

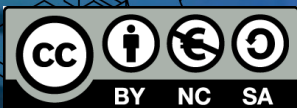
KOSMOS

MEDICINSK FYSIK

SVENSKA FYSIKERSAMFUNDETS ÅRSBOK 2022

SKRÄDDARSYDDA NANOPROBER OCH MEDICINSK VISUALISERING

© KAJSA UVDAL OCH ANDREAS SKALLBERG



Artikeln publiceras under Creative Commons-licensen CC BY-NC-SA 4.0
För bildmaterial med källhänvisning gäller samma upphovsrättsliga regler som för källan.



På nanonivå upphör fysikens lagar som vi känner dem att gälla. Material i extremt liten dimension har nämligen mycket speciella egenskaper. Kajsa Uvdal och Andreas Skallberg har skrivit en artikel där fysiken bakom nanopartiklar kort förklaras, och bredden av dess medicinska tillämpningar demonstreras.



Kajsa Uvdal

är professor i molekylär ytfysik vid Linköpings universitet. Hon arbetar med nanomaterial kombinerat med nya metoder för att avbilda cellulärfunktioner för i syfte att förstå olika sjukdomsförlopp. Hon skräddarsyr också tumörsökande nanopartiklar.



Andreas Skallberg

är teknologie doktor i tillämpad fysik och sedan 2020 postdoktor i molekylär ytfysik och nanovetenskap vid Linköpings universitet. Hans forskning är inriktad mot design och karakterisering av nanostrukturerade biofunktionella ytor.

Utrustning för avbildande XPS som används för forskning med nanopartiklar vid Linköpings universitet. (foto: Olov Planthaber)

Skräddarsydda nanoprober och medicinsk visualisering

Nanoteknologi är manipulation av material på atomär skala för att producera nya strukturer och material med nya funktioner. Detta vetenskapliga område har fått stort genomslag, med potential för genombrott både inomvetenskapligt och interdisciplinärt. Fältet genererar idag framsteg inom många sektorer, som medicin, konsumentprodukter, energi, material och tillverkning. Man har på senare år genom bidrag gällande nanomaterial och materialvetenskap gjort stora landvinningar inom det medicinska området. För att möta morgondagens behov behövs nu gränsöverskridande forskning och interdisciplinärt samarbete. Sådant öppnar för nya möjligheter att skräddarsy nanoprober för kontrastförstärkning, visualisering och målsökning inom medicin.

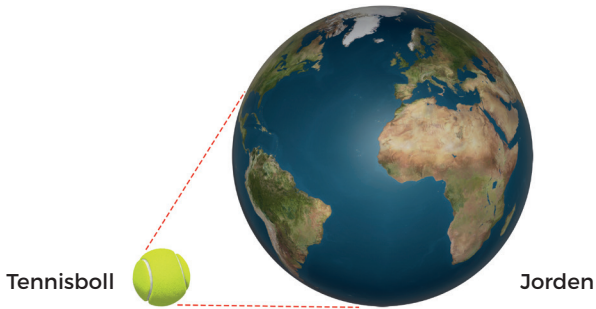
Storleken nano och nanoteknologi

Populärt brukar man säga att när ett material blir mycket litet får det helt nya egenskaper. Inom nanoteknologi använder man idag detta för att utveckla material med nya funktioner och man kan med kunskap inom fältet skräddarsy material för framtida tillämpningar. Vad är det då för speciella egenskaper man syftar på? Det hela bottnar i hur materialegenskaperna förändras när man skalar ned i storlek. Några av fysikens lagar, som vi känner dem för makroskopiska objekt, gäller inte objekt i nanostorlek.

Låt oss först börja med definitionerna kring nano och nanoteknologi. Nanometer betecknas nm. Detta är en längdenhet och motsvarar en miljarddels meter. För att ett objekt ska klassas som nanomaterial ska det vara så litet som 1–100 nanometer i storlek. Till gruppen nanomaterial inkluderar man alla material mindre än 100 nm i en, två eller tre dimensioner.

För att åskådliggöra hur liten en nanopartikel är brukar man

illustrera det med följande jämförelse: en nanometer är för en tennisboll vad en tennisboll är för jorden, se figur 1. Om man gömmer en tennisboll någonstans på jordens yta så lär tennisbollen vara svårfunnen. Detta relaterar givetvis till storleksskillnaden mellan objekten. I analogi till detta gäller samma sak om man placerar en nanopartikel på en tennisboll. Ett annat exempel är frågan hur många tennisbollar det skulle behövas för att täcka jordens yta, alternativt täcka en tennisboll med ett monolager nanopartiklar.



Figur 1: Jordens diameter: 12742000 m, tennisbollens diameter: 0,0654-0,0730 m (grafik: Göran Durgé).

Nanoteknologi omfattar förståelsen av grundläggande fysik, kemi, biologi och teknologi för objekt i nanometerskala. Detta involverar utvecklingen av nya material som ger radikalt olika egenskaper på nanoskala dvs. egenskaper som inte observeras för större storlekar. Nya fenomen uppkommer vid dessa dimensioner och dessa fenomen är förknippade med de mycket stora förhållandena yta till volym, och med s.k. kvanteffekter. Fältet inkluderar material i form av mycket tunna filmer som används i katalys och elektronik, tvådimensionella nanorör och nanotrådar för optiska och magnetiska system samt nanopartiklar som används i kosmetika, läkemedel och för ytbeläggningar.

Så hur började detta med nano och nanoteknologi? En historiskt viktig person för den ursprungliga fasen av nanoteknologin var Richard Feynman¹. Han är en av de mest ikoniska, inflytelserika och inspirerande forskarna från förra seklet, och bland annat

¹ Richard Feynman erhöll, tillsammans med Sin-Itiro Tomonaga och Julian Schwinger, Nobelpriset 1965 för grundläggande arbeten inom kvantelektrodynamik, med djupgående konsekvenser för elementarpartiklarnas fysik.

banade han väg för idéer inom kvantberäkning och nanoteknologi. Han höll 29 december 1959 föredraget ”*There’s plenty of room at the bottom*” på ett möte med *American Physical Society*. Richard Feynman beskrev då en process med möjlighet att manipulera enskilda atomer och molekyler och arrangera dem precis så som vi vill, med en uppsättning exakta verktyg för att bygga och driva en annan proportionellt mindre uppsättning, och så vidare ner till den skala som behövs. Detta för att driva till exempel kemiska och mekaniska processer på nanoskalan. Innehållet presenterades i flera tidskrifter, dock utan att det gav större uppmärksamhet. Det var inte förrän 1981, med utvecklingen av sveptunnelmikroskopet med vars hjälp man kunde ”se” eller rättare sagt avbilda enskilda atomer, som utvecklingen av modern nanoteknologi tog sin början.

Inom nanovetenskapen har egenskaperna hos lågdimensionella material under de senaste åren varit föremål för intensiv forskning och ett stort antal framtida tillämpningar inom vetenskap och teknik väntas. Den snabba utvecklingen bygger i princip på just att när en partikel, eller ett kluster, är tillräckligt liten förändras de fysikaliska egenskaperna. Kontrollerad materialdesign i en, två eller tre dimensioner ger oss möjlighet att skraddarsy intelligenta material. Om man nu vill använda dessa materialtekniska metoder inom till exempel mikro- och nanoteknologi eller biomedicin är det viktigt att förstå vilka processer och tillämpningar som används idag inom fältet.

Förutom den faktiska storleken på föremålen är tillverkningsmetoden en annan grundläggande skillnad mellan mikro- och nanoteknologi. Inom nanoteknologi används normalt tillvägagångssättet som kallas ”nedifrån och upp” (eng. *bottom-up*) för tillverkning. Inom mikroteknologi använder man normalt metoder baserade på principen ”uppifrån och ned” (eng. *top-down*).

Uppifrån-och-ned-processer är sådana där material tas bort från ett objekt i större skala för att skapa små strukturer (till exempel litografi med hjälp av elektron-, jon- eller röntgenstrålar). Litografi används mycket inom halvledarindustrin för att tillverka integrerade kretsar och optoelektroniska komponenter. Alternativt kan materialet brytas ned i successivt mindre partiklar tills nanoskalan uppnås. Denna process används ofta för att tillverka nanomaterial i pulverform.

Nedifrån-och-upp-processer innebär istället att byggstenar (atomer, molekyler) samlas ihop till gradvis större strukturer tills nanoskalan uppnås. Nedifrån-och-upp-processer kan genomföras på många sätt, vilket ger en mängd olika nanomaterial.

Vad är det som händer på nanoskalan?

Låt oss ta en titt på hur materialegenskaperna förändras hos partiklar när man går ner i storlek. Nanopartiklar är inte nya i vare sig naturen eller inom vetenskapen. Emellertid har de senaste utvecklingssprången inom områden som mikroskopi gett forskare nya verktyg för att förstå och dra nytta av fenomen som uppstår naturligt när materien är organiserad på nanoskala, dvs. fenomen baserade på kvanteffekter och andra enkla fysiska effekter såsom expanderad area.

Expanderad yta och kvanteffekter

Låt oss börja med ytförstoring som en skalbar parameter användbar inom nanoteknologi. Material i nanoskala har mycket stor yta relativt sin massa. När arean relativt massan (ytan/bulk) av ett material ökar kan en allt större delmängd av materialet exponeras till omgivningen.

Här följer ett enkelt exempel som visar varför ett material finfördelat som nanopartiklar ger en fenomenal ytförstoring. En massiv kub med sidan 1 cm av ett material har totalt sex kvadratcentimeter ytarea. Men om den volymen på en kubikcentimeter fylls med kuber med sidan 1 mm blir det 1 000 millimeterstora kuber ($10 \times 10 \times 10$), som var och en har en yta på sex kvadratmillimeter — totalt sett ytarea på 60 kvadratcentimeter. Om kubikcentimetern är fylld med mikrometerstora kuber — en biljon (10^{12}) av dem, var och en med en yta på sex kvadratmikrometer — uppgår totala ytan till sex kvadratmeter, och när den enda kubikcentimetern av volymen är fylld med en-nanometer-stora kuber, 10^{21} av dem, var och en med en yta på sex kvadratnanometer, kommer deras totala yta bli 6 000 kvadratmeter. Slutsatsen är att när ytarean per massa av ett material ökar kraftigt, dvs. när drastisk ytförstoring sker, kan en större mängd av materialet komma i kontakt med omgivningen och därmed påtagligt påverka reaktiviteten.

Förutom den förstoringen finns de så kallade kvanteffekterna som styr partiklarnas egenskaper och de effekter de har på sin omgivning. Dessa kvanteffekter påverkar många viktiga materia-

legenskaper såsom optiska, magnetiska och elektriska. Vi tar här optiska som ett exempel. När man skalar ned en partikel i storlek sker så småningom en s.k. inestängning av elektronerna. Denna inestängning resulterar i de optiska och elektriska egenskaperna som uppstår på nanoskala — elektronstrukturen förändras. Elektronerna i materialet kan inte röra sig lika fritt på nanoskalan och detta blir begränsade. Elektronernas inneslutning gör att de reagerar annorlunda på ljus.

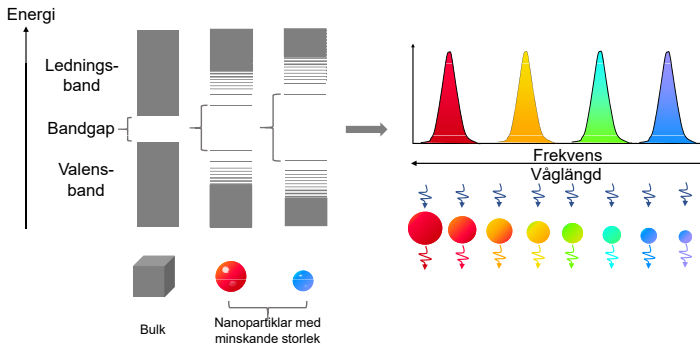
Detta kan tydligt observeras för s.k. kvantprickar (eng. *Quantum Dots*, QD). Kvantprickar är halvledarpartiklar som är några nanometer stora och har optiska och elektroniska egenskaper som skiljer sig från större partiklar på grund av kvantmekaniska lagar. När kvantprickarna belyses av UV-ljus kan en elektron i kvantpricken exciteras till ett högre energitillstånd. I fallet med en halvledande kvantprick motsvarar denna process övergången av en elektron från valensbandet till ledningsbandet. Den exciterade elektronen kan sedan falla tillbaka in i valensbandet och frigöra sin energi som ljus, se figur 2. Kvantprickarnas optoelektroniska egenskaper förändras alltså som en funktion av både storlek och form. Större kvantprickar med 5–6 nm diameter avger längre våglängder, med färger som orange eller rött. Mindre kvantprickar på 2–3 nm avger kortare våglängder, vilket ger färger som blått och grönt. Den specifika våglängden på utsänt ljus varierar dock beroende på den exakta sammansättningen av kvantprickarna. Kvantprickar har följaktligen unika egenskaper som hamnar någonstans mellan egenskaperna för en bulk och de för diskreta atomer eller molekyler.

Nanomaterial och krafter

Om du vill förflytta nanopartiklar, vilka redskap står till buds och hur stora eller små krafter kan du använda? Ta en sfär med massan m som ett exempel. Hur stor är gravitationskraften, F ? Volym skalar i tre dimensioner, yta skalar i två, och sträcka (diametern d) i en dimension. Gravitationskraft på en sfär beskrivs enligt:

$$F = \frac{4\pi}{3} \rho g \left(\frac{d}{2}\right)^3 ,$$

där ρ är densitet och g tyngdaccelerationen. Den kraft du behöver för att flytta ett objekt (som har sfärisk form) minskar med en faktor tusen när objektets diameter minskar tio gånger.



Figur 2: Schematisk illustration av hur ljus utsänt från en kvantprick beror av dess storlek.

Detta är egentligen inte så överraskande, men väl värt att fundera på en stund. Kanske har vi en förklaring till varför elefanten ser ut som den gör, dvs. varför den har så kraftiga ben relativt sin kroppshydda, jämfört med till exempel en mus. Båda djuren har genom evolution utvecklats på jorden. Elefanten behöver relativt sett mycket kraftiga ben. Musen har proportionellt sett rätt tåniga ben, men rör sig kvickt och lätt utan att benen ger vika under dess tyngd. Denna effekt blir förstås mycket större när man skalar ner till nano-området. Summa summarum är det mycket lätt att påverka nanomaterial med yttre krafter. Här valde vi gravitationskraften som ett enkelt exempel, men givetvis finns dessa aspekter på skalning att ta hänsyn till också om du till exempel vill förflytta nano-objekt med hjälp av optiska ”redskap” (till exempel en optisk pincett), eller påverka dem med hjälp av magnetiska- och elektriska fält. Man kan med mycket små medel förflytta nanomaterial.

Nanomaterial, säkerhet och hållbarhet

Europeiska rådet (*European Council*) har betonat behovet av att ägna särskild uppmärksamhet åt potentiella risker under hela livscykeln för nanoteknikbaserade produkter. Europeiska kommissionen har signalerat sin avsikt att arbeta på internationell basis för att upprätta ett ramverk av gemensamma principer för säker, hållbar, ansvarsfull och socialt acceptabel användning av nanoteknologi. Sverige är i framkant när det gäller hantering av nanomaterial. Det finns riktlinjer, t.ex. från Kemikalieinspektionen, om ”Säker användning av nanomaterial”. En ökande medvetenhet finns

inom industrin om både för- och nackdelar och de stora svenska instituten är engagerade. Universiteten driver forskningsfronten. Allt eftersom fältet utvecklas behövs mer kunskap om säkerhet och vidare god karakterisering av nanomaterial, nya rutiner och toxikologisk bedömning av nanomaterial.

Inom medicin har vi i Sverige idag strama regler. Innan nya material kan användas kliniskt ska rigorösa prekliniska tester och kliniska studier genomföras. Inom medicinska området finns stor erfarenhet av både prövning, kontroller, riskbedömning, certifiering och så vidare. Här finns möjligheter till kunskapsöverföring till andra fält.

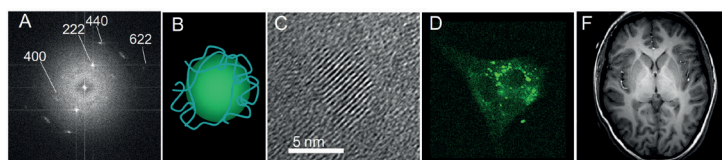
Livscykelanalys bör genomföras för nanomaterial precis som för alla nya material. Önskvärt är att redan vid design av material ha ett hållbarhetsperspektiv, dvs. från och med nu arbeta för s.k. cirkulära material. Det innebär att man behöver arbeta för både ökad säkerhet och längre hållbarhet. Möjligheter till återbruk måste ses över, då jordens resurser är ändliga (se Förenta nationernas 17 globala mål för hållbar utveckling). Material med nya egenskaper kan öppna för nya alternativ och ersätta material som visat sig vara skadliga för människa och natur. De kan också visa sig vara mer effektiva och ge möjligheter att minska materialåtgång och konsumtion. Nu söker man efter ekologiskt smarta material som kan bidra med högre prestanda och minskat klimatavtryck. Inom fältet finns således både utmaningar och möjligheter.

Karakterisering och visualisering

Man behöver en rad redskap för att utforma nanomaterial, samt avancerad utrustning för deras karakterisering. Om man vill få kunskap om elektronstrukturen och undersöka kemiska sammansättningen, dvs. få elementspecifik information, kan Röntgenfotoelektron-spektroskopi (eng. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) komma väl till pass. Om man vill få kännedom om kristallstrukturen i en enskild nanopartikel passar transmissionselektronmikroskop (TEM) mycket bra. Här kan man få en upplösning på cirka 0,1 nm. Ska man i stället undersöka hur till exempel nanopartiklar växelverkar med enskilda celler kan detta göras med hjälp av en kombination av avbildningstekniker i två dimensioner. Här använder vi i vår forskargrupp avbildande XPS och PEEM (se nedan). Vi erhåller en upplösning på 600 respektive 40 nm. Vill man använda avbildande tekniker för kliniska undersökningar, som till

exempel medicinsk diagnostik, används istället MRT och CT (magnetresonanstomografi och datortomografi, se andra artiklar i denna upplaga). Upplösningen är några μm dvs. inte alls lika god som tidigare nämnda tekniker, men med fantastiska möjligheter till avbildning i 3D.

Vilken teknik man väljer beror således på den fråga man har. Det finns tekniker tillgängliga för djupdykning på atomär nivå och det finns andra som passar bättre för hela system, studier av organ och helkroppsundersökningar (se figur 3). Att kombinera kunskap från alla nivåer är precis vad man inom forskningen arbetar med idag. För ett helhetsperspektiv behövs undersökning på fler nivåer.



Figur 3: Exempel på studier på atomär nivå och för hela system: A) Transmissionselektronmikroskopi (TEM) analys av kristallstrukturen hos en nanopartikel (elektron diffraktion). B) Schematisk bild av nanoprob med oorganisk (keramisk) hård kärna och mjukt organiskt skal. C) TEM bild av en nanopartikel med diameter 5 nm. D) Fluorescensmikroskopi av en cell som tagit upp nanopartiklar. E) Normal MRT bild av en människas hjärna.

En nyutveckling inom det medicinska området sker nu med hjälp av kunskap och tekniker inom nanoteknologi och materialvetenskap. Inom MRT och CT använder man idag både traditionella kontrastmedel, som paramagnetiskt gadolinium med olika typer av organiska kelatorer², och nanopartiklar för ökad bildkontrast. För de förra finns endast en Gd-jon per molekyl. Om man i stället använder en nanopartikel av gadoliniumoxid kan man ha cirka tusen Gd-joner i en enda, dvs. man kan göra en nanoprob som ger lokalt tusen gånger förstärkt kontrast. Nanoteknologin får en allt större betydelse inom fältet och bidrar till framväxande nya redskap inom det medicinska området, som här inom MRT och

² Kelatorer eller kelatkomplexbildare är oftast organiska substanser som binder till metalljoner och bildar kelat eller kelatkomplex, där metalljonen är upp-bunden centralt i en ringformad struktur med två eller flera bindningar till kela-torn. Kelationen medför att metalljonen inte längre är fri att reagera med andra ämnen.

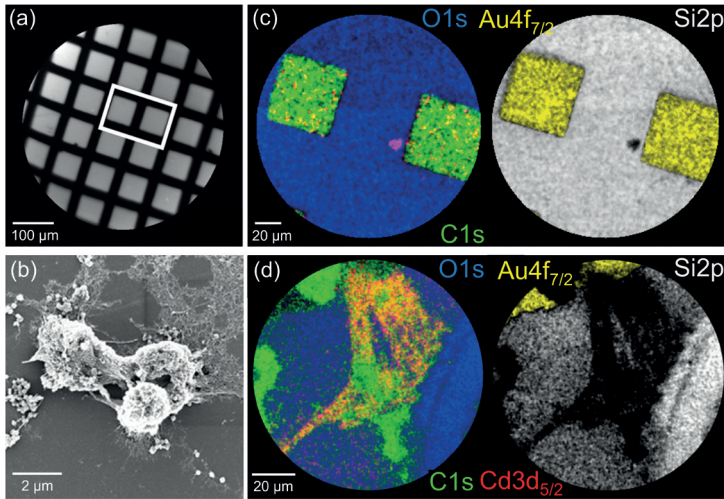
CT. Man vill i nästa steg göra dessa nanoprober målsökande dvs. med förmågan att söka upp vissa typer av celler, till exempel tumörceller, och därmed få en tusenfalt högre signal lokalt.

XPS, avbildande XPS, kvantprickar och neutrofiler

Röntgenfotoelektron-spektroskopi (XPS) eller med ett annat namn ESCA — en akronym för elektron-spektroskopi för kemisk analys — är en kvantitativ spektroskopisk teknik baserad på fotoelektriska effekten, dvs. ett fysikaliskt fenomen där ljus med tillräckligt hög frekvens kan få elektroner att utsändas från ett material. XPS är en kraftfull och ytkänslig teknik där de yttersta atomlagren, 1–10 nm, analyseras. Med denna teknik kan man identifiera de ingående atomslagen, deras elektronstruktur och kemiska tillstånd. XPS har genom historien givit värdefull information om både mjuka (polymerer och andra typer av organiska material) och hårda material (metaller, keramer etc.). Kai Siegbahn tilldelades Nobelpriset i fysik 1981 för sitt arbete med elektron-spektroskopi och det var han som introducerade namnet ESCA. XPS används flitigt inom klassisk ytfysik, halvledarfysik och materialfysik.

Tekniken har utvecklats och idag finns möjligheter till avbildande XPS med god lateral upplösning. Man kan få mycket bra bilder med grundämnesspecifik information. I vår forskning använder vi ett s.k. NanoESCA. Detta är ett instrument där man kombinerar PEEM (fotoemissionselektronmikroskop) och avbildande XPS. PEEM är en typ av elektronmikroskopi som använder lokala variationer i elektronemission för att generera bildkontrast och där avbildande XPS är utvecklat för att ge elementspecifika bilder på nano/sub-mikrometernivå. Studier med NanoESCA ger en kraftigt förstörd bild av provytan med rumslig information av olika atomslag, samt information om elektronstrukturen hos molekylära komponenter. Ett exempel på resultat från PEEM och avbildande XPS visas i figur 4. Här har kvantprickar specifikt kopplats till ett monolager, i detta fall ett s.k. självorganiserade skikt på en guldmönstrad yta.

Kvantprickarnas justerbara elektronstruktur (se figur 2), som ger deras optiska egenskaper, har visat sig vara värdefull för utvecklingen av biosensorer tack vare hög känslighet och selektivitet för till exempel detektion av DNA, proteiner, enzymer och celler. Detta är värdefullt såväl inom biomedicinsk forskning som klinisk diagnostik.



Figur 4: (a) Energifiltrerad PEEM-bild av en guldmönstrad yta. (b) Svepelektronmikroskopbild av en neutrofil med frigjort NETs. (c) Avbildande XPS med grundämnesspecifik information av det uppbyggda självorganiserade skiktet med specifikt kopplade kvantprickar. (d) Neutrofiler med frigjort NETs via en kontrollerad exponering av kvantprickar. De olika grundämnena är färgkodade för enklare visualisering: gul=guld, grå=kisel, grön=kol, blå=syre och röd=vanadin.

NanoESCA har även visat sig vara värdefullt inom livsvetenskaperna, där man har kunnat få grundämnesspecifika bilder med rumslig information av biologiska material och processer på cellnivå. Ett exempel på detta kan ses för neutrofiler. Neutrofiler är en typ av vita blodkroppar som cirkulerar i blodet och är en viktig del i det icke-specifika immunförsvaret. Neutrofilernas främsta uppgift är att ta hand om och eliminera inkräktande patogener. De har en uppsättning försvarsmekanismer för att oskadliggöra eventuella hot. De kan bl.a. fagocytera, frisläppa antimikrobiella peptider och proteolytiska enzymer, och producera reaktiva syreradikaler. För drygt ett decennium sedan upptäcktes ytterligare en försvarsmekanism, där neutrofilerna frigör ett nätverk uppbyggt av sitt eget DNA med förmåga att fånga in och oskadliggöra inkräktande patogener. Dessa nätverk kallas för *neutrophil extracellular traps* (NET). Avbildande XPS av neutrofiler, NET och kvantprickar kan ses i figur 4, där neutrofiler har adsorberats på en guldmönstrad yta och frigjort NET via en kontrollerad exponering av kvantpric-

kar. Ämnesspecifika bilder visar både en del av den guldmönstrade ytan samt neutrofiler, NET och var kvantprickarna befinner sig.

Nanoprober för att analysera bröstcancerceller

Här följer ett exempel på hur nanoprober kan användas för att spåra mitokondriella pH-förändringar i bröstcancerceller. I faktarutan ges korta förklaringar av *autofagi* och *mitofagi* och hur dessa processer på cellnivå kopplar till medicinska aspekter. Vi ska visa hur man kan skraddarsy nanoprober för att övervaka processerna.

Autofagi och mitofagi

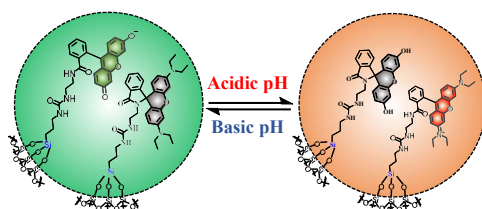
Autofagi är en naturlig reningsprocess som städar rent på cellnivå. Delar av cellens innehåll omsluts av membran och bildar så kallade vesiklar som sedan transporteras vidare till lysosomen — en cellulär återvinningsstation för nedbrytning av biologiskt material. Autofagi är cellernas egenskap att kunna skilja ut och bryta ned skadade eller överflödiga beståndsdelar. Yoshinori Ohsumi tilldelades Nobelpriset 2016 för sin upptäckt gällande maskineriet som styr autofagi. Upptäckten medförde ett paradigmskifte i förståelsen om hur celler bryter ner och återvinner cellulärt material. Vi vet idag att autofagi är grundläggande för viktiga fysiologiska processer, bland annat för cellers förmåga att hantera näringsbrist och infektioner. Mutationer i gener av betydelse för autofagi kan orsaka ärftliga sjukdomar. Störningar i autofagiprocessen kan bidra till bland annat cancer och neurologiska sjukdomar.

Mitofagi: Mitokondrier är viktiga organeller som reglerar cellulär energi, celandning, homeostas³ och celledöd. I samband med mitokondriernas metabolism generas biprodukter som orsakar skador och mutationer i DNA-molekyler. En välfungerade uppsättning av mitokondrier är därför avgörande för en cells välbefinnande. Detta regleras genom mitofagi, som är avlägsnandet av skadade mitokondrier. Det är den selektiva nedbrytningen av mitokondrier genom autofagi. Det förekommer ofta defekta mitokondrier efter skador eller stress.

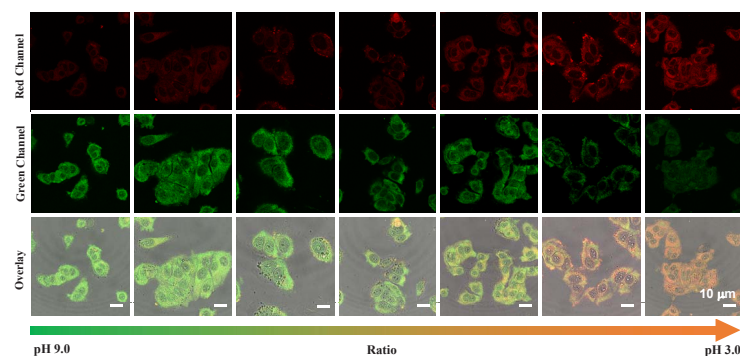
Under mitofagi sker selektivt fusion av försvagade eller skadade mitokondrier med lysosomer för nedbrytning. Därför spelar mitofagi en kritisk roll för att upprätthålla cellhomeostas. Att spåra de mitokondriella pH-förändringarna i detalj kommer att ge oss en djupare förståelse av mitofagiprocessen.

³Stabilt och konstant tillstånd gentemot omgivningen i ett biologiskt system.

Vi har utvecklat pH-känsliga fluorogena nanoprober, optimerade för pålitlig mitokondriell pH-avkänning. Detta bygger på en kombination av pH-känsliga xantenbaserade fluoroforer (fluorescein, FRC: pH-känslig i basiskt område; rhodamin B, RDM: pH-känslig i surt område) där vi utformat nanoproben så att urskiljbara emissionsband integrerades i en enda nanopartikel. Denna skräddarsydda nanoprob möjliggör kvantitativ övervakning av pH-förändringar som är förknippade med mitokondriella försurningar och fusioner under mitofagi. I figur 5, 6 visas exempel på hur detta tillämpats på bröstcancer celler.



Figur 5: Schematisk illustration av mekanismen för fluorescerande prober vid pH-förändringar.



Figur 6: Mikroskopi av levande celler. Här visar vi mänskliga bröstcancer celler (där 2×10^5 celler sätts ut på en mikrobrunnsskål med glasbotten). Cellerna inkuberades tillsammans med vår pH-känsliga nanoprob för att visualisera pH-mätning i komplex miljö.

Nanoprober för diagnostik och målsökning

Tidig upptäckt och diagnos möjliggör effektiv behandling och ökar möjligheterna för god prognos. Detta behov driver utvecklingen framåt både gällande bildbehandlingsmetoder och kontrastmedel. Nya verktyg behövs för att förbättra möjligheterna till tidig upptäckt och diagnos, samt därmed tidigarelägga terapeutisk behandling. Några av de vanligaste biomedicinska utbildningsteknikerna är datortomografi (CT), magnetisk resonanstomografi (MRT), ultraljud (US), positronemissionstomografi (PET) och datortomografi med enkelfotonemission (SPECT). Nyutveckling sker för dessa tekniker som idag ofta kombineras för ökad precision.

Vi har under senaste åren utvecklat magnetiska nanoprober som ger ökad kontrast inom MRT och CT. Det kan noteras att storleksinducerad modifiering av elektronstrukturen för oxider av sällsynta jordartsmetaller nu är möjlig. Ett ämne av stor betydelse för detta är Gd. Gadolinium har sju oparade 4f-elektroner, vilket är högintressant (p.g.a. de magnetiska egenskaperna) för olika kontrastmedelsapplikationer inom biomedicinsk avbildning. Järn är med sina fem oparade elektroner också intressant, med en mer direkt synteskemi, och har fördelaktiga egenskaper för ytfunktionalisering. Vi fokuserar på en teknisk plattform för intelligent urval (*smart screening*) vid utformning av nanoprober för avbildning med ett dedikerat mål på nanonivå. Kärnan av dessa prober består således av nanopartiklar med mycket goda, magnetiska och energiabsorberande egenskaper. Detta möjliggör signalförstärkning inom MRT och CT.

Man vill också kunna målsöka viss typ av vävnad och ha möjlighet att leverera mediciner på plats. Ytfunktionalisering fyller här flera behov. Nanoproben består ofta av en hård kärna som ger grunden till magneto-optisk finjustering, plus ett mjukt organiskt skal som stabiliserar i komplex miljö och därmed ökar biokompatibiliteten. Detta möjliggör målsökning på cell- och vävnadsnivå. Det finns en rad olika ligander⁴ som kan användas för att öka lokaliseringen av kontrastmedel genom specifik bindning till cellulära receptorer. Ett exempel är superparamagnetiska järnoxidkontrastmedel (SPIO) i nanostorlek, försedda med en anti-EGFR-antikropp med hög affinitet, riktade mot lungtumörer.

⁴ En ligand är en atom-, jon-, eller molekylbaserad funktionell grupp som donerar eller delar en eller flera av sina elektroner bundna i en koordinerad kovalent bindning runt en central atom.

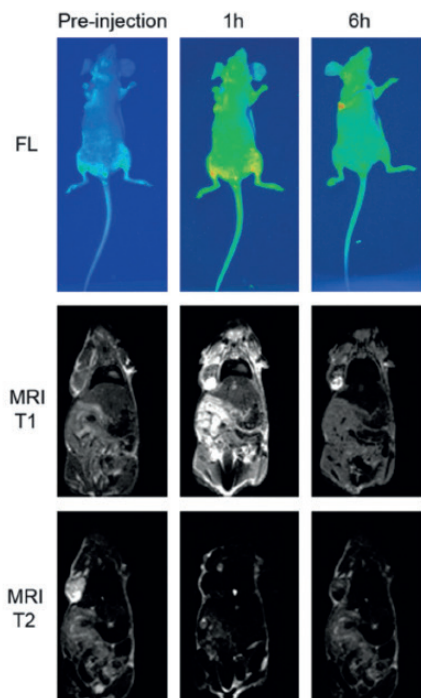
Kontrastmedel baserat på nanopartiklar med ett högt förhållande mellan ytarea och volym möjliggör effektiv ytmärkning med specifika molekyler och ligander för att minska toxicitetsprofilen och finjustera avbildningsegenskaperna. Denna ytfunktionalisering gör vi själva bland annat genom s.k. klick-kemi, dvs. den teknik som gjort det möjligt att klicka ihop molekyler och som Carolyn Bertozzi, Morten Meldal och Barry Sharpless fått Nobelpriset i kemi för 2022. Metoden används när man utvecklar nya läkemedel och avancerade material.

Dessutom förbättrar den förlängda cirkulationstiden för nanopartiklar biodistributionen, med en större skillnad till bakgrundskontrastsignalen. Formen och storleken av nanopartiklarna kan skraddarsys för att optimera laddning etc. och deras inneslående fysikaliska egenskaper kan också ändras för att möta specifika kliniska behov. MRT, CT, US, SPECT och PET används idag frekvent för klinisk diagnos, men upplösningen förblir på en makroskopisk nivå.

Nanoprober inom MRT och fluorescens

Syftet med arbetet i detta exempel var att utforma en målsökande nanoprober med multimodal kapacitet för specifik tumöravbildning hos levande möss. Vi har här utvecklat fluorescerande magnetiska nanopartiklar av hög kvalitet, som kan signalera med nära infraröd (NIR)-emission, och som dessutom har hög T_1 - och T_2 -viktad relaxivitet (se artikel om MRT av Garpebring och Ekman i denna upplaga av Kosmos). Dessa partiklar är inbäddade i ett polymerskikt med s.k. målsökande specifik flagga. Här har vi använt folsyra konjugerad till ytan och har därmed framgångsrikt uppnått målsökning för tumör *in vivo*. Dessa nya fluorescerande magnetiska nanopartiklar kan ge kompletterande information från NIR-fluorescens, samt T_1 - och T_2 -magnetisk resonanstomografi (MRT).

Dessa ultrasmå Fe_3O_4 -nanopartiklar, NIR-emitterande halvledande polymerer (PFBT och PFTBT) och amfifila polymerer som bär karboxylsyragrupper kan integreras i en partikel genom enstegssyntes. En energiöverföringsstrategi via Försterresonansen (FRET) användes för att minska självsläckningen av NIR-fluorescens. Folsyra användes för att funktionalisera de fluorescerande magnetiska nanopartiklarna (FMNP), vilket specifikt kan vägleda dem till tumörytan.



Figur 7: Fluorescensbilder *in vivo* (översta raden) och samtidig T_1 - och T_2 -viktad MRT av möss injicerade med fluorescerande magnetiska nanopartiklar, funktionaliserade med folsyra, före injektion, en timme respektive sex timmar efter injektion.

T_1 - och T_2 -viktad viktad MRT av lungcancer hos tumörbärande möss visas i figur 7. Jämfört med bilden före injektion observerades en stor kontrastförbättring (upplust på T_1 -viktade och mörkare på T_2 -viktade MRT-bilder) i muskroppen en timme efter injektion, vilket visar att syntetiserade FMNP samtidigt kan förbättra T_1 - och T_2 -avklingningen i cirkulationssystemet. Det kan noteras att FMNP har en tendens att anrikas i tumörvävnaden. Efter sex timmar kontrasterar T_1 - och T_2 -intensiteten i kropp och organ hos möss och minskar över tid, medan regionen av tumörvävnaden fortfarande är inmärkt och MRT-bilder av T_1 och T_2 är tydliga, vilket visar den utmärkta målsökande egenskapen hos FMNP. Den långsamma elimineringen av fluorescerande magnetiska nanopartiklarna från blod under cirkulationen tillskrivs deras optimala partikelstorlek.

Nanoprober och målstyrd leverans av läkemedel

Nya typer av smarta nanomaterial förväntas komma till användning inom en snar framtid inom bilddiagnostik, men även för målstyrd leverans av läkemedel. Nanomedicin är en medicinsk tillämpning av nanoteknologin som sträcker sig från medicinska tillämpningar av nanomaterial till nanoelektroniska biosensorer, och även till möjliga framtida tillämpningar av molekylär nanoteknik. Aktuella problem för nanomedicin är att förstå frågor relaterade till toxicitet och miljöpåverkan av material på nanoskalan. Hittills har integrationen av nanomaterial med biologi lett till utvecklingen av: diagnostiska redskap, kontrastmedel, analysverktyg, tillämpningar inom sjukgymnasik och läkemedelsleverans.

Nanoteknik ger oss möjligheten att leverera läkemedel till specifika celler med hjälp av nanopartiklar. Vi gör detta genom att utforma målsökande nanoprober. Vi utrustar våra nanoprober med en *tag*, dvs. en selektiv molekyl som får fungera som känselspröt för att leda nanoproben till rätt position, till exempel till en receptor på cellytan. På detta sätt vill vi kunna leverera läkemedel till rätt plats.

Läkemedelsleverans med lipid- eller polymerbaserade nanopartiklar kan utformas för att förbättra farmakokinetiken och biodistributionen av medicin. Men farmakokinetiken⁵ och farmakodynamiken för nanomedicin har en mycket stor individuell variation för olika patienter. När nanopartiklar är designade för att undvika kroppens försvarsmekanismer, har detta fördelaktiga egenskaper som kan användas till att förbättra läkemedelsleveransen. Komplexa läkemedelsleveransmekanismer utvecklas, inklusive förmågan att få läkemedel genom cellmembran och in i cellcytoplasma. Triggad respons är ett sätt för läkemedlets aktiva molekyler att användas mer effektivt.

Till exempel kommer ett läkemedel med sämre löslighet att ersättas av ett läkemedelsleveranssystem där både hydrofila och hydrofoba miljöer existerar. Detta kan ge förbättring av lösligheten. Läkemedelsleveranssystem kan också förhindra vävnadsskada genom reglerad läkemedelsfrisättning. Det pågår mycket arbete för att optimera och bättre förstå potentialen och begränsningarna för nanopartikulära system.

⁵ *Läkemedelsomsättning i kroppen, det vill säga hur halterna av ett läkemedel i kroppen förändras över tid, genom absorption, distribution, metabolism och exkretion.*

Sammanfattningsvis kan sägas att inom fältet nanomaterial arbetar man inte bara med allt mindre dimensioner. Snarare är det så att genom att arbeta på nanoskalan är det möjligt för forskare att utnyttja de unika fysikaliska, kemiska, magnetiska och optiska egenskaperna hos material som naturligt förekommer i den skalan. Detta ger möjlighet att utforma nanoprober för signalförstärkning, visualisering på cellnivå och för målsökning inom medicin.



Vidare läsning

- Skallberg A. *et al.* (2019). Neutrophils Activated by Nanoparticles and Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Work Function Mapping and Element Specific Imaging, *Anal. Chem.* 21(21), 222.
- Skallberg A. *et al.* (2021). New Tools for Imaging Neutrophils: Work Function Mapping and Element-Specific, Label-Free Imaging of Cellular Structures, *Nano Lett.* 21(1), 222.
- Wang G. *et al.* (2015). Magneto-fluorescent nanoparticles with high-intensity NIR emission, T-1-and T-2-weighted MR for multimodal specific tumor imaging, *J. Mater. Chem. B*, 15(3), 3072.