

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Supramolekulaariset hydrogeelit lääketieteellisissä
sovelluksissa**

Kandidaatintutkielma ja
tutkimusprojekti
18.6.2021
Elle Tarkkonen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tässä kandidaatin tutkielmassa perehdytään supramolekulaaristen hydrogeelien sovelluksiin lääketieteessä. Tekstissä käsitellään erilaisten hydrogeelien ominaisuuksia, valmistusta ja toimintaa sekä *in vivo* että *in vitro*. Lähempään tarkasteluun on valittu geelien sovellukset lääkekuljettimina etenkin syövän hoidossa sekä geelien tarjoamat mahdollisuudet kudostekniikassa. Tutkielmassa tarkasteltujen tutkimusten mukaan supramolekulaariset hydrogeelit ovat erittäin lupaavia materiaaleja lääketieteen sovelluksiin.

Tutkimusprojektissa suoritettiin sappihappojen amino(alkyyli)_namidien (n=2,4,6) gelatointikokeita pyridyylialdehydin läsnäollessa. Tutkimuksessa pyrittiin valmistamaan kupariin koordinoituneita metallogeelejä aldehydin läsnäollessa sekä ilman aldehydiä. Gelatointia testattiin myös alkuperäistä suunnitelmaa pienemmällä määrällä vettä. Tutkimuksessa havaittiin, että sappihappojohdannaiset geeliytyivät parhaiten alkuperäisellä vesimäärällä ilman pyridyylialdehydiä.

Esipuhe

Tämä kandidaatin tutkielma suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella dosentti Elina Sieväsen tutkimusryhmässä. Tutkielma keskittyy erilaisiin supramolekulaarisiin hydrogeeleihin ja niiden lääketieteellisiin sovelluksiin. Kirjallisuuskatsaus kirjoitettiin keväällä 2021 helmi-toukokuun välisenä aikana. Se esittelee erilaisia supramolekulaarisia hydrogeelejä sekä niihin liittyviä useita lääketieteellisiä sovelluksia lääkekuljetuksesta kudostekniikkaan. Kokeellinen osa suoritettiin maaliskuussa 2021. Se rajattiin käsittelemään sappihappojen amino(alkyyli)_namidien (n=2,4,6) gelatointikokeita pyridyylialdehydin ja kuparikloridin kanssa.

Haluan kiittää läheisiäni kaikesta tuesta matkallani luonnontieteiden kandidaatiksi. Erityisesti yliopistoystäviltäni saamani tuki on ollut korvaamattoman tärkeää tällä yhteisellä taipaleella. Lisäksi haluan kiittää Riikka Kuosmasta tutkimusprojektin ohjaamisesta sekä Elina Sievästä kandidaatin tutkielman ohjaamisesta. Teidän kanssanne oli ilo työskennellä ja oppia uutta.

Sisällysluettelo

Lyhenteet.....	vii
KIRJALLINEN OSA.....	1
1. Johdanto	2
2. Geelit.....	2
2.1 Supramolekulaariset geelit.....	3
3. Lääketieteelliset sovellukset	4
3.1 Lääkekuljetus	4
3.1.1 Syöpä.....	6
3.1.2 Supramolekulaarinen kemoterapia	6
3.1.3 Fototerminen terapia.....	7
3.2 Kudostekniikka	9
3.2.1 Metallogeelit kudostekniikassa	10
3.2.2 Hydrogeelit kudostekniikassa	11
4. Yhteenveto	14
KOKEELLINEN OSA.....	15
5. Työn tarkoitus.....	16
6. Materiaalit ja menetelmät	16
7. Työn suoritus.....	17
7.1 Valmistelut.....	17
7.2 Kompleksointikokeet	17
8.Työn tulokset.....	18
9. Johtopäätökset.....	20
Viitteet.....	21
Liitteet	22

Lyhenteet

T_{gel}	Geelin sulamispiste
3D	Kolmiulotteinen
LMWG	Matalan molekyylipainon gelaattori (<i>Low molecular weight gelator</i>)
LMOG	Matalan molekyylipainon orgaaninen gelaattori (<i>Low molecular-mass organic gelator</i>)
CD	Syklodekstriini
PTT	Fototerminen terapia
PTCA	Fototerminen konversioaine (<i>Photothermal conversion agents</i>)
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
ICG	Indosyaniini vihreä
NIR	Lähi-infrapuna (<i>Near infrared</i>)
ALP	Alkalinen fosfataasi
HA	Hyaluronihappo
BP	Bisfosfonaatti
ROS	Reaktiivinen happi (<i>Reactive oxygen species</i>)
PA	Peptidiamfiili
TGF- β 1	β 1-kasvutekijä
MSC	Mesenkyymiset kantasolut
TGFBPA	TGF:a sitova peptidiamfiili

KIRJALLINEN OSA

1. Johdanto

Supramolekulaarisessa kemiassa ollaan kiinnostuneita molekyylien välisistä ei-kovalenttisista vuorovaikutuksista, joita ovat esimerkiksi vetysitoutuminen, π - π -pinoutuminen, elektrostaattiset vuorovaikutukset, isäntä–vieras-vuorovaikutukset sekä varauksen siirtoon liittyvät vuorovaikutukset.¹ Supramolekulaarinen kemia perustuu siis isäntä–vieras-komplekseihin tai supermolekyyleihin, jotka muodostuvat isäntämolekyylin sitoessa vierasmolekyylillä ei-kovalenttein vuorovaikutuksin. Isäntämolekyylit ovat yleensä esimerkiksi entsyymejä tai synteettisiä syklisiä yhdisteitä. Vierasmolekyylit voivat puolestaan olla esimerkiksi hormoneja, feromoneja, välittäjäaineita, ionipareja, yksinkertaisia epäorgaanisia ioneita tai yksiatomisia kationeja. Isäntämolekyyleillä on konvergentti sitoutumiskohta (*binding site*) kookkaassa keskikuopassa, johon pienempi divergentin sitoutumiskohdan omaava vierasmolekyyli voi sitoutua.²

Supramolekulaarisilla molekyyyleillä on monia ominaisuuksia, jotka voivat tarjota lääketieteelle mullistavia sovelluksia. Supramolekulaarisia geelejä on tutkittu muun muassa lääkekuljetuksessa, syövän hoidossa ja kudostekniikassa. Geelejä on toistaiseksi tutkittu hyvin vähän *in vivo*-menetelmin, mutta tutkimusten tulokset ovat olleet lupaavia.

2. Geelit

Geelit muodostuvat kahdesta tai useammasta rakenneosasta. Ne koostuvat pääosin nesteestä sekä noin yhdestä massaprosentista kiinteää säiemäistä faasia. Vaikka geelit ovat pääosin nestettä, on niiden koostumus reologisesti arvioituna kiinteän kaltainen, mikä johtuu kiinteän faasin pyrkimyksestä immobilisoida aineen suurta nestepitoisuutta. Neste pysyy kuitenkin geelin sisällä liikkuvana kapillaari-ilmion seurauksena.²

Geelit voidaan luokitella niiden sisältämien liuottimien perusteella. Hydrogeelien liuottimena on vesi ja organogeeleissä jokin orgaaninen liuotin. Lisäksi aerogeeleissä nestefaasin korvaa jokin kaasu ja metallogeeleissä kiinteä faasi sitoo nestettä metalli-ionien avulla. Arkielämässä geelejä tavataan muun muassa hammastahnassa, piilolinseissä, hyytelössä tai hiusgeeleissä.²

Geelejä valmistetaan tyypillisesti liuottamalla pieni määrä gelaattoria (0.1–5 wt%) liuottimeen, jonka lämpötila on ylittänyt gelaattorin sulamispisteen (T_{gel}). Geeliytyminen tapahtuu liuoksen jäähtyessä alle sulamislämpötilan. Geeliytymisessä gelaattorin ja liuottimen välinen affiniteetti pienentyy ja nestettä immobilisoivat kolmiulotteiset (3D) verkot muodostuvat vahvojen molekyylien välisten

sidosten avulla.³ Geeliytyminen voidaan helposti tunnistaa testaamalla valmistetun geelin virtaamista. Jos astia käännetään ylösalaisin, tulisi geelin pysyä astian pohjalla. Jotkin geelit voivat kuitenkin menettää muotonsa ravistettaessa astiaa, jolloin mekaaninen liike saa geelisäikeiden väliset sidokset hetkellisesti katkeamaan. Geelin annettaessa seistä sidokset palautuvat. Tällaista ilmiötä kutsutaan *tiksotropiaksi*.²

2.1 Supramolekulaariset geelit

Supramolekulaariset geelit syntyvät, kun gelaattorimolekyylit muodostavat kolmiulotteisia nano- tai mikrorakenteita ei-kovalenttisten vuorovaikutusten, kuten π - π -pinoutumisen, vetysidosten tai metalli-ioniin sitoutumisen aikaansaamana (*supramolecular/self assembly* = itsejärjestäytyminen).^{2,4} Kolmiulotteiset rakenteet muodostuvat siis itsejärjestäytymisen seurauksena, jossa molekyylit muodostavat pareja ja edelleen muokkautuvat oligomeereiksi. Oligomeerit pakkautuvat polymeereiksi, jotka edelleen punoutuvat yhteen muodostaen paksumpia säikeitä. Säikeet kykenevät immobilisoimaan suurta nestemäärää rakentaessaan kolmiulotteisia rakenteita ja sitoutuessaan toisiinsa ei-kovalenttisin sidoksin. Ne ovat termoreversiibeileitä, eli voivat muuttaa koostumustaan useita kertoja lämpötilan muuttuessa.⁵

Yleisesti gelaattorit, joilla on pieni molekyylimassa, kykenevät muodostamaan supramolekulaarisia geelejä (*Low molecular weight gelators*, LMWG). Tällaisten geelien on havaittu kykenevän palauttamaan supramolekulaarisia vuorovaikutuksia niiden katketessa. Ominaisuus voisi siis mahdollistaa muun muassa hitaan lääkeaineen vapauttamisen.²

Supramolekulaariset metallogeelit eroavat muista supramolekulaarisista geeleistä siten, että niiden gelaattorimolekyylit ovat sitoutuneet toisiinsa metalli-ionien kautta.² Metallogeelit voivat muodostua joko metalli-ioneista johtuvista metalli-ligandi-koordinaatioista tai metallogelaattoreiden toisiinsa sitoutuessa syntyvistä metallikomplekseista. Metallionit voivat tällöin toimia joko funktionaalisenä osana gelaattoria tai koordinoivana apuaineena. Metallionin valinnalla voidaan vaikuttaa geelin ominaisuuksiin, ristiksiteutumiseen (*crosslinking*), pysyvyyteen ja itsejärjestäytymiseen.^{6,7} Metallogelaattorit tarjoavat muun muassa uudenlaisia optisia, katalyyttisiä, magneettisia, antibakteerisia ja -inflammatorisia ominaisuuksia geeleihin.^{5,7} Fysikaalisten ominaisuuksien lisäksi metalli-ioneista voi olla hyötyä esimerkiksi kudostekniikassa. Sinkki ja kalsium (Zn, Ca) esiintyvät proteiinin rakenteessa, mangaani ja magnesium (Mn, Mg) nukleinihappojen rakenteessa, elektronien kuljetukseen tarvitaan rautaa, kuparia ja molybdeenia (Fe, Cu, Mo), varauksen tasapainotukseen natriumia, kaliumia ja kalsiumia (Na, K, Ca), hapetus-pelkistys-katalyysiin rautaa, kobolttia, nikkeliä,

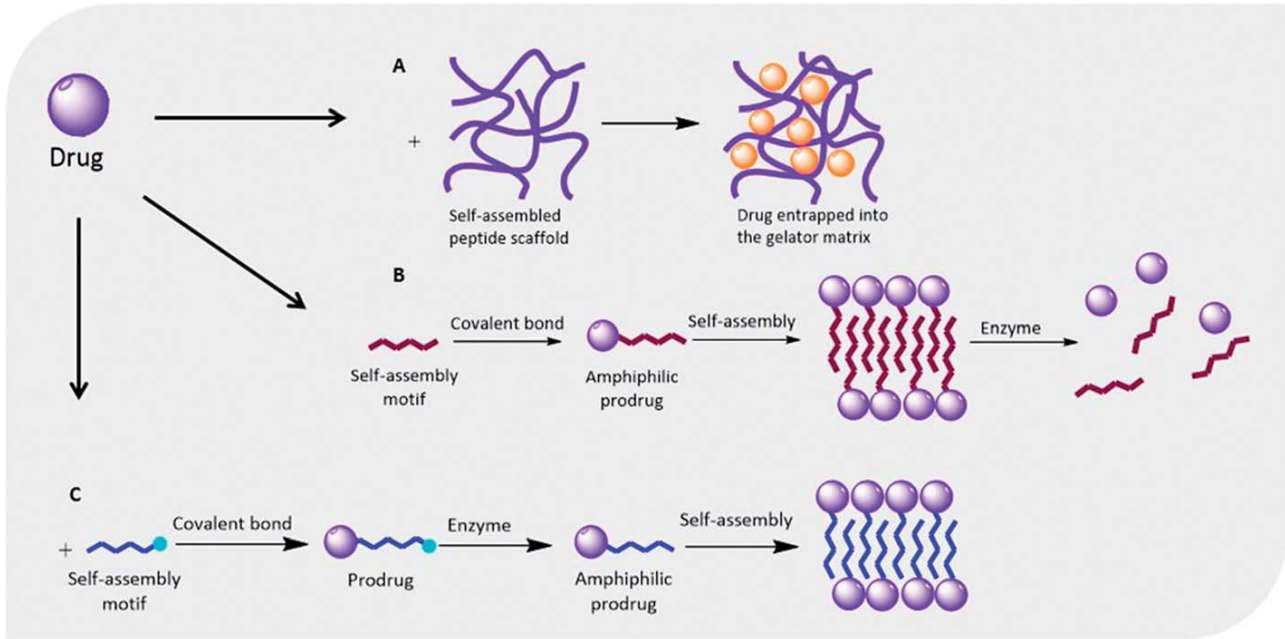
vanadiinia, mangaania, kuparia ja volframia (Fe, Co, Ni, V, Mn, Cu, W), happo-emäs-katalyysiin rautaa, sinkkiä, magnesiumia, nikkeliä ja mangaania (Fe, Zn, Mg, Ni, Mn), luun rakenteeseen kalsiumia ja piitä (Ca, Si) ja DNA-signalointiin kobolttia, hopeaa, lyijyä, arseenia, antimonia, kadmiumia, nikkeliä, elohopeaa, kuparia, sinkkiä, rautaa ja mangaania (Co, Ag, Pb, As, Sb, Cd, Ni, Hg, Cu, Zn, Fe, Mn).⁷

3. Lääketieteelliset sovellukset

Yleisesti supramolekulaarisilla geeleillä uskotaan olevan ominaisuuksia, jotka mahdollistavat tulevaisuudessa monenlaisia sovelluksia lääketieteessä. Supramolekulaarisia geelejä on tutkittu esimerkiksi lääkekuljettimina, kudostekniikassa sekä penisilliiniresistenttien bakteerien tunnistamisessa.² Geelien tulee olla sekä mekaanisesti että kemiallisesti pysyviä, kestää entsyymejä *in vivo* -olosuhteissa ja kyetä vapauttamaan lääkeaineita, jotta niitä voidaan hyödyntää esimerkiksi lääkekuljettimina tai kudostekniikassa.³

3.1 Lääkekuljetus

Supramolekulaarisia pienen molekyyli­massan omaavia orgaanisia geelejä (LMOG) on tutkittu vaihtoehdoksi polymeeristen lääkekuljetteleiden rinnalle. Kuten polymeeriset geelit, LMOG-geelit kykenevät ohjattuun lääkkeen vapauttamiseen, mutta myös metaboloituvat ja ovat suhteellisen myrkyttömiä. LMOG-geelejä voidaan käyttää kolmella tapaa lääkekuljettimena. A: Lääkeaine voidaan sulkea inerttiin gelaattoriverkkoon, josta se vapautuu geelin hajoamisen seurauksena tai diffuusion avulla. B: Geeli muodostaa amfifiilisen aihiolääkkeen, jossa lääkeaine on kovalenttisesti konjugoitunut funktionaaliseen ryhmään. Aihiolääke itsejärjestäytyy ja lopulta hiljalleen entsyymaattisesti hajoaa vapauttaen lääkeaineen. C: Geeli toimii funktionaalisenä linkkerinä (*Functional linker*), joka kovalenttisesti sitoutuu lääkeaineeseen. Tätä seuraa linkkerin entsyymaattinen hajoaminen ja aihiolääkkeen itsejärjestäytyminen. Kaikki kolme tapaa on esitetty kuvassa 1.³



Kuva 1³ LMOG-geelin kolme sovellusta lääkekuljettimena. Reproduced from reference 3 with permission from The Royal Society of Chemistry.

LMOG-geeleistä peptidipohjaisia hydrogeelejä on tutkittu eniten.³ Yksi ensimmäisistä tutkimuksista ajoittuu 1995 vuoteen, jolloin Vegners tutki jäniksillä adamantanamiinilla ladattua Fmoc-Leu-Asp-geeliä. Adamantanamiini on luonnostaan ei-antigeeninen viruslääke (non-antigenic antiviral drug). Jäniksiin injektoidun geelin havaittiin aktivoivan niiden immuunijärjestelmän tuottamaan tehokkaasti vasta-aineita.⁸ Myöhemmin tehdyissä tutkimuksissa on todettu, että peptidiverkon valinnalla on huomattava merkitys, kun tutkitaan lääkkeen vapautumista geelistä. Jotta voidaan varmistaa lääkeaineen kontrolloitu vapautuminen geeliverkosta, tulee kustomoitu peptidihydrogeeli syntetisoida jokaiselle yhdisteelle sen molekyyliarakenteen mukaan. Siltikään pitkiä aikoja tasaisesti lääkettä vapauttavaa geeliä ei ole onnistuttu valmistamaan. Tähän asti julkaistut peptidihydrogeelit kykenevät vapauttamaan lääkeainetta joitakin tunteja. Fmoc suojattuja peptidihydrogeelejä tutkittaessa on havaittu lääkkeen vapautumisen noudattavan Fickin diffuusiolakia. (*Fick's law of diffusion*). On myös havaittu, että lääkeaineen koolla ja lipofiilisyydellä on vaikutusta aineen kontrolloituun vapautumiseen geeliverkosta.³

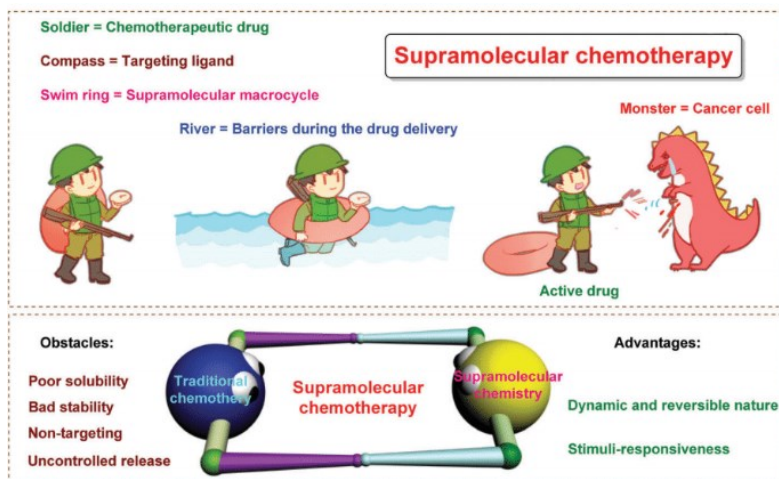
Aihiopohjaiset geelit ovat monissa suhteissa parempia kuin peptidipohjaiset geelit. Niiden valmistukseen ei tarvita apuaineita, jolloin tiettyjä vuorovaikutuksiin liittyviä ongelmia ei ole. Myöskään apuaineiden aiheuttamia sivuvaikutuksia ei ole. Ahiopohjaisiin geeleihin voidaan myös ladata enemmän lääkeainetta, sillä lääke voi sitoutua jokaiseen geelin molekyyliin.³

3.1.1 Syöpä

3.1.2 Supramolekulaarinen kemoterapia

Perinteisessä kemoterapiassa lääkkeillä pyritään hidastamaan tai lopettamaan syöpäsolujen kasvu. Kemoterapian lisäksi voidaan käyttää leikkaus-, säteily- tai biologista hoitoa kasvaimen poistamiseksi. Koska perinteiset lääkkeet voivat vaikuttaa myös terveeseen kudokseen, on tärkeää löytää soluspesifejä vaihtoehtoja. Perinteiseen kemoterapiaan liittyy paljon muitakin ongelmia kuten lääkkeiden huono pysyvyys ja liukoisuus kehonsisäisissä olosuhteissa, rajallinen tehokkuus ja lääkeresistenssi. Kuvassa 2 kuvataan perinteisen kemoterapian ja supramolekulaarisen kemoterapian eroja.¹

Isäntä–vieras-kompleksit ovat kemoterapialääkkeistä poiketen hyvinkin stabiileja ja liukoisia myös kehonsisäisissä olosuhteissa. Useimmissa farmaseuttisissa sovelluksissa makrosyklinen isäntämolekyylä kapseloi hydrofobisen vierasmolekyylin sisällään olevaan hydrofobiseen keskikuoppaan ei-kovalenttisin vuorovaikutuksin. Tämänlainen isäntä–vieras-kompleksi tarjoaa pohjan supramolekulaaristen lääkkeiden valmistukselle. Yleisimpiä makrosyklisiä molekyylejä supramolekulaaristen lääkkeiden valmistuksessa ovat syklodekstriinit, kaliksareenit, kukurbituriilit (*cucurbituril*) ja pillarareenit (*pillararenes*). Isäntä–vieras-kompleksi auttaa lääkeaineen kuljettamisessa fysiologisissa olosuhteissa oikeaan kohteeseen kuten kuvassa 2 on esitetty.¹

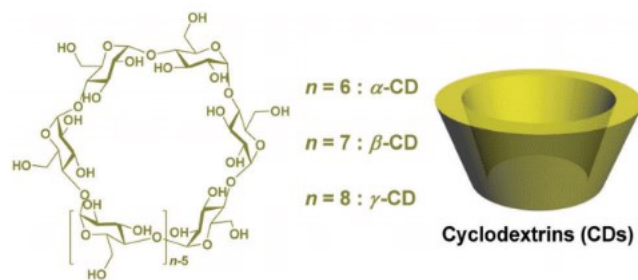


Kuva 2¹ Ylhäällä kuvattuna kuinka supramolekulaarinen kemoterapia toimii. Alhaalla verrataan perinteisen kemoterapian heikkouksia supramolekulaarisen kemian hyötyihin kemoterapiassa.

Reproduced from reference 1 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Syklodekstriini(CD)johdoksia, -nanorakenteita ja -alkuperäisrakenteita hyödynnetään biolääketieteen aloilla, farmaseuttisissa sovelluksissa, sekä apuaineena huonosti veteen liukenevissa lääkkeissä. Laajat hyödyt johtuvat niiden pysyvyydestä, saatavuudesta, sekä helposta muokattavuudesta. Syklodekstriinit ovat vesiliukoisia makrosyklisiä oligosakkarideja, jotka koostuvat α -1,4-glukosididisidoksin yhdistyneistä D-glukoosiyksiköistä. Kuuden, seitsemän ja kahdeksan D-glukoosiyksikön alatyypit ovat yleisimmin käytettyjä. Näitä kutsutaan α -, β - ja γ -syklodekstriineiksi. Syklodekstriinien sisäosa on hydrofobinen ja ulkopuoli hydrofiilinen. Niiden rakenne on esitetty kuvassa 3.¹

Syövän hoidossa syklodekstriinejä voidaan käyttää CD-lääkeainekomplekseina, mikä mahdollistaa vesiliukoisen kompleksin kapseloinnin liposomiin. CD-kompleksi parantaa liposomikapselin pysyvyyttä, vähentää sen myrkyllisyyttä sekä parantaa lääkkeen aktiivisuutta. Komplekseihin on myös kehitelty metallista gallium-indium-ydintä, mikä vaikuttaisi kompleksin fuusioitumis- ja hajoamiskäyttäytymiseen kehonsisäisissä olosuhteissa.¹



Kuva 3¹ Syklodekstriinin rakenne. Reproduced from reference 1 with permission from The Royal Society of Chemistry.

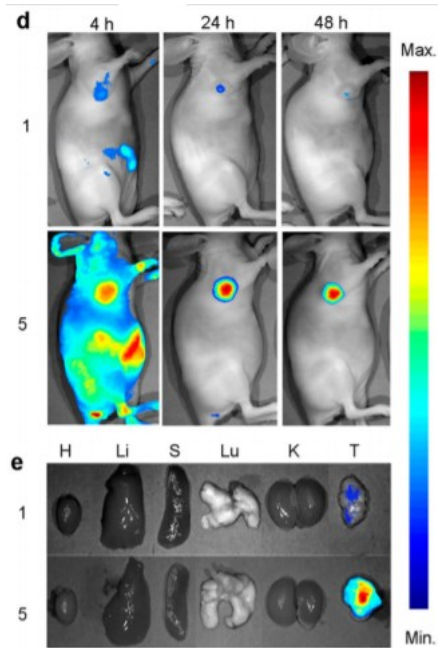
3.1.3 Fototerminen terapia

Hypertermisessä hoitomuodossa syöpäsoluja heikennetään kuumentamalla ne 40–45 °C:een lämpötilaan (*hyperthermia*). Kuumentaminen tapahtuu jonkin ulkoisen tekijän kuten valon, radiotaajuuksien, mikroaaltojen, ultraäänen tai magneettisten kenttien avulla. Hoitomuodon avulla syöpäsolut heikentyvät ja altistuvat enemmän esimerkiksi säteilyhoidolle. Yli 45 °C:ssa solujen on havaittu jopa välittömästi kuolevan. Hypertermistä hoitomuotoa on jouduttu rajaamaan, sillä se saattaa aiheuttaa terveen kudoksen solukuolemia, vaikka kuumennusta voidaankin kohdentaa syöpäsoluihin niiden alentuneen lämmönsietokyvyn vuoksi. Fototerminen terapia (PTT) sen sijaan

toimii fototermisten vaikuttavien aineiden (photothermal conversion agents, PTCA) avulla soluspesifimmin.⁹

PTCA:t lämmittävät kasvaimia muuntamalla optista energiaa lämpöenergiaksi. Huonon farmakokinetiikan ja pitkäaikaisiin bioturvallisuusongelmiin liittyvien huolenaiheiden vuoksi useita PTCA:ita ei ole hyväksytty kliiniseen käyttöön. Sen vuoksi Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (FDA) hyväksymää Indosyaniini vihreää (ICG, $C_{43}H_{47}N_2O_6S_2Na$) on tutkittu PTT:aan sopivaksi vaihtoehtoiseksi vaikuttavaksi aineeksi. ICG on aine, jota on käytetty muun muassa verenkierron tutkimuksiin ja silmien verisuonten varjoainekuvauksiin (*ophthalmic angiography*). PTT:aan ICG sopii sen turvallisuuden ja NIR-ominaisuuksien vuoksi (*near infrared*). Haasteita tuottavat sen kertyminen maksan parenkymaalisoluihin, jotka pyrkivät poistamaan ICG:ää elimistöstä aiheuttaen sen lyhyen puoliintumisajan (2–4 minuuttia). Haasteidensa asettamien rajoitusten vuoksi ICG ei itsenäisesti ole toimiva vaikuttava aine PTT:aan. Toimivuuden varmistamiseksi se tulee suojata kapseloimalla esimerkiksi supramolekulaarisiin nanosäikeisiin.¹⁰

Nanosäikeet voidaan ladata ICG:llä muuntamalla entsyymiin reagoiva peptidiesiaste (NapFFKYp) hydrogelaattoriksi alkalisella fosfataasilla (ALP) katalysoidun defosforylaation avulla. Hydrogelaattorit itsejärjestäytyvät vesiympäristössä muodostaen nanokuituja, joiden sisällä ICG muotoutuu J-aggregaatiksi. Ilman nanokuitujen tarjoamaa suojaa ICG poistuu nopeasti elimistöstä. Lisäksi nanokuitujen sisällä sen fotoakustisuuden ja fototermisten signaalien on havaittu paranevan. Kuten kuvassa 4d esitetään ladatut nanosäikeet (5) vaikuttavat pitkään kasvainalueella pelkän ICG:n (1) hajoessa nopeasti. ICG:llä ladatut nanokuidut parantavat laserhoidon vastetta kasvaimessa muuntaen fotoneja tehokkaasti kasvainta kuumentavaksi lämpöenergiaksi. Kuvassa 4e ladatut nanosäikeet antavat hyvän vasteen kasvainkudoksessa vielä 24 h jälkeen, kun pelkällä ICG:llä hoidettujen hiirien kasvaimissa vastetta on hyvin vähän.¹⁰



Kuva 4¹⁰ d.) NIR-fluoresenssikuvat 4, 24 ja 48 h kuluttua ICG:n (1) ja ICG:llä ladattujen nanosäikeiden (5) injektioinnista hiiren elimistöön. e.) NIR-fluoresenssikuvat vastaavien hiiren elimistä 24 h kuluttua lääkeaineen injektioinnista. Kuvissa esitettynä tärkeimmät elimet (H = sydän, Li = maksa, S = perna, Lu = keuhkot ja K = munuaiset) sekä kasvaimet (T). Reproduced parts of image from reference 10 with permission from ACS nano. Copyright 2015 American Chemical Society.

Hypertermisistä hoitomuodoista magneettista terapiaa ei ole vielä kovinkaan paljon tutkittu supramolekulaarisilla geeleillä. Magneettisten aineiden kuljetusta magneettisilla polymeerisillä geeleillä on kuitenkin tutkittu ja menetelmän on todettu olevan toimiva.¹¹ Siksi arvellaan, että supramolekulaarisilla metallogeeleillä voisi olla mahdollista päästä samankaltaisiin tuloksiin. Hypertermisen hoidon lisäksi kasvaimen voisi olla mahdollista kuljettaa syöpälääkettä geelin sisällä. Metallogeeliksi voisi valita magneettiseen terapiaan ominaisuuksiltaan soveltuvan geelin, joka olisi mahdollista ladata syöpälääkkeellä. Supramolekulaarinen geeli tarjoaa etuja myös soluspesifisyydessä. Syöpäsoluilla on niin kutsuttu käänteinen pH-gradientti¹², jolloin syöpäsolu eroaa terveestä solusta pH:n perusteella. Oikeanlaisella geelillä lääkeaine voitaisiin vapauttaa tietyssä pH:ssa, jolloin lääkeaineen vapautus ja magneettisen terapian hypertermisen vaikutus voidaan kohdentaa syöpäsoluun kerralla. Tällainen tutkimus olisi tulevaisuudessa mielenkiintoinen toteuttaa.

3.2 Kudostekniikka

Supramolekulaaristen geelien mahdollisuuksia kudostekniikassa on tutkittu jonkin verran. Geelien käyttäytymistä fysiologisessa ympäristössä ei vielä tunneta kovin hyvin, minkä vuoksi niiden

sovellukset ovat vielä toistaiseksi vähäisiä. Geelien vuorovaikutusta solujen ja proteiinien kanssa kannattaisikin tulevaisuudessa tutkia enemmän.

3.2.1 Metallogeelit kudostekniikassa

Metallikoordinaatioon perustuvat hydrogeelit mahdollistavat useiden kudosten uudelleenrakentamisen. Tärkein ominaisuus kudostekniikan kannalta on metallogeelien molekyyli-verkon kolmiulotteinen ympäristö. Muun muassa luihin kohdistuvat vahingot, kuten murtumat ja sydänlihaksen kuolioon johtava sydäninfarkti, ovat yleisimpiä ihmisen kudoksiin kohdistuvia vaurioita, joiden hoitoon voidaan käyttää supramolekulaarisia metallogeelejä.⁷

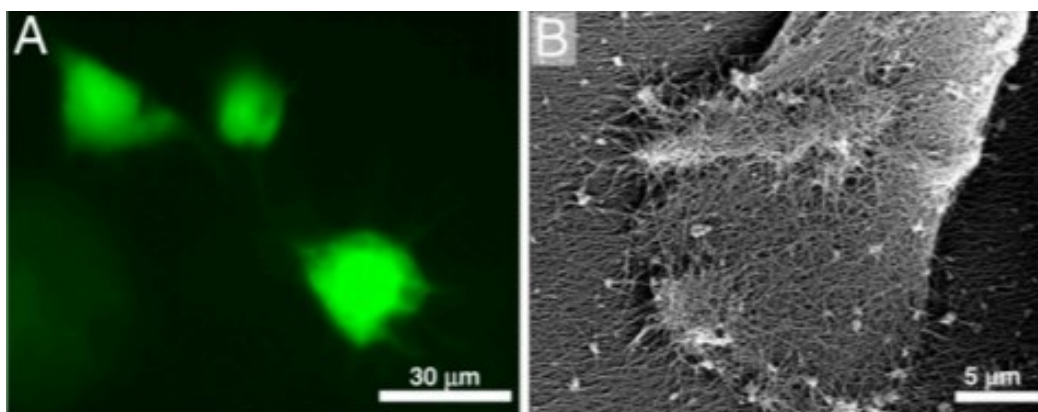
Vaikeiden luukudoksen vaurioiden korjaaminen vaatii biomateriaaleja, joiden ongelmia ovat heikot osteogeeniset ja antimikrobiset ominaisuudet. Ongelmaan on tarjottu ratkaisuksi bioyhteensopivia (*biocompatible*) jalometalli-ioneja sisältäviä hydrogeelejä. Vastaavaa geeli valmistettiin käyttäen gelaattorina hyaluronihappobisfosfonaatin Ca-kompleksia. Geelin valmistamiseksi hyaluronihappoon (HA) lisätiin akryyliamidi- (acrylamide) ja 2-ditiopyridyyliryhmät (2-dithiopyridylgroup) ja liitettiin näin muodostuneeseen hyaluronihappojohdannaiseen bisfosfonaatti (BP). Ca²⁺-ionit ristiinsitoutuivat (crosslinked) edelleen HA-BP-verkkoon. Pääasiallinen vuorovaikutus tapahtui Ca²⁺ ja BP:n välillä, joista myöhemmin muodostui luutumista edistäviä kalsiumpintaisia silkkifibroinisaiteja (SF, *silk fibroin*) HA-BP-matriisissa. Vastaavien hydrogeelien on todettu olevan antibakteerisia. Akryyliamidiryhmien lisääminen tehosti geelin mekaanisia ominaisuuksia.⁷

Metalli-ioneja on tutkittu myös sydänkudoksen vaurioiden korjaamisessa. Supramolekulaariset metallogeelit tarjoavat aiemmin mainitun kolmeulotteisen ympäristön lisäksi kudoksen kasvulle tärkeitä toiminnallisia ominaisuuksia. Sydänkudoksen korjaamiseen on esimerkiksi kehitelty ruiskutettavaa galliumiin (Ga) sitoutunutta alginaattipohjaista komposiittihydrogeeliä. Gallium- ja Al³⁺-ioneita käytettiin ohjaamaan komposiittihydrogeelin ristiinsitoutumista, kunnes gallium-ionit syrjäyttivät Al³⁺-ionit rakenteesta. Gallium-ioneja käytetään, koska ne eivät ole redox-aktiivisia *in vivo* ja koska niiden avulla voidaan vähentää reaktiivisia happilajeja (ROS). Gallium-ionein ristiinsitoutuneita geelejä on testattu *in vitro* aortan sileässä lihaskudoksessa ja naudan endoteelisoluissa. Testit osoittivat metallogeelien olevan lupaavia sydämen ja verisuonten kudostekniikassa niiden hyvän bioyhteensopivuuden vuoksi.⁷

3.2.2 Hydrogeelit kudostekniikassa

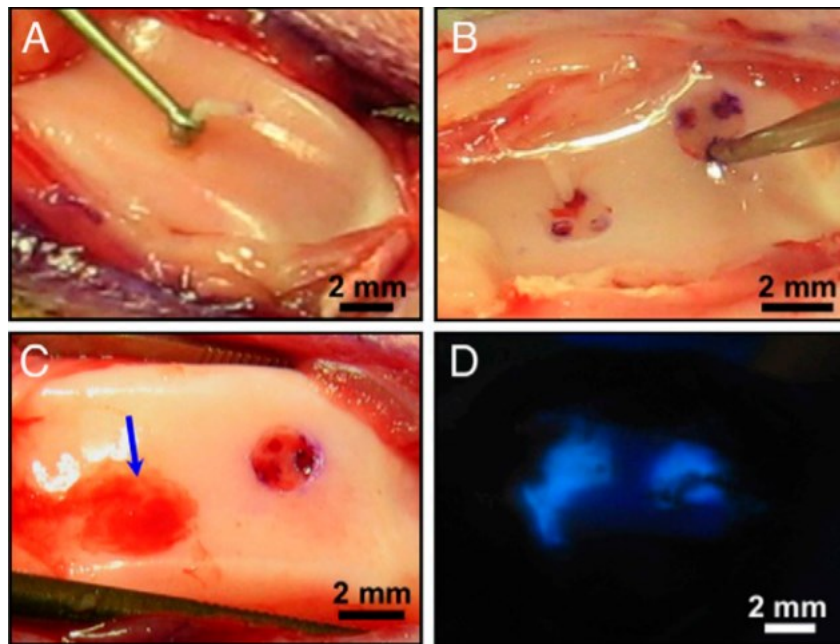
Aikuisen ihmisen keho ei kykene tehokkaasti korjaamaan nivelruston vaurioita. Supramolekulaaristen geelien on tutkimuksissa havaittu toimivan apuna rustokudoksen kasvattamisessa. Tutkimuksessa käytettiin peptidiamfiifiilejä (PA), jotka kykenevät järjestäytymään supramolekulaarisiksi nanorakenteiksi. Molekyylien on tarkoitus toimia solunulkopuolisena keinotekoisena matriisina. Ne voivat muodostaa kehossa hajoavia geelejä tietyssä pH:ssa ja PA-konsentraatiossa. Geelit hajoavat lopulta kehossa helposti edelleen metaboloituviksi aminohapoiksi ja lipideiksi.¹³

Geelit ladataan $\beta 1$ -kasvutekijällä (TGF- $\beta 1$), joka ylläpitää erilaistunutta nivelrustoa ja on tärkeä tekijä kondrogeneesin aikaansaamiseksi luuytimen mesenkyymisistä kantasoluista (MSC). TGF- $\beta 1$:n on myös todettu vähentävän soluväliaineen hajoamista sekä lisäävän kollageenin ja proteoglykaanin tuotantoa rustossa. Geelejä on testattu sekä *in vivo* että *in vitro* -menetelmin lupaavin tuloksin. *In vitro* -menetelmällä varmistettiin PA-geelien turvallisuus testaamalla myrkyllisyyttä soluille ja vaikutusta MSC:n toimintaan. Tavoitteena oli valmistaa bioaktiivinen molekyyli, jossa epitooppi kykenee kaappaamaan ja altistamaan kasvutekijän signaloinnille. Tutkimuksissa muokattiin MSC:ja ei-bioaktiivista täyteaine-PA:a sisältävällä geelillä, 5 ja 10 mol% TGF:a sitovaa PA:a (TGFBPA) ja täyteaine-PA:a sisältävällä geelillä, sekä 100 ng/mL rekombinanttia ihmisen TGF- $\beta 1$:ää sisältävällä geelillä. Testatuista geeleistä *in vivo*-tutkimukseen valittiin 10 mol% TGF:ää sitovaa PA:a sisältävä geeli, koska siinä MSC:t pysyivät elinkelpoisina koko jalostusprosessin ajan kuten kuvassa 5A on esitetty. Kuvassa 5B esitetään MSC:ja nanokuituisen geelin pinnalla.¹³



Kuva 5¹³. (A) Osoittaa elävät ja kuolleet jalostetut solut PA-geeissä (vihreä=elävä, punainen=kuollut), (B) Pyyhkäisyelektronimikroskooppikuva (SEM) hMSC:sta nanokuituisen geelin pinnalla. Reproduced from reference 13 with permission from PNAS. Copyright 2010 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

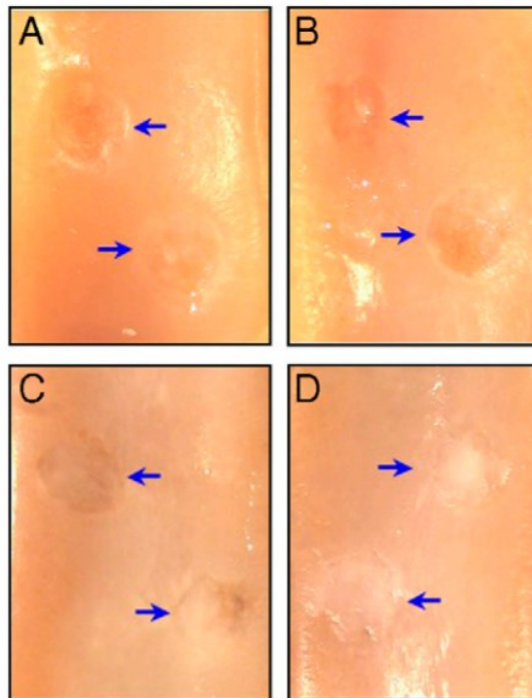
In vivo -tutkimuksessa seurattiin PA:n vaikutusta jäniksen polven vaurioituneen *throclea*-ruston palautumiseen luuytimen kantasolujen läsnä ollessa. Ruston vaurioittaminen on esitetty kuvassa 6. Alustavasti tutkittiin 10 % pyreenileimatun PA:n retentiota ja tarttumista viallisiin ruston osiin, sekä hoidon inflammatorisia vaikutuksia. Fluoresoiva pyreeni osoitti UV-valolla tutkittaessa PA:n tarttuneen vauriokohtaan kuten kuvassa 6 on esitetty, eikä suoria inflammatorisia vaikutuksia kuten, turpoamista, punoitusta tai synoviaalista hypertrofiaa, havaittu.¹³



Kuva 6¹³. Mikrohalkeamavauriot koko nivelruston paksuudelta jäniksellä. Kirurgisesti aikaansaatiin (A) koko nivelruston vaurio jäniksen rustossa mikrokyretin avulla sekä (B) mikromurtumareiat subkondraalisen luun läpi verenvuodon lisäämiseksi vauriokohtaan mikronaskalin (*microawl*) avulla. (C) PA-geeli vauriokohdassa osoitettu nuolella. (D) Pyreeni-leimattu PA-geeli osoittaa geelin tarttuneen vauriokohtaan. Reproduced from reference 13 with permission from PNAS. Copyright 2010 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Varsinaiseen 12 viikon tutkimukseen valittiin kontrolliryhmä (i) sekä kolme (ii-iv) tutkittavaa ryhmää. Kontrolliryhmää hoidettiin ainoastaan kasvutekijällä 10 μ L rhTGF- β 1 (100 ng/mL) vauriota kohti, ii-ryhmää ei-bioaktiivisella täyteaineella PA β 100 ng/mL rhTGF- β 1 (täyte/TGF), iii-ryhmää 10 mol% TGFBPA:lla sekoitettuna täyteaine PA:iin β 100 ng/mL rhTGF- β 1 (TGFBPA/TGF) ja iv-ryhmää 10 mol% TGFBPA:lla sekoitettuna täyteaine PA:iin ilman kasvutekijää (TGFBPA). 12 viikon jälkeen jokaisella tutkimuksen yksilöllä oli polvissaan normaali liikerata. Ryhmissä i ja ii ei ollut havaittavissa suurta muutosta ja vauriot olivat yhä selkeitä kuten kuvan 7 A ja B kohdassa on esitetty. Sen sijaan ryhmissä iii ja iv huomattiin useimmissa vaurioissa lähes täydellinen ruston

regeneraatio, joissa uuden kudoksen koostumus ja väri muistuttivat ympäröivää rustokudosta kuten kuvan 7 kohdissa C ja D on esitetty. Histologisessa tarkastelussa havaittiin ryhmissä i ja ii muodostuneen ruston olleen huonosti integroitunut ympäröivään kudokseen. Lisäksi molemmissa ryhmissä esiintyi muun muassa epänormaalia solutiheyttä ja järjestäytymistä minkä lisäksi glykosaminoglykaanin ja kollageeni II:n määrä oli vähäinen tai niitä ei ollut lainkaan. Päinvastoin samassa tutkimuksessa iii- ja iv-ryhmillä regeneroitunut rustokudos oli täyttänyt vaurion sekä integroitunut ympäröivään kudokseen. Lisäksi sekä glykosaminoglykaania että kollageeni II:a havaittiin muodostuneen.¹³



Kuva 7¹³. Muutokset nivelrustossa 12 viikon jälkeen. (A) i. 100 ng/mL TGF- β 1 (100TGF), (B) ii. täyteaine PA β 100TGF, (C) iii. 10 % TGF β PA β 100TGF, ja (D) iv. 10 % TGF β PA. Reproduced from reference 13 with permission from PNAS. Copyright 2010 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Tutkimus osoittaa nanokuiduista koostuvan geelin kykenevän vaikuttamaan solujen erilaistumiseen ja nivelrustospesifien matriisimolekyylien (kollageeni II) muodostumiseen jopa ilman bioaktiivista epitooppia. Geeli tarjoaa kasvutekijälle paremman kohdentumisen vauriossa, mikä on luultavasti syynä parempiin tuloksiin iii- ja iv-ryhmissä. Tutkimuksen tuloksena voidaan sanoa supramolekulaaristen geelien olevan erittäin lupaavia rustovaurioiden korjaamisessa.¹³

4. Yhteenveto

Supramolekulaaristen hydrogeelien mahdollisuuksia lääketieteessä tutkitaan jatkuvasti. Vaikka supramolekulaarisia geelejä ei vielä juurikaan käytetä kliinisessä lääketieteessä, on niiden tutkimustulokset olleet lupaavia. Niiden uniikit ominaisuudet mahdollistavat kattavasti erilaisia lääketieteen sovelluksia. Ne muun muassa lisäävät lääkeaineiden pysyvyyttä, vähentävät myrkyllisyyttä, lisäävät bioyhteensopivuutta ja niiden avulla lääkeaine voidaan kohdistaa tiettyihin soluihin.

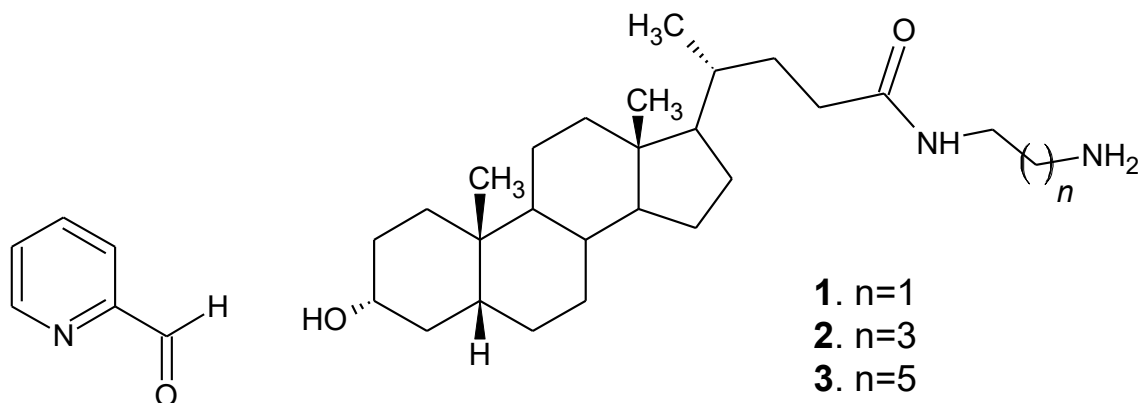
Lääkekuljetus ja siten myös syöpähoito on supramolekulaarisen kemian alalla yksi laajimmin tutkituista lääketieteen sovelluksista. Lääkekuljetuksessa geelit esimerkiksi parantavat lääkeaineiden pysyvyyttä ja auttavat lääkeaineen kohdistetussa vapauttamisessa. Supramolekulaarisille geeleille on löydetty useampia erilaisia käyttökohteita syöpähoidoissa, mikä tekee niistä tärkeän tutkimuskohteen etsittäessä uusia tehokkaita hoitomuotoja. Lääkekuljetuksen lisäksi fototerminen terapia voisi olla tulevaisuudessa tärkeä apu muun muassa perinteisen säteilyhoidon rinnalle.

Kudostekniikka on mielenkiintoinen lääketieteen sovellus, mikä mahdollistaa esimerkiksi kokonaan uusien tai vaurioituneiden kudoksien kasvattamisen. Metallionien hyödyntäminen geelien valmistuksessa lisää valtavasti niiden ominaisuuksia etenkin kudostekniikassa. Supramolekulaariset metallogeelit esimerkiksi tarjoavat kudostekniikkaan otollisen kolmeulotteisen ympäristön. Kaiken kaikkiaan supramolekulaariset hydrogeelit ovat erittäin lupaavia tulevaisuuden lääketieteessä.

KOKEELLINEN OSA

5. Työn tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia litokoolihapon amino(alkyyli)_namidien (n=2,4,6) geeliytymistä kuparisuolaliuoksessa erilaisten liuottimien ja pyridyylialdehydinin läsnä ollessa. Työ suoritettiin tohtorikoulutettava Riikka Kuosmasen laatiman työohjeistuksen mukaisesti. Kuvassa 8 esitetään pyridyylialdehydinin ja sappihappojohdannaisten rakennekaavat.



Kuva 8. Vasemmalla pyridyylialdehydinin rakennekaava ja oikealla litokoolihapon aminoalkyyliamidien rakennekaavat.

6. Materiaalit ja menetelmät

Tässä tutkimuksessa käytettiin reagensseina tutkimusryhmässä aiemmin valmistettuja litokoolihapon 2-aminoetyyliamidia (**1**), litokoolihapon 4-aminobutyliamidia (**2**) ja litokoolihapon 6-aminoheksyyliamidia (**3**), CuCl₂:a (Aldrich, 97 %), pyridyylialdehydiä (Aldrich, 99 %), ionivaihdettua vettä, metanolia (Honeywell, >99,8 %), 1-butanolia (VWR, 100 %), 1-pentanolia (Fluka, 99 %), 1-heksanolia (Riedel-de Haën, 98 %) ja DMF:a (Chromasolv Plus). Tutkimuksessa hyödynnettiin menetelminä alipainetislausta ja vakuumikuivausta.

¹H NMR-spektrit mitattiin käyttäen Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker Avance III HD 300 MHz NMR-spektrometriä. ppm-asteikko kiinnitettiin sappihappojohdannaisten mittauksissa liuottimena käytetyn MeOD:n jäännösprotonin signaaliin ($\delta(\text{CH}_3\text{OH}) = 4.87 \text{ ppm}$) ja pyridyylialdehydinin mittauksessa CDCl₃:n jäännösprotonin signaaliin ($\delta(\text{CHCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$).

7. Työn suoritus

7.1 Valmistelut

Tutkimusprojekti aloitettiin varmistamalla pyridyylialdehydinin puhtaus alipainetislauksella ja mittaamalla siitä ^1H NMR-spektri. Myös sappihappojohdannaisien kuivuus varmistettiin asettamalla ne vakuuminlinjaan yön yli, sekä mittaamalla niistä ^1H NMR-spektrit. Mitatut NMR-spektrit on esitetty liitteissä 1–3. Kantasuolaliuokset valmistettiin vastaamaan suolan ja sappihappojohdannaisen ainemääräsuhteita 1:3 liuottamalla sopiva määrä CuCl_2 :a 12 ml:aan ionivaihdettua vettä. Pyridyylialdehydinin ainemäärä oli sama kuin sappihappojohdannaisen. Sappihappojohdannaisien ja CuCl_2 :n massat on esitetty taulukossa 1 ja aldehydinin tilavuudet taulukossa 2.

Taulukko 1. Reagenssien massat

Reagenssi:	Massa:
1, 2, 3	$5,0 \pm 0,01$ mg
CuCl_2 (johdannaisen 1 tapauksessa)	$26,76 \pm 0,01$ mg
CuCl_2 (johdannaisen 2 tapauksessa)	$25,08 \pm 0,01$ mg
CuCl_2 (johdannaisen 3 tapauksessa)	$23,60 \pm 0,01$ mg

Taulukko 2. Pyridyylialdehydinin tilavuudet

Sappihappojohdannainen:	Pyridyylialdehydinin tilavuus:
1	1,14 μl
2	1,06 μl
3	1,00 μl

Kuparisuolat ja sappihaponäytteet punnittiin semimikrova'alla (Radwag XA/2X), minkä jälkeen valmistettiin kantasuolaliuokset liuottamalla suola 12,5 ml:aan ionivaihdettua vettä. Kantasuolaliuokset käytettiin ultraäänihauteessa liukenemisen varmistamiseksi.

7.2 Kompleksointikokeet

Geeliytymistä testattiin viidessä liuottimessa, jotka olivat metanoli, 1-butanoli, 1-pentanol, 1-heksanol ja DMF. Kokeet aloitettiin liuottamalla sappihappojohdannaiset 250 μl :aan liuotinta, minkä jälkeen lisättiin 250 μl kantasuolaliuosta ja lopuksi pyridyylialdehydi. Pyridyylialdehydinin lisäämisen

jälkeen viallit käytettiin ultraäänihauteessa ja niitä lämmitettiin kuumailmapistoolilla, kunnes liuos saavutti kiehumispisteensä tai vaihtoi väriä. Jokaisen reagenssin lisäyksen ja lämmityksen jälkeen havainnoitiin mahdolliset muutokset näytteen liukoisuudessa ja värissä. Viallit jätettiin odottamaan telineeseen ja näytteitä tarkasteltiin uudelleen tunnin ja vuorokauden tai viikon jälkeen mahdollisuuksien mukaan.

Tutkimus toistettiin vähentämällä veden määrää. Tällöin liuotinta pipetoitiin näytevialliin 400 µl ja kuparisuolaliuosta lisättiin 50 µl. Lisäksi geeliytymistä tarkasteltiin jättämällä pyridyylialdehydi lisäämättä. Geeliytymiskokeiden tuloksien lyhenteet esitetään liitteessä 5 ja tulokset liitteissä 6–14.

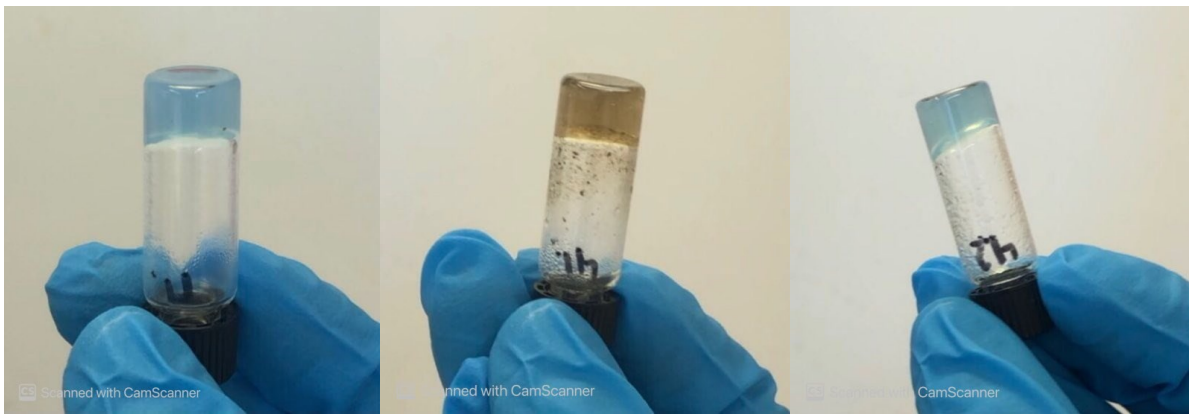
8. Työn tulokset

Litokoolihapon 2-aminoetyyliamidin (**1**) tapauksessa vahvoja geelejä ei muodostunut. Osittainen vaaleansininen geeli muodostui DMF:ssa pyridyylialdehydinin läsnä ollessa 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella tunnin jälkeen. Lisäksi yhdiste **1** muodosti metanolissa pyridyylialdehydinin läsnä ollessa parin viikon kuluessa viallin pohjalle ohuen hieman geeliä muistuttavan kerroksen 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella. Myös metanolissa ja DMF:ssa ilman aldehydiä olisi saattanut muodostua geeli tai osittainen geeli, jos tarkastelua olisi jatkettu pidempään. Aikarajoitteiden vuoksi tarkastelu-aika oli vain muutamia tunteja.

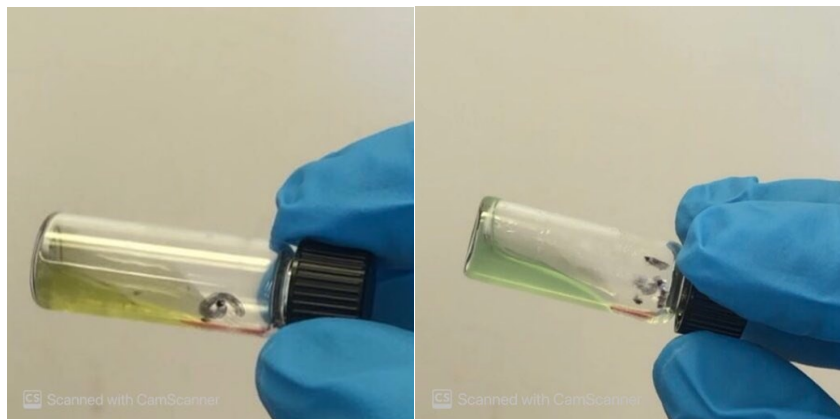
Yhdiste **2** muodosti geelin DMF:ssa ilman aldehydiä 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella. Viallissa havaittiin kaksi kerrosta. Osittaisia geelejä muodostui metanolissa aldehydinin läsnä ollessa ja ilman aldehydiä 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella. Aldehydinin läsnä ollessa osittainen geeli muodostui parin viikon aikana ja oli väriltään vaaleanvihreä. Ilman aldehydiä muodostui tunnin kuluessa heikko geeli, jossa oli havaittavissa eri kerroksia.

Yhdiste **3** muodosti geelin metanolissa ilman aldehydiä 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella. Näyte oli valmistettu metanoliin ilman aldehydiä. Koska geeli muodostui jo ennen aldehydinin lisäämistä, kokeiltiin aldehydinin lisäämistä ennen kuparisuolaliuosta. Ajatuksena oli, että lisäysjärjestystä muuttamalla Schiffin emäs pääsisi muodostumaan aldehydinin ja sappihappojohdoksen vapaan aminoryhmän välille ennen metallin lisäämistä. Tuloksena saatiin tunnin kuluessa kirkas vihreä neste, joka muuttui viikon aikana sameaksi hieman jähmeämmäksi liuokseksi. Yhdiste **3** muodosti osittaisia geelejä DMF:ssa sekä aldehydinin läsnä ollessa että ilman aldehydiä 1:1 liuotin:suolaliuos-suhteella. Aldehydinin läsnä ollessa kirkas vihreä geeli muodostui 1–2 viikon aikana. Ilman aldehydiä liuos alkoi jähmettyä välittömästi, ja muodosti vaaleansinisen osittaisen geelin. Kun tätä lämmitettiin, muuttui geeli vihreäksi nesteeksi, joka ei muuttunut enää takaisin geeliksi.

Tutkimuksessa geelejä muodostui DMF:ssa ja metanolissa. Muodostuneet geelit on esitetty kuvassa 9 ja esimerkkejä osittaisista geeleistä kuvassa 10. Metanolin ja DMF:n soveltuvuus geelien muodostukseen voisi johtua niiden poolisuudesta. Ne ovat tutkimuksessa käytetyistä liuottimista poolisimmat. Näistä metanoli osoittautui geelin muodostuksessa hieman paremmaksi liuottimeksi sen muodostaessa vahvempia geelejä. Tämä voi johtua liuottimien proottisuuseroista, sillä metanoli on proottinen kun DMF puolestaan on aproottinen. Proottisten liuottimien muodostamat vetysidokset voivat parantaa geelin pysyvyyttä ja siten metanolissa neste immobilisoituu hieman paremmin kuin DMF:ssa. Muodostuneet geelit liuottimiseen on esitetty taulukossa 3.



Kuva 9. Muodostuneet geelit. Vasemmalla yhdiste 1 metanolissa ilman aldehydiä, keskellä yhdiste 2 DMF:ssa ilman aldehydiä ja oikealla yhdiste 3 metanolissa ilman aldehydiä.



Kuva 10. Esimerkit osittaisista geeleistä. Oikealla yhdisteestä 2 metanolissa aldehydinin läsnäollessa muodostunut osittainen geeli ja vasemmalla yhdisteestä 3 DMF:ssa aldehydinin läsnäollessa muodostunut heikko osittainen geeli.

Taulukko 3. Muodostuneet geelit

Yhdiste	liuotin/aldehydi	tulos	seuranta-aika
1	DMF / Kyllä	Heikko osittainen geeli	2 vko
2	DMF / Ei	Geeli	1–3 h
2	MeOH / Kyllä	Osittainen geeli	1 vko
2	MeOH / Ei	Heikko osittainen geeli	1–3 h
3	MeOH / Ei	Heikko geeli	1–3 h
3	MeOH / Ei	Geeli	1 vko
3	DMF / Kyllä	Heikko osittainen geeli	1 vko
3	DMF / Ei	Osittainen geeli	1–3 h

Tulevaisuudessa gelatontikokeet voisi toistaa uudelleen ilman aldehydiä. Lisäksi kokeita olisi mielenkiintoista suorittaa erilaisilla metalleilla kuten raudalla tai mangaanilla, joilla on tutkittu olevan moniin lääketieteellisiin sovelluksiin sopivia ominaisuuksia. Niitä tarvitaan muun muassa DNA-signaloinnissa ja hapetus-pelkistys-katalyysissä⁷.

9. Johtopäätökset

Geelejä muodostui metanolissa ja DMF:ssa suurempaa vesimäärää käytettäessä. Kun vesimäärää vähennettiin, ei geelejä muodostunut. Aldehydin läsnäolo puolestaan näytti heikentävän geelien muodostumista. Mikäli gelatoitumista olisi ollut mahdollista seurata pidempään, olisi ilman aldehydiä tehdyissä kokeissa saatettu havaita useampia geelejä.

Viitteet

1. Zhou, J.; Yu, G. ja Huang, F., Supramolecular chemotherapy based on host-guest molecular recognition: A novel strategy in the battle against cancer with a bright future, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, (46), 7021-7053.
2. Steed, J. W. ja Atwood, J. L., *Supramolecular chemistry*, 2. painos, Wiley, Chichester, UK, 2009.
3. Skilling, K. J.; Citossi, F.; Bradshaw, T. D.; Ashford, M.; Kellam, B. ja Marlow, M., Insights into low molecular mass organic gelators: A focus on drug delivery and tissue engineering applications, *Soft matter*, **2013**, (10), 237.
4. Rao, M. R. ja Sun, S., Supramolecular assemblies of amide-derived organogels featuring rigid π -Conjugated phenylethynyl frameworks, *Langmuir*, **2013**, (29), 15146-15158.
5. Tam, A. Y. ja Yam, V. W., Recent advances in metallogels, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, (42), 1540-1567.
6. Kuosmanen, R.; Rissanen, K. ja Sievänen, E., Steroidal supramolecular metallogels, *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, (49), 1977-1998.
7. Janarthanan, G. ja Noh, I., Recent trends in metal ion based hydrogel biomaterials for tissue engineering and other biomedical applications, *J. Mater. Sci. Technol.*, **2020**, (63), 35-53.
8. Vegners, R.; Shestakova, I.; Kalvinsh, I.; Ezzell, R. M. ja Janmey, P. A., Use of a gel-forming dipeptide derivative as a carrier for antigen presentation, *J. Pept. Sci.*, **1995**, (1), 371-378.
9. Thakor, A. S. ja Gambhir, S. S., Nanooncology: The future of Cancer Diagnosis and therapy, **2013**, (63), 395-418.
10. Huang, P.; Gao, Y.; Lin, J.; Hu, H.; Liao, H.; Yan, X.; Tang, Y.; Jin, A.; Song, J.; Niu, G.; Zhang, G.; Horkay, F. ja Chen, X., Tumor-specific formation of enzyme-instructed supramolecular self-assemblies as cancer theranostics, *ACS nano*, **2015**, (9), 9517-9527.
11. Häring, M.; Schiller, J.; Mayr, J.; Grijalvo, S.; Eritja, R. ja Díaz, D. D., Magnetic gel composites for hyperthermia cancer therapy, *Prog. Coll. Pol. Sci. S.*, **2015**, (1), 135-161.
12. Webb, B. A.; Chimenti, M.; Barber, D. L. ja Jacobson, M. P., Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, (11), 671-677.
13. Ramille N. Shah; Nirav A. Shah; Marc M. Del Rosario Lim; Caleb Hsieh; Gordon Nuber; Samuel I. Stupp ja Robert Langer, Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, (107), 3293-3298.

Liitteet

LIITE 1 Yhdisteen **1** ¹H NMR-spektri

LIITE 2 Yhdisteen **2** ¹H NMR-spektri

LIITE 3 Yhdisteen **3** ¹H NMR-spektri

LIITE 4 Pyridyylialdehydin ¹H NMR-spektri

LIITE 5 Lyhenteiden selitykset

LIITE 6 **1** + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

LIITE 7 **2** + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

LIITE 8 **3** + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

LIITE 9 **1** + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

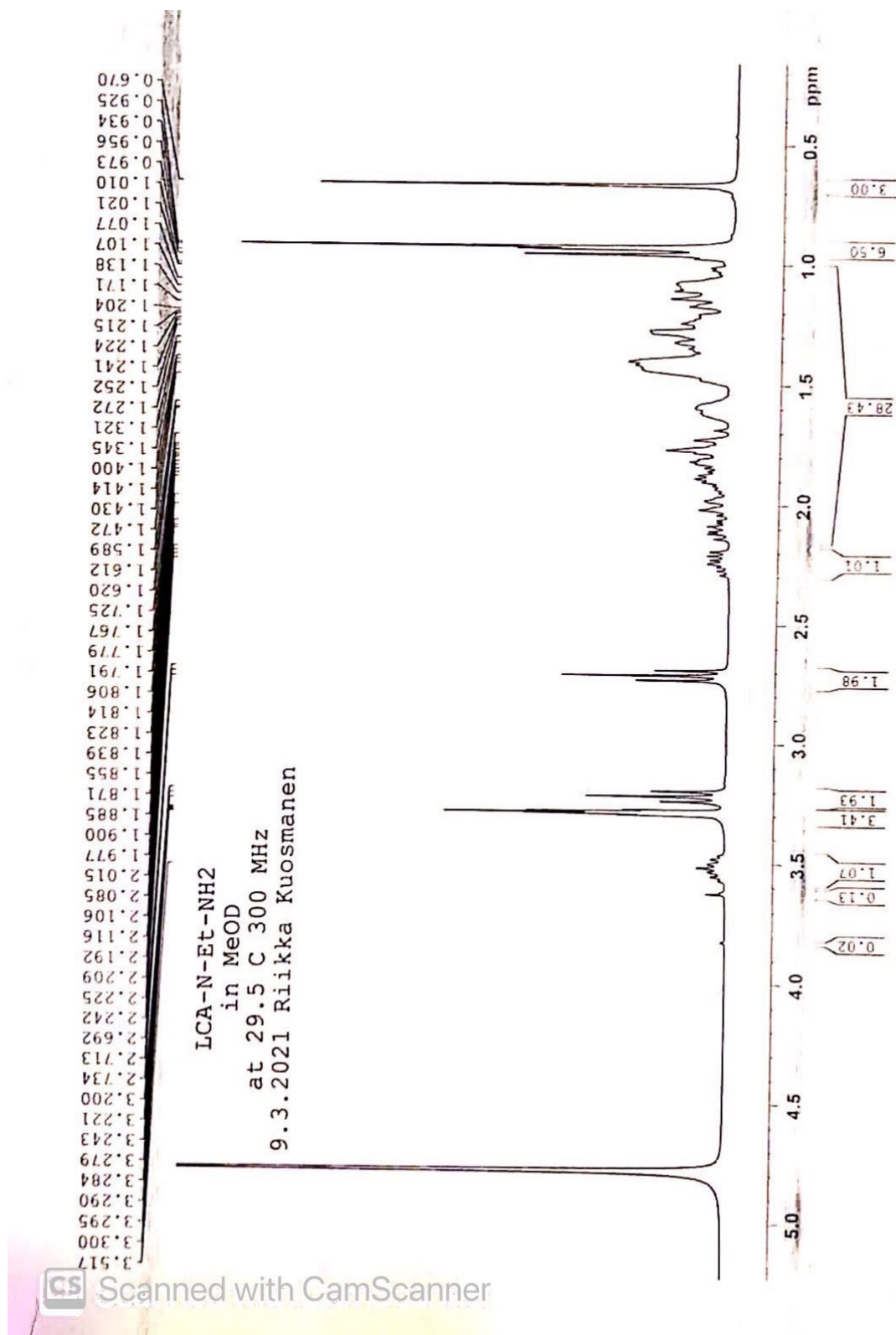
LIITE 10 **2** + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

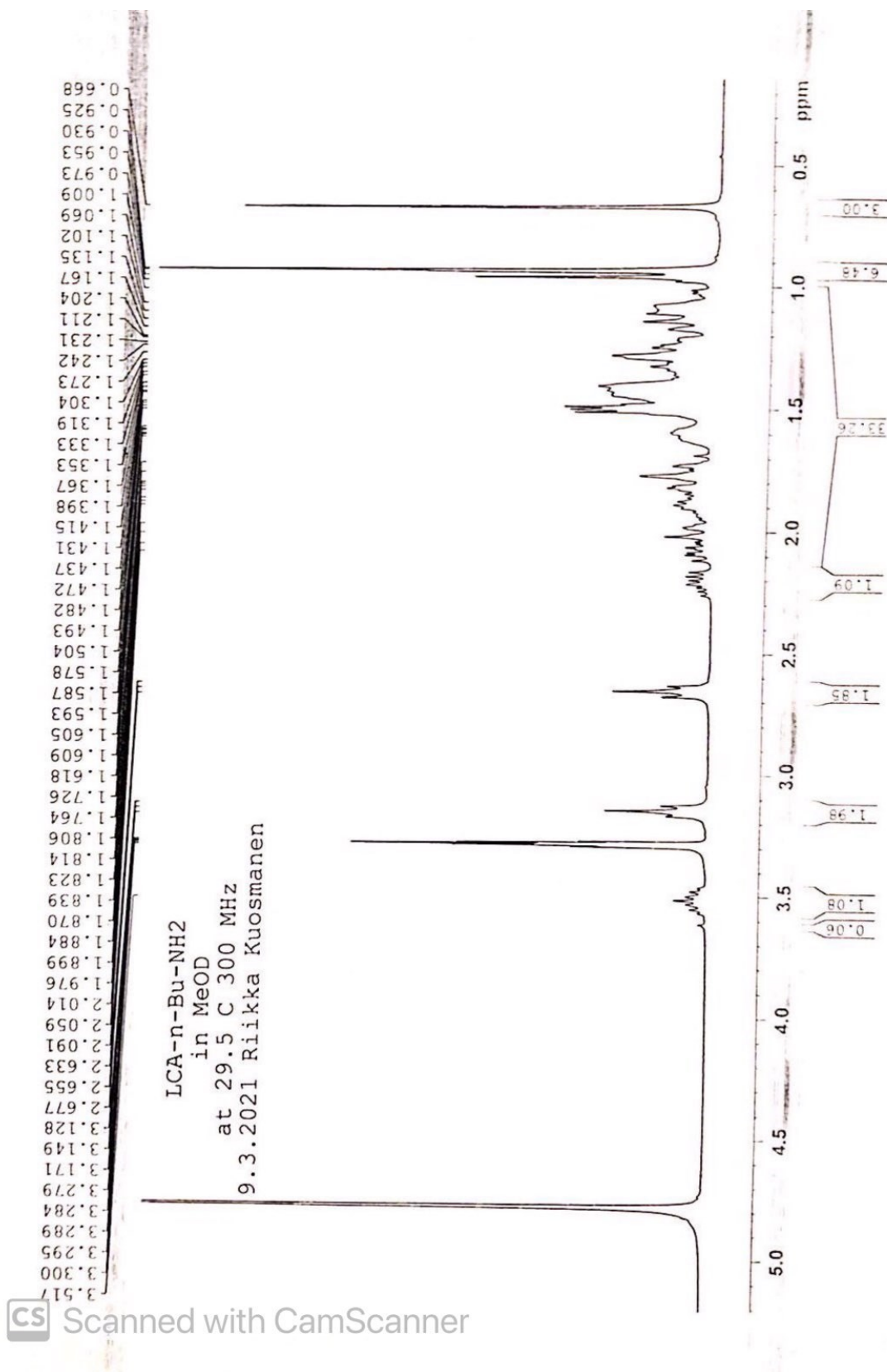
LIITE 11 **3** + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

LIITE 12 **1**, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

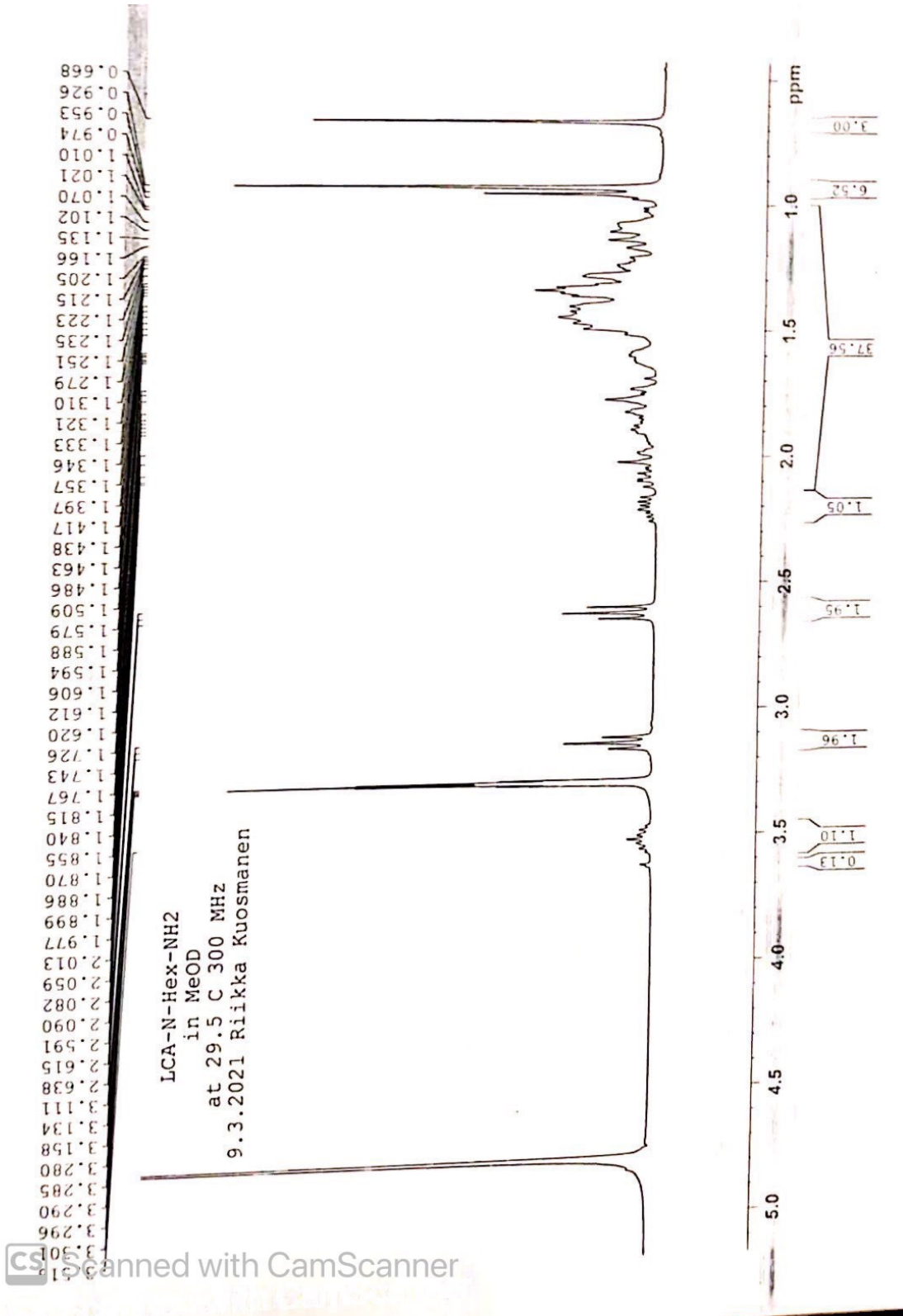
LIITE 13 **2**, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

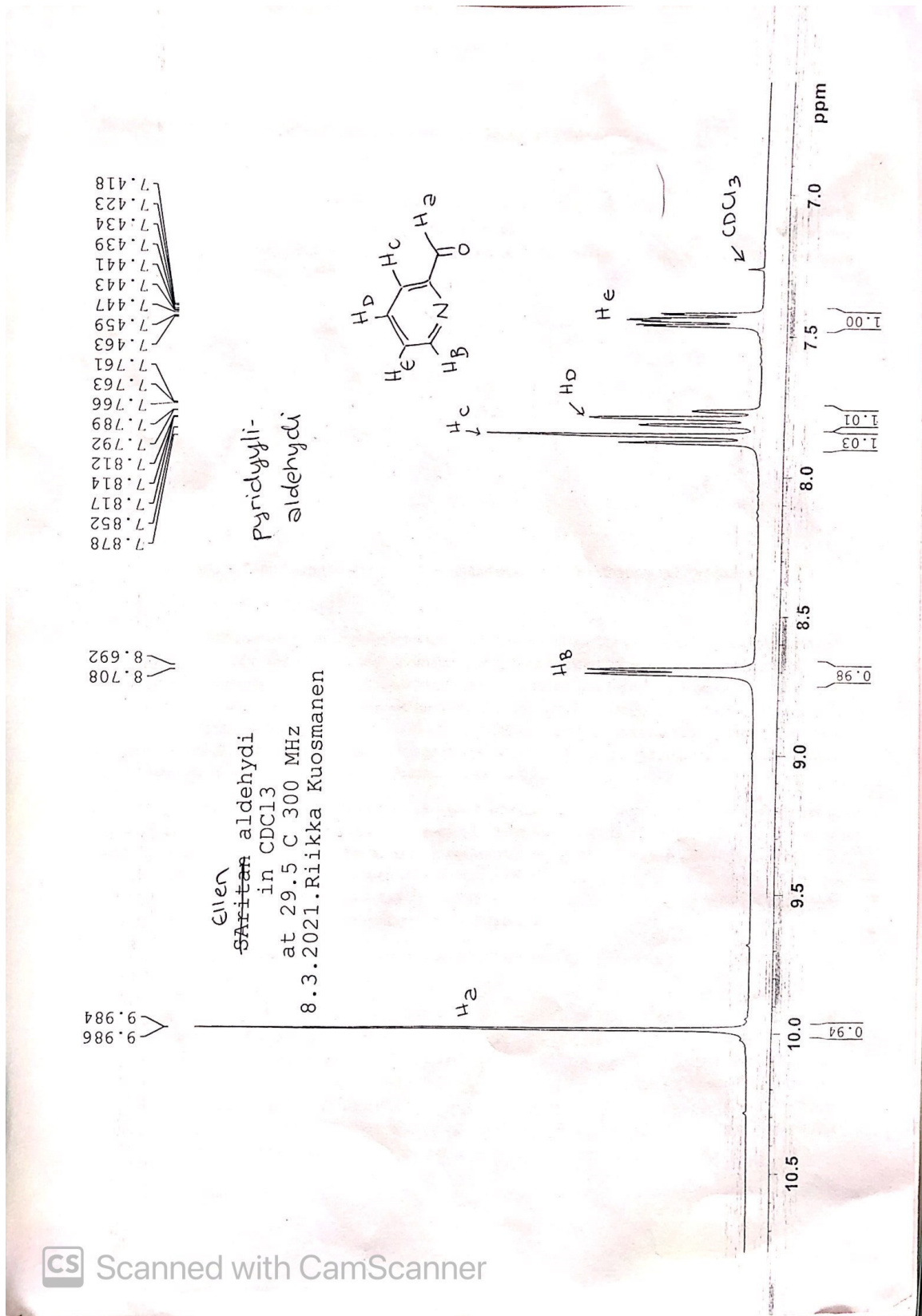
LIITE 14 **3**, 1:1 liuotin ja kantasoolaliuos -sarjan tulokset

Yhdisteen 1 ^1H NMR-spektri

Yhdisteen 2 ^1H NMR-spektri

Yhdisteen 3 ¹H NMR-spektri



Pyridyyialdehydin ^1H NMR-spektri

Taulukko 4. Lyhenteiden selitykset

Lyhenne:	Selitys:
G	Geeli (1–2 pisaraa nestettä)
G-	Heikko geeli (Geeli ei jaksakaan kantaa painoaan täydellisesti)
PG	Osittainen geeli (20–50 % nestettä)
PG-	Heikko osittainen geeli
PS	Ei täydellistä liukenemistä
S	Täydellinen liukeneminen
+ lyhenteen perässä	Havainto ilman lämmitystä

1 + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1pv	1vko
1	MeOH	PS+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ lila ----- PS sininen	PS+ sininen	PS+ v.sininen	PS+ v.sininen Pohjalla hyvin heikko geelimäinen kerros
2	1-butanoli	PS+ väritön ----- Kerrostuu: Y:PS+ v.sininen A:PS+ v.sininen ----- PS+ lila ----- Kerrostuu: Y:PS vihreä A:PS sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:S+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:S+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:S+ sininen
3	1-pentanol	PS+ väritön ----- Kerrostuu: Y: PS+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostuu: Y:PS+ sinivihreä A:PS+ sininen ----- Kerrostuu: Y:PS+ oliivi A:PS+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:PS+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:S+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ oliivi A:S+ sininen
4	1-heksanol	PS+ väritön ----- Kerrostuu: Y:PS+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostuu: Y:PS+ samea A:PS+ sininen ----- Kerrostuu: Y:PS sinivihreä A: PS sininen	Kerrostunut: Y:PS+ sinivihreä A:PS+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ sinivihreä A:PS+ sininen	Kerrostunut: Y:S+ sinivihreä A:PS+ sininen
5	DMF	PS+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ v.sininen ----- PS v.sininen	PG+ v.sininen Loppuosa muistuttaa jo geeliä	PG+ v.sininen Loppu muistuttaa geeliä	PG+ v.sininen Pohjalla sakkaa?

2 + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1pv	1vko
6	MeOH	S+ väritön ----- PS+ sinivihreä ----- PS+ lila ----- PS sinivihreä	PS+ v.vihreä	PS+ v.vihreä	PG+ v.vihreä
7	1-butanoli	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ v.sininen ----- PS+ lila ----- Kerrostunut: Y:PS sinivihreä A: PS väritön	Kerrostunut: Y:PS+ sin.harmaa A:S+ väritön	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ väritön	Kerrostunut: Y:PS+vihreä A:PS+ väritön
8	1-pentanol	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ v.sininen A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:PS+ lila A:PS+ lila ----- Kerrostunut: Y:PS sinivihreä A:PS väritön	Kerrostunut: Y:S+ turkoosi A:PS+ väritön	Kerrostunut: Y:S+ sinivihreä A:PS+ samea	Kerrostunut: Y:S+ sinivihreä A:PS+ samea
9	1-heksanol	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ sininen ----- Kerrostunut: Y:PS sinivihreä A:PS vaalea	Kerrostunut: Y:S+ vihreä A:PS+ samea	Kerrostunut: Y:S+ vihreä A:PS+ väritön	Kerrostunut: Y:S+ vihreä A:PS+ väritön
10	DMF	S+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ v.sininen ----- PS vihreä	PS+ vihreä	PS+ vihreä	PS+ vihreä Sakkaa pohjalla

3 + pyridyylialdehydi, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1vko
11	MeOH	S+ väritön ----- PS+ v.sininen Seisoi hetken pöydällä -> geeliytyi ennen aldehydiä	G+ v.sininen EI ALDEHYDIÄ	G+ v.sininen EI ALDEHYDIÄ
12	1-butanoli	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:PS+ lila A:PS+ harmaa ----- Kerrostunut: Y:PS vihreä A:PS harmaa	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ väritön	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ väritön
13	1-pentanoli	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ haalea lila A:PS+ v.sin ----- Kerrostunut: Y:PS sinivihreä A:PS harmaa	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ harmaa	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ väritön
14	1-heksanoli	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:S+ sininen ----- Kerrostunut: Y:PS vihreä A:PS harmaa	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ harmaa	Kerrostunut: Y:PS+ vihreä A:PS+ harmaa
15	DMF	PS+ väritön ----- PS+ v.sininen, jähmeämpi ----- PS+ v.sininen ----- PS sinivihreä	PS+ vihreä Jähmeä	PG++ vihreä
16	MeOH aldehydi --> Suola -->	ALDEHYDI ENNEN SUOLAA S+ väritön S+ väritön S+ v.sininen PS siniharmaa	PS+ vihreä	PS+ vihreä Hieman jähmeä

1 + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1pv
17	MeOH	PS+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ sininen ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä
18	1-butanoli	PS+ väritön ----- PS+ v.sininen ja sinisiä helmiä ----- PS+ sin.harmaa ja sakkaa ----- PS vihreä ja sin.helmiä	S+ vihreä sin.helmet	S+ vihreä
19	1-pentanol	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:S+ sininen A:S+ t.sininen ----- S oliivi	PS+ ruskea sakkaa	PS+ ruskea sakkaa
20	1-heksanol	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:PS+ harmaa A:PS+ t.sininen ----- PS ruskea	PS+ ruskea helmiä pohjalla	PS+ ruskea helmiä pohjalla
21	DMF	PS+ väritön, hieman rakeinen ----- PS+ sininen ----- PS+ vihreä ----- PS vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä

2 + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1pv
22	MeOH	S+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ lila ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä
23	1-butanoli	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ v.sin.helmet ----- PS+ vaalea lila ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä
24	1-pentanoli	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ kirkas A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ t.sininen ----- PS vihreä	PS+ vihreä "levämäinen"	S+ vihreä helmiä pohjalla
25	1-heksanoli	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A: PS+ harmaa ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:S+ turkoosi ----- PS vihreä ja valkoista sakkaa	PS+ vihreä	PS+ vihreä helmiä pohjalla
26	DMF	S+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ sinivihreä ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä

3 + pyridyylialdehydi, 9:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h	1pv
27	MeOH	S+ väritön ----- PS+ v.sininen ----- PS+ lila ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä
28	1-butanoli	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ v.sin helmi ----- Kerrostunut: Y:S+ lila A: PS+ sininen ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä
29	1-pentanol	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ harmaa sin. ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön A:PS+ turkoosi ----- PS vihreä ja valkoisia helmiä	PS+ vihreä värittömiä helmiä	PS+ vihreä helmiä
30	1-heksanol	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ harmaa sin. ----- Kerrostunut: Y:S+ väritön A:PS+ turkoosi ----- PS vihreä ja värittömiä helmiä	PS+ vihreä värittömiä helmiä	PS+ vihreä helmiä
31	DMF	S+ väritön ----- PS+ sinivihreä ----- PS+ sinivihreä ----- S vihreä	S+ vihreä	S+ vihreä

1, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h
32	MeOH	PS+ kirkas ----- PS+ v.sininen, hieman jähmeämpi ----- PS v.sininen	PS+ v.sininen ja sakkaa -> myöhemmin PG?
33	1-butanoli	PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y: PS+ kirkas K:PS+ vaalea A:PS+ v.sin ----- Kerrostunut: Y:PS vaalea K:PS v.sininen A:PS sininen	Kerrostunut: Y: S+ kirkas K: PS+ t.sininen A:PS+ v.sininen
34	1-pentanol	PS+ samea, hieman jähmeämpi ----- Kerrostunut: Y: PS+ v.sin K: PS+ kirkas A:PS+ v.sin ----- Kerrostunut: Y: PS v.sininen K: PS samea A:PS v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: S+ kirkas A:PS+ v.sininen
35	1-heksanol	PS+ väritön jähmeämpi ----- Kerrostunut: Y: PS+ samea K: PS+ kirkas A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y: PS v.sininen K: PS samea A:PS v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: PS+ kirkas A: PS+ v.sininen
36	DMF	PS+ väritön, vähän jähmeämpi ----- PS+ v.sininen, jähmeämpi ----- Kerrostunut: Y: PS sininen K: PS v.sininen A:PS kirkas Jähmeämpi	PS+ v.sininen Mahdollinen G pidemmällä ajalla.

2, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuos	koe	1h
37	MeOH	PS+ kirkas ----- PS+ v.sininen jähmeämpi ----- PS v.sininen hieman geelimäinen	Kerrostunut: Y: PG -+ kirkas A: PG -+ v.sininen
38	1-butanoli	S+ kirkas ----- Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: S+ kirkas A:PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y: PS v.sininen K: PS samea A: PS v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ kirkas K: PS + kirkas A: PS+ kirkas ja sininen sakka
39	1-pentanol	S+ kirkas ----- Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: PS+ kirkas A: PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y:PS+ v.sininen K: PS+ samea A:PS+ v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: S+ kirkas A:PS+ v.sininen
40	1-heksanol	PS+ kirkas, vähän jähmeämpi ----- Kerrostunut: Y: PS+ kirkas K: S+ kirkas A: PS+ hailakka sininen ----- Kerrostunut: Y: PS vaalea K: PS valkoinen A:PS hyvin hailakka sin.	Kerrostunut: Y: PS+ kirkas K: PS+ valkoinen A: PS+ v.sininen
41	DMF	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y:PS+ sameampi v.sininen A: v.sininen ----- v.ruskea ja tumma sakka	Kerrostunut: Y: G + vaaleampi ruskea A: G + ruskea Samea väritys ja tummaa sakkaa

3, 1:1 liuotin ja kantasuolaliuos -sarjan tulokset

nro	liuotin	koe	1h
42	MeOH	S+ kirkas ----- Kerrostunut: Y: PS+ sinivihreä A: PS+ sinivihreä ----- Ultraäänen jälkeen jähmeä ----- Kerrostunut: Y: PS sinivihreä A: PS sinivihreä Koostumus nestemäisempi	G-+ sinivihreä
43	1-butanoli	S+ kirkas ----- Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: PS+ samea A: PS+ v.sininen ----- Kerrostunut: Y: PS v.sininen K: PS samea A: PS v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: S+ kirkas A: PS+ v.sininen
44	1-pentanol	S+ kirkas ----- Kerrostunut: Y: PS+ vaalea K: S+ kirkas A:PS+ hailakka v.sininen ----- Kerrostunut: Y: PS hyvin hailakka v.sin K: PS vaalea A: PS hyvin hailakka v.sin	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: S+ kirkas A:PS+ v.sininen
45	1-heksanol	S+ väritön (hieman jähmeä) ----- Kerrostunut: Y:PS+ väritön K:S+ väritön A:PS+ väritön ----- Kerrostunut: Y: PS hyvin v.sininen K: S kirkas A:PS hyvin v.sininen	Kerrostunut: Y: PS+ v.sininen K: PS+ vaalea A: PS+ v.sininen
46	DMF	S+ väritön ----- Kerrostunut: Y: PS+ sinivihreä A: PS+ sinivihreä ----- Jähmettyi ennen lämmitystä	PG+ v.sininen Testattiin lämmitystä -> PS vihreä -> ei enää jähmettynyt