

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Polymeeriset metallogeelit lääketieteellisissä
sovelluksissa**

Kandidaatintutkielma ja
tutkimusprojekti
08.03.2022
Sarita Orava



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tässä kandidaatintutkielman kirjallisessa osassa käsitellään polymeerisiä metallogeelejä ja niiden lääketieteellisiä sovelluksia. Polymeeristen metallogeelien ominaisuuksista keskitytään tarkemmin antimikrobisuuteen vaikuttaviin tekijöihin sekä niiden antimikrobisiin toimintamekanismeihin. Lisäksi käsitellään bakteerien rakennetta, antibioottiresistenssiä ja biofilmien muodostumista osana vaihtoehtoisten hoitomuotojen kehittämistarvetta. Tutkielmassa perehdytään, kuinka näitä polymeerisiä metallogeelejä ja niiden ominaisuuksia voidaan hyödyntää lääketieteellisissä sovelluksissa. Tutkimusten perusteella polymeerisiä metallogeelejä voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti hyödyntää erilaisissa lääketieteellisissä sovelluksissa niiden useiden lupaavien ominaisuuksien vuoksi.

Kandidaatintutkielman kokeellisessa osassa tutkittiin sappihappojohdannaisten geelinmuodostumisominaisuuksia salisylylaldehydin ja kuparisuolaliuoksen kanssa erilaisissa liuottimissa. Gelatointikokeissa havaittiin systemaattisuutta sappihappojohdannaisten geelinmuodostumisessa eri liuottimissa. Liuottimista parhaiten toimivat MeOH ja DMF liuotin/vesi-suhteen ollessa 50/50. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin geeliytymisen onnistuvan parhaiten ilman salisylylaldehydin läsnäoloa.

Esipuhe

Tämä kandidaatintutkielma ja kokeellinen osa tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella dosentti Elina Sieväsen tutkimusryhmässä. Tutkielma aloitettiin kevään 2021 aikana ja se valmistui maaliskuussa 2022. Kokeellisen osan sappihappojohdannaisten gelatointikoe suoritettiin maaliskuussa 2021. Kirjallisuuslähteiden haussa käytettiin pääasiassa Google Scholar-hakukonetta ja Scopus-tietokantaa. Tutkielman ohjaajana ja tarkastajana toimi dosentti Elina Sievänen. Kokeellisen osan toisena ohjaajana toimi Riikka Kuosmanen.

Haluan kiittää Elina Sievästä ja Riikka Kuosmasta tutkielmani hyvästä ohjauksesta. Lisäksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni saamastani tuesta matkalla luonnontieteiden kandidaatiksi.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo	v
Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat	vii
Kirjallinen osa	1
1 Johdanto	2
2 Geelit	3
2.1 Polymeeriset hydrogeelit	3
2.2 Polymeeriset metallogeelit	5
2.3 Polymeeristen metallogeelien antimikrobisuus ja sytotoksisuus	8
3 Antibiootihoidon haasteet	9
3.1 Gram-positiiviset ja Gram-negatiiviset bakteerit	9
3.2 Antibioottiresistenssi	11
3.3 Biofilmit	12
4 Metallipartikkelit antibioottien korvaajina	14
4.1 Metallipartikkeleiden yleiset antimikrobiset toimintamekanismit	15
4.2 Hopea	18
4.3 Kulta	20
4.4 Muut metallit	22
5 Polymeeristen metallogeelien lääketieteelliset sovellukset	24
5.1 Haavasidokset	25
5.2 Antimikrobiset pinnoitteet	30
5.3 Lääkekuljetus	33
6 Yhteenveto	38
Kokeellinen osa	39
7 Työn tarkoitus	40
8 Materiaalit ja menetelmät	41

9 Työn suoritus	41
10 Työn tulokset	43
11 Johtopäätökset	45
Kirjallisuusluettelo	46
Liitteet	48

Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat

CS	Kitosaani
CMC	Karboksimetyyliselluloosa
M-NP	Metallinanopartikkeli
<i>in situ</i>	Paikassa, asemassa (kem. reaktioseoksessa)
<i>ex situ</i>	Ulkopuolella (kem. reaktioseoksen ulkopuolella)
HAI	Terveydenhoitoon liittyvä infektio (<i>Health care-associated infection</i>)
PGN	Peptidoglykaanikerros
TA	Teikohappo
LTA	Lipoteikohappo
LPS	Lipopolysakkaridi
ROS	Reaktiiviset happilajit (<i>Reactive oxygen species</i>)
AgNP	Hopeananopartikkeli
PAM	Polyakryyliamidi
PVA	Polyvinyylialkoholi
PGA	Polyetyleeniglykoli
AuNP	Kultananopartikkeli
ZnONP	Sinkkioksidinanopartikkeli
CuNP	Kuparinanopartikkeli
CuONP	Kuparioksidinanopartikkeli
FeONP	Rautaoksidinanopartikkeli
<i>in vivo</i>	Elävässä eliössä tehty tutkimus
DFO	Deferoksamiini
<i>in vitro</i>	Elävän eliön tai solun ulkopuolella tehty tutkimus

Kirjallinen osa

1 Johdanto

Geelit ovat meille tuttu käsite arjestamme ja voimme törmätä geeleihin jokapäiväisessä elämässämme esimerkiksi kosmetiikassa. Geelit ovat viskoelastisia materiaaleja, joilla on sekä kiinteiden että nestemäisten aineiden ominaisuuksia. Ne valmistetaan pienestä määrästä kiinteää ainetta (gelaattori) ja suuresta määrästä nestettä (liuotin). Tutkimukset ovat osoittaneet gelaattorimolekyylien muodostavan 3D-verkoston, johon liuotinmolekyylit immobilisoituvat kapillaarivoimien vaikutuksesta, mikä johtaa geelin muodostumiseen. Geelejä voidaan luokitella muun muassa niiden liuottimen luonteen, koossa pitävien sidosten sekä verkoston muodostavien molekyylien perusteella.¹

Antimikrobisia ominaisuuksia sisältävät geelit ovat herättäneet suurta kiinnostusta bakteerien aiheuttamien infektioiden ehkäisyssä ja hoidossa nopeasti kehittyneen antibioottiresistenssin vuoksi.² Antibakteerisen hoidon läpimurto tapahtui vajaa sata vuotta sitten vuonna 1928, jolloin löydettiin ensimmäinen antibiootti, penisilliini. Vaikka antibiootit ovat yksi 1900-luvun suurimmista lääketieteellisistä löydöistä ja ne ovat pelastaneet lukemattomia ihmishenkiä, on niiden laaja-alaisella käytöllä ollut seurauksensa. Antibioottien massiivinen käyttö bakteerinfektioiden hoidossa on johtanut mikrobilääkeresistenssin syntymiseen, eivätkä antibiootit enää ole riittävän tehokkaita tuhoamaan monia vaarallisia taudinaiheuttajia.³ Bakteerien kehittämä resistenssi on kehittynyt lähes kaikille nykyisessä käytössä oleville antibiooteille ja arvion mukaan resistenssi kehittyy keskimäärin 50 vuoden kuluessa antibiootin ensimmäisestä käytöstä.⁴ Biolääketieteen ja lääketieteen edistymisestä huolimatta bakteeri-infektiot ovat yhä suurin kuolinsyy maailmanlaajuisesti, minkä vuoksi uusia, tehokkaampia mikrobilääkkeitä tarvitaan bakteerien aiheuttamien tautien hoitoon.³

Metallipartikkeleilla ladatut polymeeriset hydrogeelit, eli metallogeelit, voivat olla ratkaisu uudenlaisiksi mikrobilääkkeiksi.^{1,5} Metalleja on käytetty antimikrobisina aineina antiikin ajoista lähtien ja vaikka niiden antimikrobisten toimintamekanismien tutkimus on osittain yhä kesken, ne ovat herättäneet laajaa kiinnostusta erilaisissa lääketieteellisissä sovelluksissa.^{6,7} Metallogeeleeissä yhdistyvät metallien antimikrobiset ominaisuudet ja hydrogeelimatriisin bioyhteensopivuus sekä mekaanisten ominaisuuksien muokattavuus. Antimikrobisia metallogeelejä on käytetty useissa lääketieteellisissä sovelluksissa, kuten haavasidoksissa, implanttien pinnoitteena sekä lääkekuljetuksessa.⁵

2 Geelit

Geelejä voidaan valmistaa erilaisista materiaaleista riippuen käyttötarkoituksesta ja halutuista ominaisuuksista. Geelejä luokitellaan esimerkiksi niitä koossa pitävien sidosten sekä käytetyn liuottimen perusteella. Mikäli geeliverkosto muodostuu kovalenttisilla sidoksilla, on kyseessä kemiallinen geeli, jota kutsutaan myös polymeerigeeliksi. Jos geeliverkosto on muodostunut ei-kovalenttisilla supramolekulaarisilla vuorovaikutuksilla, kuten Van der Waalsin vuorovaikutuksilla, vetysidoksilla, π - π -pinoutumisella tai halogeenisidoksilla, kyseessä on fysikaalinen, eli niin kutsuttu supramolekulaarinen geeli. Geelin liuottimesta riippuen geelit voidaan jakaa esimerkiksi hydrogeeleihin (vesi tai vesipitoinen liuotin) tai organogeeleihin (orgaaninen liuotin). Metallogeelit puolestaan ovat geelejä, joissa metalli on osa geeliverkostoa.¹

Tässä tutkielmassa keskitytään erityisesti hydrogeelipohjaisiin polymeerisiin metallogeeleihin ja niiden antimikrobisiin ominaisuuksiin sekä käyttökohteisiin lääketieteellisissä sovelluksissa. Biologisten nesteiden koostumus huomioiden biolääketieteellisten sovellusten geeleissä liuottimena käytetään vettä tai vesipitoista liuotinta.

2.1 Polymeeriset hydrogeelit

Polymeeriset hydrogeelit ovat kolmiulotteisia hydrofiilisiä polymeeriverkkoja eli -matriiseja, joilla on kyky imeä suuria määriä vettä sekä muita biologisia nesteitä.⁸ Hydrogeeli voidaan määritellä muun muassa siten, että se on vedessä turvonnut ja silloitettu (cross-linked) polymeeriverkko, joka on tuotettu yhden tai useamman monomeerin yksinkertaisella reaktiolla. Toisen määritelmän mukaan hydrogeeli on polymeerimateriaali, jolla on kyky turvota ja pitää sisällään merkittävä osa vedestä liukenematta itse veteen.⁹ Hydrogeelit voivat geeliytyä jonkin ärsyksen, kuten lämpötilan, ionivahvuuden, pH:n tai ultravioletti säteilyn seurauksena.⁷ Vaikka hydrogeeli-termiä käytettiin jo vuonna 1894, ensimmäinen biologinen käyttö raportoitui vasta 1960.²

Hydrogeelit voidaan luokitella monen eri kategorian mukaan. Niiden valmistusmateriaalin perusteella ne voidaan luokitella luonnollisiin, synteettisiin tai hybridihydrogeeleihin. Polymeerien silloitusrakenne puolestaan määrittelee niiden fysikaalisen tai kemiallisen

luonteen ja polymeerikoostumus kertoo, ovatko ne homo-, ko- vai multipolymeerisiä. Fysikaalisen rakenteen perusteella ne puolestaan jaetaan puolikiteisiksi tai amorfisiksi ja sähkövarausten perusteella ionisiksi tai neutraaleiksi. Nämä hydrogeelien luokitteluominaisuudet vaikuttavat niiden soveltuvuuteen erilaisissa käyttökohteissa.⁸

Luonnolliset hydrogeelit valmistetaan luonnollista polymeereistä, kuten algiinatista, gelatiinista, kollageenista, kitiinistä, kitosaanista (CS) ja karboksimeetyyliselluloosasta (CMC).^{7,8} Luonnollisten polymeerien käyttö hydrogeeleissä on biolääketieteen kannalta hyödyllistä, sillä ne ovat biologisesti yhteensopivia, biohajoavia ja myrkyttömiä. Synteettiset hydrogeelit puolestaan valmistetaan käyttämällä synteettisiä polymeerejä, kuten polyamideja ja polyeteeniglykolia. Synteettiset polymeerit ovat hydrofobisia ja niiden polymeerimatriisissa olevat vahvat kovalenttiset sidokset parantavat niiden mekaanista lujuutta, käyttöikä ja imukykyä. Synteettisillä ja hybridisoiduilla hydrogeeleillä on luonnollisia hydrogeelejä pidempi käyttöikä, lujuus ja veden imeytymiskyky.⁸

Polymeerisiä hydrogeelejä voidaan valmistaa useilla klassisilla kemiallisilla yksi- tai monivaiheisilla menetelmillä. Hydrogeeli on polymeerin alkuperästä huolimatta polymeeriverkko, joka on elastisen rakenteen aikaansaamiseksi silloitettu. Tämän vuoksi mitä tahansa tekniikkaa, jota voidaan käyttää silloitetun polymeerin luomiseen, voidaan käyttää myös hydrogeelin valmistamiseen. Hydrogeelien valmistuksessa käytettyjä yksivaiheisia menetelmiä ovat esimerkiksi polymerointi ja monifunktionaalisten monomeerien rinnakkaissilloittaminen. Monivaiheisia menetelmiä ovat esimerkiksi polymeerimolekyylien synteesi ja niiden myöhempi silloittaminen. Yleisesti polymeeriset hydrogeelit valmistetaan hydrofiilisistä monomeereistä, mutta myös hydrofobisia monomeerejä käytetään säätämään hydrogeelien ominaisuuksia tiettyjä sovelluksia varten.⁹

Hydrogeelien hydrofiiliset ominaisuudet johtuvat polymeerikomponenteista löytyvistä erityisistä hydrofiilisistä ryhmistä, kuten -OH, -CONH, -CONH₂ ja -SO₃H, mitkä selittävät niiden absorptiopotentiaalin. Hydrogeelien turvotessa ja venyessä niistä tulee pehmeitä ja kumimaisia, minkä lisäksi niillä on alhainen pintajännitys veden ja muiden biologisten nesteiden kanssa.⁸ Tämän lisäksi hydrogeelien suuren vesipitoisuuden vuoksi niiden joustavuus on hyvin samanlainen kuin luonnollisella kudoksella.⁹ Hydrogeelien turpoaminen vesipitoisessa ympäristössä liukenemisen sijaan johtuu niiden rakenteissa olevista fysikaalisista ja kemiallisista silloituksista.⁸ Hydrogeelit voidaan suunnitella siten, että ne kutistuvat tai laajenevat ulkoisten fysikaalisten tai kemiallisten ympäristöolosuhteiden muutosten myötä. Ympäristössä tapahtuvia fysikaalisia ärsykeitä ovat esimerkiksi lämpötila, sähkö- tai

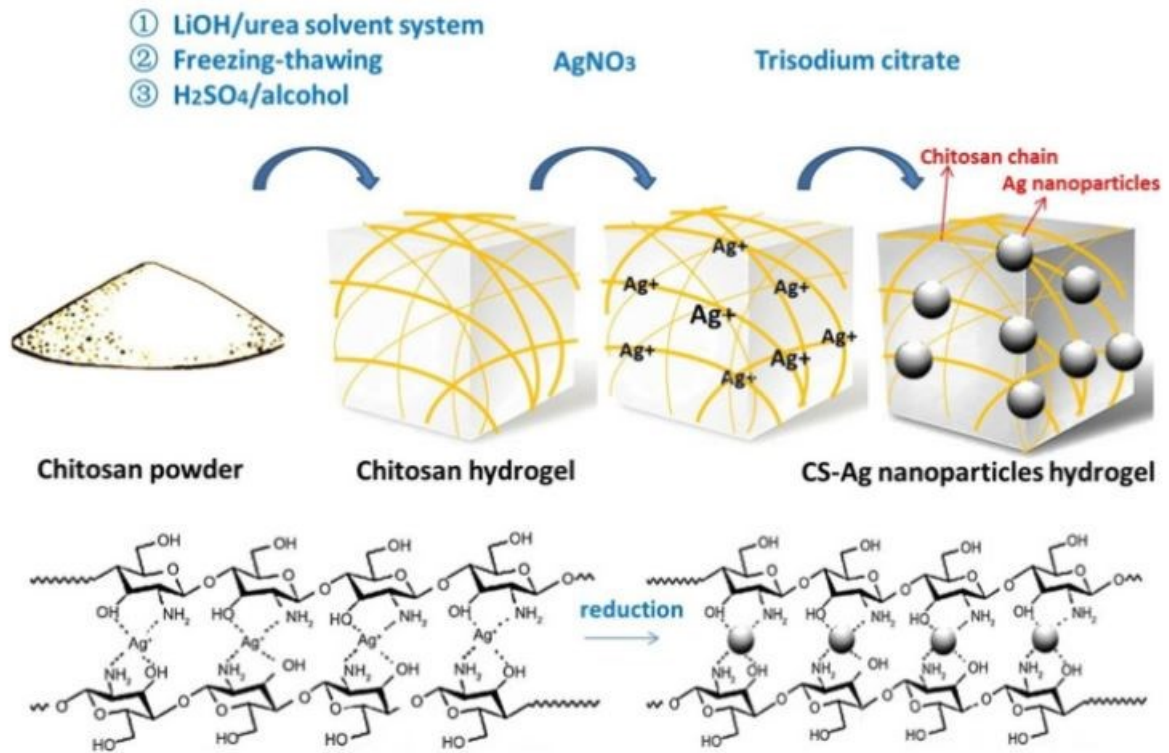
magneettikenttä, valo, paine ja ääni. Ympäristön kemiallisia ärsykeitä puolestaan ovat pH, liuottimen koostumus, ionivahvuus ja molekyyllilajit.⁹

Lukuisten ominaisuuksiensa, kuten korkean hydrofiilisyyden, ainutlaatuisen kolmiulotteisen verkkorakenteen, biologisen yhteensopivuuden, soluadheesion sekä joidenkin hydrogeelien luonnollisen antimikrobisuuden, vuoksi hydrogeelit ovat lupaavia materiaaleja erilaisiin biolääketieteellisiin sovelluksiin.⁷ Hydrogeelien käyttöä on tutkittu esimerkiksi lääke- ja proteiinikuljetuksessa, kudostekniikassa, soluviljelmissä sekä antimikrobisissa pinnoitteissa ja haavasidoksissa.² Hydrogeelien ominaisuuksien parantamiseksi erilaisia antimikrobisia materiaaleja, kuten metallipartikkeleita, voidaan liittää hydrogeelimatriisiin.

2.2 Polymeeriset metallogeelit

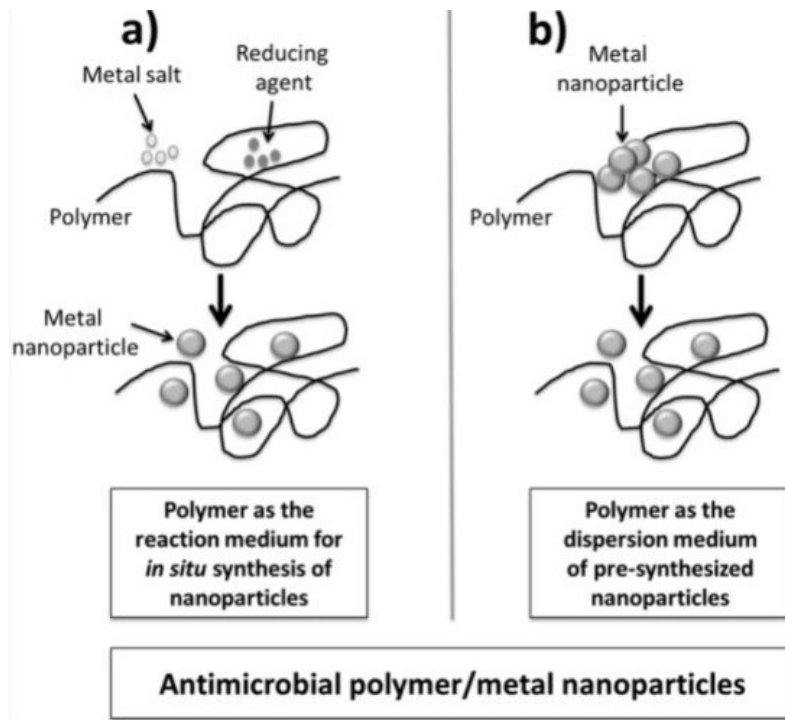
Metallogeelit ovat geeliluokka, jossa geelimatriisiin on lisätty metallikomponentteja, kuten hopeaa, sinkkiä tai kuparia. Tämä tarjoaa tehokkaan tavan muokata ja parantaa geelin ominaisuuksia sekä lisätä metallien tarjoamat erityisominaisuudet orgaanisen matriisin ominaisuuksiin.¹ Metallihiukkasten lisääminen polymeeriseen hydrogeelimatriisiin ei siis ainoastaan johda mekaanisten ominaisuuksien parantumiseen, vaan antaa myös ylivoimaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia.¹⁰ Ensimmäinen metallogeeli, litium-pohjainen hydrogeeli, raportoitiin jo 1800-luvun puolivälissä.¹

Metallogeeleissä metalli on osana geeliverkostoa joko koordinoituna metalli-ionina orgaanisen ligandin kanssa tai metallinanopartikkelina (M-NP), joka on kiinnittynyt geelimatriisiin (kuva 1).^{1,11} Metallien lisääminen polymeerimatriiseihin nanopartikkeleina on kehittyneempi tapa hyödyntää metallien antimikrobisia ominaisuuksia geeleissä. Näiden polymeeri/metallinanonkomposiittien tärkein etu on haluttujen vaatimusten saavuttamiseksi tarvittava äärimmäisen pieni pitoisuus M-NP:ita, sillä nanohiukkaset voivat liueta nopeammin annetussa liuostilavuudessa verrattuna suurempiin hiukkasiin. Tämän seurauksena vapautuu suurempi määrä metalli-ioneja.¹² Polymeeristen metallogeelien valmistus onnistuu usealla tavalla, sillä hydrogeeliverkostot soveltuvat hyvin metallinanopartikkeleiden synteesin *in situ* eli metallinanopartikkeleiden synteesi hydrogeelissä tai *ex situ* eli metallinanopartikkeleiden suora lisääminen hydrogeelimatriisiin.¹⁰



Kuva 1. Ag-nanopartikkeleiden muodostuminen kitosaanihydrogeeliverkostossa. Reprinted from ref. 11, Copyright 2018, with permission from Elsevier.

Polymeeri/metalli-nanokomposiittien valmistuksessa voidaan erottaa kaksi yleistä lähestymistapaa, *in situ* ja *ex situ*, riippuen siitä, missä M-NP:t valmistetaan (kuva 2). *In situ* -menetelmässä metallinanopartikkeleiden valmistuksessa polymeerimatriisia käytetään reaktioväliaineena. *In situ* -menetelmää käytetään polymeerihydrogeelinanokomposiiteissa, joissa useiden funktionaalisten ryhmien ja vesipitoisen väliaineen läsnäolo makromolekyylissä parantaa metallinanopartikkelin stabiloitumista ja dispersiota. *Ex situ* -menetelmässä M-NP:t puolestaan valmistetaan ennen niiden sisällyttämistä polymeeriin ja matriisi toimii vain dispersioväliaineena. *Ex situ* -menetelmää käytetään termoplastisissa komposiiteissa, joissa korkeaviskoelastinen matriisi sulamistilassa parantaa metallinanopartikkeleiden dispersiota.¹²



Kuva 2. Antimikrobisten polymeeri/metalli-nanokomposiittien kaksi pääasiallista valmistusreittiä: a) Polymeeri reaktioväliaineena nanopartikkeleiden *in situ* – valmistuksessa; b) Polymeeri metallin nanopartikkeleiden dispersioväliaineena. Reprinted from ref. 12. Palza, H., 2015.

Metallogeleissä käytetyt metallit voidaan luokitella solujen kannalta välttämättömiin ja ei-välttämättömiin. Välttämättömät metallit osallistuvat keskeisiin soluprosesseihin, kuten elektronin siirtoon ja katalyysiin, mutta liian suurina pitoisuuksina ne voivat olla tappavia kaikille solutyypeille. Ei-välttämättömät metallit, kuten hopea, voivat olla tappavia jo erittäin pieninäkin pitoisuuksina. Lääketieteellisissä sovelluksissa käytettäviä metallipohjaisia yhdisteitä suunniteltaessa on tärkeää ymmärtää metallien antimikrobisuuteen ja siten myös niiden sytotoksisuuteen vaikuttavat tekijät.⁶ Nämä polymeeristen metallogeelien antimikrobisuuteen ja sytotoksisuuteen vaikuttavat tekijät esitellään tarkemmin seuraavassa luvussa.

2.3 Polymeeristen metallogeelien antimikrobisuus ja sytotoksisuus

Polymeeri/metallikomposiitissa käytetystä metallipohjaisesta partikkelista (metalli-ioni, nanopartikkeli, oksidi, suola, kompleksi) riippumatta polymeeri/metallikomposiitin pääasiallinen antimikrobinen toimintamekanismi perustuu tutkimusten mukaan metalli-ioniin, ja sen vapauttamiseen. Yhä useammat tutkimukset ovat osoittaneet, että metalli-ionien vapautuminen metallinanopartikkeleista on myös metallinanopartikkeleiden antimikrobisten toimintamekanismien liikkeelle paneva voima.¹²

Metallogeelien sisältämien epäorgaanisten metallinanopartikkeleiden antimikrobisiin ominaisuuksiin vaikuttavat M-NP:den koko ja muoto. Niiden koko vaihtelee 1–100 nm:n välillä ja ne voivat olla muodoltaan esimerkiksi pallomaisia, kolmionmuotoisia, levyjä, putkia, kuutioita tai sauvoja. M-NP:den koon ja muodon lisäksi niiden antimikrobisiin ominaisuuksiin vaikuttavat myös niiden varaus, zeta-potentiaali ja pinnan muoto. Esimerkiksi pienemmillä metallinanopartikkeleilla on tyypillisesti suurempi antimikrobinen aktiivisuus johtuen niiden suhteellisesti suuremmasta pinta-ala-tilavuussuhteesta, mikä lisää niiden kykyä tuottaa bakteereille vahingollisia reaktiivisia happilajeja. M-NP:den muodoista nanoputket ja sauvat ovat tehokkaimpia antimikrobisissa sovelluksissa johtuen niiden tasoista ja siten metallien hapettumisesta.¹³

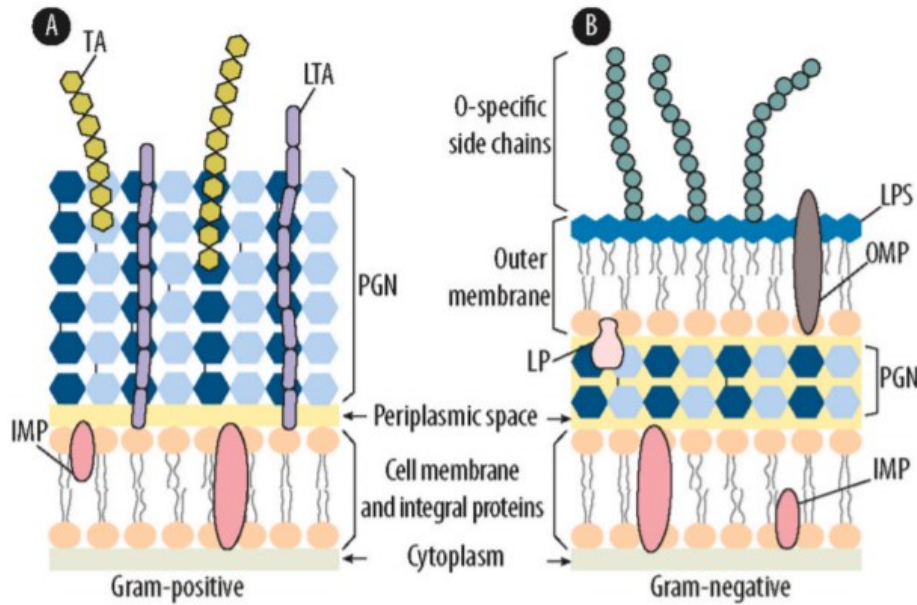
Monet metalleista ovat antimikrobisia ja mikrobeille sytotoksisia, mutta ne ovat sitä myös muille solutyypeille suurina annoksina. Bakterisoluluilla ja eukaryoottisoluluilla, kuten nisäkässoluluilla, on kuitenkin erilaisia metallinkuljetusjärjestelmiä ja metalliproteiineja, minkä perusteella metallia sisältävät yhdisteet voivat erottaa kohdesolunsa. Metallien myrkyllisyys ihmisille voitaisiin välttää antoreittiä muuttamalla tai rajoittamalla nämä aineet vain pinnoille, kuten lääkinnällisiin laitteisiin.⁶ Metallipartikkeleiden sytotoksisuuteen vaikuttaa partikkeleiden koon ja muodon lisäksi myös pitoisuus, erilaisten funktionaalisten ryhmien läsnäolo ja hoidon kesto.³ Esimerkiksi hydrogeelimatriisiin lisättyjen aineiden on havaittu vähentävän hopeananopartikkeleiden toksisuutta nisäkässoluille säilyttäen samalla niiden antimikrobisen aktiivisuuden.² Metallien käyttöä lääketieteellisissä sovelluksissa rajoittaa niiden myrkyllisyys, minkä vuoksi sen tutkiminen on herättänyt paljon kiinnostusta viime aikoina.¹⁴

3 Antibiootihoidon haasteet

Bakteerien aiheuttamien tautien hoitoon on käytetty jo vuosikymmeniä antibiootteja, joiden käyttö on johtanut bakteerien resistenssin eli vastustuskyvyn kehittymiseen.⁷ Antibioottiresistenssin lisäksi bakteerien muodostamat biofilmit ovat osoittautuneet haasteellisiksi, sillä ne lisäävät bakteerien eloonjäämistä yli 1000-kertaisesti antibioottien läsnäolosta huolimatta.³ Yleisiä terveydenhuoltoon liittyviä infektioita (HAI) aiheuttavia bakteereja ovat esimerkiksi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ja *Clostridium difficile* (*C. difficile*).¹⁵ Bakterisolujen ja niiden rakenteen tuntemus on tärkeää antimikrobisten aineiden toimintamekanismien ymmärtämisen kannalta, sillä esimerkiksi bakteerien soluseinän rakenteiden on huomattu vaikuttavan bakteerien selviytymisessä erilaisia antimikrobisia aineita vastaan. Gram-värjäys on bakteerien luokittelumenetelmä, joka perustuu bakteerien soluseinien rakenteiden eroihin. Sen perusteella bakteerit voidaan luokitella Gram-positiivisiin ja Gram-negatiivisiin bakteereihin.¹³

3.1 Gram-positiiviset ja Gram-negatiiviset bakteerit

Bakteerit ovat kehittäneet itselleen monimutkaisen soluseinän, joka suojaa niitä ympäristöltä sallien samalla valittujen ravintoaineiden ja solujätteiden kuljetuksen. Bakteerien soluseinä on monikerroksinen kokonaisuus, joka koostuu pääasiassa proteiineista, lipideistä ja hiilihydraateista. Bakteerien soluseinien eroavaisuudet määrittävät Gram-värjäyksessä, onko kyseessä Gram-positiivinen vai Gram-negatiivinen bakteeri (kuva 3).¹³



Kuva 3. Gram-positiivisen (A) ja Gram-negatiivisen (B) bakteerisolun soluseinän rakenne.

IMP: integroitu kalvoproteiini, LP: lipoproteiini, LPS: lipopolysakkaridi, LTA: lipoteikkohappo, OMP: ulkokalvoproteiini, PGN: peptidoglykaani, TA: teikkohappo.

Reprinted from ref. 13., M. Godoy-Gallardo *et al.*, 2021.

Gram-positiivisen bakteerin soluseinä koostuu 20–80 nm:n paksuisesta peptidoglykaanikerroksesta (PGN), joka on funktionalisoitu anionisilla glykopolymeereillä. PGN-kerros rakentuu toistuvista *N*-asetyyli-glukosamiini-*N*-asetyylimuramiinihappodisakkarideista, jotka ovat liittyneet toisiinsa pentapeptidisivuketjujen avulla. Gram-positiivisten bakteerisolujen soluseinät sisältävät teikkohappoja (TA), jotka ovat kiinnittyneet kovalenttisesti PGN:ään tai amfiifiliseen lipoteikkohapon (LTA) välityksellä bakteerin solukalvoon.¹³

Gram-negatiivisen bakteerin soluseinä on monimutkaisempi kokonaisuus kuin Gram-positiivisen bakteerin soluseinä, vaikkakin sen PGN-kerros on Gram-positiivisen bakteerin soluseinän PGN-kerrosta ohuempi, noin 7–8 nm:ä. Gram-negatiivisella bakteerisolulla PGN-kerros sijaitsee solukalvon ja ulomman kalvon välissä. Ulommalla kalvolla sijaitsevat negatiivisesti varautuneet lipopolysakkaridit (LPS), joita on vain Gram-negatiivisissa bakteereissa. Lipopolysakkaridit saattavat aiheuttaa tulehduksellisia vaikutuksia nisäkkäissä, minkä vuoksi niiden merkitys Gram-negatiivisten bakteerien patogeenisyydelle on keskeinen. Gram-negatiivisten bakteerisolujen ulkokalvo estää hydrofobisten aineiden ja makromolekyyliden pääsyn sisään bakteerisoluihin. Gram-negatiivisten bakteerisolujen

ulkokalvon sisältämien muiden komponenttien, kuten poriinien, avulla onnistuu kuitenkin valikoitujen aineiden diffuusio.¹³

Gram-negatiivisia bakteereja pidetään ulkokalvon alhaisen läpäisevyytensä vuoksi vähemmän herkkinä antimikrobisille metalli-ioneille ja -nanopartikkeleille kuin Gram-positiivisia bakteereja, joilta tämä solukalvon rakenne puuttuu. Tutkimuksessa on kuitenkin havaittu Gram-positiivisen *S. aureuksen* olevan vähemmän altis Cu- ja Ag-nanohiukkasille kuin Gram-negatiivisen *E. colin*. Tästä voidaan päätellä, ettei bakteerikantojen herkkyys riipu yksinomaan bakteerien soluseinärakenteesta ja Gram-luonteesta, vaan pikemminkin yksittäisen soluseinän koostumuksesta ja paksuudesta.¹³ Gram-luonteesta riippumatta bakteerisolulla on kyky kehittää itselleen vastustuskyky mikrobilääkkeitä vastaan. Tällöin puhutaan antibioottiresistenssistä tai laajemmin mikrobilääkeresistenssistä.

3.2 Antibioottiresistenssi

Antibioottiresistenssi syntyy bakteerien kehittäessä resistenssimekanismeja, jotka vähentävät tai poistavat vastaavien mikrobilääkkeiden vaikutuksia.¹³ Antibioottiresistenssin kasvu on ollut odotettua nopeampaa ja tutkimukset ovat osoittaneet, etteivät antibiootit ole enää riittävän tehokkaita monien vaarallisten taudinaiheuttajien tuhoamiseen. Uusien antibioottien löytäminen sekä olemassa olevien antibioottien kemiallinen muokkaaminen ei ole enää riittävän tehokas keino torjua antibioottiresistenssiä.³ Antibiootit toimivat bakteerisolussa solunsisäisesti jättäen bakteerien solukalvon ehjäksi, minkä seurauksena bakteerit pystyvät kehittämään itselleen vastustuskyvyn mutaation kautta.² Antibiooteille vastustuskykyisten bakteerien aiheuttamat infektiot ovat vaikeahoitoisia, mikä voi lisätä sairastuvuutta ja kuolleisuutta.¹³

Antibiooteilla on tyypillisesti vain yksi antimikrobinen toimintamekanismi, joka kohdistuu tiettyyn kohtaan bakteerisolussa.^{7,3} Antibioottien mahdolliset bakteerikohteet ovat soluseinän synteesi, DNA:n replikaatio tai proteiinien translaatiokoneisto. Bakteerit pystyvät kuitenkin kehittämään resistenssimekanismeja kaikkia näitä antibioottien toimintamekanismeja vastaan. Bakteerien kehittämä antibioottiresistenssi voi muodostua seuraavilla tavoilla: bakteerisolu tuottaa normaalia enemmän poistovirtauspumppuja solukalvolle, mikä johtaa antibioottien aktiiviseen ulosvirtaukseen bakteerisolusta; bakteerisolu tehostaa antibiootin vaikutuksesta muuttuville aineenvaihduntareiteille vaihtoehtoisten aineenvaihduntareittien toimintaa;

bakteerisolun seinämän läpäisevyys heikentyy, mikä estää mikrobilääkeaineiden pääsyn kohdealueelle; antibiootteja muuttamaan tai hajottamaan kykeneviä entsyymejä, kuten β -laktamaaseja, tuotetaan bakteerisolussa niin paljon, että ne eliminoivat antibakteerisen lääkkeen; ja antibiootin vaikutuskohtaa bakteerisolussa muokataan esimerkiksi aminohappomutaatiolla tai translaation jälkeisellä muokkauksella.¹³

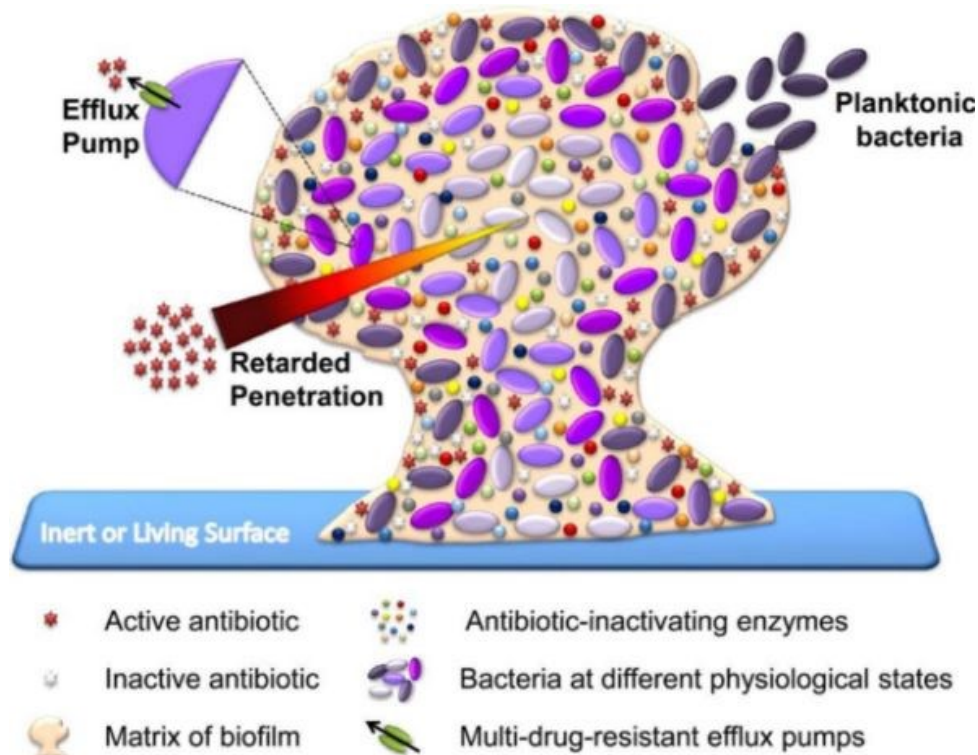
Antibioottiresistenssi voi levitä myös muihin kantoihin ja lajeihin, sillä antibioottiresistenssigeeni voi siirtyä plasmidien, faagien tai ympäristössä olevan DNA:n kautta.¹³ Antibioottiresistenssin sekä sen leviämisen lisäksi näihin perinteisiin mikrobilääkkeisiin liittyy myös yliannostuksia ja sytotoksisuutta. Tämän vuoksi tarvitaan kiireellisesti tehokkaita ja turvallisia lääkkeiden kuljetus- ja annostelujärjestelmiä, jotka toimisivat paikallisesti. Tällaiset kohdennetut jakelujärjestelmät voivat pidentää mikrobilääkkeiden vapautumisaikaa ja vähentää bakteerien lääkeresistenssin riskiä sekä estää bakteerien erittäin kestävä biofilmin muodostumisen.^{3,7} On arvioitu, että bakteerien biofilmien osuus on 80 % kaikista kliinisistä infektiosta. Näiden infektioiden hoitaminen on erityisen haastavaa biofilmin bakteereita suojaavien ominaisuuksien vuoksi.³

3.3 Biofilmit

Biofilmit ovat bakteerien kehittämää järjestäytyneitä yhteisöjä, jotka tarjoavat mekaanista vakautta ja suojaa bakteerisoluille sen heterogeenisen verkkorakenteen sisällä. Biofilmeissä bakteerit voivat muodostaa yhtenäisiä, kolmiulotteisia polymeeriverkkomatriiseja, jotka yhdistävät biofilmisolut. Biofilmien sisällä bakteerit osoittavat keskenään sosiaalista käyttäytymistä, mikä auttaa niitä kommunikoimaan ja sopeutumaan nopeasti ympäristöolosuhteisiin. Mekaanisille voimille altistuessaan biofilmit voivat absorboida ja haihduttaa energiaa sen sijaan, että ne irtoaisivat substraatistaan. Näiden ominaisuuksien ansiosta biofilmi on menestynein elämänmuoto maapallolla.³

Bakteerisolut tuottavat biofilmin polymeerimatriisit solunulkoisilla polymeeriaineilla, kuten polysakkarideilla, proteiineilla, nukleiinihapoilla ja lipideillä. Lisäksi biofilmimatriisi kerää ympäröivästä ympäristöstään esimerkiksi mineraaleja ja veren proteiineja. Bakteerien biofilmi voi muodostua mihin tahansa pinnalle, johon bakteerien kiinnittyminen on mahdollista. Tämän vuoksi lääkinnällisten laitteiden pinnat ja kehon kudossiirteet ovat bakteeribiofilmi-infektioiden yleisin ilmenemiskohde. Biofilmi paitsi lisää bakteerien vastustuskykyä ulkoisia

rasituksia vastaan, se kasvattaa myös bakteerien eloonjäämistä merkittävästi antibioottien läsnäolosta huolimatta (kuva 4).³

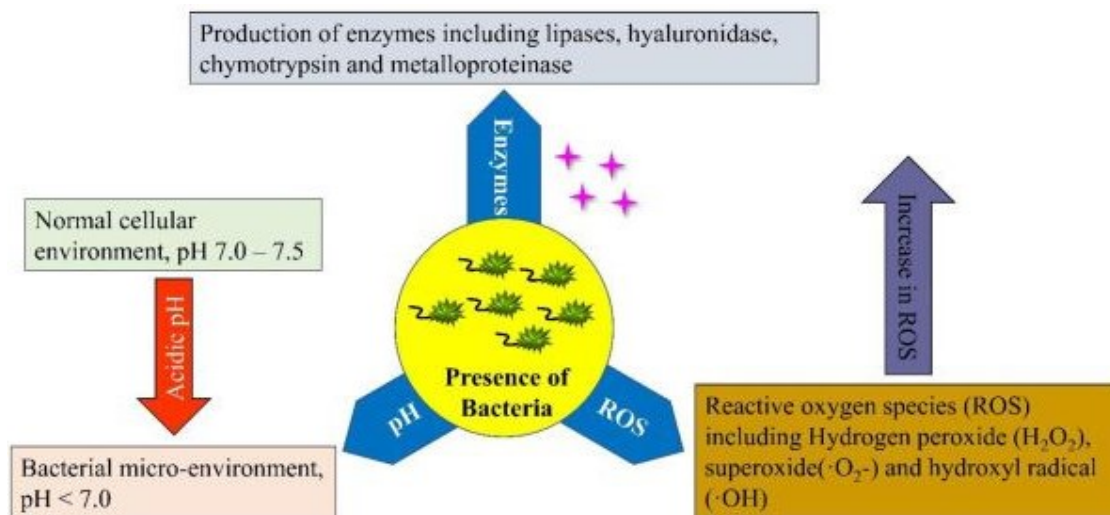


Kuva 4. Bakteerien biofilmin antibiootiresistenssimekanismit: biofilmin matriisi hidastaa mikrobilääkkeiden tunkeutumista biofilmiin ja näin ollen bakteerisoluihin; bakteerisolujen heterogeenisyys; bakteerien sisältämät poistovirtauspumput ja antibiootteja tuhoavat entsyymit. Reprinted from ref. 3, Copyright 2022, with permission from Elsevier.

Antibioottihoitojen tehottomuus biofilmi-infektioita vastaan johtaa usein siihen, että tartunnan saaneet kudokset ja/tai implantoidut laitteet on poistettava kirurgisesti. Tästä seuraa usein pitkä antibioottihoito ja uuden järjestelmän implantointi. Nykyisten antibioottien ja lääkkeenantojärjestelmien rajallinen kyky biofilmi-infektioita vastaan voi johtaa kroonisiin ja toistuviin infektioihin, joihin liittyy huomattavaa sairastuvuutta ja kuolleisuutta. Tämän vuoksi biofilmien muodostumisen huomioiminen on yksi tärkeimpiä bakteri-infektioiden nykyiseen hoitoon ja tulevien hoitomenetelmien kehitykseen liittyvistä kysymyksistä.³

4 Metallipartikkelit antibioottien korvaajina

Antibioottiresistenssi ja bakteerien muodostamat biofilmit ovat muodostuneet maailmanlaajuisesti ongelmaksi, minkä vuoksi vaihtoehtoisten hoitomuotojen kehittäminen on tärkeää.⁷ Nykyiset tutkimukset keskittyvät suunnittelemaan ärsykeisiin reagoivia järjestelmiä, jotka sisältävät laajan valikoiman antimikrobisia nanomateriaaleja, kuten metallogeeleissä esiintyviä metallinanopartikkeleita. Bakteerien aiheuttamat muutokset mikroympäristössä (kuva 5) saavat aikaan muutoksia bakteereille reagoivien nanojärjestelmien rakenteissa, minkä seurauksena antimikrobisia aineita vapautetaan järjestelmästä.³



Kuva 5. Bakteerien aiheuttamat muutokset mikroympäristönsä: pH:n muutokset, reaktiivisten happilajien muodostuminen ja bakteereille spesifisten entsyymien tuotanto.

Reprinted from ref. 3, Copyright 2022, with permission from Elsevier.

Antimikrobisissa metallogeeleissä hopea on eniten käytetty metalli hyvien antimikrobisten ominaisuuksiensa ja suhteellisen alhaisen myrkyllisyytensä vuoksi. Lisäksi käytetään myös muita metalleja, kuten kultaa, sinkkiä, kuparia ja rautaa. Näillä metalleilla on omat antimikrobiset ominaisuutensa, etunsa sekä rajoituksensa.²

4.1 Metallipartikkeleiden yleiset antimikrobiset toimintamekanismit

Metallinanopartikkeleiden sekä metalli-ionien antimikrobinen toimintamekanismi on monivaiheinen (kuva 6). Metallinanopartikkelit ja/tai metalli-ionit voivat kiinnittyä bakteerisolun solukalvoon sähköstaattisilla vuorovaikutuksilla, Van der Waalsin voimilla, reseptori-ligandi- tai hydrofobisilla vuorovaikutuksilla. Kiinnittymisen jälkeen ne voivat läpäistä bakteerin solukalvon, estää bakteerisolun aineenvaihduntareittejä sekä aiheuttaa muutoksia kalvon muodossa ja toiminnassa. Bakteerisolun sisään päästyä ne voivat estää entsyymien toimintaa, deaktivoita proteiineja, aiheuttaa oksidatiivista stressiä ja muuttaa geenien ilmentymistasoja.¹³

Metallinanopartikkeleiden ja/tai metallinanopartikkeleista vapautettujen metalli-ionien (kuva 6, kohta 1) ensimmäinen vuorovaikutuskohta bakteerisolun kanssa on bakteerisolun solukuori (kuva 6, kohdat 2 ja 3). Solukuori ei ole ainoastaan pääeste solun ja ympäristön välillä, vaan siinä on myös useita bakteerisoluille välttämättömiä toimintoja, kuten elektroninsiirtoketju. Bakteerisolun solukuoressa on reaktiivisia ryhmiä, jotka voivat olla vuorovaikutuksessa eri metallien kanssa ja siten muodostaa ensimmäiset kontaktikohdat. Proteiinien lukumäärä ja tyypit solukuoressa riippuvat bakteerilajista, sen pintakoostumuksesta, kehitysvaiheesta ja rakenteesta.¹³

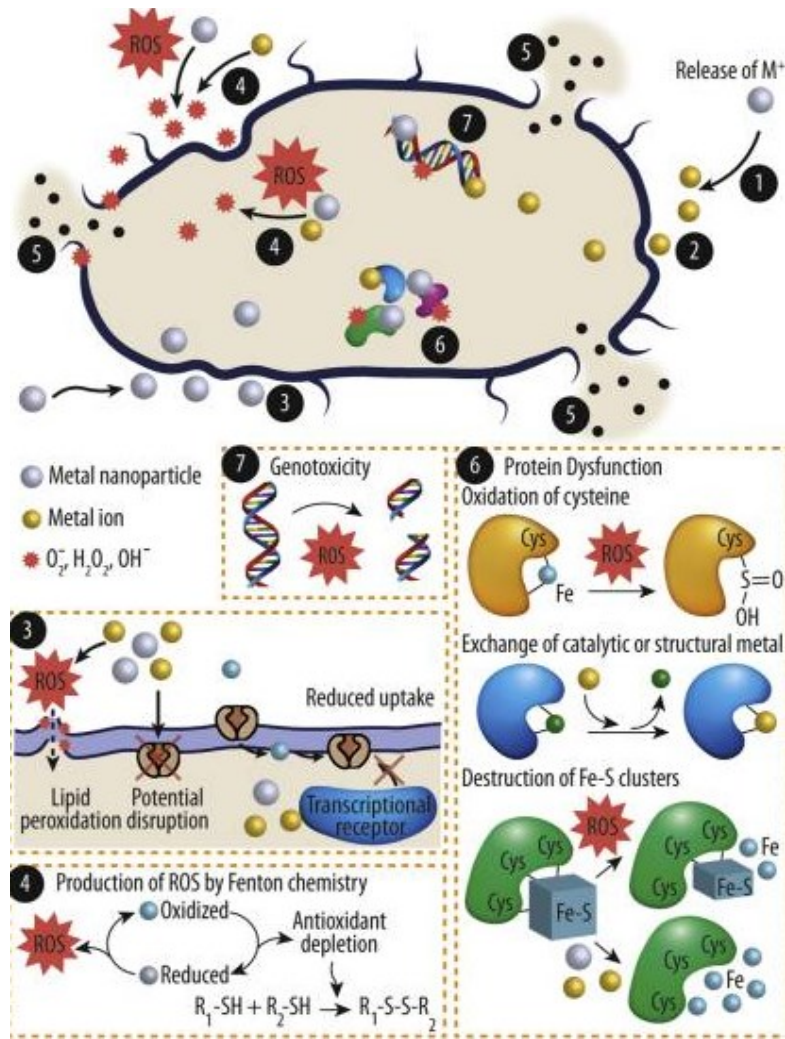
Bakteerien kaksikerroksisen solukalvon pääkomponentti ovat lipidit, johon sitoutuessa M-NP:t ja metalli-ionit aiheuttavat välittömän vaikutuksen solukalvon pysyvyyteen ja kykyyn järjestäytyä dynaamisesti uudelleen. Bakteerikalvon hallitseva yhdisteryhmä ovat fosfolipidit, joiden ulospäin suuntautuvien poolisten fosfaattipäiden kanssa metallit ovat vuorovaikutuksessa. Metallin sitoutuessa kalvoon, kalvon dipolipotentiali pienenee ja fosfaattiryhmän protonaatioaste muuttuu, mikä johtaa kalvon kokonaisvarauksen muuttumiseen. Tämä puolestaan johtaa kalvon paikalliseen hajoamiseen, läpäisevyyden lisääntymiseen sekä reaktiivisten happilajien (ROS) muodostukseen (kuva 6, kohta 4). Lisäksi metalli-ionien tai -nanopartikkeleiden korkeat pitoisuudet bakteerisolussa voivat johtaa soluesteen (cell barrier) paikalliseen hajoamiseen, mikä johtaa bakteerisolun sisällön ulosvuotamiseen (kuva 6, kohta 5). Veden menetyksen kompensoimiseksi bakteerit lisäävät protonien ulosvirtausta ja säätelevät elektronien kuljetusta. Ionien lisääntyvä epätasapaino ja kalvon epävakaus johtavat bakteerisolun energiansiirtojärjestelmän häiriöihin ja lopulta solukuolemaan.¹³

Metalli-ionit voivat myös sitoutua proteiineihin bakteerisolujen sisällä (kuva 6, kohta 6). Sitoutuessaan metalli-ionit katalysoivat aminohappojen hapettumista, mikä heikentää proteiinien toimintaa, vähentää niiden pysyvyyttä ja saattaa johtaa proteiinin hajottamiseen. Bakteerisolujen proteiinien oikeanlainen laskostuminen ja biologinen toiminta vaativat monia metallikofaktoreita. On osoitettu, että tietyt metalli-ionit estävät bakteerien kasvua tai tuhoavat bakteerin mekanismeilla, jossa välttämättömän metallin sijasta samanlaiset kemialliset ominaisuudet omaava metalli-ioni sitoutuu kyseiseen proteiiniin. Tämä häiritsee bakteerisolun elintärkeitä aineenvaihduntareittejä, sillä bakteerisolu ei pysty poistamaan metalli-ioneja sisältään. Lisäksi metallien on osoitettu myös vaurioittavan bakteeri-DNA:ta epäsuorasti (kuva 6, kohta 4). Esimerkiksi Fe-homeostaasin häiriintyminen ja raudan vapautuminen sytoplasmaan lisää solunsisäisen Fentonin-kemian seurauksena syntyviä ROS-tasoja. Fentonin-kemiaksi kutsutaan katalyyttistä prosessia, jossa esimerkiksi vetyperoksidi muutetaan erittäin myrkylliseksi vapaaksi hydroksyyli-radikaaliksi. Nämä reaktiiviset happiradikaalit puolestaan aiheuttavat DNA-vaurioita (kuva 6, kohta 7).¹³

Metalli-ioneilla käsitellyissä bakteerisoluisissa havaitaan usein näiden reaktiivisten happilajien muodostumista. ROS:ien tiedetään aiheuttavan suurimman osan metallien antimikrobisista vaikutuksista bakteerisoluille, minkä vuoksi metallien myrkyllisyyden uskotaankin ainakin osittain johtuvan ROS-tuotannon aiheuttamista soluvaurioista. Nämä happiradikaalit syntyvät happimolekyylien epätäydellisen pelkistymisen seurauksena. Termi ROS sisältää kuitenkin myös reaktiivista happea sisältävät yhdisteet, joissa ei ole parittomia elektroneja, kuten vetyperoksidin (H_2O_2). Tasapainotilassa bakteerisolun ROS-tasot ovat hallinnassa ja solunsisäinen antioksidanttipuolustusjärjestelmä poistaa ylimäärän, joka esimerkiksi aerobisen hengityksen aikana väistämättä syntyy. Kun tasapaino ROS-tuotannon ja antioksidanttipuolustuksen välillä häiriintyy, ROS-tasot nousevat tasaisesti aiheuttaen vakavia vaurioita bakteeriproteiineille, DNA:lle ja lipideille. Korkeat ROS-tasot aiheuttavat bakteerisolulle oksidatiivista stressiä, mikä lopulta johtaa solukuolemaan. Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että sekä välttämättömät metallit että ei-välttämättömät metallit voivat lisätä solunsisäistä ROS-tuotantoa.¹³

Metallit aiheuttavat ROS:ien syntymisen kolmen päämekanismin kautta (kuva 6, kohta 4). Redox-aktiiviset metallit, eli metallit, jotka osallistuvat hapetus- tai pelkistysreaktioihin vastaanottamalla tai luovuttamalla elektroneja, voivat olla osana Fentonin-kemiassa. Redox-aktiivisia metalleja ovat esimerkiksi rauta, kupari, kromi ja nikkeli. Tietyt metallit voivat myös hajottaa solun rautaa koordinoivat donoriligandin. Esimerkiksi alumiinin, kuparin ja hopean on osoitettu kohdistuvan suoraan $[4Fe-4S]$ -klustereita sisältäviin proteiineihin ja siten häiritsevän

niiden useiden aineenvaihdunnallisten prosessien elektroninsiirtoketjua. Tämä voi johtaa raudan hallitsemattomaan vapautumiseen sytoplasmaan, mikä saa aikaan ROS:n muodostumisen. Metallioniitit pystyvät lisäksi aiheuttamaan oksidatiivista stressiä mikro-organismeissa kuluttamalla niiden antioksidanttivaraston loppuun.¹³



Kuva 6. Metallioniitien ja -nanopartikkeleiden antimikrobisten mekanismien keskeiset vaikutustavat: (1) metallioniitin vapauttaminen nanopartikkelista ja (2) metallioniitien sekä/tai (3) metallinanonpartikkeleiden suora vuorovaikutus bakteerin soluseinän kanssa; (4) solunulkoisten ja -sisäisten reaktiivisten happilajien (ROS) muodostuminen, mikä aiheuttaa oksidatiivista stressiä; (5) metallioniitin sitoutuminen bakteerisolun solukuoreen ja korkeat ROS-tasot voivat vaurioittaa solukalvoa, mikä johtaa bakteerisolun sisällön vuotamiseen; (6, 7) bakteerisolussa metallioniitit ja -nanopartikkelit voivat häiritä bakteerisolun proteiineja sekä DNA:ta, heikentää niiden toimintaa ja häiritä solujen aineenvaihduntaa metallivälitteisen ROS-tuotannon lisäksi. Reprinted from ref. 13., M. Godoy-Gallardo *et al.*, 2021.

Metalli-ionien ja -nanopartikkeleiden antimikrobiset toimintamekanismit voivat vaikuttaa bakteerisolussa useaan eri kohtaan ja vaurioittaa bakteerisolun geeniperimää (kuva 6, kohta 7). On tärkeää huomata, että tässä esiteltyt M-NP:den ja metalli-ionien antimikrobiset toimintamekanismit eivät ole yksiselitteisiä, sillä antimikrobinen aktiivisuus on monimutkainen lopputulos useista toisiinsa liittyvistä samanaikaisesti tapahtuvista mekanismeista. Kullakin metallilla antimikrobiset toimintamekanismit voivat olla hieman erilaisia.¹³

4.2 Hopea

Hopeaa on käytetty mikrobien tappamiseen hopeajauheen ja -liuoksen muodossa jo tuhansien vuosien ajan. Hopea on eniten käytetty metalli myös näissä antimikrobisissa metallogeeleissä, sillä hopealla on laaja antimikrobisten vaikutusten kirjo lääkeresistenttejä bakteereja, sieniä ja viruksia vastaan, minkä oletetaan johtuvan hopean useista sterilointimekanismeista.⁷ Hopeaa pidetään lupaavana mikrobilääkkeenä, sillä sen laajasta käytöstä huolimatta mikrobien vastustuskykyä Ag^+ :lle on tavattu harvoin ja sen on havaittu kehittyvän hitaasti antibioottiresistenssiin verrattuna.⁷ Lisäksi hopean sytotoksisuutta nisäkäsoluille voidaan säädellä.²

Hopean ja muiden metallisuolojen antimikrobisen aktiivisuuden tiedetään johtuvan metallikationin kyvystä hajottaa mikrobin solukalvo, mistä seuraa mikrobin hajoaminen.² Hopea voi olla geeleissä hopeaioneina tai hopeananopartikkeleina eli AgNP-muodossa, mutta nanotieteen ja -tekniikan kehityksen myötä AgNP-muodosta on tullut kuitenkin yleisempi monipuolisempien antimikrobisten vaikutusmekanismiensa vuoksi. Ag^+ -ionien ja AgNP:n antimikrobiset toimintamekanismit eroavat toisistaan, sillä AgNP:t ovat hiukkasspesifejä. Vaikka AgNP:n toiminnasta ei ole vielä tarkkaa tietoa, sen useita vaihtoehtoisia toimintamekanismeja on tutkittu.⁷

Viimeaikaisten tutkimusten valossa AgNP:n ensisijainen toimintamekanismi perustuu Ag^+ -ionin vapauttamiseen nanopartikkeleista. Tällöin hopeaioni on vuorovaikutuksessa bakteerikalvojen tietyillä proteiinialueilla aminohappo kysteiinin SH-ryhmien kanssa. Tämä aiheuttaa K^+ -ionien vajauksen bakteerisolun sisällä sekä solukuljetusjärjestelmän vaurioita, mitkä lopulta johtavat bakteerisolun kuolemaan. Muut tutkimukset osoittavat AgNP:sta vapautuneen Ag^+ -ionin vaikuttavan bakteerisolun soluseinän ja -kalvon proteiinien kanssa rei'ittäen negatiivisesti varautuneen solukalvon, jolloin solulima valuu bakteerisolusta ulos,

hajottaa solukalvon H^+ -gradientin ja joskus aiheuttaa solukuoleman. Mikäli tämä toimintamekanismi ei ole riittävä bakteerisolun tuhoamiseksi, hopeaioni voi siirtyä bakteerisolun sisään tuhoten solun vaikuttamalla sen sisäisiin biomolekyyleihin. Yksi hopean vaikutusmekanismeista on myös metallivälitteinen ROS-tuotanto, mikä johtaa oksidatiiviseen stressiin. Metallogeelien toimintamekanismeihin bakteerisoluissa vaikuttaa hopean esiintymismuodon lisäksi esimerkiksi bakteerien Gram-luonne.^{7, 13}

AgNP-hydrogeelien oletetaan tuhoavan tehokkaammin Gram-negatiivisia bakteereita, sillä niiden solukalvoilla on alhaisempi vastustuskyky verrattuna Gram-positiivisten bakteerisolujen paksumpiin peptidoglykaanisoluseiniin. On kuitenkin myös esitetty, että Gram-positiiviset bakteerit olisivat herkempiä Ag^+ -ioneille kuin Gram-negatiiviset bakteerit. Tämän oletetaan johtuvan Ag^+ -ionin voimakkaammasta sitoutumisesta Gram-negatiivisen bakteerin ulommalla kalvolla olevaan negatiivisesti varautuneeseen lipopolysakkaridiin, kuin Gram-positiivisen bakteerin peptidoglykaanikerrokseen. Voimakkaamman sitoutumisen seurauksena Ag^+ -ioni on loukussa LPS:ssa, mikä estää sen pääsyn bakteerisolun sisään.⁷ Tutkimusten perusteella voidaan todeta hopean osoittavan antimikrobisuutta molemmille bakteerisolutyypeille, mikä lisää sen antimikrobisuuden kirjoa.

Hopean esiintymismuodon ja bakteerityypin lisäksi hopeageelin ominaisuuksiin ja rakenteeseen vaikuttaa geelimatriisi, sillä erilaiset matriisit tuovat erilaisia ominaisuuksia ja synteesiprosesseja. Luonnollisista polymeereistä yleisimmät geelimatriisit ovat polysakkaridit, kuten alginaatti, kitiini, kitosaani ja karboksimeetyyliselluloosa. Esimerkiksi alginaattipohjaisilla AgNP-geeleillä on todettu antibakteerista vaikutusta *S. Aureusta* ja *E. colia* vastaan. Vaikka alginaattia on käytetty jo kaupallisesti haavasidoksissa, on AgNP:illa alginaatissa korkea taipumus aggregoitumiseen. AgNP:illa ladatuilla alginaattihydrogeeleillä on tehty monia eläinkokeita, mikä osoittaa, että tällaista antimikrobista hydrogeeliä on tutkittu perusteellisesti.⁷

Synteettisissä geelimatriiseissa valikoima on suuri, mutta yleisimmät ovat muun muassa polyakryyliamidi (PAM), polyvinyylialkoholi (PVA) ja polyetyleeniglykoli (PGA). Synteettisten geelimatriisien suurin etu on siinä, että nanopartikkeleiden morfologiaa ja kokoa voidaan helposti hallita muuttamalla hydrogeeliverkoston silloitteen ja monomeerien määrää. Esimerkiksi AgNP:llä ladattu PAM/PVA-hydrogeeli osoitti korkeampaa antibakteerista aktiivisuutta *E. colia* vastaan verrattuna pelkkiin AgNP:hin ja Ag^+ -silloitettuihin hydrogeeleihin.⁷

Vaikka hopeaionit ja -nanopartikkelit mikrobilääkkeinä ovat kiinnostava ja lupaava tutkimuskohde, niiden käyttöön liittyy myös haittavaikutuksia. Hopean aiheuttamia haittavaikutuksia soluissa voivat olla apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema sekä nisäkässolujen nekroosi, jossa suurempi solujoukko tuhoutuu apoptoosin tavoin. Nieltynä hopea voi aiheuttaa pysyvän kosmeettisen argyria-tilan, jossa ihonväri muuttuu harmaansiniseksi.² Viimeaikaisten tutkimusten mukaan nisäkässolut voivat sietää bakteerisoluja suurempaa hopeapitoisuutta, minkä oletetaan johtuvan eukaryoottisolujen suuremmasta koosta ja monimutkaisemmasta rakenteesta bakteerisoluihin verrattuna.

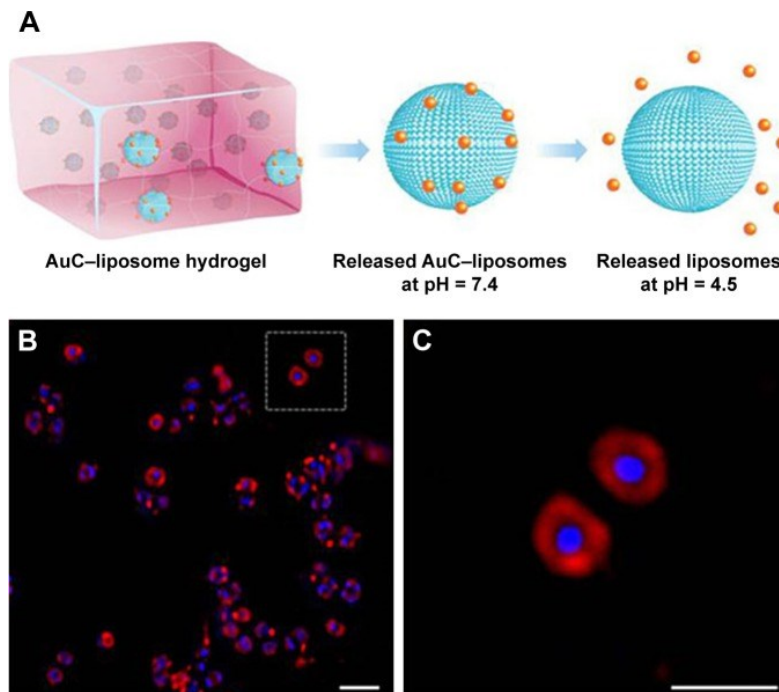
Hopean käyttöön antimikrobisena aineena liittyy kuitenkin vielä monia kysymyksiä, kuten niiden antimikrobisen kyvyn parantaminen Gram-positiivisia bakteereja vastaan ja geenitoksisuuden minimointi. Veren seerumin albumiinin on todettu heikentävän AgNP-ladattujen hydrogeelien antibakteerisia vaikutuksia, minkä vuoksi myös seerumin albumiinin vähentäminen AgNP-pohjaisia hydrogeelejä suunniteltaessa on yksi tutkimuskohde. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on löydetty lisää AgNP-pohjaisia hydrogeelejä, joiden ominaisuuksia tutkijat ovat pyrkineet muokkaamaan: antimikrobisia ominaisuuksia on vahvistettu ja nanopartikkeleiden vapautumisaikaa pidennetty. Nämä kaikki kehitykset ja parannukset vahvistavat AgNP-hydrogeelien käyttömahdollisuuksia monissa lääketieteellisissä sovelluksissa.⁷

4.3 Kulta

Yleisesti kultaa on pidetty biologisesti inerttinä, mutta kultananopartikkeleilla (AuNP) on monia biologisia toimintoja.⁷ Kullan nanohiukkasilla ei itsessään ole myöskään antibakteerista aktiivisuutta, mutta ne voidaan muokata antimikrobisiksi.³ AuNP:ista voidaan suunnitella erikokoisia ja ne voidaan funktionalisoida haluttujen polymeerien kanssa, jolloin niiden bioyhteensopivuuteen ja antimikrobisuuteen voidaan vaikuttaa. Kultananopartikkeleita sisältävien hydrogeelien tutkimukset ovat vielä kuitenkin harvinaisia verrattuna esimerkiksi hopeananopartikkeleita sisältäviin hydrogeeleihin, mutta jotakin näyttöä AuNP:den antimikrobisista vaikutuksista on saatu.⁷

Kultapartikkeleiden antimikrobisen toimintamekanismien oletetaan perustuvan niiden suoraan vuorovaikutukseen bakteerin solukalvon kanssa, mikä johtaa bakteerisolun sisällön vuotamiseen ulos. Ne voivat myös läpäistä ulomman solukalvon ja peptidoglykaanikerroksen,

mikä johtaa solukuolemaan.⁷ Kullan alhaisen reaktiivisuuden vuoksi vapaita ioneja muodostuu vähemmän. Tämän seurauksena syntyy myös vähemmän ROS:ia.¹³ Brown *et al.*⁷ ovat havainneet, että kultananopartikkelit yksinään eivät ole antibakteerisia, mutta ne saadaan antimikrobisiksi lisäämällä niiden pinnalle erilaisia komponentteja. Esimerkiksi AuNP:iden, joihin on liitetty ampicilliini, on todettu tuhoavan useita lääkeresistentejä bakteereja, kuten metisilliinille resistenttejä *S. aureusta*, *P. aeruginosaa*, *Enterobacter aerogenesia* (*E. aerogenes*) ja *E.colia*. pH-muutoksiin reagoivan AuNP-stabiloituja liposomeja (kuva 7) sisältävän hydrogeelin on havaittu osoittavan antimikrobisia ominaisuuksia *S. aureusta* vastaan ilman ihotoksisuutta hiirikokeissa.⁷



Kuva 7. AuNP-stabiloituja liposomeja sisältävä hydrogeeli; A) AuNP-stabiloituja liposomeja sisältävän hydrogeelin liposomit reagoivat pH-muutoksiin, mikä sai aikaan liposomien ja myöhemmin AuNP:iden vapautumisen; B) Bakteerit, joita on inkuboitu AuC-liposomihydrogeelin kanssa pH:ssa 4,5; C) Zoomattu kuva kohteesta B). Reprinted from ref 7., International Journal of NanoMedicine 2018 13 2217-2263, Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd.

Useiden tutkimusten mukaan Au-NP:iden antimikrobinen vaikutus on suhteellisen heikko. Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että muiden metallien nanohiukkasten antibakteerisen vaikutuksen saavuttamiseksi oli käytettävä huomattavasti korkeampaa Au-NP-tasoa:

esimerkiksi 197 µg/ml AuNP:ta vastasi 4,86 µg/ml AgNP:ta *S. aureusta* vastaan.¹³ Vaikka kultananopartikkeleiden antimikrobinen aktiivisuus on hopeananopartikkeleita heikompi, on kultananopartikkeleilla omat etunsa. Esimerkiksi hopeananopartikkeleihin verrattuna kultananopartikkelit eivät ole myrkyllisiä osteoblastisoluille, minkä vuoksi AuNP:ita voidaan hyödyntää esimerkiksi luun regeneraatioissa. Koska AuNP:ita sisältävät hydrogeelit eivät juurikaan vaikuta luun luonnolliseen kasvuun, ne ovat lupaavia materiaaleja ortopedisessä kirurgiassa.⁷

4.4 Muut metallit

Hopean ja kullan lisäksi on myös muitakin metalleja, joilla on antimikrobisia ominaisuuksia mikrobeita vastaan. Näiden metallipartikkeleiden yhdistämistä hydrogeeleihin sekä hydrogeelien antimikrobisia ominaisuuksia on tutkittu esimerkiksi sinkillä, kuparilla ja raudalla. Näistä sinkki on suosituin antimikrobinen aine. Kaikki näistä metalleista ovat pieninä pitoisuuksina välttämättömiä bakteerisolujen toiminnalle, mutta suurina määrinä tuhoavat bakteerisolut.^{7, 13}

Sinkki on monissa biolääketieteellisissä sovelluksissa ja kosmeettisissa materiaaleissa käytetty antimikrobinen aine, sillä sinkkioksidinanopartikkeleiden (ZnONP) antibakteerinen aktiivisuus ja soluille turvallinen pitoisuus on hyvin tunnettu.^{3,7} Lisäksi ZnONP:t ovat bioyhteensopivia.³ Sinkki-ionien (Zn^{2+}) tiedetään osallistuvan bakteerisolujen lisääntymisen säätelyyn, erilaistumiseen tai kalvorakenteen säilymiseen sekä lisäksi ne osallistuvat moniin tärkeisiin aineenvaihduntareitteihin. Pieninä pitoisuuksina sinkin hyödylliset vaikutukset ovat hallitsevia, kun taas suuret pitoisuudet estävät bakteerien kasvun.¹³

Sinkkioksidinanopartikkeleiden toimintamekanismeja mikrobeja vastaan on useita. ZnONP:t voivat sitoutua bakteerisolun solukalvoon tuhoten solukalvon lipidit ja proteiinit aiheuttaen lisääntyntä solukalvon läpäisevyyttä ja bakteerisolujen solukuoleman. ZnONP:ista voi vapautua myös Zn^{2+} -ioneja, mikä aiheuttaa ROS:ien muodostumisen. Nämä puolestaan voivat vahingoittaa bakteerisolua. ZnONP:t on todettu olevan tehokkaita sekä Gram-positiivisia että Gram-negatiivisia bakteereja vastaan, sillä ne ovat antibakteerisia myös korkeissa lämpötiloissa ja paineessa säilyviä bakteeri-itöitä vastaan.⁷ ZnONP:iden useista antimikrobisista toimintamekanismeista huolimatta on raportoitu *P. aeruginosan* ja *Proteuksen* olevan sinkille resistenttejä.³

Viimeaikaisissa tutkimuksissa ZnONP-hydrogeelit ovat kuitenkin osoittaneet suurta potentiaalia lääkeaineiden kuljetuksessa ja haavojen paranemisessa sekä biolääketieteellisten laitteiden pinnoitteena. Esimerkiksi CMC/ZnO-nanokomposiittihydrogeelin on todettu osoittavan antibakteerisuutta *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan.⁷ On myös havaittu, että bakteerien mikroympäristön muutoksiin reagoivien kuljetuskantajien käyttö parantaa ZnONP:iden antimikrobista vaikutusta.³ AuNP:iden tavoin ZnONP:illa on huomattu olevan positiivinen vaikutus luun regeneraatioon, mikä tekee niistä myös lupaavan materiaalin ortopedisissä leikkauksissa. Vaikka ZnONP:den antibakteerinen kyky on suhteellisen heikko, sen alhaisen sytotoksisuuden vuoksi sillä on todettu olevan potentiaalia kliinisessä käytössä.⁷

Sinkin tavoin myös kuparilla on keskeinen rooli monissa solujen biologisissa prosesseissa. Kupari on tärkeä kofaktori useille entsyymeille, jotka osallistuvat hengitys- ja fotosynteesiprosesseihin. Kuparilla on siis monia erilaisia rooleja vuorovaikutuksessa eri proteiinien kanssa. Kuparin keskeisiksi antimikrobisiksi toimintamekanismeiksi ehdotetaan solukalvon vaurioittamista, muutosten aiheuttamista solunsisäisiin biokemiallisiin prosesseihin ja DNA:n vaurioittamista. On havaittu, ettei kuparin antimikrobisuuden pääasiallisiin mekanismeihin kuuluisi metallivälitteisten ROS:ien muodostus. Sen sijaan kuparin antimikrobisuuden toimintamekanismeihin kuuluu entsyymien väärin metalloitumisen seurauksen inaktivoituminen sekä metalliklustereiden purkaminen. Kuparin, kuten muidenkin metallien, tarkat antimikrobiset toimintamekanismit ovat yhä epäselvät.¹³

Vaikka kuparia sisältävien nanopartikkeleiden (CuNP/CuONP) antibakteerinen vaikutus on AgNP:ita heikompi, on niillä parempi mikrobisidisten mekanismien kirjo sieniä sekä bakteereja, kuten *E. colia*, *S. aureusta* ja *Listeria monocytogeneesia* vastaan. Kuparinanopartikkeleilla ladatut CMC/CuO-nanokomposiittihydrogeelit ja kuparipartikkeleilla ladatut CS-hydrogeelit osoittivat erinomaisia antibakteerisia vaikutuksia *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan ilman havaittua sytotoksisuutta.⁷

Bakteereille välttämätön mikroelementti on myös rauta, joka osallistuu moniin biologisiin prosesseihin, kuten DNA-synteesiin ja energia-aineenvaihduntaan. Suurina määrinä rauta kuitenkin tuhoaa bakteerisolun. Raudan metallioksidinanopartikkeleilla (FeONP) on rautaioneja ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) tehokkaampi antimikrobinen aktiivisuus niiden suuremman pinta-alan vuoksi. Raudan antimikrobisia toimintamekanismeja ovat ROS:ien muodostuminen ja solukalvon vaurioittamien, mitkä johtavat bakteerisolun solukuolemaan. Useat tutkimukset ovat osoittaneet Gram-positiivisten bakteereiden suuremman herkkyyden FeONP:ille kuin Gram-negatiivisten bakteereiden.¹³

Metallipartikkeleita voidaan pitää lupaavana vaihtoehtona antibioottiresistenssin ratkaisemiseksi, sillä niillä on osoitettu olevan useita etuja bakteerien aiheuttamia tauteja vastaan.¹³ Metallipartikkeleiden laajasta käytöstä huolimatta bakteerien kehittämää resistenssiä niitä vastaan on raportoitu harvoin, minkä oletetaan johtuvan niiden useista antimikrobisista toimintamekanismeista. Lisäksi metallipartikkeleiden pieni koko sallii niiden aiheuttaa bakterisolulle solunsisäisiä sekä -ulkoisia vaurioita. Metallinanopartikkeleiden stabiiliuden vuoksi ne pystyvät tuhoamaan jäljellä olevia mikrobisoluja kuolleesta bakterisolusta vapauduttuaan.⁷ Nämä kaikki ominaisuudet tekevät niistä houkuttelevan tutkimuskohteen erilaisiin lääketieteellisiin sovelluksiin.

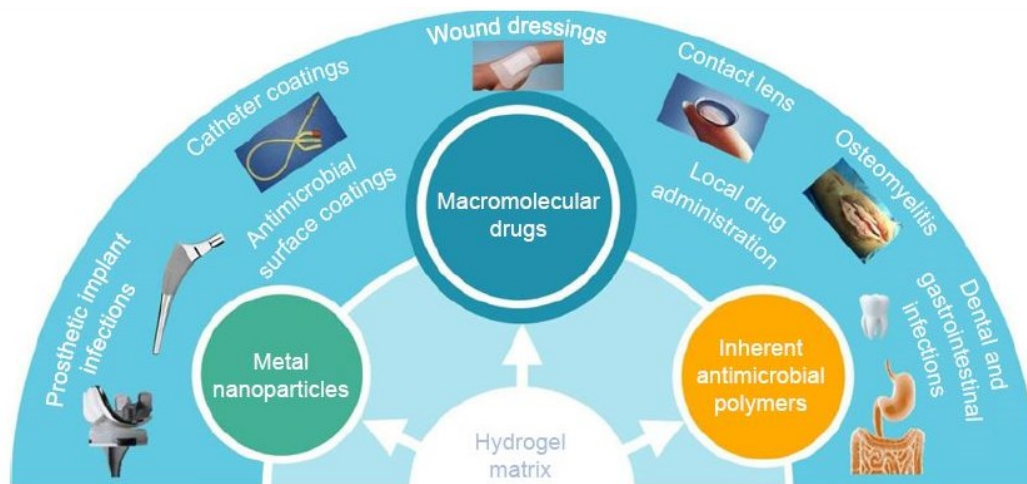
5 Polymeeristen metallogeelien lääketieteelliset sovellukset

Erialaisten biomateriaalien ja lääkinnällisten laitteiden nopean kehityksen myötä ovat kehittyneet vakavat HAI:t, joista yleisimpiä ovat verenkierroinfektiot, hengityskoneeseen liittyvä keuhkokuume, leikkauskohdan infektiot ja katetriin liittyvät virtsatieinfektiot.^{7,15} Kuten kappaleessa 3 mainittiin, näitä vakavia terveydenhoitoon liittyviä infektioita aiheuttavia yleisiä patogeenejä ovat esimerkiksi *S. aureus*, *E. coli* ja *P. aeruginosa*. HAI:den hoidon perustana olleet antibiootit eivät enää antibioottiresistenssin ja biofilmien muodostumisen myötä ole riittävän tehokkaita näiden infektioiden torjumiseen. HAI:t ovat vakava huolenaihe, sillä ne voivat aiheuttaa korkeaa sairastavuutta ja kuolleisuutta.¹⁵

Erialaista menetelmiä on kehitetty sellaisten materiaalien valmistamiseksi, joilla olisi antimikrobisia vaikutuksia infektioiden ehkäisemiseksi tai hoitamiseksi esimerkiksi haavassa tai implantin ja muiden lääkinnällisten laitteiden asennuskohdissa. Materiaalit voidaan kyllästää näillä ajan myötä vapautuvilla antimikrobisilla aineilla tai materiaalin pintaa voidaan muokata kovalenttisesti immobilisoimaan antimikrobiset aineet, jotka antavat antimikrobisia ominaisuuksia materiaalin pinnalle. Hydrogeelit ovat osoittautuneet lupaavaksi materiaaliksi tällaisten antimikrobisten aineiden suunnittelulle muun muassa niiden bioyhteensopivuuden ja luonnollisen kudoksen kaltaisten mekaanisten ominaisuuksien vuoksi. Erityisen mielenkiintoisen materiaalin hydrogeeleistä tekee niiden antimikrobinen muokattavuus esimerkiksi metallipartikkeleita tai muita antimikrobisia aineita lisäämällä.⁵

Antimikrobisten hydrogeelien on havaittu sekä estävän biofilmien muodostuminen että biomateriaaliin liittyvä infektio. Antimikrobisten hydrogeelien lääketieteellisiä käyttökohteita

ovat esimerkiksi implanttien, katetrien ja piilolinssien antimikrobiset pinnoitteet, haavasidokset, osteomyeliittien hoito sekä hampaiden ja ruuansulatuskanavan infektiot (kuva 8).^{7,15} Lisäksi hydrogeelejä voidaan käyttää lääkkeiden kuljetus- ja annostelujärjestelmänä, sillä turvallisen ja tehokkaan lääkekuljetuksen avulla voitaisiin vaikuttaa esimerkiksi perinteisten antibakteeristen lääkkeiden sytotoksisuuteen ja yliannostukseen.⁷ Tässä luvussa käsitellään metallipartikkeilla ladattujen hydrogeelien mahdollisuuksia haavasidoksissa, antimikrobisissa pinnoitteissa sekä lääkekuljetuksessa.



Kuva 8. Antimikrobisten hydrogeelien lääketieteellisiä sovelluksia. Reprinted from ref 7., International Journal of NanoMedicine 2018 13 2217-2263, Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd.

5.1 Haavasidokset

Haavojen parantuminen on yksi monimutkaisimmista prosesseista monisoluisissa organismeissa ja siihen liittyy useita eri vaiheita: hemostaasi eli verenvuodon tyrehtyminen; inflammaatio eli tulehdusreaktiovaihe, jonka aiheuttaa kehon oma ärsyke taudinaiheuttajan sijaan; proliferaatio eli korjausvaihe ja maturaatio eli kypsyysvaihe. Bakteeri-infektiot ovat yksi vakavimmista ongelmista haavojen paranemisessa, sillä infektio voi pidentää ja heikentää haavan paranemisprosessia, mikä johtaa kudosten sairastumiseen ja infektion vakavuudesta riippuen mahdollisesti myös verenmyrkytykseen.^{5,16} Infektioita esiintyy haavassa, kun yhden tai useamman haavassa olevan mikro-organismien virulenssitekijät onnistuvat voittamaan

elimistön immuunijärjestelmän. Infektoituneiden haavojen komplikaatiot riippuvat mikro-organismien patogeenisuudesta ja potilaan immuniteetista. Infektioiden tyypillisiä kliinisiä oireita ovat kipu, kuumotus, punoitus, turvotus, arkuus, selluliitti ja paise. Infektio haavassa voi aiheuttaa akuutteja vasteita ja viivästyttää haavan paranemisprosessia. Infektoituneiden haavojen yleisiä haavapatogenejä ovat *S. aureus*, *E. coli* ja *S. epidermis*.¹⁷

Bakteeri-infektioiden vähentämiseen tähtäävä haavahoito on herättänyt paljon huomioita viime aikoina.¹⁶ Erityisesti kroonisten haavojen hoito vaatii usein toistuvia haavasidosten vaihtoja ja lukuisia sairaalahoitoja, mikä aiheuttaa potilaalle taloudellista huolta ja heikentää merkittävästi elämänlaatua.¹⁸ Ihanteellisen haavasidoksen tulisi olla imukykyinen poistaakseen eritteen ja toksiinit, säilyttää kosteus siteen ja haavan rajapinnassa, sallia kaasujen vaihto, antaa lämpöeristys, välttää bakteerien aiheuttamia infektiota ja olla turvallinen potilaalle. Lisäksi haavasidoksen tulisi olla potilaalle miellyttävä ja kestävä, ärsyttämätön ja helposti irrotettava sekä sen tulisi vähentää arven muodostumista.¹⁶ Erityisesti haavan kosteana pidetty ympäristö on tärkeä, sillä se helpottaa solujen adheesiota, kasvua ja migraatiota, edistää angiogeneesiä eli verisuonten uudismuodostumista, nopeuttaa granulaatiokudoksen muodostumista ja helpottaa uudelleen epitelisaatiota. Kaikki nämä ominaisuudet huomioiden, hydrogeelit ovat yksi kilpailukykyisimmistä vaihtoehdoista uudenaikaisiksi haavasidoksiksi.¹¹

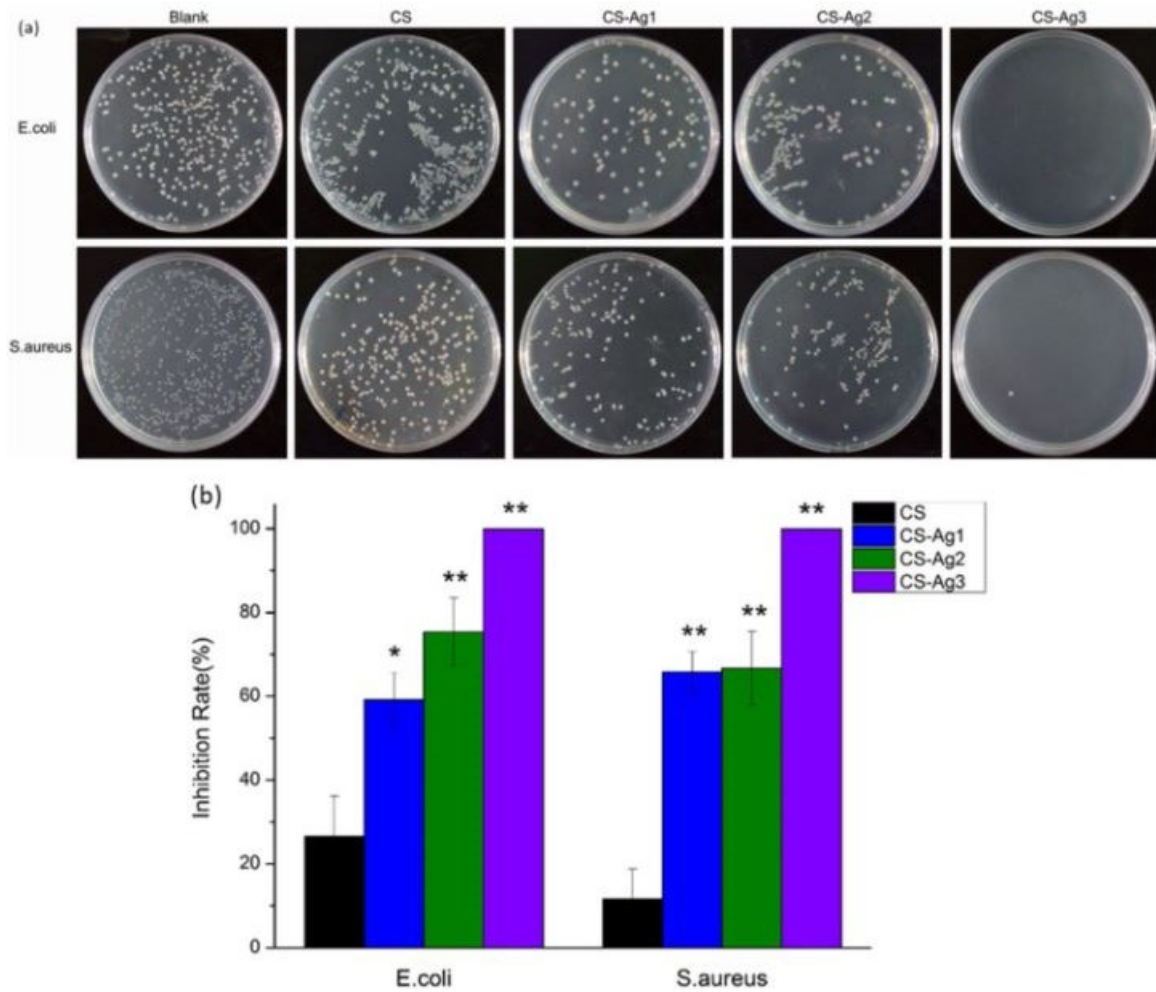
Hydrogeelit paitsi toimivat haavassa esteenä haitallisille mikro-organismeille, ne säilyttävät myös kostean ympäristön haavan rajapinnassa tarjoten kolmiulotteisia rakenteita solujen kiinnittymiselle ja leviämiselle. Tämä mahdollistaa kaasujen, ravinteiden ja aineenvaihduntatuotteiden vaihdon.¹¹ Luonnollisista polymeereistä, kuten esimerkiksi natriumalginaatista, karboksyyylimetyyliselluloosasta ja kitosaanista, valmistetut polymeeriset hydrogeelit ovat erityisen lupaavia biomateriaaleja haavasidoksiksi niiden biologisen yhteensopivuuden ja biohajoavuuden vuoksi. Näillä luonnollisilla polymeereillä on ainutlaatuisia etuja haavojen paranemisessa, kuten hemostaasi, tulehduksen estäminen ja solujen lisääntyminen. Luonnon polymeereistä kitosaanilla on lisäksi luonnollisia antimikrobisia ominaisuuksia, mitkä useimmilta luonnollisilta polymeereiltä puuttuvat. Hydrogeelimatriiseihin lisätyt antimikrobiset aineet, kuten metallipartikkelit, kuitenkin tarjoavat hydrogeelille kaivatut antimikrobiset ominaisuudet mikrobi-infektioita vastaan.¹⁶

On osoitettu, että metalleja sisältävien komposiittien vaste riippuu metalli-ionin pitoisuudesta.¹⁶ Esimerkiksi Zn²⁺-ladatulla SA-pohjaisella hydrogeelillä haavasidoksena oli hyvät antimikrobiset ja biologiset ominaisuudet *S. Aureusta* ja *E. colia* vastaan, kun Zn²⁺-pitoisuus oli säädetty 0,0001 paino-%. Liian suurta pitoisuutta tulee välttää solumyrkyllisyyden vuoksi.¹⁸ Hydrogeelien valmistaminen metalli-ionin ja polymeerimatriisin välisillä

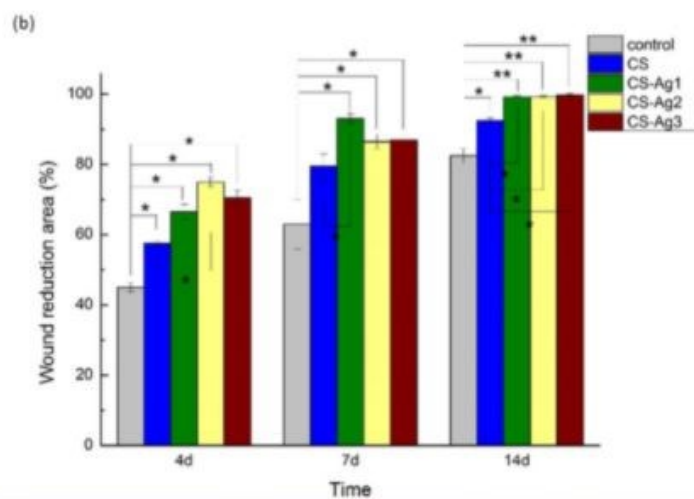
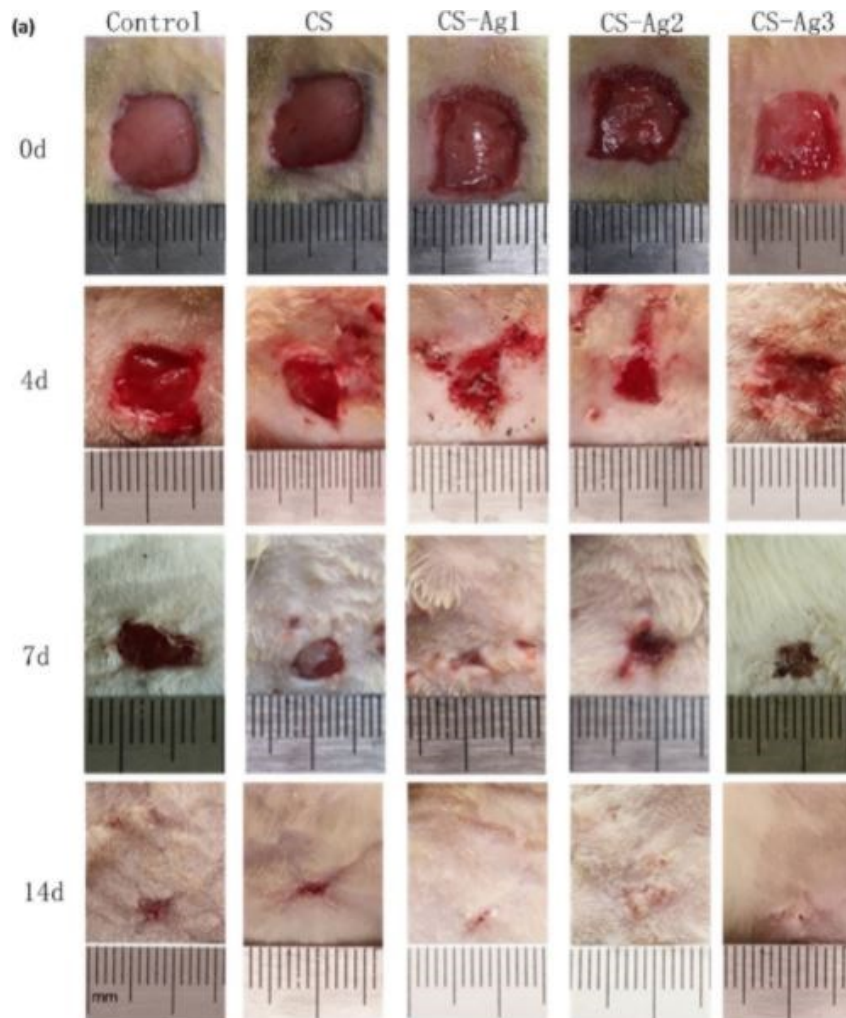
metallikoordinaatiosidoksilla voi mahdollistaa metalli-ionien hallitun vapautumisen ja lisäksi parantaa hydrogeelien mekaanista lujuutta, johon voidaan vaikuttaa metalli-ionien pitoisuutta säätämällä.¹⁶

Haavasideksissa metallinanopartikkeleista Ag- sekä Ti- ja ZnONP:t ovat yleisimmin käytettyjä metallinanopartikkeleita ja erityisesti hopeananopartikkeleiden käyttöä on tutkittu laajasti sen haavanparanemista stimuloivien ominaisuuksien sekä sen luonnollisen antimikrobisuuden vuoksi.¹⁵ Esimerkiksi AgNP:llä ladatuilla BC-hydrogeeleillä havaittiin antimikrobista aktiivisuutta *S. aureusta*, *P. aeruginosaa* ja *Candida aurista* vastaan.¹⁶ Myös alginaattipohjainen AgNP-hydrogeeli vähensi tehokkaasti inflammaatiota ja edistivät kudosten korjausta hiirillä suoritetuissa haavakokeissa. Lisäksi on havaittu, että AgNP:ita sisältävien hydrogeelien haavan paranemiseen liittyviä ominaisuuksia voidaan parantaa terapeuttisia aineita lisäämällä. Hiirillä testattaessa infektoituneiden diabeettisten haavojen parantuminen oli tehokkainta ja nopeampaa kun sidoksen yhteydessä vapautui sekä hopeananopartikkeleita että tulehdusta estäviä fibrolasteja stimuloivia lääkkeitä.¹⁵

Hopeananopartikkeleita sisältävä kitosaanipohjainen hydrogeeli syntetisoitiin sen antimikrobisten ominaisuuksien sekä haavan paranemisominaisuuksien tutkimiseksi. AgNP:illa ladatut kitosaanihydrogeelit valmistettiin upottamalla valmistetut CS-hydrogeelit vesiliuoksiin, joissa oli erilaiset hopeanitraattipitoisuudet (CS-Ag1: 1,0 g/100 ml; CS-Ag2: 2,0 g/100 ml; CS-Ag3: 3,0 g/100 ml). Lopuksi Ag⁺-ionit pelkistettiin AgNP:iksi. AgNP:itä sisältävä kitosaanipohjaisen hydrogeelin mekaaniset ominaisuudet osoittautuivat hyviksi, minkä lisäksi sen antibakteeriset vaikutukset *S. aureusta* ja *E. colia* vastaan olivat erinomaiset (kuva 9). AgNP-CS-hydrogeelin ominaisuudet paransivat merkittävästi myös haavan paranemista hiirillä suoritetuissa haavakokeissa *in vivo* (kuva 10). AgNP-ladatuissa kitosaanipohjaisissa hydrogeeleissä kitosaani pystyy säätelemään hopean myrkyllisyyttä sallimalla kuitenkin hopean antimikrobiset vaikutukset.¹¹ Tämä on merkittävä ominaisuus, sillä hopean ja sinkkioksidin rajoitukset ovat liittyneet niiden biologisen yhteensopivuuden haasteisiin.¹⁵



Kuva 9. AgNP:illa ladattujen CS-hydrogeelien antibakteerinen käyttäytyminen *E. coli* ja *S. aureusta* vastaan 24 tunnin kuluttua. Antibakteerisuus lisääntyy AgNP-pitoisuuden kasvaessa. Reprinted from ref. 11, Copyright 2018, with permission from Elsevier.



Kuva 10. Valokuvat haavojen paranemisprosessista, joita on käsitelty erilaisilla haavasidoksilla 0, 4, 7 ja 14 päivää haavan syntymisen jälkeen. Reprinted from ref. 11, Copyright 2018, with permission from Elsevier.

Tällaiset antimikrobisilla aineilla ladatut hydrogeelit ovat osoittaneet perinteisiin haavasidosmateriaaleihin verrattuna monia etuja, jotka edistävät haavan paranemisprosessia. Vaikutus voi olla seurausta polymeerimatriisien ja nanomateriaalien erilaisista ominaisuuksista, jotka usein myötävaikuttavat synergistisesti haavan paranemisprosessiin.¹⁹ Vaikka monet näistä antimikrobisista geeleistä osoittautuivat tehokkaiksi laajaa patogeenien kirjoa vastaan, tarvitaan pitkäkestoisia tutkimuksia niiden mahdollisten haittavaikutusten arvioimiseksi.¹⁵

5.2 Antimikrobiset pinnoitteet

Viime vuosikymmeninä laitesuunnittelun ja materiaalitieteen kehityksen myötä implantoitavien lääkinnällisten laitteiden käyttö on lisääntynyt vaurioituneiden tai sairaiden kudosten toimintojen palauttamiseksi ja potilaan elämänlaadun parantamiseksi. Erityisen yleinen haaste laitteisiin liittyen on infektioiden kehittyminen aseptisten tekniikoiden edistymisestä ja perioperatiivisen antimikrobisen ennaltaehkäisyyn käytöstä huolimatta. Esimerkiksi keinoiveltulehdukset ovat yksi yleisimmistä lääkinnällisten laitteiden infektiosta johtuen proteesien laajasta käytöstä. Implanttitulehdukset ovat yleisin korjausleikkauksen syy kaikissa polven tekonivelleikkauksissa ja yleisin syy polvi- ja lonkkaproteesien poistoissa. Kirurgisen hoidon estämiseksi varhainen diagnoosi on avainasemassa, sillä pinnallisia infektiota voidaan hoitaa antibiooteilla suurella onnistumisprosentilla. Diagnoosit voivat kuitenkin olla haastavia, sillä implantaatti-infektioille ei ole vahvistettu yhtenäisiä kriteerejä.²⁰

Lääkinnällisiin laitteisiin, kuten implantaatteihin sekä kirurgisiin työkaluihin, dialyysikalvoihin ja katetreihin, liittyvät infektiot johtuvat tyypillisesti mikro-organismeista, jotka kasvavat biofilmeissä.^{19, 20} Biofilmin muodostuminen alkaa bakteerien kiinnittymisestä laitteen pintaan tai adsorboituihin isäntäproteiineihin.²⁰ On havaittu, että substraatin pintaan jopa yksittäinen kiinnittyvä bakteeri voi muodostaa biofilmin alle 24 tunnissa.²¹ Tämän vuoksi antibakteeriset pinnat, jotka estävät bakteerien kiinnittymisen ja sen avulla biofilmin muodostumisen, ovat tavoiteltavia.²⁰ Tällaisten antibakteeristen pintojen suunnittelussa on kolme vaihtoehtoista strategiaa: bakteereita hylkivät (bacteria-repelling) pinnat, kosketustuhoamispinnat (contact killing) ja antimikrobisen aineen aktiivinen vapautuminen pinnoilta (bactericide-releasing (kuva 11)).²¹



Kuva 11. Strategiat antibakteeristen hydrogeelipinnoitteiden suunnitteluun. Reprinted from ref. 20, Copyright 2020, with permission from Elsevier.

Bakteereja hylkivät pinnat voivat estää bakteerin kiinnittymisen pinnalle, kosketustuhoamispinna tuhoavat kiinnittyvän bakteerin ja antimikrobisia aineita vapauttava pinta voi tuhota sekä kiinnittyvät bakteerit että planktoniset, eli kelluvat, mikrobit. Hydrogeelipinnoitteiden ainutlaatuinen etu on paksuuden säätely antimikrobisten aineiden lataamisessa sekä kostutettavuus ja vaihtelevat kemialliset rakenteet. Näiden kaikkien ominaisuuksien ansiosta hydrogeelipinnoitteet voivat sisältää nämä kaikki kolme strategiaa.²¹

Antimikrobisia metallipartikkeleilla ladattuja hydrogeelejä on testattu esimerkiksi implanttien, katetrien ja piilolinssien antimikrobisiksi pinnoitteiksi. Esimerkiksi hopeananopartikkeleilla ladattu polyetyleeniglykolidiakrylaatti-ko-polyakryylihapo-hydrogeeli titaani-implanttien pinnoitteena osoitti tehokasta antibakteerista aktiivisuutta *S. aureusta*, *P. aeruginosaa* ja *E. colia* vastaan. Vaikka useita antimikrobisia implanteja on tutkittu, vain pieni osa niistä on saavuttanut kliiniset tutkimukset. Tämä korostaa tehokkaampien ja luotettavampien menetelmien kehittämistarvetta.¹⁵

Yleisimmät verenkiertoinfektioiden aiheuttajat ovat virtsa- ja suonensisäiset katetrit huolimatta niiden terminaalista sterilisaatiosta, sillä asentamisen jälkeen ne keräävät useita mikrobien kiinnittymistä edistäviä biomolekyylejä.¹⁵ Katetrit voivat toimia myös bakteerien kulkuvälineinä sairaalaympäristöstä potilaaseen.⁵ Fisher *et al.*¹⁵ kehittivät katetreille pitkäaikaisen antimikrobisen pinnoitteen yhdistämällä hopeananopartikkelit antikoagulantti polyetyleeniglykoli-ko-hepariiniin. Saatu monikerroksinen pinnoite osoitti jatkuvaa antiseptistä aktiivisuutta *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan viiden päivän ajan sekä hemoyhteensopivuuden ihmisen vereen. Kaikista uusista menetelmistä huolimatta useimmat näistä katetreista ovat epäonnistuneet mikrobiresistenssin pitkäaikaisen tehon puutteen tai potilaan kokeman epämiellyttävyyden vuoksi.¹⁵

Näönkorjaamiseen käytetyissä piilolinssissä esiintyvät bakteeri-infektiot ovat vakava huolenaihe, joka voi johtaa erilaisiin silmäsairauksiin. Esimerkiksi kvaternisoidusta kitosaanista, AgNP:ista ja grafeenioksidista muodostetut hybridihydrogeelilinsit osoittivat hyviä antimikrobisia ominaisuuksia ja sytoyhteensopivuutta. Vaikka tällaisten piilolinssien tutkimukset ovat olleet lupaavia, tarvitaan lisää eläin- ja ihmiskokeita ennen näiden antimikrobisten linssien kliinistä käyttöä, sillä on tärkeää varmistaa niiden pitkän aikavälin tehokkuus ja turvallisuus.¹⁵

Biolääketieteellisten materiaalien implantointiin steriilin ympäristön ylläpitämiseksi liittyy myös haaste vierasesinevasteesta, minkä ne voivat laukaista kollageenikapselin muodostumisen kautta. Tämänkaltainen hyljintäreaktio aiheuttaa implantin pysyvän eristyksen muista kudoksista, mikä haittaa sen toimintaa. Implanttien pinnoitteena testatun polyhydroksietyylimetakrylaatista ja AgNP:ista valmistetun huokoisen hydrogeelin on kuitenkin havaittu osoittavan antimikrobisuutta Gram-positiivisille ja -negatiivisille bakteereille estäen samalla vierasesinevasteen eli kollageenikapselin muodostumisen *in vivo*.²²

Antimikrobisten pinnoitteiden metallipartikkelit, jotka estävät biofilmien muodostumista, voivat olla myrkyllisiä bakteerisolujen lisäksi myös ihmisoluille. Metallien aiheuttamaa myrkyllisyyttä ihmisoluille voitaisiin vähentää ärsykeisiin reagoivilla hydrogeeleillä. pH-herkän AgNP-dendrimeeri-hydrogeelin syntetisointi implantoitavien lääkinnällisten laitteiden pinnoitteeksi osoitti antibakteerista aktiivisuutta Gram-positiivisia sekä -negatiivisia bakteereja vastaan. Bakteerien laukaiseman pH:n happamoitumisen seurauksena pinnoite osoitti minimaalisella sytotoksisuudella ylivoimaista antibakteerista aktiivisuutta verrattuna kaupallisiin valmisteisiin.²²

Näiden biolääketieteellisten sovellusten kannalta antimikrobisten pinnoitteiden on olennaisinta estää biofilmien muodostuminen pinnoille pitämällä lääkinnällisten laitteiden ja instrumenttien pinnat vapaina kiinnittyvistä bakteerisoluista. Tähän tarkoitukseen pyritään näiden M-NP:illa ladattujen hydrogeelipinnoitteiden aktiivisilla ja passiivisilla menetelmillä. Aktiivisessa menetelmässä hydrogeelin sisältämät metallinanopartikkelit suojaavat pintoja antimikrobisilla toimintamekanismeillaan tuhoten bakteerisoluja. Passiivisessa menetelmässä taas vähennetään bakteerisolujen adsorptiota pinnoilla. Näillä M-NP:illa ladatuilla hydrogeeleillä on siis monia ihanteellisille antimikrobiselle pinnoille kuuluvia ominaisuuksia, kuten bakteerisolujen tarttuvuuden esto, bakterisidinen aktiivisuus ja itsepuhdistavuus kuolleiden bakteerisolujen poistamiseksi.¹⁹

5.3 Lääkekuljetus

Lääkekuljetus on kiinnostava tutkimusala, sillä lääkkeen toimittaminen sen terapeuttisten vaikutuksien kohteeseen on yksi lääke- ja bioteknologiatoiminnan suurimmista haasteista. Lääkekuljetus voidaan määritellä prosessiksi, jossa bioaktiivinen aine vapautuu tietyllä nopeudella tietyssä paikassa. Kohdennettu lääkekuljetus on nousemassa ratkaisuksi, jotta voidaan hyödyntää tuhansia uusia lääkkeitä, joita tällä hetkellä rajoittaa turvallisen ja tehokkaan lääkkeenkuljetusjärjestelmän puute. Kohdennetun lääkekuljetuksen ansiosta lääkkeitä voidaan kuljettaa tehokkaammin ja kätevämmiin kuin aikaisemmin, lisätä potilaiden hoitomyönteisyyttä, pidentää tuotteen elinkaarta ja vähentää terveydenhuollon kustannuksia. Lisäksi ne voivat suojata ja parantaa helposti hajoavien peptidien ja proteiinien farmakokinetiikkaa, joilla on usein lyhyt puoliintumisaika *in vivo*.²³

Hydrogeelejä on käytetty lääkekuljetuksessa näiden nykyisten haasteiden, kuten lääkkeiden antomenetelmien mukaan lukien suurien annoksien ja toistuvan annon sekä potilastoksisuuden, voittamiseksi.¹⁵ Hydrogeelit ovat erityisen houkutteleva uudenlainen lääkkeenkuljetusjärjestelmä ja niitä on käytetty monilla lääketieteen aloilla, kuten kardiologiassa, onkologiassa, immunologiassa, haavan paranemisprosesseissa sekä kivunhallinnassa.²⁴ Hydrogeelit voivat toimia kantajina monille lääkkeille ja antimikrobisille aineille, mukaan lukien M-NP:t, antibiootit, synteettiset antimikrobiset aineet ja biologiset tuotteet.^{15, 24}

Hydrogeelit voivat tarjota spatiaalista ja ajallista hallintaa näiden erilaisten terapeuttisten aineiden vapautumiselle. Säädeltävien fysikaalisten ominaisuuksiensa, hajoavuuden ja lääkkeitä hajoamiselta suojaavan kyvyn vuoksi ne toimivat alustana, jolla tapahtuu erilaisia fysikaaliskemiallisia vuorovaikutuksia lääkkeiden kanssa niiden vapautumisen säätelyä varten.²⁴ Hydrogeelit lääkkeenkuljetusjärjestelmänä ovat suosittu tutkimuskohde myös niiden biologisen yhteensopivuuden sekä hydrofiilisten lääkkeiden suuren latausmahdollisuuden (loading efficiencies) vuoksi. Lisäksi hydrogeelijärjestelmät mahdollistavat lääketta sisältävän hydrogeelin injektioimisen suoraan kohdealueelle, jossa lääke vaikuttaa kohdennetusti ja vapautuu tasaisesti.²²

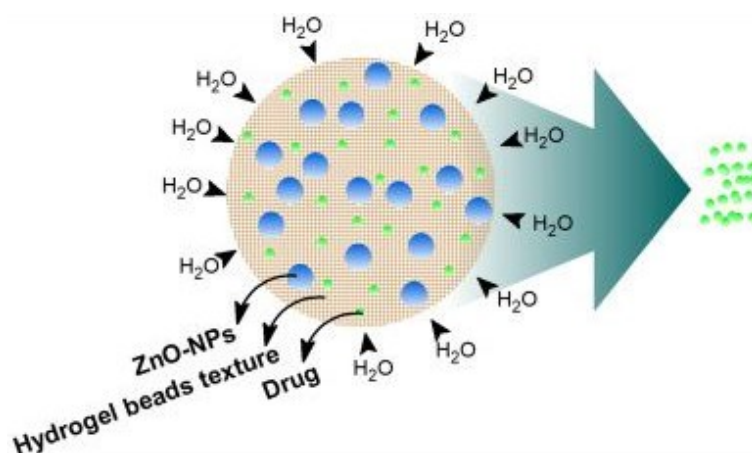
Hydrogeeleillä on myös ainutlaatuisia fysikaalisia ominaisuuksia, kuten turpoaminen, gelaattoriverkoston onkalokoko (mesh size) ja hajoaminen (degradation), joiden avulla ne muodostavat lääkebiomolekyyleihin vaikuttavan 3D-ympäristön. Lääkkeen sisällytyksellä hydrogeelimatriisiin on merkittävä vaikutus lääkkeen vapautumiseen ja sen säätelyyn.

Hydrogeelit ja lääkemolekyylit ovat molemmat kovalenttisia, minkä vuoksi lääkkeiden vapautuminen hydrogeelimatriisista vaatii kovalenttisen sidoksen katkeamisen hydrogeelimatriisin ja lääkemolekyylin välillä. Kovalenttisen sidoksen katkeaminen voi tapahtua kemiallisten reaktioiden, entsyymien tai ulkoisten tekijöiden kuten valon ja pH-muutoksen kautta.²⁵

Hydrogeelien suuren vesipitoisuuden ja suhteellisen suuren huokoskoon vuoksi niihin ladattujen lääkkeiden vapautuminen on kuitenkin tyypillisesti nopeaa. Tämän haasteen voittamiseksi on tutkittu useita lähestymistapoja antimikrobisten aineiden vapautumisen hallitsemiseksi ja samalla niiden biosidiaktiivisuuden tehostamiseksi sekä myrkyllisyyden vähentämiseksi. Uusia tutkittuja strategioita ovat esimerkiksi hydrogeelien ominaisuuksien optimointi, bakteereihin reagoivat hydrogeelit sekä nanopartikkeleiden sisällyttäminen hydrogeeleihin.¹⁵

Useiden viime vuosikymmenten aikana on tutkittu laajasti esimerkiksi metallin nanopartikkeleilla ladattuja hydrogeelipohjaisia järjestelmiä lääkekuljetuksessa. Näiden nanopartikkeleiden toimittamien lääkkeiden parantuneet terapeuttiset tehot on onnistuneesti mukautettu kliiniseen käyttöön.²⁵ Metallipartikkelit voivat hydrogeelissä toimia osana lääkekuljetusta tai ne voidaan ladata hydrogeeleihin antimikrobisiksi lääkkeiksi.²⁵ Näitä metallin nanopartikkeleilla ladattuja hydrogeelejä voidaan hyödyntää sekä passiivisissa että ärsykkeisiin reagoivissa lääkkeiden kuljetus- ja antojärjestelmissä. Näiden ärsykkeisiin reagoivien ominaisuuksien lisäksi nanopartikkeleilla ladattujen hydrogeelien mekaanisia ominaisuuksia voidaan parantaa. Tämä mahdollistaa hydrogeeliin ladattujen lääkkeiden toimitusaikojen pidentämisen, jota muuten rajoittaisi hajoaminen fysiologisissa ympäristöissä.²²

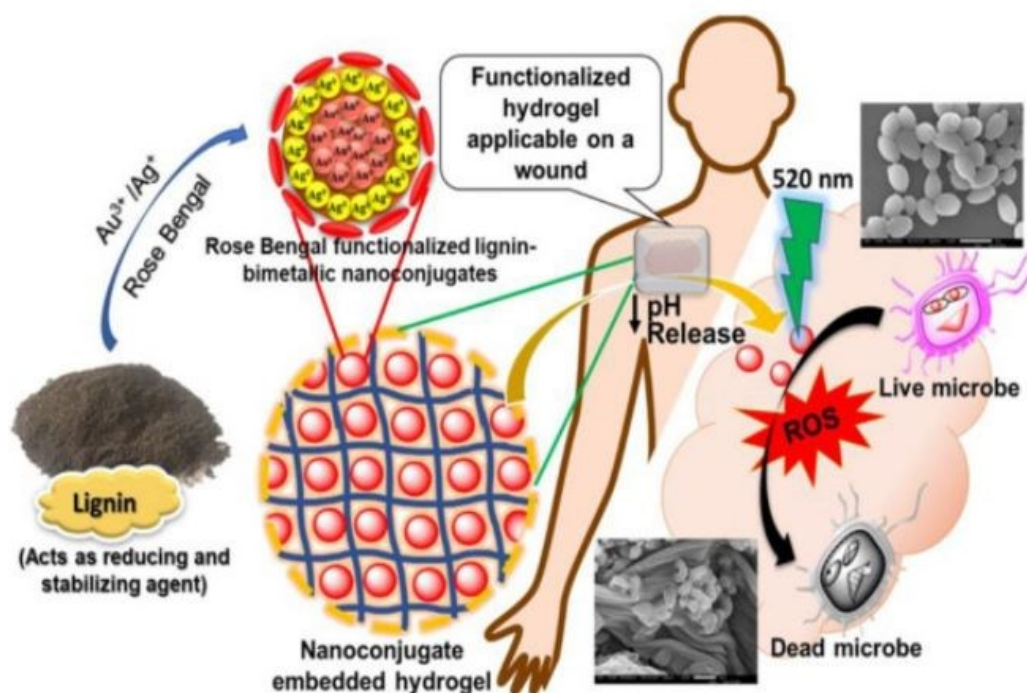
Passiivisessa lääkekuljetuksessa hydrogeelijärjestelmät luottavat tehokkaaseen diffuusion pidentymiseen lääkemolekyylien jatkuvan vapautumisen aikaansaamiseksi. Esimerkiksi AgNP:iden sisällyttäminen geelimatriisiin vähentää hydrofiilisten lääkkeiden hydrogeelijärjestelmän kokonaiskuormitusta pidentäen samalla lääkkeiden vapautumista. Lisäksi AgNP:uden etuna on synergiset vaikutukset mikrobi-infektioiden hoidossa.²² Kuvassa 12 esitettyä CMC/ZnO-hydrogeeleihin ladattujen lääkkeiden jatkuva vapautuminen hydrogeelin turpoamisen ja diffuusion seurauksena.²⁶



Kuva 12. Lääkkeen vapautumismekanismi CMC/ZnONP-hydrogeelihelmeistä veden vaikutuksesta. Reprinted from ref. 25, Copyright 2021, with permission from Elsevier.

Ärsykeisiin reagoivat lääkekuljetusjärjestelmät mahdollistavat latauksen vapautumisen vasteena paikallisen ympäristön muutoksiin. Perinteisissä hydrogeelijärjestelmissä ärsyke on tyypillisesti sairauteen liittyvä biologinen häiriö. Metallinanopartikkeleilla ladatut hydrogeelit voivat reagoida niin ulkoisiin kuin sisäisiin ärsykeisiin reagoivia älykkäitä lääkkeiden kuljetus- ja antojärjestelmiä. Ulkoinen laukaisutekijä voi olla esimerkiksi optinen ärsyke, kuten fototerminen terapia ja sisäisiä ärsykeitä ovat esimerkiksi muutokset pH:ssa, lämpötilassa tai ionipitoisuudessa. Fototerminen terapian sekä muiden lämpöä indusoivien mekanismien lämpövastetta voidaan hyödyntää terapeuttisissa sovelluksissa yhdistämällä lääkkeen vapautuminen näihin lämpöominaisuuksiin.²²

Erytyisesti nanomateriaalien kanssa yhdistetyt pH-herkät hydrogeelit ovat herättäneet suurta kiinnostusta lääkkeiden kontrolloiduissa vapautumisovelluksissa, sillä ne ovat erittäin yhteensopivia ihmiskehon kanssa, jossa on erilaisia pH-alueita. pH-herkissä hydrogeelinanokomposiiteissa hydrogeelimonomeeri sisältää pääasiassa happo- tai emäsherkkiä ryhmiä. Polyakryylihappo-hydrogeeliä käytettiin bimetallisen Au/Ag-nanokonjugaatin pH-herkän älykkään materiaalin kanssa menestyksekkäästi kontrolloituun lääkkeen vapautumiseen (kuva 13). Tämän fotodynaamisen hydrogeelin antimikrobista aktiivisuutta tuktittiin *Candida tropicalis* vastaan fluorosenssimikroskopialla. Havaittiin, että kyseisellä hydrogeelillä käsitellyt bakteerisolut kuolivat fotodynaamisen vaikutuksen alaisena, kun taas käsittelemättömät bakteerisolut olivat terveitä.²⁵

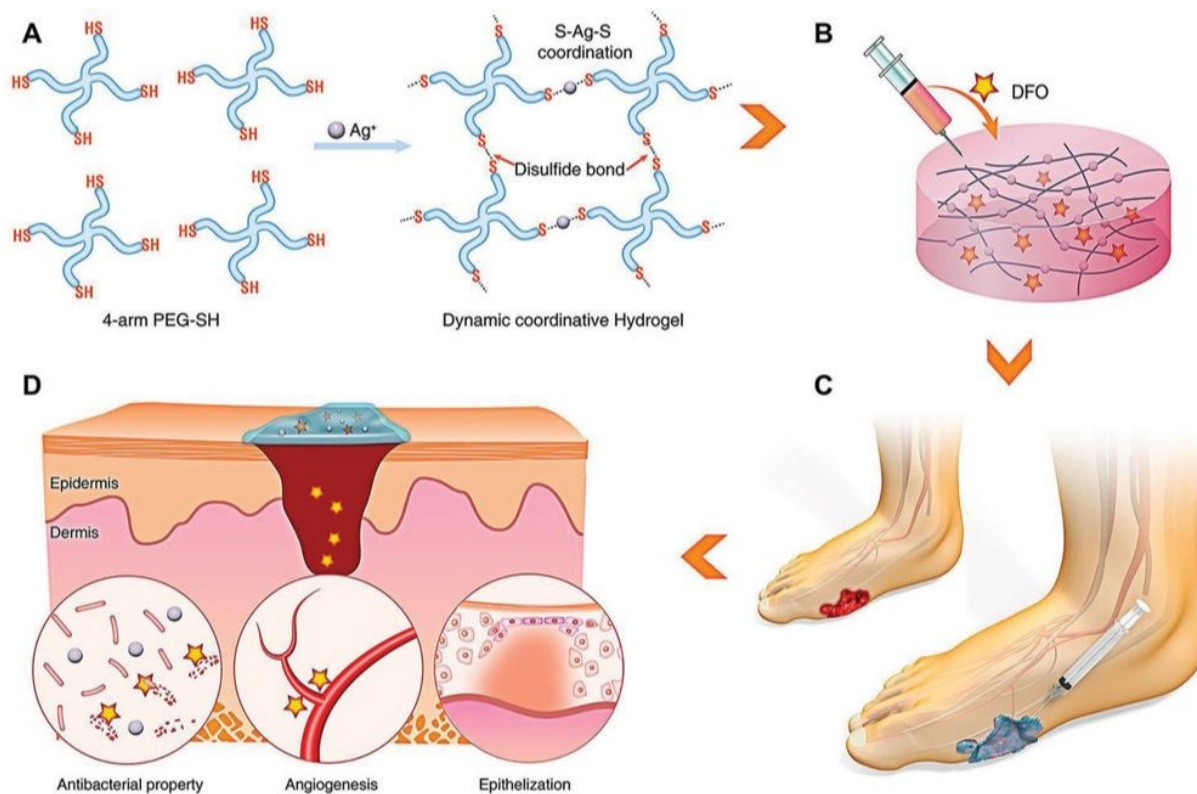


Kuva 13. Bimetallista Au/Ag-nanopartikkeleilla ladattua poly(akryylihapo)hydrogeeliä pH-herkän älykkään materiaalin kanssa käytettiin menestyksekkäästi kontrolloituun lääkkeen vapautumiseen haavassa. Reprinted from ref. 25, Copyright 2022, with permission from Elsevier.

Myös muitakin pH-herkkiä hydrogeelinanokomposiitteja on tutkittu. Eräässä tutkimuksessa valmistettiin sitruunahappo-AgNP/polyvinyylialkoholi-hydrogeeli antibakteerisen siprofloksasiinin lääkekuljetukseen. Valmistettu hydrogeeli toimi siprofloksasiinin kantajana kuljetuksessa ja osoitti ylivoimaista antimikrobista aktiivisuutta *S. aureusta* ja *E. colia* vastaan. pH-herkkää nanokomposiittihydrogeeliä on testattu myös tulehduskipulääke naprokseenin kontrolloidun lääkkeenvapautumisjärjestelmän kehittämiseksi.²⁵

Infektioiden hoidossa käytettävien antibakteeristen lääkkeiden ja tulehduskipulääkkeiden lisäksi M-NP-hydrogeelijärjestelmiä on tutkittu myös syöpälääkkeiden ja haavojen paranemiseen liittyvien lääkkeiden kuljetuksessa. Lämpöherkkää polyakryyliamidista ja kultananopartikkeleista ja -sauvoista valmistettua hydrogeeliä käytettiin syöväntä vastaisen lääkkeen, doksorubisiinin, toimittamiseen rintasyöpäsoluihin. Positiivisia tuloksia havaittiin valosta riippuvaisen lääkkeen vapautumiselle hydrogeelimatriisista. Myös muitakin onnistuneita tutkimustuloksia syöväntä vastaisen lääkkeen vapautumisesta M-NP-hydrogeelijärjestelmästä on raportoitu.²⁵ Eräässä diabeettisten haavojen paranemisisprosessin tutkimuksessa syntetisoitiin polyetyleeniglykoli-SH:n ja AgNO₃:n välillä

ruiskeena annettava hydrogeeli, johon ladattiin deferoksamiinia (DFO). Kyseisellä geelillä havaittiin antibakteerinen ja angiogeeninen kyky diabeettisten haavojen parantamisessa (kuva 14).²⁷



Kuva 14. A) Hydrogeelin muodostuminen; B) Angiogeneesiä edistävän DFO-lääkkeiden *in situ*-kapselointi; C) Hydrogeelin tyypin 1 diabeteksen jalkahaavoille (vasemmalla) ja terapeutinen vaikutus (oikealla); D) Hydrogeelin mekanismi diabeettisten haavojen hoidossa.

Reprinted from ref. 26, © 2020 Wiley-VCH GmbH.

Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että metallinanopartikkeleiden yhdistäminen perinteisten antibioottien kanssa ei ainoastaan vähennä molempien aineiden myrkyllisyyttä ihmisluille vähentämällä suurten annosten tarvetta, vaan myös parantaa niiden bakterisidisia ominaisuuksia. Antibioottien yhdistäminen metallinanopartikkeleiden kanssa myös palauttaa niiden kyvyn tuhota niille resistenttejä bakteereja. Lisäksi synergististen vaikutusten on osoitettu lisäävän antibioottien pitoisuutta bakteri-antibioottivuorovaikutuskohdassa sekä helpottavan antibioottien sitoutumista bakteereihin.¹⁴

Metallipartikkeleilla ladattuja hydrogeelejä on käytetty niin syöpälääkkeiden kuin antibakteeristen lääkkeiden kuljetuksessa sekä hyödyntämällä geelimatriisiin ladattuja

metallipartikkeleita antimikrobisina lääkkeinä. M-NP:illa ladatuilla hydrogeeleillä tehdyt tutkimukset lääkekuljetuksessa ovat olleet lupaavia.²⁵ Hallittu ja pitkittynyt vapautuminen, paikallinen anto, stimuloitu päälle/pois-vapautus, parantunut mekaaninen lujuus ja bioyhteensopivuus ovat etuja, joita hydrogeelijärjestelmät voivat tarjota.⁷

6 Yhteenveto

Lääkeresistenttien bakteerien ja biofilmien ilmaantumisen myötä terveydenhoitoon liittyvien infektioiden tuomat ongelmat ovat kasvaneet. HAI:den korkean kuolleisuuden ja sairastuvuuden vuoksi tarvitaan kiireellisesti vaihtoehtoisia antimikrobisia biomateriaaleja tehottomien perinteisten antibakteeristen lääkkeiden rinnalle.^{3,15} Potentiaaliseksi vaihtoehdoksi ovat nousseet luonnollisista tai synteettistä polymeereistä valmistetut hydrogeelit, joilla on suuri potentiaali käsitellä ja hallita HAI:ta.¹⁵ Uusia ainutlaatuisiin ominaisuuksiin tähtääviä funktionaalisia materiaaleja on kehitetty käyttämällä antimikrobisten nanomateriaalien, kuten metallinanopartikkeleiden, yhdistämistä näihin hydrogeeliverkostoihin.¹⁹

Antimikrobiset hydrogeelit, kuten metallogeelit, voivat auttaa ratkaisemaan näitä antimikrobilääketieteen nykypäivän haasteita, mukaan lukien antibioottiresistenssin. Antimikrobisten hydrogeelien ainutlaatuiset ominaisuudet, kuten kolmiulotteinen verkkorakenne, bioyhteensopivuus sekä mekaaninen muokattavuus, tekevät niistä potentiaalisen materiaalin erilaisiin lääketieteellisiin sovelluksiin.⁷ Näiden antimikrobisten hydrogeelien käyttökohteita lääketieteessä ovat esimerkiksi haavasidokset, piilolinssit, erilaisten infektioiden hoito esimerkiksi antimikrobisten pinnoitteiden avulla, lääkekuljetus sekä kudosteknologia.^{7, 15}

Antimikrobisilla hydrogeeleillä on useita mekanismeja antimikrobilääketieteen haasteita vastaan. Antimikrobisten hydrogeelien paikallinen käytön avulla voitaisiin välttää lääkkeiden systeemisen käytön tuomat ei-toivotut sivuvaikutukset. Uudenlainen lääkekuljetus voisi mahdollistaa antimikrobisten lääkkeiden kestävänsä vapautumisen, pitkäaikaisen antimikrobisen vaikutuksen ja sen avulla voitaisiin välttää myös resistenttien bakteerien seulonta. Lisäksi antimikrobisten hydrogeelien sisältämien nanopartikkeleiden useiden vaikutusmekanismien ansiosta bakteerien on hankala kehittää resistenssiä niitä kohtaan. Hydrogeelien komponenteilla voi olla keskenään synergistisiä vaikutuksia, mitkä tekevät niistä tehokkaampia. Näiden

kaikkien ominaisuuksien avulla antimikrobiset hydrogeelit voisivat tarjota nykyisiä hoitomuotoja laajemman antibakteerisen kirjon ja paremman antimikrobisen vaikutuksen.⁷

Antimikrobisia ominaisuuksia sisältävillä metallogeeleillä on kuitenkin lukuisten hyvien ominaisuuksien lisäksi myös huonoja ominaisuuksia.¹⁵ Vaikka metallinanopartikkeleiden korkea biologinen ja kemiallinen aktiivisuus tekee niistä lupaavia materiaaleja antibakteerisissa hoidoissa, metallien myrkyllisyys rajoittaa niiden käyttöä.¹⁴ Tämän vuoksi lisätutkimuksia tarvitaan metallien antibakteeristen mekanismien selvittämiseksi, jotta bakteerien yksilöllinen herkkyys eri metallikomponenteille voitaisiin ymmärtää paremmin. Metallinanopartikkeleiden pintaa sekä fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia säätämällä voitaisiin vaikuttaa metallin vuorovaikutukseen bakteerin soluseinän kanssa sekä metalli-ionin vapautumiseen. Tämä johtaisi tehokkaampaan bakteerien tuhoamiseen sekä mahdollistaisi käytettyjen yhdisteiden annoksen pienentämisen näiden ei-toivottujen sivuvaikutuksen vähentämiseksi, sillä metallien myrkyllisyyden on havaittu olevan pitoisuudesta riippuvainen.¹³ Metallien myrkyllisyyteen voidaan vaikuttaa myös ärsykeisiin reagoivilla vapautusjärjestelmillä, jolloin järjestelmä vapauttaa antimikrobisia metallipartikkeleita vain halutun ärsykkeen, kuten bakteerin mikroympäristöön aiheuttamien muutosten, seurauksena.³

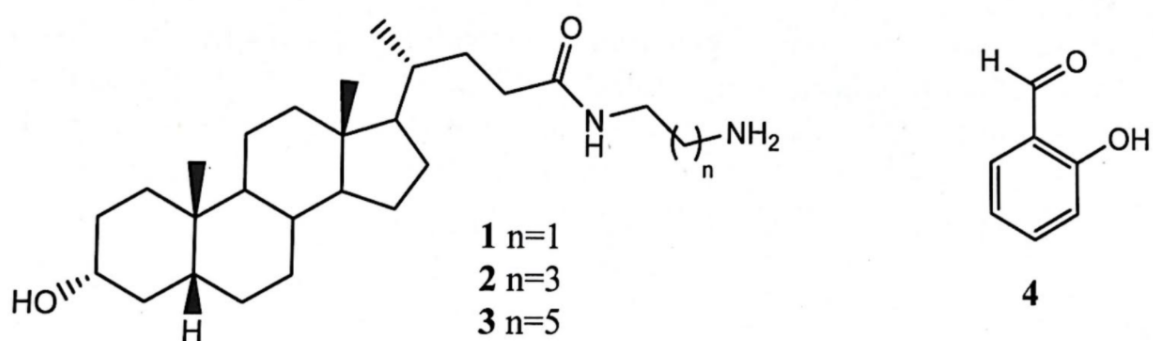
Antimikrobisia hydrogeelejä on tutkittu niiden monien lupaavien ominaisuuksien vuoksi myrkyllisyydestä huolimatta. Monet näistä antimikrobisista hydrogeeleistä ovat osoittaneet lupaavia tuloksia *in vitro*, mutta lupaavat kliiniset tutkimukset puuttuvat. Kliinisen menestyksen saavuttamiseksi antimikrobisten hydrogeelien on saavutettava bakterisidisia lääkeainetasoja säilyttäen samalla antimikrobinen aktiivisuus. Lisäksi niiden tulisi olla soluystävällisiä ja samalla pystyä toimimaan myös resistenttejä kehittäviä bakteereja vastaan tehokkaasti. Kaikki nämä haasteet selittävät eron useiden meneillään olevien tutkimusten, ja markkinoille tulevien tuotteiden määrässä. Lisäksi kehittyneiden hydrogeelien kaupallistumista estää myös niiden korkeat kustannukset.¹⁵

Uusia hoitomuotoja tarvitaan nykyisten antibakteeristen lääkkeiden jäädessä tehottomaksi bakteerien aiheuttamien tautien hoidossa. Tavoiteltavia ovat metallia sisältävät antimikrobiset hydrogeelijärjestelmät, joilla on laaja antimikrobinen vaikutus monilääkeresistenttejä mikrobeja vastaan, korkea selektiivisyys sekä vähäinen myrkyllisyys ihmisoluille.⁷

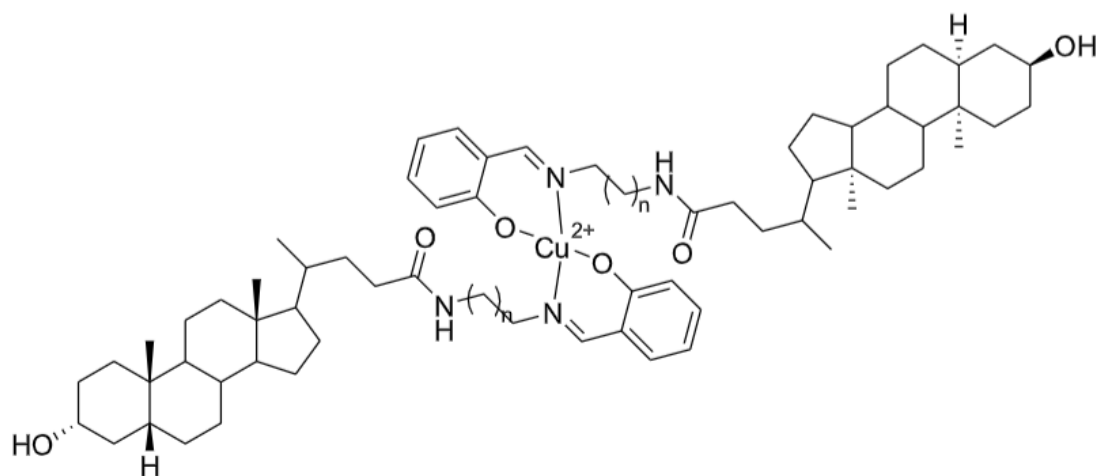
Kokeellinen osa

7 Työn tarkoitus

Tämän kandidaatin tutkimusprojektin tarkoituksena oli valmistaa sappihappopohjaisia supramolekulaarisia kuparogeelejä salisyylialdehydin läsnä ollessa erilaisissa liuottimissa. Työssä tutkittiin sappihappopohjaisten gelaattoreiden (kuva 15) geelinmuodostumisominaisuuksia erilaisissa liuottimissa, salisyylialdehydin ja sappihappojohdannaisen vapaan aminoryhmän muodostaman Schiffin emäksen luoman koordinaatioympäristön (kuva 16) vaikutusta sekä liuottimen ja kantasuolaliuoksen tilavuussuhdetta geelinmuodostumisessa. Oletettu Schiffin emäksen ja Cu^{2+} :n koordinaatiorakenteen rakennekaava esitetään kuvassa 2.



Kuva 15. Sappihappojohdannaisten rakenne 1–3 ja salisyylialdehydin rakenne 4.



Kuva 16. Sappihappojohdannaisten ja salisyylialdehydin muodostaman Schiffin emäksen ja Cu^{2+} :n koordinoituminen.

8 Materiaalit ja menetelmät

Sappihappojohdannaisten gelatointikokeissa käytetyt reagenssit ja niiden tiedot on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus
1-Butanoli	VWR	100 %
CuCl ₂	Aldrich	97 %
DMF	Chromasolv Plus	
1-Heksanoli	Riedel-de Haën	98 %
Metanoli	Honeywell	> 99,8 %
1-Pentanoli	Fluka	99 %
Salisyylialdehydi	VWR	98 %

Sappihappojohdannaiset **1–3** oli valmistettu tutkimusryhmässä aiemmin.

Salisyylialdehydin tislaukset suoritettiin alipainetislauksella manttelin avulla ja sappihappojohdannaiset kuivattiin vakuuminlinjassa yön yli. Gelatointikokeissa käytettiin automaattipipettejä, ultraäänihaudetta ja kuumailmapistoolia. Tislatusta salisyylialdehydistä ja kuivatuista sappihappojen amino(alkyyli)_namideista (n = 2, 4, 6) mitattiin ¹H NMR-spektrit käyttäen Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker Avance III HD 300 MHz NMR-spektrometriä. NMR-näytteissä käytettiin liuottimina deuteroitua kloroformia (CDCl₃) ja metanolia (MeOD) ja NMR-spektrin ppm-asteikko kiinnitettiin liuottimien jäännösprotonien signaaleihin $\delta(\text{CHCl}_3) = 7,26 \text{ ppm}$ ja $\delta(\text{MeOH}) = 4,87 \text{ ppm}$.

9 Työn suoritus

Tässä työssä tutkittiin kolmen eri sappihappojohdannaisen geelinmuodostumisominaisuuksia kuparisuolaliuoksen ja salisyylialdehydin läsnä ollessa viidessä erilaisessa liuottimessa. Työn edetessä ja tehtyjen havaintojen perusteella kokeiltiin myös kuparisuolaliuoksen ja liuottimien tilavuussuhteiden vaikutusta sappihappojohdannaisten geelinmuodostumisominaisuuksiin

vähentämällä näytteen sisältämää vesimäärää. Lisäksi geelin muodostumista testattiin ilman salisyylialdehydin läsnäoloa.

Työ aloitettiin salisyylialdehydin tislauksella ja sappihappojohdannaisten kuivauksella. Salisyylialdehydi tislattiin vakuumitislauksella, jossa alipaine luodaan vesisuihkupumpun avulla. Salisyylialdehydi alkoi tislautua lämpötilassa 196 °C ja tuotteen keräyslämpötila oli 196–197 °C. Sappihappojohdannaiset kuivattiin yön yli vakuumilinjassa ja niiden, sekä tislatus salisyylialdehydin, ¹H NMR-spektrit mitattiin puhtauden tarkistamiseksi. NMR-spektrit löytyvät liitteistä 1–4.

Sappihappojohdannaisten gelatointikokeet salisyylialdehydin ja kuparisuolaliuoksen kanssa tehtiin 2 ml:n korkillisissa näytevialleissa. Työ aloitettiin punnitsemalla jokaista sappihappojohdannaista vaa'alla (Redwag XA/2X) 5 mg ± 0,01 mg vialliin. Lisäksi punnittiin kantasuolaliuosten valmistamiseen tarvittava CuCl₂ määrä vastaamaan kolmasosaa sappihappojohdannaisten ainemäärästä. Kuparisuolaliuosten valmistuksessa punnittu kuparikloridi liuotettiin 12,5 ml:aan ionivaihdettua vettä. Sappihappojohdannaisiin 1–3 lisättyjen kuparisuolaliuosten konsentraatiot olivat 2,14 mg/ml (H₂O) (1), 2,00 mg/ml (H₂O) (2) ja 1,89 mg/ml (H₂O) (3).

Gelatointikokeet aloitettiin lisäämällä näytevialliin automaattipipeteillä 250 µl liuotinta ja tarkastelemalla, liukeneeko sappihappojohdannainen kyseiseen liuottimeen. Työssä käytetyt liuottimet olivat metanoli, 1-butanoli, 1-pentanoli, 1-heksanoli ja DMF. Seuraavaksi vialliin lisättiin kuparikloridin kantaliuosta automaattipipetillä 250 µl, jolloin sappihappojohdannaisten ja Cu²⁺:n ainemäärät vastasivat moolisuhdetta 3:1. Havainnot kirjattiin ylös.

Liuottimen ja kuparisuolaliuoksen lisäysten jälkeen salisyylialdehydi lisättiin vialliin automaattipipetillä siten, että salisyylialdehydin ainemäärä oli sama kuin sappihappojohdannaisten ainemäärä. Salisyylialdehydin tilavuudet eri sappihappojohdannaisten tapauksissa esitetään taulukossa 2. Salisyylialdehydin lisäyksen jälkeen vialli laitettiin ultraäänihauteeseen minuutiksi ja tämän jälkeen viallia kuumennettiin kuumailmapistoolilla, kunnes liuoksen kiehumispiste saavutettiin tai näytteen sisältämä kaikki kiinteä aines liukeni. Kaikki havainnot näytteen liukoisuudessa ja värissä havainnoitiin. Lopuksi näyte asetettiin telineeseen ja näytettä tarkasteltiin tunnin sekä vuorokauden tai viikon kuluttua uudelleen.

Taulukko 2. Sappihappojohdannaiset ja lisätyn salisyylialdehydin tilavuus

Sappihappojohdannainen	V(salisyylialdehydi)/ μ l
1	1,25
2	1,17
3	1,10

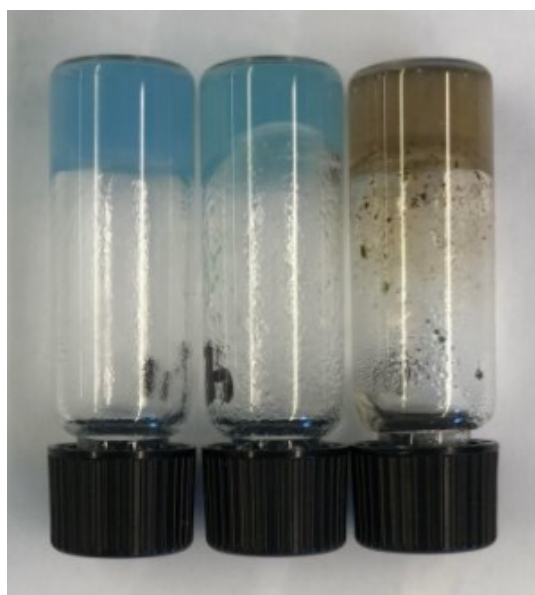
Kun kokeet tehtiin liuotin/kantasuolaliuos-suhteella 50/50, geelejä ei muodostunut. Tämän vuoksi testattiin gelinmuodostumista vähentämällä näytteen sisältämää vesimäärää. Sappihappojohdannaisten gelatointikokeet etenivät muuten täysin samalla tavalla kuin edellä on kuvattu, mutta liuotinta lisättiin 450 μ l ja vettä sisältävää kuparisuolaliuosta 50 μ l. Kuparisuolaliuokset valmistettiin tähän gelatointiin liuottamalla kuparikloridi 2,5 ml:aan ionivaihdettua vettä, jolloin kuparisuolaliuosten konsentraatiot olivat 10,70 mg/ml (H₂O) (**1**), 10,03 mg/ml (H₂O) (**2**) ja 9,44 mg/ml (H₂O) (**3**). Vesimäärän vähentäminen ei johtanut gelatoitumiseen, vaan liuottimet erottuivat selvästi useammaksi kerrokseksi vesimäärän vähennyksen myötä. Sappihappojohdannaisten gelatointia kokeiltiin myös ilman salisyylialdehydin lisäystä, jolloin työvaiheet pysyivät muuten samana. Työn tulokset ja havainnot kirjattiin ylös.

10 Työn tulokset

Työssä tehtiin yhteensä 47 koetta ja näytteiden väri ja koostumus havainnointiin jokaisen lisäyksen sekä ultraäänikäsitteilyn ja lämmityksen jälkeen. Lisäksi näyte tarkistettiin tunnin ja vuorokauden/viikon kuluttua mahdollisuuksien mukaan. Kokeiden tulokset ja niiden tulkinta esitetään liitteessä 5. Työn tavoitteena oli valmistaa sappihappopohjaisia kuparogeelejä, joissa kupari koordinoituu gelaattoriin muodostaen metallogeelin. Yhteensä työssä onnistuttiin valmistamaan kuusi geeliä tai osittaista geeliä, jotka esitetään taulukossa 3. Kuvassa 17 esitetään kahden gelin, sekä yhden heikon gelin rakenne.

Taulukko 3. Muodostuneet geelit ja osittaiset geelit

Sappihappojohdannainen	Liuotin (V = 250 μ l)	Salisyylialdehydi	V(CuCl ₂)	Tulos	Seuranta-aika
2	DMF	Ei	250 μ l	G	3 h
2	MeOH	Ei	250 μ l	PG -	3 h
2	DMF	Kyllä	250 μ l	PG -	1 vk
3	MeOH	Ei	250 μ l	G	1 vk
3	MeOH	Ei	250 μ l	G -	3 h
3	DMF	Ei	250 μ l	PG	3 h



Kuva 17. Reunoissa geelit, joissa ei virtausta. Keskellä heikko geeli, jossa hiukan virtausta.

Työssä havaittiin, että litokoolihapon 2-aminoetyyliamidi (**1**) ei muodostanut geelejä. Sen sijaan litokoolihapon 4-aminobutyliamidi (**2**) ja 6-aminoheksyyliamidi (**3**) muodostivat geelejä, sekä osittaisia geelejä. Sappihappojohdannaisten alkyyliketjun pituus vaikuttaa siis selvästi geelin muodostumiseen, ja tämä saattaa johtua esimerkiksi siitä, että alkyyliketjun pituus vaikuttaa sappihappojohdannaisen liukoisuusominaisuuksiin. Mitä lyhyempi ketju on, sitä paremmin johdannainen yleensä liukenee.

Tutkimuksen aikana tehdyissä kokeissa geelit tai osittaiset geelit syntyivät suurimmaksi osaksi systeemeissä, jotka eivät sisältäneet salisyylialdehydiä. Salisyylialdehydin läsnä ollessa muodostui ainoastaan yksi heikko osittainen geeli. Sappihappojohdannaiset näyttäisivätkin

tarjoavan paremman koordinaatioympäristön Cu^{2+} -ionille kuin salisylylaldehydin ja sappihappojohdannaisen muodostama Schiffin emäs. Lisäysjärjestystä muuttamalla olisi voitu vaikuttaa siihen, että Schiffin emäs olisi muodostunut ennen metalli-ionin lisäämistä, mikä puolestaan olisi saattanut vaikuttaa geelin muodostumiseen.

Työssä käytetyistä liuottimista geelejä muodostui ainoastaan metanolissa ja DMF:ssä. Molemmat liuottimet ovat poolisia verrattuna muihin testattuihin liuottimiin (1-butanoli, 1-pentanol ja 1-heksanol). Saatujen tulosten perusteella voidaan myös päätellä, että geelin muodostuminen vaatii vettä ja liuottimen/kantasuolaliuoksen 50/50-suhde toimii paremmin, kuin kantasuolaliuoksen vähentäminen.

11 Johtopäätökset

Tutkimuksen tuloksena havaittiin litokoolihapon 4-aminobutyylimididin (**2**) ja 6-aminoheksyylimididin (**3**) toimivan geelin muodostuksessa, mutta litokoolihapon 2-aminoetyylimididin (**1**) ei. Lisäksi havaittiin poolisten liuottimien (MeOH ja DMF) muodostavan geelejä paremmin kuin vähemmän poolisten liuottimien. Salisylylaldehydi ei parantanut kuparogeelien muodostumista, vaan itse asiassa geeliytyminen onnistui paremmin ilman aldehydin lisäämistä. Jos aldehydi olisi lisätty ennen kuparisuolan lisäämistä, olisi haluttu Schiffin emäs mahdollisesti muodostanut otollisen koordinaatioympäristön kupari-ionille ja se olisi saattanut vaikuttaa geelin muodostumiseen. Tutkimuksessa havaittiin myös liuottimen ja kantasuolaliuoksen 1:1-suhteen toimivan 9:1-suhdetta paremmin, sillä vesimäärää vähentämällä liuokset erottuivat useammaksi kerrokseksi eikä geelejä muodostunut.

Tärkeimpänä havaintona työssä voidaan pitää salisylylaldehydin vaikutusta geelinmuodostumisominaisuuksiin. Huomioitavaa on, että ilman salisylylaldehydiä tehdyt näytteet valmistettiin laboratoriossa viimeisenä tutkimuspäivänä, minkä vuoksi niiden seuranta oli vain muutaman tunnin. Jos seuranta-aikaa olisi jatkettu, olisi näistä mahdollisesti useampikin voinut muodostaa geelejä.

Kirjallisuusluettelo

1. Dastidar, P.; Ganguly, S. ja Sarkar, K., Metallogels from Coordination Complexes, Organometallic, and Coordination Polymers, *Chem. - An Asian J.*, **2016**, *11*, 2484–2498.
2. Ng, V. W. L.; Chan, J. M. W.; Sardon, H.; Ono, R. J.; García, J. M.; Yang, Y. Y. ja Hedrick, J. L., Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, *78*, 46–62.
3. Quek, J. Y.; Uroro, E.; Goswami, N. ja Vasilev, K., Design principles for bacteria-responsive antimicrobial nanomaterials, *Mater. Today Chem.*, **2022**, *23*.
4. Brooks, B. D. ja Brooks, A. E., Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, *78*, 14–27.
5. Veiga, A. S. ja Schneider, J. P., Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection, *Biopolymers*, **2013**, *100*, 637–644.
6. Lemire, J. A.; Harrison, J. J. ja Turner, R. J., Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2013**, *11*, 371–384.
7. Yang, K.; Han, Q.; Chen, B.; Zheng, Y.; Zhang, K.; Li, Q. ja Wang, J., Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application, *Int. J. Nanomedicine*, **2018**, *13*, 2217–2263.
8. Gyles, D. A.; Castro, L. D.; Silva, J. O. C. ja Ribeiro-Costa, R. M., A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations, *Eur. Polym. J.*, **2017**, *88*, 373–392.
9. Ahmed, E. M., Hydrogel : Preparation , characterization , and applications : A review, **2015**, 105–121.
10. Thomas, V.; Namdeo, M.; Murali Mohan, Y.; Bajpai, S. K. ja Bajpai, M., Review on Polymer, Hydrogel and Microgel Metal Nanocomposites: A Facile Nanotechnological Approach, *J. Macromol. Sci. Part A, Pure Appl. Chem.*, **2007**, *45*, 107–119.
11. Xie, Y.; Liao, X.; Zhang, J.; Yang, F. ja Fan, Z., Novel chitosan hydrogels reinforced by silver nanoparticles with ultrahigh mechanical and high antibacterial properties for accelerating wound healing, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, *119*, 402–412.
12. Palza, H., Antimicrobial polymers with metal nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 2099–2116.
13. Godoy-Gallardo, M.; Eckhard, U.; Delgado, L. M.; de Roo Puente, Y. J. D.; Hoyos-Nogués, M.; Gil, F. J. ja Perez, R. A., Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications, *Bioact. Mater.*, **2021**, *6*, 4470–4490.

14. Allahverdiyev, A. M.; Kon, K. V.; Abamor, E. S.; Bagirova, M. ja Rafailovich, M., Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **2011**, *9*, 1035–1052.
15. Navare, K. J.; Eggermont, L. J. ja Rogers, Z. J., Antimicrobial Hydrogels: Key Considerations and Engineering Strategies for Biomedical Applications. Kirjassa: Li, B.; Moriarty, T. F.; Webster, T. ja Xing, M (toim.), *Racing for the Surface*, Springer, Cham, 2020, ss. 511-542.
16. Zhong, Y.; Xiao, H.; Seidi, F. ja Jin, Y., Natural Polymer-Based Antimicrobial Hydrogels without Synthetic Antibiotics as Wound Dressings, *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 2983–3006.
17. Anh, H. T. P.; Huang, C.-M. ja Huang, C.-J., Intelligent Metal-Phenolic Metallogels as Dressings for Infected Wounds, *Sci. Rep.*, **2019**, *9*, 11510–11562.
18. Zhang, M.; Chen, S.; Zhong, L.; Wang, B.; Wang, H. ja Hong, F., Zn²⁺-loaded TOBC nanofiber-reinforced biomimetic calcium alginate hydrogel for antibacterial wound dressing, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, *143*, 235–242.
19. Kaniewska, K.; Karbarz, M. ja Katz, E., Nanocomposite hydrogel films and coatings – Features and applications, *Appl. Mater. Today*, **2020**, *20*.
20. Mi, G.; Shi, D.; Wang, M. ja Webster, T. J., Reducing Bacterial Infections and Biofilm Formation Using Nanoparticles and Nanostructured Antibacterial Surfaces, *Adv. Healthc. Mater.*, **2018**, *7*, 1–23.
21. Zhao, C.; Zhou, L.; Chiao, M. ja Yang, W., Antibacterial hydrogel coating: Strategies in surface chemistry, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2020**, *285*.
22. Clasky, A. J.; Watchorn, J. D.; Chen, P. Z. ja Gu, F. X., From prevention to diagnosis and treatment: Biomedical applications of metal nanoparticle-hydrogel composites, *Acta Biomater.*, **2021**, *122*, 1–25.
23. Parveen, S.; Misra, R. ja Sahoo, S. K., Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **2012**, *8*, 147–166.
24. Li, J. ja Mooney, D. J., Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.*, **2016**, *1*.
25. Kailasa, S. K.; Joshi, D. J.; Kateshiya, M. R.; Koduru, J. R. ja Malek, N. I., Review on the biomedical and sensing applications of nanomaterial-incorporated hydrogels, *Mater. Today Chem.*, **2022**, *23*.
26. Amiri, M.; Khazaeli, P.; Salehabadi, A. ja Salavati-Niasari, M., Hydrogel beads-based nanocomposites in novel drug delivery platforms: Recent trends and developments, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2021**, *288*.
27. Cao, Z.; Luo, Y.; Li, Z.; Tan, L.; Liu, X.; Li, C.; Zheng, Y.; Cui, Z.; Yeung, K. W. K.;

Liang, Y.; Zhu, S. ja Wu, S., Antibacterial Hybrid Hydrogels, *Macromol. Biosci.*, **2021**, *21*, 1–24.

Liitteet

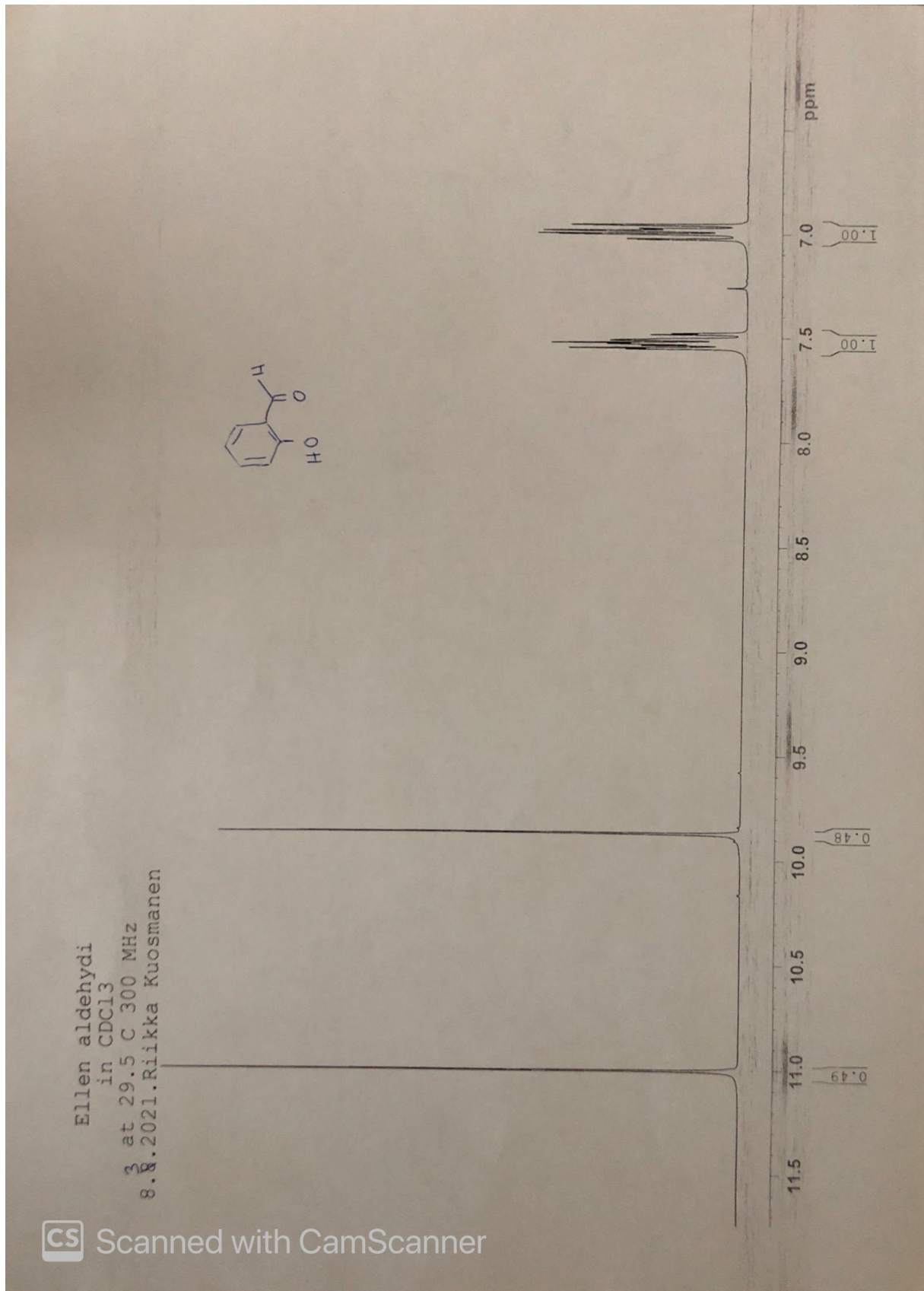
Liite 1: Salisyylialdehydin ^1H NMR-spektri (CDCl_3)

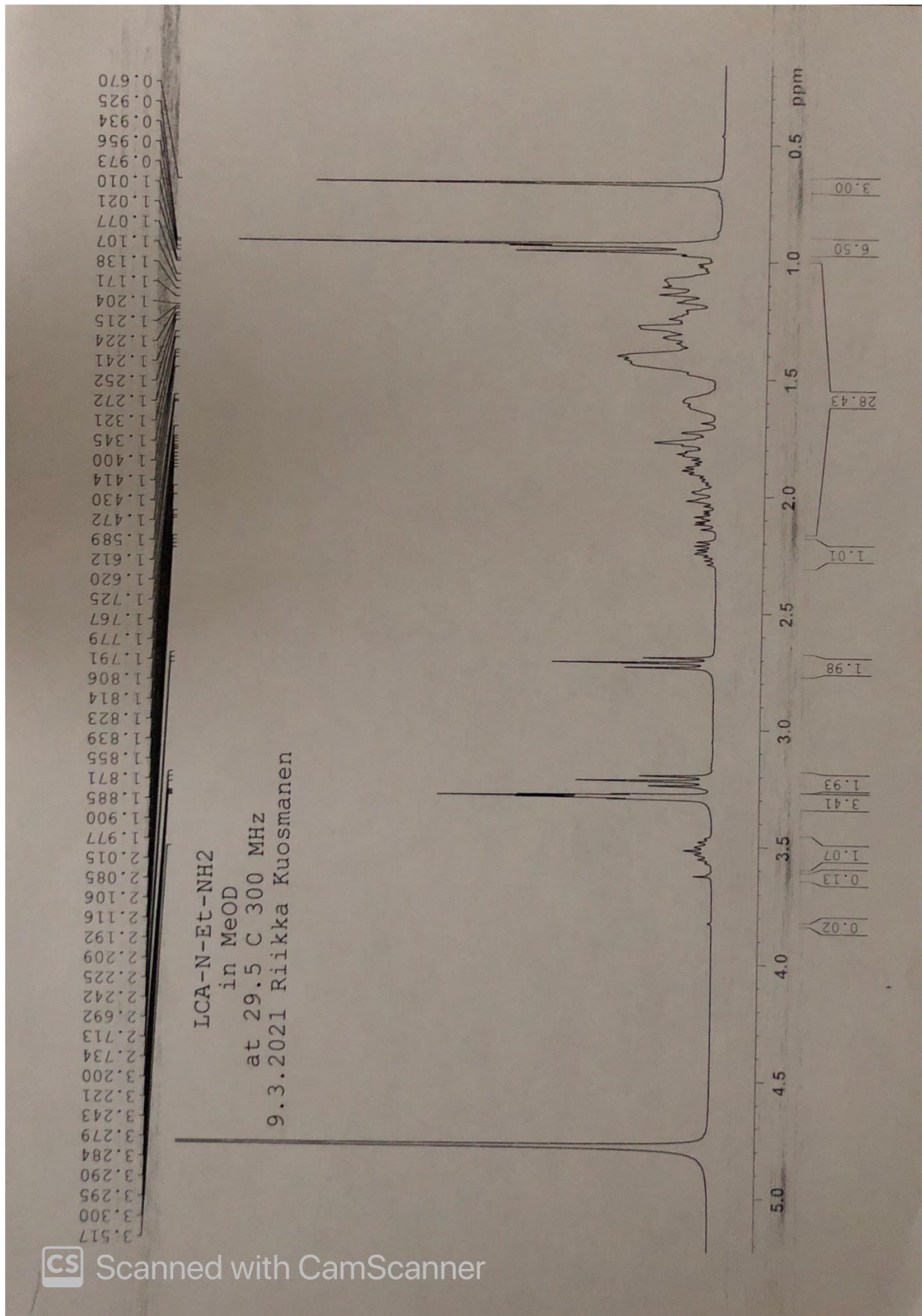
Liite 2: Litokoolihapon 2-aminoetyyliamidin (**1**) ^1H NMR-spektri (MeOD)

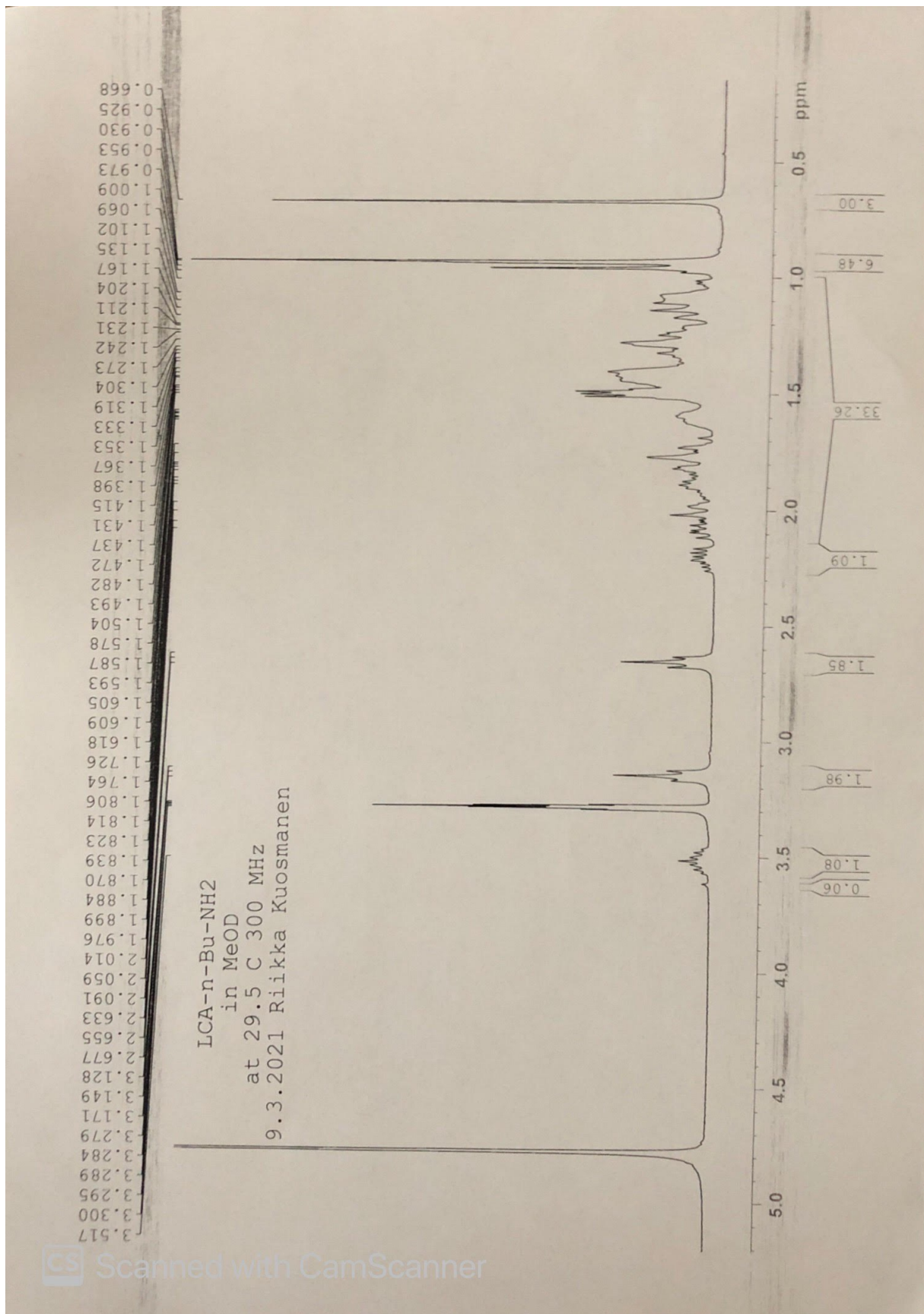
Liite 3: Litokoolihapon 4-aminobutyyliamidin (**2**) ^1H NMR-spektri (MeOD)

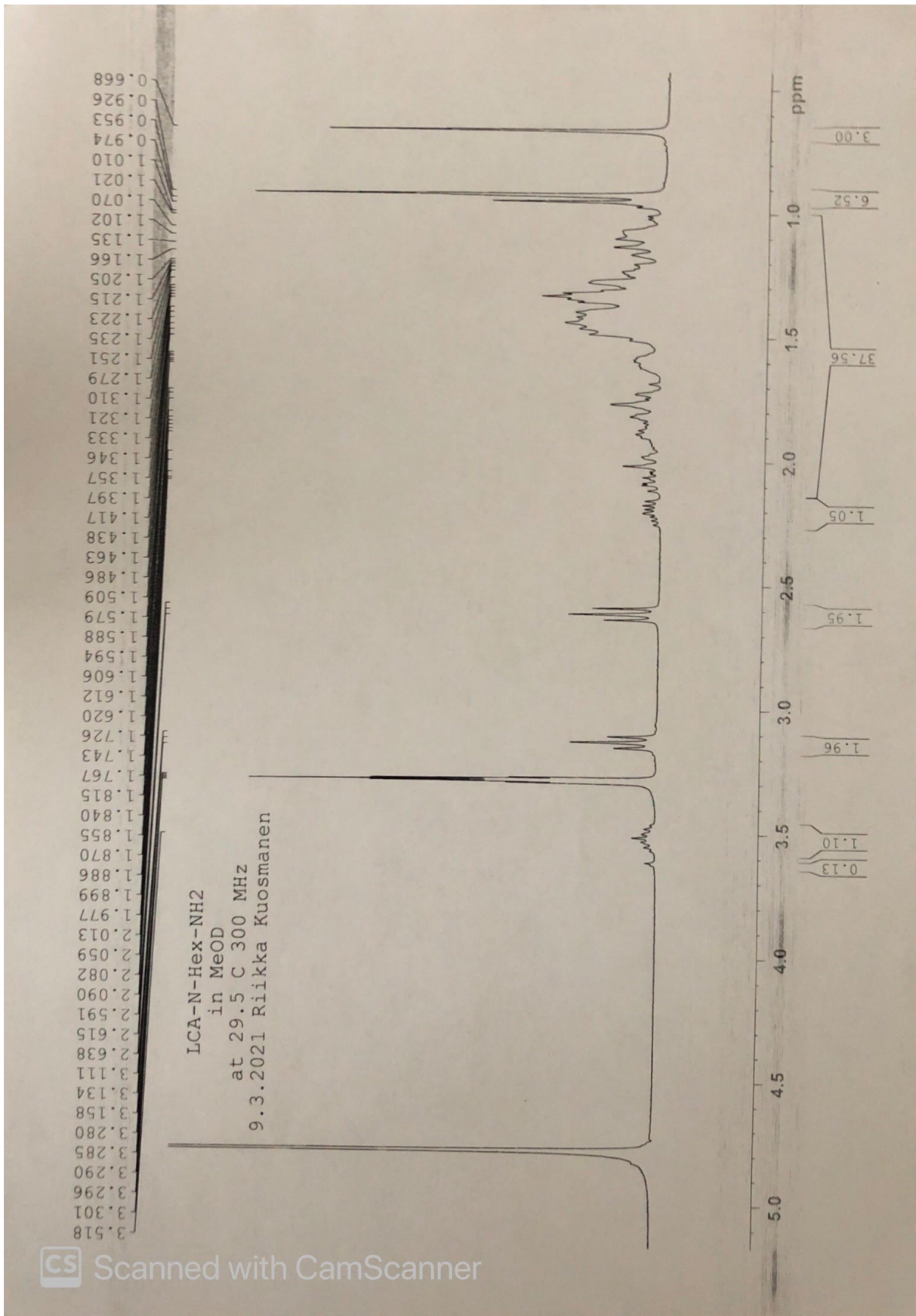
Liite 4: Litokoolihapon 6-aminoheksyyliamidin (**3**) ^1H NMR-spektri (MeOD)

Liite 5: Gelatointikokeiden tulkinta (taulukot 4. ja 5.) ja tulokset (taulukot A-I), 13 sivua









Taulukko 4. Näytteiden havainnoinnissa käytetyt lyhenteet

PS +	Osittain liukoinen ilman Δ
PS	Osittain liukoinen Δ
S +	Liukoinen ilman Δ
S	Liukoinen Δ
PG	Osittainen geeli (20–50 % nestettä jäljellä)
PG -	Heikko osittainen geeli (50–75 % nestettä jäljellä)
G	Geeli (1–2 pisaraa nestettä)
G -	Heikko geeli (5–20 % nestettä jäljellä)

Taulukko 5. Taulukot A-I

Taulukko	Sappihappo- johdannainen	V(liuotin)/ μ l	V(kantasuolaliuos)/ μ l	Salisylyialdehydi
A	1	250	250	Kyllä
B	2	250	250	Kyllä
C	3	250	250	Kyllä
D	1	450	50	Kyllä
E	2	450	50	Kyllä
F	3	450	50	Kyllä
G	1	250	250	Ei
H	2	250	250	Ei
I	3	250	250	Ei

TAULUKKO A

Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta	1 vk:n seuranta
1	MeOH	PS+ PS+, sininen PS+, vihreä PS, kelt.vihreä	PS, vaal.vihreä	PS, kirkas ja seassa tum.vihreää sakkaa
2	1-butanoli	PS+ PS+, vaal.sininen, faasiraja näkyvissä PS+, vihreä, faasiraja näkyvissä Kerrostunut Y PS,tum.vihreä A PS, vaal. vihreä	Kerrostunut Y S, oliiv. Vihreä A PS, vaal.vihreä	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, valkoinen
3	1-pentanoli	PS+ PS+, vaal.sininen, faasiraja näkyvissä PS+, vihreä, faasiraja näkyvissä Kerrostunut Y PS, tum.vihreä A PS, vaal. vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv.vihreä A PS, vaal.vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen
4	1-heksanoli	PS+ Kerrostunut Y PS+, valkoinen A PS+, vaal. sininen PS+, vihreä, faasiraja näkyvissä Kerrostunut Y PS, tum.vihreä A PS, vaal.vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, vaal.vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen
5	DMF	PS+ PS+, vaal.sininen PS+, vihreä PS, vaal.vihreä	PS, vihreä	PS, vihreä ja pohjalla tummaa sakkaa → 2 vk:n kuluttua kirkas ja seassa vihreää sakkaa

TAULUKKO B

Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta	1 vk:n seuranta
6	MeOH	S+ PS+, vaal.sinivihreä PS+, vaal.vihreä PS, vaal.vihreä	PS, vaal.vihreä	PS, vaal.vihreä ja seassa tum.vihreää sakkaa
7	1-butanoli	PS+ PS+, vaal.sininen, faasiraja näkyvissä PS+, vihreä, faasiraja näkyvissä Kerrostunut Y PS, ruskea A PS, vaal. vihreä	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A S, kirkas	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A S, kirkas
8	1-pentanol	S+ PS+, vaal.sininen, faasiraja näkyvissä Kerrostunut Y S+, oliiv.vihreä A PS+, vaal.vihreä Kerrostunut Y PS, ruskea A PS, valkoinen	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, valkoinen	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A S, kirkas
9	1-heksanol	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, vaal. sininen Kerrostunut Y S+, oliiv.vihreä A PS+, vaal.vihreä Kerrostunut Y PS, ruskea A PS,vaal. vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A S, kirkas
10	DMF	PS+ PS+, vaal.sininen PS+, vihreä PS, vihreä, viallin pinnalla mustaa	PS, vihreä	PS, vihreä → 2 vk:n kuluttua muodostunut PG-vihreä geeli ja kirkas neste

TAULUKKO C				
Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta	1 vk:n seuranta
11A	MeOH	S+ PS+, vaal.sininen G+, vaal.sininen → GEELI ENNEN ALDEHYDIN LISÄYSTÄ, EI ULTRAÄÄNIHAUDETTA, EI LÄMMITYSTÄ	G, vaal.sininen	G, vaal.sininen
11B	MeOH	S+ PS+, vaal.sininen PS+, vaal.vihreä PS, vaal.vihreä	PS, vaal.vihreä	PS, kirkas ja pohjalla tum.vihreää sakkaa
12	1-butanoli	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, samea vaalea Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaal.keltainen Kerrostunut Y PS, oliiv.vihreä A PS, vaal. vihreä	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, valkoinen	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, valkoinen
13	1-pentanol	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, samea vaalea Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaal.keltainen Kerrostunut Y PS, oliiv.vihreä A PS, vaal.vihreä	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen
14	1-heksanol	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, samea vaalea	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen	Kerrostunut Y PS, oliiv. vihreä A PS, valkoinen

		<p>Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaal.keltainen</p> <p>Kerrostunut Y PS, ruskea A PS, valkoinen</p>		
15	DMF	<p>PS+</p> <p>PS+, vaal.sininen, jähmeämpi rakenne</p> <p>PS+, vihreä, jähmeä</p> <p>PS, vihreä, viaalin pinnalla mustaa</p>	PS, vihreä	PS, vaal.vihreä ja pohjalla vihreää sakkaa
16	DMF	<p>PS+</p> <p>PS+, vaal.sininen, jähmeämpi rakenne</p> <p>PS+, vihreä, jähmeä</p> <p>→ EI ULTRAÄÄNIHAUDETTA, EI LÄMMITYSTÄ</p>	PS, vihreä	PS, vihreä ja pohjalla vihreää sakkaa

TAULUKKO D

Näytteen
numero

Liutotin

Koe

1 h:n seuranta

1 vrk:n seuranta

17	MeOH	<p>PS+</p> <p>PS+, vaal.sininen</p> <p>PS+, vihreä</p> <p>PS, oliiv.vihreä</p>	PS, oliiv.vihreä	S, oliiv.vihreä
18	1-butanoli	<p>PS+</p> <p>PS+, samea vaalea ja vaal.sinistä sakkaa pohjalla</p> <p>PS+, keltainen ja keltaista sakkaa pohjalla</p> <p>PS, oliiv.vihreä ja vihreää sakkaa pohjalla</p>	PS, oliiv.vihreä ja vihreää sakkaa pohjalla	S, oliiv. vihreä
19	1-pentanol	<p>PS+</p> <p>Kerrostunut Y PS+, samea vaalea A PS+, vaal.sininen, kuplia</p> <p>PS+, keltainen ja valkoista sakkaa</p> <p>PS, oliiv.vihreä ja valkoista sakkaa</p>	PS, oliiv.vihreä ja valkoista sakkaa, hieman jähmeämpi rakenne	PS, oliiv. vihreä
20	1-heksanol	<p>PS+</p> <p>PS+, kirkas ja vaal.sininen helmi pohjalla</p> <p>PS+, keltainen ja vaal.sininen helmi pohjalla</p> <p>Kerrostunut Y PS, vihreä A PS, vaal.sininen</p>	PS, oliiv.vihreä ja vaaleaa sakkaa pohjalla	PS, oliiv.vihreä
21	DMF	<p>PS+</p> <p>PS+, vaal.sininen, hiukan jähmeämpi</p> <p>PS+, vihreä, hiukan jähmeämpi</p> <p>S, oliiv.vihreä</p>	S, oliiv.vihreä	S, oliiv.vihreä

TAULUKKO E

Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta	1 vrk:n seuranta
22	MeOH	PS+ PS+, vaal.sininen PS+, kelt.vihreä PS, oliiv.vihreä	S, oliiv. vihreä	PS, keltainen ja tummaa sakkaa
23	1-butanoli	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, vaalea ja vaal.sininen helmi PS+, keltainen ja pohjalla helmiä S, ruskea	S, oliiv. vihreä	S, oliiv.vihreä
24	1-pentanol	PS+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, vaalea ja vaal.sininen helmi Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, valkoinen helmi Kerrostunut Y S, oliiv.vihreä A PS, valkoiset helmet	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, kirkkaita helmiä	PS, oliiv.vihreä ja kirkkaita helmiä
25	1-heksanol	PS+ Kerrostunut Y PS+, samea vaalea A PS+, vaal.sininen helmi Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaalea helmi Kerrostunut Y S, oliiv.vihreä A PS, valkeat helmet	Kerrostunut Y S, oliiv. vihreä A PS, kirkkaita helmiä	PS, oliiv.vihreä ja kirkkaita helmiä
26	DMF	PS+ PS+, vaal.sininen, jähmeämpi rakenne PS+, vihreä S, ruskea	S, ruskea	S, ruskea

TAULUKKO F				
Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta	1 vrk:n seuranta
27	MeOH	S+ PS+, vaal.sininen PS+, oliiv.vihreä S, oliiv.vihreä	PS, oliiv.vihreä ja tummaa sakkua pohjalla	PS, oliiv.vihreä ja tummaa sakkua pohjalla
28	1-butanoli	S+ Kerrostunut Y PS+, vaalea A PS+, vaal.sinisiä helmiä Kerrostunut Y PS+, keltainen A PS+, vaaleita helmiä Kerrostunut Y PS, oliiv.vihreä A PS, valkeita helmiä	PS, kirkas ja tummaa sakkua pohjalla	PS, oliiv.vihreä ja tummaa sakkua pohjalla
29	1-pentanol	S+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, vaal.sininen helmiä Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaaleita helmiä PS, ruskea ja valkeaa sakkua pohjalla	PS, oliiv.vihreä ja vaa.sinistä sakkua, hiukan jähmeä rakenne	PS, oliiv.vihreä ja vaal.sinistä sakkua
30	1-heksanol	S+ Kerrostunut Y S+, kirkas A PS+, vaalea helmi Kerrostunut Y S+, keltainen A PS+, vaaleita helmiä Kerrostunut Y S, ruskea A PS, valkeita helmiä	PS, oliiv.vihreä ja muutamia helmiä, hiukan jähmeä rakenne	PS, oliiv.vihreä ja helmiä

31	DMF	S+ PS+, vaal.sininen PS+, vihreä S, ruskea	S, ruskea	S, ruskea
----	-----	---	-----------	-----------

TAULUKKO G			
Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta
32	MeOH	PS+ PS+, vaal.sininen, jähmeämpi PS, vaal.sininen	PS, vaal.sininen
33	1-butanoli	PS+ 3 kerrosta, jähmeä rakenne Y PS+, kirkas K PS+, valkoinen A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta, jähmeä rakenne Y PS, vaalea K PS, turkoosi A PS, sininen	3 kerrosta Y S, kirkas K PS, sininen A PS, vaal.sininen
34	1-pentanol	PS+, jähmeämpi rakenne 3 kerrosta Y PS+, vaal.sininen K PS+, samea väritön A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K S, kirkas A PS, vaal.sininen
35	1-heksanol	PS+, jähmeämpi rakenne 3 kerrosta Y PS+, samea väritön K PS+, samea väritön, yläpuolta kirkkaampi A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen
36	DMF	PS+, jähmeämpi rakenne PS+, vaal.sininen, jähmeämpi rakenne 3 kerrosta Y PS, sininen K PS, vaal.sininen A PS, samea väritön	PS, vaal.sininen

TAULUKKO H			
Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta
37	MeOH	PS+ PS+, vaal.sininen, jähmeämpi PS, vaal.sininen ja tummaa sakkaa, jähmeämpi rakenne	Kerrostunut Y PS, samea väritön A PS, vaal.sininen → 3h:n kuluttua PG-
38	1-butanoli	PS+ 3 kerrosta, jähmeä rakenne Y PS+, vaal.sininen K S+, kirkas A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen ja tummaa sakkaa	3 kerrosta Y PS, samea väritön K PS, samea väritön A PS, kirkas ja sinistä sakkaa
39	1-pentanol	S+ 3 kerrosta Y PS+, vaal.sininen K PS+, samea väritön A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K S, kirkas A PS, vaal.sininen
40	1-heksanol	PS+, jähmeämpi rakenne 3 kerrosta Y PS+, samea väritön K S+, kirkas A PS+, valkoinen 3 kerrosta Y PS, samea väritön K PS, valkoinen A PS, hento vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, samea väritön K PS, valkoinen A PS, vaal.sininen
41	DMF	S+ Kerrostunut Y PS+, vaal.sininen A PS+, vaal.sininen, yläpuolta kirkkaampi PS, vaal.ruskea ja seassa tummaa sakkaa	G, jossa 2 kerrosta Y ohut kirkas kerros, jossa tummaa sakkaa A vaal.ruskea, samea

TAULUKKO I			
Näytteen numero	Liutin	Koe	1 h:n seuranta
42	MeOH	S+ Kerrostunut Y PS+, sinivihreä A PS+, sinivihreä Kerrostunut Y PS, sinivihreä A PS, sinivihreä Ultraäänen jälkeen jähmeämpi rakenne	G-, sinivihreä
43	1-butanoli	S+ 3 kerrosta Y PS+, vaal.sininen K PS+, samea väritön A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, samea väritön A PS, vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K S, kirkas A PS, vaal.sininen
44	1-pentanol	S+ 3 kerrosta Y PS+, valkoinen K S+, kirkas A PS+, vaal.sininen 3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, valkoinen A PS, vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, valkoinen A PS, vaal.sininen
45	1-heksanol	S+, jähmeämpi rakenne 3 kerrosta Y PS+, samea väritön K S+, kirkas A PS+, samea väritön 3 kerrosta Y PS, hento vaal.sininen K S, kirkas A PS, hento vaal.sininen	3 kerrosta Y PS, vaal.sininen K PS, valkoinen A PS, vaal.sininen

46	DMF	<p>S+</p> <p>Kerrostunut, jähmeämpi rakenne Y PS+, sinivihreä A PS+, sinivihreä</p> <p>PS+, vaal.sininen, jähmeämpi rakenne → Ei lämmitystä, jähmeämpi rakenne ultraäänihautteen jälkeen</p>	<p>G, jossa 2 kerrosta Y ohut kirkas kerros, jossa tummaa sakkaa A vaal.ruskea, samea PG, vaal.sininen</p>
----	-----	---	--