

Lantanideihin perustuvat aikaerotteiset biosensorit ja biokuvantaminen

Jenni Ali-Penttilä

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

29.4.2024

Turku

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

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Jenni Ali-Penttilä

Otsikko: Lantanideihin perustuvat aikaerotteiset biosensorit ja biokuvantaminen

Ohjaaja: Mika Lastusaari

Sivumäärä: 15 sivua

Päivämäärä: 29.4.2024

Lantanideilla on useita hyödyllisiä luminesenssiominaisuuksia, jotka ovat peräisin niille tyypillisestä elektronirakenteesta ja porrasmaisista energiatasoista. Lantanideilla seostettujen nanopartikkelien tärkein ominaisuus on erityisen pitkäkestoinen ja kirkas luminesenssi, joka voi kestää jopa useiden millisekuntien ajan. Perinteisillä fluoresoivilla materiaaleilla luminesenssin elinikä on vain joitakin nanosekunteja. Lantanidien intensiivisen luminesenssin kapeat ja terävät emissioviivat tekevät niiden luminesenssispektristä helposti tunnistettavan.

Viime vuosina erityisesti upkonvertoivat nanopartikkelit (UCNP) ovat herättäneet mielenkiintoa biosensoreiden ja biokuvantamisen parissa. Upkonversiolla tarkoitetaan luminesenssia, jossa emittoidaan korkeaenergisiiä fotoneja absorboimalla matalaenergisiiä fotoneja. Sitä havaitaan lantanideilla, aktinideilla ja siirtymämetalli-ioneilla. Pitkäikäisen luminesenssin lisäksi UCNP:eilla on muitakin suotuisia ominaisuuksia, kuten suuri anti-Stokesin siirtymä, vähäinen fotovalkaisu ja myrkyllisyys sekä hyvä stabiilisuus.

UCNP:ien lisäksi on kehitetty myös muita kiinnostavia lantanidiperusteisia nanopartikkeleita biosovelluksiin. Näistä NIR-II-aallonpituusalueelle soveltuvat downkonvertoivat nanopartikkelit (DCNP) tarjoavat mahdollisuuksia erityisesti syväkudoskuvantamiseen. Pitkäkestoiseen biojäljitykseen ja -kuvantamiseen tarkoitettujen pysyvän luminesenssin nanopartikkelien luminesenssi voi kestää jopa useita päiviä. Lantanideilla seostettujen nanopartikkelien muokkausmahdollisuudet ovat lähes rajattomat, mikä mahdollistaa niiden käytön laajasti erilaisissa biosensori- ja biokuvantamismenetelmissä.

Avainsanat: Nanopartikkeli, luminesenssi, upkonversio, downkonversio

Sisällysluettelo

<i>Lyhenteet</i>	3
<i>1 Johdanto</i>	4
<i>2 Aikaerotteinen luminesenssi</i>	5
<i>3 Nanopartikkelien seostaminen lantanideilla</i>	5
<i>4 Upkonvertoivat nanopartikkelit</i>	6
4.1 Rakenne ja toiminta	6
4.2 Biologinen vaste	8
4.3 Luminesenssin eliniän säätely	9
<i>5 Muita lantanideilla seostettuja nanopartikkeleita</i>	10
5.1 Downkonvertoivat nanopartikkelit.....	11
5.2 Pysyvän luminesenssin nanopartikkelit	11
<i>6 Lantanideilla seostetut nanopartikkelit biosensoreissa ja biokuvantamisessa</i>	12
6.1 Biosensorit	12
6.2 Biokuvantaminen.....	13
<i>8 Yhteenveto</i>	16
<i>Lähteet</i>	17

Lyhenteet

DCNP	Engl. <i>Downconverting nanoparticle</i> , downkonvertoiva nanopartikkeli
ESA	Engl. <i>Excited-state absorption</i> , virittyneen tilan absorptio
ETU	Engl. <i>Energy transfer upconversion</i> , energiansiirtoupkonversio
HIV	Engl. <i>Human immunodeficiency virus</i> , HI-virus
HPV	Engl. <i>Human papilloma virus</i> , papilloomavirus
NIR	Engl. <i>Near-infrared</i> , lähi-infrapuna
PLNP	Engl. <i>Persistent luminescence nanoparticle</i> , pysyvän luminesenssin nanopartikkeli
UCNP	Engl. <i>Upconverting nanoparticle</i> , upkonvertoiva nanopartikkeli

1 Johdanto

Erilaisten fluoresoivien materiaalien kehittäminen on mahdollistanut entistä parempien biosensori- ja biokuvantamismenetelmien käyttöönoton. Vaikka nykypäivänä on pystytty havainnoimaan jo useimpia biologisia prosesseja, niiden tutkimiseen liittyy vielä haasteita. Biologisen kudoksen sisältämät fluoroforit absorboivat useimpien fluoresoivien materiaalien viritys- ja emissioaallonpituusalueilla, mikä aiheuttaa häiritsevää autofluoresenssia. Tämä hankaloittaa esimerkiksi makromittakaavan kuvantamista. Jotta mutkikkaita biologisia tapahtumia voidaan ymmärtää, molekyylien rakenteen lisäksi olisi erityisen tärkeää tutkia niiden välisiä vuorovaikutuksia ja kemiallisia reaktioita. Nykyisillä menetelmillä näyte täytyy kuitenkin lähes aina fiksoida eli kiinnittää, mikä hankaloittaa elävän kudoksen tutkimista.¹

Nanopartikkeliteknologia on ollut mullistava keksintö, jonka avulla terveydenhuollon tutkimus on ottanut suuria harppauksia eteenpäin. Nanopartikkeleiksi kutsutaan hiukkasia, joiden halkaisija on 1–100 nm.² Lantanideilla seostettujen nanopartikkelien tärkein ominaisuus biosensori- ja biokuvantamismenetelmiä ajatellen on niiden erityisen pitkäkestoinen ja kirkas luminesenssi, joka voi kestää jopa useiden millisekuntien ajan. Lisäksi luminesenssin kestoa voidaan helposti muokata sopivaksi erilaisia sovelluksia varten. Yhdistämällä lantanidien ainutlaatuiset luminesenssiominaisuudet aikaerotteiseen mittaustapaan, voidaan poissulkea lähes kokonaan häiritsevä autofluoresenssi, mikä mahdollistaa pääsyn syvemmälle kudokseen. Lupaavia tuloksia on saatu sekä biologisen ympäristön ulkopuolella (*in vitro*) että biologisessa ympäristössä (*in vivo*) suoritetuista kokeista.³

Lantanideilla seostetuista nanopartikkeleista erityisesti upkonvertoivat ja downkonvertoivat nanopartikkelit ovat olleet viime vuosina kiivaan tutkimuksen kohteena. Perinteisiin fluoresoiviin materiaaleihin verrattuna niille ominaisia, edullisia piirteitä luminesenssin pitkän eliniän lisäksi ovat suuret Stokesin siirtymät, kapeat emissioviivat ja vähäinen valon sironta. Upkonvertoivia ja downkonvertoivia nanopartikkeleita on sovellettu biokuvantamisessa ja lukuisissa bioapplikaatioissa kuten pH:n, lämpötilan ja happipitoisuuden mittaamisessa sekä DNA:n tunnistamisessa.³ Mainitsemisen arvoisia ovat myös pysyvän luminesenssin nanopartikkelit, joita voidaan hyödyntää pitkäaikaista seuranta vaativissa sovelluksissa.⁴

2 Aikaerotteinen luminesenssi

Aikaerotteisessa luminesenssissa (engl. *Time-resolved luminescence*) mitataan pitkäikäistä luminesenssia, jonka kesto on noin mikrosekunnista millisekuntiin. Mittaustekniikassa pulssittava virityslähde virittää pitkäikäisen koettimen samalla, kun tietylle taajuudelle säädetty suodatin estää virityslähteen ja lyhytikäisen fluoresenssin päätyksen detektorille. Taustasignaalin hävitessä suodatin aukeaa päästäen läpi pitkäikäisen luminesenssin. Mittaus tapahtuu, kun taustan lyhytikäinen luminesenssi on hävinnyt ja jäljellä on enää pitkäikäinen koettimen luminesenssi. Mittaustavalla saadaan parannettua signaali-kohinasuhdetta, vähennettyä valon sironnasta johtuvaa häiriötä sekä vaimennettua biologisen näytteen autofluoresenssia, jonka aiheuttaa kudoksissa luontaisesti esiintyvät fluoroforit. Lisäksi pulssittavasta laserista aiheutuu kudoksille vähemmän haitallista lämpövaikutusta kuin jatkuvasta virityslähteestä³. Aikaerotteinen tekniikka vaatii kuitenkin useamman mittauskerran tarkkuuden parantamiseksi, koska pitkäikäisen luminesenssin intensiteetti vähenee ajan kuluessa.⁴

3 Nanopartikkelien seostaminen lantanideilla

Nanopartikkeleihin seostettuina lantanidit aikaansaavat useita hyödyllisiä luminesenssiominaisuuksia, jotka ovat peräisin lantanideille tyypillisestä $[\text{Xe}]4f^N$ -elektronirakenteesta ja porrasmaisista energiatasoista. Lantanidit esiintyvät nanopartikkeleissa yleisimmin kolmenarvoisina, Ln^{3+} , ja niillä on kolme mahdollista elektroninsiirtotapaa. Näistä kaksi vähemmän yleistä ovat $4f-5d$ - ja varauksensiirtosiirtymä. Yleisin siirtymä on Laporten valintasäännöllä kielletty $4f-4f$ -siirtymä ja se saakin aikaan lantanidien erityisen pitkäikäisen luminesenssin, joka voi kestää jopa useiden millisekuntien ajan.⁴ Esimerkiksi yleisesti käytössä olevien Tb^{3+} - ja Eu^{3+} -kompleksien luminesenssin elinikä on 0,5–2,5 ms¹. Lantanidien luminesenssi on myös hyvin intensiivistä, koska virittyneet $4f$ -tilat ovat suojassa täyttyneiden $5s^2$ - ja $5p^6$ -kuorien alla. Emissioviivat ovat tyypillisesti kapeita ja karakteristisia juuri tietyille lantanidille. Esimerkiksi Eu^{3+} :lle ominaiset terävät emissioviivat aallonpituuksilla 590, 610 ja 720 nm tekevät sen luminesenssispektristä helposti tunnistettavan.¹

4 Upkonvertoivat nanopartikkelit

Viime vuosina erityisesti upkonvertoivat nanopartikkelit (engl. *Upconverting nanoparticle*, *UCNP*) ovat herättäneet mielenkiintoa biosensoreiden ja biokuvantamisen tutkimuksessa ainutlaatuisten luminesenssiominaisuuksiensa vuoksi. Upkonversiolla tarkoitetaan luminesenssia, jossa emittoidaan korkeaaenergiaa fotoneja absorboimalla matalaenergiaa fotoneja. Energiaeroa absorptio- ja emissioaallonpituuden välillä kutsutaan anti-Stokesin tai Stokesin siirtymäksi riippuen siitä, onko absorptioenergia pienempi vai suurempi kuin emissioenergia. Upkonversioon perustuvaa luminesenssia havaitaan lantanideilla, aktinideilla ja siirtymämetalli-ioneilla.⁵

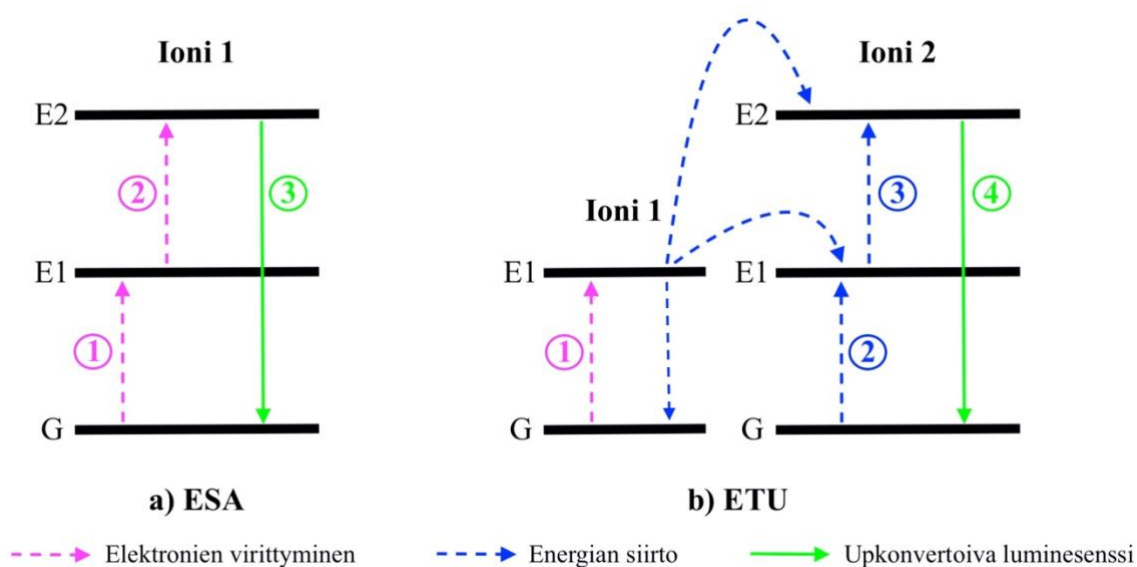
4.1 Rakenne ja toiminta

Lantanideilla seostetut UCNP:t koostuvat epäorgaanisesta isäntähilasta ja seosioneista. Isäntähilan valinta vaikuttaa nanopartikkelien toimintaan. Tärkein ominaisuus on hilan läpinäkyvyys ja stabiilisuus seostettujen ionien absorptio- ja emissioaallonpituusalueilla, jotta hilasta ei aiheudu häiritsevää signaalia luminesenssin mittaukseen. Lisäksi hilan rakenne määrää kidekentän ja seosionien mahdolliset konsentraatiot nanopartikkelissa, mikä vaikuttaa partikkelin luminesenssiominaisuuksiin. Ioneja saadaan seostettua rakenteeseen helpommin, jos korvattavan ionin ja seosionin halkaisija ovat keskenään samaa kokoluokkaa. Edellä mainittujen seikkojen vuoksi eniten käytettyjä hila-aineita ovat fluoridit ja oksidit, kuten NaGdF₄, CaF₂ ja CeO₂, mutta myös oksisulfaatti-, kloridi-, bromidi-, fosfaatti-, jodidi- ja vanadaattipohjaisia partikkeleita on kehitetty.⁶

Upkonvertoiva luminesenssi saadaan aikaiseksi jo yhdenlaisilla seosioneilla, mutta sen intensiteetti jää sovelluksia ajatellen usein liian heikoksi. Tehokkaampi emissiosignaali saavutetaan seostamalla vähintään kahta erilaista ionia. Useamman ionin toimintaan perustuvassa upkonversiossa on herkistinioneja, joiden tarkoituksena on kasvattaa absorptio- tehokkuutta, ja aktivaattori-ioneja, jotka toimivat varsinaisena luminesenssikeskuksena. Ionit seostetaan isäntähilaan yleensä varsin pienissä pitoisuuksissa. Herkistinionien konsentraatio nanopartikkeleissa on keskimäärin noin 20 mooli-% ja aktivaattori-ionien noin 2 mooli-%.⁶

Lantanideilla on useita eri upkonversiomekanismeja, joista kaksi yleisintä ja yksinkertaisinta ovat virittyneen tilan absorptio (engl. *Excited-state absorption*, *ESA*) sekä

energiansiirtoupkonversio (engl. *Energy transfer upconversion, ETU*)¹. ESA:ssa perustilassa G oleva elektroni virittyy ensin energiatilalle E1, minkä jälkeen toisen elektronin virittyminen aiheuttaa sen hyppäämisen energiatilalle E2. ETU:ssa herkistinioni virittyy samaan tapaan kuin ESA:ssa, mutta luovuttaa tämän jälkeen energiansa aktivaattori-ionille virittäen sen energiatilalle E2. Upkonvertoivassa luminesenssissa virittymiseen vaadittu energia perustilalta tilalle E1 on siis pienempi kuin luminesenssina purkautuva energia tilalta E2 takaisin perustilalle.⁵ Kuvassa 1 on esitetty sekä virittyneen tilan absorptioon että energiansiirtoupkonversion vaiheet.



Kuva 1. a) Virittyneen tilan absorptioon eli ESA:n mekanismi. **b)** Energiansiirtoupkonversion eli ETU:n mekanismi. Kuva mukailtu artikkelista⁶.

UCNP:t ovat monessa suhteessa yliverkaisia perinteisiin fluoresoiviin materiaaleihin, kuten orgaanisiin väriaineisiin, fluoresoiviin proteiineihin, metallikomplekseihin ja kvanttipisteisiin verrattuna. Fluoresoivien materiaalien luminesenssin elinikä on tyypillisesti vain muutamia nanosekunteja, kun taas UCNP:ien luminesenssi voi kestää jopa useiden millisekuntien ajan⁴. Perinteiset fluoresoivat materiaalit virittyvät usein ultravioletisäteilystä tai näkyvästä valosta. Korkeaenerginen säteily aiheuttaa biologisten näytteiden sisältämien fluoroforien autofluoresenssia, DNA-vaurioita ja solukuolemia, mikä huonontaa signaali-kohinasuhdetta ja herkkyyttä. UCNP:t pystyvät absorboimaan matalaenergistä lähi-infrapunasäteilyä muuttamaan sen vasta emissiovaiheessa korkeaenergisemmäksi näkyväksi valoksi. Näin mahdollisen kudonvaurion ja soluista aiheutuvan häiritsevän fluoresenssin määrä vähenee. Lähi-infrapunasäteilyn käyttö virityslähteenä mahdollistaa myös pääsyn syvemmälle kudokseen.⁵

Perinteisillä fluoresoivilla materiaaleilla on muitakin heikkouksia biosovelluksissa. Ne eivät sovellu pitkäaikaisiin kuvantamis- tai seurantajaksoihin, sillä niiden fluoresoiva signaali heikkenee voimakkaasti mittauskertojen ja ajan kuluessa. Kyseistä ilmiötä kutsutaan fotohaalenemiseksi. Monet fluoresoivat materiaalit, kuten kvanttipisteet, sisältävät hyvin myrkyllisiä komponentteja eivätkä siten sovellu kliiniseen käyttöön. UCNP:ien pitkäikäinen luminesenssi, suuri anti-Stokesin siirtymä, vähäinen fotohaaleneminen, alhainen myrkyllisyys ja hyvä stabiilisuus tekevät niistä potentiaalisen vaihtoehdon käytettäväksi biokuvantamisessa ja biosensoreissa.⁵

4.2 Biologinen vaste

Useat UCNP:ien fysikokemialliset piirteet, kuten koko, muoto, pintarakenne ja funktionaaliset ryhmät vaikuttavat niiden biologiseen vasteeseen. Nanopartikkelien koko määrää mekanismin, jolla partikkeli kulkeutuu soluun. Alle 50 nm:n kokoiset nanopartikkelit vuorovaikuttavat kaikkien kudostyyppien kanssa kulkeutuen helposti soluihin ja soluväliaineeseen. Yli 1 µm:n kokoiset partikkelit eivät pääse kulkeutumaan solukalvon läpi ollenkaan, mutta voivat vuorovaikuttaa erilaisten proteiinien kanssa. Upkonvertoivia nanopartikkeleita on kehitetty useita eri kokoisia alle 10 nm:stä jopa 100 nm:iin.⁵ Biosovelluksiin kehitettyjen nanopartikkelien tulisi olla kooltaan alle 10 nm, jotta munuaiset pystyvät poistamaan ne elimistöstä⁶. Liian suuret partikkelit voivat alkaa kertyä tiettyihin elimiin, kuten maksaan. Koon lisäksi nanopartikkelien muoto vaikuttaa niiden kulkeutumiseen ja käyttäytymiseen kehossa. Partikkelit voivat olla muodoltaan kaikkea putken, säikeen, pallon tai tason väliltä. Näistä pallomaisen muodon on todettu olevan kaikista bioyhteesopivin, mistä johtuen useimmat UCNP:t ovat muodoltaan heksagonaalisia.⁵

UCNP:ien pintarakennetta muokkaamalla voidaan vähentää ympäristön ligandeista, liuottimesta tai konsentraatiosta aiheutuvaa luminesenssin vaimenemista. Rakennetta voidaan muokata lisäämällä siihen epäorgaaninen pintakerros tai orgaanisia ligandeja. Pintarakenne ei vaikuta ainoastaan luminesenssiin, vaan määrää myös partikkelin mahdolliset soveltamiskohteet.⁶ Bioapplikaatioita ajatellen UCNP:ien haasteena on niiden farmakokinetiikkaan vaikuttava hydrofobisuus. Nanopartikkelien hydrofobinen pintarakenne absorboi plasman proteiineja, mikä vähentää partikkelien kiertoaikaa elimistössä. Hydrofiilisyyttä voidaan lisätä muokkaamalla pintarakennetta, mutta muutokset aiheuttavat

usein fluoresenssin vaimenemista ja vähentävät upkonversion tehokkuutta.⁵ Esimerkiksi piidioksidi on suosittu päällystysmateriaali, jota voidaan hyödyntää useissa eri käyttökohteissa. Sillä voidaan päällystää sekä hydrofobisia että hydrofiilisiä nanopartikkeleita.⁶

Pintarakenteella on vaikutusta myös muihin partikkelien ominaisuuksiin, kuten myrkyllisyyteen, stabiilisuuteen sekä vuorovaikutukseen solujen kanssa. Positiivisen pintavarauksen on havaittu lisäävän nanopartikkelien myrkyllisyyttä, sillä se aiheuttaa sähköstaattisia vuorovaikutuksia yleensä negatiivisesti varautuneiden solujen kanssa. Erilaisilla funktionaalisilla ryhmillä voidaan kohdistaa nanopartikkelien kulkeutuminen tiettyihin kudoksiin tai soluihin. Polyetyleeniglykoli on esimerkki eräästä laajalti käytetystä polymeeristä, joka auttaa epäspesifisten vuorovaikutusten välttämässä ja nanopartikkelien kiinnittymisessä juuri tietyn solutyypin reseptoreihin.⁵

4.3 Luminesenssin eliniän säätely

Luminesenssin eliniän pidentäminen auttaa häiritsevän autofluoresenssin ja valon sironnan vähentämisessä aikaerotteisessa mittauksessa. Valmistamalla erivärisiä koettimia muokkaamalla luminesenssin elinikää, voidaan tutkia useita kohteita samanaikaisesti. Tämä on usein haastavaa spektrien osuessa päällekkäin, mutta välttämätöntä monimutkaisten biologisten prosessien ymmärtämisessä.⁴

Luminesenssin elinikään voidaan vaikuttaa muuttamalla nanopartikkelin herkistin- tai aktivaattori-ionien konsentraatioita. Aktivaattori-ionien tapauksessa konsentraation nostamisella on havaittu olevan negatiivisia vaikutuksia, kuten aggregoitumista ja relaxoitumista virittyneestä tilasta ilman säteilyä. Lupaavampia tuloksia on saatu muokkaamalla herkistinionien pitoisuutta. Herkistinionien konsentraation lisäämisen on huomattu olevan yhteydessä luminesenssin intensiteetin kasvuun ja konsentraation vähenemisen sen eliniän pitenemiseen. Konsentraation vähentyessä herkistin- ja aktivaattori-ionien keskimääräinen välimatka kasvaa, jolloin luminesenssin elinikä pitenee energian takaisinsiirtoprosessin muuttuessa vaikeammaksi.³

UCNP:ien synteesimenetelmän valinta vaikuttaa partikkelien ominaisuuksiin ja siten myös luminesenssiin. Nanopartikkelien lämpökäsittely on havaittu pidentävän luminesenssin elinikää, koska se vähentää partikkelien pinnan ei-säteilevää luminesenssia. Käsittelyssä myös partikkelikoko kasvaa, minkä on huomattu vähentävän ympäristön aiheuttamaa luminesenssin

vaimenemista. Ympäristön lämpötilan kasvattaminen näyttäisi kuitenkin lyhentävän luminesenssin elinikää, sillä se lisää ei-säteilevän luminesenssin osuutta säteilyn kokonaisuudesta.³

Ydin-kuori-rakenteen on havaittu edistävän upkonversiomekanismia, koska se lisää elektronien todennäköisyyttä virittyä korkeammille energiatasoille. Luminesenssin elinikään voidaan vaikuttaa muokkaamalla kuoren paksuutta ja koostumusta. Kuorirakenne estää virittyneiden elektronien energian siirtymistä ympäristössä oleviin ligandeihin ja liuotinmolekyyleihin. Mitä paksumpi kuori on, sitä vähemmän ympäristön vaimentava efekti pääsee vaikuttamaan luminesenssiin kasvattaen sen elinikää. Yleisesti nanopartikkeleissa käytettyjä kuorimateriaaleja ovat esimerkiksi optisesti inertti NaYF_4 sekä biohajoava CaF_2 .³

Ydin-kuori-rakenteeseen on mahdollista lisätä optisesti aktiivinen välikuori, jolloin nanopartikkelilla voi olla samanaikaisesti useampia viritys- ja emissioaallonpituuksia. Rakenteessa välikuori koostuu usein lyhytikäisistä herkistinioneista, jotka siirtävät energiansa pitkäikäisille ytimen aktivaattori-ioneille. Esimerkki tällaisesta rakenteesta on Liu *et al.* kehittämä nanopartikkeli, jossa matriisimateriaalina toimivan NaGdF_4 :n ytimeen seostettiin Mn^{2+} -ioneita ja välikuoreen $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ -ioneita uloimman passiivisen kuoren koostuessa puhtaasta NaGdF_4 :sta⁷. $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}$ -välikuoren virittyessä absorboitu energia siirtyi $\text{Yb}^{3+} \rightarrow \text{Tm}^{3+} \rightarrow \text{Gd}^{3+}$ -reittiä pitkin Mn^{2+} -ionille, jolla havaittiin 550 nm:ssä poikkeuksellisen pitkä 39 ms kestävä luminesenssi. Tm^{3+} -ionilla nähtiin huomattavasti lyhyempi 0,6 ms:n luminesenssi aallonpituudella 475 nm.⁴

5 Muita lantanideilla seostettuja nanopartikkeleita

UCNP:ien laajoista soveltamismahdollisuuksista huolimatta, ne eivät sovi kaikkien biosensori- ja biokuvantamismenetelmien asettamiin vaatimuksiin. Tämän vuoksi UCNP:ien lisäksi on kehitetty myös muita kiinnostavia lantanidiperusteisia sensori- ja kuvantamismateriaaleja. Näistä NIR-II-aallonpituusalueelle soveltuvat downkonvertoivat nanopartikkelit tarjoavat mahdollisuuksia erityisesti syväkuduskuvantamiseen ja pysyvän luminesenssin nanopartikkelit pitkäkestoisiin sovelluksiin.⁴

5.1 Downkonvertoivat nanopartikkelit

Downkonvertoivat nanopartikkelit (engl. *Downconverting nanoparticle*) ovat UCNP:ien tapaan lantanideilla seostettuja partikkeleita. Niillä esiintyy samankaltaisia hyödyllisiä luminesenssiominaisuuksia kuin UCNP:eilla, kuten pitkäikäistä luminesenssia, useita kapeita emissioviivoja ja suuria Stokesin siirtymiä. DCNP:t absorboivat kuitenkin korkeaenergisiä fotoneja ja emittoivat matalaenergisiä fotoneja, joten niillä ei esiinny upkonversiomekanismia. DCNP:ien käyttöä rajoittaa niiden mahdollinen myrkyllisyys, mikä tekee UCNP:eistä paremman vaihtoehdon biosovelluksiin⁵. Ne ovat kuitenkin erityisen käyttökelpoisia sovelluksissa, joissa optisen ikkunan halutaan sijoittuvan NIR-II aallonpituusalueelle eli 1000–1700 nm:n välille. Detektointia NIR-II-alueella hyödynnetään syväkuduskuvantamisessa, koska se vähentää valon sirontaa. DCNP:ien luminesenssin elinikään voidaan vaikuttaa seostettujen lantanidien konsentraation muutoksilla, ydin-kuori-rakenteella ja seostamalla partikkeleihin lantanidien kidekenttään vaikuttavia heterovalenssi-ioneja.⁴

5.2 Pysyvän luminesenssin nanopartikkelit

Pysyvän luminesenssin nanopartikkelien (engl. *Persistent luminescence nanoparticle, PLNP*) luminesenssin kesto vaihtelee sekunneista jopa kuukausiin. Luminesenssin poikkeuksellisen pitkäkestoinen elinikä johtuu PLNP:eiden kyvystä siepata virittyneet elektronit ja varastoida ne kidehilan vakansseihin eli loukkuihin, joista energia luovutetaan hitaasti aktivaattori-ioneille. Luminesenssin elinikää ja intensiteettiä voidaan muokata vakanssien lukumäärällä ja syvyydellä. Vakanssien lukumäärään voidaan vaikuttaa lähtöaineiden stoikiometrian muutoksilla ja seostamalla heterovalenssi-ioneja korvaussija-atomeiksi. Lisäksi kalsinoinnilla eli kuumentamisella voidaan tuottaa kidehilaan happivakansseja.⁴ PLNP:t soveltuvat erinomaisesti pitkäkestoiseen biojäljitykseen ja -kuvantamiseen, jota voidaan hyödyntää erityisesti molekyylien toiminnan ja käyttäytymisen tutkimiseen biologisissa systeemeissä. PLNP:t eivät välttämättä vaadi UCNP:ien ja DCNP:ien tapaan solunsisäistä viritystä, mikä vähentää niiden myrkyllisyyttä ja virityksen vaikutusta mittaussignaaliin. Määritykset eivät tarvitse monimutkaista laitteistoa, vaan ne voidaan suorittaa esimerkiksi spektrofotometrillä, mikrolevylukijalla tai konfokaalimikroskoopilla.⁴

6 Lantanideilla seostetut nanopartikkelit biosensoreissa ja biokuvantamisessa

Fluoresenssiin perustuvat menetelmät soveltuvat hyvin *in vivo* -tutkimuksiin, koska ne eivät juuri vaikuta tutkittavaan kohteeseen. Moniulotteinen biologinen ympäristö kuitenkin vaikeuttaa tarkkaa kvantitatiivista analyysiä erilaisten häiriötekijöiden vuoksi. Useimpien menetelmien ongelmana on biologisen näytteen autofluoresenssi ja valon sironnasta aiheutuvat häiriöt. Yhdistettäessä aikaerotteiseen määrittelyyn lantanidien pitkäikäinen luminesenssi, voidaan häiritsevä taustasignaali poistaa lähes kokonaan ja parantaa siten sekä biosensori- että biokuvantamismenetelmien tarkkuutta ja laatua entisestään.⁸ Toisin kuin perinteisiin fluoresoiviin materiaaleihin, kudossyvyys, virityslähteen intensiteetti tai liuoksen konsentraatio eivät vaikuta lantanideilla seostettuihin nanopartikkeleihin. Tällöin tulos saadaan vain analyytin perusteella ilman, että mittausolosuhteet vaikuttavat siihen.³

6.1 Biosensorit

UCNP:t toimivat hyvin vesipitoisissa ympäristöissä ja jopa elävissä soluissa, mikä tekee niistä potentiaalisen vaihtoehdon solussa tapahtuvien muutosten tarkkailuun⁶. UCNP:eihin perustuvissa pH-sensoreissa partikkelin pintaan kiinnitetään jokin pH:n muutoksille herkkä molekyyli. Eräs jo yleisesti käytössä oleva sensortyyppi on fluoreskeiini liitettyä UCNP:n pintaan, jolloin pH voidaan mitata fluoreskeiinin emission intensiteetistä.³ Fluoreskeiinin toimintaan perustuvat sensorit ovat pienikokoisia, eivät tarvitse referenssielektrodia, havaitsevat muutokset ilman kontaktia sekä toimivat myös voimakkaassa sähkömagneettisessa kentässä⁶.

Li *et al.* kehittivät vastaavan pH:n mittaukseen soveltuvan komposiittirakenteen, jossa upkonvertoivien NaYF₄:1%Tm@NaLuF₄-nanopartikkelien pintaan kiinnitettiin Rh760-väriainetta⁸. Kokeessa viritysaallonpituutena oli 690 nm ja emissiosignaali saatiin 800 nm:ssä. Nanopartikkelien luminesenssi kesti 695 μ s ja väriaineen 1,40 ns. Fluoresenssiin perustuvissa detektiomenetelmissä haasteena on koettimen määrän ja kudostyyppin vaikutus mittaustuloksiin. Tutkimuksessa käytettiin reversiibeileitä, toiminnaltaan tasapainoreaktioon perustuvia koettimia. Tällöin koettimien määrä ei vaikuta mittaukseen ja tulos saadaan vain analyytin pitoisuuden perusteella. Valmistettujen komposiittipartikkelien avulla määritettiin

onnistuneesti kuoppalevyllä pH-arvon vaihtelu 1,51–7,00 välillä. Tuloksesta voitiin päätellä, ettei luminesenssin elinikä riippunut koettimen konsentraatiosta tai käytetystä viritysaallonpituudesta, vaan pH:n muutoksista.⁸

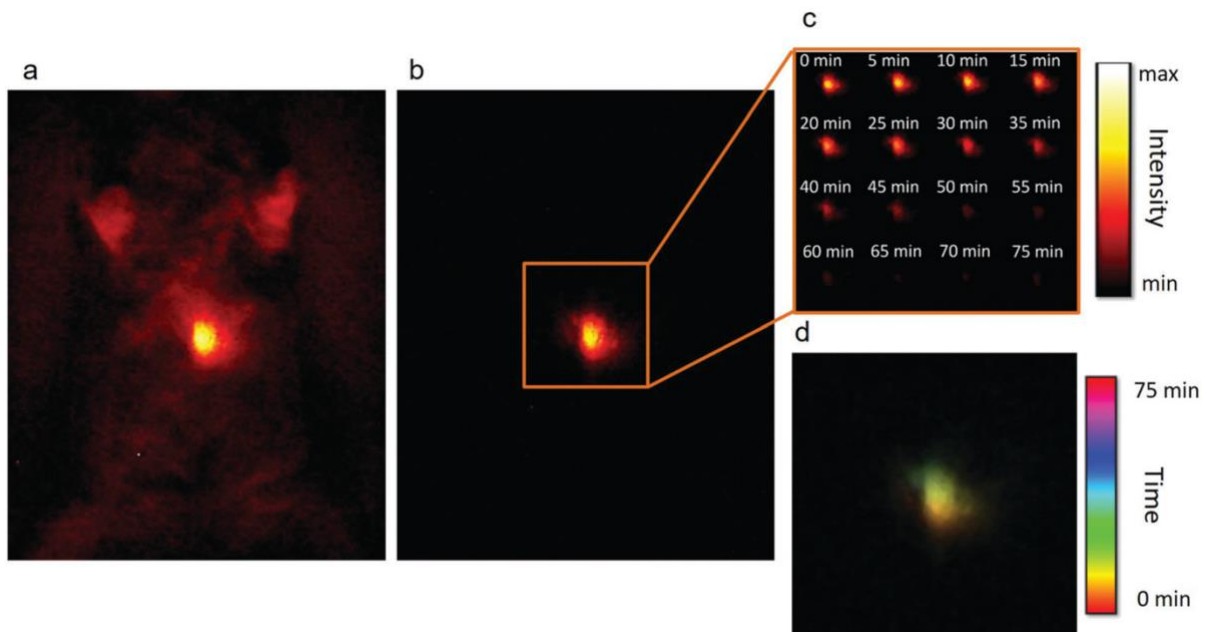
Kuoppalevyllä tehtyjen kokeiden lisäksi kyseisillä nanopartikkeleilla kyettiin mittaamaan myös hiiren maha-suolikanavan pH:n muutoksia *in vivo* -kokeissa. Nanopartikkelit päällystettiin mPEG5000-DSPE-kuorella hydrofiilisyyden ja stabiilisuuden lisäämiseksi, jotta ne kestäisivät maha-suolikanavan vaativat olosuhteet. Menetelmää voitaisiin mahdollisesti hyödyntää lääkekehityksessä, sillä pH:n muutoksien seuranta on usein tärkeässä roolissa esimerkiksi lääkeaineiden vapautumisen tarkkailussa ja annostelunopeuden optimoinnissa. Muokkaamalla nanopartikkelien pintarakennetta tutkittavaa kohdetta voidaan laajentaa pH:n mittauksen lisäksi esimerkiksi lämpötilan tai happipitoisuuden määrittämiseen.⁸

Mahdollisuutta muokata lantanidien luminesenssin elinikää voidaan hyödyntää multipleksauksessa eli useiden signaalien yhdistämisessä. Luminesenssisignaalista tuleva optinen tieto voidaan muuntaa esimerkiksi DNA:n sekvenssiksi, josta Jin *et al.* suorittama tutkimus on loistava esimerkki⁹. Tutkimuksessa tunnistettiin patogeenejä eli taudinaiheuttajia niiden DNA:sta downkonvertoivien nanopartikkelien avulla aikaerotteisella määrittelyllä. Kokeessa havainnoitiin samanaikaisesti HIV:n ja HPV:n sekä Ebola- ja hepatiitti B-virusten yksijuosteista DNA:ta. Polystyreenistä koostuviin nanopartikkeleihin seostettiin herkistimeksi Eu^{3+} -kompleksia ja akseptoriksi kumariinista johdettua väriainetta. Viritetty Eu^{3+} -kompleksi siirtää energiaansa ei-säteilevästi väriaineelle, mikä vähentää kompleksin luminesenssin elinikää. Muuttamalla Eu^{3+} -kompleksin ja väriaineen etäisyyksiä konsentraation muutoksilla, voidaan säätää luminesenssin elinikä vastaamaan eri virusten DNA:ta. Lantanidien pitkäkestoinen luminesenssi ja kyky muokata sen pituutta mahdollistaa suurienkin tietokantojen luomisen muun muassa erilaisia seulontatestejä varten.⁹

6.2 Biokuvantaminen

Perinteisillä fluoresoivilla materiaaleilla on onnistuttu kuvantamaan hyvin pienempiä kohteita kuten yksittäisiä soluja, mutta syvemmälle kudokseen mentäessä erityisesti autofluoresenssi heikentää kuvanlaatua. Lantanidipohjaisten nanopartikkelien luminesenssin pitkä elinikä mahdollistaa ihonalaisen kuvantamisen lähes täysin ilman autofluoresenssin häiritsevää signaalia. Esimerkiksi Liu *et al.* onnistuivat kuvantamaan hiiressä lantanideilla (Gd^{3+} -, Yb^{3+} -

ja Tm^{3+}) seostettuja upkonvertoivia nanokiteitä jopa 2 cm:n kudossyvyudessa 980 nm:n viritys- ja 800 nm:n detektioaallonpituudella¹⁰. Yhdistettäessä lantanidipohjaisten nanopartikkelien pitkäikäinen luminesenssi aikaerotteiseen mittaustapaan saadaan autofluoresenssin määrää vähennettyä entistäkin tehokkaammin. Aikaerotteinen määrittäminen sopii sekä upkonvertoiville että downkonvertoiville nanopartikkeleille. Tan *et al.* valmistivat lantanideilla seostettuja NaGdF_4 - ja NaYF_4 -nanopartikkeleita, jotka kuvannettiin hiirestä kudosta vahingoittamattomalla viritysaallonpituudella (808 nm) ilman autofluoresenssia yhden millisekunnin aikaikkunalla¹¹. NaGdF_4 -nanopartikkelit kuvannettiin reaaliaikaisesti vatsalaukusta sen jälkeen, kun ne annettiin hiirelle suun kautta. Hiiren aivoihin injektoidut NaYF_4 -nanopartikkelit kuvannettiin kallon läpi.¹ Kuvassa 2 on esitetty NaGdF_4 -nanopartikkelien käyttäytyminen hiiren vatsassa heti niiden annostelun jälkeen sekä ajan kuluessa.



Kuva 2. a) Hiiren vatsa heti $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Nd}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ -nanopartikkelien annostelun jälkeen. Kuvassa näkyy selkeästi kudosten autofluoresenssi. **b)** Saman hiiren vatsa, kun nanopartikkelien annostelusta on kulunut 1 μs . Nyt huomataan vain partikkeleista tuleva signaali. **c)** Nanopartikkelien signaalin intensiteettiin perustuva reaaliaikainen seuranta. Intensiteetti pienenee partikkelien siirtyessä kohti pohjukaissuolta, josta ne imeytyvät hiiren suolistoon. **d)** Aikaviive värikoodattu kuva c)-kohdan kuvasta. Huomataan, että nanopartikkelit sijaitsevat aluksi vatsan pohjalla (punertava väri) ja lopuksi ylempänä lähellä pohjukaissuolta (vihertävä väri).¹¹ Kuva on kopioitu avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut Royal Society of Chemistry, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported -lisenssillä (CC BY-NC)¹¹.

Tietokonetomografiaa ja magneettiangiografiaa voidaan käyttää verisuonten kuvantamiseen, mutta metodien haittoina ovat säteilyn käyttö, pitkät kuvantamisajat sekä alhainen spatiaalinen resoluutio eli erotustarkkuus. Fluoresenssiin perustuvat kuvantamismenetelmät ovat nopeita ja

herkkiä, omaavat korkean resoluution, eivätkä tarvitse haitallisia säteilylähteitä. Useimmat menetelmät ovat keskittyneet NIR-I aallonpituusalueelle eli 650-950 nm:n välille. Biologiset kudokset ja elimet aiheuttavat kuitenkin tällä aallonpituusalueella voimakasta sirontaa huonontaan resoluutiota. Viime aikoina on kehitetty koettimia, joita voidaan käyttää kudoksien kanssa vuorovaikuttamattomalla NIR-II-aallonpituusalueella eli 1000-1700 nm:ssä. Tämä on askel kohti seuraavan sukupolven korkealaatuisia kuvantamismenetelmiä, jotka ovat erityisen tärkeitä verisuonten kuvantamisessa, sairauksien diagnosoinnissa sekä kasvainten löytämisessä.¹²

Jo käytössä olevista koettimista kvanttipisteet, yksiseinäiset hiilinanoputket ja pienet orgaaniset molekyylit soveltuvat NIR-II-alueelle. Kvanttipisteiden käyttöä biokuvantamisessa rajoittaa kuitenkin niiden sisältämät myrkylliset raskasmetallit. Yksiseinäisten hiilinanoputkien pituus, alhainen kvanttisaanto, lyhyt viritysaallonpituus sekä laajat emissiovyöt haittaavat niiden käyttöä. Pienten orgaanisten molekyylien ongelmana taas on niiden liian nopea poistuminen elimistöstä, mikä estää käytön esimerkiksi kasvainten kuvantamisessa. Upkonvertoivat nanopartikkelit sopisivat muuten luminesenssiominaisuuksiensa vuoksi ylivoimaisesti tähän tarkoitukseen, mutta niillä on alhainen kvanttisaanto kyseisellä aallonpituusalueella. Downkonvertoivien nanopartikkelien on huomattu toimivan tehokkaasti ja sirontavapaasti NIR-II-alueella, mistä Xue *et al.* tekemä tutkimus on erinomainen osoitus. Tutkimuksessa kuvannettiin polyakryylihapolla muokattujen NaYF₄:Gd/Yb/Er-nanosauvojen avulla noninvasiivisesti hiiren suuret verisuonet sekä halkaisijaltaan 4 mm:n levyinen pahanlaatuinen kasvain 1550 nm:n emissioaallonpituudella. Kuvantamismenetelmän noninvasiivisuus, tarkkuus ja korkea erotuskyky tekevät siitä lupaavan vaihtoehdon NIR-II-alueen *in vivo* -verisuonikuvantamiseen.¹²

PLNP:ien poikkeuksellisen pitkäikäistä luminesenssia voidaan hyödyntää pitkäkestoisessa kuvantamisessa ja seurannassa. Shi *et al.* kehittivät NIR-alueella 696 nm:ssä emittoivia pysyvän luminesenssin Zn_{1,1}Ga_{1,8}Ge_{0,1}O₄:Cr,Eu@SiO₂-nanopartikkeleita, joiden luminesenssi kesti parhailaan 15 päivää¹³. Tutkimuksessa nanopartikkelit saatiin kulkeutumaan tarkasti hiiren syöpäkasvaimeen liittämällä partikkeleihin funktionaaliseksi ryhmäksi foolihappoa. Nanopartikkelit onnistuttiin virittämään uudelleen punaisella LED-lampulla sen jälkeen, kun ne olivat kulkeutuneet syöpäkasvaimeen. Lisäksi nanopartikkelien avulla saatiin kuljetettua ja vapautettua kasvaimeen doksorubisiinihydrokloridia, joka on yleisesti kemoterapiassa käytetty

lääkeaine. Syövän diagnosoinnin ja seurannan lisäksi valmistettuja nanopartikkeleita voitaisiin siis hyödyntää myös syöpälääkkeen kuljettamisessa kasvaimeen.¹³

8 Yhteenveto

Lantanideille ominaisen elektronirakenteen vuoksi niillä seostetuilla nanopartikkeleilla on lukuisia hyödyllisiä luminesenssin piirteitä, kuten sen pitkä elinikä, suuret Stokesin siirtymät sekä useat, kapeat emissioviivat. Aikaerotteisen mittaustavan avulla kudoksen autofluoresenssista ja valon sironnasta aiheutuvat häiriöt saadaan eliminoitua lähes kokonaan keräämällä lantanidien pitkäikäinen luminesenssi lyhytikäisen taustasignaalin hävittyä. Nanopartikkeleita, ja siten niiden luminesenssiominaisuuksia, voidaan muokata muuttamalla esimerkiksi partikkelien koostumusta, kokoa tai muotoa. Muokkausmahdollisuudet ovat lähes rajattomat, mikä mahdollistaa nanopartikkelien monipuolisen käytön erilaisissa biosensori- ja biokuvantamismenetelmissä. Tarvetta on edullisten ja yksinkertaisten menetelmien kehittämiseksi, jotta lantanideilla seostetut nanopartikkelit saataisiin kaupallisille markkinoille.⁴ Kuitenkin lantanidien rajoittunut saatavuus hidastaa niihin perustuvien sovelluksien kehittämistä. Tulevaisuuden tutkimuksen aiheena tulee olemaan ei-lantanidiperusteisten nanopartikkelien kehittäminen, mutta lantanidien ainutlaatuisia luminesenssiominaisuuksia on ainakin toistaiseksi hankala jäljitellä muilla alkuaineilla.²

Suurin hidaste lantanideilla seostettujen nanopartikkelien hyödyntämisessä biosensoreissa ja biokuvantamisessa on avoimet kysymykset niiden bioyhteensopivuudesta. Lantanidi-ionit eivät ole juurikaan ihmiselle myrkyllisiä, mutta nanomittakaavan materiaalit saattavat käyttäytyä elimistössä yllätyksellisesti, sillä niiden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet voivat erota hyvinkin paljon saman aineen bulkkikokoisesta muodosta.² UCNP:ien alhaisesta myrkyllisyydestä verrattuna perinteisiin fluoresoiviin materiaaleihin on saatu kannustavia tuloksia erilaisilla solulinjoilla tehdyissä tutkimuksissa. Useimmissa *in vitro* -kokeissa solujen elinkelpoisuus säilyi UCNP:eille altistamisen jälkeen yli 50 %:ssa, mikä viittaa suhteellisen alhaiseen sytotoksisuuteen.⁵ Lantanideilla seostettujen nanopartikkelien myrkyllisyyden arviointi perustuu kuitenkin vain koeputki- ja joihinkin solututkimuksiin, joten niiden sopivuudesta kliiniseen käyttöön ei voida sanoa vielä mitään varmaa. Esimerkiksi pitkän aikavälin vaikutuksia immunologiseen vasteeseen ja syöpäriskiä ei ole selvitetty lainkaan⁵. Vaikka lantanideilla seostettujen nanopartikkelien ainutlaatuisista ominaisuuksista

biosensoreissa ja biokuvantamisessa ei voida kiistellä, tarvitaan vielä näyttöä niiden paremmuudesta verrattuna käytössä oleviin metodeihin.²

Lähteet

1. Cho, U. & Chen, J. K. Lanthanide-Based Optical Probes of Biological Systems. *Cell Chemical Biology* **27**, 921–936 (2020).
2. Loo, J. F. C. *et al.* Upconversion and downconversion nanoparticles for biophotonics and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews* **400**, 213042 (2019).
3. Wang, M., Hu, C. & Su, Q. Luminescent Lifetime Regulation of Lanthanide-Doped Nanoparticles for Biosensing. *Biosensors (Basel)* **12**, 131 (2022).
4. Ma, Q. *et al.* Recent Progress in Time-Resolved Biosensing and Bioimaging Based on Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Small* **15**, 1804969 (2019).
5. Gerelkhuu, Z., Lee, Y. I. & Yoon, T. H. Upconversion Nanomaterials in Bioimaging and Biosensor Applications and Their Biological Response. *Nanomaterials* **12**, 3470 (2022).
6. Yao, J., Huang, C., Liu, C. & Yang, M. Upconversion luminescence nanomaterials: A versatile platform for imaging, sensing, and therapy. *Talanta* **208**, 120157 (2020).
7. Liu, X. *et al.* Binary temporal upconversion codes of Mn²⁺-activated nanoparticles for multilevel anti-counterfeiting. *Nat Commun* **8**, 899 (2017).
8. Cheng, S. *et al.* Reversible Ratiometric Probe Combined with the Time-Gated Method for Accurate in Vivo Gastrointestinal pH Sensing. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 25557–25564 (2020).
9. Lu, Y. *et al.* On-the-fly decoding luminescence lifetimes in the microsecond region for lanthanide-encoded suspension arrays. *Nat Commun* **5**, 3741 (2014).
10. Liu, Q. *et al.* Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging in vivo. *J Am Chem Soc* **133**, 17122–17125 (2011).

11. Tan, M. *et al.* Rare-earth-doped fluoride nanoparticles with engineered long luminescence lifetime for time-gated: In vivo optical imaging in the second biological window. *Nanoscale* **10**, 17771–17780 (2018).
12. Xue, Z., Zeng, S. & Hao, J. Non-invasive through-skull brain vascular imaging and small tumor diagnosis based on NIR-II emissive lanthanide nanoprobes beyond 1500 nm. *Biomaterials* **171**, 153–163 (2018).
13. Shi, J. *et al.* Multifunctional near infrared-emitting long-persistence luminescent nanoprobes for drug delivery and targeted tumor imaging. *Biomaterials* **37**, 260–270 (2015).