

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

NBIOTS11Z

2017

Janita Vartija

# BIOHAJOAVAN MALLI- IMPLANTIN KEHITYS BIOFARMASEUTTISTEN AINEIDEN VAPAUTUMISELLE

Janita Vartija

## BIOHAJOAVAN MALLI-IMPLANTIN KEHITYS BIOFARMASEUTTISTEN AINEIDEN VAPAUTUMISELLE

Biohajoavien materiaalien tarve ja suosio lääketieteen sovellutuksissa kasvaa jatkuvasti uusien teknologioiden ja tutkimustulosten myötä. Biohajoavan materiaalin etuna on, että sitä ei tarvitse erikseen poistaa elimistöstä sinne asentamisen jälkeen. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää mallisysteemi ja mittausmenetelmät malliproteiinin vapautumiselle biohajoavasta materiaalista. Silikasta valmistettiin biohajoava malli-implantti, jonka sisälle kapseloitiin vihreää väriä fluoresoivaa proteiinia, GFP:tä (Green Fluorescent Protein). GFP toimi tutkimuksessa mallilääkeaineena, jonka vapautumista implantista tutkittiin liuotus- eli dissoluutiotesteillä. Samalla tutkittiin implantin biohajoavuusnopeutta.

Opinnäytetyössä valmistettiin sooli-geeli-prosessilla silikaimplantteja, jotka sisälsivät GFP:tä 1 % suhteutettuna silikan massaan implantissa. Implantteille suoritettiin dissoluutiotestejä, joissa ne upotettiin ihmiskehon fysiologisia olosuhteita simuloivaan puskuriin. Silikan in sink –raja optimoitiin 24 h:n kohdalle ja sitä ylläpidettiin liuotuksen aikana vaihtamalla puskuri uuteen vuorokauden välein. Implanttia liuotettiin kerrallaan 4 vuorokautta ja sille määritettiin liukenemisnopeus eri aikapisteistä otetuista näytteistä ja niistä analysoiduista liuotustuloksista. Samalla tutkittiin GFP:n vapautumisnopeutta implantista.

Silikan pitoisuutta mitattiin UV-Vis –spektrofotometrillä ja GFP:n aktiivisuutta aikaerotteisella fluoresenssilla. Dissoluutiotesteistä saaduista tuloksista havaittiin, että valmistetut silikaimplantit liukenevat puskuriin kokonaisuudessaan 6-8 vuorokaudessa. Vapautunutta GFP:tä ei pystytty havaitsemaan lainkaan fluoresenssimittauksissa, koska pitoisuus implantissa oli liian pieni. Pystyttiin kuitenkin osoittamaan, että GFP:tä vapautuu käytetyllä menetelmällä mitattavissa olevia määriä.

### ASIASANAT:

biomateriaalit, silika, lääkeannostelu, biofarmaseuttiset proteiinit, dissoluutio

Janita Vartija

## DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE MODEL IMPLANT FOR RELEASE OF BIOPHARMACEUTICALS

The demand for biodegradable materials for use in medical applications is constantly growing due to new studies and advanced technologies. The advantage of biodegradable material is that no removal from the system is needed. The aim of this thesis was to develop a model system and measuring methods for the release of protein from a biodegradable material. A model implant was produced from silica with encapsulated Green Fluorescent Protein. The GFP represented a model biopharmaceutical ingredient, and its release rate from the implant was studied by performing dissolution tests. Also the biodegradability of the implants was examined.

Silica-based implants were produced by the sol-gel method. The implants contained 1 % of GFP in proportion to the mass of silica in the implant. Dissolution tests were performed on the implants, which consisted of their immersion in buffer that simulates the physiological conditions of the human body. The in sink conditions of silica were optimized at 24 hours and maintained by changing the buffer every 24 hours. One implant was dissolved for 4 days, and its dissolution rate was determined based on samples taken at different points of time and on the results analyzed. At the same time, the release rate of GFP was examined.

The amount of silica was measured by UV-Vis spectrophotometry and the activity of GFP was measured by fluorescence and time-resolved fluorescence. The research discovered that the manufactured silica- implants dissolve completely in 6 to 8 days. The released GFP was not successfully detected in the fluorescence measurements, because it was present in too small an amount. However, it could be proved that GFP is able to be released in amounts that are measurable by the used method.

### KEYWORDS:

biomaterials, silica, drug delivery, biopharmaceutical proteins, dissolution

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 BIOMATERIAALIT JA LÄÄKEANNOSTELU</b>	<b>9</b>
2.1 Biohajoavat materiaalit	9
2.1.1 Silika	9
2.1.2 Sink –olosuhteet	10
2.2 Lääkeannostelu	11
<b>3 BIOFARMASEUTTISET PROTEIINIT</b>	<b>12</b>
<b>4 SOOLI-GEELI –PROSESSI</b>	<b>14</b>
<b>5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>16</b>
5.1 Analyysimenetelmät	16
5.1.1 UV-Vis –spektroskopia	16
5.1.2 Fluoresenssi ja aikaerotteinen fluorometria	17
5.1.3 Bradford-menetelmä	18
5.2 Tangentiaalivirtaussuodatus	18
5.3 Dissoluutiotestit silikaimplantilla	19
5.3.1 Silika-näytteiden esikäsittely	19
5.3.2 In sink –rajan testaus	20
5.3.3 Silikaimplantin liukenemisnopeuden tutkiminen	20
5.4 GFP:n kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen ja konsentrointi	21
5.5 GFP:n ja silikan häiriöttestaus	22
5.6 GFP:tä sisältävän silika-implantin valmistus	22
5.7 GFP:n vapautumisen tutkiminen dissoluutiotesteillä	23
<b>6 TULOKSET JA POHDINTA</b>	<b>24</b>
6.1 In sink –rajan testaus ja optimointi	24
6.2 Silika-implantin liukenemisnopeus	26
6.3 GFP:n kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen ja konsentrointi	27
6.4 Silikan ja GFP:n häiriöttestaus	27
6.5 GFP:tä sisältävän implantin valmistus	28

6.6 GFP:n vapautuminen	29
<b>7 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>32</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>34</b>

## **LIITTEET**

Liite 1. Piin standardisuora.	
Liite 2. Proteiiniääritys Bradford-menetelmällä.	
Liite 3. Keskiarvoihin perustuva standardisuora ja GFP-liuoksen laskettu proteiinipitoisuus.	
Liite 4. Sooli-geeli-laskuri.	
Liite 5. Laskuesimerkki silikapitoisuuden laskemisesta	
Liite 6. Silikan liukenemisnopeuden laskeminen	
Liite 7. GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden laskeminen	

## **KAAVAT**

$A = \text{Log}_{10}(I_0/I) = \epsilon c l \quad (5)$	16
---	----

## **KUVAT**

Kuva 1. GFP:n rakenne. (Kuvan alkuperäislähde: Protein Databank in Europe)	13
Kuva 2. Tangentiaalivirtaussuodatuksen periaate.	18
Kuva 3. Havaintokuva GFP-implanteista.	23

## **KUVIOT**

Kuvio 1. In sink -olosuhteiden merkitys lääkeaineen dissoluutiassa.	10
Kuvio 2. Aikaeroitteisen fluorometrian periaate.	17
Kuvio 3. Silikan liukenemisnopeus.	21
Kuvio 4. In sink -rajan testaus.	25
Kuvio 5. Silika-implantin liukenemisnopeus.	27
Kuvio 6. GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus	31

## TAULUKOT

Taulukko 1. In sink –rajan testaus	24
Taulukko 2. In sink -rajan optimointi.	25
Taulukko 3. Silikan liukenemisnopeus	26
Taulukko 4. Silika-GFP-häiriötestaus	27
Taulukko 5. GFP:n fluoresenssimittaukset.	29
Taulukko 6. Mittausalarajatesti.	30
Taulukko 7. GFP:n teoreettinen vapautuminen	30

## KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
API	Active Pharmaceutical Ingredient, aktiivinen lääkeaine
GFP	Green Fluorescent Protein
HCl	Suolahappo
IEX	Ion Exchange Chromatography, ioninvaihtokromatografia
in sink	Ylläpidettävä olosuhde dissoluutiotesteissä
NaCl	Natriumkloridi
NaOH	Natriumhydroksidi
SiO <sub>2</sub>	Piiksidin, silika
RPM	Kierrosta minuutissa, Revolutions per minute
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
TMOS	Tetrametyyliortosilikaatti
Tris	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
UV	Ultravioletti
VIS	Näkyvä valo

# 1 JOHDANTO

Biomateriaali on materiaali, jota käytetään apuna tukemaan ja korjaamaan elimistön osia ilman, että se haittaa itse elävän organismin toimintaa. (O'Brien, 2011) Biomateriaaleista voidaan valmistaa lääkeannosteluun soveltuvia biohajoavia ja -yhteensopivia lääkeaineen kantajia. Biohajoavan materiaalin tarkoituksena on hajota elimistössä itsestään joko kontrolloidusti tai ei-kontrolloidusti, ja sen on oltava ihmiskehelle vaaraton myös hajottuaan.

Lääkeannostelussa implantit ovat yksi annostelumuodoista ja niiden sisään voidaan kapseloida paitsi lääkeaineita, mutta joissakin tapauksissa myös soluja ja viruksia. Implanttien avulla voidaan kuljettaa annosteltava aktiivinen lääkeaine (API) spesifisesti ja turvallisesti ihmiskehon haluttuun osaan, jossa se vapautuu kontrolloidusti. Biohajoavaa implanttia ei tarvitse erikseen poistattaa lääkeaineen vapauduttua, sillä se poistuu itsestään elimistöstä tietyn ajan kuluessa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää biofarmaseuttisia lääkeaineita vapauttava malli-implantti. Opinnäytetyössä valmistettiin silikasta sooli-geeli-prosessilla biohajoavia implantteja, joiden sisään kapseloitiin malli-lääkeaineena toimivaa GFP:tä (Green Fluorescent Protein). Suuri osa biofarmaseuttisista lääkeaineista on proteiineja, ja GFP:n tutkittavuuden etuna on myös sen fluoresoiva ominaisuus. Silika puolestaan on bioyhteensopiva ihmiskehon kanssa, ja synteettisenä materiaalina ominaisuuksiltaan helposti muokattavissa. Työssä keskityttiin tutkimaan implantin biohajoavuutta ja proteiinin vapautumista implantin sisältä liuotus- eli dissoluutiotestien avulla. Dissoluutiotestit suoritettiin olosuhteissa, jotka mukailivat ihmiskehon omien nesteiden ominaisuuksia.

Opinnäytetyö suoritettiin osana Biomateriaalit ja diagnostiikka -tutkimusryhmän Cell-in-Gel -projektia Turun Ammattikorkeakoulussa. Projekti on Turun Ammattikorkeakoulun ja Åbo Akademin yhteistyöprojekti, joka keskittyy injektoitavien, geelimäisten ja vaahtomaisten materiaalien tutkimiseen ja kehittämiseen solukapseloinnissa, solukasvatuksessa ja lääkeannostelussa.



## 2 BIOMATERIAALIT JA LÄÄKEANNOSTELU

Biomateriaalit ovat luontoperäisiä tai synteettisiä materiaaleja, joita ihmiskeho ei hylji. Niitä käytetään pääasiassa lääketieteellisissä sovellutuksissa apuna korjaamaan, hoitamaan, tukemaan ja korvaamaan elimistön erilaisia vaurioituneita osia ilman, että ne haittaavat kanssaan vuorovaikutuksessa olevan elävän organismin toimintaa. Synteettiset biomateriaalit ovat yleensä metalleja, keraameja, komposiitteja ja polymeereja. Luontoperäiset biomateriaalit voivat olla peräisin ihmisen tai eläimen eri osista, kuten luusta tai sidekudoksesta (Ratner, 1996) (Valvira) (Ulery, 2011)

Biomateriaalit voidaan luokitella biostabiileihin tai biohajoaviin materiaaleihin, riippuen käyttötarkoituksestaan. (Seppälä ym, 2004) Biostabiilit eli ei-biohajoavat materiaalit eivät häviä elimistöstä itsestään. Tällaisten materiaalien on oltava nimensä mukaisesti kestäviä; niiden on kestävä monentasoisesta rasituksesta, eivätkä ne saa esimerkiksi liueta elimistöön pitkänkään ajan kuluessa. Biostabiilit materiaalit ovat hyödyllisiä esimerkiksi hammasteknologiassa (esim. hammaspaikat) ja ortopediassa (esim. titaaniset tekonivelet). (Seppälä et al., 2004)

### 2.1 Biohajoavat materiaalit

Biohajoavat materiaalit hajoavat elimistössä itsenäisesti joko kontrolloidusti tai ei-kontrolloidusti. Hajoavan materiaalin tarkoitus on antaa kehon omien solujen korvata istutettu materiaali ajan kanssa, kuitenkin niin, että materiaali antaa tarvittaessa riittävän pitkäkestoisen tuen. Materiaalin hajotessa sen sivutuotteiden on myös oltava vaarattomia elimistölle ja niiden on pystyttävä poistumaan kehosta luonnollisesti haittaamatta kehon muita osia tai toimintoja (O' Brien, 2011, Törmälä, 2003)

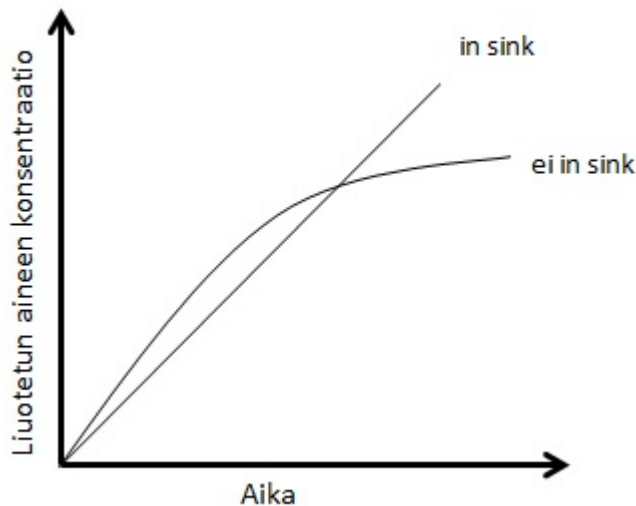
#### 2.1.1 Silika

Silika on suosittu ja paljolti tutkittu biomateriaali sen monikäyttöisyyden vuoksi. Sooligeeli –prosessilla valmistettu silika on ominaisuuksiltaan helposti muokattavissa. Synteettisenä materiaalina se on lääkannostelua ajatellen toimivampi kuin luonnonmateriaalit, sillä sen mekaanisia ja kemiallisia ominaisuuksia sekä muotoa, kokoa ja huokoisuutta on helpompi muokata kuin luonnonmateriaalien. Silika on myös bioyhteensopiva

elävän kudoksen kanssa, joten sen monipuolista hyödyntämistä esimerkiksi lääketieteellisen sovellutuksissa halutaan tutkia jatkuvasti lisää. Silika on oiva materiaali esimerkiksi lääkeannostelussa, jossa kehoon istutetaan vieras esine, josta vapautuu kehoon lääkeainetta tasaiseen tahtiin haluttu määrä. Silikasta valmistetun implantin sisään voidaan kapseloida esimerkiksi lääkeaineita tai viruksia ja soluja. Silikan liukoisuus ihmiskehon kaltaisessa nesteessä on pienimmillään, mutta sen liukenemisnopeutta voidaan säädellä laajasti. Ihmiskehon sisälle istutettaessa se liukenee tarpeeksi hitaasti, mutta kuitenkin lopulta kokonaan niin, ettei sitä tarvitse poistaa jälkikäteen. (Jokinen et al., 2010)

### 2.1.2 Sink –olosuhteet

Sink–olosuhteiden ylläpitäminen on merkittävä osa dissoluutiotesteissä. Sink-olosuhteissa liukenevan aineen konsentraatio pysyy liuoksessa koko ajan alle 15 – 20 % liukenevan aineen liukoisuudesta. Mikäli konsentraatio ylittää tämän pisteen, alkaa aineen liukenemisnopeus asteittain hidastumaan mitä lähemmäs liukenevan aineen saturaatio-rajaa se kasvaa. Kuviossa 1 havainnollistetaan aineen liukenemisnopeuden muutosta in sinkissä ja ei-in sinkissä.



Kuvio 1. In sink -olosuhteiden merkitys lääkeaineen dissoluutiassa.

Mikäli sink-olosuhteita ei ylläpidetä ainetta liuotettaessa, liukenemisnopeuden aleneminen on sen verran merkittävä, että mittaustulokset vääristyvät.

## 2.2 Lääkeannostelu

Lääkeannostelussa aktiivinen lääkeaine (API) kuljetetaan ihmiskehoon eri menetelmien ja annostelumuotojen avulla. Menetelmiä voivat olla esimerkiksi suun kautta, kielenalle laitettavat, silmän, nenän tai korvan kautta annosteltavat ja ihon alle laitettavat. Lääkeannostelumuotoja on myös paljon erilaisia, kuten kaasumainen, jauhemainen, nestemäinen, kiinteä, puolijähmeä geelimäinen ja emulsio. Eri tavoilla ja muodoilla annosteltuina lääkeaineiden vapautumista ja lääkkeen vaikuttamista elimistöön tai pelkästään tiettyyn sen osaan voidaan säädellä. Lääkeaineen annostelumuoto ja –menetelmä on valittava sen asettamien vaatimusten mukaisesti. (Popescu, 2011.)

Tässä opinnäytetyössä käytetty implantti on kiinteä lääkeannostelun muoto, joka annostellaan usein ihonalaisesti. Ihonalaisissa annostelumenetelmissä vapautuva lääkeaine kulkeutuu vapauduttuaan suoraan systeemiseen kiertoon. Useimmille kiinteille annostelumuodoille on tehtävä dissoluutio- eli liuotustestejä sekä tutkittava niiden hajoamista elimistössä. Implanttimuotoinen lääkeaineen kuljetus on pitkäkestoinen ja stabiili tapa annostella lääkeainetta, ja se on myös usein huomaamaton kantajalleen. Implanttimuotoisessa annostelussa lääkeaineen vapautuminen on myös kontrolloitua. (Popescu, 2011)

Biojahoavan implantin etuna on, että sitä ei tarvitse poistattaa erikseen enää istuttamisensa jälkeen, vaan implantti hajoaa liukenemalla itsestään tietyn ajan kuluttua kehossa vapauttaen samalla sisältämänsä lääkeaineen. Implantin ominaisuuksia on pystyttävä muokkaamaan siten, että se liukenee kehon olosuhteissa tarpeeksi hitaasti, mutta vapautettuaan lääkeaineen se kulkeutuu kuitenkin lopulta itse pois kehosta. (Popescu, 2011)

### 3 BIOFARMASEUTTISET PROTEIINIT

Suuri osa biofarmaseuttisista aineista on proteiineja. Biofarmaseuttiset (bioterapeuttiset) proteiinit ovat kattava joukko proteiineja, joihin lukeutuvat muun muassa kasvutekijät, sytokiinit, hormonit, entsyymit, fuusioproteiinit ja monoklonaaliset vasta-aineet. Näiden proteiinien käyttö lääkeaineina kiinnostaa tutkijoita, sillä niiden on tutkittu olevan ominaisuuksiltaan turvallisia ja käyttökohteeltaan spesifisiä sekä myrkyttömiä. (Schmidt, 2013)

Biofarmaseuttisia aineita on aiemmin eristetty esimerkiksi ihmiskudoksesta, mutta rekombinantti- eli yhdistelmä-DNA-tekniikan kehityttyä pystytään nykyään tuottamaan puhtaita ja hyvin konsentroituja materiaaleja (WHO, 2013). Suurin osa näistä markkinoilla tavattavista proteiineista onkin tuotettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla (Dimitrov, 2012). Biofarmaseuttiset proteiinit ovat merkittävässä osassa kun kehitellään uusia parannuskeinoja taudeille tai etsitään uusia parantavia keinoja selättämään sairaudet, joille ei vielä löydy hoitoa. Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla tuotetut tuotteet, kuten kasvutekijät ja interferonit ovat taanneet valtavan kehitysaskelen eteenpäin esimerkiksi kroonisten sairauksien hoidossa. Sen ansiosta myös biofarmaseuttisten proteiinien ominaisuuksia, kuten turvallisuutta ja tehokkuutta on onnistuttu parantamaan. (WHO, 2013)

Biofarmaseuttiset proteiinit voidaan luokitella käyttötarkoituksensa perusteella. Proteiini voi:

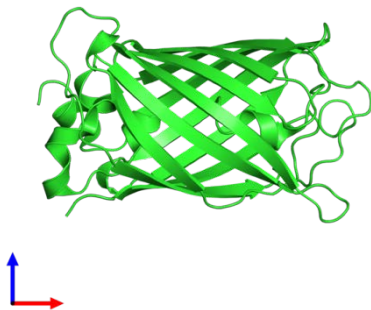
1. Korvata epänormaalin tai puutteellisesti toimivan proteiinin
2. Tehostaa jo olemassaolevaa
3. Toimia jossakin uudessa tarkoituksessa tai toiminnossa
4. Puuttua molekyylin tai organismin toimintaan
5. Kuljettaa toisia proteiineja tai tuotteita

Biofarmaseuttiset proteiinit voivat toimia elimistössäkin useilla eri tavoilla perustuen molekyylien toimintaan. Ne voivat joko muodostaa kovalenttisiä sidoksia, kuten entsyymit tai kiinnittyä ei-kovalenttisesti kohteeseensa, kuten monoklonaaliset vasta-aineet. Jotkin aineet, kuten esimerkiksi seerumialbumiini vaikuttaa elimistössä ilman molekyylien välisiä vuorovaikutuksia. (Dimitrov, 2012)

Farmaseuttisten aineiden ominaisuuksia tarkasteltaessa niistä valmistetun tuotteen laatu on prioriteettiasemassa varmistamassa turvallisen ja tehokkaan tuotteen markkinoille. Farmaseuttisilla proteiineilla nämä laadulliset asiat ovat paljon haastavampia saavuttaa

kuin pienimolekyylisillä lääkkeillä, sillä ne altistuvat helpommin kemialliselle ja fysikaaliselle hajoamiselle, niiden aktiivisuus on usein riippuvaista monimutkaisesta kolmiulotteisesta rakenteesta, niiden tuottaminen vaatii yleensä monimutkaisia prosesseja ja lisäksi niillä on taipumus muodostaa immuunivasteita. Proteiinin hajoaminen voi johtua useista eri tekijöistä, kuten kuumuudesta, ravistelusta, valosta tai pitkäaikaisesta vesipitoisessa nesteessä säilytyksestä. (Mahler, 2011)

Green Fluorescent Protein (GFP) on suosittu proteiini luonnon- ja lääketieteen tutkimuksissa, kuten esimerkiksi solu- ja kudosisologiassa. Se on nimensä mukaisesti vihreää väriä fluoresoiva proteiini, joka on eristetty meduusasta. GFP voidaan liittää esimerkiksi geeniin tai elävään soluun ja se voidaan paikantaa käyttämättä leimausmenetelmiä. Se voidaan myös liittää osaksi toista proteiinia fuusioproteiiniksi, joka saadaan fluoresoimaan. Soluun siirrettynä voidaan tutkia proteiinin vaikutuksia solun toimintoihin. GFP:tä on käytetty paljon terapeuttien proteiinien tuotannossa, sillä sen avulla voidaan tutkia esimerkiksi geenien toimintaa ja toimintapaikkaa solussa (Wahlfors et al., 2001) Lääkeannostelussa sitä käytetään ilmentämään lääkeaineen vapautumista elimistöön. Kuvassa 1 on esitetty GFP:n rakenne.



Kuva 1. GFP:n rakenne. (Kuvan alkuperäislähde: Protein Databank in Europe)

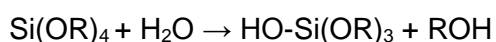
GFP:llä on sylinterimäinen kerrostunut rakenne, ja sen sisällä suojassa sijaitsee molekyylin väriä aiheuttava osa, kromofori. Tällainen tiivis rakenne tekee proteiinista kestävämmän, kun esimerkiksi pH:ta, lämpötilaa ja muita proteiinin denaturointia aiheuttavia tekijöitä säädellään. Tämä tekee siitä hyvän malli-aineen tutkittaessa terapeuttien aineiden vapautumista. (Valeur, 2013)

## 4 SOOLI-GEELI –PROSESSI

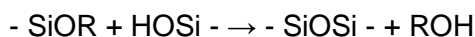
Sooli-geeli -prosessi on tunnettu biokeraamisten materiaalien, kuten silikan valmistuksessa käytetty menetelmä (Jokinen et al., 2010). Sovellusalueita ovat muun muassa kudosteknologia, lääkeannostelu, ja biosensorit. Silika-pohjaisten materiaalien valmistusprosessi perustuu yleisimmin alkoksidin hydrolyysiin ja kondensatioon. Muita silikan valmistuksessa käytettyjä lähtöaineita ovat alkyylialkoksidit, aminoalkoksidit sekä epäorgaaniset silikaatit. Prosessissa valmistetaan ensin soolia, jolloin alkoksidit hydrolysoituvat, kondensoituvat ja muodostavat nanokokoisia partikkeleita. Nämä partikkelit aggregoituvat muodostaen geeliä (Nassar et al., 2011) (Brinker, 1990).

Kolloidi on suspensio, jossa dispergoitunut faasi on niin pientä (koko n. 1-1000 nm), että gravitaation vaikutukset partikkeleihin ovat merkityksettömiä ja niihin vaikuttavat erilaiset pienemmät voimat, kuten van der Waalsin voimat sekä pintavaraukset (Brinker, 1990). Sooli on kolloidaalinen suspensio, joka muodostuu kiinteistä partikkeleista nestemäisessä jatkuvassa faasissa. Geelissä neste on vastaavasti dispergoituneena jatkuvassa kiinteässä faasissa. Soolin valmistuksessa käytetyimpiä lähtöaineita ovat tetraetyyliortosilikaatti (TEOS) sekä tetrametyyliortosilikaatti (TMOS). (Brinker, 1990)

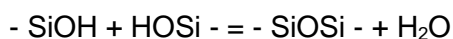
Alkoksidit ovat prosessissa yleisesti käytettyjä lähtöaineita, sillä ne reagoivat helposti veden kanssa. Tapahtuvaa reaktiota kutsutaan hydrolyysiksi, sillä sen seurauksena hydrolyysi-ioni kiinnittyy atomiin seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti:



OR on alkoksyyliiryhmä ja ROH on reaktiossa lopputuotteena muodostuva alkoholi. Hydrolyysiä seuraa kaksi kondensaatioreaktiota, joiden jälkeen silikapartikkelit kasvavat ja polymerisoituvat eli liittyvät keskenään yhteen muodostaen ensin ketjuja ja sitten kokonaisia verkostoja. Ensimmäinen kondensaatioreaktio on alkoholin kondensaatio, jossa muodostuu siloksaanisidoksia ja alkoholia:



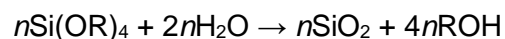
Polymerisaatio käsittää myös muodostuneiden silanoliryhmien kondensaation, jossa puolestaan muodostuu siloksaanisidoksia ja vettä:



Kondensaation edetessä syntyy nanopartikkeleita, jotka aggregoituvat, ja kun silikaverkosto kattaa koko nesteen se kiinteytyy lopulta geeliksi. Mikäli lähtöaineena on käytetty TEOS:ia, lopputuotteena muodostuva alkoholi on etanolia ja vastaavasti TMOS:lla se on metanolia (Brinker, 1990) (Iler, 1979).

Kondensoituminen ei pysähdy täysin vielä geelin muodostuttua vaan silika jatkaa polymerisoitumistaan muodostaen lisää polymeeriverkostoja. Kondensaatioreaktion nopeutta voidaan myös muuttaa säätämällä pH:ta. Alhaisessa pH:ssa (pH 2) kondensaatio tapahtuu hitaasti, ja vastaavasti pH-arvossa 7 se on nopeimmillaan, sillä silikan liukoisuus ja liukeneminopeus ovat maksimoituja. Silikapartikkelit ionisoituvat huomattavasti pH 7:n yläpuolella siten, että silikapartikkelit kasvavat, mutta niiden aggregoitumista eikä siten geelautumista tapahdu. (Brinker, 1990)

R-arvolla ilmaistaan veden ja TEOSin moolisuhde. R-arvo 2 on teoreettisesti pienin arvo, jossa hydrolyysi ja kondensaatio voivat tapahtua täydellisesti. Tämän voi havaita netto-reaktioyhtälöstä:



Kuitenkaan käytännössä, vaikka veden määrä olisi riittävä R-arvolla 2, reaktio ei kuitenkaan etene loppuun. (Brinker, 1990)

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön käytännön osuudessa valmistettiin silikasta malli-implantti, joka sisälsi GFP:tä. GFP toimi biofarmaseuttisen lääkeaineen mallimolekyylinä. Silikaimplantin ominaisuuksista tutkittiin sen liukenemisnopeutta sekä proteiinin vapautumisnopeutta suorittamalla dissoluutio- eli liuotustestejä. Implanttia liuotettiin fysiologisia olosuhteita simuloivassa puskurissa.

Silikan pitoisuutta dissoluutionesteessä analysoitiin UV-Vis –spektroskopiolla. Dissoluutioliuoksesta otettiin näytteitä eri aikapisteistä ja niistä mitattiin liuenneen silikan pitoisuus UV-Vis –spektrofotometrillä aallonpituudella 815 nm. Liuenneen silikan määrä laskettiin ajan funktiona. GFP:n pitoisuuden määrittämiseen käytettiin fluoresenssimittausmenetelmää sekä aikaerotteista fluorometriaa mittaamalla dissoluutionesteestä otettuja näytteitä. Käytetyn GFP-liuoksen kokonaisproteiinipitoisuus mitattiin Bradford-menetelmällä. Kyseinen menetelmä mittaa liuoksen kaikkien proteiinien pitoisuuden eikä pelkän GFP:n pitoisuutta, joten GFP:n todellinen proteiinipitoisuus saattaa olla laskettua tulosta matalampi. Proteiinipitoisuuden perusteella valmistettiin implantteja, jotka sisälsivät 1 % GFP:tä implantin sisältämän silikan massaan suhteutettuna. GFP-liuosta konsentroidiin tangentialivirtaussuodatuksella proteiinipitoisuuden kasvattamiseksi.

### 5.1 Analyysimenetelmät

#### 5.1.1 UV-Vis –spektroskopia

UV-Vis –spektroskopia on monikäyttöinen, yksinkertainen, nopea ja tarkka mittausmenetelmä molekyylien ja alkuaineiden kvantitatiiviseen määrittämiseen. Se perustuu molekyylien kyvyllä absorboida itseensä valoa tietyllä aallonpituudella. Ultraviolettisäteily on sähkömagneettista säteilyä, joka esiintyy aallonpituusalueella 100-400 nm. Näkyvän valon aallonpituusalue on 400-800 nm. Molekyylit absorboivat valoa tietyllä aallonpituusalueella, mikä saa aikaan niiden elektronien virittymistä korkeammille energiatasoille. (Thermo Spectronic) (Mahler, 2011)

Mittausmenetelmä perustuu Lambert-Beerin lakiin, jota kuvastaa yhtälö:

$$A = \text{Log}_{10}(I_0/I) = \epsilon c l \quad (1)$$

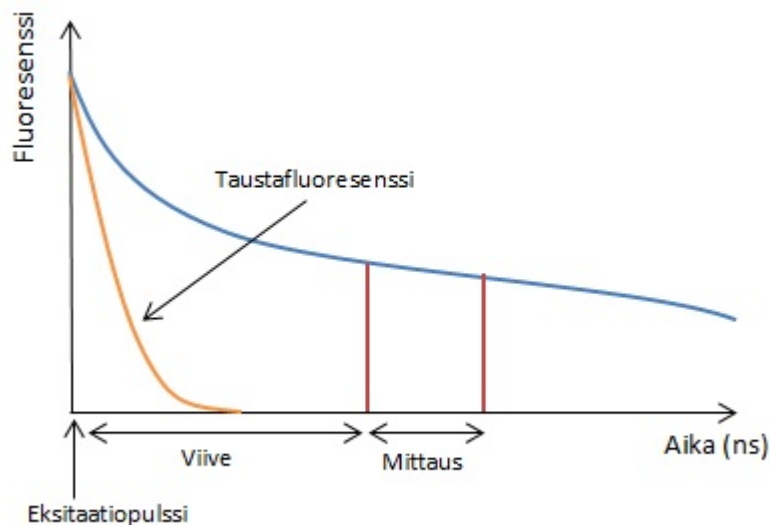


jossa  $A$  on mitattu absorbanssi,  $\epsilon$  molaarinen absorptiokerroin,  $c$  konsentraatio ja  $l$  valon kulkema matka. (Mahler, 2011)

### 5.1.2 Fluoresenssi ja aikaerotteinen fluorometria

Fluoresenssissa tapahtumaa, jossa molekyylit absorboivat fotoneja tietyllä aallonpituudella kutsutaan eksitaatioksi. Tapahtuma saa atomit virittymään. Emissio on käänteisilmio eksitaatiolle ja siinä molekyylit säteilee valoa tietyllä aallonpituudella lyhyen ajan kulltua eksitaatiosta. Fluoresenssin elinikä on aika, jolloin fotonin emissio voidaan yhä havaita. (Valeur, 2013)

Jotkut molekyylit ovat fluoresoivia luonnostaan. Esimerkiksi GFP sisältää näkyvästi emittoiva fluoroforeja. Fluoroforit aiheuttavat taustafluoresenssia, joka voi häiritä mitattavan signaalin havaitsemista, ja näin ollen vääristää mittaustuloksia. Käyttämällä aikaerotteista fluorometriaa fluoresenssin mittaamisessa pyritään poistamaan taustafluoresenssia. (Valeur, 2013) Kuviossa 2 on selitetty aikaerotteisen fluorometrian periaate.



Kuvio 2. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.

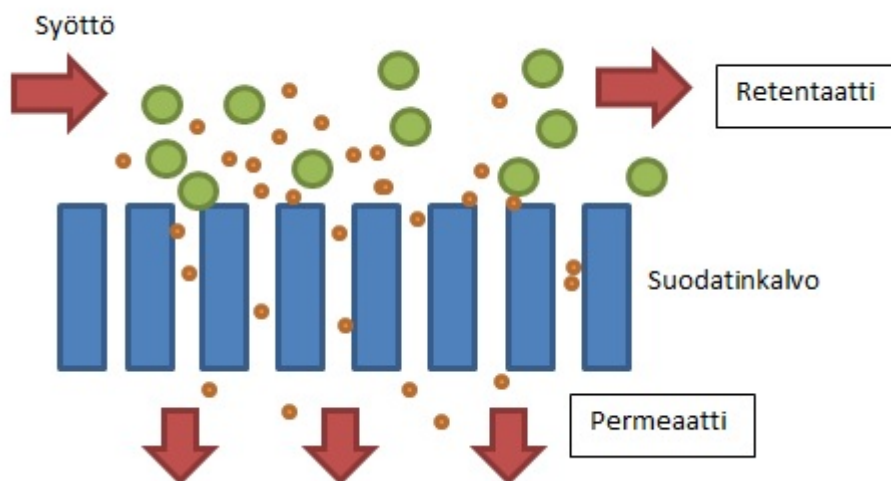
Mittauksessa fluoresoivan molekyylin emissio mitataan vasta pitkän viiveen jälkeen, joka on seurausta eksitaatiopulssista. Tämän viiveen aikana taustafluoresenssi laskee eikä se enää häiritse mittausta. (Valeur, 2013)

### 5.1.3 Bradford-menetelmä

Bradford on proteiinimääritysmenetelmä, jossa proteiinit reagoivat happaman Coomassie Brilliant Blue –väriaineen kanssa. Väriaine kiinnittyy proteiineihin, mikä aiheuttaa väriaineen absorptiomaksimin siirtymisen 465 nm:stä 595 nm:iin. Spektrofotometrisessä mittauksessa mitataan absorbtion muutos 595 nm:ssä. Mittausmenetelmä on hyvin nopea sekä herkkä ja toistettava; väriaineen tarttumisen tapahtuu 2 minuutissa ja värireaktio kestää stabiilina tunnin. (Bradford, 1976) Proteiinipitoisuus määritetään tunnetun proteiinin, kuten BSA:n (bovine serum albumin) eli naudan seerumin albumiinin standardisuorasta. (Janson, 2011)

### 5.2 Tangentiaalivirtaussuodatus

Tangentiaalivirtaussuodatus, tunnettu myös nimellä cross-flow-suodatus, on kalvosuodatusmenetelmä, jossa suodatettava aine virtaa poikkisuuntaisesti (tangentiaalisesti) suodatinkalvoon nähden. Pienimolekyyliset materiaalit läpäisevät suodatinkalvon ja isommat jatkavat kulkuaan. Kuvassa 2 havainnollistetaan tangentiaalivirtaussuodatuksen periaatetta.



Kuva 2. Tangentiaalivirtaussuodatuksen periaate.

Permeaatti on se osa, joka kulkeutuu kalvon läpi, kun taas retentaattia yleensä kierrätetään useaan otteeseen laitteiston läpi. Virtaussuunnan ollessa poikkisuuntainen eikä kohtisuora kalvoon nähden, kalvon tukkeutumista (fouling) ei tapahdu yhtä helposti.

Kova poikkivirtaus estää partikkeleita tarttumasta kalvon pinnalle ja suuri osa niistä irtoaa ja kulkeutuu uudelleen kiertoon. Kuvassa on havainnollistettu tangentialivirtaussuodatuksen periaate. Kiertävän systeeminä takia crossflow-suodatus onkin hyvin dynaaminen prosessi. (Janson, 2011. Wang, 2010)

### 5.3 Dissoluutiotestit silikaimplantilla

Silikan liukenemista tutkittiin upottamalla GFP:tä sisältävä silikaimplantti (250  $\mu$ l, 0,15 g) 200 ml:aan 0,05 M Tris-puskuria (pH 7.4) ja sekoittamalla sitä 80 rpm sekoittavassa inkubaattorissa +37 °C. Edellä mainitut parametrit mukailevat ihmiskehon omia nesteitä ja olosuhteita. In sink –olosuhteita pidettiin yllä liuotuksen aikana vaihtamalla puskuria uuteen 24 h välein. Tällä mahdollistettiin silikan vapaa liukeneminen.

GFP:n vapautumista mitattiin aikaerotteisella fluoresenssilla (HIDEX Sense). Liuenneen silikan määrä mitattiin UV-Vis spektrofotometrillä (UV-1601). Silikanäytteille suoritettiin ennen mittausta esikäsitely. Esikäsitelyn tarkoituksena on, että näytteen absorbanssi voidaan mitata spektrofotometrillä, kun apuna käytetään pelkistys–reaktiota, jossa 1-amino-2-hydrokso-4-naftaleenisulfonihapon avulla muodostetaan molybdeenisiinistä.

#### 5.3.1 Silikanäytteiden esikäsitely

Dissoluutionesteestä otettiin näytteitä eri määriä eri aikapisteissä ja otetut näytteet laimennettiin kukin 100 ml:ksi siten, että ensin pipetoitiin mittapulloon 5 ml 1,0 M suolahappoa (HCl) pH:n alentamiseksi, ennen kuin lisättiin näyte ja täytettiin merkkiin Milli-Q –vedellä. Dissoluutionesteestä otetut näytemäärät suhteutettiin arvioituun silikan määrään näytteessä niin, että laimennettaessa 100 ml:ksi, näyte osuisi mitattaessa spektrofotometrin mittaus-alueelle (0,1-1,2 mg Si/L). Siten esimerkiksi 1 tunnin aikapisteessä otettiin 15 ml näytettä, kun taas 24 tunnin aikapisteessä näytetilavuus oli 1 ml. pH alennettiin arvoon 1-1.8, sillä piihappo muodostaa happamassa liuoksessa molybdaattiliuoksen kanssa pelkistettävän kompleksiyhdisteen. Näytelaimennosten jälkeen otettiin 50 ml laimennosta ja lisättiin siihen 1 ml 0,5 M rikkihappoliuosta ja sekoitettiin. Tämän jälkeen lisättiin 2 ml ammoniumheptamolybdaattiliuosta, sekoitettiin ja odotettiin 10 minuuttia kompleksiyhdisteen muodostamiseksi. Sitten lisättiin 2 ml oksaalihappoliuosta, jonka avulla näytteestä poistetaan määritystä häiritsevät muut ionit, jotka muodostavat molyb-

deenin kanssa kompleksiyhdisteitä. Oksaalihapon lisäyksen jälkeen lisättiin 30-60 sekunnin kuluessa 1 ml pelkistysreagenssia, jonka jälkeen odotettiin ennen mittausta 20 minuuttia. Pelkistysreagenssin sisältämät sulfiitti ja 1-amino-2-hydrokso-4-naftaleeni-sulfonihappo pelkistävät kompleksiyhdisteen molybdeenisiniseksi, jonka absorbanssi mitataan aallonpituudella 815 nm. Absorbanssin ja standardisuoran yhtälön (Liite 1) perusteella laskettiin silikan pitoisuus.

### 5.3.2 In sink –rajan testaus

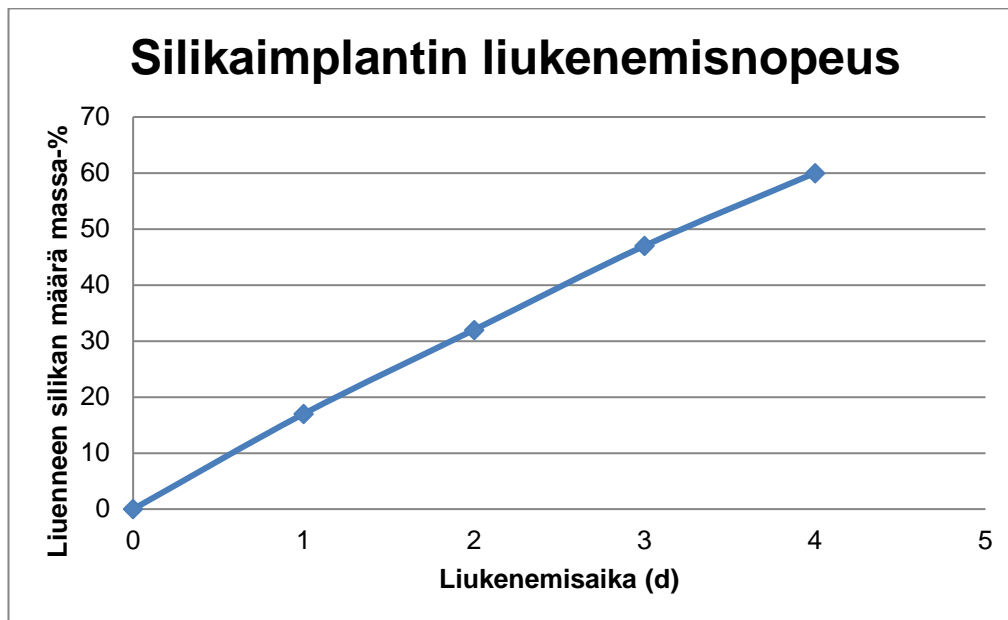
Silikan in sink –rajaa tutkittiin liuottamalla silika-implanttia (R20) 50 ml:ssa 0,05 M Tris-puskuria 24 h, lämpötilan ollessa + 37 °C. Puskurin pH oli 7.4. Puskurista otettiin näytteitä eri aikapisteistä ja niistä mitattiin liuenneen silikan pitoisuus UV-Vis –spektrofotometrillä aallonpituudella 815 nm ja laskettiin liuenneen määrä ajan funktiona. Seurattiin in sink –rajan (30 ppm) ylityspistettä.

Implantteja liuotettiin aina 3 kappaletta rinnakkaisten tulosten vertailun vuoksi. In sink –rajan ylittyminen optimoitiin 24 h tunnin kohdalle näytteenoton helpottamiseksi. Tämän saavuttamiseksi kasvatettiin puskurin volyymiä 200 ml:aan. Pienennettiin myös implantin kokoa 1 ml:sta 250 µl:aan. Implantin massa pieneni kokoa muutettaessa n. 1,2 g:sta n. 0,15 g:aan, joten sen rakenne muuttui oletettavasti tiiviimmäksi ja vähemmän nestettä suhteessa kokoon sisältäväksi. Lisättiin hidas sekoitus 80 rpm, sillä ihmiskehon sisälläkään nesteet eivät pysy paikallaan, vaan ovat jatkuvassa virtausliikkeessä. Sekoitus myös ehkäisee virheellisten gradienttinäytteiden ottamista varmistuen, että liuenneen silika on tasaisesti sekoittuneena nesteessä.

### 5.3.3 Silikaimplantin liukenemisnopeuden tutkiminen

Silikaimplantin liukenemisnopeutta tutkittiin liuottamalla implantteja samalla tavalla, kuin tehtiin in sink –raja –testauksissa. Implantti punnittiin ja laitettiin liukenemaan 200 ml:aan 0,05 M Tris-puskuria, lämpötilassa + 37 °C, pH 7.4 ja sekoituksella 80 rpm. Implanttia liuotettiin yhteensä 4 vuorokautta siten, että puskurista otettiin näyte aina 24 tunnin välein. In sink –olosuhteita pidettiin yllä vaihtamalla puskuri aina uuteen 24 tunnin kohdalla näytteenoton jälkeen. Näytteistä mitattiin silika-pitoisuus UV-Vis –spektrofotometrillä aal-

lonpituudella 815 nm ja saaduista tuloksista laskettiin liuenneen silikan osuus massaprosentteina. Kuvioon 3 on piirretty esimerkkikuvaaja erään implantin (R20) liukenemisnopeuden määrittämisestä.



Kuvio 3. Silikan liukenemisnopeus.

Kuvioon on laskettu kumulatiivisesti liuenneen silikan määrä massaprosentteina ajan funktiona.

#### 5.4 GFP:n kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen ja konsentrointi

Käytetty GFP oli puhdistettua (eGFP; puhdistettu (IEX); 14.2.08 JAE; BIOTS 05b), mutta se puhdistettiin uudelleen sentrifugoimalla 9000 rpm 20 min sekä ruiskusuodatuksella (VWR; 25 mm Syringe filter w/ 0.45 µm Polyethersulfone membrane; Batch No. 12447882) kunnes sakkaa ei muodostunut. Käytetyn GFP-liuoksen kokonaisproteiinipitoisuus ei ollut tiedossa, joten sille suoritettiin kokonaisproteiinipitoisuusmäärittäminen Bradford-menetelmällä (Ks. Liite 2). Absorbanssi mitattiin HIDEX Sense:llä aallonpituudella 595 nm. Albumiinista (Albumin standard; conc. 2.0 mg/ml in a 0.9 % aqueous NaCl solution containing sodium azide; Lot # Q1220824; Thermo Scientific) tehdyn, keskiarvoihin perustuvan standardisuoran (Liite 3) perusteella määritettiin GFP:lle kokonaisproteiinipitoisuus.

GFP:n kokonaisproteiinipitoisuus oli liian alhainen sopivan geelin (R-arvo välillä R15 – R30) valmistamiseksi, joten liuosta oli konsentroitava. GFP-liuos konsentroidiin Pellicon 5K (5 kDa) -tangentialivirtaussuodatuksella kahteen otteeseen. Virtausnopeus oli 30 ml/min, 70 rpm, joka säädettiin virtausnopeustestin perusteella. Konsentroidusta liuksesta mitattiin uusi proteiinipitoisuus.

### 5.5 GFP:n ja silikan häiriötestaus

Silikalle ja GFP:lle suoritettiin häiriötestaus. Testissä tutkittiin, häiritseekö GFP:n läsnäolo mitattavassa nesteessä silikan mittaamista spektrofotometrillä tai päinvastoin häiritseekö silika GFP:n fluoresenssimittauksia. Suoritettiin kaikille näytteille esikäsittely samalla tavalla kuin silikanäytteitä mitatessa. Mitattiin ensin spektrofotometrillä pelkällä silikalla saturoituneen liuoksen silikapitoisuus sekä saman liuoksen pitoisuus, kun siihen oli lisätty GFP:tä. Testattiin myös mittaamalla pelkkää Tris-puskuria, johon lisättiin GFP:tä.

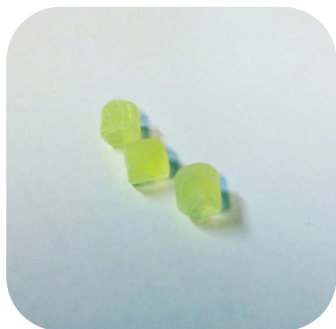
GFP:n häiriötestaus suoritettiin pipetoimalla 96-kuoppalevyllä saturoitunutta silika-liuosta (samaa kuin yllä mainittu) ja liuosta, jossa oli tiedetty pitoisuus GFP:tä lisättyinä. Mitattiin kuopista fluoresenssi (HIDEX Sense) eksitaatiolla 485 nm ja emissiolla 535 nm.

### 5.6 GFP:tä sisältävän silika-implantin valmistus

Valmistettavalle implantille määritettiin sopiva veden ja TEOSin moolisuhde, eli R-arvo, sooli-geeli –laskurin avulla (Liite 4). Tavoitteena oli saada geelin lopulliseksi R-arvoksi 15, sillä se on teknisesti helppo valmistaa. Tarvittavan GFP-liuoksen määrä määritettiin geelissä niin, että GFP:n massan osuus on suhteessa 1 % geelissä olevan silikan ( $\text{SiO}_2$ ) kokonaismassasta. Geelin valmistuksessa GFP-liuos toimi soolin neutralointiliuoksena. Valmistetun geelin lopulliseksi R-arvoksi saatiin 20,0.

Geeli valmistettiin kaksivaiheisella sooli-geeli –prosessilla. Ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin 50 ml soolia. Soolin valmistuksessa, hydrolyysissa, lähtöaineena oli tetraetyyliortosilikaattia (TEOS),  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , joka reagoi veden (Milli-Q, 18,2 M $\Omega$ ) kanssa. Katalysaattorina käytettiin suolahappoa (HCl) ja aineet reagoivat keskenään happamassa pH-arvossa (pH 2). TEOSin ja veden moolisuhde oli soolissa 10,0.

Prosessin toisessa vaiheessa, geelin muodostamisessa, pH nostettiin arvoon 6-7 NaOH:n avulla. Vasta kun pH oli tasoittunut haluttuun pH-arvoon, lisättiin GFP, sillä se ei säily aktiivisena alhaisissa pH-lukemissa (Campbell, 2001). Geelautuminen tapahtuu NaOHin lisäämisen jälkeen nopeasti neutraalissa pH-arvossa, joten GFP-liuos oli sekoitettava nopeasti soolin joukkoon homogeeniseksi seokseksi. GFP-sooli valettiin 96-kuoppalevyille (à 250 µl/kuoppa), jolle se geelautui implanteiksi. Kuvassa 3 on valmiita GFP-implantteja.



Kuva 3. Havaintokuva GFP-implanteista.

Implanttien annettiin geelautua yhden vuorokauden ajan jääkaappilämpötilassa.

### 5.7 GFP:n vapautumisen tutkiminen dissoluutiotesteillä

GFP:n vapautumista implanteista tutkittiin liuottamalla implantteja 0,05 M Tris-puskuriin, + 37 °C, pH 7.4, 80 rpm sekoituksella 4 vuorokauden ajan. Näytteitä otettiin GFP-mittauksia ja silika-mittauksia varten 24 tunnin välein. In sink –olosuhteita ylläpidettiin vaihtamalla puskuri uuteen näytteenoton jälkeen 24 h välein.

In sink –olosuhteiden pysyvyys (eli silikan pitoisuus nesteessä kokoajan <30 ppm) tarkistettiin mittaamalla silikan pitoisuutta UV-Vis –spektrofotometrillä aallonpituudella 815 nm. GFP:n vapautumista tutkittiin mittaamalla GFP:n aktiivisuutta näytteistä fluoresenssilla ja aikaerotteisella fluoresenssilla (HIDEX Sense) Viritysaallonpituus (eksitaatio) oli 485 nm ja mittausaallonpituus (emissio) 535 nm.

## 6 TULOKSET JA POHDINTA

Suoritetuista dissoluutiotesteistä tutkittiin silikaimplantin liukenemisnopeutta. Tämän selvittämiseksi liuotettiin useita implanteja ja liuotuksista saatujen tulosten perusteella voitiin määrittellä R-20- reseptillä valmistetuille implanteille liukenemisnopeus. Myös GFP:n vapautumisnopeutta tutkittiin, mutta se pystyttiin määrittämään vain teoreettisesti, sillä fluoresenssimittauksissa ei havaittu lainkaan GFP:tä.

### 6.1 In sink –rajan testaus ja optimointi

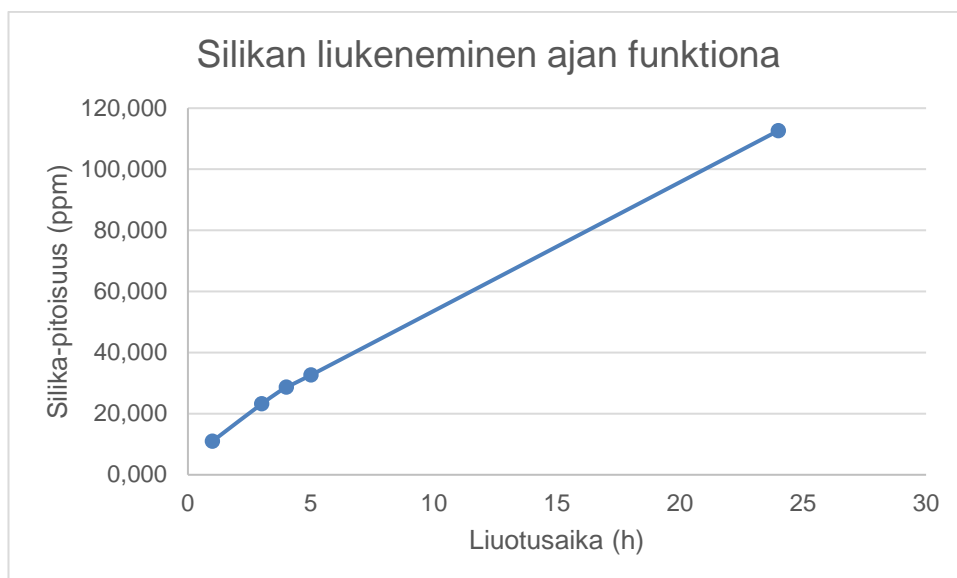
Taulukossa 1 on mitattu liuenneen silikan pitoisuutta 5 eri aikapisteessä.

Taulukko 1. In sink –rajan testaus

Näyte	Absorbanssi	Mitattu Si-konsentraatio mg/L	SiO <sub>2</sub> -pitoisuus dissoluutionesteessä (ppm)	Liuotusaika (h)
1	0,585	0,7702	10,98	1
2	0,412	0,5422	23,20	3
3	0,509	0,6700	28,68	4
4	0,579	0,7623	32,63	5
5	0,4	0,5264	112,64	24

Taulukosta havaitaan, että 24 tunnin jälkeen silikaa oli liennut nesteeseen 112,64 ppm. Liitteessä 5 on esitetty laskuesimerkki taulukon tuloksista. Kuvio 4 havainnollistaa myös silikan liukenemistä ajan funktiona sekä in sink –rajan määrittämistä.





Kuvio 4. In sink -rajan testaus.

Taulukosta 1 piirretty kuvio osoittaa, että silikan in sink –raja (30 ppm) käytetyissä olosuhteissa ylittyisi n. 5 tunnin kohdalla.

Kasvattamalla Tris-puskurin tilavuus 200 ml:aan ja pienentämällä implanttikoko 250 µl:aan (paino 1,2 g:sta 0,15 - 0,11 g:aan) in sink –raja saatiin optimoitua niin, että silikan pitoisuus dissoluutioliuksessa ei ylity ennen 24 tunnin aikapistettä. Taulukko 2 havainnollistaa tehtyjä mittauksia.

Taulukko 2. In sink -rajan optimointi.

Näyte	Absorbanssi	Mitattu Si-konsentraatio mg Si/L	Silika-pitoisuus dissoluutioliuksessa (ppm)	Liuotusaika (h)
21.1	0,192	0,2522	17,993	21
21.2	0,174	0,2285	16,301	21
22.1	0,139	0,1824	19,516	22
22.2	0,112	0,1468	15,709	22
23.1	0,115	0,1508	16,132	23
23.2	0,119	0,1560	16,696	23
24.1	0,125	0,1639	35,084	24
24.2	0,119	0,1560	33,392	24
24.3	0,141	0,1850	39,596	24

Taulukosta nähdään kolmen eri implantin liuotustulokset. Kahdesta implantista (21-24.1 ja 21-24.2) on otettu 21-24 h:n aikapisteen kohdalla näytteet ja yhdestä implantista

(24.3) on otettu pelkkä yksi näyte 24 h:n aikapisteen kohdalla. Tällä pyrittiin havaitsemaan eroja näytteenotossa, jossa puskuria poistuu aina joka näytteenoton yhteydessä liuotusastiasta otetun näytteen tilavuuden verran. Poistettu nestemäärä korvataan lisäämällä näytetilavuuden verran uutta puskuria tilalle. Taulukosta nähdään, että koska implantin 24.3 dissoluutionesteestä ei olla otettu kuin yksi näyte eli nestettä ei ole poistettu eikä lisätty kertaakaan 24 tunnin aikana, silikan pitoisuus on hieman korkeampi verrattuna kahteen muuhun liuotettuun implanttiin (21-24.1 ja 21-24.2). Liuenneen silikan pitoisuus kaikissa liuotuksissa on kuitenkin selvästi alle 30 ppm (in sink –olosuhteet), joten katsottiin, että pitoisuuseroja ei tarvitse ottaa huomioon.

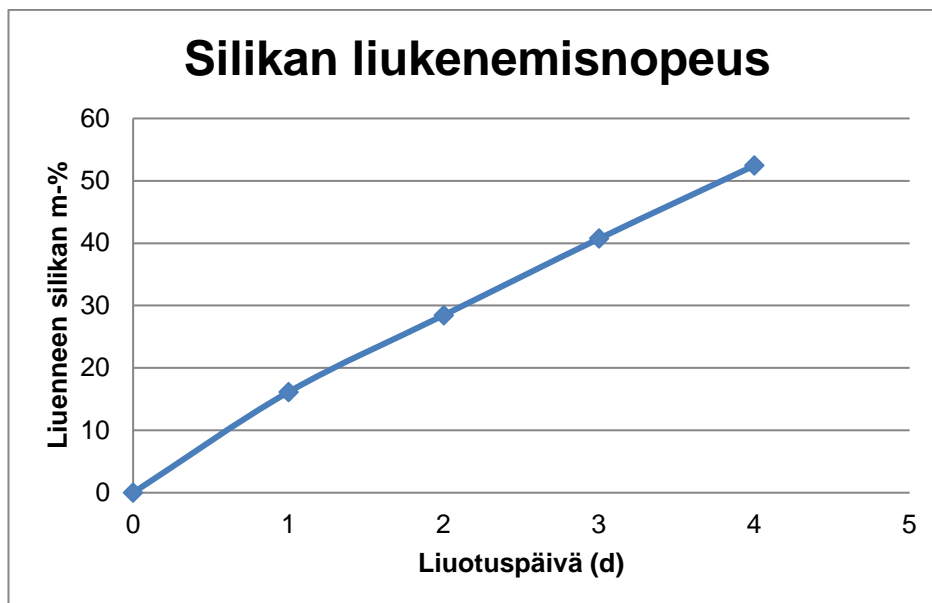
## 6.2 Silika-implantin liukenemisnopeus

Silika-implantin liukenemisnopeus määritettiin liuonneen silikan määrästä neljän vuorokauden ajalta. Taulukko 3 näyttää liuonneen silikan määrän jokaisena liuotuspäivänä.

Taulukko 3. Silikan liukenemisnopeus

Si-konsentraatio dissoluutionesteessä (mg/L)	SiO <sub>2</sub> -konsentraatio dissoluutionesteessä (ppm)	Liuenneen silikan massa (µg)	Liuenneen silikan massa (m-%)	Liuenneen silikan m-% kumulatiivisesti laskettuna	Liuotuspäivä
9,634	20,62	4123,19	16,13	16,13	1
7,36	15,75	3150,21	12,32	28,46	2
7,327	15,68	3136,11	12,27	40,73	3
6,998	14,98	2995,10	11,72	52,44	4

Liuenneen silikan määrä massaprosentteina laskettiin liuonneen silikan massasta suhteutettuna implantin sisältämän silikan kokonaismassaan (Liite 6). Kuvio 5 havainnollistaa silikaimplantin liukenemisnopeutta, kun jokaisen päivän liuennut silikan määrä massaprosentteina lasketaan kumulatiivisesti ja tarkastellaan sitä ajan funktiona.



Kuvio 5. Silikaimplantin liukenemisnopeus.

Kuviosta nähdään, että 4 vrk:n jälkeen implantista oli liuennut n. 50 %. Tämän perusteella implantti liukenesi kokonaisuudessaan n. 8 vuorokaudessa. Kaikkien saatujen tulosten perusteella silikan liukenemisnopeus vaihteli välillä 6-8 vuorokautta.

### 6.3 GFP:n kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen ja konsentroidin

GFP-liuoksen lopulliseksi tilavuudeksi jäi 17,5 mL kahden konsentroidin jälkeen. Bradford-menetelmällä saatu kokonaisproteiinipitoisuus oli 3593,56 µg/ml (Liite 3). GFP-liuoksen tilavuudeksi jäi noin 2/3 alkuperäisestä tilavuudesta, mutta vastaavasti proteiinipitoisuus kasvoi n. kaksinkertaiseksi. Pellicon 5K –suodattimen kunnosta ei ollut varmuutta, sillä sitä oli käytetty useita kertoja aikaisemmin, eikä viimeisimmästä käyttökerästä ollut tietoa.

### 6.4 Silikan ja GFP:n häiriötestaus

Silikan ja GFP:n häiriötestauksessa todettiin, että kumpikaan materiaali ei häiritse toistensa mittauksia. Taulukossa 4 on esimerkki spektrofotometrimittauksista, joissa testattiin, häiritseekö GFP silikapitoisuuden mittausta.

#### Taulukko 4. Silika-GFP-häiriötestaus

Näyte	Absorbanssi		Selitys
1	0,365	0,359	silikalla saturoitu vesi
2	0,332	0,331	silikalla saturoitu vesi GFP:llä
3	0,008	0,010	vesi ilman silikaa ja GFP:tä
4	0,020	0,004	GFP-vesi ilman silikaa

Taulukosta nähdään, että mittaus antaa samankaltaisen tuloksen näytteille, joissa on sama määrä silikaa huolimatta siitä, onko näytteessä GFP:tä vai ei. Fluoresenssimittauksissa silika ei häirinnyt GFP:n signaalia.

### 6.5 GFP:tä sisältävän implantin valmistus

GFP:n osuus implantissa olevan silikan määrästä massaprosentteina haluttiin olevan 1-5%. GFP-liuoksen proteiinipitoisuus oli niin alhainen, 3593 µg/ml, että pystyttiin valmistamaan vain 1 %:n GFP-implantteja silikan teoreettisen määrän suhteen. Suuremmilla massaprosenttiosuuksilla ei pystytty kehittämään R-arvoltaan tavoiteltua implanttia (R15), sillä GFP-liuoksen tarve olisi ollut suurempi kuin geelin valmistamiseen käytettävän neutralointiliuoksen osuus. Päästiin kuitenkin hyvin lähelle haluttua lopputulosta, kun geelin lopullinen R-arvo oli 20.

Edellä mainittu proteiinipitoisuus saavutettiin GFP-liuoksen konsentroinnilla tangentiaalivirtausuodatuksella. Ennen konsentroitua GFP:n pitoisuus oli n. 1500 µg/ml. Konsentroidi ei nostanut GFP:n proteiinipitoisuutta odotetulla tavalla, mutta pitoisuus saatiin kuitenkin tarpeeksi korkeaksi, jotta pystyttiin valmistamaan 1% geeli GFP:n suhteen. Konsentroidin pienemmät vaikutukset saattoivat johtua joko GFP-liuoksen koostumuksesta ja puhtaudesta tai vaihtoehtoisesti suodatinlaitteiston puhtaudesta. Valmiin GFP-liuoksen aikaisemmasta käytöstä ei ollut varmuutta lukuun ottamatta tietoa siitä, että liuos oli aiemmin puhdistettu ioninvaihtokromatografialla. Ruiskusuodatuksista huolimatta proteiinissa saattoi olla jäämiä muista epäpuhtauksista, mikä olisi voinut vaikuttaa osaltaan konsentroidin onnistumiseen. Proteiiniliuosta konsentroidaessa jouduttiin vaihtamaan kerran kalvosuodattimen kasettia, sillä se vaikutti olevan tukossa suoritetuista alkupuolista ja puhdistusyrityksistä huolimatta. Toinen kasetti puhdistettiin aluksi, mutta ei on-

nistuttu tarkastamaan, oliko kalvo vielä suodatuskelpoinen. GFP-liuosta pystyttiin kuitenkin laitteistolla konsentroimaan, mutta suodatuskalvon tehosta suodattaa täydellisesti kaikki muut kuin GFP-partikkelit pois, ei voitu siitä huolimatta olla varmoja.

## 6.6 GFP:n vapautuminen

GFP:tä ei havaittu näytteissä lainkaan fluoresenssimittauksissa.

Taulukko 5. GFP:n fluoresenssimittaukset.

Blank-corrected (RFU)	Implantti 1			Implantti 2			Implantti 3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Päivä 1	22	22	23	0	18	175	17	0	0
Päivä 2	0	0	33	9	0	2	51	117	0
Päivä 3	15	0	85	0	0	0	37	13	35

Taulukosta nähdään, että näytteet eivät anna signaalia. Taulukko antaa tulokset kolmen eri implantin liuotuksista kolmen päivän ajalta rinnakkaisnäytteineen. Signaalia ei havaittu tavallisilla fluoresenssimittauksilla eikä aikaerotteisella fluoresenssilla. Aikaerotteisessä fluoresenssissa mittausviive saattoi olla liian pitkä, minkä takia GFP:tä ei voitu mittauksissa havaita. Fluoresenssimittaustenkaan perusteella ei signaalia kuitenkaan havaittu. Mikäli aikaerotteisella fluoresenssilla signaali ehtii laskea viiveen aikana, on fluoresenssi parempi menetelmä GFP:n mittaamiselle.

Laskettiin GFP:lle teoreettinen vapautumisnopeus (Liite 7). GFP:tä pitäisi liueta implantista vain 1,34 ppm, kun koko implantti on liuennut. Tehtiin HIDEX Sense -laitteelle GFP-liuoksen avulla mittausalarajatesti, jonka avulla tutkittiin kuinka pieniä pitoisuuksia laitteella voi mitata. Testi tehtiin varmistamaan, että teoriassa GFP:tä vapautuva määrä voidaan havaita mittalaitteella. GFP:tä, jonka kokonaisproteiinipitoisuus oli aikaisemmin määritetty Bradford-menetelmällä, laimennettiin eri suhteissa ja mitattiin fluoresenssi.

Taulukko 6. Mittausalarajatesti.

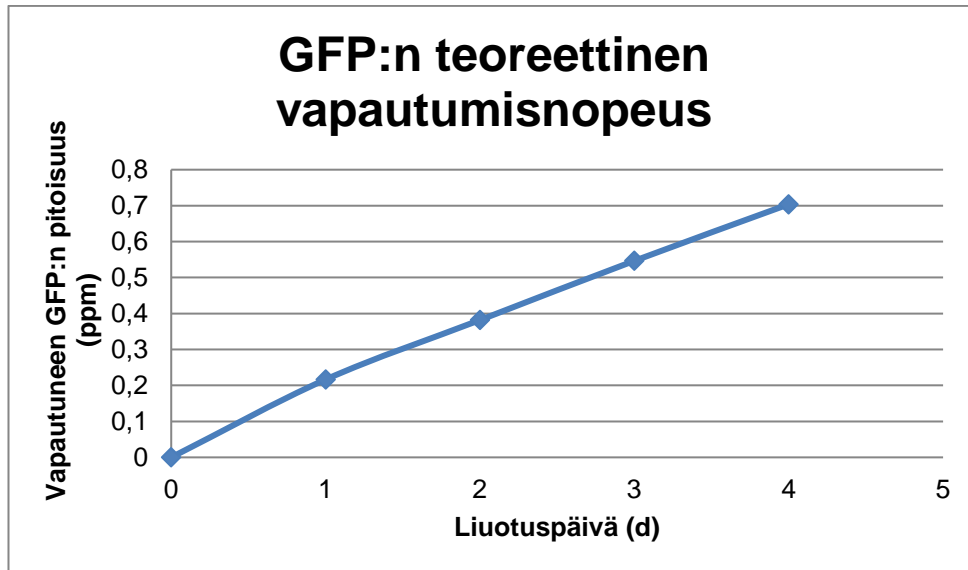
Laimennussuhde	RFU		GFP:n laskennallinen pitoisuus (ppm)
	1:100	46485	
1:1000	2825	2136	3,6
1:2000	1066	1152	1,8
1:3500	635	869	1,0
1:5000	483	457	0,7
Blank	0	46	0

Tehdyn testin perusteella fluoresenssi on mitattavissa alhaisimmillaan ainakin 0,7 ppm:n pitoisuuksissa asti. GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus on kuitenkin vain n. 0,2 ppm päivässä.

Taulukko 7. GFP:n teoreettinen vapautuminen

Liutospäivä	Liuenneen silikan massa ( $\mu\text{g}$ )	Liuenneen GFP:n osuus teoriassa ( $\mu\text{g}$ )	m-%	Liuenneen GFP:n määrä (ppm)	Määrä kumulatiivisena (ppm)
1	4123,19	43,29	16,13	0,221	0,221
2	3150,21	33,08	12,32	0,169	0,389
3	3136,11	32,93	12,27	0,168	0,557
4	2995,10	31,45	11,72	0,160	0,717

Taulukossa 7 on tulokset GFP:n teoreettisesta vapautumisesta, joka on laskettu eräästä implantista (ks. Taulukko 3) liuenneen silikan määrästä. GFP:tä vapautuva määrä on suhteutettu niin, että sen määrä liuenneen silikan massasta on 1,05 %. Kun vapautuneen GFP:n pitoisuus lasketaan kumulatiivisesti, voidaan tutkia sen vapautumisnopeutta (Kuvio 6) Taulukosta havaitaan, että neljän päivän liuotuksen jälkeen ollaan kuitenkin hyvin lähellä mittausalarajaa, sillä neljässä päivässä GFP:tä oli vapautunut 0,717 ppm kokonaisuudessaan.



Kuvio 6. GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus

GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus on oletettava enintään samaksi kuin silikan määritetty liukenemisnopeus, sillä ei ole tutkimustuloksia siitä, vaikuttaako silikan liukenemistahti GFP:n vapautumisnopeuteen. Koska ollaan hyvin lähellä mittausalarajaa, GFP:n konsentroiminen vielä vahvemmassa saattaisi antaa mitattavissa olevia tuloksia.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Dissoluutiokokeet osoittivat, että silika-implantti voi liueta kokonaisuudessaan ihmiskehon nesteiden kaltaisissa olosuhteissa. Liukenemisnopeuden tarpeen määrittää implantin sisältämä lääkeaine, jota halutaan vapauttaa halutulla nopeudella sekä kehon osaan, johon implantti tullaan istuttamaan.

Silikan in sink –raja optimoitiin ylittymään yhden vuorokauden kohdalla. Voitaisiin myös toimia päinvastoin niin, että in sink –raja pienennettäisiin hyvin nopeasti ylittävaksi. Tämä tarkoittaisi sitä, että yhden työpäivän (8 h) aikana in sink –olosuhteiden ylläpitämiseksi puskuria olisi vaihdettava useammin. Samalla saataisiin nopeasti useita näytteitä eri aikapisteistä, ja nopeammin mittaustuloksia, joista voitaisiin tutkia paitsi silikan liukenemisominaisuuksia, myös mahdollisesti GFP:n vapautumiseen liittyviä ongelmakohtia, eikä tutkimus veisi niin paljon aikaa.

Tutkimusten edetessä GFP:tä olisi kannattavaa konsentroida tarpeeksi. Mitä suurempi on käytetyn GFP-liuoksen kokonaisproteiinipitoisuus, sen helpompi on valmistaa halutun R-arvon implantteja. Opinnäytetyössä käytetyn GFP-liuoksen pitoisuus oli verrattain alhainen, ja se tuotti ongelmia oikeanlaisen geelireseptin rakentamisessa. GFP:n osuus silikan massasta on katsottu olevan riittävä, kun se on 1-5%. Osuuden haluttiin olevan työssä 5 %, mutta liian laimean GFP-liuoksen takia osuus jouduttiin jättämään 1 %:iin, sillä vahvempaa ei pystytty valmistamaan haluttuun geelireseptiin. GFP-liuosta käytettiin geelin valmistamisessa samalla sooliin lisättävänä neutralointiliuoksena. GFP-liuoksen tarve 5 %:ssa geelissä olisi ollut suurempi kuin sooliin lisättävän neutralointiliuoksen määrä, joten haluttu geeli (R20) olisi käytännössä mahdotonta toteuttaa. Suuremmilla proteiinipitoisuuksilla ei ilmenisi tällaista ongelmaa. Myös GFP:n valmistaminen itse alusta asti pienentäisi ongelmatarpeita edellä kuvatuissa asioissa.

GFP:tä ei havaittu fluoresenssimittauksissa lainkaan, ja laskelmat osoittivatkin, että GFP:tä liukenisi kokonaisuudessaan vain 1.34 ppm sinä aikana, kun koko silika-implantti liukenee (n. 6-8 päivässä). 4:n päivän liuotustulokset osoittivat, että GFP:tä oli liuennut noin 0,7 ppm, joka on samalla mittaustuloksella GFP:n fluoresenssimittauksille. Tämä osoittaa, että ollaan kuitenkin verrattain lähellä havaittavia tuloksia. Mikäli GFP:n osuus geelissä pystyttäisiin nostamaan 5 % suhteutettuna silikan massaan, onnistuneita mittaustuloksia voitaisiin luultavasti saavuttaa. Tämä vaatisi edelleen GFP:n konsentroidusta vahvemmaksi.



GFP:n aktiivisuuteen olisi syytä perehtyä enemmän. Yksi syy GFP:n signaalin puuttumiseen voi olla se, että GFP on menettänyt aktiivisuutensa prosessin aikana. Se, missä kohtaa aktiivisuus olisi kadonnut, on epäselvää. Mitattaessa GFP:n pitoisuutta aikaerotteisella fluoresenssilla, menetelmässä käytetty mittausviive taustasignaalin poistamiseksi on voinut olla liian pitkä, jolloin GFP:n signaali on ehtinyt jo laskea ennen mitausta. Tämän perusteella mittausviivettä on joko laskettava, tai mitattava pelkällä fluoresenssimenetelmällä, jossa ei käytetä mittausviivettä. Implanttien on hyvä antaa ikäännyä ennen dissoluutiotestejä jonkin aikaa, jotta niiden rakenne saavuttaisi lopullisen muotonsa, ja jonka seurauksena niistä poistuisi ylimäärät nesteitä, kuten etanolia pois. Implantin valmistusvaiheessa syntyvän etanolin voi haihduttaa pois prosessin ollessa soolivalmistusvaiheessa, ja sen voi korvata lisäämällä haihtuneen etanolin tilalle vettä. Ikäänntyneen implantin liukeneminen on tasaisempaa kuin tuoreen implantin, jonka kohdalla liukenemisnopeus saattaa olla alussa nopeampaa ja tasoittua/hidastua loppua kohden.

Lisäksi voitaisiin tutkia GFP:n mahdollista reagoimista liuotusastian kanssa. GFP voi esimerkiksi vapauduttuaan tarttua tietyistä materiaalista tehdyn astian seinämiin kiinni. Tämä voisi selittää myös sitä, miksi GFP:tä ei havaittu mittauksissa. Liuotustesteissä käytettiin muoviasioita, sillä lasiasioista irtoava silikaatti häiritsee silikan mittausta. Muoviasitioiden materiaaliin voisi tulevissa kiinnittää huomiota tai testata, onko GFP:llä taipumusta tarttua kiinni.

Lääkeaineita tutkiessa on otettava huomioon valtavasti asioita ennen kuin ne pääsevät markkinoille. Biofarmaseuttisille aineille laatu ja turvallisuus ovat avainasemassa, mikä tekee niiden tutkimus- ja kehitysprosessista osittain haasteellista ja aikaa vievää. GFP toimii hyvänä mallina biofarmaseuttisille aineille. Se on kestävä ja helppo paikantaa. Tästä huolimatta tarvitaan kuitenkin lisää tutkimustietoa GFP:n käyttäytymisestä dissoluutiokokeissa sekä mittausmenetelmien kehitystä.

## LÄHTEET

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 – 254.

Brinker, J. & Scherer, G., 1990. SOL-GEL SCIENCE: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego: ACADEMIC PRESS, INC.

Campbell, T., Choy, F. 2001. The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review. *Molecular Biology Today* (2001) 2(1): 1-4.

Dimitrov, DS. Julkaisussa: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2012, Vol.899, pp.1-26

Iler, R. K. 1979. *The chemistry of silica*

Janson, J-C. 2011. *Methods of Biochemical Analysis: Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Third edition.

Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A., Koskinen, M. 2010. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. Patentnumero: US 2010/0119500 A1

Mahler, H-C. Jiskoot, W. 2011. *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*

Nassar, E.J. et al. 2011. *Biomaterials and Sol-Gel Process: A Methodology for the Preparation of Functional Materials*. Universidade de Franca, Franca, Sao Paulo, Brazil

Seppälä, J. Uudet polymeeripohjaiset biomateriaalit. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. 2004;120(10):1203-9 Pekka Vallittu, Timo Närhi, Allan Alho, Antti Yli-Urpo

O'Brien, F. J. 2011. *Biomaterials and scaffolds for tissue engineering*. *Materials Today*, Volume 14, Issue 3

Popescu, M. A. 2011. *Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine: Drug Delivery*

Protein Databank in Europe.Green Fluorescent Protein. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>

Ratner, B. D. 2004. A history of biomaterials. In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 10-19.

Schmidt, S. R. 2013. *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals : Applications and Challenges*. 75-77.

Thermo Scientific. *Instructions. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit*

Thermo Spectronic. *Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications*. [http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle\\_file\\_imports/359201.PDF](http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/359201.PDF)

Törmälä, P. (toim.) 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin. *Lääkelaitoksen julkaisusarja*. 3, osa 1.

Ulery, B D., Lakshmi S.N, Cato, T. 2011. *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics* 49.12 (2011): 832–864.

Valeur, B. Berberan-Santos, M. N. 2013. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Second edition.

Valvira, 2015. Biomateriaalit. [www.valvira.fi](http://www.valvira.fi) >terveydenhuolto>terveysteknologia>biomateriaalit

Wang, L. K. Chen, J. P., Hung, Y-T. 2010 Handbook of Environmental Engineering, 13: Membrane and Desalination Technologies

Wahlfors, J., Loimas, S., Pasanen, T., Hakkarainen, T. 2001. Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. Histochemistry and Cell Biology. 2001 Jan;115(1):59-65.

WHO, 2013. Biotherapeutic products.

<http://www.who.int/en/> >programmes>biologicals>biotherapeutics>biotherapeutic products

## Piin standardisuora

Standardisuoraa varten valmistetaan Si-käyttöliuos, jonka pitoisuus on 50 mg/L. Käyttöliuos valmistetaan Si-standardiluoksesta, jonka pitoisuus on 1000 mg Si/L pipetoimalla 1,25 ml standardiliuosta 25 ml:n mittapulloon ja täyttämällä merkkiin. Standardisuoraa varten tarvitaan 7 eri vahvuista vertailuliuosta, jotka on valmistettu pipetoimalla 100 ml:n mittapulloihin Si-käyttöliuosta. Pipetoidaan alla olevan taulukon mukaisesti.

Taulukko. Vertailuliuosten pipetointilavuudet ja pitoisuudet

Vertailuliuos	Pipetointilavuus (ml)	Lopullinen Si-pitoisuus (mg/L)
1	0,2	0,1
2	0,4	0,2
3	0,8	0,4
4	1,2	0,6
5	1,6	0,8
6	2,0	1,0
7	2,4	1,2

Suoritetaan näytteille esikäsitely, ja mitataan absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 815 nm. Näytteiden silikapitoisuudet lasketaan standardisuoran yhtälönperusteella.

Taulukko. Piin standardisuora

Piin standardisuora	
Conc. (mg/L)	Abs.
0	0,00005
0,1	0,07674
0,2	0,1485
0,4	0,29869
0,6	0,4669
0,8	0,61255
1	0,75885
1,2	0,90512

Standardisuoran yhtälö:

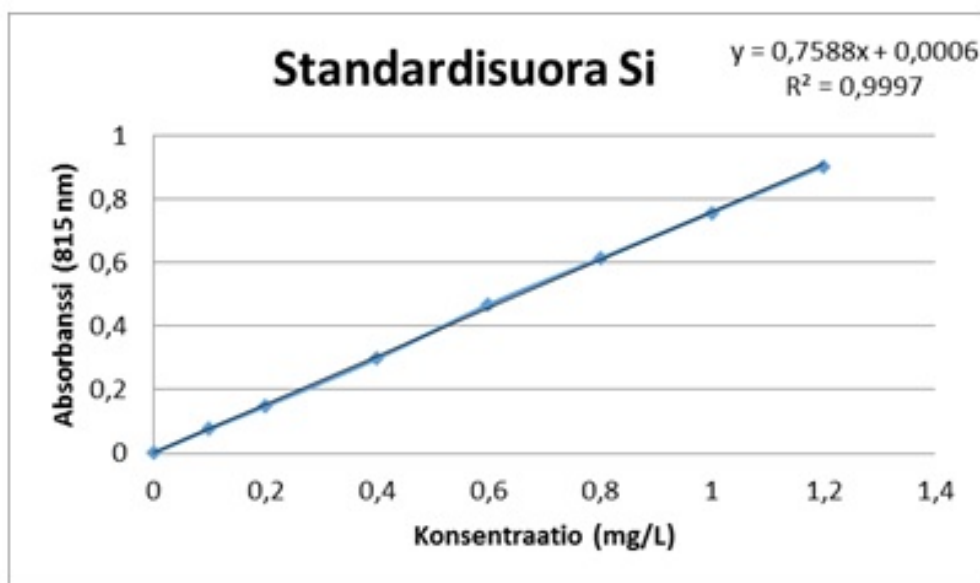
$$\text{Abs} = k * \text{Si (mg/L)} + b \quad (1)$$

jossa:

Abs = absorbanssi

k = standardisuoran kulmakerroin

b = kalibrointisuoran leikkauspiste



Kuvio. Piin standardisuora

Spektrofotometri antaa tulokseksi absorbanssiarvon, josta lasketaan Si-konsentraatio näytteessä standardisuoran yhtälön perusteella.

Esimerkkilasku:

Mitattu absorbanssi, y: 0,192

Si-konsentraatio:

$$x \left( \text{Si} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{0,192 - 0,0006}{0,7588}$$

=0,2522

## Proteiinimääritys Bradford-menetelmällä

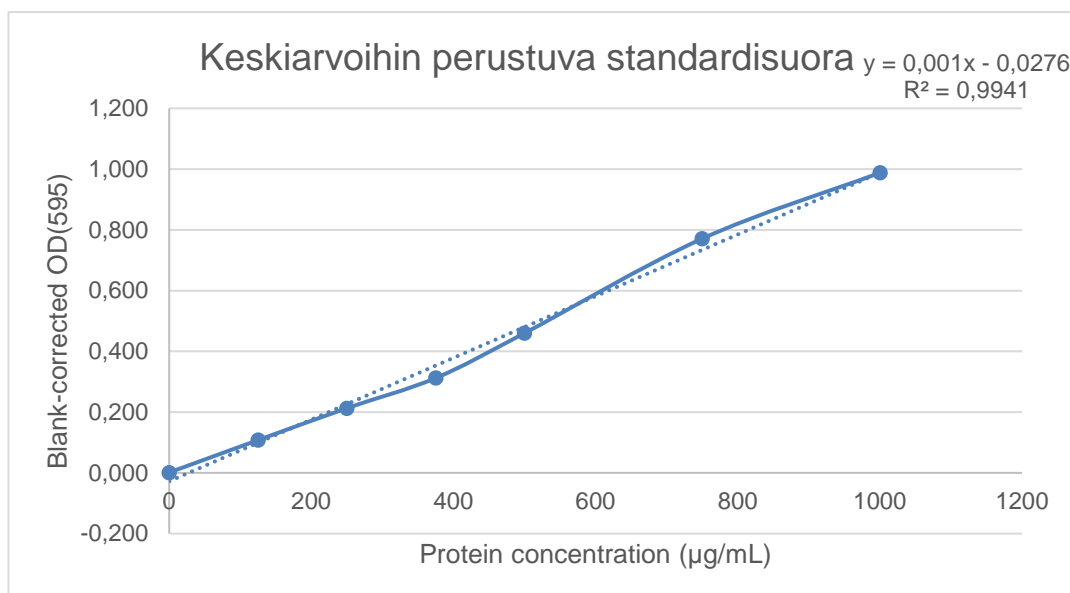
Valmistetaan proteiinistandardit albumiinista (Albumin Standard; Bovine serum albumin; BSA; 2.0 mg/mL in a 0,9 % aqueous NaCL solution containing sodium azide; Thermo-Scientific). Yksi ampulli (1 ml) albumiinia riittää hyvin yhteen laimennossarjaan.

Taulukko. Laimennussarjan valmistus

Pipetoitu tilavuus (H <sub>2</sub> O) / µl	Pipetoitu tilavuus albumiinia (mistä vahvuudesta pipetoidaan)	Lopullinen pitoisuus (µg/ml)	Lopullinen tilavuus (µl)
100	100 µl (2000 µg/ml)	1000	200
25	75 µl (1000 µg/ml)	750	100
50	50 µl (1000 µg/ml)	500	100
50	50 µl (750 µg/ml)	375	100
50	50 µl (500 µg/ml)	250	100
50	50 µl (250 µg/ml)	125	100
100	0 µl	0	100

1. Pipetoidaan 10 µl jokaista standardia ja näytettä 96-kuoppalevyille + 2 rinnakkaista
2. Pipetoidaan kuoppiin päälle 250 µl Coomassie Reagentia (Coomassie Protein Assay Reagent, Thermo Scientific)
3. Sekoitetaan levyravistelijassa n. 30 sekuntia ja annetaan inkuboitua huoneenlämmössä 10 minuuttia
4. Mitataan absorbanssi aallonpituudella 595 nm kuoppalevylukijalla ja lasketaan standardisuoran yhtälön avulla proteiinipitoisuus.

## Keskiarvoihin perustuva standardisuora ja GFP-liuoksen laskettu proteiinipitoisuus



Kuvio. Keskiarvoihin perustuva standardisuora.

Bradfordilla mitatusta absorbanssista ja standardisuoran yhtälöstä lasketaan kokonaisproteiinipitoisuus GFP:lle. Bradford-menetelmä kertoo kaikkien liuoksessa olevien proteiinien pitoisuuden yhteensä. Mahdollisimman luotettavan tuloksen saamiseksi on varmistettava, että liuoksesta on poistettu ensin kaikki muut proteiinit.

Taulukko. GFP-liuoksen kokonaisproteiinipitoisuus

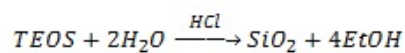
OD(595)	Blank corrected	Protein concentration (µg/mL)	Dilution corrected (µg/mL)	Average (µg/mL)
0,563	0,134	161,52	3230,33	3593,56
0,556	0,127	154,52	3090,33	
0,554	0,125	152,52	3050,33	
0,724	0,295	322,52	3225,17	
0,701	0,272	299,52	2995,17	
0,702	0,273	300,52	3005,17	
0,864	0,435	462,52	4625,17	
0,855	0,426	453,52	4535,17	
0,86	0,431	458,52	4585,17	

## Sooli-geeli-laskuri

Soolilaskuri		
Tekijä:	JV & PA	
Päivämäärä:	24.8.2016	
V(total)	50	ml
R-arvo:	10	
pH:	2	
c(HCl):	1	mol/l
<b>Lähtöaineet:</b>		
	V (ml)	n (mol)
TEOS:	27,92	0,12253
H <sub>2</sub> O:	21,58	1,22535
HCl:	0,5	0,0005
<b>Lopputuotteet:</b>		
SiO <sub>2</sub> :	7,36	g
EtOH:	28,60	ml
<b>Tarkistus:</b>		
V(total):	50,0	ml
R(laskettu):	10	

Geelilaskuri		
Tekijä:	JV & PA	
Päivämäärä:	24.8.2016	
V(total):	17,5	ml
Soolin osuus:	4,55	
Neutralointiliuoksen osuus:	2	
V(sooli):	12,15649	ml
n(TEOS) geelissä:	0,029792	mol
V(neutralointiliuos):	5,343511	ml
n(H <sub>2</sub> O) geelissä:	0,2979	mol
n(H <sub>2</sub> O) liuos:	0,2965	mol
n(H <sub>2</sub> O) total:	0,5945	mol
Valmistetun geelin R:	20,0	

Aine	M (g/mol)	Tiheys (g/ml)	m-%	c (mol/l)
TEOS	208,33	0,933	98	-
H <sub>2</sub> O	18,02	1	100	-
HCl	36,46	1,017	-	1
SiO <sub>2</sub>	60,08	-	-	-
EtOH	46,07	0,7894	-	-



$$V_{TEOS} = \frac{V_{total}}{\left(\frac{R_{sooli} \cdot c_{TEOS}}{c_{H_2O}} + 1\right)}$$

$$V_{H_2O} = V_{total} - V_{TEOS} - V_{HCl}$$

$$V_{HCl} = \frac{10^{-pH} \cdot V_{total}}{c_{HCl}}$$



Soolin osuus koko geelissä:

$$\frac{12,15649 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} * 100 \% = 24,31 \%$$

Silikan määrä geelissä:

$$7,36 \text{ g} * 0,2431 = 1,789216 \text{ g} = 17892,16 \mu\text{g}$$

$$\text{GFP:n teoreettinen tarve geelissä: } 0,01 * 1,789216 \text{ g} = 0,01789216 \text{ g} = 17892,16 \mu\text{g}$$

GFP-liuos toimii implantinvalmistusvaiheessa neutralointiliuoksena. GFP-liuoksen tarve geelissä:

$$\frac{17892,16 \mu\text{g}}{3593,56 \mu\text{g/mL}} = 4,9789 \text{ mL}$$

HCl:n määrä geelissä:

$$0,5 \text{ mL} * 0,2431 = 0,12155 \text{ mL}$$

NaOH:a tarvitaan sama määrä kuin HCl:a soolin pH:n nostamiseksi arvoon 7, joten tarvittava määrä on otettava huomioon neutralointiliuoksessa. GFP-liuosta käytetään siis neutralointiliuoksessa:

$$5,343511 \text{ mL} - 0,12155 \text{ mL} = 5,22191 \text{ mL}$$

Yhden implantin tilavuus on 250  $\mu\text{l}$ , joten silikan määrä yhdessä implantissa on:

$$\frac{1789216,0 \mu\text{g}}{17,5 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL}}{0,25 \text{ mL}} = 25560,2285 \mu\text{g/mL}$$

## Laskuesimerkki silikapitoisuuden laskemisesta

Spektrofotometri antaa aallonpituudella 815 nm mittaustulokseksi absorbanssin, josta lasketaan Si-konsentraatio näytteessä standardisuoran kulmakertoimen avulla.

Esimerkkilasku (Liitteestä 1):

Mitattu absorbanssi,  $y$ : 0,192

Si-konsentraatio:

$$x \left( \text{Si} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{0,192 - 0,0006}{0,7588}$$

$$= 0,2522$$

Si-pitoisuus dissoluutioliuoksessa saadaan, kun poistetaan laimennoksesta saatu osatulos.

Taulukko. Si-pitoisuuden laskeminen

Konsentraatio mg/L	Laimennussuhde (ml/ml)	Si-pitoisuus dissoluutionesteessä (mg/L)	
0,2522	3/100	$0,2522 \cdot (100/3)$	8,408
0,2285	3/100	$0,2285 \cdot (100/3)$	7,617
0,1824	2/100	$0,1824 \cdot (100/2)$	9,120
0,1468	2/100	$0,1468 \cdot (100/2)$	7,341
0,1508	2/100	$0,1508 \cdot (100/2)$	7,538
0,1560	2/100	$0,1560 \cdot (100/2)$	7,802
0,1639	1/100	$0,1639 \cdot (100/1)$	16,394
0,1560	1/100	$0,1560 \cdot (100/1)$	15,604
0,1850	1/100	$0,1580 \cdot (100/1)$	18,503

Mittaukset antavat vain piin konsentraation dissoluutionesteessä. Silikan konsentraatio saadaan lisäämällä tulokseen kerroin 2.14, joka saadaan silikan ( $\text{SiO}_2$ ) ja piin (Si) moolimassojen suhteesta:

$$M(\text{SiO}_2) = 28,085 + (2 \cdot 16,00) = 60,085$$

$$\text{SiO}_2 : \text{Si} = 60,085 / 28,085 = 2,14$$

Taulukko. Silika-pitoisuuden laskeminen

Si-pitoisuus dissoluutionesteessä (ppm)	SiO <sub>2</sub> -pitoisuus dissoluutionesteessä (ppm)
8,408	$8,408 * 2,14 = 17,993$
7,617	16,301
9,120	19,516
7,341	15,709
7,538	16,132
7,802	16,696
16,394	35,084
15,604	33,392
18,503	39,596

## Silikan liukenemisnopeuden laskeminen

Taulukko. Silikan liukenemisnopeuden laskeminen

Si-konsentraatio dissoluutiones- teessä (mg/L)	Liuenneen silikan määrä ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Liuenneen silikan massa ( $\mu\text{g}$ )	Liuenneen silikan massa (m- %)	Liuenneen silikan m- % kumulatiivisesti laskettuna	Liutuspäivä
9,634	20,62	4123,19	16,13	16,13	1
7,36	15,75	3150,21	12,32	28,46	2
7,327	15,68	3136,11	12,27	40,73	3
6,998	14,98	2995,10	11,72	52,44	4

Liuenneen silikan määrä laskettiin dissoluutionesteen Si-konsentraatiosta lisäämällä tulokseen kerroin 2,14. Liuenneen silikan massa milligrammoina saatiin suhteuttamalla liuenneen silikan määrä liuotustilavuuteen (200 mL):

$$20,62 \mu\text{g}/\text{mL} * 200 \text{ mL} = 4123,19 \mu\text{g}$$

Liuenneen silikan massa massaprosentteina laskettiin suhteuttamalla liuenneen silikan massa implantin sisältämän silikan kokonaismassaan.

$$\frac{4123,19 \mu\text{g}}{25560,2285 \mu\text{g}} * 100 \% = 16,13 \%$$

## GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden laskeminen

GFP-liuosta, jonka pitoisuus on 3593,56  $\mu\text{g/mL}$ , on geelissä 5,22 mL eli GFP:tä on kokonaisuudessaan geelissä:

$$3593,56 \mu \frac{g}{mL} * 5,22 mL = 18758,4 \mu g$$

GFP:n tarkka osuus silikan massaan suhteutettuna on:

$$\frac{18758,4 \mu g}{1789216,0 \mu g} * 100 \% = 1,05 \%$$

Liuenneen GFP:n osuus teoriassa lasketaan tämän avulla:

$$4123,19 \mu g * 0,0105 = 43,29 \mu g$$

Liuenneen GFP:n osuus massaprosentteina lasketaan liuenneen GFP:n suhteesta GFP:n kokonaisuudessaan implantissa.

GFP:n määrä yhdessä implantissa on:

$$25560,23 \mu \frac{g}{mL} * 0,0105 = 268,382 \mu g/mL$$

GFP:n osuus massaprosentteina:

$$\frac{43,29 \mu g}{268,382 \mu g/mL} * 100 \% = 16,13 \%$$

Taulukko. GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden laskeminen

Liuotuspäivä	Liuenneen silikan massa ( $\mu\text{g}$ )	Liuenneen GFP:n osuus teoriassa ( $\mu\text{g}$ )	m-%	Liuenneen GFP:n määrä (ppm)	Määrä kumulatiivisena (ppm)
1	4123,19	43,29	16,13	0,221	0,221
2	3150,21	33,08	12,32	0,169	0,389
3	3136,11	32,93	12,27	0,168	0,557
4	2995,10	31,45	11,72	0,160	0,717

Taulukko. GFP:n liukenemisnopeus teoriassa

Silikan liukenemisnopeus (m-%/pvä)	$52,44 \% * 4 d = 13,11$
Implantti liukenee kokonaisuudessaan (pvää)	$100 / 13,11 = 7,63$
GFP teoreettinen liukenemisnopeus (m-%/pvä)	13,11
Liukenemisnopeus (ppm/pvä)	$0,717 \text{ ppm} / 4 d = 0,176$
GFP:tä liukenee koko implantin liuettua (ppm)	$7,63 d * 0,176 \text{ ppm} = 1,34$