

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

## Hydrogeelipohjaiset haavasidokset

Kandidaatintutkielma ja  
tutkimusprojekti  
15.02.2022  
Senni Mäntynen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO



**KIRJALLINEN OSA**

## Tiivistelmä

Tässä kandidaatintutkielmassa perehdytään synteettisesti luonnonmateriaaleista jalostettuihin hydrogeeleihin, erityisesti kitosaani- ja hyaluronihappopohjaisten hydrogeelien rakenteeseen, ominaisuuksiin, valmistukseen ja käyttöön sovelluksissa, kuten lääkeaineenlatausjärjestämänä (DDS, *drug delivery system*). Tutkielmassa käsitellään myös polyetyyliyglykoli-hyaluronihappoa (PEG-HA) ja polyvinyylideenifluoridi-hyaluronihappoa (PVDF-HA) sisältäviä hydrogeelikalvoja. Lisäksi perehdytään hyaluronihappopohjaisiin polyvinyylialkoholihydrogeeleihin (PVA-HA) ja niiden toimintaan lääkeaineita annostelevina kalvorakenteina. Kirjallinen osa rajattiin hydrogeelien käyttöön haavasidoksissa.

## Esipuhe

Kandidaatintutkielman aihe valikoitui aivan sattumalta. En halunnut poissulkea mitään kemian tutkimusalaa tai -aihetta. Päätös osoittautui oikeaksi, sillä kiinnostus tutkielman aiheeseen vain kasvoi mitä pidemmälle projekti eteni. Kirjoittaminen, tiedonhaku ja tutkimusprojekti eivät olleet itsestäänselvyksiä. Haasteet on kuitenkin tehty voitettaviksi ja loppujen lopuksi tutkielman kirjoittaminen olikin hyvin motivoivaa. Erityisen kiitollinen olen englannin kielen ja vuorovaikutustaitojeni kehittymisestä tutkimusprojektin aikana. Uskon, että niistä on hyötyä myös tulevaisuudessa.

Kirjallista osaa kirjoitettiin kesän 2021 aikana. Kokeellinen osuus suoritettiin Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksen laboratoriossa syyskuun 2021 aikana. Tutkimusprojektin laajuus oli 3 opintopistettä. Tiedonhakuvälineinä käytettiin Google Scholar -hakukonetta sekä ScienceDirect-tietokantaa. Tutkielman kirjallinen osa rajautui mielekkäästi haavasidosmateriaaleissa käytettäviin hydrogeeleihin ja niiden sovelluksiin. Kokeellisen laboratoriotyöskentelyn osuus tuki kirjallisen osan teoriaa.

Haluan kiittää tutkielman ohjaajaa, professori Maija Nissistä sekä kokeellisen työskentelyn ohjaajaa, Dr. Efstratios Sitsanidistä, arvokkaista neuvoista tutkielman kirjoittamisen ja kokeellisen työskentelyn eri vaiheissa. Kiitos kuuluu myös koko Nissisen tutkimusryhmälle: minut otettiin todella ystävällisesti mukaan mielenkiintoiseen ja kansainväliseen projektiin.

Jyväskylässä 08.02.2022

Senni Mäntynen

## Sisällysluettelo

### KIRJALLINEN OSA

<b>Tiivistelmä</b> .....	iv
<b>Esipuhe</b> .....	v
<b>Sisällysluettelo</b> .....	vi
<b>Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat</b> .....	vii
<b>1 Johdanto</b> .....	1
<b>2 Hydrogeelit</b> .....	2
2.1 Hydrogeelien rakenne ja käyttö.....	2
2.2 Hydrogeelit haavasidosmateriaaleissa.....	3
<b>3 Kitosaani</b> .....	4
3.1 Kitosaanin rakenne ja sidokset.....	4
3.2 Kitosaanipohjaisten hydrogeelien valmistus.....	6
3.3 Kitosaani haavasidosmateriaaleissa.....	8
3.3.1 Kitosaani lääkeaineenlatausjärjestelmänä.....	9
<b>4 Hyaluronihappo</b> .....	10
4.1 Hyaluronihapon rakenne ja sidokset.....	10
4.2 Hyaluronihapon valmistus hyaluronisyntaasilla.....	11
4.3 Hyaluronihappo haavasidosmateriaaleissa.....	13
4.3.1 Polyetyleeniglykoli-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö.....	13
4.3.2 Polyvinyylideenifluoridi-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö.....	14
4.3.3 Polyvinyylialkoholi-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö.....	15
<b>5 Yhteenveto</b> .....	16
<b>Kirjallisuus</b> .....	18

### EXPERIMENTAL PART

**Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat**

<b>DDS</b>	lääkeaineenlatausjärjestelmä ( <i>drug delivery system</i> )
<b>SEM</b>	pyyhkäisyelektronimikroskooppi ( <i>scanning electron microscope</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	kudosten kasvutekijä ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math>1</i> )
<b>CS</b>	kitosaani
<b>HPN</b>	hybridipolymeeriverkot ( <i>hybrid polymer networks</i> )
<b>IPN</b>	täydellisesti läpäisevät polymeeriverkot ( <i>interpenetrating networks</i> )
<b>TMC</b>	trimetyylikitosaani
<b>CMC</b>	karboksिमetyylikitosaani
<b>CMTMC</b>	karboksिमetyylitrimetyylikitosaani
<b>NMP</b>	<i>N</i> -metyyli-2-pyrrolidoni
<b>DMC</b>	dimetyylikitosaani
<b>HA</b>	hyaluronihappo
<b>HAS1</b>	hyaluronihapposyntaasi 1
<b>HAS2</b>	hyaluronihapposyntaasi 2
<b>HAS3</b>	hyaluronihapposyntaasi 3
<b>ADH</b>	adipiinidihydratsidi
<b>PEG-HA</b>	polyetyleeniglykoli-hyaluronihappo
<b>PVDF-HA</b>	polyvinyylideeni fluoridi-hyaluronihappo
<b>PVA-HA</b>	polyvinyylialkoholi-hyaluronihappo

## 1 Johdanto

Geelit ovat kiinteän ja nestemäisen aineen välimuotoja. Hydrogeeleillä on verkkomaisen rakenteensa ansiosta taipumus veden absorptioon. Hydrogeelipolymeerien koko vaihtelee nanomittakaavasta mikrometrikokoisiin partikkeleihin. Polymeeriverkkojen tiheydestä riippuen hydrogeelit voivat absorboida vettä jopa miljoona kertaa oman painonsa verran, jolloin ne turpoavat moninkertaisiksi. Vettä absorboinut polymeeriverkosto antaa geelille joustavan ja pehmeän koostumuksen, minkä vuoksi ne sopivat käytettäväksi myös kudospäristössä.<sup>1</sup>

Hydrogeelien käytöstä kemiallisissa ja biolääketieteellisissä sovelluksissa on paljon tutkimustietoa – aina vuodesta 1989 lähtien. Lääkeaineenlatausjärjestelmä (DDS, *drug delivery system*) kykenee lataamaan ja annostelevaan kudosten uusiutumista tukevia ja tulehdusreaktiota estäviä lääkkeitä, kuten kasvutekijöitä ja mikrobipohjaisia lääkkeitä.<sup>2</sup> Lataus- ja annostelujärjestelmien tulee olla ihmisen elintoiminnoille soveltuvia ja turvallisia. Siksi niiden valmistamiseen käytetään synteettisiä, mutta luonnossa esiintyvien materiaalien johdannaisia, kuten kitosaania ja hyaluronihappoa. Haavasidoksissa DDS:nä käytettävät hydrogeelit annostelevat lääkkeitä hallitusti ja niin, että kroonisen tai akuutin kudospäristön asettamat vaatimukset täyttyvät.<sup>3,4</sup>

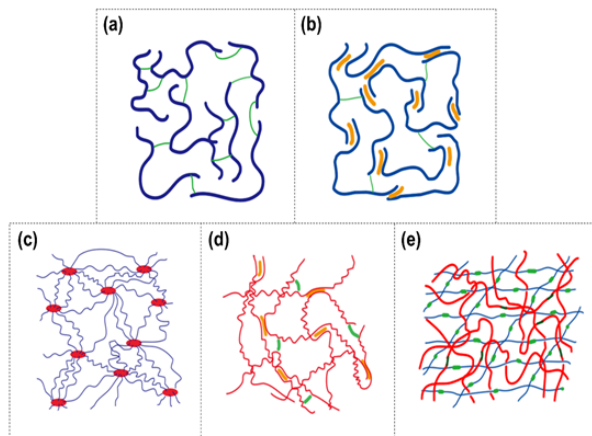
Synteettisesti valmistetuista hyaluronihaposta ja kitosaanista voidaan jatkojalostaa hydrogeelipintaisia lääkeainekalvoja, joiden toimintaperiaate pohjautuu DDS:ään.<sup>2</sup> Latausjärjestelmät aktivoituvat solunulkoisessa kudospäristössä ja vapauttavat lääkeainetta tarpeen mukaan.<sup>4</sup> Hyaluronihapon ja kitosaanin tehtävä on biologisen yhteensopivuuden varmistaminen.<sup>5</sup> Hydrogeeleistä, latausjärjestelmistä ja kalvorakenteista on etsitty apua paitsi haavasidosten kudoksia korjaaviin materiaaleihin myös vaurioituneita hermosoluja kasvattaviin ympäristöihin ja esimerkiksi Parkinsonin taudin hoitoon.<sup>2</sup>



## 2 Hydrogeelit

### 2.1 Hydrogeelien rakenne ja käyttö

Hydrogeelit ovat hydrofiilisiä polymeerejä, jotka eivät liukene veteen. Rakenteensa perusteella ne voidaan luokitella kiinteän ja nesteen välimaastoon. Hydrogeelit rakentuvat hydrofiilisista, ristikkäisistä polymeeriketjuista, joiden välissä vesi toimii dispersioväliaineena. Polymeeriketjut sitoutuvat toisiinsa esimerkiksi kovalenttisilla sidoksilla, vetysidoksilla, hydrofobisilla vuorovaikutuksilla ja ketjun kolmiulotteisella, kietoutuneella rakenteella.<sup>6</sup> Ristisilloitetussa rakenteessa polymeeriketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa vety- tai kovalenttisilla sidoksilla.<sup>1</sup> Hydrofobiset vuorovaikutukset johtuvat vesimolekyylien välisestä koheesiosta, jolloin hydrofiiliset polymeeriketjut eivät vesiliukoisuudestaan huolimatta hajota näitä vetovoimia. Tällöin vesimolekyylit ja polymeeriketjut jäävät molemmat omiin faaseihinsa.<sup>6</sup> Hydrogeeliverkkoja on olemassa useita erilaisia (Kuva 1).<sup>7</sup>



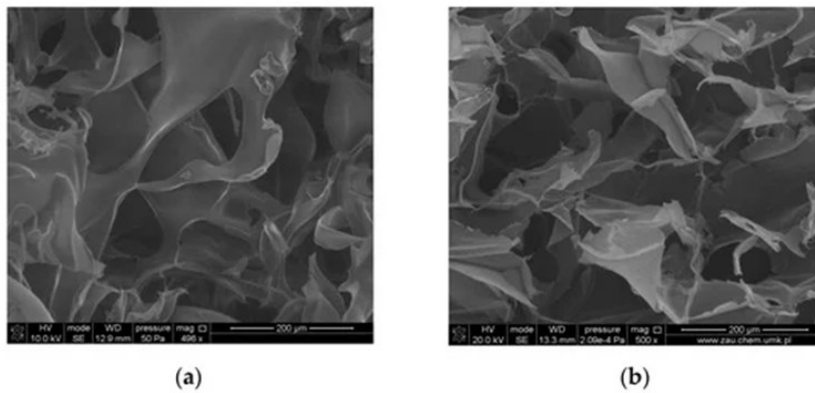
**Kuva 1.** Esimerkkejä hydrogeelien erilaisista verkkorakenteista. a) Kovalenttisesti sitoutunut, yksi verkkopolymeeri, b) kaksoisiltarakenne, c) polymeeri-interkaloitu nanokomposiitti, d) ei-kovalenttisesti sitoutuneet ja elastomeeriset segmentit sekä e) kaksoisverkko.<sup>7</sup>

Kitosaani- ja hyaluronihappopohjaisia hydrogeelejä valmistetaan synteettisesti matkimalla sekä luonnon kitiinin rakennetta että soluissa tapahtuvaa hyaluronihappotuotantoa. Polysakkaridipohjaisten polymeerien valmistus ja käyttö on edullista. Ne ovat myös biohajoavia,

ympäristöystävällisiä ja biologisesti yhteensopivia useiden eri materiaalien kanssa. Synteettisiä hydrogeelejä käytetään lääkeaineita lataavina ja annostelevina järjestelminä ja kalvoina. Latausjärjestelmät ja kalvorakenteet tarvitsevat hyaluronihappopinnoitteen, jotta niitä voidaan käyttää solunulkoisessa ympäristössä ja ihmiselimistössä.<sup>2</sup>

## 2.2 Hydrogeelit haavasidomateriaaleissa

Haavasidokset suojaavat kudosta toissijaisilta infektioilta. Lisäksi ne nopeuttavat vaurioituneen kudoksen uusiutumiskykyä ja paranemista. Myös haavaeritteiden poistaminen on tärkeää.<sup>2,6</sup> Puuvillaisilla sideharsoilla on taipumus jäädä kiinni haavoihin ja niitä poistettaessa kudokseksi voi repeytyä. Geelimäiset materiaalit ennaltaehkäisevät haavan kuivumista ja sidostarpeiden kiinnijäämistä ihon pintaan (Kuva 2).<sup>8</sup>



**Kuva 2.** Pyyhkäiselektronimikroskooppikuva (SEM, *scanning electron microscope*) kitosaani- ja hyaluronihappopohjaisia hydrogeelejä sisältävistä 3D-komposiittikalvoista. a) Kitosaani ja kollageeni sekä b) kitosaani, kollageeni ja hyaluronihappo. Hyaluronihappo lisää kalvon mekaanista kestävyyttä.<sup>8</sup>

Hydrogeelien lääkitsevä vaikutusaika ei ole kovin pitkä. Siksi niitä muokataan kemiallisesti kestävämmiksi. Tutkimus on johtanut erityisesti kroonisten kudonvaurioiden hoidossa käytettyjen, lääkeainetta annostelevien haavasidomateriaalien kehittämiseen.<sup>9</sup> Latausjärjestelmissä hydrogeelien

toiminta perustuu kumimaiseen, joustavaan rakenteeseen sekä pintajännityksen vähäisyyteen hydrogeelin sisältämän veden ja haavan erittämän kudoksen välillä. Tällöin immuunijärjestelmän haavasidoksiin kohdistama negatiivinen vaste on pieni ja annostelu onnistuu helpommin. Hydrogeelit imeytyvät heikosti, eivätkä geelimäisen koostumuksensa vuoksi tartu kiinni kudoksen pintaan. Lisäksi hydrogeelit ovat ominaisuuksiltaan saman tyyppisiä kuin solun ulkoinen ympäristö, mikä edistää lääkeaineen vaikutusta. DDS:ään kapseloitujen lääkeainemolekyylien vapautumista säädellään paitsi materiaalin huokoskoolla myös lääkeaineen hydrodynaamisella koolla.<sup>1</sup>

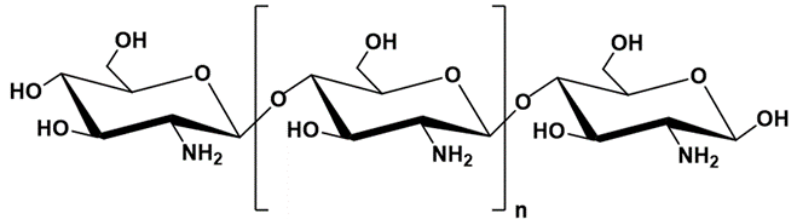
Haavasidosmateriaaleilla on merkitystä valittaessa sidostarpeita joko akuuttien tai pitkäaikaisten haavojen hoitoprosesseihin. Kitosaanipohjaiset hydrogeelit ovat sopivampia akuuttien haavojen tarpeisiin, koska ne lisäävät jo alkuvaiheessa ihon kollageenin tuotantoa ja edistävät kudosten uusiutumista. Kitosaanipohjaiset materiaalit soveltuvat myös kroonisten haavojen parantamiseen, koska kitosaani ehkäisee arpikudoksen muodostumista: se vähentää kudosten kasvutekijöiden (TGF- $\beta$ 1, *transforming growth factor  $\beta$ 1*) ilmenemistä, jotka aiheuttavat arpeutumista.<sup>10</sup> Pitkäaikaisten haavojen hoidossa sekä kitosaani- että hyaluronihappopohjaiset hydrogeelit ovat käyttökelpoisia. Hyaluronihappo on DDS:nä monipuolisempi, koska siitä voidaan valmistaa hydrogeelipitoisia lääkeainekalvoja, jotka vapauttavat lääkeainetta hallitusti ja pidemmällä aikavälillä. Tämä ominaisuus on hyödyllinen etenkin kroonisessa paranemisprosessissa.<sup>4</sup> Hyaluronihappo sopiikin esimerkiksi diabeettisiin haavoihin ja niiden sidostarpeisiin.<sup>5</sup>

### 3 Kitosaani

#### 3.1 Kitosaanin rakenne ja sidokset

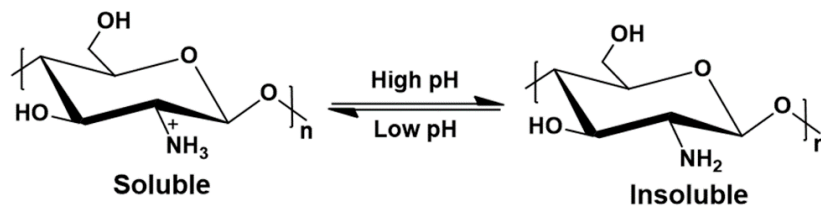
Kitosaani,  $(C_6H_{11}O_4N)_n$  (CS; Kuva 3), on luonnossa esiintyvän kitiinipolymeerin johdannainen. Luonnossa kitiiniä tavataan esimerkiksi äyriäisten ja hyönteisten kuorissa. Kitosaani on kitiinistä deasetyloitu polymeeri. Se koostuu  $\beta$ -1,4-sitoutuneesta D-glukosamiinista, joka on kitosaanimolekyylin deasetyloitu yksikkö, ja N-asetyyli-D-glukosamiinista, joka on molekyylin asetyyloitu yksikkö.<sup>11</sup> Kitosaanipohjaisilla hydrogeeleillä on myös positiivisesti varautuneita

aminoryhmiä, jotka voivat adsorboitua negatiivisesti varautuneiden bakteerien kanssa. Adsorboitumisen ansiosta kitosaania sisältävät hydrogeelit ovat antimikrobisia aineita.<sup>2</sup>



**Kuva 3.** Kitosaanin rakennekaava.<sup>1</sup>

Kitosaani on heikko polyemäs, jonka pKa-arvo on noin 6,5. Kitosaanimolekyylin varaustiheys vaihtelee pH-arvojen 6–6,5 välillä. Kitosaanin pH-herkkyyden vuoksi sitä käytetään DDS:ssä. Molekyylin liuennot ja liukenematon muoto vaihtelevat pH-arvojen 6–6,5 välillä (Kuva 4). Tämä tarkoittaa, että korkeammassa pH:ssa kitosaani on liukenemattomassa ja matalammassa liuenneessa muodossa.<sup>1</sup>



**Kuva 4.** Kitosaanin liuenneen ja liukenemattoman muodon rakennekaavat kitosaanin pKa-arvoa alhaisemmassa ja korkeammassa pH:ssa.<sup>1</sup>

Hydrogeeleissä käytetty kitosaani jaetaan rakenteen ja sitoutumisen perusteella kolmeen ryhmään:

- 1) Kovalenttinen sitoutuminen itsensä kanssa eli vähintään kaksi kitosaanimolekyylä liittyy toisiinsa kovalenttisella sidoksella. Polymeeriketjujen tiheyden kasvaessa kovalenttiset vuorovaikutukset tulevat hallitseviksi.<sup>3</sup>

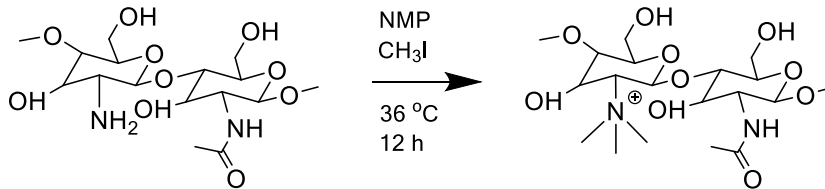
2) Toissijaiset (sekundääriset) vuorovaikutukset, joita ovat vetysidokset ja hydrofobiset vuorovaikutukset asetyloituneiden kitosaaniyksiköiden välillä. Kovalenttiset ja sekundääriset vuorovaikutukset voivat aiheuttaa konformaatiomuutoksia kitosaanimolekyylissä.<sup>3</sup>

3) Hybridipolymeeriverkot (HPN, *hybrid polymer networks*), joiden verkkorakenteessa on kitosaanin lisäksi jotain muuta polymeeriä. Niiden rakenne on joko läpäisevä tai puoliläpäisevä. HPN:ja valmistetaan lisäämällä reagoimattomia polymeeriketjuja kitosaaniin ennen valmistusprosessia. Prosessi johtaa ketjumaisen kitosaaniverkon muodostumiseen, jossa ei-reagoiva polymeeriketju on kiinnittyneenä. Mikäli edellä mainittu ei-reagoiva polymeeriketju ketjutetaan edelleen, saadaan aikaan täydellisesti läpäisevä hybridipolymeeriverkko (IPN, *interpenetrating polymer network*). Osittain tai täydellisesti läpäisevät hydrogeelit voivat olla mikrorakenteeltaan ja täten ominaisuuksiltaan hyvinkin erilaisia, joten niiden käyttötarkoitusta tulee pohtia aina tapauskohtaisesti.<sup>3</sup>

### 3.2 Kitosaanipohjaisten hydrogeelien valmistus

Puhtaan kitosaanin valmistuksessa hyödynnetään kitosaanin alkuperäisen muodon, kitiinin, rakennetta ja molekyylitason muokkausta.<sup>1</sup> Erilaisia kitosaanipohjaisia hydrogeelejä valmistetaan kemiallisesti muokkaamalla. Vaatimuksena voi olla esimerkiksi hyvä vesiliukoisuus tai kyky tukea solujen uusiutumista. Haavasidoksissa trimetyylikitosaani (TMC), karboksimeetyylikitosaani (CMC) ja karboksimeetyylitrimetyylikitosaani (CMTMC) ovat hyviä materiaaleja. Kitosaanin trimetylointi (Kuva 5) parantaa lääkeaineiden tai oligonukleotidien kuljetusta ja tarttumiskykyä kudoksen pintaan. Metylointi tapahtuu kolmivaiheisessa kitosaanitrimetylointi-reaktiossa, jossa muodostuu *N,N,N*-trimetyylikitosaania. TMC:llä on pysyviä positiivisia varauksia kitosaanirungon C-2-paikassa. Ensimmäisessä reaktiovaiheessa kitosaani käsitellään metyyljodidilla. Tällöin tuotteena syntyy *N*-metyyli-2-pyrrolidonia (NMP) ja natriumhydroksidin vesiliuosta. Reaktion ongelmana on hallitsematon trimetylaatio: O-metylaatiota tapahtuu myös rungon C-3- ja C-6-paikkoihin.<sup>10</sup>

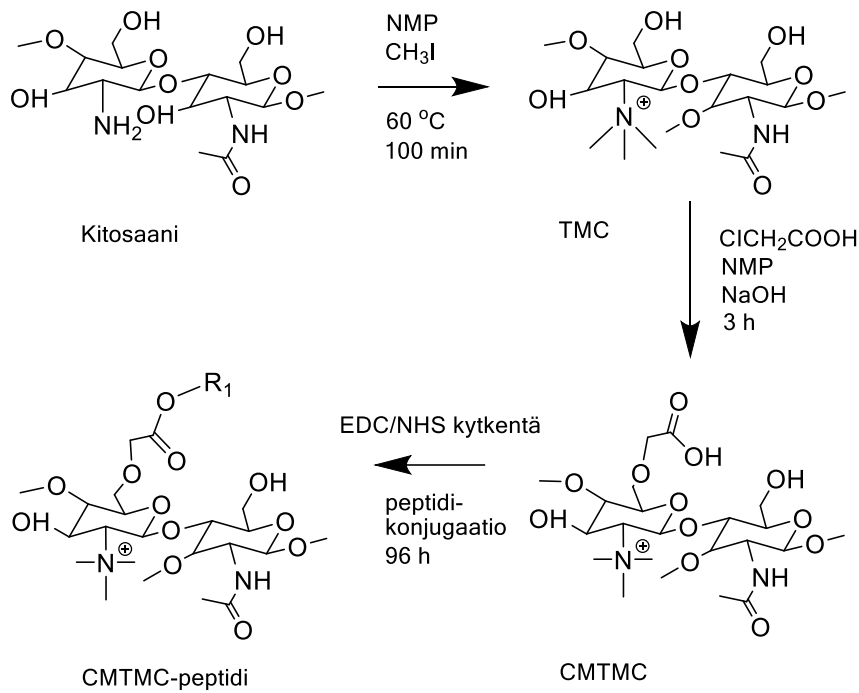
Kontrolloimattoman metyloinnin estämiseksi kitosaani käsitellään ensin muurahaishapolla ja formaldehydillä, jolloin reaktiossa muodostuu *N*-dimetyylikitosaania (DMC). Seuraavassa vaiheessa DMC:tä käsitellään metyylijodidilla NMP:n läsnä ollessa. Tuote pestään ja kuivataan, jolloin muodostuu varsinaista TMC:tä.<sup>10</sup>



**Kuva 5.** Trimetyylikitosaanin (TMC) synteesi.<sup>10</sup>

CMC:n ominaisuuksia ja käyttömahdollisuuksia muokataan lisäämällä kopolymeerirunkoon karboksimeetyyliryhmiä. Kemiallisella muokkauksella saadaan vesiliukoinen ja biologisesti yhteensopiva kitosaanijohdannainen. CMC:n valmistus on yksivaiheinen reaktio. Kitosaania käsitellään natriumhydroksidilla isopropanolin ja veden läsnä ollessa. Reaktioseokseen lisätään myös kloorietikkahappoa. Reaktiotuotteena muodostunut CMC on geelimäinen ja se vaikuttaa eri lääkeaineiden kanssa. Lisäksi se edistää ihon fibroblastien lisääntymistä ja ihon säiemäisen proteiinin muodostumista.<sup>10</sup>

CMC voidaan muokata edelleen karboksimeetyylitrimetyylikitosaaniksi (CMTMC). Metylointireaktio on sama kuin edellä TMC:n valmistuksessa, mutta NMP korvataan isopropanolilla, jolloin kitosaanilla on reaktiota varten enemmän vapaita hydroksyyliiryhmiä. Lisäksi TMC:tä täytyy käsitellä vahvalla emäksellä (esimerkiksi NaOH), jotta klooriasetaatti ehtii vaikuttaa kitosaaniketjuihin. Lopuksi tarvitaan vielä käsittely kloorietikkahapolla. Synteesi (Kuva 6) vaatii erityistä huolellisuutta, sillä O-metylointi estää reaktiot kitosaanirungon C-3 ja C-6 hiilissä ja näin ollen myös karboksimeetylaation. Jos CMTMC:tä käytetään esimerkiksi peptidien siirtoon tai nanohiukkasten valmistamiseen, se täytyy kompleksoida anionisten polymeerien kanssa.<sup>10</sup>



**Kuva 6.** Karboksimeetyylitrimetyylikitosaanin (CMTMC) valmistus.<sup>10</sup>

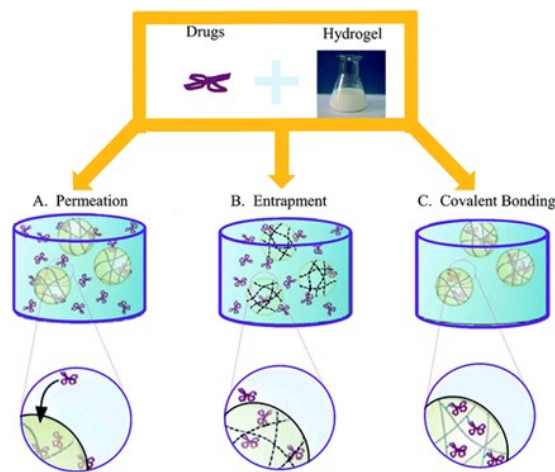
### 3.3 Kitosaani haavasidosmateriaaleissa

Kitosaanipohjaisia hydrogeelejä käytetään haavasidosmateriaaleissa biologisina ja lääkeaineita lataavina rakenteina. Kitosaania sisältävät haavasidokset ovat biohajoavia sekä biologisesti yhteensopivia ja aktiivisia kudosten kanssa. Lisäksi ne ovat antimikrobisia ja myrkyttömiä materiaaleja. Muita antimikrobisia aineita ovat esimerkiksi hopea ja sinkki sekä orgaaniset ja epäorgaaniset aineet, kuten antibiootit ja nanohopea.<sup>2</sup>

Kroonisten haavojen paranemisprosessi edellyttää aktiivista annostelua, koska tulehtunut haavaympäristö pyrkii estämään lääkeaineen vaikutusta. Kitosaanipohjaiset hydrogeelit tasapainottavat haavassa tapahtuvia biokemiallisia reaktioita ja edistävät kudosten uusiutumista.<sup>2</sup> Lisäksi niillä on hyvä haavan sterilointikyky eli antiseptiikka.<sup>1</sup> Haavasidoksissa ne ovat hengittäviä materiaaleja, eli ilman happea pääsee sidosmateriaalin läpi kudოსvauriokohtaan.<sup>10</sup> Seuraavassa kappaleessa perehdytään tarkemmin kitosaanin merkitykseen lääkeaineenlatausjärjestelmissä.

### 3.3.1 Kitosaani lääkeaineenlatausjärjestelmänä

Lääkeaineenlatausjärjestelmä (DDS, *drug delivery system*) annostelee kudoksiin esimerkiksi lääkemolekyylejä, kasvutekijöitä, kantasoluja, peptidejä ja antimikrobisia aineita. Kitosaanipohjaisen DDS:n vaikutus riippuu hydrogeelin fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista. Lääkeainetta voidaan ladata ja kuljettaa kudoksiin kolmella eri menetelmällä: läpäisyllä, sitoutumisella ja kovalenttisella sitoutumisella (Kuva 7). Jokaisella kuljetusmenetelmällä on hyötyjä ja haittoja. DDS:n käytössä tulee aina huomioida hydrogeeliverkoston rakenne ja lääkeaineen kemialliset ominaisuudet.<sup>2</sup>



**Kuva 7.** Kitosaanipohjaisten hydrogeelien toiminta lääkeaineenlatausjärjestelmänä. Lääkeainetta voidaan ladata kolmella eri tavalla: A) läpäisymenetelmällä (*permeation*), B) sitoutumisella (*entrapment*) ja C) kovalenttisella sitoutumisella (*covalent bonding*).<sup>2</sup>

Helpoin kolmesta lataus- ja kuljetustavasta on läpäisy, joka perustuu diffuusioon. Tällöin täysin gelatoitunut hydrogeeli sijoitetaan väliaineeseen, jota on kyllästetty jollain toisella aineella. Läpäisymenetelmällä ladataan pienimolekyylisiä lääkkeitä. Hydrogeelipolymeerit muodostavat lääkeainemolekyyliden kanssa kovalenttisia, ristikkäisiä siltarakenteita. Lääkeaineen purkautuminen latausjärjestelmästä tapahtuu ikään kuin sarjana, eli lääkettä vapautuu kerralla melko paljon, koska diffuusiolla on hyvin korkea lataustehokkuus. Suuren vapautumismäärän vuoksi lääkeaineen vapautumisaika on vain tunneista muutamiin päiviin. Diffuusiomenetelmän toinen heikkous on järjestelmään ladattujen lääkkeiden deaktivoimisen mahdottomuus.<sup>2</sup>



Sitoutumisella tarkoitetaan lääkeainemolekyylien sitomista jo gelatoitumisprosessin aikana. Menetelmä soveltuu erityisesti suurille lääkeainemolekyyille ja bioligandeille. Geelirakenteeseen voidaan ladata myös pienimolekyyllisiä lääkkeitä, peptidejä ja proteiineja sekä mikro- ja nanopartikkeleita. Sitoutumismenetelmällä voidaan ladata sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia lääkkeitä. Hydrogeelit ja lääkkeet muodostavat kovalenttisia sidoksia. Lääkettä vapautuu tällä annostelutavalla keskimääräisesti ja vapautuminen kestää muutamista päivistä viikkoihin ennen uutta lataustarvetta. Myös lääkkeiden deaktivoitumismahdollisuus on läpisyä parempi. Menetelmän haittapuolena on myrkyllisten aineiden mahdollinen huuhtoutuminen latausjärjestelmästä kudoksiin.<sup>2</sup>

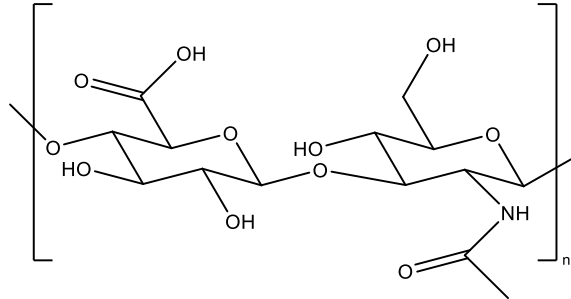
Kovalenttinen sitoutuminen polymeeriketjuihin ehkäisee myrkyllisten aineiden huuhtoutumista. Kovalenttisella sitoutumisella voidaan ladata pieniä molekyyliä, peptidejä ja proteiineja. Lääkeainemolekyylit sitoutuvat samalla periaatteella kuin kahdessa edellisessäkin lataustavassa: kovalenttisilla sidoksilla ja ristisilloilla. Lääkettä vapautuu vain pieninä annoksina ja vaikutusaika on päivistä jopa kuukausiin. Lataustapa sopii parhaiten hydrofiilisille lääkkeille. Lääkeaine on myös mahdollista deaktivoita.<sup>2</sup>

## 4 Hyaluronihappo

### 4.1 Hyaluronihapon rakenne ja sidokset

Hyaluronihappo eli hyaluronaani,  $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$  (HA; Kuva 8), on luonnostaan sidos-, epiteeli- ja hermokudoksissa esiintyvä disakkaridi. Sen tehtävä on kudosten uusiutumiskyvyn ylläpito eli kollageenisynteesin stimulointi. Lisäksi se edistää solujen lisääntymistä ja yhteenliittymistä.<sup>12</sup> Hyaluronihappo on molekyylipainoltaan suuri glykosamiiniglykaani (hiilihydraatti), jossa vuorottelevat *N*-asetyyli-glukosamiini ja glukuronihappo  $\beta$ -1,3- ja  $\beta$ -1,4-glykosididoksilla glukosimolekyyliin liittyneinä.<sup>13</sup> Hyaluronihapon rakenne on erittäin stabiili, koska funktionaaliset ryhmät (hydroksyyli-ryhmät, karboksylaatti ja anomeerinen hiili) ovat ekvatoriaalisessa asemassa ja vedyt aksiaalisessa asemassa. Hyaluronihappomolekyyli voi koostua jopa tuhansista peräkkäisistä

hiilirenkaista. Ihmiskehossa se esiintyy suolamuodossa (hyaluronaattina), ja sitä on kaikissa elävissä olennoissa. Erityisen paljon hyaluronihappoa on ihossa ja nivelissä.<sup>13,14</sup>

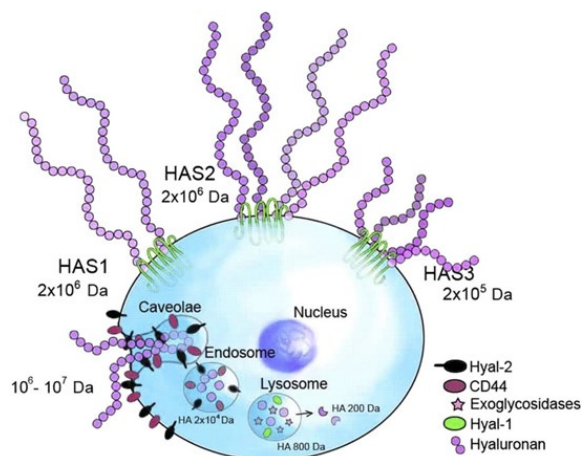


**Kuva 8.** Hyaluronihapon rakennekaava.<sup>8</sup>

Liuottimissa hyaluronihappomolekyylit jäykistyvät niin, että aksiaaliset vetyatomit muodostavat ei-polaarisen ja hydrofobisen osan ja ekvatoriaaliset sivuketjut polaarisemman, hydrofiilisen pinnan. Molekyylistä muodostuu kierteinen rakenne. Tällöin hyaluronihappopolymeeriketjut muodostavat satunnaisen kelarakenteen, jossa ketjut sekoittuvat toistensa lomiin.<sup>13</sup>

#### 4.2 Hyaluronihapon valmistus hyaluronisyntaasilla

Hydrogeeleissäkin käytettävän hyaluronihapon valmistuksessa hyödynnetään sekä biologisia että kemiallisia menetelmiä. Suurin osa solujen luonnollisesta glykosaminoglykaanista on soluissa Golgin laitteissa ja solulimakalvostoilla. Selkärankaisilla eliöillä on kolme homologista geeniä, jotka koodaavat kolmea soluissa sijaitsevaa hyaluronaanisyntaasia: HAS1, HAS2 ja HAS3 (Kuva 9). Jokainen syntaasi tuottaa identtistä polymeeriä, vaikkakin ketjujen pituudet voivat hieman vaihdella.<sup>13</sup>



**Kuva 9.** Solussa tapahtuva biologinen hyaluronihapposyntaasi eli hyaluronisyntaasi. HAS1 tuottaa vähiten ja HAS3 eniten lineaarisia hyaluronihappopolymeerejä. HAS3:n rakentamat polymeerit ovat lyhyempiä kuin HAS1:n ja HAS2:n.<sup>15</sup> Copyright © 2012 the American Physiological Society.

Synteesissä entsyymit lisäävät vuorotellen disakkaridirakenteen kasvavaan polymeeriketjuun glukuronihappoa ja *N*-asetyyliglukosamiinia. Substraatteina käytetään aktivoitujen ytimien nukleotidisokereita. Syntyneet molekyylit ovat yleensä melko suuria ja lineaarisia polymeerejä.<sup>13</sup> Hyaluraanisyntaasit sijaitsevat solukalvolla, jonne ne kuljetetaan Golgin laitteesta tai solulimakalvostolta.<sup>14</sup> Mikrobit, kuten bakteerit, valmistavat hyaluronihappoa hyaluraanisyntaasilla omalla solukalvolla. Mikrobitien avulla tuotetaan hyaluronihappoa suuren mittakaavan bioreaktoreissa teollisuus- ja tutkimuskäyttöön.<sup>17</sup>

Rilla *et al.*<sup>16</sup> ovat tutkineet, ettei HAS1 kyennyt muodostamaan hyaluraania juuri ollenkaan toisin kuin HAS2 ja HAS3. HAS1:n toimimattomuus kompensoitiin nostamalla D-glukuronihappo- ja *N*-asetyyliglukosamiinipitoisuudet kymmenkertaiseksi 1 mM glukosamiinia sisältävässä kasvatusliuoksessa. Kyseisen tutkimuksen mukaan kasvatusliuoksen glukosamiinipitoisuus vaikutti hieman HAS2-entsyymiin, mutta HAS3:een sillä ei ollut vaikutusta. HAS1 oli lähes kokonaan passiivinen, jos kasvuympäristössä ei ollut glukuronihappoa. Tällöin HAS2:n toiminta hieman kasvoi ja HAS3 tuotti polymeeriä suurella tehokkuudella.<sup>16</sup>

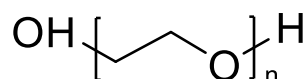
### 4.3 Hyaluronihappo haavasidosmateriaaleissa

Hyaluronihappohydrogeelit ovat kitosaanipohjaisten hydrogeelien tapaan myrkyttömiä, biohajoavia ja biologisesti yhteensopivia monien materiaalien kanssa. Myös niiden valmistus ja käyttö on edullista.<sup>9</sup> Haavasidoksissa käytettäviin hydrogeeleihin tarvitaan yleensä myös lisäaineesia, jotka edistävät kudosten uusiutumista ja jotka tarjoavat hermosoluille sopivan kasvu ympäristön (esimerkiksi hyaluronihappo). Sopivalla kasvu ympäristöllä tarkoitetaan solujen kasvulle optimaalista pH:ta.<sup>2</sup>

Hyaluronihappohydrogeelejä käytetään monimutkaisemmissa lääkeaineita annostelevissa sovelluksissa. Tällaisia sovelluksia ovat lääkeainekalvot. Myös näiden hydrogeelikalvojen toiminta perustuu DDS:ään. Kaksoisterapeuttisella käyttäytymisellä tarkoitetaan haavasidosmateriaalien lääkeainemolekyylejä sitovia ja niitä tarvittaessa vapauttavia ominaisuuksia. Ne lievittävät kipua ja ehkäisevät tulehduksia vaurioituneessa kudoksessa.<sup>4,5</sup> Seuraavissa kappaleissa perehdytään tarkemmin hyaluronihapon merkitykseen lääkeainetta annostelevissa hydrogeelikalvoissa.

#### 4.3.1 Polyetyleeniglykoli-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö

Hyaluronihaposta ja hydrogeelistä on valmistettu lääkeainekalvo, joka annostelee lääkeainetta kontrolloidusti. Valmistusprosessissa hyaluronihappo muutetaan ensin adipiinidihydratsidijohdannaiseksi (HA-ADH). Muutoksen jälkeen se yhdistetään siltarakenteella makromolekyylisen reagenssin, polyetyleeniglykoli-propionialdehydin, kanssa. Tällöin muodostuu hydrogeelille tyypillinen verkkomainen polymeerirakenne. Lopullinen hyaluronihappohydrogeelikalvo valmistettiin liuotINVALUMENETELMÄLLÄ. Menetelmässä lääkeaineet liuotetaan ensin veteen tai etanoliin. Sen jälkeen ne lisätään liuokseen, joka sisältää ADH:n vesiliuosta. Kun liuos yhdistetään polyetyleeniglykolin (PEG; Kuva 10) vesiliuokseen, saadaan lääkeainetta sisältävä polyetyleeniglykoli-hyaluronihappohydrogeelikalvo (PEG-HA-kalvo). Jähmettymisen aikana kalvoja kuivatetaan hitaasti lähes 400 °C:ssa.<sup>4</sup>

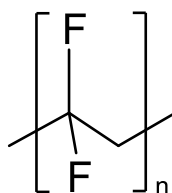


**Kuva 10.** Polyetyleeniglykolin (PEG) rakennekaava.<sup>4</sup>

Prosessin lopputuote on biologisesti yhteensopiva kudosten kanssa. Kosketuksessa kudoksen kanssa kalvo muuttuu joustavaksi ja hydratoituu geelimäiseksi materiaaliksi. Kalvo on helppo ja edullinen säilyttää kuivassa ympäristössä. Sen aktivoitumiseen menee yleensä vain muutama sekunti.<sup>11</sup> Materiaalin huokoskoolla ja lääkeainemolekyylien hydrodynaamisella koolla hallitaan lääkeaineen vapautumisnopeutta ja -määrää.<sup>1</sup> Kalvon annostelutehokkuutta on tutkittu käyttämällä samanaikaisesti sekä antimikrobisia että tulehduskipulääkkeitä.<sup>4</sup>

#### 4.3.2 Polyvinyylideenifluoridi-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö

Polyvinyylideenifluoridi (PVDF; Kuva 11) on fluoratuista hiilivetyketjuista rakentuva polymeeri. Se on sekä kemiallisesti että termisesti hyvin stabiili molekyyli. Lisäksi se on hydrofobinen ja mekaanisesti kestävä. PVDF-kalvon pinnat ovat sisältä- ja ulkoapäin huokoisia: niiden ansiosta lääkeainetta voidaan varastoida kalvon sisälle ja vapauttaa pintahuokosten kautta kudoksiin. Vapautumis- ja varastointiominaisuuksistaan huolimatta PVDF-polymeerit eivät ole muokkaamattomina biologisesti yhteensopivia kudosten kanssa.<sup>5</sup>



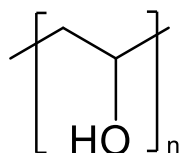
**Kuva 11.** Polyvinyylideenifluoridin (PVDF) rakennekaava.<sup>5</sup>

PVDF toimii haavasidosmateriaaleissa lääkesäiliönä. Geelimäinen hyaluronihappokerros varmistaa kalvon sopivuuden solunulkoiseen ympäristöön. Kaksoiskalvon avulla lääkeainetta annostellaan suoraan ja kontrolloidusti ihon läpi. Polyvinyylideenifluoridi-hyaluronihappokalvo (PVDF-HA-kalvo) parantaa fibroblastien toimintakykyä ja adheesiota lääkeainekalvon suuntaan. Lääkeainemolekyylit sitoutuvat vetysidoksin kalvojen pintaasiin ja huokosiin.<sup>5</sup>

PVDF-HA-kaksoiskalvo ei ole täysin ongelmaton. Koska hydrogeeleillä on taipumus absorboida vettä, haavasidosmateriaalien mekaaninen lujuus ja kaksoiskalvon yhteensopivuus kudosten kanssa vähenevät. Tällöin myös lääkeaineen annostelukyky heikkenee. PVDF estää absorboituneen veden haittavaikutuksia ja pitää sidosten vakauden ennallaan, eikä materiaalin kestävyys huonone merkittävästi. PVDF-HA-kalvon vetolujuus ja kestävyys paranee, kun PVDF-pitoisuus kasvaa: mitä enemmän liuoksessa on polymeeriketjuja, sitä parempi on kalvon viskositeetti ja Youngin moduuli eli jäykkyys.<sup>5</sup>

#### 4.3.3 Polyvinyylialkoholi-hyaluronihappokalvojen valmistus ja käyttö

Polyvinyylialkoholi (PVA; Kuva 12) on hydroksyyliiryhmiä sisältävä vesiliukoinen polymeeri. Hyaluronihappoa liitetään jäädytys-sulatusmenetelmäksi kutsutulla kiteytyksellä PVA:han. Sykli toistetaan kolme kertaa peräkkäin, jolloin PVA ja hyaluronihappo liittyvät toisiinsa. PVA-molekyylit kiteytyvät jäähtyessään ja muodostavat järjestäytyneitä lamelliverkostoja.<sup>18</sup>



**Kuva 12.** Polyvinyylialkoholin (PVA) rakennekaava.<sup>18</sup>

Fysikaalista eli ilman kemiallista liuotinta tapahtuvaa gelatoitumisreaktiota suositaan, koska liuottimen puuttuminen tekee geelistä myrkyttömän. Myrkyllisyyden lisäksi kemialliset liuottimet

voivat sitoutua esimerkiksi proteiineihin, lääkeainemolekyyleihin tai soluihin, jolloin ne vaikuttavat kalvon biologiseen toimintaan heikentävästi. PVA-molekyylin kiteytymiseen perustuvassa reaktiossa tislattuun veteen lisätään vesiliuosta, joka sisältää 5 % PVA:ta, 1 % hyaluronihappoa ja 0,3 % askorbiinihappoa. Polymeeriliuosta sekoitetaan ultraäänihauteessa 40 °C:ssa noin tunnin ajan, jonka jälkeen seosta vorteksoidaan pari minuuttia homogeenisuuden varmistamiseksi. Noin 15 ml seosta kaadetaan petrimaljoihin, pakastetaan 18 tunniksi (-20 °C) ja sulatetaan kuuden tunnin ajan 25 °C:ssa. Kalvon mekaanisen kestävyuden lisäämiseksi edellä mainittu sykli toistetaan kolme kertaa. Valmiiden kalvojen paksuus vaihteli (150–200 µm) ja märkien kalvojen paksuus on kuivia suurempi. Pakastekuivauksella tyhjiössä ja huoneenlämmössä saadaan lopullisia, biologisesti toimivia polyvinyylialkoholi-hyaluronihappokalvoja (PVA-HA-kalvoja).<sup>18</sup>

Hyaluronihapon lisäys muodostaa siltarakenteita PVA-kalvojen ja hyaluronihappomolekyylien välillä. Hyaluronihapon endogeenisuudesta johtuen ne ovat sopivia kroonisia kudonsvaurioita hoitaviin haavasidosmateriaaleihin. Hyaluronihappo tekee kalvoista mekaanisesti joustavia, proteiineja absorboivia sekä turpoavia ja mukautuvia materiaaleja. PVA-HA-kalvot ovat myrkyttömiä ja biohajoavia kantojärjestelmiä. Ne eivät sisällä karsinogeneenejä. PVA-molekyylien rooli painottuu lähinnä gelatoitumisprosessiin ja kiteytymiseen. Lisäksi PVA kykenee bioadhesiivisten ominaisuuksiensa ansiosta stimuloimaan kudoksia ja edistämään niiden paranemista.<sup>18</sup>

## 5 Yhteenveto

Hydrogeelit rakentuvat verkkomaisesti toisiinsa sitoutuneista polymeeriketjuista ja niiden välisestä väliaineesta, vedestä. Veden absorboimiskyvyn ansiosta ne ovat joustavia materiaaleja kemiallisissa ja biologisissa sovelluksissa. Veden absorboituessa geeli turpoaa ja sen tilavuus muuttuu. Hydrofobisista vuorovaikutuksista johtuen polymeeriketjut ja vesi jäävät eri faaseihin.<sup>6</sup> Funktionaalisten ryhmiensä ansiosta ne eivät liukene gelatoitumisvaiheessa. Gelatoitumisprosessi on pH-herkkä, eli liian korkeassa tai matalassa pH:ssa muodostuu myös sivutuotteita, jotka haittaavat sidosten muodostumista molekyyliden välille ja muuttavat geelin koostumusta.<sup>2</sup>

Lääkeaineenlatausjärjestelmissä hydrogeelipinnat toimivat lataus- ja annostelupintoina, joiden toiminta perustuu kemiallisten sidosten muodostumiseen lääkeaineen ja hydrogeelin välille. Kitosaani ja hyaluronihappo tekevät järjestelmistä biologisesti yhteensopivia ja turvallisia, sillä ne ovat luonnossa esiintyvien molekyylien johdannaisia.<sup>9</sup> DDS:n avulla lääkeaineiden määrää ja vapautumisnopeutta säädellään tarkoitukseen sopivaksi. DDS annostelee siihen ladattua ainetta kolmella tavalla: diffuusioon perustuvalla läpäisyllä, sitoutumisella ja kovalenttisella sitoutumisella.<sup>2</sup>

Myös hyaluronihappohydrogeelikalvoilla annostellaan lääkeaineita. PEG-HA- ja PVDF-HA-kalvojen lataus- ja annostelukyky perustuu pinnan huokoskokoon.<sup>4,5,18</sup> PEG-HA-kalvojen aktivoituminen vie vain muutaman sekunnin.<sup>11</sup> PVDF ei ole muokkaamattomana soluille sopiva materiaali: siksi kalvojen pintaan on lisättävä valmistusvaiheessa hyaluronihappopohjainen hydrogeelikerros. Kerroksen vesiabsorptio heikentää kalvon biologista yhteensopivuutta, kestävyyttä ja annostelukykyä. PVDF kykenee kuitenkin estämään absorptio aiheuttamia rakennemuutoksia ja näin ollen palauttamaan kalvon lataus- ja annostelukyvyn.<sup>5</sup> PVA taas stimuloi bioadhesiivisilla ominaisuuksillaan kudoksia ja niiden uusiutumiskykyä.<sup>18</sup>



## Kirjallisuus

1. El-banna, F. S.; Mahfouz, M. E.; Leporatti, S.; El-Kemary, M. ja Hanafy, N. A. N., Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels, *Appl. Sci.*, **2019**, *9*, 2193.
2. Liu, H.; Wang, C.; Li, C.; Qin, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Li, Z. ja Wang, J., A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing, *RSC Adv.*, **2018**, *8*, 7533-7549.
3. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A. ja Gurny, R., Structure ja interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2004**, *57(1)*, 19-34.
4. Luo, Y.; Kirker, K. R. ja Prestwich, G. D., Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery, *J. Control Release*, **2000**, *69*, 169-184.
5. Abednejada, A.; Ghaee, A.; Eduarda, S. M.; Sharmab, M.; Nevesc, B. M.; Freireb, M. G.; Nourmohammadi, J. ja Mehrizia, A. A., Polyvinylidene fluoride–Hyaluronic acid wound dressing comprised of ionic liquids for controlled drug delivery and dual therapeutic behavior, *Acta Biomater.*, **2019**, *100*, 142-157.
6. Hoffman, Allan S., Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *64*, 18–23.
7. Liu, Y.; He, W.; Zhang, Z. ja Lee, B. P., Recent Developments in Tough Hydrogels for Biomedical Applications, *Gels*, **2018**, *4*, 46.
8. Sionkowska, A.; Gadomska, M.; Musial, K. ja Piatek, J., Hyaluronic Acid as a Component of Natural Polymer Blends for Biomedical Applications: A Review, *Molecules*, **2020**, *25*, 4035.
9. Burdick, J. A. ja Prestwich, G. D., Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications, *Adv Mater.*, **2011**, *23(12)*, H41-H56.
10. Patrulea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G. ja Jordan, O., Chitosan as a starting material for wound healing applications, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, **2015**, *97*, 417-426.
11. Islam, S.; Bhuiyan, M. A. R. ja Islam M. N., Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering, *J. Polym. and the Environ.*, **2016**, *25*, 854-866.

12. Selyanin, M. A.; Boykov, P. Y.; Khabarov, V. N. ja Polyak, F., Hyaluronic acid, Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine, *John Wiley Sons Inc*, **2015**.
13. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P. ja Kolar, J., Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, **2008**, *53(8)*, 397-411.
14. Siiskonen, Hanna. **2013**. "Hyaluronan and hyaluronan synthases." PhD thesis, University of Eastern Finland.
15. Stridh, S.; Palm, F. ja Hansell, P., Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2012**, *302*, R1235-R1249.
16. Rilla, K.; Oikari, S.; Jokela, T. A.; Hyttinen J. M. T.; Kärnä, R.; Tammi, R. H. ja Tammi, M. I., Hyaluronan Synthase 1 (HAS1) Requires Higher Cellular UDP-GlcNAc Concentration than HAS2 and HAS3, *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 5973-5983.
17. Sze, J. H.; Brownlie, J. C. ja Love, C. A., Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review, *3 Biotech.*, **2016**, *6*, 67.
18. Fahmy, A.; Kamoun, E. A.; El-Eisawy, R.; El-Fakharany, E. M.; Taha, T. H.; El-Damhougy, B. K. ja Abdelhai, F., Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and *in vitro* Bio-Evaluations, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, *7*, 26.

## **EXPERIMENTAL PART**

# **Preparing hyaluronic acid-adipic acid dihydrazide based hydrogels**

Experimental project

University of Jyväskylä

Department of Chemistry

Synthetic and Structural Nanochemistry

15.02.2022

Senni Mäntynen



## Abstract

Hyaluronic acid (HA) gels were prepared both in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS<sup>++</sup>) and phosphate buffered saline (PBS) solutions. The crosslinking of HA follows the amide formation mechanism in which the free carboxylic group of HA is activated by 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) before reaction with adipic acid dihydrazide (ADH) towards HA-ADH gels. Gelation is pH sensitive and is achieved at a range of 3-5. The pKa value of HA is 3, while at higher pH (>3.5), EDCI is hydrolyzed towards *N*-acyl urea, preventing the crosslinking with ADH. In literature, the given pH values range between 3.5 and 4.75. Further to this, the IR spectra of HA and ADH powders were compared to those of HA-ADH gel films. The obtained data revealed the formation of amide bonding, which resulted in the crosslinking of HA.

**Table of contents****EXPERIMENTAL PART**

<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Table of contents</b> .....	v
<b>Abbreviations</b> .....	vi
<b>1 Introduction</b> .....	1
<b>2 Aim of work</b> .....	2
<b>3 Materials and methods</b> .....	3
3.1 The chemical structures of molecules.....	3
3.2 The reaction mechanism.....	5
3.3 Buffer solution and cell culture medium.....	5
3.4 Swelling studies.....	6
<b>4 Results and discussion</b> .....	6
4.1 HA-ADH gels prepared in PBS and DPBS <sup>++</sup> using different gelation protocols .....	6
4.2 Preparation of HA-GO hybrid hydrogels in PBS.....	13
4.3 Swelling studies.....	13
4.4 IR-spectroscopy analysis .....	15
<b>5 Conclusions</b> .....	16
<b>References</b> .....	17
<b>Appendices</b> .....	

**Abbreviations**

<b>HA</b>	hyaluronic acid
<b>ECM</b>	extracellular matrix
<b>ADH</b>	adipic acid dihydrazide
<b>DDS</b>	drug delivery system
<b>EDCI</b>	1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>DI</b>	deionized water
<b>DPBS<sup>++</sup></b>	Dulbecco's phosphate buffered saline with Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>
<b>GO</b>	graphene oxide



## 1 Introduction

Gels are elastic, viscous and self-supporting soft materials. One of the main gel categories is polymeric gels, in which the matrix is formed by the crosslinking of long molecular chains (solid phase) encapsulating the liquid phase (solvent of the gel). Gels are also classified as organic gels, hydrogels, inorganic gels (e.g., metallo gels) depending on the used solvent and the type of the gelator molecules.<sup>1</sup> Hydrogels are usually formed by amphiphilic gelator molecules. Such materials have a viscoelastic behavior and are robust, self-supporting gels with interesting mechanical properties (e.g., swelling).<sup>2</sup> To be used for biochemical applications, they need to be stable at 37 °C under physiological pH conditions. To this extent, pH sensitive materials are extremely important as, for example, gelation can be triggered by changing the pH value of the gelators' solution.<sup>3</sup>

Graphene oxide is used, for example, in biomedical applications, in the detection of Alzheimer's disease and in combination with hydrogels.<sup>4</sup> Phosphate buffered salines are also used to dissolve hyaluronic acid in the hydrogels.<sup>5</sup> Graphene oxide and hyaluronic acid make amide bonds, and the molecules conjugate covalently.<sup>6</sup> To be used in the human body, the hydrogels must include the cell culture medium, making them biologically suitable.<sup>5</sup>

## 2 Aim of work

This project was done in the Nanoscience Center of the University of Jyväskylä during 6<sup>th</sup> – 17<sup>th</sup> September 2021. The project was instructed by Dr. Efstratios Sitsanidis.

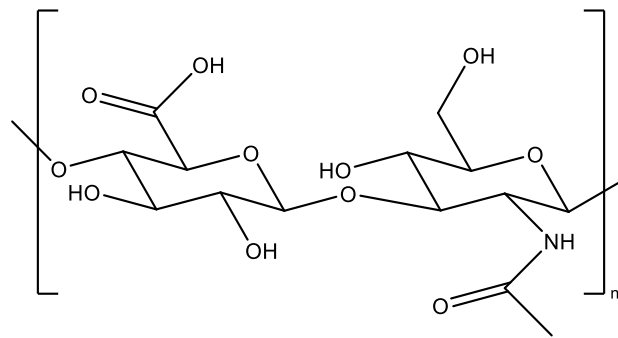
The project focuses on the preparation of biocompatible hydrogels for 3D nerve cell cultures applications. The experimental part describes the preparation of hyaluronic acid (HA) based hydrogels under different conditions and evaluation of their stiffness by the vial inversion method. The main goal was to establish a robust gelation protocol towards self-supporting hydrogels, which is highly reproducible. The gels must resemble the stiffness of the nerve tissue (~100-1000 Pa) to be considered as “artificial extracellular matrices” (ECM).<sup>3</sup>

Both hyaluronic acid-adipic acid dihydrazide (HA-ADH) hydrogels and films can be used for 3D and 2D nerve cell culturing, respectively. The project aims at transplantable materials to the human brain able to restore impaired nerve tissue and help, for instance, patients with Parkinson’s disease and brain trauma. The hydrogels not only mimic the ECM, but they can also function as drug delivery systems (DDS). The most important property of HA based hydrogels is their biocompatibility since HA consists of the major component of the brain’s ECM.<sup>3</sup>

### 3 Materials and methods

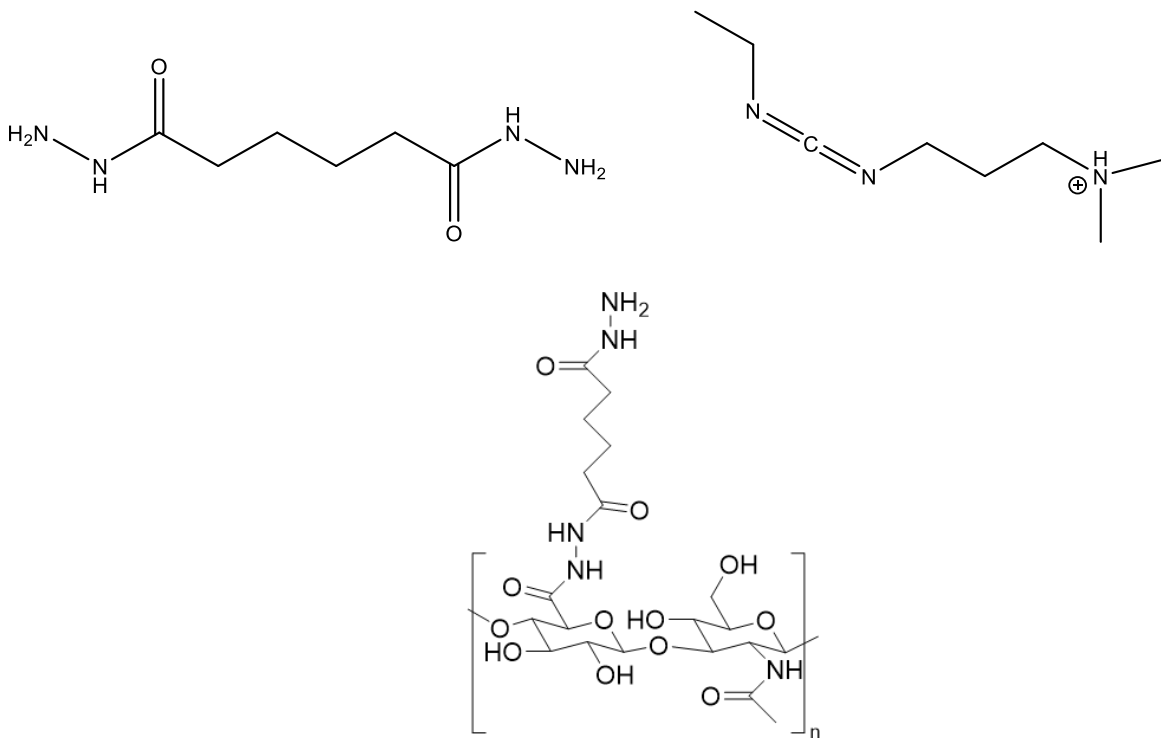
#### 3.1 The chemical structures of molecules

HA is a disaccharide made of *N*-acetylglucosamine and glucuronic acid linked by a glycosidic bond (Figure 1). HA is a high molecular weight glucosamine glycan (a carbohydrate) with alternating *N*-acetylglucosamine and glucuronic acid moieties with  $\beta$ -1.3- and  $\beta$ -1.4-glycosidic bonds attached to the glucose. The structural configuration of HA is very stable because the functional groups (hydroxyl groups, the carboxylate, and the anomeric carbon) are in the equatorial position while the hydrogen atoms are in the axial position.<sup>7</sup>



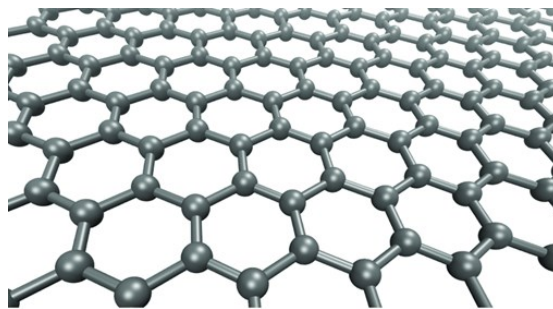
**Figure 1.** The chemical structure of HA.<sup>5</sup>

Adipic acid dihydrazide (ADH) acts as the crosslinker of HA by the amide bond formation (Figure 2).<sup>5</sup> Only the free carboxylic functional group of HA participates in the crosslinking reaction with the adipic acid dihydrazide (ADH). Numerous hydroxyl groups on the HA scaffold do not participate in intermolecular interactions since the gel is polymeric or chemical and not physical or supramolecular. 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI, Figure 2) activates the carboxyl group of HA.<sup>5</sup>



**Figure 2.** The chemical structure of ADH and EDCI (top). HA and ADH molecules crosslink and form an amide bond (bottom).<sup>5</sup>

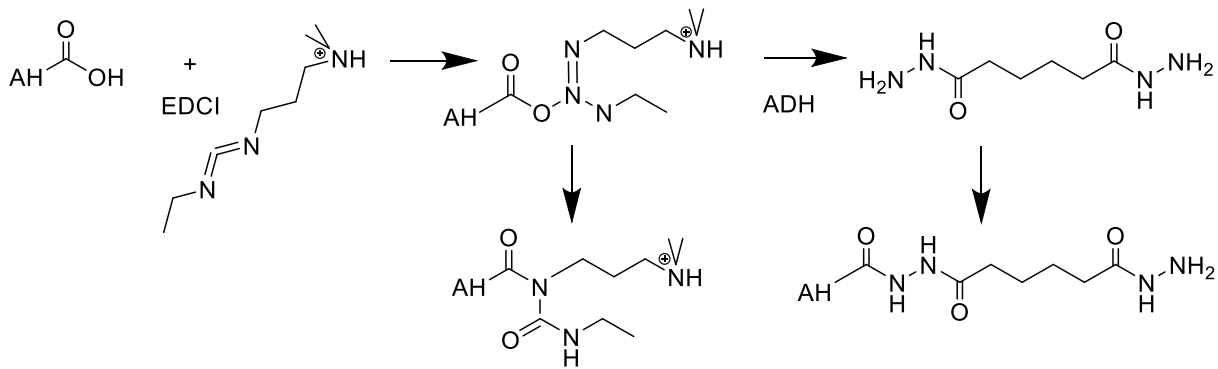
Graphene is a 2D material consisting of  $sp^2$  hybridized carbon atoms bonded together in a hexagonal lattice (Figure 3).<sup>6</sup>



**Figure 3.** The hexagonal lattice of graphene.<sup>8</sup>

### 3.2 The reaction mechanism

For the preparation of HA-ADH gels, the chemical reaction of HA with EDCI activates its carboxyl groups allowing the ADH crosslinking. If the pH of the reaction exceeds pH 5, EDCI will form *N*-acyl urea derivatives that will hinder the ADH crosslinking. Therefore, we maintained the system's pH between 3.5 and 5. In literature, the given pH values range between 3.5 and 4.75.<sup>9</sup> Figure 4 depicts the chemical reaction of HA's activation and crosslinking in addition to the side *N*-acyl urea byproduct formed at the higher pH values.<sup>5</sup>



**Figure 4.** The reaction mechanism of the HA-ADH crosslinking.<sup>5</sup>

### 3.3 Buffer solution and cell culture medium

The concentration of phosphate buffer solution (PBS) was 137 mM, NaCl; 10 mM, phosphate salts; and 2.7 mM, KCl. PBS solution was prepared by dissolving one tablet of PBS in 100 mL of deionized water (DI). The initial pH was 7.6, which was changed to 5.3 by the dropwise addition of 0.1 M HCl. The pH of DI water was 7.73. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS<sup>++</sup>) was purchased from ThermoFisher Scientific and was used without any pH modification.

The cell culture medium was prepared by mixing Neurobasal Plus Medium solution (98 mL), B-27 Plus Supplement solution (2 mL) and GlutaMAX Supplement solution (250  $\mu$ L). The final mixture was kept in the fridge at 2-4  $^{\circ}$ C while covered in foil.

### 3.4 Swelling studies

We have evaluated the ability of the formed gels to absorb solvent (PBS) by swelling studies. By comparing the swelling degrees, it is possible to determine how much the gel has absorbed water. To calculate the swelling degree ( $SD$ -%) following equation was used

$$SD\text{-}\% = \frac{W_t}{W_0} \cdot 100 \% \quad (1)$$

where  $W_t$  is the mass of the swollen gel (wet gel) and  $W_0$  is the mass of the initial gel before the addition of the buffer solution (dry gel).

## 4 Results and discussion

### 4.1 HA-ADH gels prepared in PBS and DPBS<sup>++</sup> using different gelation protocols

HA based gels were prepared using two different buffer solutions (PBS and DPBS<sup>++</sup>). Both gel systems were self-supporting, and gelation started almost immediately with the addition of acid. Gelation trials were performed at the different pH values to estimate the pH value for sufficient gelation.

## Gelation trials

Gels were prepared by mixing three different solutions A, B and C.

- Solution A: 40 mg of HA were dissolved in 3200  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 7.63).
- Solution B: 20.4 mg of EDCI were dissolved in 400  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 7.63).
- Solution C: 20 mg of ADH were dissolved in 400  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 7.63).

Solution A (800  $\mu\text{L}$ ) was transferred in three vials, I, II and III.

**Trial 1.** In vial I, 100  $\mu\text{L}$  of EDCI was added. The pH was 7.9. Then, 1 drop of (aq) HCl, 1.0 M and 100  $\mu\text{L}$  of ADH were added. The final pH was 4.0 (Figure 5).



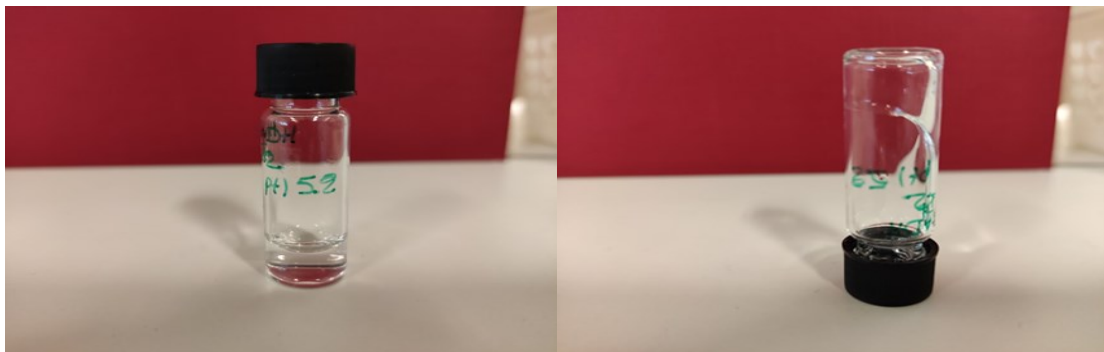
**Figure 5.** Preparation of HA-ADH gels at the final pH 4.0. Trial 1 did not yield a self-supporting gel but a viscous flowing solution.

**Trial 2.** In vial II, 100  $\mu\text{L}$  of EDCI was added. The pH was 7.9. Then, three drops of (aq) HCl, 0.1 M were added, and the pH changed to 5.81. 100  $\mu\text{L}$  of ADH was added, and the pH changed to 6.25. Finally, two more drops of (aq) HCl, 0.1 M was added, and the pH of the sample was measured to be 4.8 (Figure 6).



**Figure 6.** Preparation of HA-ADH gels at pH 4.8. Trial 2 yielded a self-supporting gel.

**Trial 3.** In vial III, 100  $\mu\text{L}$  of EDCI was added. The pH was 7.9. Then, 100  $\mu\text{L}$  of ADH was added, followed by four drops of (aq) HCl, 0.1 M to the pH value of 5.2 (Figure 7).



**Figure 7.** Preparation of HA-ADH gels at pH 5.2. Trial 3 did not yield a self-supporting gel but a free-flowing viscous solution.

#### Gelation trial outcome

The final pH of gels was trial I: 4.0, II: 4.8, and III: 5.2. Trials I and III did not yield a self-supporting gel but a viscous free-flowing solution. Only trial II was successful yielding a self-supporting gel.

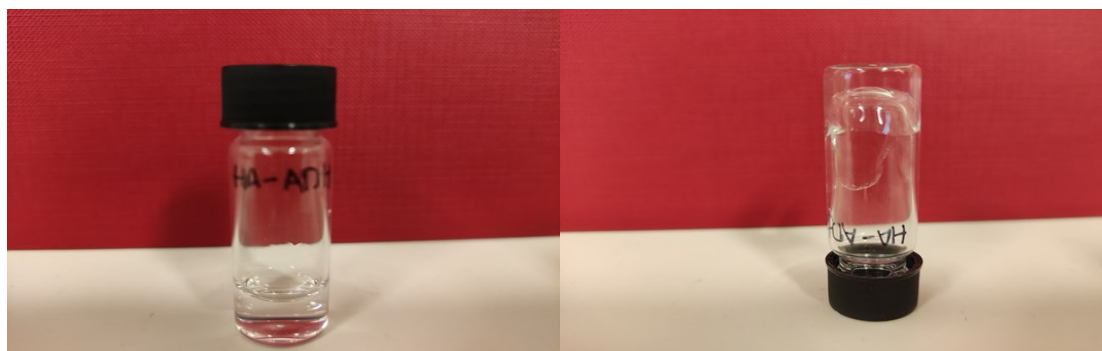
Based on the above, the optimum gelation protocol is as follows:



Solution A is prepared by dissolving 40 mg of HA in 3200  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 7.63). Solution A is transferred in three vials (800  $\mu\text{L}$  each). Then 100  $\mu\text{L}$  of EDCI is added in each vial followed by the dropwise addition of three drops of (aq) HCl, 0.1 M to the pH value of 5.81. 100  $\mu\text{L}$  of ADH is then added to each vial, and the pH rises to the value of 6.25. Finally, two more drops of (aq) HCl, 0.1 M, is added, and the pH changes to 4.75. The obtained gels are self-supporting with a final pH of 4.8. In each vial the concentration of HA is 10 mg/mL, EDCI 5.1 mg/mL and ADH 5.0 mg/mL. A schematic depiction of the optimum protocol is given below.

#### Gelation trials using different glassware

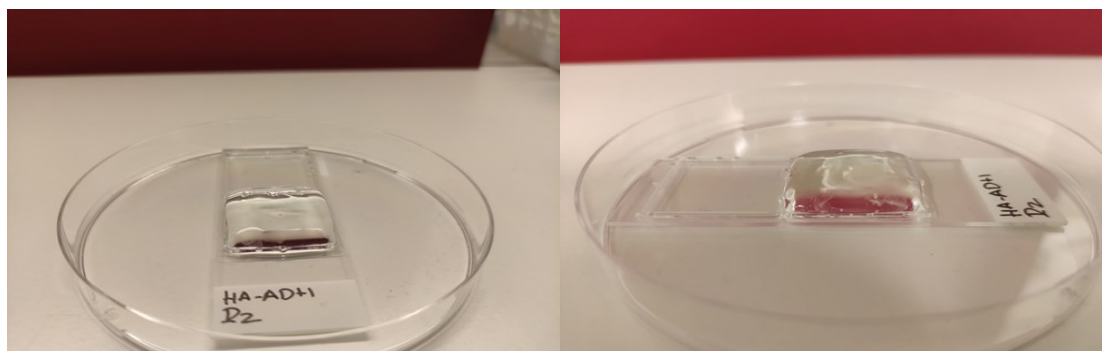
Gelation in a vial (optimum protocol): HA-ADH hydrogel was prepared in PBS (pH 7.63). 10 mg of HA was dissolved in 800  $\mu\text{L}$  of PBS followed by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of EDCI (pH 7.63). Six drops of (aq) HCl, 0.1 M, were added dropwise and the pH dropped to 4.61. Finally, 100  $\mu\text{L}$  of the crosslinker ADH was added to the solution (the final pH 4.69). The solution was left undisturbed overnight at room temperature. The vial inversion method indicated a weak self-supporting hydrogel (Figure 8).



**Figure 8.** An HA-ADH gel formed in vial following the optimum gelation protocol. The gel is, although weak, self-supporting.

Gelation in a glass chamber system (optimum protocol): 40 mg of HA were dissolved in 3200  $\mu\text{L}$  of PBS followed by the addition of 400  $\mu\text{L}$  of EDCI activator (pH 7.60). 24 drops of (aq) HCl, 0.1 M were added to the solution, and the pH value dropped to 4.27. 1800  $\mu\text{L}$  of the acidic solution were transferred in two chambers. Finally, 200  $\mu\text{L}$  of the ADH crosslinker was added to each chamber.

The final volume in each chamber was 2 mL. The concentration of the two solutions is the same as the optimum gelation protocol. The glass chamber system was left undisturbed overnight at room temperature. The next day, the removal of the chamber walls revealed a square-shaped self-supporting gel (Figure 9).



**Figure 9.** Gelation of HA in a glass chamber system.

#### Reducing the amount of acid in the gelation system

By the addition of six drops of (aq) HCl, 0.1 M in each gel (the final volume of 1 mL), the obtained hydrogels were self-supporting but weak. This is due to the reduction of HA concentration. To address this issue, we acidified PBS solution (pH from 7.6 was lowered to 3.6) before adding the activator and the crosslinker. The protocol for the preparation of four gel samples (1 mL each) is as follows:

- Use PBS solution with a lower pH value (pH 3-4).
- Prepare an EDCI stock solution by dissolving 20 mg of EDCI in 400  $\mu$ L of PBS.
- Prepare an ADH stock solution by dissolving 20.4 mg of ADH in 400  $\mu$ L of PBS.
- Weigh 10 mg of HA in each vial and add 800  $\mu$ L of PBS.
- Add 100  $\mu$ L of EDCI in each vial and mix.
- Add 100  $\mu$ L of ADH in each vial and mix.

The final volume of the gels should be 1 mL in each vial. The effect of the added amount of HCl is given in the following Table 1.

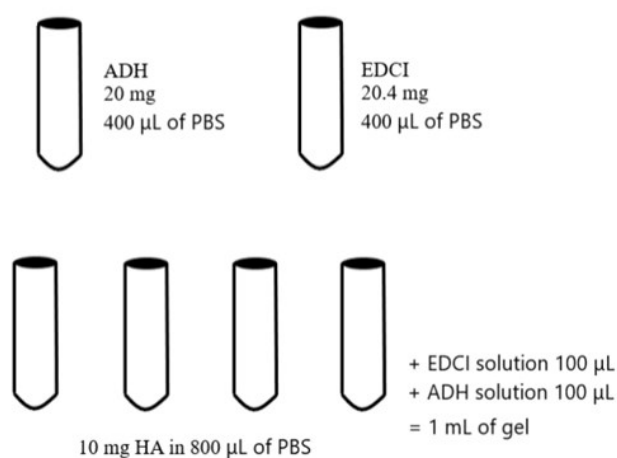
**Table 1.** The effect of HCl on the final pH of the gels. The PBS solution has pH 3-4

Drops of (aq) HCl (0.1 M)	Final pH
No acid	5.7
1 drop	5.3
2 drops	4.7

With the addition of two drops of HCl, acid gelation starts almost instantly. The initial stock PBS solution has a pH of 7.66, which was adjusted to 3.22 by the dropwise addition of (aq) HCl, 0.1 M.

Based on the above, the final gelation protocol (standard protocol) is as follows (Figure 10):

- 10 mg of HA is dissolved in 800  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 3-4).
- Addition of 100  $\mu\text{L}$  of EDCI solution (EDCI stock solution: 20.4 mg of EDCI in 400  $\mu\text{L}$  of PBS).
- Addition of 100  $\mu\text{L}$  of ADH solution (ADH stock solution: 20 mg of ADH in 400  $\mu\text{L}$  of PBS).
- Addition of two drops of acid.

**Figure 10.** Schematic depiction of the standard gelation protocol.

To induce gelation, the vials must leave to rest at room temperature for at least 12 h. The obtained gels were then washed three times with PBS solution and water to remove unreacted EDCI and ADH.

### Gelation in DPBS<sup>++</sup> buffer solution

HA-ADH gels were prepared in DPBS<sup>++</sup> solution (pH 3.56) using the standard gelation protocol. The final pH of the gels was 4.21. After gelation, the gels were washed three times with DPBS<sup>++</sup> solution and water (Figure 11). To assess their stability, 1 mL of the cell culture medium was added on their surface and left them overnight to rest at 37°C. The stability of the gels was evaluated by the vial inversion method. All samples were self-supporting gels. The results indicate that the gels are stable under incubation conditions in the presence of the cell culture medium (Figure 12).



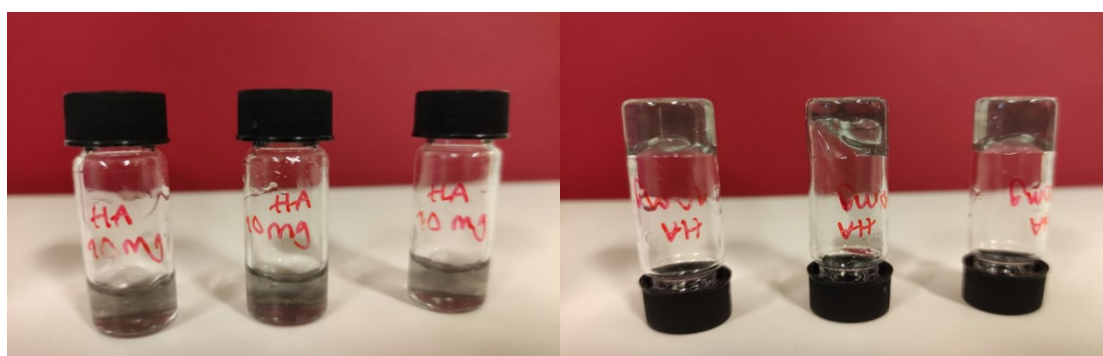
**Figure 11.** HA-ADH gels in DPBS<sup>++</sup> solution prepared by the standard gelation protocol. All the gels are self-supporting.



**Figure 12.** An HA-ADH gel after incubation in the presence of the cell culture medium. The pink colour is due to the pH indicator within the cell culture medium.

## 4.2 Preparation of HA-GO hybrid hydrogels in PBS

HA-ADH gels were prepared by encapsulating graphene oxide (GO) in their network (Figure 13). 10 mg of HA were dissolved in 800  $\mu\text{L}$  of GO suspension. The suspension was prepared by dissolving 3.2 mg of GO flakes in 3200  $\mu\text{L}$  of PBS. The suspensions of EDCI and ADH were prepared in PBS solution as in the standard gelation protocol. The final pH of the gels was 3.93, and the concentration of GO was 1 mg/mL.



**Figure 13.** HA-ADH-GO gels in PBS.

Three out of four samples of the dual-component gels were self-supporting. Gelation started immediately upon the addition of the acid. However, all the gels were heterogeneous as distinguished layers of GO were present in the bulk materials.

## 4.3 Swelling studies

After preparing HA-ADH gels in PBS solution and washing them three times with PBS, the vials were weighted. The initial masses of the gels are given in Table 2.

**Table 2.** The initial masses of the gels in PBS (pH 3.22)

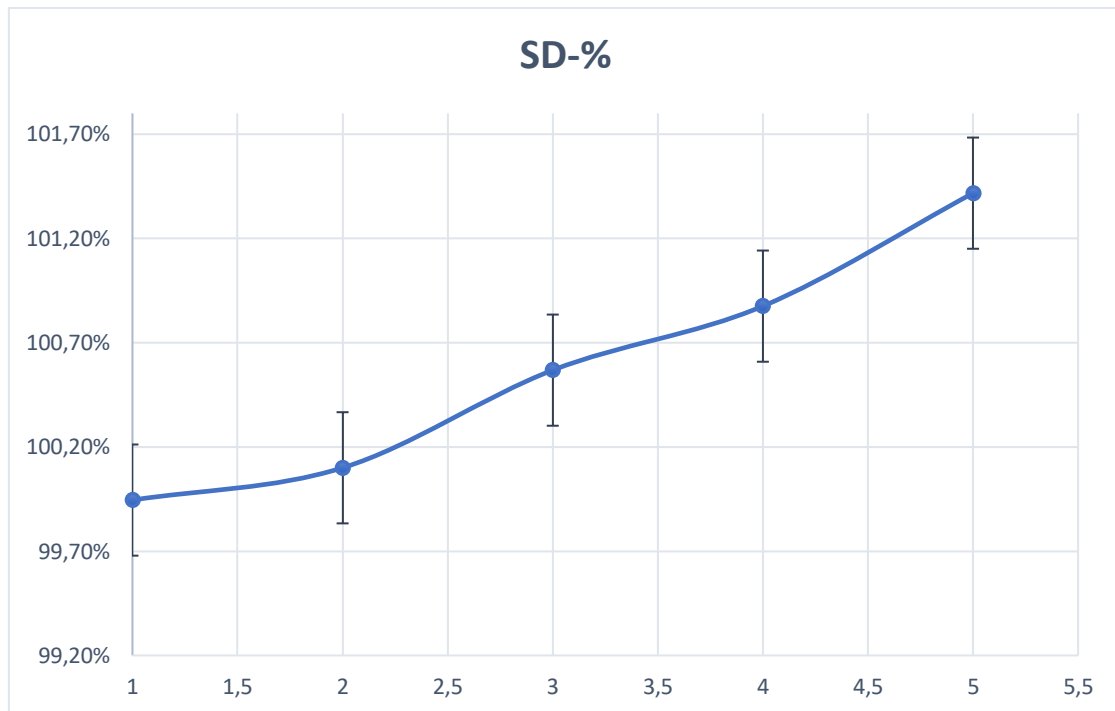
$W_o$ (g)	
$W_A$	6.4991
$W_B$	6.4736
$W_C$	6.4862
$W_D$	6.5072
Average	6.491525

In each vial, we added 1 mL of PBS solution and left them in the block heater at 37 °C for a day to swell. Every day, we removed the buffer solution and measured the weight of the vials (swollen gels). The measured weights are given in Table 3.

**Table 3.** The weight of the swollen gels

Time (days)	Vial A (g)	Vial B (g)	Vial C (g)	Vial D (g)	Average (g)	Error
1	6.4925	6.4659	6.4889	6.5046	6.487975	0.01617639
2	6.5096	6.4845	6.4955	6.5025	6.498025	0.01069746
3	6.5255	6.5061	6.5336	6.5485	6.528425	0.01767057
4	6.5567	6.5452	6.5592	6.5323	6.548350	0.01231500
5	6.6188	6.5730	6.5890	6.5533	6.583525	0.02768000

After weighing the vials, we calculated the swelling degree ( $SD$ -%) of the gels to assess their swelling capacity (Table 3 and Figure 14). To calculate the swelling degrees, we used equation 1.



**Figure 14.** Swelling degree of the gels (top) and the gel samples after swelling (bottom).

#### 4.4 IR-spectroscopy analysis

We have recorded the IR spectra of hyaluronic acid sodium salt powder, adipic acid dihydrazide powder and HA-ADH xerogel film (Appendices 4-6). All spectra are given in Appendices 1-6. The IR profile shows the absorbance signals of several functional groups such as amides, carboxylic acid groups and hydroxyl groups. All spectra were baseline corrected.

IR spectrum of HA sodium salt (Appendix 4): OH-group,  $\tilde{\nu}$  3269.2  $\text{cm}^{-1}$  strong and wide; C=O,  $\tilde{\nu}$  1614.4  $\text{cm}^{-1}$  middle strong; C-O-C group,  $\tilde{\nu}$  1030  $\text{cm}^{-1}$  strong. IR spectrum of ADH (Appendix 5): NH-group,  $\tilde{\nu}$  3313.6  $\text{cm}^{-1}$  strong; OH-group,  $\tilde{\nu}$  3288.4  $\text{cm}^{-1}$  wide; C=O,  $\tilde{\nu}$  1625.9  $\text{cm}^{-1}$  strong.

The formation of the amide bond during gelation is indicated by the observed shifted signals in Appendix 2 (amide spectral region) by comparison of the HA powder, ADH and gel film spectra.

## 5 Conclusions

In this work, we attempted to establish a reproducible protocol for the preparation of hyaluronic acid-based gels. Since the crosslinking reaction was pH sensitive, several gelation trials were performed to obtain self-supporting gels. As the structure of the hydrogels had to be elastic, we assessed the swelling capacity of the materials. Gelation was successful in two different buffer solutions at the final pH of 3-4. Dual component HA-GO gels were also prepared. However, the materials were heterogeneous. Gelation was induced almost immediately by the addition of the acid. All gels were elastic and self-supporting.



## References

1. Brinker, C. J. and Scherer, G. W., Sol → Gel → Glass: I. Gelation and gel structure, *J. Non-Crystal. Solids*, **1985**, *70*, 301-322.
2. Hoffman, Allan S., Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *64*(2012), 18–23.
3. Selyanin, M. A.; Boykov, P. Y.; Khabarov, V. N. and Polyak, F., Hyaluronic acid, Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine, *John Wiley Sons Inc*, **2015**.
4. Sun, L.; Zhong, Y.; Gui, J.; Wang, X.; Zhuang, X. and Weng, J., A hydrogel biosensor for high selective and sensitive detection of amyloid-beta oligomers, *Int. J. Nanomedicine*, **2018**, *13*, 843-856.
5. Prestwich, G. D.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Vercruyssen, K. P. and Ziebell, M. R., Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives, *J. Control. Rel.*, **1998**, *53*, 93-103.
6. Ghawanmeh, A. A.; Ali, G. A. M.; Algarni, H.; Sarkar, S. M. and Chong, K. F., Graphene oxide-based hydrogels as a nanocarrier for anticancer drug delivery, *Nano Research*, **2019**, *12*, 973-990.
7. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P. and Kolar, J., Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, **2008**, *53*(8), 397-411.
8. Armano, A. and Agnello, S., Two-Dimensional Carbon: A Review of Synthesis Methods, and Electronic, Optical, and Vibrational Properties of Single-Layer Graphene, *J. Carbon Res.*, **2019**, *5*, 67.
9. Cui, F. Z.; Tian, W. M.; Hou, S. P.; Xu, Q. Y. and Lee, I.-S., Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.*, **2006**, *17*, 1393-1401.

## **Appendices**

APPENDIX 1 IR-spectra of all samples. Spectral region 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ .

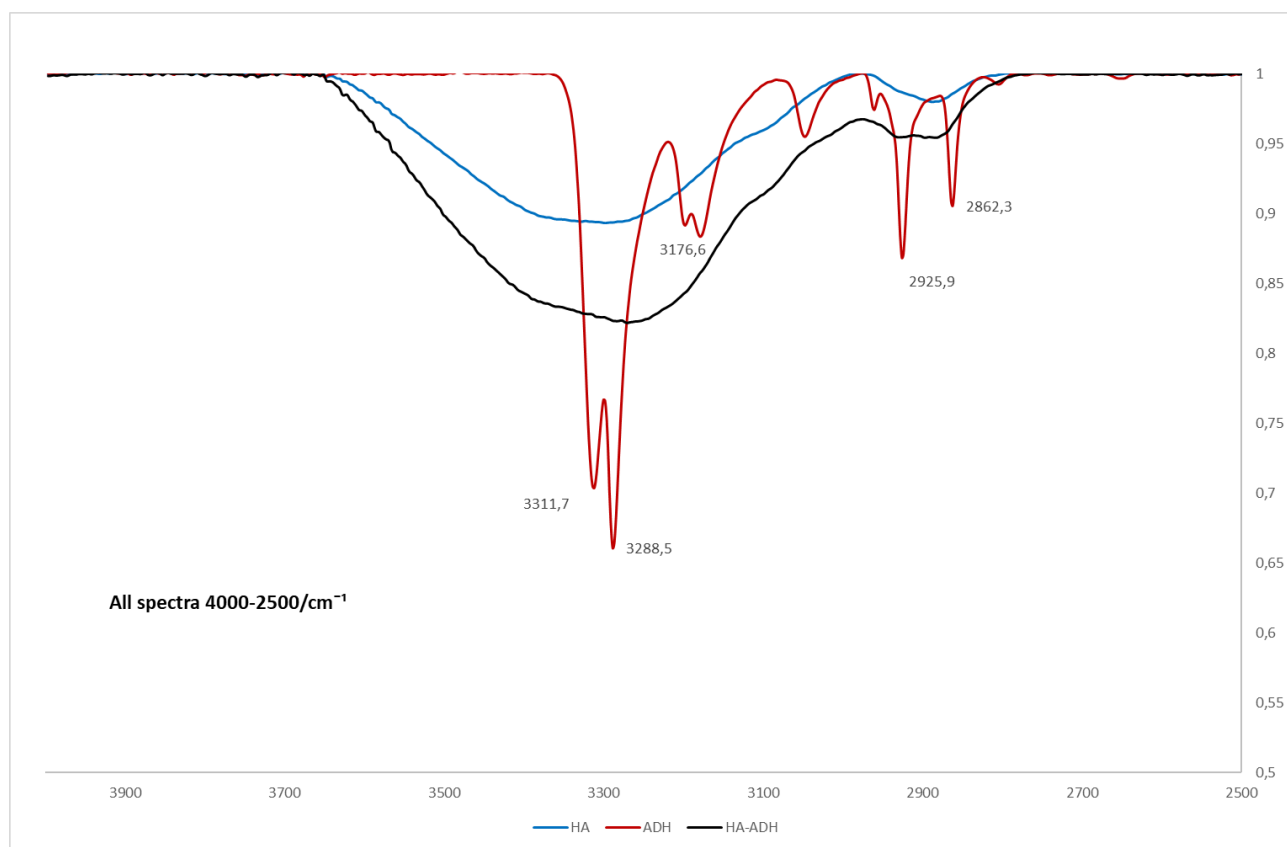
APPENDIX 2 IR-spectra of all samples. Spectral region 1800-1400  $\text{cm}^{-1}$ .

APPENDIX 3 IR-spectra of all samples. Spectral region 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

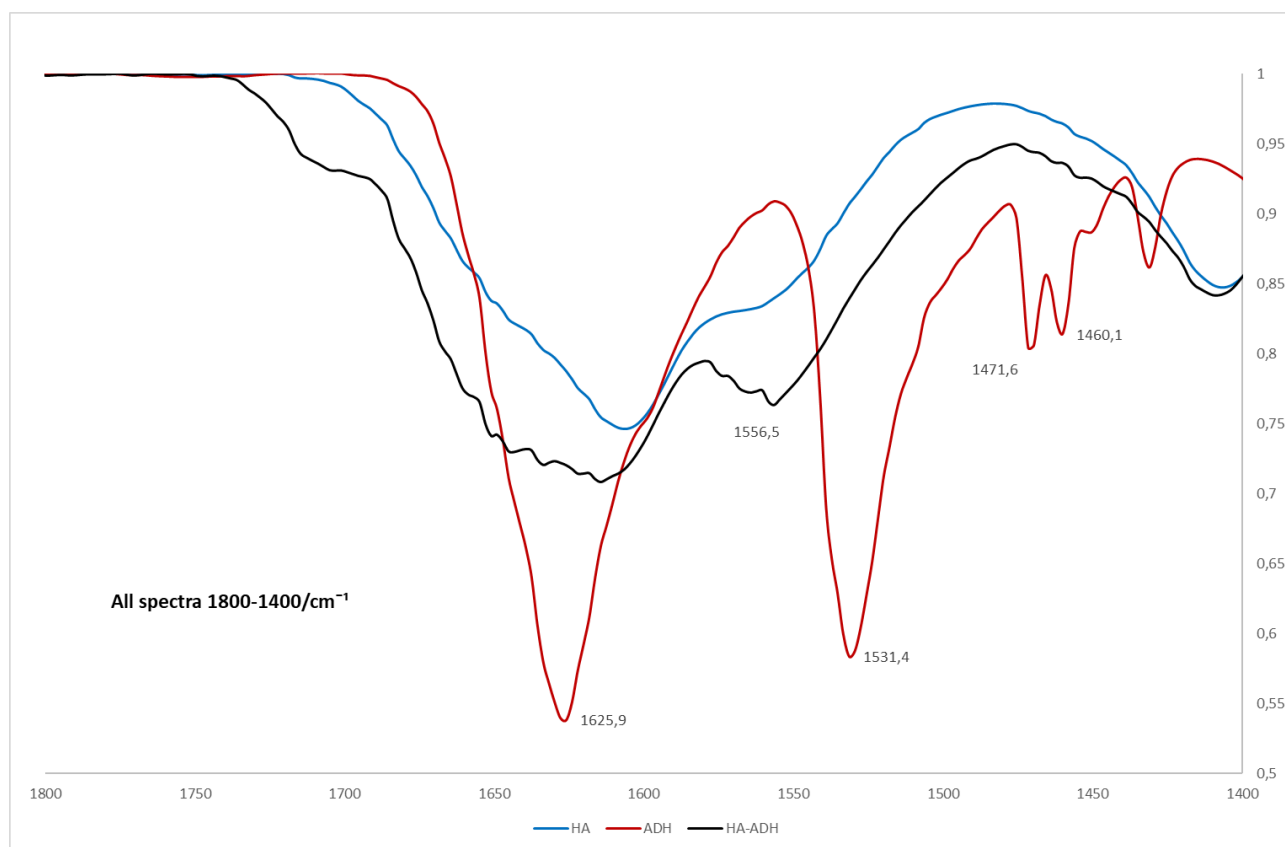
APPENDIX 4 IR-spectrum of HA-ADH xerogel film.

APPENDIX 5 IR-spectrum of ADH powder.

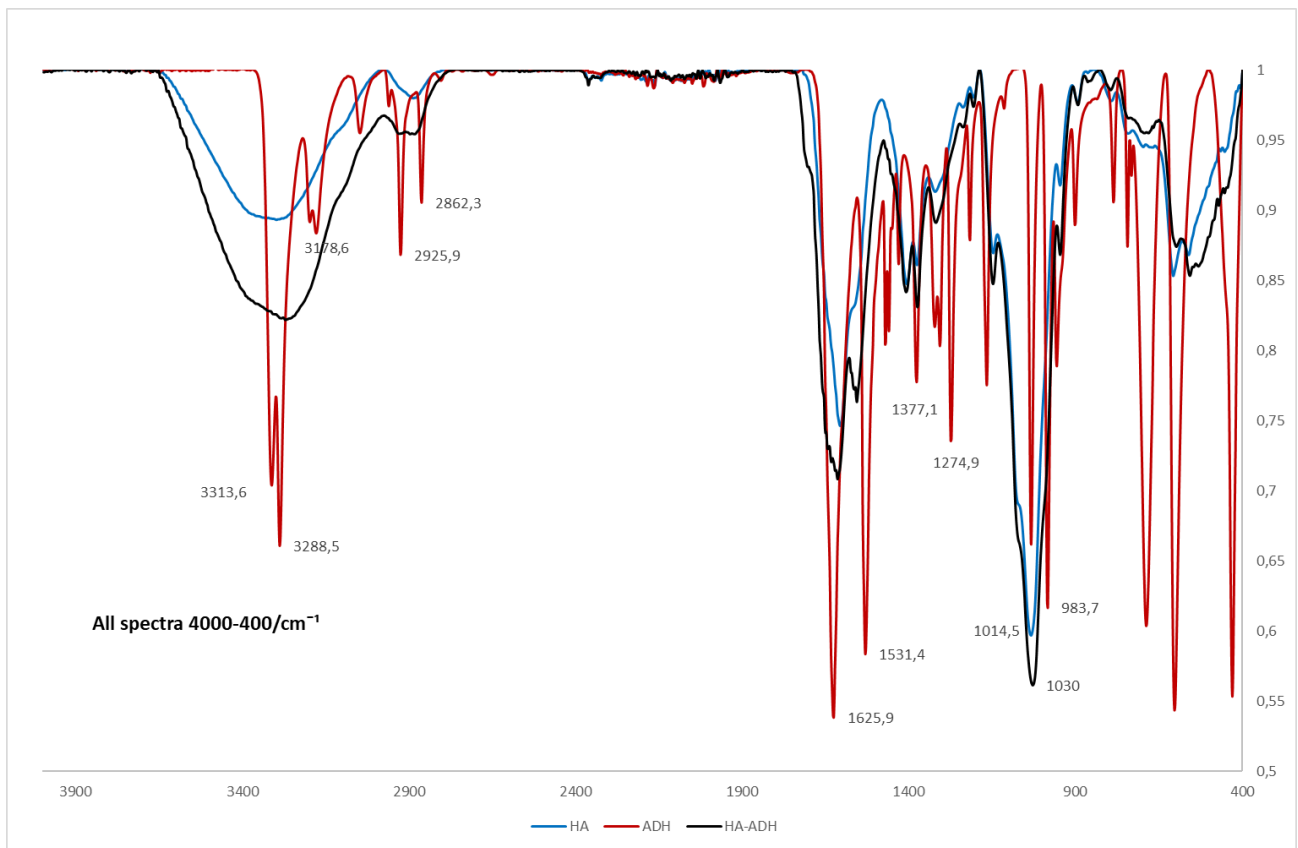
APPENDIX 6 IR-spectrum of HA sodium salt powder.



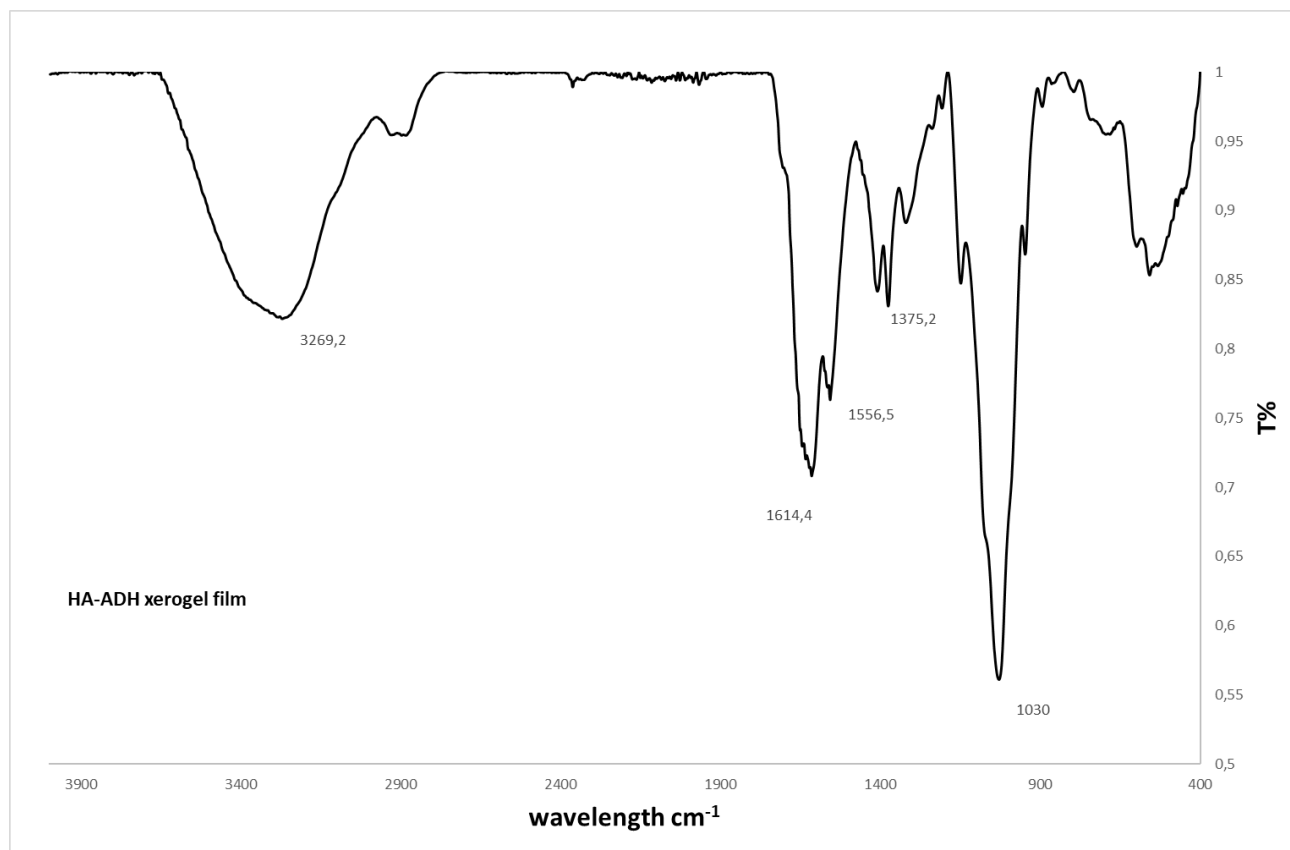
**Figure 15.** IR-spectra of all samples. Spectral region 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ .



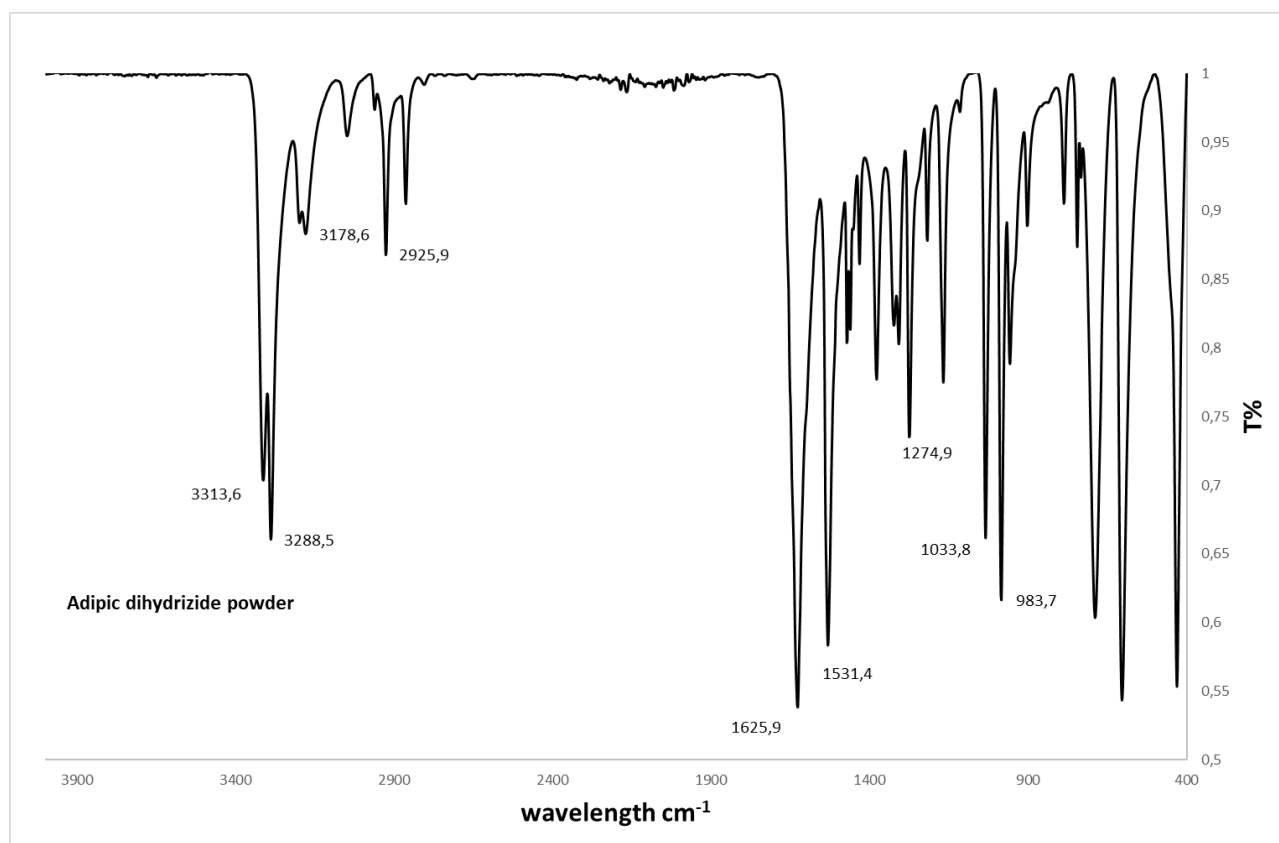
**Figure 16.** IR-spectra of all samples. Spectral region 1800-1400 cm<sup>-1</sup>.



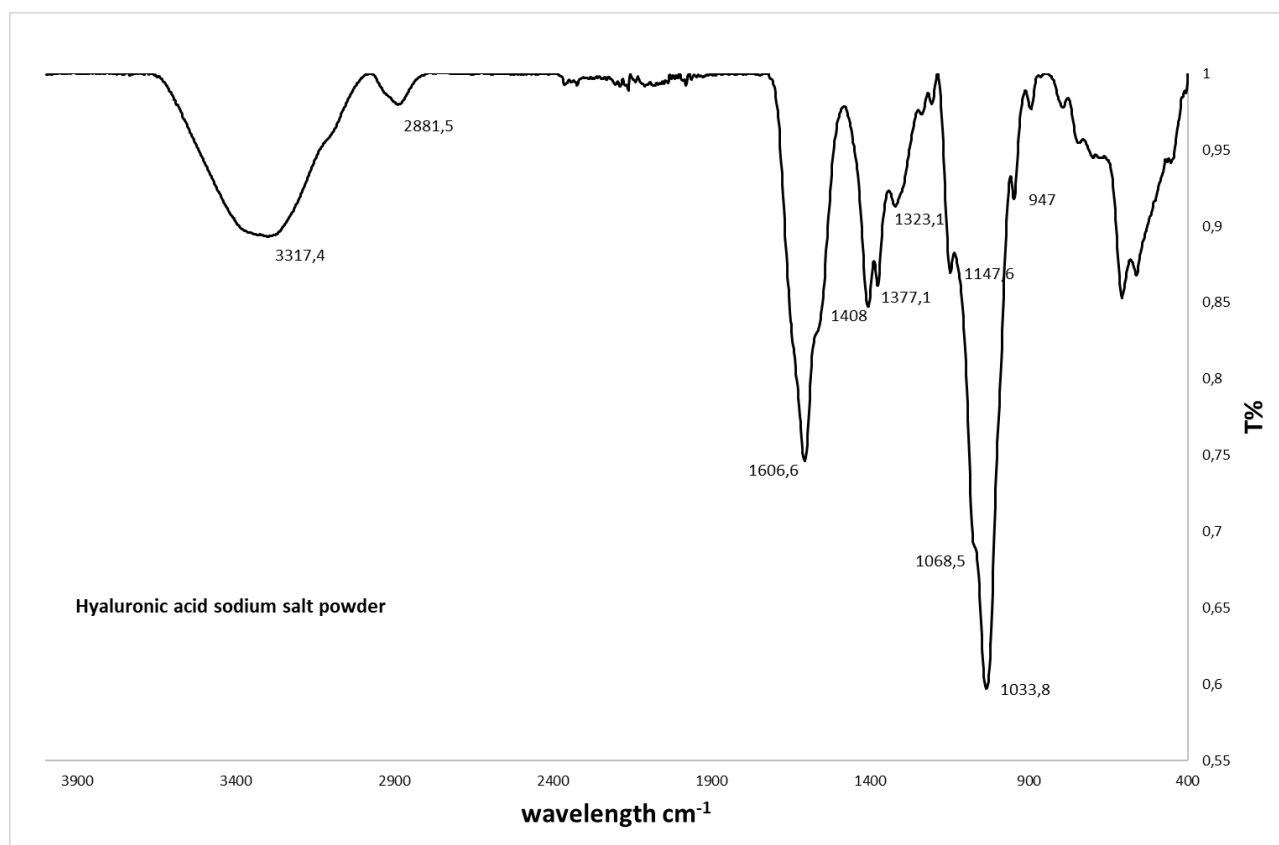
**Figure 17.** IR-spectra of all samples. Spectral region 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 18.** IR-spectrum of HA-ADH xerogel film.



**Figure 19.** IR-spectrum of ADH powder.



**Figure 20.** IR-spectrum of HA sodium salt powder.