

Synteza i cytotoksyczność nanocząstek NaYF₄ pokrytych warstwą porowatej krzemionki

STRESZCZENIE

Jakościowe i ilościowe metody takie jak mikroskopie czy spektroskopie, są jednymi z najbardziej popularnych technik wykorzystywanych we współczesnej biologii. W ostatnich latach nanocząstki konwertujące energię wzbudzenia w górę (ang. upconverting nanoparticles, UCNPs), domieszkowane jonami lantanowców, stały się przedmiotem intensywnych badań w ciągle rozwijającym się polu poszukiwań nowych i wydajnych metod obrazowania oraz detekcji struktur biologicznych.

Proces konwersji energii wzbudzenia w górę (ang. upconversion, UC) został odkryty już w latach 60-tych XX wieku, a w latach 2000-tych opracowano metody syntezy chemicznych pierwszych domieszkowanych mikro- i nanocząstek opartych o matrycę NaYF₄, o wydajności kwantowej wyższej niż poprzednie materiały UC. Zjawisko UC polega na absorpcji dwóch lub więcej niskoenergetycznych fotonów, zazwyczaj z zakresu podczerwieni, i emisji fotonów o wyższej energii, zazwyczaj z zakresu widzialnego lub ultrafioletowego. Zjawisko to wykorzystuje przejścia elektronowe 4f-4f zachodzące w jonach lantanowców.

Dalsze wzmocnienie luminescencji nanocząstek UC można uzyskać poprzez zaprojektowanie tak zwanej aktywnej powłoki. Powłoka ta, poprzez konkretne jony lantanowców, jest zdolna do pochłonięcia dodatkowej energii fotonów i przekazania jej do rdzenia, w którym zachodzi zjawisko UC.

Nanocząstki NaYF₄ mają jednak istotną wadę w postaci niskiej wydajności kwantowej. Wzbudzenie w widmie IR wymaga intensywnego źródła tego światła. To generuje znaczną ilość ciepła w układzie, które jest szkodliwe dla struktur biologicznych. Problem ten próbuje się rozwiązać poprzez zastosowanie tak zwanych powierzchniowych anten uczulających. Antena pochłaniając promieniowanie IR, przekazuje energię bezpromieniście do jonów lantanowców w strukturze nanocząstki. Ta dodatkowa energia zwiększa intensywność zjawiska UC. Cyjaninowe barwniki organiczne pochłaniające w widmie bliskiej podczerwieni (NIR) takie jak IR-806, lub kropki kwantowe są przykładami aktualnie badanych kandydatów do roli tychże anten.

Oferując właściwości takie jak możliwość wzbudzania w głębszych fragmentach tkanki, niższy szum tła i wyższą stabilność, nanocząstki NaYF₄ stały się przedmiotem badań nad nową grupą znaczników luminescencyjnych zdolnych do zastąpienia klasycznych znaczników takich jak związki organiczne czy białka fluorescencyjne.

Istnieją trzy główne metody syntezy nanocząstek NaYF₄. Metoda Ostwald-ripening, synteza hydrotermalna oraz najbardziej znana metoda dekompozycji termicznej - termolizy.

Metoda dekompozycji termicznej pozostawia na powierzchni nanokryształu ligandy kwasu oleinowego. Właściwości hydrofobowe nanocząstek NaYF₄ opłaszczonych tymi ligandami znacząco ograniczają zastosowanie biologiczne, z tego względu konieczne jest przeprowadzenie modyfikacji powierzchni nanokrystalitów, która pozwala uzyskać właściwości hydrofilowe. Te modyfikacje można przedstawić w następujących kategoriach: wymiana ligandów, przyciąganie ligandów, utlenianie ligandów, usuwanie ligandów, powlekanie powłoką polimerową, powlekanie metodą layer-by-layer, metoda oddziaływań host-guest oraz powlekanie nanocząstki warstwą powłoki krzemionkowej.

Nanocząstki ze zmodyfikowaną powierzchnią mogą być wykorzystywane w szerokiej gamie badań biologicznych, które można podzielić na kategorie takie jak: obrazowanie, detekcja związków i zjawisk, śledzenie dynamiki związków i procesów biologicznych,

transport oraz dostarczanie leków lub innych cząsteczek chemicznych, terapia fotodynamiczna a także optogenetyka.

Podczas gdy wzbudzenie promieniowaniem z zakresu nadfioletowego i widzialnego ogranicza wysokie pochłanianie fotonów z tych zakresów, spektrum podczerwieni zapewnia kilka potencjalnie efektywnych tak zwanych okien optycznych w ramach których do około 90% światła jest w stanie przeniknąć tkanki na głębokość 2 centymetrów i więcej. Perspektywa przenikania do tak głębokich warstw pozycjonuje wykorzystanie znaczników UC jako ważną alternatywę w obserwacji struktur wielokomórkowych, takich jak tkanki czy całe organizmy.

Cytotoksyczność i inne szkodliwe efekty uboczne nanocząstek NaYF₄ to pole debat i wielu prac badawczych. Obecnie ogranicza to ich zastosowanie. Prace w dziedzinie tych materiałów wskazują, że nanocząstki NaYF₄ ulegają rozpadowi w płynach ustrojowych uwalniając jony lantanowe i fluorkowe do otoczenia. Ze względu na swoją wielkość, nanocząstki typu core- i core@shell mogą bez problemów przenikać przez błonę komórkową bez udziału aktywnych mechanizmów endocytozy i akumulować się w cytoplazmie. Nanocząstki o większych rozmiarach, wynikających z potencjalnych modyfikacji powierzchniowych, są internalizowane na drodze endocytozy zależnej od kaweolin lub klatryn. Konieczność ścisłego przebadania tych nanocząstek wynika z faktu, że endocytoza zależna od kaweolin i klatryn jest ściśle powiązana z wieloma szlakami apoptotycznymi. Dodatkowym argumentem przemawiającym za koniecznością prowadzenia szeroko zakrojonych badań w tej kwestii są doniesienia wykazujące wysoki poziom akumulacji nanocząstek NaYF₄ w konkretnych narządach.

Podsumowując, materiały oparte o nanokryształy NaYF₄ wymagają w dalszym ciągu szeregu badań. Wymagają także pewnego stopnia indywidualnego podejścia dla różnych rodzajów materiałów różniących się między sobą składem chemicznym, rozmiarem nanocząstki, obecnością różnych modyfikacji powierzchni, mogących przekładać się na diametralnie różną odpowiedź ze strony całego organizmu lub konkretnie układu odpornościowego.

W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki wstępnych badań nad zasadnością zastosowania nanocząstek core@shell typu β -NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ @ β -NaYF₄: Nd³⁺, Yb³⁺, o wielkości 55 nm i 96 nm, pokrytych warstwą porowatej krzemionki będącej platformą nośnikową dla potencjalnych środków terapeutycznych oraz wcześniej opisanych wzmacniających luminescencję anten uczulających, takich jak barwnik IR-806 wykorzystany w przedstawianych tutaj badaniach.

Nanocząstki β -NaYF₄: 2% Er³⁺, 20% Yb³⁺ @ β -NaYF₄: 30% Nd³⁺, 20% Yb³⁺ o wielkości 28 nm, których syntezę przeprowadził zespół w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN we Wrocławiu, zostały pokryte warstwą krzemionki poprzez zmodyfikowaną metodę Ströbera u podstaw której leży kondensacja krzemionki na drodze chemicznej degradacji prekursorowego związku TEOS w środowisku zasadowym.

Potencjalne właściwości ochronne powłoki krzemionkowej badano pod kątem trzech aspektów. Pierwszym był wpływ na ogólną stabilność chemiczną IR-806 w czasie. Porównano barwnik w roztworze i barwnik zaadsorbowany do krzemionki. W po dwóch tygodniach, 21% optycznie aktywnego IR-806 zostało w roztworze wodnym, podczas gdy 74% barwnika pozostało w krzemionce. Dodatkowe siedem miesięcy przechowywania w ciemni pokazuje, że 16% barwnika osadzonego na krzemionce było nadal aktywne, podczas gdy tylko około 1% pozostającego w formie roztworu. Analogiczne eksperymenty, badające degradację pod wpływem działania światła, przeprowadzono poprzez naświetlanie promieniami UV o długości 254 i 366 nm. Po 200 minutach naświetlania cała populacja cząsteczek IR-806 w wodzie uległa degradacji, podczas gdy około 27% molekuł barwnika pozostało niezdegradowane wewnątrz porowatej warstwy krzemionkowej. Ostatnim badanym aspektem degradacji była ocena skuteczności w zapobieganiu utleniania IR-806 przez nadtlenek wodoru jako przedstawiciela

grupy reaktywnych form tlenu. Eksperymenty sugerują, że powłoka krzemionkowa nie chroni cząsteczek IR-806 przed działaniem H_2O_2 , gdyż szybkość degradacji jest stosunkowo podobna pomiędzy barwnikiem zaadsorbowanym do krzemionki i barwnikiem w roztworze wodnym. Do eksperymentów badających cytotoksyczność użyto komórek linii makrofagowo-podobnych THP-1, linii komórek nabłonkowo-podobnych MDA-MB-231 i nabłonkowo-podobnych komórek linii A375 od pacjenta z przerzutowym czerniakiem. Zastosowano nanocząstki $NaYF_4$ pokryte krzemionką o różnej grubości jak też nanokryształy $NaYF_4$ z usuniętymi ligandami oleinowymi i bez otoczki krzemionkowej. W przypadku makrofagowej linii THP-1 mniejsze nanocząstki typu core zwiększały proliferację komórek. Wzrost proliferacji w przypadku nanocząstek typu core@shell także był obserwowany, nawet wyższy niż w przypadku NPs typu core. Dla nabłonkowo-podobnej linii MDA-MB-231 nie zaobserwowano właściwości stymulujących zarówno dla nanocząstek typu core, jak i core@shell. Stymulacja nanocząstkami $NaYF_4$ pokrytymi krzemionką pokazuje znaczną toksyczność tych nanocząstek. Żywotność hodowli THP-1 spadła do 16% grupy kontrolnej, natomiast przeżywalność linii MDA-MB-231 obniżyła się do 49%. Następnie, linie THP-1 i A375 zostały wybrane do eksperymentów mających na celu ocenić wpływ różnej wielkości powłoki krzemionkowej oraz potencjalną cytotoksyczność barwnika IR-806. W przypadku nanocząstek pokrytych krzemionką o średnicy 96 nm nie zaobserwowano istotnego efektu cytotoksycznego. Podobnie jak w przypadku wyników eksperymentów z liniami THP-1 i MDA-MB-231, nanocząstki pokryte krzemionką o średnicy 55 nm istotnie zmniejszały żywotność komórek, jednocześnie nie zaobserwowano żadnego dodatkowego efektu cytotoksycznego próbek nanocząstek z barwnikiem osadzonym w krzemionce. Barwnik IR-806 rozpuszczony w medium hodowlanym nie wpłynął na żywotność hodowli komórkowej. Analiza cytometryczna żywotności komórek pokrywa się z wynikami cytotoksyczności, jednocześnie wskazując na indukcję szlaków apoptozy w hodowlach komórkowych prowadzących do znacznej śmierci populacji komórek po upływie 48 godzin od rozpoczęcia stymulacji.

Uzyskane wyniki, wraz z danymi literaturowymi, sugerują istnienie przedziału wielkości nanocząstek w zakresie którego są one wysoce cytotoksyczne dla linii komórkowych.