

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Hydrogeelit, regeneratiivisen lääketieteen
sovellus**

Kandidaatintutkielma

18.10.2021

Ossi Tanhuanpää



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

TIIVISTELMÄ

Tässä kandidaatintutkielmassa käsitellään hydrogeelejä ja kuinka niitä voidaan käyttää regeneratiivisen lääketieteen erilaisissa sovelluksissa. Tutkielma jakautuu kolmeen aihepiiriin. Ensimmäisessä osiossa perehdytään hydrogeelin muodostaviin sidoksiin ja sidosvoimiin, toisessa osiossa perehdytään synteettisistä hydrogeeleistä polyvinyylialkoholiin ja polyetyleeniglykoliin sekä luonnollisista hydrogeeleistä hyaluronihappoon ja kollageeniin. Kolmannessa osiossa perehdytään hydrogeeliavusteiseen lääkeainekuljetukseen ja kudosterapiaan. Kirjallisuuden perusteella hydrogeelin valmistusmateriaalilla on merkitystä käyttökohteelle ja käyttötarkoitukselle.

ESIPUHE

Kandidaatin tutkielman kirjallinen osuus aloitettiin tammikuussa 2021 ja saatiin valmiiksi lokakuussa 2021. Tieteellisiä julkaisuja kirjallisuuslähteiksi haettiin käyttämällä hakukoneita Google ja Google Scholar. Myös tietokantoja Scopus, Elsevier ja Pubmed käytettiin tieteellisten julkaisujen löytämiseksi. Tämä kandidaatintutkielma käsittelee hydrogeelejä ja kuinka niitä voidaan hyödyntää regeneratiivisen lääketieteen eri sovelluksissa. Aihepiiriä käsitellään kemian näkökulmasta minkä vuoksi kantasoluhoidot rajattiin pois.

Tutkielman kirjallisen osuuden ohjaajana toimi professori Maija Nissinen ja kokeellisen tutkimusprojektin ohjaajana väitöskirjatutkija Romain Chevigny. Kokeellinen tutkimusprojekti tehtiin huhtikuussa 2021. Haluan suuresti kiittää ohjaajiani professori Maija Nissistä sekä väitöskirjatutkija Romain Chevigny kärsivällisyydestä, ohjauksesta, haastavasta ja mielenkiintoisesta aiheesta sekä mahdollisuudesta päästä tekemään aiheesta kandidaatin tutkielmaa.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	iii
ESIPUHE	iv
SISÄLLYSLUETTELO	v
KÄYTETYT LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT	vi
1 JOHDANTO	1
2 SITOUTUMINEN HYDROGEELISSÄ	3
2.1 Fysikaaliset hydrogeelit	3
2.2 Kemialliset hydrogeelit	4
2.3 Vesi hydrogeeleissä	5
3 HYDROGEEELITYYPIT	7
3.1 Luonnolliset hydrogeelit	7
3.1.1 Hyaluronihappo	7
3.1.2 Tyypin I kollageeni	9
3.2 Synteettiset hydrogeelit	10
3.2.1 Poly(vinyylialkoholi) eli PVA	10
3.2.2 Poly(etyleeniglykoli) eli PEG	11
4 REGENERATIIVISUUS JA SOVELLUKSET	13
4.1 Regeneratiivisuus	13
4.2 Kudosterapia (Tissue Engineering)	14
4.3 Lääkkeiden kuljetus (Drug Delivery)	15
5 YHTEENVETO	17
KIRJALLISUUSLUETTELO	18

KÄYTETYT LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT

ECM	Solun ulkopuolinen väliaine (extracellular matrix)
HA	Hyaluronihappo
PVA	Poly(vinyylialkoholi)
PVAc	Poly(vinyyliaetaatti)
PEG	Poly(etyleeniglykoli)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
THF	Tetrahydrofuraani
HMPA	Heksametyylifosforamidi
PEO	Poly(etyleenieetteri)
POE	Poly(oksyetyyli)

1 JOHDANTO

Hydrogeeli koostuu kolmiulotteisesta verkkomaisesta polymeerirakenteesta ja vedestä, joka on sitoutunut polymeeriverkkoon.^{1,2} Organogeeleissä nesteenä toimii orgaaninen liuotin ja aerogeelissä polymeeriverkostoon on sitoutunut nesteen sijasta ilmaa. Hydrogeelin polymeeriketju voi koostua yhdestä tai useammasta monomeeristä ja niille on ominaista sitoa huomattava määrä vettä rakenteeseensa.¹ Hydrogeelejä voidaan jaotella muun muassa sen perusteella kuinka pysyvä polymeeriverkko on (ns. kemialliset ja fysikaaliset hydrogeelit) tai verkkorakenteen muodostavien monomeerien perusteella (luonnolliset, synteettiset tai hybridigeelit).²

Polymeeriverkko muodostuu erilaisten siltasidosten avulla, jotka estävät yksittäisten polymeeriketjujen vapaan liikkumisen. Erilaiset siltasidokset vaikuttavat geelin fysikaalisiin ominaisuuksiin kuten elastisuuteen, liukoisuuteen ja termoplastisuuteen.³ Siltasidosten määrä määrittää, kuinka paljon nestettä, esimerkiksi vettä tai kudosnestettä, polymeeriverkkoon voi sitoutua ja kuinka vahvaksi polymeeriverkko muodostuu.^{2,4,5}

Veden sitoutumisen polymeeriverkkoon aiheuttavat muun muassa kapillaariset, osmoottiset ja hydrataatiovoimat (hydration forces). Näiden vastavoimana toimivat polymeeriketjun siltasidokset, jotka estävät verkon laajenemisen loputtomiin.²

Hydrogeeleille on keksitty useita erilaisia käyttökohteita niiden absorptiokyvyn vuoksi. Ensimmäiset 1960-luvulla markkinoille tulleet kaupalliset piilolinssit valmistettiin hydrogeelistä.^{1,2,4} Nykyisin hydrogeeleille löytyy useita käyttökohteita etenkin lääketieteessä, sillä hydrogeeleistä voidaan valmistaa kudoskopvikkeita, joihin ei tapahdu hylkimisreaktiota.¹

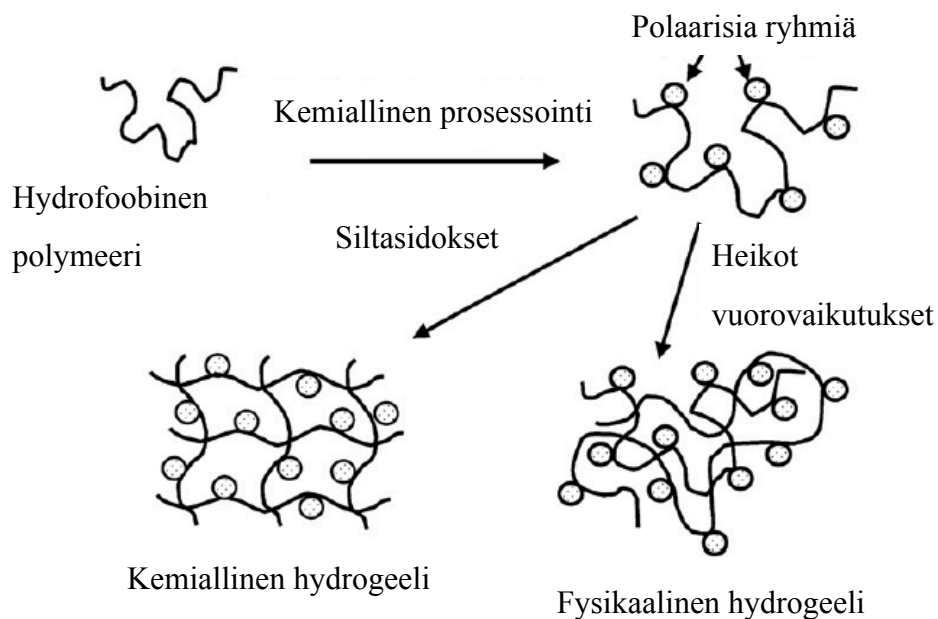
Regeneratiivisella lääketieteellä tarkoitetaan lääketieteen alaa, jossa elimistön rakenteita korvataan tai korjataan erilaisilla materiaaleilla ja menetelmillä. Korvaavista rakenteista esimerkkeinä toimivat nivelproteesit, kudosteknologia ja hammasimplantit. Korjaavilla menetelmillä tarkoitetaan keinoja saada kudokset uusiutumaan tehokkaamin. Selkeää rajaa ei ole, jolla aihepiiri voitaisiin rajata ja sanoa loppuvan. Tutkimuksen pääpaino on ihmisen

soluissa, kuten somaattisissa soluissa ja aikuisen kantasoluissa ja siinä kuinka näitä hyödyntämällä erilaisia kudosisvaurioita ja sairauksia voitaisiin hoitaa. ⁶

2 SITOUTUMINEN HYDROGEELISSÄ

2.1 Fysikaaliset hydrogeelit

Ei-kovalenttisin sidosvoimien, kuten vetysidosten, Van der Waals -voimien ja/tai ionisten vuorovaikutusten avulla muodostuneita siltasidoksia kutsutaan fysikaaliseksi siltasidoksiksi ja ne muodostavat fysikaalisen hydrogeelin (Kuva 1).^{4,5,7} Vuorovaikutukset eivät jakaudu materiaalissa tasaisesti, jolloin syntyy monomeerien kiertymisestä johtuvia klustereita. Tämän takia hydrogeeli ei ole homogeeninen.⁵



Kuva 1. Kemiallisen ja fysikaalisen hydrogeelin muodostuminen.⁵

Reprinted from *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol 54, Allan S Hoffman, *Hydrogels for biomedical applications*, 18-23, 2002, ©2002 with permission from Elsevier.

Ei-kovalenttiset sidokset ovat heikompia kuin kovalenttiset sidokset eivätkä sen takia kestä ulkoista rasitusta yhtä hyvin kuin kovalenttiset sidokset. Fysikaalisten hydrogeelien liukoisuus kasvaa ulkoisten tekijöiden muuttuessa ei-kovalenttisille sidoksille epäsuotuisaksi.⁴ Terminen energia lisää molekyylien liikettä, jolloin heikot vuorovaikutukset katkeavat. Vaihtoehtoisesti

liuottimen määrän lisääntyessä kilpailevien vuorovaikutusten määrä heikentää syntyviä sidoksia. Fysikaaliset siltasidokset voidaankin siis ajatella polymeeriverkoston koossa pitävinä solmuina.

Siltasidokset muodostuvat vain kun ulkoiset tekijät, kuten pH ja lämpötila, ovat geelin muodostumiselle optimaalisia. Ulkoisia tekijöitä säätelämällä voidaan vaikuttaa geelin käyttäytymiseen. Geeli voidaan esimerkiksi liuottaa käytettyyn liuottimeen nostamalla liuoksen pH:ta ja/tai lämpötilaa, ja palauttaa geeli takaisin, kun lämpötila ja/tai pH palautuvat alkutilanteeseen. Tästä syystä fysikaalisia hydrogeelejä voidaan kutsua myös reversiibeileiksi geeleiksi.^{4,5}

Fysikaalisten hydrogeelien käyttöikä on parhaimmillaan vain muutamia kuukausia johtuen heikoista vuorovaikutuksista, jotka pitävät polymeeriverkkoa kasassa. Tästä syystä ne sopivat hyvin lyhytaikaiseen lääkkinnälliseen hoitoon, jos esimerkiksi tavoitteena on vapauttaa lääkeaine elimistöön suhteellisen lyhyen ajanjakson sisään. Fysikaalisten geelien etuna on myös niiden spontaani muodostuminen, jolloin toksisten siltasidosaineiden käyttäminen ei ole tarpeellista.⁴

2.2 Kemiaalliset hydrogeelit

Kemiaallisissa hydrogeeleissä polymeeriverkkoa koossa pitävät vuorovaikutukset ovat kovalenttisiä, jolloin polymeeriverkosta muodostuu pysyvä (Kuva 1).^{4,5} Kemiaallisia hydrogeelejä kutsutaankin irreversiibeileiksi geeleiksi, sillä polymeeriverkon synnyttyä sen rakenteeseen ei enää voida vaikuttaa ulkoisten tekijöiden avulla.^{4,7} Kovalenttisen sidoksen luonteen takia kemiaalliset hydrogeelit ovat paljon vahvempia ja kestävät mekaanisesti paremmin kuin fysikaaliset hydrogeelit. Kemiaallisissa hydrogeeleissä ongelman muodostavat mahdolliset toksiset sidosaineet (crosslinkers).⁷

Hydrogeelin monomeerit sisältävät useita funktionaalisia ryhmiä kuten $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NH}_2$ ja $-\text{OH}$, joiden avulla polymeeriverkko voidaan rakentaa esimerkiksi amidisidoksen muodostuksella, Schiffin emäsreaktiolla tai radikaalipolymerisaation avulla

sopivan sidosmolekyylin (crosslinker) läsnäollessa.⁷ Hydrogeelejä on mahdollista valmistaa myös korkeaenergisien säteilyn, kuten gammasäteiden tai elektronisuihkun avulla. Tällöin esimerkiksi vinyyliryhmän sisältäviä vesiliukoisia polymeerejä voidaan muuttaa veteen liukenemattomiksi hydrogeeleiksi ilman, että reaktiossa täytyy käyttää muita reagensseja.⁷

Siltasidoksien muodostuttua kemialliset hydrogeelit saavuttavat turpoamisen tasapainotilan. Tällöin vesi sitoutuu muodostuneeseen polymeeriverkkoon. Vesi sitoutuu parhaiten kohtiin, joissa on pieni ristisilloitustiheys (crosslink density) ja heikoiten niihin kohtiin, joissa sidostiheys on suurin muodostaen klustereita. Tästä johtuen kemiallisetkaan hydrogeelit eivät ole homogeenisiä.⁵

2.3 Vesi hydrogeeleissä

Hydrogeelit kykenevät sitomaan itseensä 20–100-kertaisen määrän vettä kuivapainoonsa nähden riippuen polymeeriverkon rakenteesta. Superabsorbanteiksi geeleiksi kutsutaan hydrogeelejä, joihin sitoutuu vettä enemmän kuin 99,5% oman kuivapainonsa verran. Hydrogeelien vesimäärän kasvaessa niiden yhteensopivuus bio-organismeihin, kuten ihmisen kudoksiin kasvaa,⁷ sillä kudokset lukuunottamatta rasvakudosta sisältävät painostaan suurimman osan vettä. Hydrofobisten ryhmien ja siltasidosten määrän kasvaessa hydrogeeli sitoo vähemmän vettä ja jää rakenteellisesti hauraaksi. Hydrofiilisten ryhmien määrän kasvaessa sitoutuneen veden määrä kasvaa, minkä seurauksena geelistä tulee elastista.⁷

Polymeeriverkon hydrofiiliset ryhmät ovat ensisijaisesti vastuussa veden sitomisesta. Vesi sitoutuu ensin hydrofiilisimpään kohtaan koko polymeeriverkossa. Tätä kutsutaan primäärisesti sitoutuneeksi vedeksi (primary bound water).⁵ Hydrofiilisten ryhmien hydratoituessa polymeeriverkko turpoo jolloin polymeerin hydrofobiset ryhmät niin sanotusti avautuvat ja vuorovaikuttavat vesimolekyylin kanssa hydrofobisen efektin kautta. Tällöin hydrofobiset ryhmät pyrkivät minimoimaan vuorovaikutuksensa vesimolekyylin kanssa, mikä johtaa vuorostaan vesimolekyylin entropian muutokseen kyseessä olevien ryhmien ympärillä. Hydrofobinen efekti saa aikaan vesimolekyylin häkkimäisen rakenteen

hydrofobisten ryhmien ympärille.⁸ Tämä johtaa veden sitoutumiseen polymeeriverkon hydrofobisten ryhmien kanssa eli sekundääriseen sitoutumiseen (secondary bound water).⁵

Kun kaikki vesi on sitoutunut hydrogeelin polymeeriverkkon hydrofiilisiin ja hydrofobisiin osiin, sitoutunutta vesimäärää kutsutaan kokonaisvesimääräksi (total bound water). Tämän jälkeen hydrogeelit imevät itseensä lisää vettä polymeeriverkon osmoottisen pakotevoiman takia (osmotic driving force), joka pyrkii laimentamaan hydrogeelit äärettömyyteen. Fysikaaliset ja kemialliset sidokset, jotka pitävät polymeeriverkkoa kasassa estävät rakennetta hajoamasta. Tämän seurauksena turpoaminen saavuttaa tasapainon. Vettä, joka sitoutuu geeliin osmoottisen pakotevoiman takia, kutsutaan vapaaksi vedeksi, sillä se ei ole sitoutunut polymeeriverkkoon, vaan täyttää tyhjän tilan polymeeriverkkojen välissä.⁵

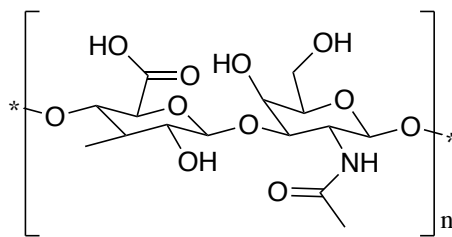
3 HYDROGEEELITYYPIT

3.1 Luonnolliset hydrogeelit

Luonnollisilla hydrogeeleillä tarkoitetaan hydrogeelejä, joiden polymeeriverkon rakentavat poly- tai monomeerit löytyvät luonnosta, kuten hyaluronihappo, gelatiini ja kollageeni. Synteettisillä hydrogeeleillä taas tarkoitetaan hydrogeelejä, joiden polymeeriverkon rakentavat poly- tai monomeerit ovat synteettisesti valmistettuja, eikä niitä löydy siis luontaisesti organismeista. Synteettiset ja luonnolliset hydrogeelit ovat ominaisuuksiltaan toisistaan poikkeavia, mikä mahdollistaa valmistettujen hydrogeelien ominaisuuksien valitsemisen käyttötarkoituksen mukaan.

3.1.1 Hyaluronihappo

Hydrogeelejä esiintyy luonnollisesti ihmisten kudoksissa solun ulkoisessa väliaineessa (ECM). Hyaluronihappo (HA; Kuva 2) ja kollageeni ovat esimerkkejä luontaisesti esiintyvistä hydrogeeleistä.⁹ Luontaisesti esiintyvien hydrogeelien kohdalla toksisten sidosaineiden käyttäminen ei ole tarpeellista.



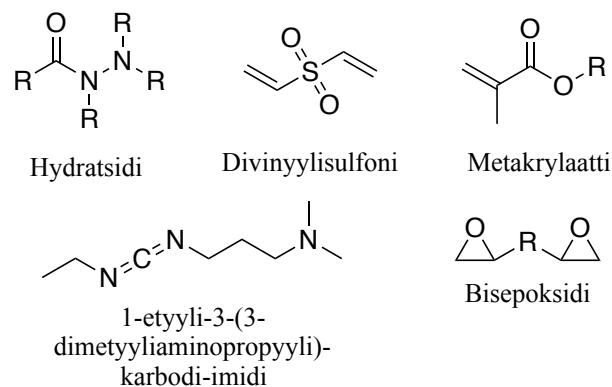
Kuva 2. Hyaluronihapon toistoyksikön rakenne.

Fysiologisessa ympäristössä hyaluronihappo kykenee absorboimaan suuria määriä vettä ja laajentumaan 1000 kertaiseksi, luoden löyhän hydratoituneen verkkorakenteen, hydrogeelin. Hyaluronihappo esiintyy hyaluronaanina pehmeissä sidekudoksissa, kuten napanuorassa, ihossa, ja osmoottisena puskurina sekä liukasteena ECM:ssä.⁹ HA-hydrogeeli tukee soluja ulkoisesti ja rajoittaa patogeenien sekä plasman proteiinien liikettä kudoksessa.¹⁰ HA:lla on

suuri vaikutus haavojen paranemiseen johtuen sen kyvystä tuoda vaurioituneeseen kudokseen ravinteita sekä stimuloida paranemisen tulehdussignaalointia.¹⁰ Hyaluronihappo onkin potentiaalinen materiaali regeneratiiviseen lääketieteeseen johtuen muun muassa sen bioyhteensopivuudesta, biohajoavuudesta, epä-immunogeneettisyydestä¹⁰ ja osallistumisesta haavojen parantamiseen.¹¹

Hyaluronihaposta voidaan räätälöimällä valmistaa HA-pohjaisia hydrogeelejä kemiallisesti siten, että sen biologiset ominaisuudet säilyvät.^{9,10} Hyaluronidaasi¹⁰ ja hyaasi⁹ hajoittavat HA-verkkoa elimistössä muutaman tunnin tai muutaman päivän kuluessa riippuen kudoksesta ja kudostyypistä.¹⁰ Entsymaattista hajoamista voidaan hidastaa kemiallisten siltasidosten avulla. Samalla vapautuvien lääkeaineiden vapautuminen hidastuu.⁹ Silloittuminen on mahdollista toteuttaa joko karboksyyli- tai hydroksyyli-ryhmän kautta ja näin HA:sta voidaan räätälöidä eri sovelluksiin kelpaavia johdannaisia.⁹

Siltasidosten muodostaminen voidaan tehdä happamissa tai emäksisissä olosuhteissa riippuen siitä, mitä sidosmolekyyliä (crosslinker) tai menetelmää käytetään. Hydrogeelejä muodostaessa sidosaineina voidaan käyttää metakrylaatti-ryhmää, heterobifunktionaalisia sidosaineita, kuten 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbodi-imidihydrokloridi ja multifunktionaaliset hydratsidit, sekä homobifunktionaalisia sidosaineita kuten divinyyli-sulfoni-johdannaiset ja bisepoksidi (Kuva 3).⁹⁻¹¹ Kovalenttisten sidosten muodostaminen HA-molekyylien välille vaatii toksisia reagensseja ja olosuhteita, jotka eivät ole sopivia soluille.

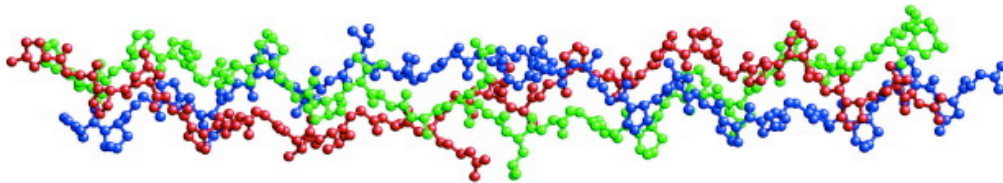


Kuva 3. Hyaluronihappohydrogeelin sidosaineita.

3.1.2 Tyypin I kollageeni

Kollageenit ovat amfoteerisia proteiineja, joita esiintyy ihmisen pehmeissä ja jäykissä kudoksissa, kuten verisuonten seinämissä, jätteissä, luissa sekä ECM:ssä.^{11,12} Kollageenin osuus on suuri, noin 80% verinahan kuivamassasta, minkä takia sitä käytetään paljon kudosterapiassa (tissue engineering).¹² Ihmisestä on tunnistettu kaikkiaan 28 eri kollageeniä, mutta tutkimus on keskittynyt lähinnä tyypin I kollageenin hydrogeeleihin ja niiden sovelluksiin.¹²⁻¹⁴

Syttoplasmassa tyypin I kollageeni esiintyy liukoisena prokollageenina, joka rakentuu kolmesta toisiinsa kiertyneestä α -heliksistä (Kuva 4), muodostaen triplaheliksien. Rakennetta stabiloivat proteiiniketjun sisäiset vetysidokset sekä $n \rightarrow \pi^*$ -vuorovaikutukset.¹³ $n \rightarrow \pi^*$ -vuorovaikutus on seurausta nukleofiilin vapaan elektroniparin (n) ja tyhjän π^* -orbitaalin (läheinen karbonyyliryhmä) elektronitiheyden jakaantumisesta nukleofiilin ja karbonyyliryhmän kesken. Orbitaalien sekoittumisen (overlap) seurauksena on puoleensavetävä vuorovaikutus nukleofiilin ja karbonyyliryhmän välillä.¹⁵



Kuva 4. α -kierteiden kietoutuminen kollageenissa.¹⁶

Reprinted from *Advances in Protein Chemistry*, Vol 70, Barbara Brodsky & Anton V. Persikov, *Molecular Structure of the Collagen Triple Helix*, 301–339, 2005, ©2005, with permission from Elsevier.

Tropokollageeni muodostuu kun prokollageenin C- ja N-terminaalien peptidit irrotetaan entsyymaattisesti. Syntyneestä tropokollageenista itsejärjestäytyy (self-assemble) fibrillogeneesin avulla proto- ja mikrofibrilejä, jotka toimivat rakenneosina kollageenifibrilleille.^{13,15} Vierekkäiset profibrillit sitoutuvat kovalenttisesti toisiinsa

proteiinilyysiini-6-oksidaasin (lysyl oxidase, LOX) avulla muodostaen verkkomaisen rakenteen.¹⁵

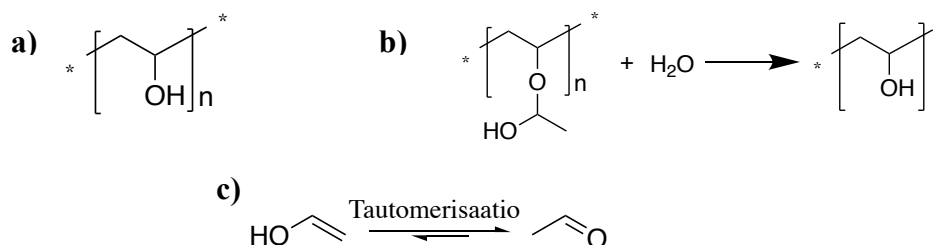
Kollageenista on mahdollista valmistaa fysikaalisia hydrogeelejä UV- ja gammasäteilyn avulla sekä lämpökäsittelyllä. Kollageenisäikeiden välille voidaan muodostaa kovalenttisia tai ionisia sidoksia, käyttämällä esimerkiksi aldehydejä, di-isosyanaatteja tai polyepoksiedeja. Fysikaalisen hydrogeelin valmistamisesta seuraa kuitenkin osittainen kollageenin denaturaatio. Käytetyt sidosaineet ovat usein sytotoksisia, ja näin ollen rajoittavat kemiallisten hydrogeelien käyttöä.¹²

3.2 Synteettiset hydrogeelit

3.2.1 Poly(vinyylialkoholi) eli PVA

Poly(vinyylialkoholi) (PVA; Kuva 5a) on synteettinen polymeeri, jonka toistoyksikkö sisältää yhden hydroksyyliyhdyksen. PVA on biohajoava ja hyvin bioyhteensopiva yhdiste, joka sopii hyvin kudosterapiaan. PVA valmistetaan radikaalipolymerisaation avulla vinyyliasetaatista alkoholiliuoksessa tai osittaisen hydrolyysin avulla polyvinyyliasetaatista (PVAc; kuva 5b).^{2,17} PVA:n valmistaminen suoraan monomeerisesta vinyylialkoholista on hankalaa, sillä vinyylialkoholi on epästabiili yhdiste ja muuttuu tautomerisaatiolla asetaldehidiksi (kuva 5c).

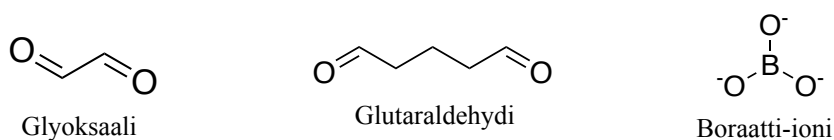
17



Kuva 5. a) PVA:n toistoyksikkö b) Polyvinyliasetaatian hydrolyysi polyvinyylialkoholiksi c) Vinyylialkoholin tautomerisaatio.

PVA:n ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen ja kemiallisiin ominaisuuksiin, voidaan vaikuttaa sillä, kuinka suuri osa PVAc:sta hydrolysoidaan PVA:ksi. Eri suhteilla (PVAc/PVA) voidaan vaikuttaa syntyneen geelin vesiliukoisuuteen ja siihen, kuinka monta sitoutumisen mahdollistavaa hydroksyyliiryhmää biomolekyyleille jää geeliin.^{9,17}

PVA:sta on mahdollista valmistaa hydrogeelejä joko fysikaalisesten tai kemiallisten siltasidosten avulla. Fysikaaliset siltasidokset saavutetaan vuorottaisilla jäädytys- ja sulattamissykleillä. Näin polymeeriketjun hydroksyyliiryhmät muodostavat vahvoja vetysidoksia keskenään, minkä seurauksena PVA:han syntyy kiteytyviä (crystallites), joiden avulla polymeeriverkko muodostuu. Kemialliset siltasidokset muodostuvat kovalenttisesti hydroksyyliiryhmien välille sidosaineiden, kuten boraattien, glyoksaalien ja glutaraldehydin avulla (Kuva 6).¹⁷ Kemiallisesti valmistettujen PVA-hydrogeelien ongelmana on sidosaineiden toksisuus eläville soluille, minkä takia niiden käyttö elävien kudosten kanssa on erittäin haasteellista.^{2,17}



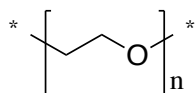
Kuva 6. PVA-hydrogeelissä käytettyjen kemiallisten sidosaineiden rakenteita.

Erilaisia PVA-hybridigeelejä on mahdollista valmistaa muiden synteettisten polymeerien, (esimerkiksi poly(akryylihappo), poly(dimetyylisiloksaani) ja polyuretaani) tai luonnollisten hydrogeelien (esimerkiksi tärkkelys, kitosaani, selluloosa ja gelatiini) kanssa. Tällä tavoin voidaan vaikuttaa syntyvän geelin ominaisuuksiin, minkä tarjoaa mahdollisuuden räätälöidä sovelluksissa käytettäviä geelejä sopimaan paremmin tarkoitukseensa.¹⁷

3.2.2 Poly(etyleeniglykoli) eli PEG

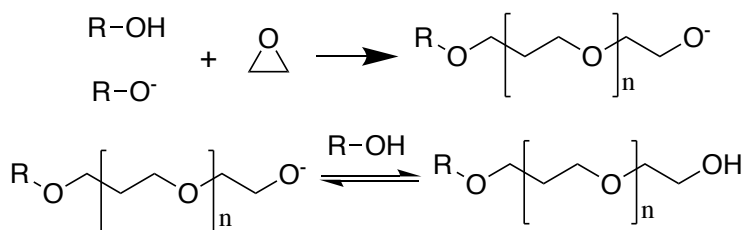
Polyetyleeniglykoli (PEG; Kuva 7) on hyvin bioyhteensopiva, hydrofiilinen, antigeenisyyttä, immunogeenisyyttä, proteiinien sitoutumista ja soluadheesiota rajoittava, synteettinen

vesiliukoinen polymeeri.^{2,9,19} PVA:han verrattaessa PEG:ssä ei ole vetysidoksen luovuttavaa ryhmää, joka vähentää proteiinien sitoutumista, mikä tekee PEG:stä hyvän materiaalin biomateriaalien päällystämiseen, sillä proteiinien sitoutuminen rakenteeseen on vähäisempää.⁹



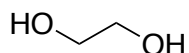
Kuva 7. Polyetyleeniglykolin toistoyksikkö.

PEG:n valmistaminen tapahtuu etyylioksidin oksianionisella (oxyanionic) polymerisaatiolla, joka perustuu reaktion nukleofiiliseen aloittajaan (initiator). Tällöin aproottiseen polaariseen liuottimeen (DMSO, THF, dioksaani, heksametyylifosfoamidi) lisätään vettä tai alkoholia, joka toimii reaktion aloittajana, sekä emästä, joka katalysoi reaktiota.¹⁹ (Kuva 7)



Kuva 8. Polyetyleeniglykolin valmistus etyleenioksidista.

Polyetyleeniglykoli ja polyetyleenioksidi/polyoksyetyleeni (PEO/POE) ovat toistoyksikön rakenteeltaan identtisiä. Yleisesti puhuttaessa PEG viittaa pienempiin ja PEO viittaa suurempiin polymeeriketjuihin. Selkeää rajaa polymeeriketjun koolle ei ole, minkä jälkeen PEG:n katsottaisiin muuttuneen PEO:ksi. PEG ja PEO eroavat kuitenkin kemiallisilta ominaisuuksiltaan. PEO:n kemialliset ominaisuudet muistuttavat enemmän polyetterien kemiallisia ominaisuuksia, kun taas PEG:n kemialliset ominaisuudet ovat huomattavasti lähempänä glykolin (Kuva 9) ominaisuuksia.^{2,9,18,19}



Kuva 9. Etyleeniglykolin (etaani-1,2-idioni) rakenne.

4 REGENERATIIVISUUS JA SOVELLUKSET

4.1 Regeneratiivisuus

Regeneratiivisuus tarkoittaa uudelleen kasvua ja regeneraatiokyvyllä tarkoitetaan organismin kykyä kasvattaa uudelleen kudoksiaan. Tiettyjen kudonvaurioiden, kuten haavojen tai luunmurtumien paraneminen ja maksan uudelleen kasvaminen, ovat ihmisen regeneratiivisia piirteitä. Meiltä puuttuu kuitenkin kyky kasvattaa takasin poistettuja raajoja tai sisäelimiä (munuaiset, perna), johon osa eliöistä (esimerkiksi meritähti, merimakkara ja sisilisko) kykenevät. Ihmisen kyky regeneraatiolle ja kudosten uusiutumiseen vähenee elimistön vanhetessa, minkä takia lapsilla kudonvaurioiden paraneminen on nopeampaa kuin aikuisilla.

Regeneratiivinen lääketiede on lääketieteen ala, joka yhdistää useita tieteenaloja laajaksi kokonaisuudeksi. Tavoitteena on korvata ja korjata elimistön kudoksia ja rakenteita joko erilaisin bioyhteensopivien materiaalein tai kasvattamalla korvaavia kudoksia sekä näiden molempien kombinaatiolla. Tavoitteena on myös nopeuttaa luontaisia paranemisprosesseja ja vähentää komplikaatioiden riskiä.^{6,20,21} Terapeuttiset lääkkeaineet, 17 β -estradioli ja rekombinaatiotransformaatiokasvutekijä β 3 (recombinant transforming growth factor β 3), estävät arpikudoksen muodostuminen ihon uusiutuessa. Tällaiset lääkkeaineet eroavat esimerkiksi antibiooteista, jotka ovat palauttavia eivätkä terapeuttisia lääkkeitä.⁶ Tiedetyt hoitotoimenpiteet kuten luuydinsiirteet, ovat esimerkkejä regeneratiivisista hoitomuodoista.

Regeneratiivinen farmakologia pyrkii muokkamaan solujen, kudosten ja elinten fysiologisia prosesseja nopeuttaakseen, parantaakseen tai muuttaakseen niiden toimintaa. Selkein ero perinteisen ja regeneratiivisen farmakologian välillä on se että perinteinen farmakologia keskittyy hoitamaan oireita, kun taas regeneratiivinen farmakologia tavoittelee rappeumamekanismien (minkä tahansa solun, kudoksen tai elimen vaurioitumista) selvittämistä ja tätä kautta tarjoamaan terapeuttisia hoitokeinoja.²¹

Regeneratiivinen lääketiede ja regeneratiivinen farmakologia ovat tavallaan saman kolikon kääntöpuolet. Ne nojaavat toisiinsa vahvasti, mutta eivät vielä ole täysin sama yksittäinen regeneratiivisen tieteen ala. Regeneratiivinen lääketiede ja regeneratiivinen farmakologia käyttävät samoja menetelmiä, mutta niiden tarkoitukselliset eroavat toisistaan. Jotta regeneratiivinen farmakologia ja regeneratiivinen lääketiede sulautuisivat yhdeksi tieteen alaksi, pitäisi kummankin tieteen niin kutsuttuja aktiivisia ja passiivisia menetelmiä keskittää yhdeksi kokonaisuudeksi. Aktiivisilla prosesseilla tarkoitetaan kasvutekijöiden ja muiden farmakologisten lääkeaineiden käyttöä solujen ja kudosten kasvun, toiminnan ja erilaistumisen ohjaajina. Passiivisilla keinoilla taas tarkoitetaan eri keinoja karakterisoida muunneltuja soluja tai kudoksia regeneratiivisten prosessien ymmärtämiseksi. Kudosterapia (tissue engineering) lääkeaineiden kuljetus (drug delivery) ja solujen kapselointi (cell encapsulation) ovat regeneratiivisen lääketieteen sovelluksia, jotka nojaavat regeneratiivisen farmakologian aktiivisiin ja passiivisiin prosesseihin.²¹

4.2 Kudosterapia (Tissue Engineering)

Kudosterapian tarkoituksena on luoda keinotekoisia rakenteita, jotka imitoivat kudoksia niin, että niillä voidaan korjata olemassa olevia biologisia rakenteita. Keinotekoisien kudosten rakenteet muistuttavat ECM:ää ja tarjoavat mahdollisuuden soluadheesiolle, solumigraatiolle ja solujen proliferaatiolle.^{20,22} Hydrogeelien avulla on mahdollista valmistaa kuljettimia bioaktiivisille aineille tai tukirakenteita, jotka auttavat kudosten uusiutumisessa. Synteettiset hydrogeelit, kuten PEG ja PVA, sekä luonnolliset hydrogeelit, kuten kollageeni ja HA, tarjoavat vaihtoehtoja kudosterapian tarpeisiin.²²

Hydrogeeleistä on mahdollista valmistaa huokoisia tukirakenteita (scaffolds), joiden huokosiin on mahdollista sisällyttää kasvutekijöitä tai kudoksiksi erilaistuvia soluja. Vaihtoehtoisesti huokokset voivat olla niin isoja, että kudoksessa olevien solujen on mahdollista tunkeutua niihin ja lisääntyä niissä.²⁰ Arginiini-glysiini-asparagiinihappo (RGD) -aminohapposekvenssin on todettu mahdollistavan eri kudostyyppien solujen, kuten endoteelisolujen, osteoblastien ja sileiden lihassolujen, sitoutumisen sekvenssiin. Tästä

johtuen käytettyyn hydrogeeliin voidaan integroida RGD-sekvenssejä joko hydrogeelin pinnalle tai itse polymeerirakenteeseen, jolloin soluadheesion määrää saadaan kasvatettua.⁹

Keinotekoisia kudoksia suunniteltaessa, on otettava huomioon se että hydrogeelien on oltava melkein tai täysin bioyhteensopivia, jotta käytetyt geelit eivät aiheuta hylkimisreaktiota. Hylkimisreaktio on immunologinen reaktio, joka johtuu kohdehenkilön elimistöön yhteensopimattomasta kudoksesta. Tällöin imusolut ryhtyvät tuhoamaan vierasta kudosta tai rakennetta. Koska hydrogeelit ovat jatkuvasti kosketuksessa kudokseen, ne eivät saa aiheuttaa tuhoa kudokseen. Kemiallisissa hydrogeeleissä käytettävät sidosaineet (crosslinkers), polymeerireaktion aloittajat, orgaaniset liuottimet ja reagoimattomat monomeerit saattavat olla sytotoksisia ja näin vähentävät bioyhteensopivuutta. Myrkyllisiä aineita voidaan poistaa erilaisten puhdistusmenetelmien avulla, sekä kehittämällä olemassa oleville synteeseille vaihtoehtoisia synteeseireittejä.^{4,9}

Hydrogeeleillä on keskenään erilaisia kemiallisia ja mekaanisia ominaisuuksia, johtuen niiden rakenneosien erilaisista ominaisuuksista. PVA-hydrogeelien on todettu olevan mekaanisesti kestävämpiä kuin useimpien muiden hydrogeelien ja tämän vuoksi sopivan hyvin rustokudosten ja jänteiden korvaavaksi materiaaliksi.^{9,12} Polyakryyliamidilla voidaan ohjata mesenkymaalisten stroomasolujen (mesenchymal stromal cells) erikoistumista eri kudoksiksi.²¹ Kollageeni-hydrogeeleistä on mahdollista valmistaa suonitettuja kasvualustoja myoblasteille, jonka jälkeen valmistetut geelit voidaan siirtää vaurioituneeseen lihakseen.¹² Tämän kaltaisen hydrogeelien on todettu edistävän verisuonten kasvua sekä myoblastien erilaistumista lihassyksi (myotube).¹²

4.3 Lääkkeiden kuljetus (Drug Delivery)

Hydrogeelien rakenteesta johtuen, niihin voidaan ladata biologista materiaalia, bioaktiivisia aineita, lääkkeitä ja soluja. Hydrogeelien fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia on muunneltu niin että ne olisivat mahdollisimman optimaalisia kontrolloidulle lääkeaineiden vapautumiselle. Ladattujen aineiden vapautuminen tapahtuu diffuusion ja hydrogeelin hajoamisen avulla ja vapautumisen aloittajina toimivat ulkoiset muutokset esimerkiksi pH ja

lämpötila. Veren glukoosipitoisuuteen reagoiville ”älykkäille” geeleille povataan käyttöä diabeteksen hoitamisessa. Tämän kaltaisten geelien rakenteeseen on sisällytetty glukoosioksidaasia, joka hajottaa hydrogeelin verkkorakenteen ja vapauttaa sen sisällä olevan insuliinin.^{20,22}

Perinteisen annostelun ongelmana on suuri annoskoon tarve ja annosteluvälin tiheys terapeuttilaisen vaikutuksen saavuttamiseksi. Suuren annostuksen takia sivuvaikutusten ja lääkeaineen toksisuus ovat todennäköisiä.⁹ Hydrogeelien hydrofiilisen luonteen takia hydrofiiliset lääkeaineet ovat luonnostaan yhteensopivia näiden kanssa. Ristisilloitustiheyttä, polymeeriketjun hajoamista ja sitoutuneen veden määrää (degree of swelling) muuttamalla, voidaan vaikuttaa lääkeaineiden vapautumisen reaktiokinetiikkaan ja näin säätää vapautuminen sopimaan oikeaa annostusta.⁷

5 YHTEENVETO

Hydrogeelit ovat monipuolisia yhdisteitä, joille on kehitetty useita käyttökohteita esimerkiksi elintarviketeollisuudessa ja lääketieteessä. Viimeisen 50 vuoden aikana. Fysikaalisten ja kemiallisten hydrogeelien käyttökohteet vaihtelevat vähäisesti, vaikka niiden ominaisuudet eroavat toisistaan paikoittain suuresti. Eri hydrogeelityypit tarjoavat mahdollisuuden ongelman lähestymiseen eri näkökulmista ja tarjotavat useampia ratkaisumahdollisuuksia.

Kemiallisilla tai fysikaalisilla hydrogeeleillä voidaan regeneratiivisessa lääketieteessä edesauttaa kudosten paranemista niiden vaurioituttua tai tarjota vaihtoehtoisia tukirakenteita tai bioyhteensopivia kasvualustoja erilaistuville soluille. Suurimpana haasteena on luoda sellaisia rakenteita, jotka ovat tarpeeksi pitkäikäisiä kudosten uusiutumisen mahdollistamiseksi, mutta ovat biohajoavia siinä vaiheessa kun niitä ei enää tarvita. Pysyvien hydrogeelien ongelmana on niiden valmistamisessa käytettävät toksiset sidosaineet, joita ilman pysyvien geelien saavuttaminen on hankalaa.

Hybridihydrogeeleillä on mahdollista saavuttaa hydrogeelejä, joiden ominaisuudet (esimerkiksi bioyhteensopivuus ja biohajoaminen), eroavat kummankin komponentin ominaisuuksista. Tällä tavoin voidaan pyrkiä muovaamaan jo olemassa olevia hydrogeelejä paremmin sopiviksi haluttuihin lääketieteellisiin sovelluksiin tai vaihtoehtoisesti luoda täysin uusia geelejä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Ahmed, E. M., Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review, *J. Adv. Res*, **2015**, *6*, 105 – 121.
2. Buwalda, S. J.; Boere, K. W. M.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Vermonden, T. ja Hennik, W. E., Hydrogels in a historical perspective: from simple network to smart materials, *J. Control. Release.*, **2014**, *190*, 254 – 273.
3. Maitra, J. ja Shukla, V. K., Cross-linking in hydrogels - a review, *Am. J. Pol. Sci.*, **2014**, *4*, 25 – 31.
4. Bashir, S.; Hina, M.; Iqbal, J.; Rajpar A. H.; Mujtaba, M. A.; Alghamdi, N. A.; Wageh, S.; Ramesh, K. ja Ramesh, S., Fundamental concept of hydrogels: synthesis, properties, and their applications, *Polymers*, **2020**, *12*, 2702.
5. Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug, Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 18 – 23.
6. Mason, C. ja Dunnill, P. A., A brief definition of regenerative medicine, *Regen. Med.*, **2008**, *3*, 1–5.
7. Budama-Klinic, Y.; Cakir-Koc, B. A.; Özkan, B.; Mutlu, H. ja Üstün, E., Hydrogels in regenerative medicine, Teoksessa: Dobrzanki, L. A., (toim.); *Biomaterials in Regenerative Medicine*, InTech, Rijeka, Croatia, **2018**.
8. Cho, E.C.; Lee, J. ja Cho, K., Role of bound water and hydrophobic interactions in phase transition of poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution, *Macromolecules*, **2003**, 9929 – 9934.
9. Slaughter, B. V.; Khurshid, S.S.; Fisher O. Z.; Khademhosseini A. ja Peppas, N. A., Hydrogels in regenerative medicine, *Adv Mater.*, **2009**, *21*, 3307 – 3329.
10. Xu, X.; Jha, A.K.; Harrington, D.A.; Farach-Carson, M.C. ja Jia, X., Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter.*, **2012**, *8*, 3280 – 3294.
11. Li, L.; Yu, F.; Zheng, L.; Wang, R.; Yan, W.; Wang, Z. ja Jiang, Q., Natural hydrogels for cartilage regeneration: modification, preparation and application. *J. Orthop. Translat.*, **2019**, *17*, 26 – 41.
12. Dinescu, S.; Kaya, A.M.; Chitoiu, L.; Ignat, S.; Kaya, D. A.; ja Costache, M., Collagen-based hydrogels and their applications for tissue engineering and regenerative medicine.

- Teoksessa: Mondal., I.H.; *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, 1. painos, Springer International Publishing AG, **2019**, 1643 – 1664.
13. Coradin, T.; Wang, K.; Law, T. ja Trichet, L., Type I Collagen -fibrin mixed hydrogels: preparation, properties and biomedical applications, *Gels*, **2020**, *6*.
 14. Zhu, S.; Yuan, Q.; Yin, T.; You, J.; Gu, Z.; Xiong, S. ja Hu, Y., Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. *J. Mater. Chem.*, **2018**, *6*, 2650 – 2676.
 15. Newberry, R.W. ja Raines, R. T., The $n \rightarrow \pi^*$ Interaction. *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, 1838 – 1846.
 16. Brodsky, B. ja Persikov, A. V., Molecular structure of the collagen triple helix, *Adv. Protein Chem.*, **2005**, *70*, 301–339.
 17. Kumar, A. ja Han, S. S., PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review, *Int. J. Polym. Mater.*, **2017**, *44*, 159 – 182.
 18. Lu, X.; Perera, T. H.; Aria, A. B. ja Smith Callahan, L. A., Polyethylene glycol in spinal cord injury repair; a critical review, *J. Exp. Pharmacol.* **2018**, *10*, 37 – 49.
 19. Herzberger, J.; Niederer, K.; Pohlitz, H.; Seiwert, J.; Worm, M.; Wurm, F.R. ja Frey, H., Polymerization of ethylene oxide, propylene oxide, and other alkylene oxides: synthesis, novel polymer architectures, and bioconjugation, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 2170 – 2243.
 20. Khalid, G.; Gan R.Y.; Sun, C.X.; Jiao, G.; Wu, D.T.; Li, H.B.; Kenaan, A.; Corke, H. ja Fang Y.P., Recent advances in the structure, synthesis, and applications of natural polymeric hydrogels. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **Online 6.1.2021** [<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870034>], 1 – 16.
 21. Christ, G.J.; Saul, J.M.; Furth, M.E.; Andersson K.E., The Pharmacology of Regenerative Medicine, *Pharmacy. Rev.*, **2013**, *65*, 1091 – 1133.
 22. Peppes, N.A.; Hilt, J.Z.; Khademhosseini, A. ja Langer, R., Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology, *Adv. Matter.*, **2006**, *18*, 1345 – 1360.