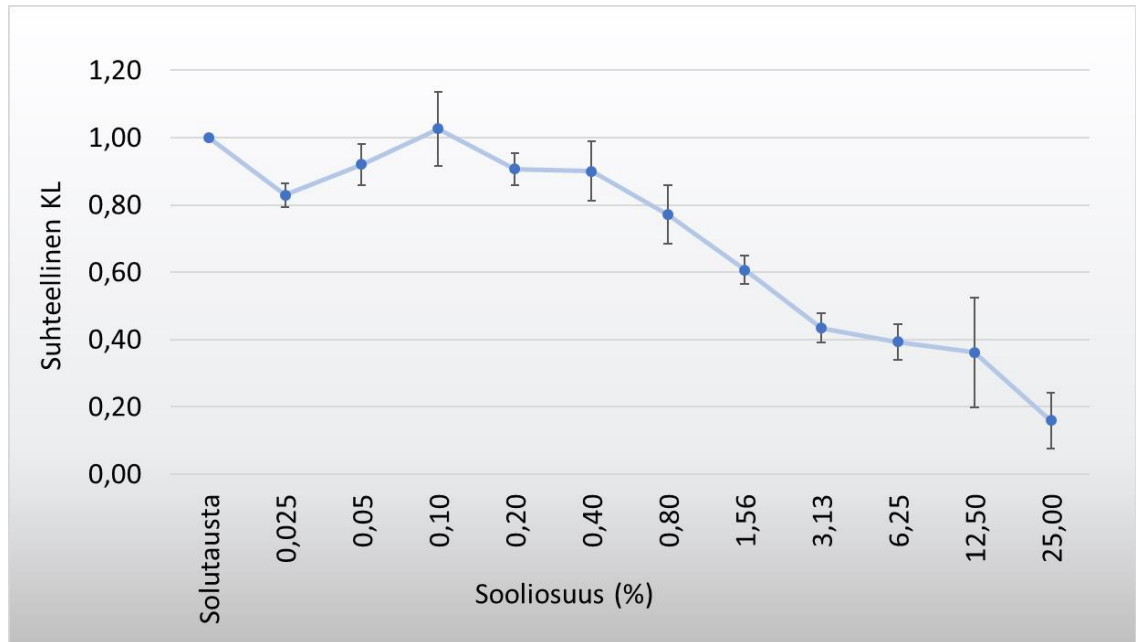
Käytännön osuuden ensimmäisessä vaiheessa tutkittiin veren valkosolujen reagoitua tuoreeseen R400-silikasooliin ja kuinka soolin eri %-osuudet (V/V) reaktioseoksissa vaikuttavat valkosolujen aktivoitumiseen. Soolista tehtiin tietty laimennossarja (esitetty kapaleessa 7.2.4) ja lisättäessä soolia 50 µl reaktioseokseen, jonka kokonaistilavuus oli 200 µl, saatiin soolille erilaisia %-osuuksia (V/V). Kontrollina mittauksissa toimi solutausta, joka sisälsi pelkkiä valkosoluja. Reaktiot tapahtuivat mustilla 96-kuoppalevyillä + 37 °C:ssa ja kemiluminesenssia mitattiin reaaliaikaisesti luminometrillä keskimäärin 45 minuutin ajan. Mittaustulokset käsiteltiin Excelillä siten, että rinnakkaisnäytteiden (3 kpl) keskiarvoista ja niiden aikapisteiden keskiarvoista piirrettiin kuvaaja, jossa x-akselilla on aika minuutteina ja y-akselilla kemiluminesenssi. Seuraavassa esimerkkikuvaajassa esitetään tuoretta R400-soolia sisältäneiden reaktioiden mittaustulokset (yksi mittaus) (Kuva 11).



Kuva 11. Tuoreen R400-silikasoolin eri %-osuuskien (V/V) kemiluminesenssikäyrien vertailua. X-akselilla on aika ja Y-akselilla kemiluminesenssi. Kuvaaja sisältää yhden mittauksen tulokset (n=1).

Mitä korkeampi KL-arvo on, sitä suurempi määrä neutrofiilejä on aktivoitunut ja alkanut tuottamaan reaktiivisia happiyhdisteitä fagosytoinnin yhteydessä. Kuvaajasta pystyy seuraamaan neutrofiilien aktivoitumista sekä määrittämään aikapisteen, missä reaktiivisten happiyhdisteiden tuotto on suurimmillaan (maksimiarvo).

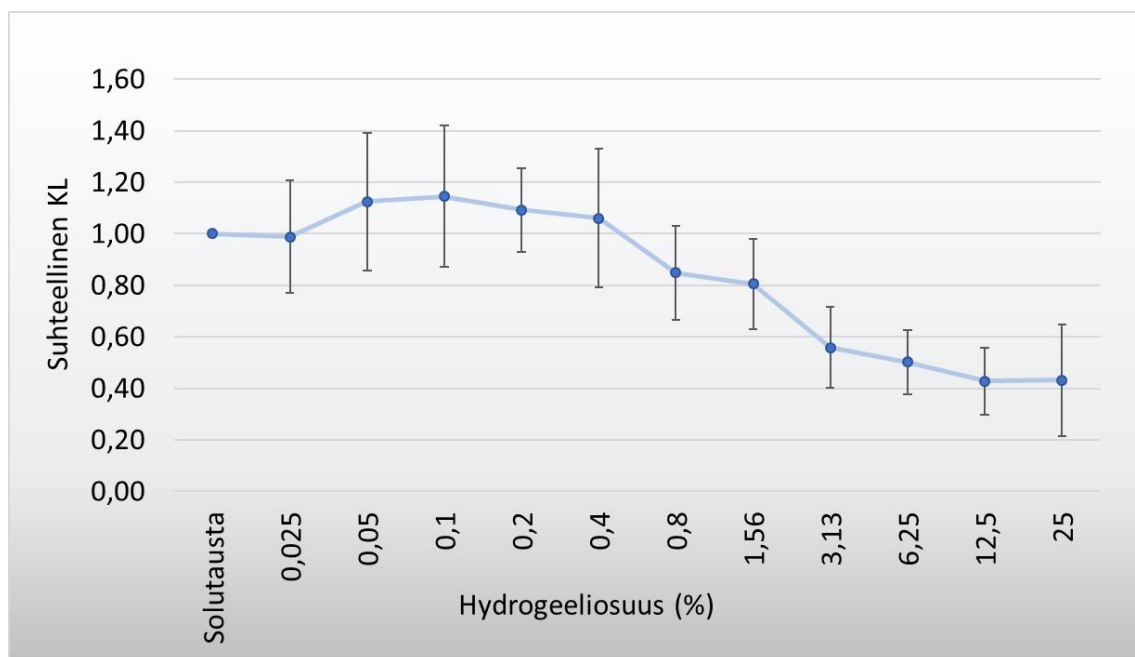
Rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista määritettiin maksimiarvot ja niiden KL-arvoja verrattiin negatiiviseen kontrolliin eli solutaustaan. Näin saatiin laskettua suhteellinen KL. Tuoreella silikasoolilla suoritettiin kolme mittausta (valkosolut erotettu eri henkilöiden verestä), joiden suhteellisten KL-arvojen keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 12).



Kuva 12. Tuoreen R400-silikasooliosuuksien suhteelliset kemiluminesenssit. Zymosaa-  
nin KL-arvo oli 51,5-kertainen verrattuna solutaustaan (ei näy kuvaajassa). (n=3)

Tuloksista käy ilmi, että jo matalilla sooliosuuksilla (0,025 % – 0,4 %) on inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen ja reaktiivisten happiyhdisteiden tuottoon. Silikasoolin inhiboiva vaikutus voimistuu sooliosuuden kasvaessa reaktioseoksissa.

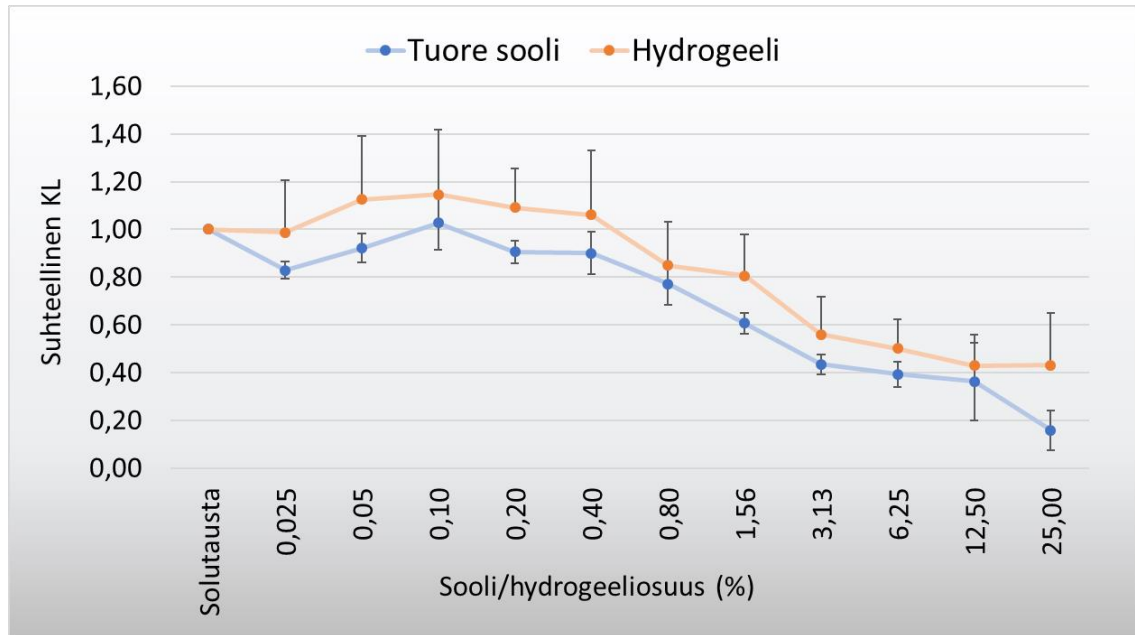
Seuraavaksi tutkittiin aktivoiko silikahydrogeeli ja sen hajotettu rakenne valkosoluja. R400-silikasoolia säilytettiin huoneenlämmössä viikon ajan ja muodostuneen hydrogeelin rakenne hajotettiin ennen laimennossarjojen tekemistä ravistamalla. Mittauksia suoritettiin kolme ja niiden suhteellisten KL-arvojen keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 13).



Kuva 13. Hajotetun R400-hydrogeelin suhteelliset kemiluminesenssit. Zymosaanin KL-arvo oli 85,5-kertainen verrattuna solutaustaan (ei näy kuvaajassa). (n=3)

Kuvaajasta voi päätellä, että hydrogeeli aktivoi matalilla pitoisuuksilla (0,025-0,4 %) hie-man valkosoluja. Valkosolujen aktivoituminen ja reaktiivisten happiyhdisteiden tuotto on kuitenkin todella vähäistä verrattaessa zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen, joka oli 85,5-kertainen verrattuna solutaustaan. Hydrogeeliosuuden noustessa reaktioseoksissa sen inhiboiva vaikutus voimistuu samaan tapaan kuin tuoreella silikasoolilla.

Soolin ja hydrogeelin tulokset eivät eroa merkittävästi toisistaan, vaikka soolin ja geelin rakenteet ovat erilaisia. Sooli sisältää silikananopartikkeleita (< 1  $\mu\text{m}$ ) ja hydrogeelissä silikananopartikkelit ovat aggregoituneet suuremmiksi partikkeleiksi, jotka liittyessään toisiinsa muodostavat suurempia partikkeliagregaatteja eli klustereita. Klusterit sitoutuvat toisiinsa muodostaen lopuksi yhtenäisen verkoston. Klustereiden väliset sidokset katkeavat kun hydrogeelin rakenne hajotetaan, jolloin yhtenäinen verkosto hajoaa suuriksi partikkeliagregateiksi. Seuraavassa kuvaajassa verrataan vielä soolin ja hydrogeelin suhteellisia KL-arvoja toisiinsa (Kuva 14).



Kuva 14. Tuoreen R400-silikasoolin ja hajotetun R400-silikahydrogeelin suhteellisten KL-arvojen vertailua.

Soolilla että hydrogeelillä on jopa inhihoiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen sooli/hydrogeeliosuuskasvaessa. Sooli, joka sisältää silikananopartikkeleita ei aktivoi valkosoluja pienellä sooliosuuskasvaessa. Tästä voi päätellä, että soolissa olevat silikananopartikkelit eivät aktivoi veren valkosoluja. Hydrogeelin puolestaan havaitaan aktivoivan valkosoluja hieman matalilla hydrogeeliosuuskasvaessa (0,025-0,4 %). Tämä voi johtua suuremmista silikapartikkeliaggrekaateista, jotka syntyivät kun hydrogeelin rakenne hajotettiin. Valkosolujen aktivoituminen on kuitenkin todella vähäistä verrattuna positiiviseen kontrolliin eli zyмосааниin, jonka suhteellinen KL-arvo on 85,5.

Zyмосааниin vasteiden erot (suhteellinen KL: 51,5 ja 85,5) johtuvat eri verenluovuttajien immuunipuolustuksen ja neutrofiilien kyvystä reagoida, aktivoitua ja fagosytoida zyмосааниipartikkeleita.

### 8.1.2 Valkosolujen vaste silikamikropartikkeleihin

Partikkelimittaukset suoritettiin 3 erikokoisilla silikamikropartikkeleilla, joista keskikokoiset ja suurimmat partikkelit valmistettiin sumukuivaamalla ennen opinnäytetyön työsuuden aloittamista ja pienimmät mikropartikkelit oli valmistettu aikaisemmin DelSiTechin

toimesta. Kaikki nämä partikkelit olivat plaseboja eli ne eivät sisältäneet lääkeainetta. Seuraavassa taulukossa esitetään partikkelien kokojakaumat (Taulukko 13).

Taulukko 13. Silikamikropartikkelien kokojakauma.

Silikapartikkelit	D10	D50	D90
Pienet	1,51 $\mu\text{m}$	2,79 $\mu\text{m}$	4,79 $\mu\text{m}$
Keskikokoiset	1,54 $\mu\text{m}$	4,28 $\mu\text{m}$	12,47 $\mu\text{m}$
Suuret	1,99 $\mu\text{m}$	8,51 $\mu\text{m}$	29,08 $\mu\text{m}$

Sumukuivaamalla ei pysty valmistamaan tarkalleen samankokoisia partikkeleita vaan partikkelien koko vaihtelee hieman. D50-luku kuvaa partikkelien keskimääräistä kokoa ja D10 ja D90 kuvaavat ääripäässä olevien partikkelien kokoluokkaa.

Partikkelimittauksissa tutkittiin tunnistavatko veren valkosolut, erityisesti neutrofiilit, silikamikropartikkelit keholle vieraksi partikkeleiksi ja alkavatko ne fagosytoimaan ja tuhoamaan niitä tuottamallaan reaktiivisilla happiyhdisteillä. Mittauksissa tutkittiin myös vaikuttaako reaktioseosten partikkelipitoisuuksien erot, partikkelikoko sekä erilainen muoto valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Partikkelien muodon vaikutusta fagosytointiin tutkittiin donitsin muotoisilla silikamikropartikkeleilla (D50 7,0  $\mu\text{m}$ ), jotka sisälsivät muista partikkeleista poiketen lääkeainetta, joka oli rakenteellisesti peptidi.

Mittauksia varten silikamikropartikkeleista valmistettiin tietyt laimennokset (kappale 7.2.4). Seuraavassa taulukossa esitetään mittauksissa käytetyt partikkelipitoisuudet ja niiden partikkeliannokset eli kuinka monta partikkelia reaktioseoksissa oli yhtä valkosolua kohden (Taulukko 14). Partikkelien määrä laskettiin Bürkerin laskukammio avulla.

Taulukko 14. Reaktioseosten partikkelipitoisuudet ja partikkeliannokset.

Partikkelipitoisuus (mg/ml)	Mikropartikkelien (mp) kappalemäärä yhtä solua kohden reaktioseoksessa (mp/solu)		
	Pienet D50 2,79 µm	Keskikokoiset D50 4,28 µm	Suuret D50 8,51 µm
31,25	163,2	256,5	38,5
6,25	32,6	51,3	7,7
1,25	6,5	10,3	1,5
0,25	1,3	2,1	0,3
0,05	0,3	0,4	0,1
0,01	0,1	0,2	0,02

Silikamikropartikkeleille on ominaista aggregoitua, joten käytännön osuudessa tutkittiin myös vaikuttaako mikropartikkelilaimennosten sonikointi eli mahdollisten partikkeliaggregaattien hajottaminen siihen kuinka valkosolut tunnistavat ja fagosytoivat partikkeleita.

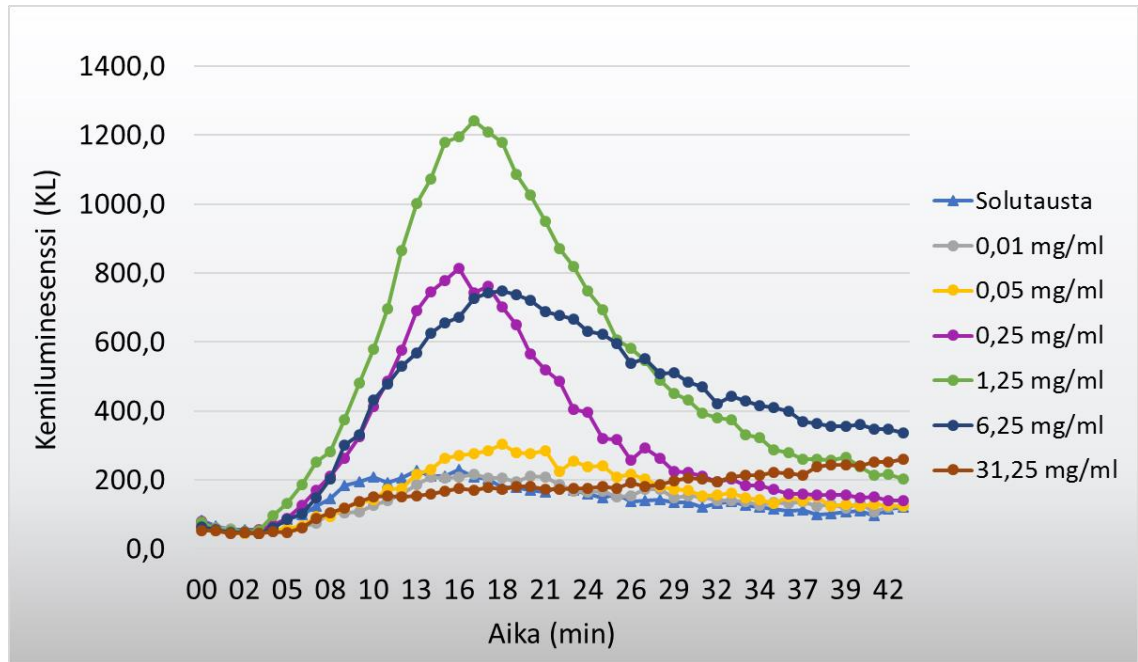
Silikasoolin inhiboivaa vaikutusta tutkittiin mikropartikkelien ja tuoreen soolin seoksella, jossa materiaalit lisättiin reaktioseokseen erikseen. KL-menetelmällä tutkittiin myös kuinka valkosolut aktivoituvat silikahydrogeelin ja silikamikropartikkelien yhdistelmä-materiaalista eli komposiitista, jossa silikamikropartikkelit ovat kapseloituneina hydrogeelin sisään. Tämän komposiitin silikamikropartikkelit sisälsivät lääkeainetta, joka oli rakenteellisesti peptidi. Komposiitista tehtiin laimennokset samaan tapaan kuin partikkeleista.

Tulokset käydään läpi seuraavassa järjestyksessä: pienet, keskikokoiset ja suuret silikamikropartikkeli, partikkelien koon vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen, sonikoinnin sekä muodon vaikutus fagosytointiin ja viimeiseksi silikaseoksen sekä komposiitinäytteidien tulokset. Mittaustulokset käsiteltiin samaan tapaan kuin aikaisemmassa kappalessa (8.1.1) esitettiin.

### 8.1.3 Pienet silikamikropartikkelit

Seuraavassa kuvaajassa esitetään kuinka valkosolut aktivoituvat pienten silikamikropartikkelien (D50 2,79 µm) eri partikkelipitoisuuksista (Kuva 15).

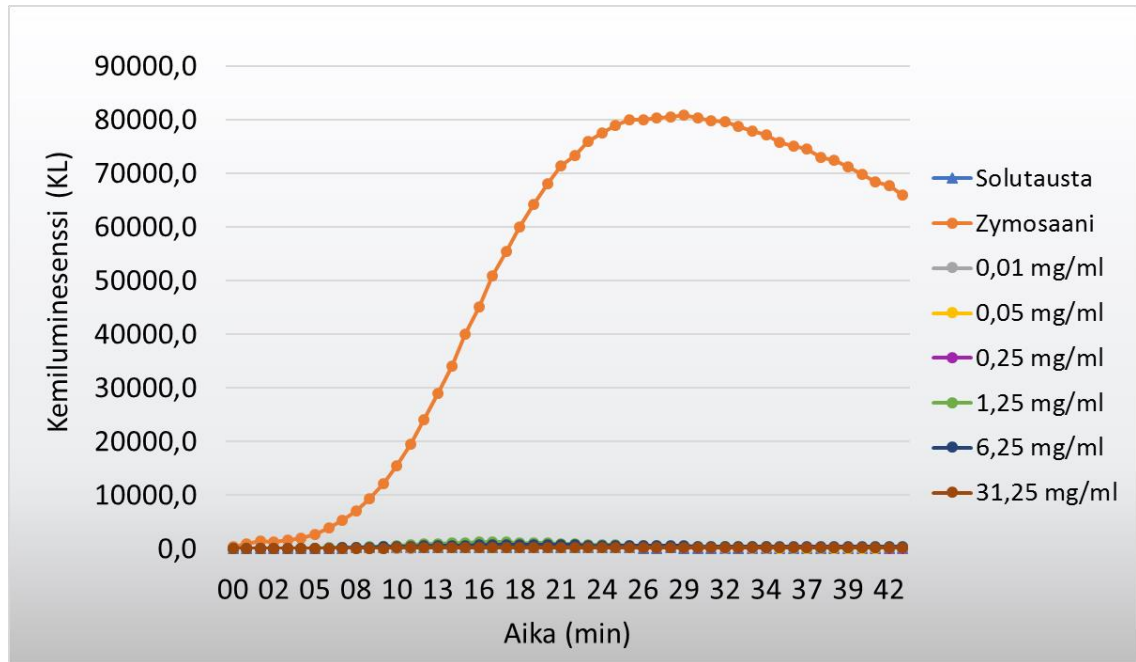




Kuva 15. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien kemiluminesenssi-käyrien vertailua. (n=1)

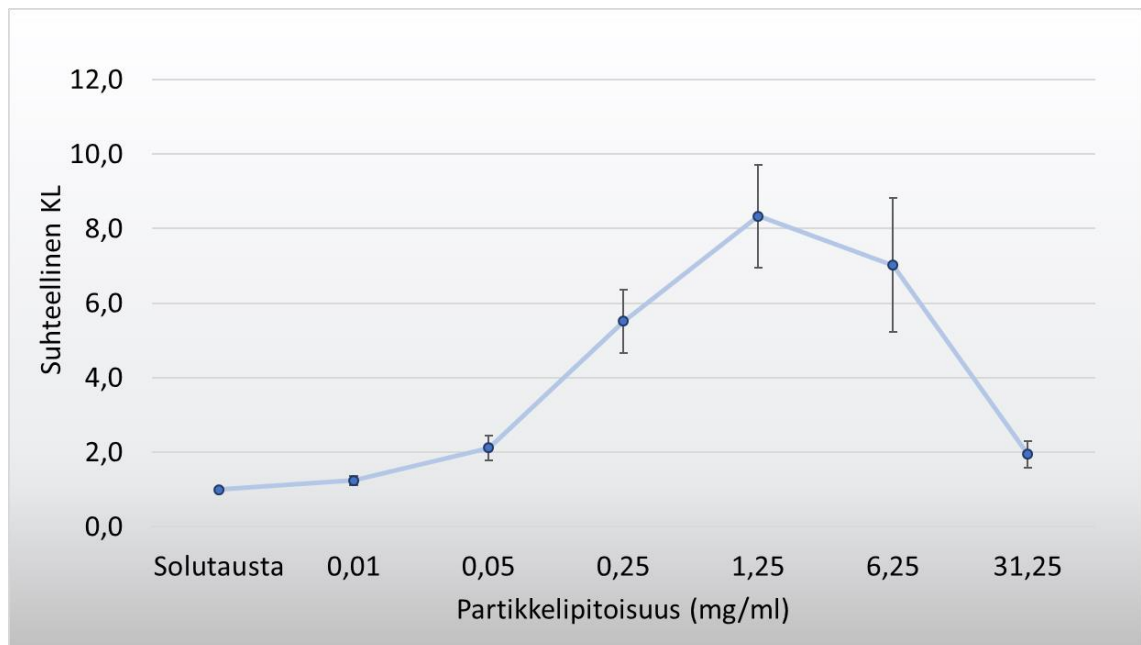
Kuvaajasta näkee että valkosoluja aktivoi lähes kaikki partikkelipitoisuudet, mutta eniten pitoisuus 1,25 mg/ml. Korkein partikkelipitoisuus (31,25 mg/ml) ei aktivoi valkosoluja juuri ollenkaan. Korkea partikkelipitoisuus saattaa häiritä kemiluminesenssin mittaamista tai partikkelit ovat aggregoituneet tai sakkautuneet liian suuriksi fagosytoida. Valkosolut ovat aktiivisimmillaan 16–18 minuutin kohdalla, jolloin valkosolut tuottavat eniten reaktiivisia happiyhdisteitä.

Pienet silikamikropartikkelit aktivoivat neutrofiilejä jo matalilla pitoisuuksilla, mutta verrattaessa näitä vasteita zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen voidaan todeta, että valkosolujen aktivoituminen on todella vähäistä. Seuraavassa kuvaajassa verrataan edellisen kuvaajan tuloksia zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen valkosoluissa (Kuva 16).



Kuva 16. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien kemiluminesenssi-käyrien vertailua positiivisen kontrolliin eli zymosaanin kemiluminesenssiin. (n=1)

Mittauksia pienillä silikamikropartikkeleilla suoritettiin kolme. Mittausten tuloksista määritettiin maksimiarvojen avulla suhteellinen kemiluminesenssi ja niiden keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 17).

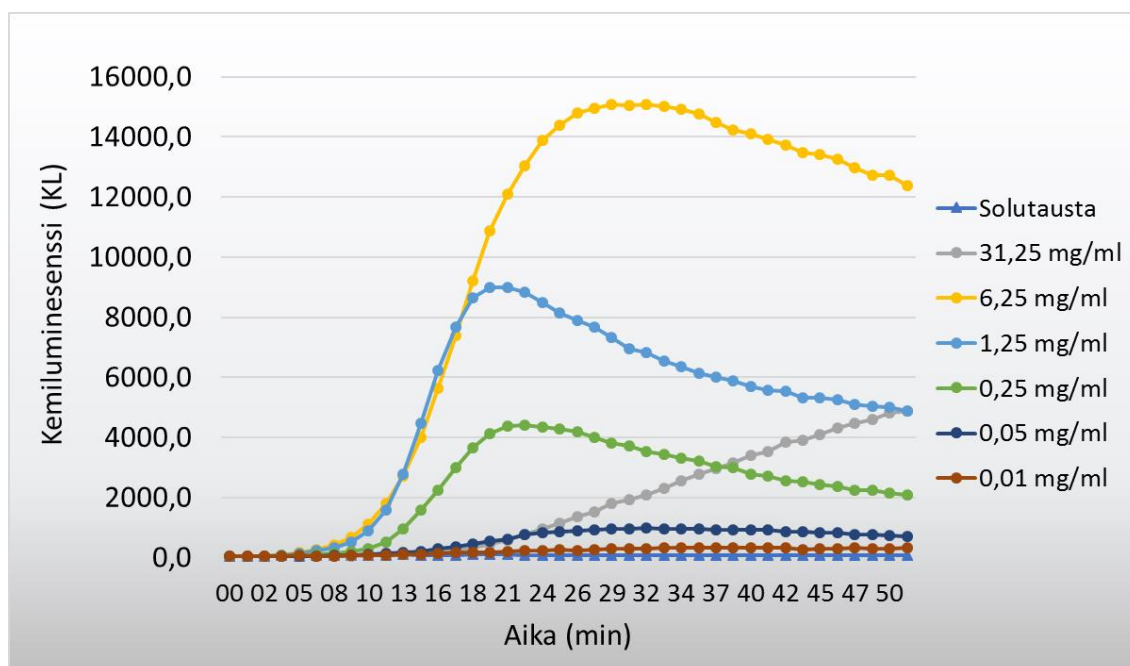


Kuva 17. Pienten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien suhteelliset kemiluminesenssit. Zymosaanin suhteellinen KL oli 496,1 (ei näy kuvaajassa). (n=3)

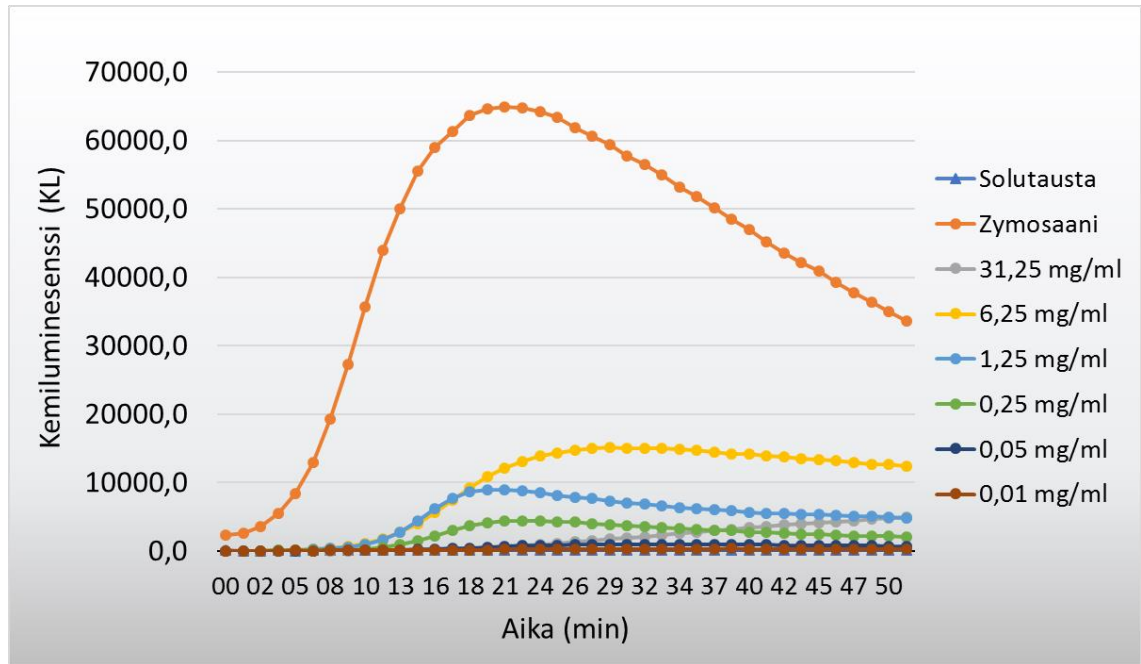
Kuvaajasta voi todeta, että pienet silikamikropartikkelit aktivoivat valkosoluja jo pienillä pitoisuuksilla. Neutrofiilit fagocytoivat partikkeleita aktiivisimmin partikkelipitoisuuden ollessa 1,25 mg/ml, mutta myös pitoisuus 6,25 mg/ml tuottaa lähes yhtä korkean vasteen. Kuitenkin verrattaessa partikkelien suhteellisia KL-arvoja zymosaanin arvoon (496,1) voidaan todeta, että pienet silikamikropartikkelit eivät aktivoi hälyttävästi luontaista immuunipuolustusjärjestelmää, jossa neutrofiilit muodostavat ensimmäisen puolustuslinjan vieraita mikro-organismeja vastaan.

#### 8.1.4 Keskikokoiset silikamikropartikkelit

Seuraavaksi esitetään kuinka neutrofiilit aktivoituvat ja fagocytoivat keskikokoisia silikamikropartikkeleita (D50 4,28 µm). Seuraavissa kuvaajissa esitetään ja vertaillaan eri partikkelipitoisuuksien aiheuttamia vasteita valkosoluissa (kemiluminesenssi) ja niitä verrataan zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen (Kuva 18, Kuva 19). Kuvaajissa esitetään yhden ja saman mittauksen tulokset.

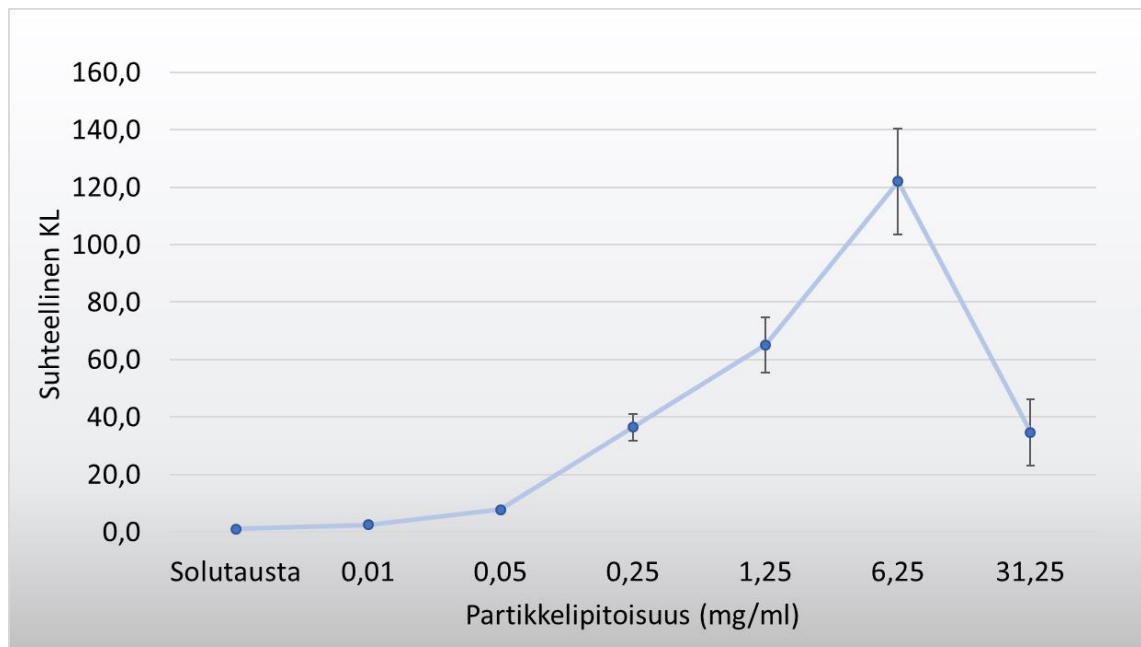


Kuva 18. Keskikoisten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua. (n=1)



Kuva 19. Keskikokoisten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua positiiviseen kontrolliin eli zymosaaniin. (n=1)

Partikkelimittauksia keskikoisilla partikkeleilla suoritettiin kolme ja niiden suhteellisten KL-arvojen keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 20).

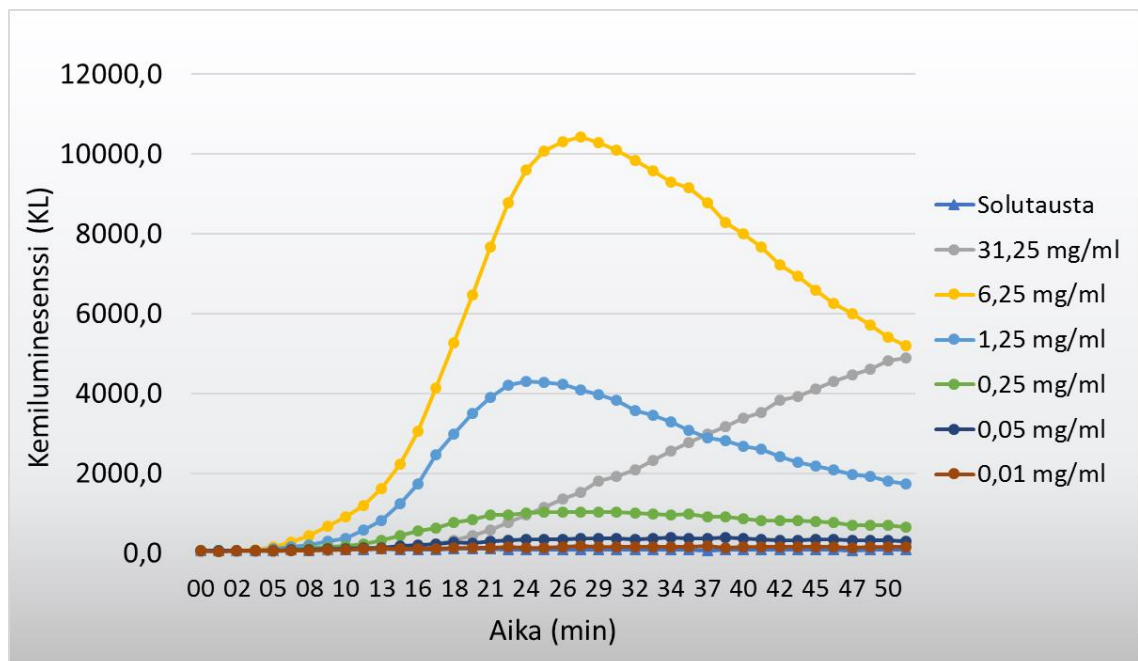


Kuva 20. Keskikokoisten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua solutaustaan. Zymosaanin suhteellinen KL oli 614,6 (ei näy kuvaajassa). (n=3)

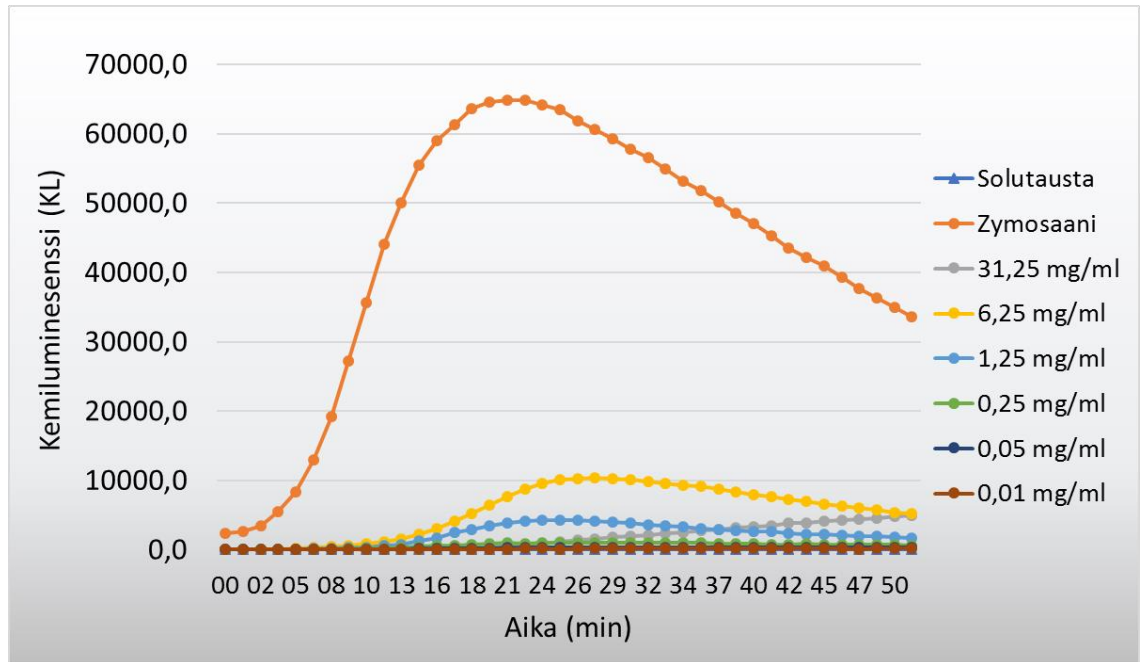
Kuvaajista voi päätellä, että keskikoiset silikamikropartikkelit aktivoivat neutrofiilejä jo pienillä pitoisuuksilla. Partikkeleita fagosytoidaan runsaiten partikkelipitoisuuden ollessa 6,25 mg/ml. Neutrofiilien kyky aktivoitua ja fagosytoida partikkeleita laskee partikkelipitoisuuden noustessa 31,25 mg/ml:aan.

### 8.1.5 Suuret silikamikropartikkelit

Seuraavissa tuloksissa esitetään kuinka suurten silikamikropartikkelien (D50 8,51  $\mu\text{m}$ ) eri partikkelipitoisuudet aktivoivat veren valkosoluja ja erityisesti neutrofiilejä. Partikkelien synnyttämiä vasteita valkosoluissa verrataan zymosaanin aiheuttamaan vasteeseen (Kuva 21, Kuva 22).

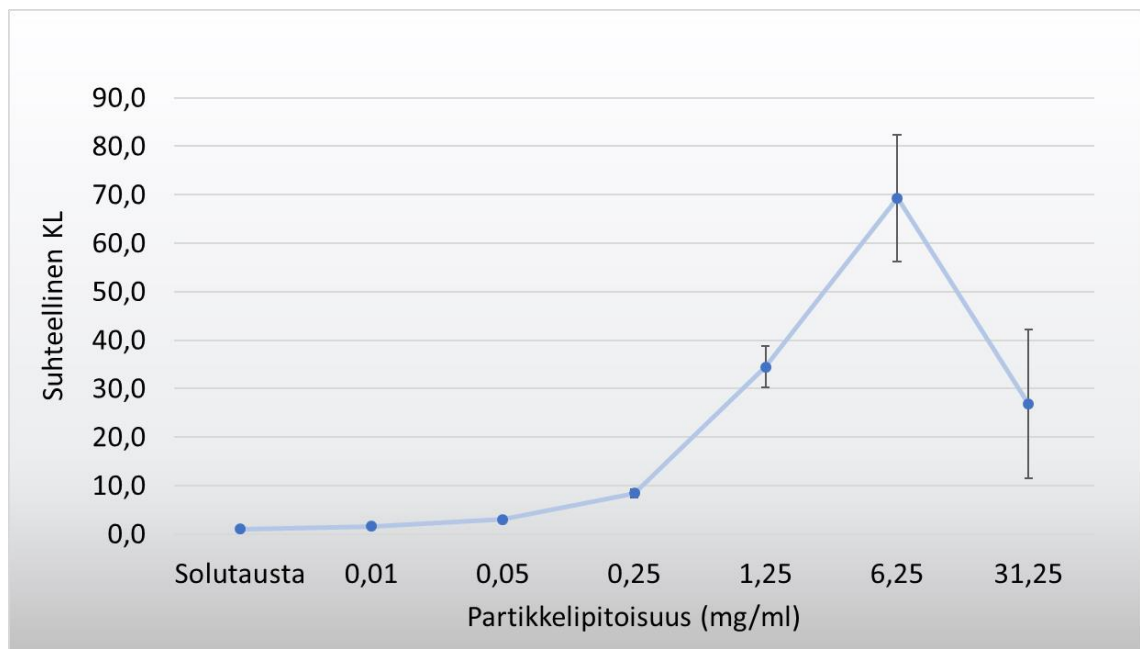


Kuva 21. Suurten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua solutaustaan. (n=1)



Kuva 22. Suurten silikamikropartikkelien kemiluminesenssikäyrien vertailua positiiviseen kontrolliin eli zymosaanin kemiluminesenssiin. (n=1)

Mittauksia suurilla silikamikropartikkeleilla suoritettiin kolme. Mittausten suhteellisten kemiluminesenssien keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 23).

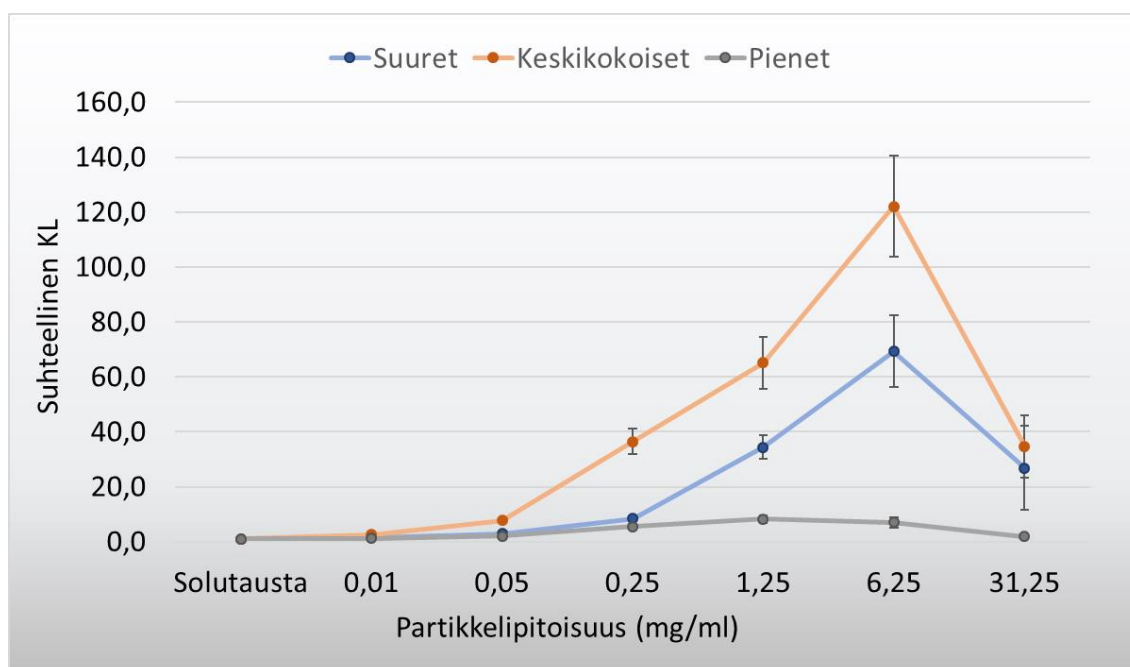


Kuva 23. Suurten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua solutaustaan. Zymosaanin suhteellinen KL oli 614,6 (ei näy kuvaajassa). (n=3)

Korkeimman vasteen valkosoluissa synnyttää 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus, joka on noin 69-kertainen verrattuna solutaustaan. Zymosaanin synnyttämä vaste oli puolestaan 614,6, joka on huomattavasti suurempi kuin 6,25 mg/ml partikkelipitoisuuden suhteellinen KL-arvo.

#### 8.1.6 Partikkelikoon vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen

Opinnäytetyössä oltiin kiinnostuneita vaikuttaako mikropartikkelien kokoerot neutrofiilien aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Seuraavassa kuvaajassa verrataan tutkimuksessa käytettyjen pienten, keskikokoisten ja suurten silikamikropartikkelien suhteellisia KL-arvoja toisiinsa (Kuva 24).



Kuva 24. Pienten, keskikokoisten ja suurten silikamikropartikkelien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua.

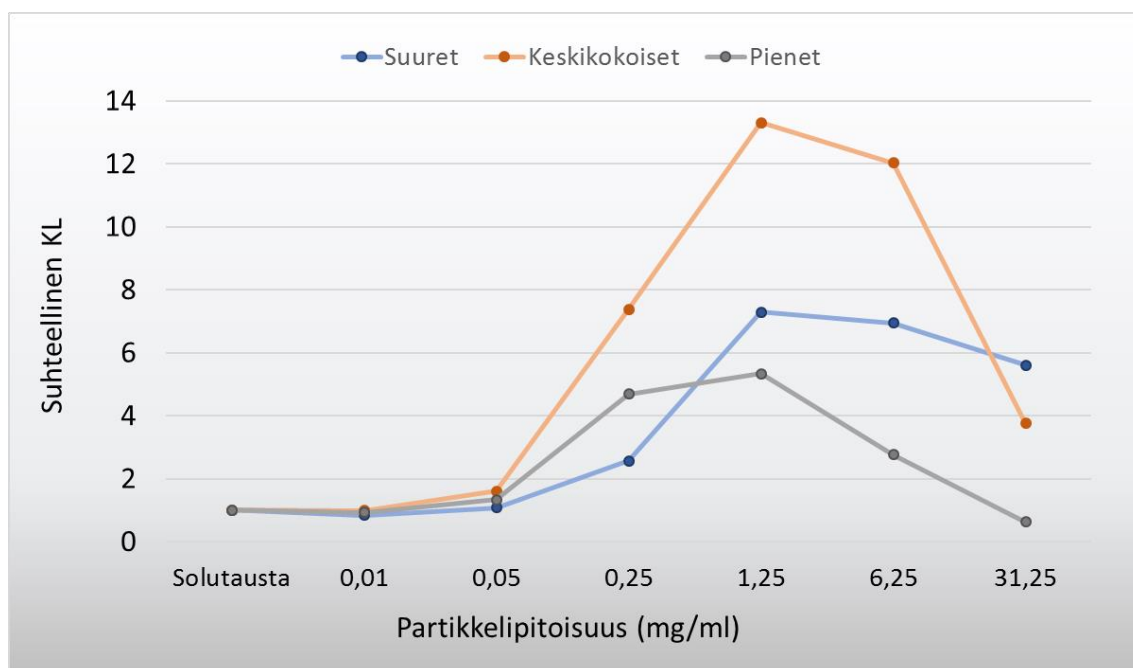
Vertaillen suhteellisia KL-arvoja toisiinsa, pienet partikkelit (D50 2,79  $\mu\text{m}$ ) aktivoivat valkosoluja vähiten ja eniten keskikokoiset partikkelit (D50 4,28  $\mu\text{m}$ ). Tarkastellessa suurten ja keskikokoisten partikkeleiden aiheuttamia vasteita, suurimman vasteen valkosoluissa aiheutti 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus. Suurten partikkelien (D50 8,51  $\mu\text{m}$ ) eri pitoisuuksien tuottamat vasteet noudattavat samaa kaavaa kuin keskikokoisten partikkelien, mutta niiden arvot ovat kuitenkin matalampia. Kaikkien partikkelien aiheuttamat

vasteet ovat alhaisilla partikkelipitoisuuksilla (0,01-0,05 mg/ml) lähellä toisiaan. Partikkelipitoisuuden kasvaessa, kasvavat myös partikkelien aiheuttamien vasteiden erot.

Tuloksista voi siis todeta, että mikropartikkelien koolla sekä partikkelipitoisuudella on vaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen ja niiden fagosytointiin. Keskikokoiset partikkelit aktivoivat eniten valkosoluja ja niitä fagosytoitiin aktiivisimmin. Kaikkien partikkelien vasteet olivat kuitenkin paljon matalampia kuin zymosaanin aiheuttamat vasteet valkosoluissa.

### 8.1.7 Sonikoinnin vaikutus mikropartikkelien fagosytointiin

Silikamikropartikkeleille on ominaista aggregoitua, joten käytännön osuudessa tutkittiin vaikuttaako mikropartikkelilaimennosten sonikointi valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Sonikoidessa mahdolliset partikkeliaggregaatit hajoavat. Mittauksia suoritettiin yksi kaikilla mikropartikkeleilla (D50 2,79 µm pienet, D50 4,28 µm keskikokoiset ja D50 8,51 µm suuret). Partikkelien suhteellisista KL-arvoista piirrettiin seuraava kuvaaja, jossa erikokoisten partikkelien suhteellisia KL-arvoja voitiin verrata toisiinsa (Kuva 25).



Kuva 25. Sonikoitujen silikamikropartikkelien suhteelliset KL-arvot. Zymosaanin suhteellinen KL oli 302 (ei näy kuvaajassa). (n=1)

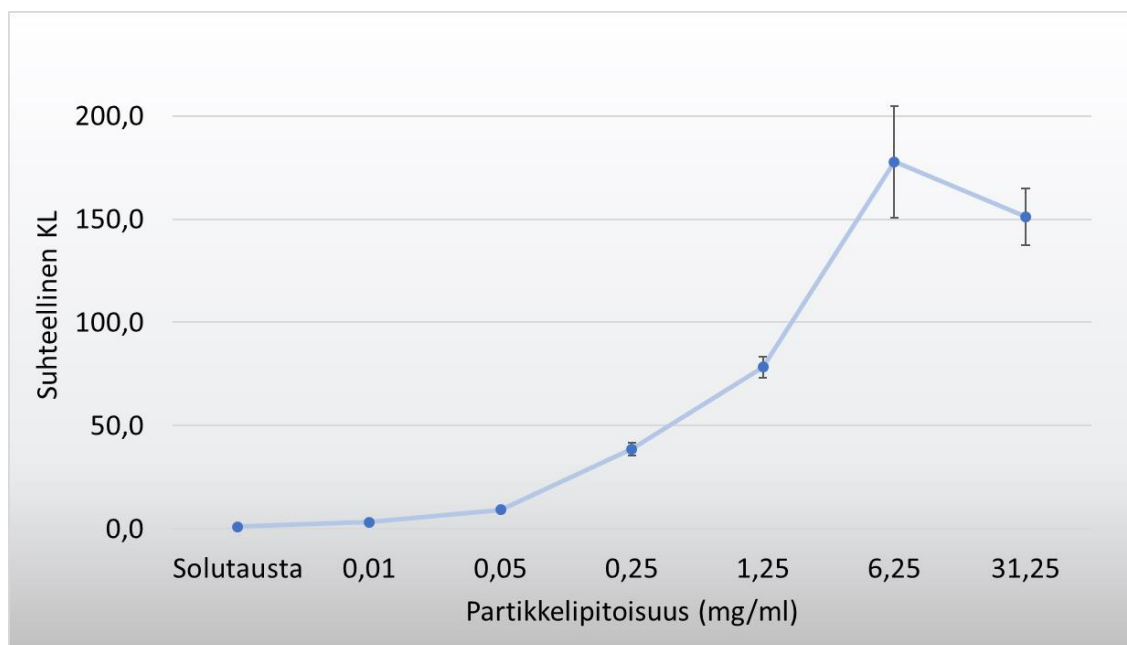


Sonikoidessa partikkeliseoksia laimennossarjojen välissä ja ennen reaktioseokseen lisäämistä, 1,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus aktivoi valkosoluja eniten kaiken kokoisilla silikamikropartikkeleilla. Tulos eroaa sonikoimattomista mikropartikkeleista, sillä niillä 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus aktivoi valkosoluja eniten. Keskikoiset silikamikropartikkelit aktivoivat eniten valkosoluja, seuraavaksi suuret ja vähiten valkosoluja aktivoivat pienet mikropartikkelit (samaa tapaan kuin sonikoimattomat mikropartikkelit).

Sonikoitujen silikamikropartikkelien aiheuttamat vasteet olivat huomattavasti alhaisempia kuin sonikoimattomien. Tästä voi päätellä, että aggregoituneet silikamikropartikkelit aktivoivat valkosoluja enemmän. Hydrogeelimitauksissa havaittiin myös hajotetun hydrogeelin partikkeliaggrekaattien (klustereiden) aktivoivan hieman valkosoluja, toisin kuin soolin nanopartikkelit. Soolissa olevat nanopartikkelit eivät aktivoineet valkosoluja ollenkaan.

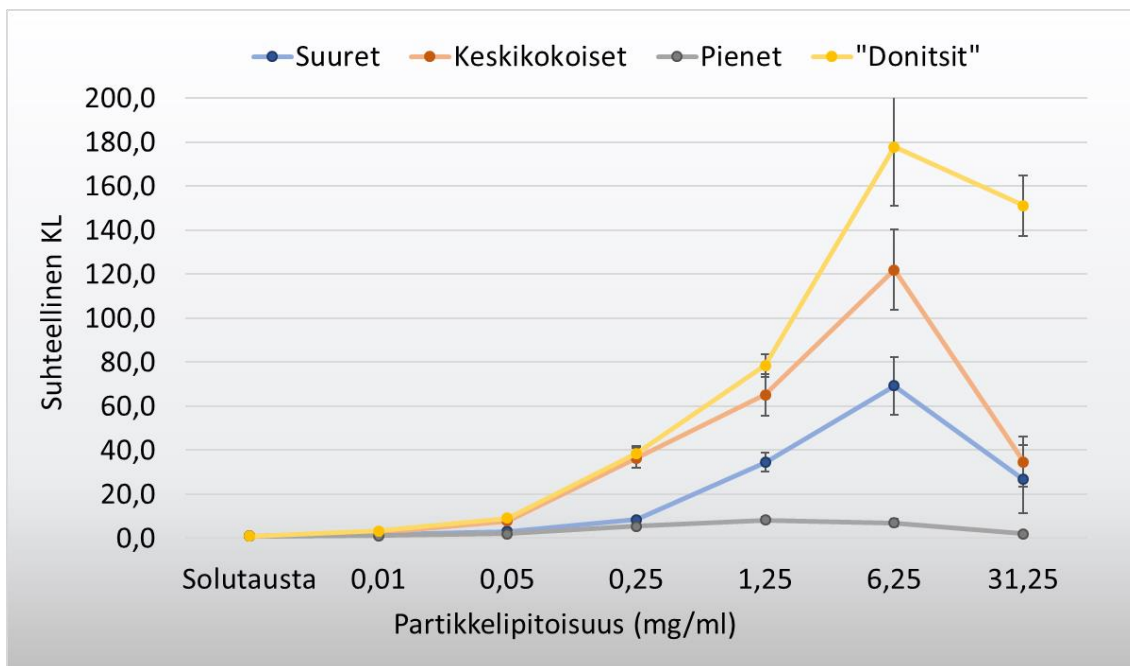
#### 8.1.8 Donitsin muotoiset silikamikropartikkelit

Opinnäytetyössä oltiin myös kiinnostuneita siitä voiko partikkelien erilainen muoto vaikuttaa partikkelien tunnistamiseen ja fagosytointiin. Kaikki muut tutkimuksessa käytettävät partikkelit olivat pyöreitä, mutta näissä kahdessa mittauksessa käytetyt partikkelit olivat ”donitsin” muotoisia ( $D_{50} = 6.99 \mu\text{m}$ ). Nämä partikkelit sisälsivät lääkeainetta (rakenteellisesti peptidejä), joka saattoi vaikuttaa tuloksiin. Kahden mittauksen suhteellisten KL-arvojen keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 26).



Kuva 26. "Donitsin" muotoisten silikamikropartikkelien eri partikkelipitoisuuksien suhteellisten kemiluminesenssien vertailua. Zymosaanin suhteellinen KL-arvo oli 607. (n=2)

Nämä "donitsin" muotoiset silikamikropartikkelit aktivoivat valkosoluja ja pienillä pitoisuuksilla ja suurimman vasteen valkosoluissa aiheutti 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus, joka oli 178-kertainen verrattuna solutaustaan. Zymosaanin suhteellinen KL-arvo oli kuitenkin huomattavasti suurempi (607). Seuraavassa kuvaajassa verrataan donitsin muotoisten silikamikropartikkelien suhteellisia KL-arvoja pyöreiden silikamikropartikkelien KL-arvoihin (Kuva 27).

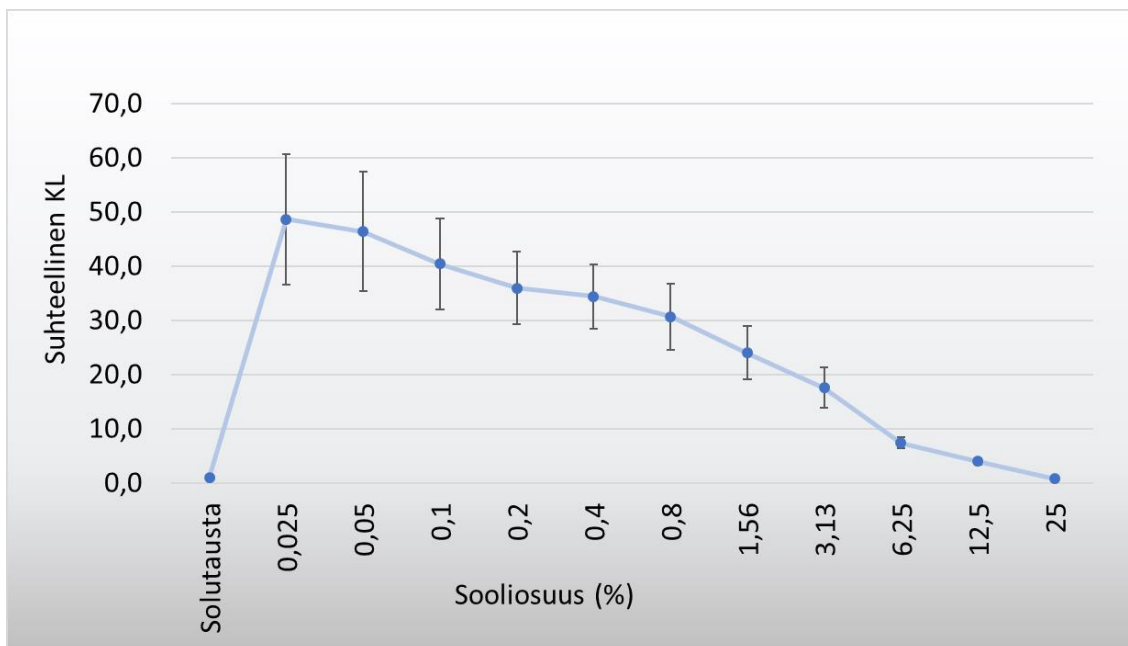


Kuva 27. Donitsin muotoisten mikropartikkelien suhteellisten KL-arvojen vertailua pyöreisiin mikropartikkeleihin.

Verrattaessa donitsin muotoisten partikkelien aiheuttamia vasteita pyöreiden silikamikropartikkelien vasteisiin, donitsin muotoiset partikkelit aktivoivat valkosoluja kaikista partikkeleista eniten suurilla partikkelipitoisuuksilla (1,25–31,25 mg/ml). Tuloksiin saattoi kuitenkin vaikuttaa partikkelien sisältämä lääkeaine, joka on voinut aktivoiva valkosoluja.

#### 8.1.9 Silikasoolin ja silikamikropartikkelien seos

Silikasoolin ja silikamikropartikkelien seokseen valittiin suuret silikamikropartikkelit niiden helpon käsittelyn vuoksi (sekoittuivat tasaisesti laimennosseoksissa) ja tuore R400-silikasooli. Reaktioissa käytettiin vain 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuutta, joka aktivoi valkosoluja voimakkaimmin. Tuoreen soolin vaikutusta tutkittiin samoilla reaktioseosten sooli-osuuksilla kuin aikaisemmin tehdyissä soolimittauksissa (0,025-25 % V/V). Mittauksissa käytettiin pelkästään tuoretta soolia, koska soolin ja hajotetun hydrogeelin inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen ei eronnut huomattavasti toisistaan. Näissä mittauksissa tutkittiin inhiboiko sooli valkosolujen aktivoitumista ja partikkelien fagosytointia. Mittauksia suorettiin kolme ja niiden maksiarvojen keskiarvoista piirrettiin seuraava kuvaaja, jossa vertaillaan komposiittien suhteellisia KL-arvoja toisiinsa (Kuva 28).



Kuva 28. Tuoreen R400-silikasoolin eri sooliosuuksien vaikutus silikamikropartikkelien fagosytointiin. Zymosaanin suhteellinen KL oli 569,4 (ei näy kuvaajassa). (n=3)

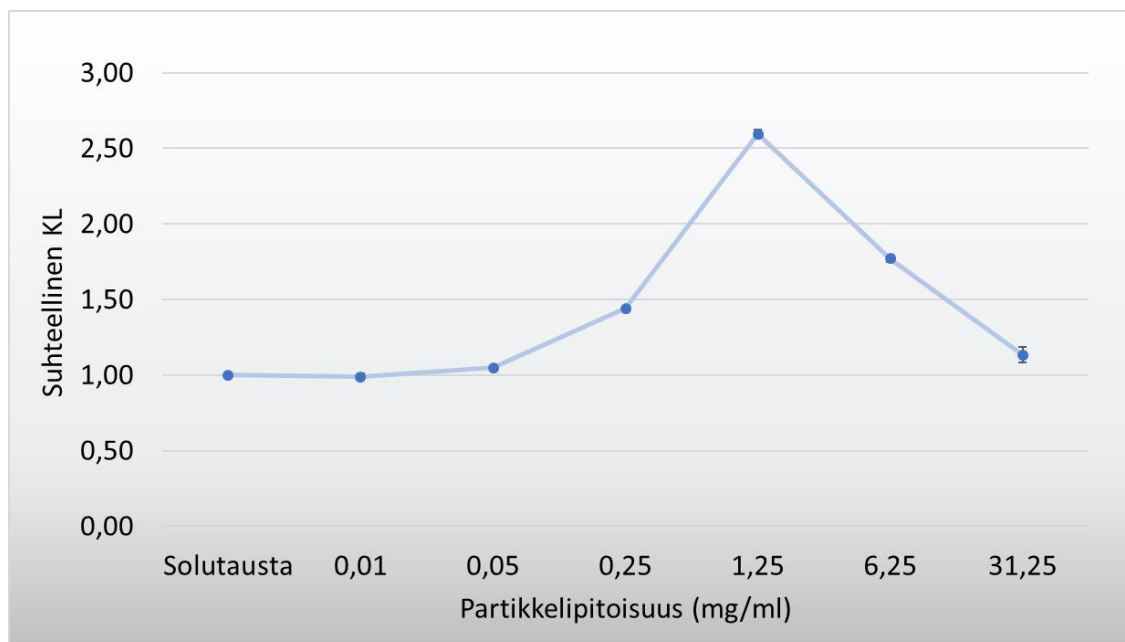
Kuvaajasta käy ilmi, että soolilla on inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Mitä suuremmaksi sooliosuus reaktioseoksissa kasvaa, sitä voimakkaammin sooli inhiboi valkosolujen aktivoitumista ja mikropartikkelien fagosytointia.

Soolin inhiboiva vaikutus voi johtua siitä, että sooli alkaa muuttumaan mittauksen aikana (+ 37 C°:ssa) geeliksi kapseloiden partikkeleita ja/tai valkosoluja sisäänsä ja näin vähentää valkosolujen aktivoitumista ja partikkelien fagosytointia. Tai silikalla voi olla mittausta häiritseviä ominaisuuksia, jotka kasvavat sooliosuuden noustessa.

#### 8.1.10 Yhdistelmäateriaali

Silikan yhdistelmäateriaalin eli komposiitin kykyä aktivoida valkosoluja tutkittiin materiaalilla, joka koostui silikahydrogeelistä ja sen sisälle kapseloituneista silikamikropartikkelista, jotka sisälsivät lääkeainetta (rakenteellisesti peptidi). Materiaali oli yhtenäinen kun siitä tehtiin sopivat laimennokset mittauksia vasten. Komposiitin partikkelipitoisuus tiedettiin, joten punnitsemalla oikea määrä komposiittia pystyttiin reaktioseoksen partikkelipitoisuus pitämään samana kuin partikkelimitauksissa. Tällä komposiitilla suoritettiin

kaksi mittausta, joiden suhteellisten KL-arvojen keskiarvosta piirrettiin seuraava kuvaaja (Kuva 29).



Kuva 29. Lääkeainetta sisältävän komposiitin suhteelliset kemiluminesenssit. Zymosaanin suhteellinen KL oli 119,4. (n=2)

Kuvaajasta käy ilmi, että komposiitti aktivoi valkosoluja todella vähän. 1,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus aktivoi valkosoluja eniten, mutta vain 2,6-kertaisesti verrattuna solutaustaan. Verrattaessa tätä arvoa zymosaanin suhteelliseen KL-arvoon (119,4) voidaan todeta, että komposiitin tuottama vaste valkosoluissa on lähes olematon.

Komposiitin rakenne hajosi, kun siitä tehtiin sopivat laimennokset mittauksia varten. Komposiitin silikamikropartikkelit sisälsivät samaa lääkeainetta (rakenteellisesti peptidi) kuin ”donitsin” muotoiset silikapartikkelit. Hajotetusta komposiitista muodostuu silikahydrogeelillä kapseloituneita partikkeliagregaatteja ja mikropartikkeleita. Nämä partikkeliagregaatit ja mikropartikkelit aktivoivat valkosoluja huomattavasti vähemmän kuin pelkät silikamikropartikkelit sekä samaa lääkeainetta sisältävät ”donitsin” muotoiset partikkelit, jotka aktivoivat valkosoluja kaikista partikkeleista eniten.

Silikaseosten ja komposiittimittauksen tuloksista voidaan todeta, että silikasoolilla sekä hydrogeelillä on valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin inhihoiva vaikutus. Tulokset osoittivat myös sen, että silikapartikkelien ja silikageelin yhdistelmämateriali aktivoi veren valkosoluja huomattavasti vähemmän kuin pelkät silikamikropartikkelit.

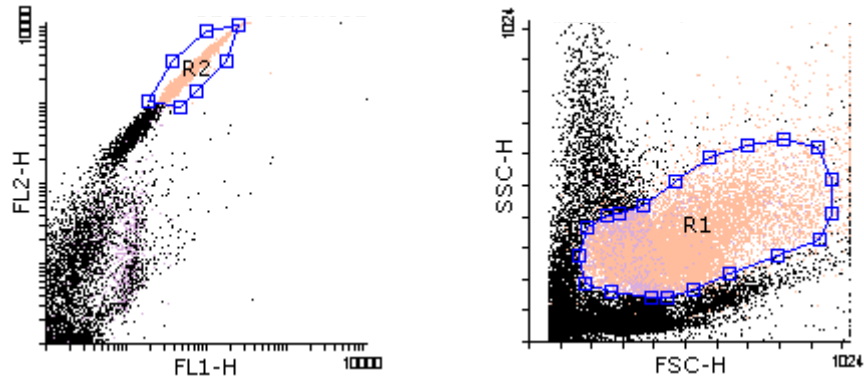
## 8.2 Virtausytometriset tulokset

Virtausytometristä menetelmää alettiin kehittää tunnetun menetelmän pohjalta, jossa määritettiin fagosyyttien kykyä aktivoitua ja fagosytoida fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) leimattua zymosaanipartikkeleita (Nuutila et al. 2005). Menetelmässä käytettiin Trypan Blue:ta (TB) erottamaan fagosyyttien pintaan sitoutuneet zymosaanipartikkelit fagosytoidusta zymosaanista. Tämä tehtiin sammuttamalla TB:llä fagosyyttien pinnassa kiinni olevien zymosaanipartikkelien fluoresenssi. Opinnäytetyössä yritettiin soveltaa samaa tekniikkaa fluoreseiinisilikamikropartikkeleille, mutta tuloksetta. TB:n teho ei riittänyt sammuttamaan fluoreseiinisilikamikropartikkelien fluoresenssia. Tämä saattoi johtua siitä, että TB ei pystynyt sitoutumaan partikkelien pintaan tai päässyt tunkeutumaan partikkelien tiiviin rakenteen sisään, jossa fluoreseiini sijaitsi. Toisaalta neutofiilit saattoivat fagosytoivat kaikki partikkelit sisäänsä, eivätkä sitoneet niitä ollenkaan pintaansa. Tutkimuksen edetessä TB:n käytöstä luovuttiin. Opinnäytetyössä tutkittiin myös, kuinka reaktioiden lämpötila vaikuttaa neutrofiilien kykyyn fagosytoida silikamikropartikkeleita. Nuutila mainitsi artikkelissaan, että inkuboidessa neutrofiilejä + 4 °C:ssa sytokalasiini D:n kanssa, neutrofiilit eivät pysty fagosytoimaan zymosaanipartikkeleita, vaan pelkästään sitomaan niitä pintaansa (Nuutila et al. 2005). Tämän innoittamana ja vertailun vuoksi reaktiot tehtiin + 37 °C:ssa sekä + 4 °C:ssa, mutta ilman sytokalasiini D:tä.

Menetelmän kehittäminen ja toimivuuden testaaminen aloitettiin fluoreseiinizymosaanilla, jota valmistettiin päällystämällä zymosaanipartikkeleita (20 mg/ml) fluoreseiiniliuosella (200 ppm). Tämän jälkeen siirryttiin tekemään mittauksia fluoreseiinisilikamikropartikkeleilla. Huomattiin, että neutrofiilien populaatiota oli vaikea erottaa muista valkosoluista, joten neutrofiilit leimattiin jatkossa fluoresoivalla monoklonalisella vasta-aineella (PE Anti-human CD16), joka sitoutuu spesifisesti neutrofiilien reseptoreihin. CD16:sta ansiosta pystyttiin spesifisesti tutkimaan neutrofiilien fluoresenssia, joka korreloi fagosytoitujen fluoreseiinisilikamikropartikkelien määrää. Mitä voimakkaammin neutrofiili fluoresoi sitä enemmän se on fagosytoinut fluoreseiinisilikamikropartikkeleita. Reaktioseoksia inkuboitiin eri aikapisteissä, jonka avulla pystyttiin määrittämään neutrofiilien kykyä fagosytoida partikkeleita ajan funktiona.

CD16-leimatut neutrofiilit rajattiin muista valkosoluista ”portilla” ja virtausytometri asetettiin keräämään 10 000 solua tämän portin sisältä. 2D-pistekaaviosta, joka kerää neutrofiilien fluoresenssia FL1- ja FL2-kanavilla, rajattiin DC16-positiiviset neutrofiilit (R2).

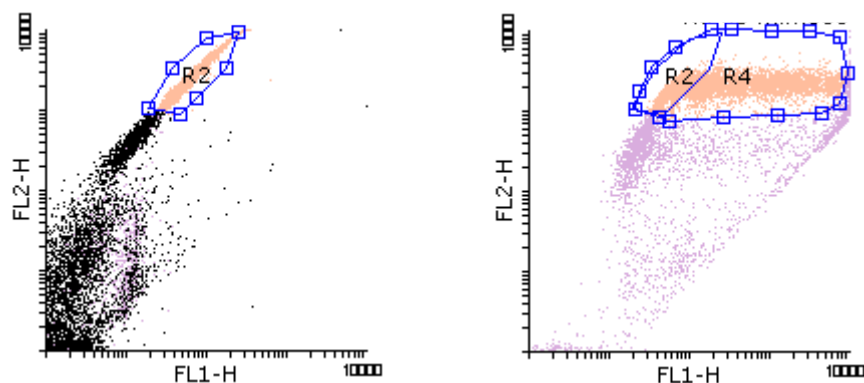
R2-portin sisään osuvat solut erottuivat FSC-SSC-pistekaaviossa värillisinä, joka mahdollisti neutrofiilipopulaation rajaamisen (R1) (Kuva 30).



Kuva 30. Neutrofiilipopulaation rajaaminen CD16-leimattujen neutrofiilien avulla. R1 = neutrofiilipopulaatio FSC-SSC-pistekaaviossa, R2 = CD16 leimatut neutrofiilit FL1-FL2-pistekaaviossa.

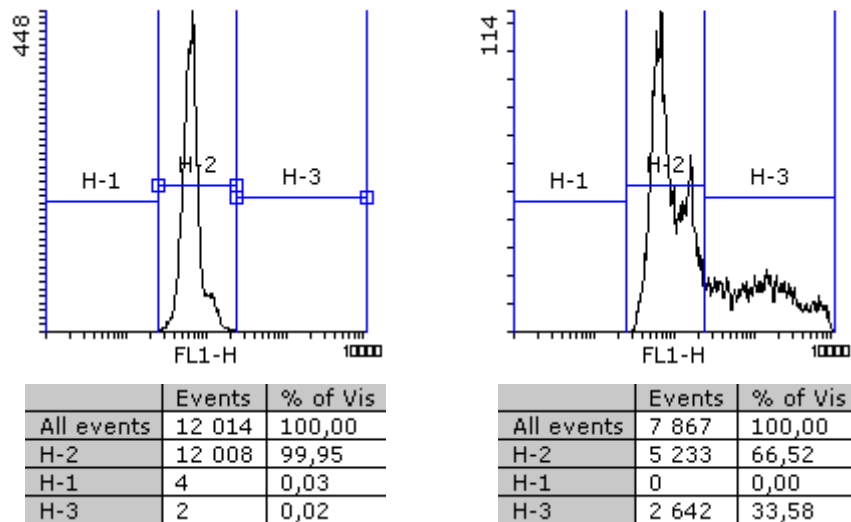
Porttien asettamisen jälkeen kaikki näytteet ajettiin samoilla asetuksilla ja mittaustulokset käsiteltiin Flowing Software 2.5.1-ohjelmalla.

Tuloksia analysoitaessa oltiin kiinnostuneita neutrofiilien fluoresenssista, joka korreloi fagosytoitujen fluoreseiinisilikamikropartikkelien määrää. Mitä voimakkaammin neutrofiili fluoresoi sitä enemmän se on fagosytoinut silikamikropartikkeleita. Nämä neutrofiilit näkyvät FL1-FL2-pistekaaviossa R2-populaation oikealla puolella (R4) (Kuva 31).



Kuva 31. Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien fluoresenssin vertaamista partikkeleita fagosytoimattomiin neutrofiileihin (CD16 solutausta). Vasemmanpuoleisessa kaaviossa esitetään neutrofiilejä, jotka eivät ole fagosytoineet partikkeleita (R2) ja oikeanpuoleisessa kaaviossa on partikkeleita fagosytoineita neutrofiilejä (R4).

Neutrofiilien fluoresenssia (R4) voidaan esittää histogrammilla, jossa x-akseli kuvaa fluoresenssin voimakkuutta (kasvaa oikealle mentäessä) ja y-akseli esittää mitattujen tapahtumien määrän (Kuva 32).



Kuva 32. Neutrofiilien fluoresenssia esittävät histogrammit ja niiden statistiikat. Vasemmanpuoleinen histogrammi esittää partikkeleita fagosytoimattomien neutrofiilien fluoresenssia ja oikeanpuoleinen partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien fluoresenssia. Histogrammien alapuolella ovat niiden statistiikat, joissa näkyy tapahtumien (mitattujen neutrofiilien) määrät ja niiden prosenttiosuudet. H-1 = leimaamattomat valkosolut, H-2 = leimatut neutrofiilit ja H-3 = partikkeleita fagosytoineet ja leimatut neutrofiilit.

Näistä histogrammeista pystyttiin erottamaan ja määrittämään partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien %-määrä kaikista neutrofiileistä. H-1-, H-2- ja H-3-portit pystyttiin asettamaan kontrollien avulla, joita olivat negatiivinen kontrolli (sisälsi leimaamattomia valkosoluja) ja CD16-solutausta (sisälsi CD16-leimattuja neutrofiilejä). Näytteitä analysoidessa oltiin kiinnostuneita partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosenttiosuuksista. Virtausytometrisellä menetelmällä tutkittiin vaikuttaako silikamikropartikkelien koko ja eri partikkelipitoisuudet reaktioseoksissa partikkelien fagosytointiin neutrofiilien toimesta. Mittauksissa käytettiin kolmen kokoisia fluoreseiinisilikamikropartikkeleita. Partikkelien koot ovat esitetty seuraavassa taulukossa (Taulukko 15).



Taulukko 15. Fluoreseiniisilikamikropartikkelien kokojakauma.

Silikapartikkelit	D10	D50	D90
R5	1,34 $\mu\text{m}$	3,14 $\mu\text{m}$	10,21 $\mu\text{m}$
R10	1,73 $\mu\text{m}$	5,40 $\mu\text{m}$	58,25 $\mu\text{m}$
R15	1,63 $\mu\text{m}$	4,45 $\mu\text{m}$	34,12 $\mu\text{m}$

Mittauksissa käytettiin 1,25 ja 0,25 mg/ml partikkelipitoisuuksia ja seuraavassa taulukossa esitetään niiden sisältämät partikkeliannokset reaktioseoksessa eli mikropartikkelien määrä yhtä valkosolua kohden reaktioseoksessa (Taulukko 16).

Taulukko 16. Partikkelipitoisuudet ja partikkeliannokset.

Partikkelipitoisuus (mg/ml)	Mikropartikkelien kappalemäärä yhtä solua kohden reaktioseoksessa (mp/solu)		
	R5 D50 3,14 $\mu\text{m}$	R10 D50 5,4 $\mu\text{m}$	R15 D50 4,45 $\mu\text{m}$
1,25	12,5	11,3	9,6
0,25	2,5	2,3	1,9

Menetelmällä tutkittiin myös kuinka tuoreen silikasoolin läsnäolo ja sen eri %-osuudet (V/V) reaktioseoksissa vaikuttavat partikkelien fagosytointiin sekä kuinka reaktioiden lämpötilaerot vaikuttavat partikkelien fagosytointiin. Näytteitä inkuboitii eri aikapisteitä + 37 °C:ssa sekä + 4 °C:ssa.

Seuraavaksi esitetään mittausten tulokset taulukoituna. Ensimmäisessä taulukossa esitetään kuinka partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien määrä kasvaa ajan kuluessa. Mittauksessa käytettiin 1,25 mg/ml:n partikkelipitoisuutta, joka valittiin sopivaksi pitoisuudeksi menetelmän kehitysvaiheessa, koska tämä partikkelipitoisuus osoitettiin aikaisemmissa KL-mittauksissa aiheuttavan suurimman vasteen valkosoluissa, kun mikropartikkelit olttiin sonikoitu (kappale 8.1.7). Mittauksissa haluttiin myös välttää liian suuren partikkelipitoisuuden käyttöä virtausytometrinen tukkeutumisen riskin vuoksi. Näytteitä inkuboitii + 37 °C:ssa vesihauteessa ravistuksessa 5, 15 ja 30 minuutin ajan ja reaktiot pysäytettiin asettamalla ne jäähauteeseen (Taulukko 17).

Taulukko 17. Fluoreseiinisilikamikropartikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosenttiosuus.

Aika (min)	Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosenttiosuus (%)
5	8,1
15	16,8
30	21,9

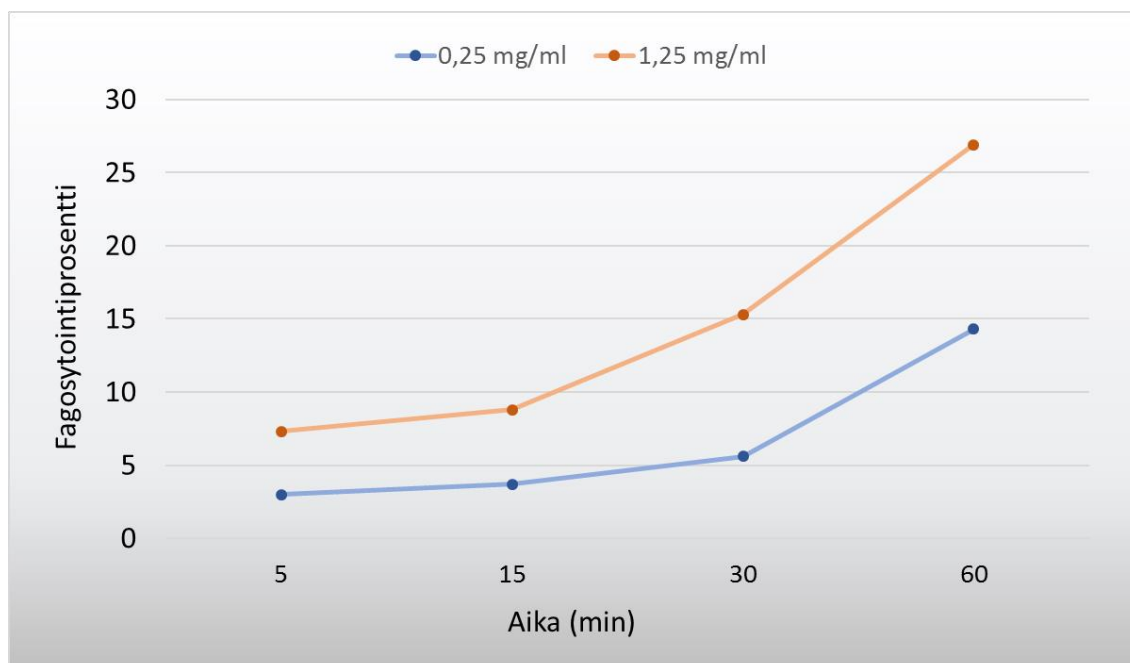
Taulukoidut tulokset osoittavat, että partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien määrä kaksinkertaistuu 5-15 minuutin aikavälillä. 15 minuutin jälkeen partikkeleita fagosytoidaan vähemmän.

Seuraavassa taulukossa verrataan kuinka eri partikkelipitoisuudet (1,25 mg/ml ja 0,25 mg/ml) vaikuttavat partikkelien fagosyointiprosenttiin. Näytteiden reaktiot tapahtuivat + 37 °C:ssa (Taulukko 18).

Taulukko 18. Eri partikkelipitoisuuksien fagosyointiprosenttien vertailua.

Aika (min)	Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosenttiosuus (%)	
	1,25 mg/ml	0,25 mg/ml
5	7,3	3
15	8,8	3,7
30	15,3	5,6
60	26,9	14,3

1,25 mg/ml:n partikkelipitoisuuden laskiessa viidesosaan eli 0,25 mg/ml:n pitoisuuteen, fagosytointiprosentti laskee karkeasti arvioita puoleen. Fagosytointiprosentti kasvaa mo- lemmissa pitoisuuksissa yhtenevästi ajan kuluessa (Kuva 33).



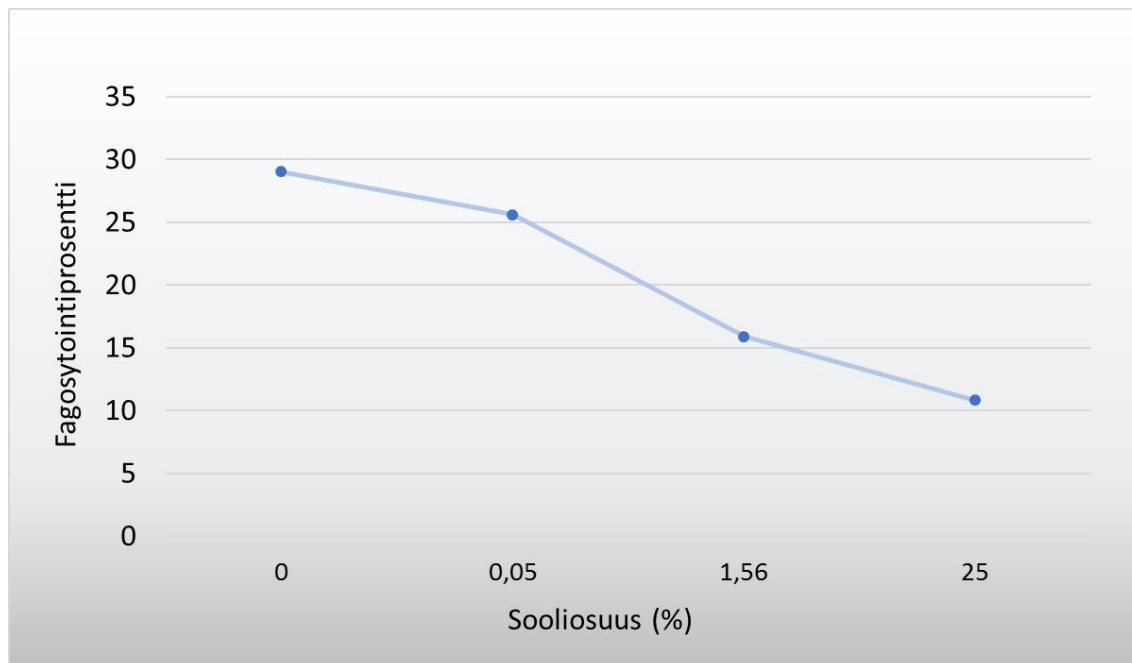
Kuva 33. Eri partikkelipitoisuuksien fagosytointiprosenttien kasvun vertailua ajan funk- tion.

R400-silikasoolin eri %-osuuksien (V/V) inhiboivaa vaikutusta partikkelien fagosytointiin tutkittiin 1,25 mg/ml:n partikkelipitoisuuden kanssa. Reaktioseosten sooliosuuksina käy- tettiin 0,05 %, 1,56 % ja 25 %:a (Taulukko 19). Sooliosuudet valittiin aikaisempien KL- mittausten tulosten perusteella, jossa 1,56 %:n osuus inhiboi valkosolujen aktivoitumista noin puolella verrattaessa reaktioon, joka ei sisältänyt soolia vaan pelkästään silikamik- ropartikkeleita. Näytteitä inkuboitin 60 minuutin ajan + 37 °C:ssa.

Taulukko 19. R400-silikasoolin vaikutus silikamikropartikkelien fagosytointiin.

Sooliosuus (%)	Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien prosentiosuus (%)
0	29
0,05	25,6
1,56	15,9
25	10,8

Reaktioseosten sooliosuuden noustessa soolin inhiboiva vaikutus neutrofiilien aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin voimistuu (Kuva 34). Tulokset ovat vertailukelpoisia aikaisempien KL-mittaustulosten kanssa (kappale 8.1.8)



Kuva 34. R400-silikasooliosuuksien (%) inhiboivien vaikutusten vertailua.

Seuraavaksi tutkittiin vaikuttaako mikropartikkelien kokoerot niiden fagosytointi prosenttiin. Reaktioiden partikkelipitoisuus pidettiin vakiona (1,25 mg/ml) ja kaikkia näytteitä inkuboitii 60 minuutin ajan +37 °C:ssa. Mittauksessa tutkittiin myös, kuinka reaktioiden eri lämpötila (+4 °C) vaikuttaa silikamikropartikkelien fagosytointiin. Lisäksi tehtiin myös reaktiot silikamikropartikkelien ja soolin seoksella (sooliosuus 1,56 %) + 37 °C:ssa. (Taulukko 20).

Taulukko 20. Silikamikropartikkelien kokoerojen, reaktiolämpötilan sekä R400-silikasoolin vaikutukset partikkelien fagosytointi prosenttiin.

Mikropartikkelit (1,25 mg/ml)	Partikkeleita fagosytoineiden neutrofiilien %-osuus		
	Inkubointi +37 °C:ssa	Inkubointi +4 °C:ssa	Inkubointi + 37 °C:ssa soolin kanssa (1,56 %)
R5 (D50 3,14 µm)	37,78	9,24	22,15
R10 (D50 5,4 µm)	38,88	8,86	19,50
R15 (D50 4,45 µm)	44,48	11,71	23,19

Fluoreseiinisilikamikropartikkelien kokoerojakauma virtausytometrisessä menetelmässä oli suppeampi kuin KL-mittauksissa käytettyjen partikkelien (D50 2,79 µm, 4,28 µm ja 8,51 µm), mutta keskikokoiset fluoreseiinisilikamikropartikkelit (D50 4,45 µm) olivat lähes samankokoisia kuin KL-mittauksissa käytetyt keskikokoiset silikamikropartikkelit (D50 4,28 µm). + 37 °C:ssa inkuboitujen partikkelinäytteiden tulokset osoittavat kuitenkin samankaltaisuutta kuin KL-mittausten tulokset. KL-mittauksissa osoitettiin, että keskikokoiset silikamikropartikkelit aiheuttavat voimakkaimman vasteen valkosoluissa ja suurimmat silikamikropartikkelit aiheuttivat puolestaan matalimman vasteen. Pienten partikkelien vaste valkosoluissa asettui näiden väliin (kappale 8.1.6). Virtausytometrisen menetelmän mittaustulokset olivat yhtäläisiä. Eniten neutrofiilit fagosytoivat keskikokoisia partikkeleita (R15: D50 4,45 µm), seuraavaksi suurimpia partikkeleita (R10: D50 5,4 µm) ja vähiten pienimpiä partikkeleita (R5: D50 3,14 µm). Virtausytometrisellä menetelmällä osoitettiin myös, että silikasoolilla on inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen ja silikamikropartikkelien fagosytointiin kuten KL-mittauksissakin.

Reaktioiden lämpötilalla on selvästi suuri vaikutus partikkelien fagosytointiin. Inkuboidessa näytteitä + 4 °C:ssa, partikkelien fagosytointiprosentti laski noin neljäsosaan verrattuna + 37 °C:ssa tapahtuneiden reaktioiden tuloksiin. Matala lämpötila hidastaa selvästi valkosolujen aktivoitumista ja silikamikropartikkelien fagosytointia.

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Biohajoavaa amorfista silikaa käytetään hydrogeelin, mikropartikkelien tai näiden yhdistelmäperiaatteen muodossa lääkeannosteluteknologiassa, joten näiden materiaalien täytyy olla biohyhteensopivaa kehon kanssa. Opinnäytetyössä tutkittiin silikan biohyhteensopivuutta veren valkosolujen, erityisesti neutrofiilien kanssa. Neutrofiilit muodostavat kehon luontaisen immuunijärjestelmän ensimmäisen puolustuslinjan patogeeniä vastaan ja ne ovat runsaslukuisimpia valkosoluja veressä. Valkosolujen vasteita silikan eri muotoihin (sooli, hydrogeeli, mikropartikkelit, soolin ja mikropartikkelien seos, komposiitti), tutkittiin kemiluminesenssimäärityksellä sekä virtaussytometrisellä menetelmällä.

Tulokset osoittivat, että tuore silikasooli ja hajotettu silikahydrogeeli eivät aktivoi veren valkosolujen puolustusjärjestelmää (fagocytoosi) ja ovat näin ollen biohyhteensopivaa veren valkosolujen kanssa. Tämä todettiin mittaamalla neutrofiilien oksidatiivisen aineenvaihdunnan aktivoitumista kemiluminesenssimäärityksellä. Silikasoolin ja silikahydrogeelin rakenteet poikkesivat toisistaan, sillä tuore sooli sisältää silikananopartikkeleita (<1 µm) ja hajotettu hydrogeeli suuria silikapartikkeliaggregaatteja. Rakenne-eroista huolimatta tuloksista havaittiin, että molemmilla materiaaleilla on jopa inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen. Tämä todettiin vertaamalla valkosolujen aktivoitumista (silikasoolin läsnä ollessa) negatiiviseen kontrolliin eli valkosolujen tausta-aktivoitumiseen (ilman silikan läsnäoloa). Tuore sooli, joka sisältää silikananopartikkeleita, ei aktivoi valkosoluja ollenkaan. Jo matalalla sooliosuudella reaktioseoksessa oli inhiboiva vaikutus ja se kasvoi sooliosuuden noustessa (soolin/hydrogeelin osuus reaktioseoksissa oli 0,025-25 %). Hydrogeelin puolesta havaittiin aktivoivan valkosoluja hieman matalilla hydrogeeliosuuksilla (0,025-0,4 %). Valkosolujen aktivoituminen saattoi johtua suuremmista silikapartikkeliaggregaateista, jotka syntyivät kun hydrogeelin rakenne hajotettiin ravistamalla. Valkosolujen aktivoituminen oli kuitenkin todella vähäistä verrattuna positiiviseen kontrolliin eli zymosaanipartikkelien aiheuttamaan vasteeseen. Zymosaanipartikkeleiden synnyttämä reaktio valkosoluissa vastaa valkosolujen aktivoitumistasoa, kun ne kohtaavat keholle haitallisia mikro-organismeja. Hydrogeeliosuuden noustessa havaittiin, että hydrogeelillä on inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen samaan tapaan kuin tuoreella soolilla.

Silikasoolin inhiboivaa vaikutusta silikamikropartikkelien fagosytointiin tutkittiin tuoreen soolin ja silikamikropartikkelien seoksella. Mittaustulokset osoittivat, että soolilla on inhiboiva vaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen ja partikkelien fagosytointiin. Sooliosuuden noustessa valkosolujen aktivoituminen laski eli neutrofiilit fagosytoivat partikkeleita vähemmän.

Tutkimustuloksista havaittiin, että kaikki erikokoiset ja muotoiset amorfiset silikamikropartikkelit aktivoivat veren valkosoluja ja niitä fagosytoitiin neutrofiilien toimesta. Mittauksia suoritettiin erikokoisilla silikamikropartikkeleilla (D50: 2,79  $\mu\text{m}$ , 4,28  $\mu\text{m}$  ja 8,51  $\mu\text{m}$ ) ja näistä suurimman vasteen valkosoluissa aiheuttivat keskikokoiset partikkelit (D50 4,28  $\mu\text{m}$ ). Seuraavaksi eniten valkosoluja aktivoivat isot partikkelit (D50 8,51  $\mu\text{m}$ ) ja vähiten pienemmät silikamikropartikkelit (D50 2,79  $\mu\text{m}$ ). Tämä todistettiin myös virtausstometrisellä menetelmällä. Partikkelin koolla on merkitystä valkosolujen aktivoitumiseen ja niiden fagosytointiin.

Opinnäytetyössä tutkittiin myös kuinka eri partikkelipitoisuudet reaktioseoksissa vaikuttavat valkosolujen vasteisiin. Todettiin, että vahvimman vasteen aiheutti suurilla ja keskikokoisilla partikkeleilla 6,25 mg/ml:n partikkelipitoisuus ja pienimmillä partikkeleilla 1,25 mg/ml:n pitoisuus. Voidaan siis todeta, että partikkelien määrällä on vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen ja fagosytoinnin tehokkuuteen. Havaittiin myös, että suurella partikkelipitoisuudella (31,25 mg/ml) on valkosolujen aktivoitumista inhiboiva vaikutus, kun verrataan 6,25 mg/ml:n pitoisuuden aiheuttamaan vasteeseen. Suuri partikkelipitoisuus saattoi häiritä kemiluminesenssin mittaamista. Silikamikropartikkeleille on ominaista aggregoitua, joten partikkelipitoisuuden ollessa korkea partikkelit saattavat aggregoituvat suuremmiksi partikkeleiksi, jolloin fagosytointi neutrofiilien toimesta hidastuu tai ei onnistu lainkaan. Mikäli partikkeliaggregaatit kasvavat suuremmiksi kuin valkosolut, partikkelien fagosytoiminen estyy kokonaan. Partikkelien aggregoitumisen vaikutusta vasteiden voimakkuuteen tutkittiin sonikoiduilla silikamikropartikkeleilla. Sonikoitujen silikamikropartikkelien aiheuttamat vasteet valkosoluissa olivat huomattavasti alhaisempia kuin sonikoimattomien. Tästä voi päätellä, että aggregoituneet silikamikropartikkelit aktivoivat valkosoluja enemmän kuin sonikoidut partikkelit, mutta myös aggregaattien koolla on vaikutusta valkosolujen aktivoitumiseen. Aggregaattien koon kasvaessa liian suuriksi, neutrofiilit eivät pysty fagosytoimaan niitä.

Kaikki silikamikropartikkelit aktivoivat veren valkosoluja ja niitä fagosytoitiin neutrofiilien toimesta. Verrattaessa silikamikropartikkelien vasteita zyмосaanipartikkelien aiheuttamaan vasteeseen voidaan todeta, että partikkelit eivät aktivoi valkosoluja hälyttävästi.

Hydrogeelin inhiboivaa vaikutusta silikamikropartikkelien fagosytointiin tutkittiin hydrogeelin ja silikamikropartikkelien yhdistelmäperiaalilla eli komposiitilla. Komposiitissa partikkelit olivat kapseloituneina geelin sisään. Mittauksia varten komposiitin rakenne hajotettiin, jolloin sen rakenne sisälsi silikahydrogeelillä kapseloituneita partikkeliagregaatteja ja mikropartikkeleita. Nämä hydrogeelillä kapseloidut partikkeliagregaatit ja mikropartikkelit aktivoivat valkosoluja huomattavasti vähemmän kuin pelkät silikamikropartikkelit. Valkosolujen aktivoituminen oli lähes olematonta. Voidaankin todeta, että yhdistelmäperiaali on bioyhteensopivampaa valkosolujen kanssa kuin pelkät silikamikropartikkelit. Jokinen et al. toteaa artikkelissaan, että sooli-geeli-menetelmällä tuotettu amorfinen ja vesiliukoinen silika on bioyhteensopivaa kehon kanssa ja sillä on havaittu olevan jopa positiivista vuorovaikutusta elävien organismien ja biomolekyylien kanssa (Jokinen et al. 2013). Tämä tukee havaittuja tutkimustuloksia, jossa silikasooli ja hydrogeeli eivät aktivoi valkosoluja, vaan niillä on jopa inhiboiva vaikutus valkosolujen aktivoitumiseen.

Jatkotutkimuksia ajatellen partikkelien kokoerojen vaikutusta valkosolujen vasteeseen ja partikkelien fagosytointiin voitaisiin tutkia tarkemmin siten, että partikkelien määrä solua kohden vakioitaisiin tietyksi. Määrä vakioitaisiin samaksi kaikille erikokoisille partikkeleille. Tämän opinnäytetyön tuloksiin saattoi vaikuttaa se, että partikkeliannosten sisältämien partikkelien kappalemäärät erosivat toisistaan. Partikkelien määrien erot johtuivat siitä, että kaikista partikkeleista valmistettiin perusliuos punnitsemalla sama määrä partikkelijauhoa. Näin ollen suurien partikkelien määrä perusliuoksessa oli vähäisempi kuin pienempien partikkelien.

Partikkelien fagosytointia voitaisiin tutkia myös mikroskopoimalla, jonka avulla pystyy saamaan varmuuden partikkelien fagosytoinnista tai mahdollisesti vain pintaan sitoutuneista partikkeleista. Fagosytoosia voisi tutkia esimerkiksi konfokaalisella pyyhkäisevällä lasermikroskoopilla, jolla on mahdollista kuvata soluja reaaliaikaisesti (Kusaka et al. 2014). Neutrofiilit leimattaisiin monoklonaalisella vasta-aineella (PE Anti-human CD16), jonka ansiosta neutrofiilien soluseinä näkyy fluoresoivana. Menetelmässä käytettäisiin fluoreseiinisilikamikropartikkeleita, jolloin partikkelit näkyvät hohtavina. Partikkelien fagosytointia ei ehditty tutkimaan/todistamaan mikroskoopin avulla, mutta tällä menetelmällä olisi voinut saada varmuuden partikkelien fagosytoinnista tai mahdollisesti vain pintaan sitoutuneista partikkeleista.



## LÄHTEET

AB RAHMAN ISMAIL and PADAVETTAN VEJAYAKUMARAN, 2012. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, pp. 1-15.

ALBERTS BRUCE, JOHNSON ALEXANDER, LEWIS JULIAN, RAFF MARTIN, ROBERTS KEITH and WALTER PETER, 2008. *Molecular Biology of the cell*, 5th edition edn. 270 Madison Avenue, New York 10016, USA and 2 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

BANDYOPADHYAY AMIT and BOSE SUSMITA, eds, 2013. *Characterization of Biomaterials*. Elsevier Science.

BRAND, Counting Chambers [Homepage of Clinical Laboratory Pub], [Online]. Available: [www.brand.de](http://www.brand.de) [May 9, 2017].

BRINKER, C.J. and SCHERER, G.W., 1990. *Sol Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. San Diego, USA: Academic Press, Inc.

CHAMPION JULIE, A. and MITRAGOTRI SAMIR, 2006. Role of Target Geometry in Phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(13), pp. 4930-4934.

DAHLGREN, C. and KARLSSON, A., 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, **232**(1), pp. 3-14.

DELEO, F.R. and QUINN, M.T., 1996. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, **60**(6), pp. 677-691.

DELSITECH OY, Mar 27, 2017-last update, Silica - The Natural Solution for Drug Delivery. Available: [http://www.delsitech.com/eng/technology/silica\\_drug\\_delivery\\_matrix/](http://www.delsitech.com/eng/technology/silica_drug_delivery_matrix/) [Mar 27, 2017].

FAURSCHOU MIKKEL and BORREGAARD NIELS, 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, **5**(14), pp. 1317-1327.

HEDMAN KLAUS, HEIKKINEN TERHO, HUOVINEN PENTTI, JÄRVINEN ASKO, MERI SEPPO and VAARA MARTTI, 2011. *Immunologia - Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos edn. Kustannus Oy Duodecim.

HERVONEN HEIKKI, 2012. *Veri ja veren solut*. Biolääketieteen laitos. Luentomateriaali.

JOKINEN MIKA, JALONEN HARRY, FORSBACK ARI-PEKKA and KOSKINEN MIKA, 2013. *Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof*. Patent Number: EP2118006 B9.

JOKINEN MIKA, KOSKINEN MIKA and JALONEN HARRY, 2010. *Method for storing silica-based material, package produced with the method and use of package for packaging of silica-based products. Patent Number: US20100136657 A1.*

JOKINEN, M., KOSKINEN, M. and AREVA, S., 2008. Rationale of Using Conventional Sol-Gel Derived SiO<sub>2</sub> for Delivery of Biologically Active Agents. *Key Engineering Materials*, **377**, pp. 195-210.

JOSE SAN, 2000. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. BD Biosciences, 2350 Qume Drive.

KUSAKA, T., NAKAYAMA MASAFUMI, NAKAMURA KYOHEI, ISHIMIYA MAI, FURUSAWA EMI and OGASAWARA KOUETSU, 2014. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PloS one*, **9**(3), pp. e92634.

LEE, W.L., HARRISON, R.E. and GRINSTEIN, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, **5**(14), pp. 1299-1306.

LEINO, L., PELTONEN, P. and LILIUS, E., 1991. The role of Fc-gamma and C3 receptors in opsonized and non-opsonized bacteria induced chemiluminescence of human neutrophils, pp. 1-4.

LILIUS, E.E. and NUUTILA, J.T.J., 2006. Particle-induced myeloperoxidase release in serially diluted whole blood quantifies the number and the phagocytic activity of blood neutrophils and opsonization capacity of plasma. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, **21**(3), pp. 148-158.

MAYER-SCHOLL, A., AVERHOFF, P. and ZYCHLINSKY, A., 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Current opinion in microbiology*, **7**(1), pp. 62-66.

NUUTILA, J. and LILIUS, E., 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry Part A*, **65A**(2), pp. 93-102.

TIWARI ASHUTOSH, RAMALINGAM MURUGAN, KOBAYASHI HISATOSHI and TURNER ANTHONY, P.F., 2012. *Biomedical Materials and Diagnostic Devices (1)*. Somerset, US: Wiley-Scrivener.

TÖRMÄLÄ, P., AHO, A., ANDERSON, Ö, HEIKKILÄ, J., KERÄNEN, J., KONTTINEN, Y., LAPPALAINEN, R., LEPOJÄRVI, M., NEVALAINEN, J., SANTAVIRTA, S., TARVAINEN, T., VALLITTU, P., VILJANEN, V., WARIS, E. and WARIS, V., 2003. *Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin, Osa 1*. 00301 Helsinki: Lääkelaitos Terveydenhuollon laitteet ja tarvikkeet –osasto PI 55.

TURKU CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY, Cell Imaging / instrumentation / flow cytometers. Available: <http://www.btk.fi/cell-imaging/instrumentation/flow-cytometers/> [Apr 2, 2017].

VIITALA REETA, JOKINEN MIKA and ROSENHOLM, J.B., 2007. Mechanistic studies on release of large and small molecules from biodegradable SiO<sub>2</sub>. *International journal of pharmaceutics*, **336**(2), pp. 382-390.

WEAVER, J.L., 2000. Introduction to Flow Cytometry. *Methods*, **21**(3), pp. 199-201.

## Liuosten valmistusohjeet

### 6 % dekstraani-liuos

6 % dekstraani-liuos (w/V) valmistettiin liuottamalla 0,9 g:a dekstraania (Dextran from *Leuconostoc* spp, Sigma Aldrich), 15 ml:n 0,9 %:sta suolaliuosta (NaCl). Liuos steriloidiin ruiskusuodattimella (Whatman FP 30/0, 2 CA-S, 0,2 µm). Ruiskuna käytettiin 20 ml:n (Terumo®) steriiliä ruiskua. Liuosta säilytettiin jääkaapissa + 4 °C:ssa.

### gHBSS- ja gHBSS-CMF-puskurit

Tuoreet 0,1 % (w/V) gelatiinia sisältävät HBSS- (Sigma-Aldrich, lot RNBD9512) ja HBSS-CMF-puskurit (Sigma-Aldrich, lot RNBD8566) valmistettiin lisäämällä gelatiinia puskuriin. Gelatiini liuotettiin puskuriin lämpimässä vesihauteessa, ja tämän jälkeen puskuri jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Puskureita säilytettiin huoneenlämmössä ja ne käytettiin saman päivän aikana.

### 10 Mm Luminoli

10 mM:n luminoli-liuos valmistettiin liuottamalla luminolia (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione, Sigma) 0,2 M:n glysiini-NaOH-puskuriin. Glysiini liuotettiin milli-Q-veteen ja liuoksen pH säädettiin NaOH:n avulla yhdeksään. Valonarkuutensa vuoksi luminoli-liuos jaettiin ruskeisiin Eppendorf-putkiin ja niitä säilytettiin pakastimessa - 20 °C:ssa.

### Zymosaani (20 mg/ml)

Zymosaani-liuos (20 mg/ml) valmistettiin liuottamalla zymosaanipartikkeleita (zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*) gHBSS-CMF-puskuriin kiehuvaan vesihauteeseen, 20 minuutin ajan. Homogeenisemmän lopputuloksen saamiseksi, liuosta sonikoitiin noin 10 minuutin ajan. Lopuksi zymosaani pestiin (sentrifugoitiin) gHBSS-CMF-puskurilla kahteen kertaan (400 x g / 10 min). Zymosaani jaettiin Eppendorf-putkiin ja niitä säilytettiin pakastimessa - 20 °C:ssa.