

Aurora Pitkänen

# **HYALURONIHAPPOPOHJAISTEN HYD- ROGEELIEN ANTIBAKTEERISET OMI- NAISUUDET**

Kandidaatintyö  
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta  
Elina Vuorimaa-Laukkanen  
Toukokuu 2025

# TIIVISTELMÄ

Aurora Pitkänen: Hyaluronihappopohjaisten hydrogeelien antibakteeriset ominaisuudet  
Antibacterial properties of hyaluronic acid-based hydrogels  
Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Tekniikan ja luonnontieteiden TkK-tutkinto-ohjelma, ympäristö- ja energiatekniikka  
Toukokuu 2025

---

Antibioottiresistenssi ja bakteerien muodostamat biofilmit ovat yleistyneet haaste terveydenhuollossa. Ne vaikeuttavat esimerkiksi haavojen sekä implantteihin ja tukirakenteisiin liittyvien tulehdusten hoitamista. Antibakteeriset hydrogeelit ovat yksi mahdollinen hoitokeino. Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia ja hydrofiilisiä verkostoja, jotka koostuvat joustavista polymeeriketjuista. Antibakteeriset hydrogeelit on suunniteltu paitsi hillitsemään bakteerien kasvua mutta myös ehkäisemään infektion syntyä, lievittämään tulehdusta ja edistämään kudoksen uusiutumista.

Hyaluronihappo (HA) on yksi lupaavimmista materiaaleista antibakteerisille hydrogeeleille. HA muistuttaa soluväliainetta, joten se on bioyhteensopiva, biohajoava ja hydrofiilinen. Lisäksi se on luonnostaan hieman antibakteerinen. HA:n antibakteerisia ominaisuuksia voidaan helposti parantaa tekemällä siitä hydrogeelejä ja sitomalla siihen erilaisia antibakteerisia aineita, kuten metallinopartikkeleita ja antimikrobisia peptidejä.

Tässä kandidaatintyössä tutkittiin, miten HA-hydrogeelien antibakteerisia ominaisuuksia voidaan parantaa. Työssä selvitettiin, miten HA-hydrogeelejä voidaan kemiallisesti muokata antibakteeristen ominaisuuksien parantamiseksi. Työssä pohdittiin myös, mitä etuja ja haasteita erilaisilla kemiallisilla muokkauksilla on. Kemiallisista muokkauksista tarkasteltiin lupaavimpia: antibiootteja, hopeananopartikkeleita (AgNP), sinkkioksidinanopartikkeleita (ZnONP), antimikrobisia peptidejä (AMP), e-polylyysiiniä (EPL) ja kitosaania.

Kaikilla kemiallisilla muokkauksilla on etuja ja haasteita ja on mahdotonta nimetä yhtä parasta muokkausta. Eri muokkaukset voivat sopia eri käyttötarkoituksiin, kuten haavanhoitoon, kudosteknologiaan ja infektioiden ehkäisyyn. Lisäksi eri aineita yhdistelemällä voidaan saada muodostettua parempia HA-hydrogeelejä. Ainoastaan antibioottien käyttöä on syytä tarkastella kriittisesti antibioottiresistenssin kasvun vuoksi. Antibioottien muutkin ominaisuudet, kuten myrkyllisyys, biohajoavuus, mekaaniset ominaisuudet ja tulehduksen lievittäminen, ovat heikot. AgNP:t ovat jo tutkittu ja käytetty vaihtoehto. Niiden haasteena on kuitenkin myrkyllisyys ja kerääntyminen elimistöön ja ekosysteemeihin. ZnONP:t ovat vielä melko tuore tutkimuskohde mutta niillä on lupaavia kudosta parantavia ominaisuuksia, ja ne ovat vähemmän myrkyllisiä kuin AgNP:t. Ne tarvitsevat UV-valoa antibakteerisen vaikutuksen maksimoimiseksi, mikä voi olla sovelluskohteen mukaan joko mielenkiintoinen tai haastava ominaisuus. AMP:t ovat myös vähän tutkittuja ja lisäksi niillä on haasteita stabiilisuuden ja hydrogeelin mekaanisten ominaisuuksien kanssa. AMP:illä on kuitenkin ainutlaatuinen ominaisuus, sillä ristosiloitettuna ne voivat vapautua pH:n muutoksesta. Lisäksi AMP:itä on useita erilaisia, joten niistä voi löytyä vielä paremmat ominaisuudet omaavia yhdisteitä. EPL:llä on paljon samoja ominaisuuksia AMP:ien kanssa. Se omaa kuitenkin erittäin hyvät mekaaniset ominaisuudet, joita on helppo säätää. Kitosaani on ainoa tutkituista muokkauksista, joka on myrkytön suurinakin pitoisuuksina. Sillä on muutenkin erinomaiset ominaisuudet mutta se heikentää hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia, mikä rajoittaa sen käyttömahdollisuuksia.

Suurin haaste antibakteeristen HA-hydrogeelien kehityksessä on tehokkuuden ja myrkyllisyyden tasapainottaminen. Lisäksi kustannustehokkuus vaikuttaa ratkaisevasti siihen, mitkä muokkaukset voidaan lopulta kaupallistaa. Turvallisuuden ja taloudellisen toteutettavuuden parantamiseksi tarvitaan lisää tutkimusta, erityisesti pitkäaikaisessa käytössä ja ihmisillä. Ajan myötä selviää, mitkä kemialliset muokkaukset osoittautuvat käytännössä toimiviksi ja markkinoille soveltuviksi. Kokonaisuudessaan antibakteeriset HA-hydrogeelit edustavat lupaavaa uutta lähestymistapaa antibakteeristen materiaalien kehityksessä.

Avainsanat: hyaluronihappopohjaiset hydrogeelit, antibakteerisuus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

Opinnäytteessäni käytetyt tekoälytyökalut ja niiden käyttötarkoitukset on kuvailtu alla:

**ChatGPT (GPT-4o):**

**Käyttötarkoitus ja osio, jossa työkalua käytettiin:** aiheen valinta ja tutkimuskysymysten määrittäminen, työn rakenteen jäsentely ja ideointi, lähteiden ja käsitteiden kääntäminen englannista suomeksi, monimutkaisten aiheiden yksinkertaistaminen kirjoittamisen helpottamiseksi, tekstin viimeistely johdannossa ja johtopäätöksissä

**Scopus AI:**

**Käyttötarkoitus ja osio, jossa työkalua käytettiin:** tiedonhankinta, lähteiden etsiminen, monimutkaisten aiheiden yksinkertaistaminen kirjoittamisen helpottamiseksi

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien tekoälyllä tuotetut osat, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. HYALURONIHAPPOPOHJAISET HYDROGEELIT .....	4
3. HA-HYDROGEELIEN LUONTAISET ANTIMIKROBISET OMINAISUUDET .....	6
4. HA-HYDROGEELIEN ERILAISET KEMIAALLISET MUOKKAUKSET .....	10
4.1 Antibakteeriset aineet .....	10
4.1.1 Antibiootit .....	10
4.1.2 Metallinanopartikkelit .....	13
4.1.3 Antimikrobiset peptidit .....	18
4.2 Luonnolliset polymeerit .....	20
4.2.1 $\epsilon$ -polylyysiini .....	20
4.2.2 Kitosaani .....	22
4.3 Kemiallisten muokkauksien vertailua .....	24
5. ANTIBAKTEERISTEN HA-HYDROGEELIEN SOVELLUKSIA .....	27
6. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	29
LÄHTEET .....	31

# LYHENTEET JA MERKINNÄT

Ag@Lig NP	Hopealigniininanopartikkeli
AgNP	Hopeananopartikkeli
AHA	Aldehyde containing hyaluronic acid, aldehydihyaluronihappo
AMP	Antimikrobinen peptidi
AMX	Amoxicillin, amoksisilliini
BDDE	1,4-butaanidioli-diglycidyyli-etteri
CA	Cathecol, katekoli
CC	Carboxylated chitosan, karboksyloitu kitosaani
CFX	Cefuroxime, kefuroksiimi
DTP	3,3'-ditiobis(propionyylihydratsidi)
DVS	Divinyylisulfonaatti
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, 1-etyyli-3-(3-dime- tyyliaminopropyli) karbodi-imidi
EPL	$\epsilon$ -polylysiini
GS	Gentamisiini
HA	Hyaluronic acid, hyaluronihappo
HA-hydrogeeli	Hyaluronihappopohjainen hydrogeeli
HA-SH	Thiolated hyaluronic acid, tioloitu hyaluronihappo
LMW	Low-molecular-weight, pienimoolimassainen
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , metisilliinille vastustus- kykyinen <i>Staphylococcus aureus</i>
NHS	N-hydroksisukkinimidi
PRSA	Penicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , penisilliinille vastustus- kykyinen <i>Staphylococcus aureus</i>
TCX	Tetracycline, tetrasykliini
ZnONP	Sinkkioksidinanopartikkeli

# 1. JOHDANTO

Bakteeri-infektiot ja antimikrobinen resistenssi ovat kasvava haaste terveydenhuollossa [1]. Haavat, jotka syntyvät fyysisen vamman tai leikkauksen seurauksena, ovat erityisen alttiita infektioille. Infektion seurauksena haava voi märkiä, paraneminen hidastua ja pahimmassa tapauksessa kehittyä jopa sepsikseksi. Kroonisten haavojen yhteydessä bakteeri-infektiot ovat yksi merkittävimmistä paranemista estävistä tekijöistä [2].

Haavoissa infektiot ovat tyypillisesti polymikrobisia, eli niissä esiintyy useita eri bakteerikantoja, mikä vaikeuttaa niiden hoitoa [3]. Yksi yleisimmistä vakavia kudosisinfektioita aiheuttavista bakteereista on gram-positiivinen *Staphylococcus aureus*, jota hoidetaan usein beetalaktaamiantibioteilla. Beta-lactam antibiootit ovat johdettu metisilliinistä ja penisilliinistä ja niihin kuuluvat esimerkiksi amoksisilliini ja kefuroksiimi. Viime vuosikymmeninä *S. aureus* on kuitenkin kehittänyt näille antibiooteille vastustuskykyisiä kantoja, kuten metisilliinille vastustuskykyinen *Staphylococcus aureus* (MRSA) ja penisilliinille vastustuskykyinen *Staphylococcus aureus* (PRSA), mikä vaikeuttaa hoitoa. [4] Muita haavainfektioissa yleisesti esiintyviä bakteereja ovat *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ja *Acinetobacter baumannii* [3].

Monet kudosisinfektiot ovat vaikeahoitoisia, sillä bakteerit voivat muodostaa biofilmejä eli mikrobiyhteisöjä, jotka kiinnittyvät erilaisille pinnoille. Biofilmit ovat huomattavasti vastustuskykyisempiä antibiooteille kuin yksittäisinä, planktonisessa muodossa esiintyvät bakteerit. [5] Esimerkiksi *P. aeruginosa* -biofilmit, joita esiintyy virtsaketetreissa, ovat jopa tuhat kertaa vastustuskykyisempiä tobramysiiniantibiootille kuin samat bakteerit planktonisessa muodossa [6].

Antibioottiresistenssin ja vaikeiden biofilmi-infektioiden takia uusille antibakteerisille materiaaleille on suuri kysyntä. Antibakteeriset hydrogeelit ovat herättäneet suurta kiinnostusta viime vuosina niiden moninaisten ominaisuuksien vuoksi. Ne on suunniteltu paitsi hillitsemään bakteerien kasvua mutta myös ehkäisemään infektion syntyä, lievittämään tulehdusta ja edistämään kudoksen uusiutumista [7]. Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia ja hydrofiilisiä verkostoja, jotka koostuvat joustavista polymeeriketjuista. Ne voivat muodostaa lähes minkä tahansa muodon ja voivat absorboida suuria määriä vettä. [8] Hydrogeelit muistuttavatkin rakenteeltaan soluväliainetta, joten niitä käytetään paljon kudostekniikassa [9]. Sen lisäksi hydrogeelejä käytetään muun muassa haavanhoidossa ja sairaalavälineiden pinnoitteina. Hydrogeelit ovat monin tavoin parempia kuin perinteiset

tukirakenteet. Ne ovat bioyhteensopivampia, helposti muokattavia ja ne pystyvät edistämään solujen kasvua ja erilaistumista. [7] Haavanhoidossa hydrogeelit tarjoavat kosteudesta, säätelevät nesteiden vaihtoa haavanpinnasta, viilentävät haavaa, suojaavat haavaa infektioilta ja edistävät haavan paranemista [10]. Hydrogeelit ovat myös joustavia, kun taas perinteiset haavasidokset eivät jousta, eivät ole huokoisia ja kiinnittyvät haavaan, jolloin niiden poisto on kivuliasta [11].

Hyaluronihappo (HA) on yksi lupaavimmista materiaaleista antibakteerisille hydrogeeleille. Sitä esiintyy luonnostaan ihmiskehossa, joten se on bioyhteensopiva ja biohajoava [12]. HA on hydrofiilinen, mikä tekee siitä hyvän kudosta kosteuttavan materiaalin [13]. HA ehkäisee biofilmien syntymistä ja sen antibakteerisia ominaisuuksia voidaan helposti parantaa tekemällä siitä hydrogeelejä ja sitomalla siihen erilaisia antibakteerisia aineita, kuten metallinanopartikkeleita ja antimikrobisia peptidejä [14]. Hyaluronihappopohjaiset hydrogeelit (HA-hydrogeelit) vapauttavat antibakteerisia aineita paikallisesti ja pitkällä aikavälillä, jolloin niitä tarvitaan vähemmän ja antibakteeristen aineiden myrkyllisyys ei ole yhtä suuri riski [7]. HA-hydrogeeleillä voidaan hoitaa erityisesti kroonisia haavoja, kuten diabeetikkojen jalkahaavoja ja painehaavoja, keinonivel- ja implantti-infektioita sekä katetriin liittyviä infektioita. Lisäksi HA-hydrogeeleillä voidaan ehkäistä bakteri-infektioiden syntymistä haavoissa, implanteissa ja sairaalavälineissä. [13] Erilaisten antibakteeristen HA-hydrogeelien yleisimpiä haasteita ovat niiden myrkyllisyys suurina pituisuuksina, heikot mekaaniset ominaisuudet ja huono kustannustehokkuus [3,13]. Lisäksi niitä on tutkittu vielä melko vähän eikä niitä ole vielä kaupallistettu. Kuitenkin muita antibakteerisia hydrogeelejä, kuten hopeananopartikkeleita (AgNP) sisältäviä hydrogeelejä, on jo onnistuneesti kaupallistettu, mikä osoittaa hydrogeelien potentiaalinen antibakteerisenä aineena.

Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on tutkia, miten HA-hydrogeelien antibakteerisia ominaisuuksia voidaan parantaa. Työssä selvitetään, miten HA-hydrogeelejä voidaan kemiallisesti muokata antibakteeristen ominaisuuksien parantamiseksi. Esimerkit keskittyvät pääosin haavanhoitoon, sillä siitä on saatavilla eniten tutkimusta. Työssä pohditaan myös, mitä etuja ja haasteita erilaisilla kemiallisilla muokkauksilla on. Työssä tarkastellaan vain HA-hydrogeelien ja sen erilaisten sovellusten itsensä tuottamaa antibakteerista vaikutusta, joten työstä rajataan ulkopuolelle erilaiset vuorovaikutusmekanismit immuunijärjestelmän kanssa sekä erilaiset antimikrobisuuteen vaikuttavat ympäristökijät.

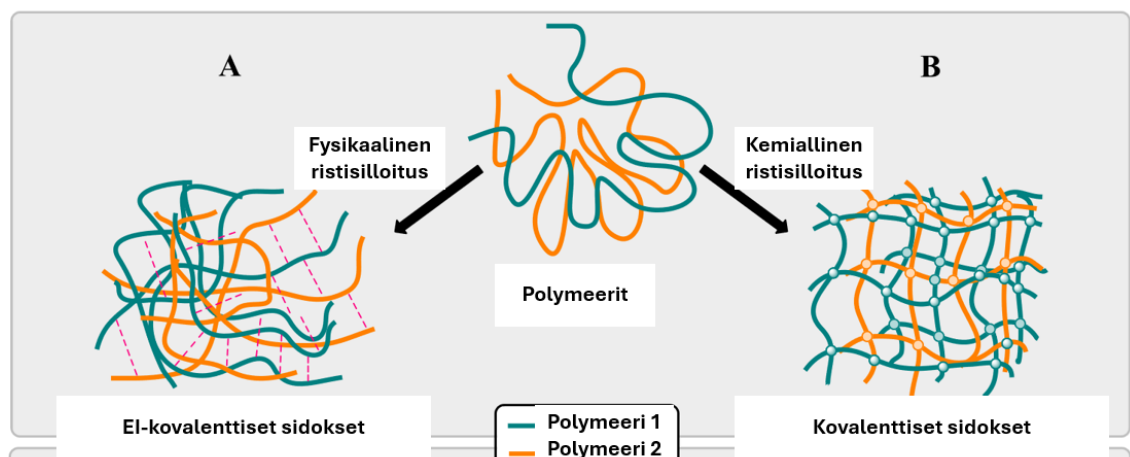
Työn luvussa 2 esitellään HA-hydrogeelit. Luvussa 3 tutkitaan HA-hydrogeelien luontaisia antimikrobisia ominaisuuksia. Luvussa 4 tarkastellaan erilaisia kemiallisia muokkauksia, joilla HA-hydrogeelien antibakteerisia ominaisuuksia voidaan parantaa. Luvussa 5

vertaillaan näitä muokkauksia. Luvussa 6 esitellään antibakteeristen HA-hydrogeelien sovelluksia ja pohditaan niiden tulevaisuutta. Luvussa 7 esitetään työn johtopäätökset.

## 2. HYALURONIHAPPOPOHJAISET HYDROGEE- LIT

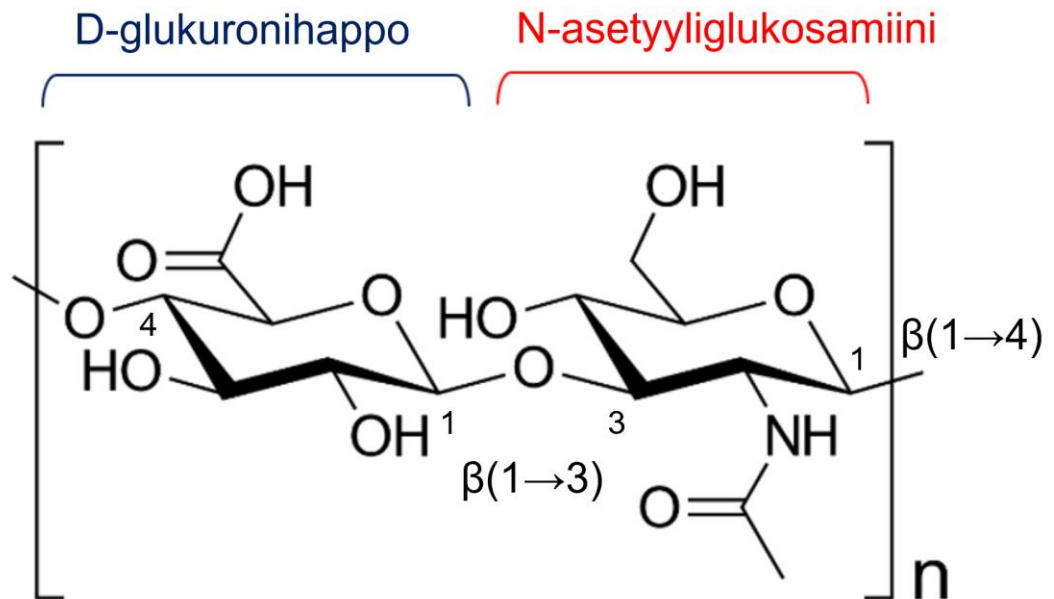
Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia ja hydrofiilisiä verkostoja, jotka koostuvat joustavista polymeeriketjuista. Ne muistuttavat rakenteeltaan soluväliainetta, sillä ne voivat turvota absorboimalla suuria määriä nestettä. Soluväliaine on kudosten solujen ulkopuolinen rakenne, joka tukee soluja ja säätelee niiden toimintaa. Se koostuu useista bioaktiivisista polymeereistä, kuten peptideistä, proteiineista ja glykosaminoglykaaneista. Lisäksi hydrogeelit voivat kapseloida ja vapauttaa bioaktiivisia yhdisteitä, kuten lääkkeitä ja kasvutekijöitä, ja tukea solujen uusitumista ja kasvua. Hydrogeelejä käytetäänkin lääketieteessä esimerkiksi kudostekniikassa ja lääkekuljettimina. [15]

Hydrogeelit valmistetaan yleensä ristosilloittamalla. Ristosilloitus tarkoittaa prosessia, jossa molekyylien välille muodostetaan fysikaalisia tai kemiallisia sidoksia, jolloin syntyy kolmiulotteinen verkosto. Ristosilloitusta havainnollistetaan kuvassa 2. Fysikaalisesti ristosilloitetussa hydrogeelissä polymeeriketjut ovat yhdistyneet sekundäärisillä sidoksilla, kuten vety- ja ionisidoksilla. Fysikaalisesti ristosilloitetut hydrogeelit ovat turvallisia, helppoja valmistaa ja bioyhteensopivia, koska niiden valmistuksessa ei käytetä yleensä myrkyllisiä reaktion käynnistäjiä tai kemiallisia katalyyttejä. Fysikaalisesti ristosilloitettujen hydrogeelien heikkous ovat huonot mekaaniset ominaisuudet, kuten kestävyys ja joustavuus. Lisäksi niiden hajoamisnopeutta on vaikea säätää. Kemiallisessa ristosilloituksessa molekyylien välille muodostuu puolestaan kovalenttisia sidoksia. Hydrogeelin mekaaniset ominaisuudet paranevat, jolloin se on stabiilimpi fysiologisessa ympäristössä. Lisäksi sen hajoamisen nopeutta on helpompi säätää. Hydrogeelin ristosilloitustapa on hyvä valita hydrogeelin käyttötarkoituksen mukaan. [15]



**Kuva 2.** Fysikaalinen (A) ja kemiallinen (B) ristosilloitus. Muokattu lähteestä [16].

HA on luonnollinen biopolymeeri, jota esiintyy kaikissa elävissä organismeissa. Se on yksi soluväliaineen tärkeimmistä rakennusaineista, ja sitä löytyykin esimerkiksi nivelnestestä ja silmästä. HA on mukopolysakkaridi eli glykosaminoglykaani, joka koostuu toistuvista D-glukuronihapon ja N-asetyyliglukosamiinin muodostamista disakkaridiyksiköistä. Disakkaridit linkittyvät toisiinsa  $\beta(1\rightarrow3)$  ja  $\beta(1\rightarrow4)$  -glykosididoksilla muodostaen lineaarisen polysakkaridin, joka voi olla useita tuhansia sokeriyksikköjä pitkä. [12] Kuvassa 1 on esitetty hyaluronihapon rakenne.



**Kuva 1.** HA-molekyylin rakenne. Muokattu lähteestä [14].

HA:lla on monia hyödyllisiä ominaisuuksia biomateriaalina. Se on hydrofiilinen, viskoelastinen, bioyhteensopiva, kemiallisesti muokattava ja resorboituva eli se hajoaa ja imeytyy elimistöön. HA hajoaa nopeasti fysiologisessa ympäristössä, sillä sen puoleensa vetämä vesi ja hyaluronidaasi-entsyymi hajottavat sitä. HA:sta onkin kehitetty hydrogeelejä, jotka ovat stabiilimpeja ja ovat näin sopivampia erilaisissa sovelluksissa. HA-hydrogeelejä on lukuisia erilaisia, kuten nanogeelejä, nanokuituja, mikropartikkeleita, mikroneulalaastareita, injektoitavia hydrogeelejä ja tukirakenteita [17]. Näiden hydrogeelien valmistuksessa HA:ta muokataan lisäämällä siihen molekyyliä tai ristisilloittamalla sitä.

### 3. HA-HYDROGEEELIEN LUONTAISET ANTIMIKROBISUUS OMINAISUUDET

HA on luonnostaan lievästi antimikrobinen. Se on bakteriostaattinen, eli se hidastaa bakteerien kasvua. Se ei kuitenkaan tapa bakteereja, joten se ei ole bakterisidinen. HA:lla on antimikrobista vaikutusta niin Gram-positiivisia kuin Gram-negatiivisia bakteereja vastaan. Antimikrobista vaikutusta on havaittu *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* ja *E. coli* -bakteereja vastaan. [14] Mekanismeja HA:n luontaisen antimikrobisen ominaisuuden taustalla ei vielä tarkalleen tunneta. Siihen vaikuttavat muun muassa HA:n fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, joita käsitellään tulevissa alaluvuissa.

HA:n antimikrobisuutta on tutkittu erityisesti biofilmin muodostumisen ehkäisyssä. Biofilmit ovat mikrobiyhteisöjä, jotka kiinnittyvät joko bioottisille pinnoille, esimerkiksi haavaan, tai abioottisille pinnoille, esimerkiksi sairaalavälineisiin. Biofilmi muodostuu, kun irralliset mikrobit havaitsevat pinnan ja tarttuvat siihen. Mikrobit tuottavat soluvälimatriisin, jonka sisälle ne kapseloituvat. Näin muodostunut biofilmi suojaa mikrobeja antimikrobisilta agenteilta, kuten antibiooteilta ja kehon immuunijärjestelmältä. HA-hydrogeelit voivat ehkäistä biofilmin muodostumista ja näin vähentää tulehduksia kudoksissa ja ehkäistä mikrobien kasvua sairaalavälineiden pinnoilla. [5]

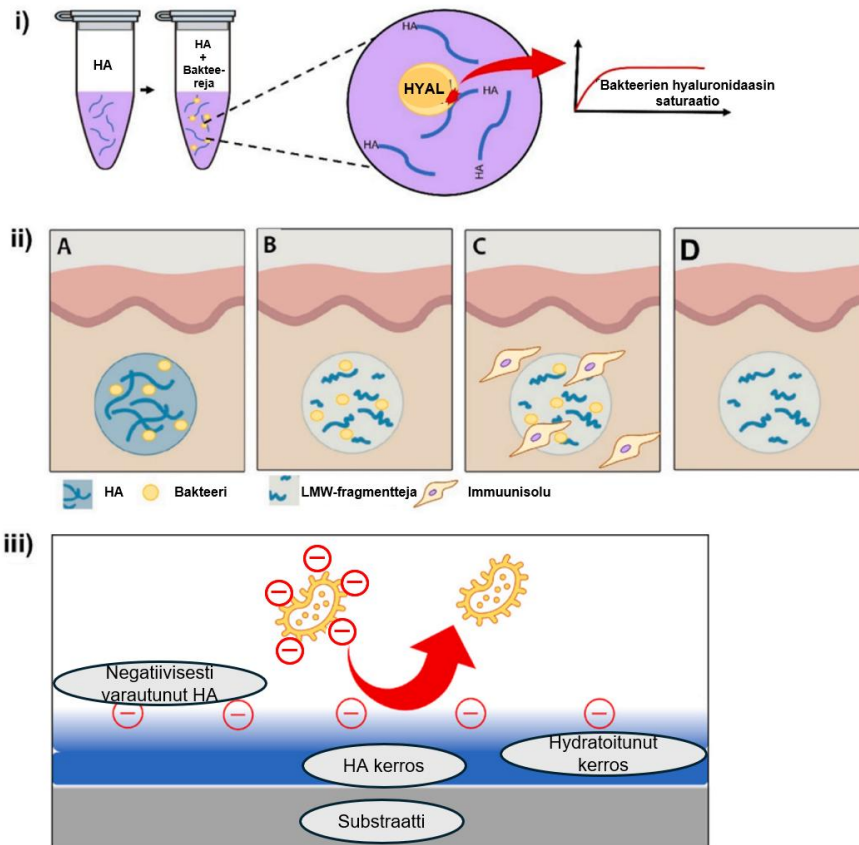
HA:n kemiallinen rakenne mahdollistaa sen monet antimikrobiset ominaisuudet. HA:lla on neljä erilaista funktionaalista ryhmää: asetamidi, karboksyyli, hydroksyyli ja terminaalinen aldehydi (kuva 1). Näistä karboksyyli- ja hydroksyyli-ryhmät sekä asetamidiryhmän amiiniosa ja karbonyyliryhmä ovat poolisia ja ne muodostavat HA:lle negatiivisen nettovarauksen. Pooliset kohdat muodostavat myös vetysidoksia toistensa ja veden kanssa. Siksi HA sitoo paljon vettä. Asetamidiryhmän metyyli-ryhmä ja glukosidirungon hiilivetysidokset ovat puolestaan poolittomia. Ne vuorovaikuttavat hydrofobisten molekyylien, kuten lipidien ja hydrofobisten lääkeaineiden, kanssa. Tämä lisää HA-hydrogeelien kemiallista muokattavuutta erilaisiin biolääketieteellisiin sovelluksiin. Yhdessä pooliset ja poolittomat osat lisäksi mahdollistavat HA:n erilaisten konformeerien muodostumisen. [18, s. 97–104]

HA:n funktionaalisilla ryhmillä on myös omia käyttötarkoituksiaan. Hydroksyyli-ryhmät mahdollistavat monia kemiallisia reaktioita, kuten eetterin ja esterin muodostuksen, substituution ja eliminaation. HA:n reaktiivisuus riippuukin pääosin hydroksyyli-ryhmistä.

Hydroksyyliiryhmät ovat pääosassa HA:n ristosilloituksessa. [18, s.121–124] Hydroksyyliiryhmiä voidaan myös muokata esterifikaatiolla, jolloin hydrogeeliin voidaan sitoa erilaisia molekyylejä, kuten proteiineja [19]. Lisäksi hydroksyyliiryhmiä voidaan hapettaa aldehydeiksi, jolloin se voi reagoida Schiff-emäs reaktiolla proteiinien [20] ja polysakkaridien [21] kanssa. Terminaalinen aminoryhmä voi reagoida myös Schiff-emäs reaktiolla.

Karboksyyliryhmät voivat muodostaa esteri- tai amidisidoksia, mikä mahdollistaa esimerkiksi peptidien [19,22], antibioottien [23] ja polyamiinien [15] kiinnittämisen hydrogeeliin. Lisäksi karboksyyliryhmiin voi kiinnittyä fysikaalisin sidoksin antibiootteja [4], metallikaationeita [24,10], polyamiineja [15] tai polysakkarideja [25], jotka toimivat antimikrobisina aineina. Karboksyyliryhmiä käytetään myös ristosilloitukseen esimerkiksi karbodiimidien ja epoksidien kanssa [18, s. 124–128].

Myös HA:n monet fysikaaliset ominaisuudet lisäävät sen antimikrobisuutta. HA-molekyylit ovat pitkiä, joten ne muodostavat liuoksen, jolla on korkea viskositeetti ja jossa bakteerien liike ja diffuusio estyvät [18, s. 102–104]. Pirnazar et al. [26] havaitsivat, että HA:n suuri moolimassa ja konsentraatio korreloivat bakteriostaattisen vaikutuksen kanssa. Tutkimuksessa testattiin useiden mikro-organismien kasvua kolmella eri HA:n moolimassalla (141, 757 ja 1 300 kDa) ja kolmella eri HA-konsentraatiolla (0,5, 1,0 ja 2,0 mg/mL). 1 300 kDa:n (kilodalton) moolimassa ja 2,0 mg/ml:n konsentraatio todettiin tehokkaimiksi. HA:n suurta moolimassaa ja konsentraatiota voidaan hyödyntää myös hydrogeelien valmistuksessa. HA:n suuren konsentraation bakteriostaattinen vaikutus voi liittyä myös HA:n ylimäärään. On nimittäin esitetty, että HA:n ylimäärä aiheuttaisi bakteerien hyaluronidaasi-entsyymien (HYAL) kyllästymisen, jolloin entsyymillä ei olisi enää kykyä hajottaa HA:ta ja bakteerien kasvu hidastuisi [14]. Tätä on havainnollistettu kuvassa 3 i).



**Kuva 3.** Kolme kirjallisuudessa esitettyä mekanismia HA:n antimikrobiselle vaikutukselle. i) Hyaluronidaasientsyymin (HYAL) kyllästyminen HA:n ylimäärässä hidastaa bakteerien kasvua. ii) Bakteerit hajottavat HA:ta LMW-muotoon, jolloin immuunisolut pystyvät tuhoamaan bakteereja. iii) HA-hydrogeelin negatiivisesti hydratoitunut pinta hylkii negatiivisesti varautuneita bakteereja. Muokattu lähteestä [27].

In vivo -tutkimuksissa on myös ehdotettu epäsuoraa mekanismia antimikrobisuudelle. Sitä on havainnollistettu kuvassa 3 ii), jossa bakteerien hyaluronidaasientsyymi hajottaa HA:ta, jolloin bakteeri ei kykene kiinnittymään antiadhesiiviseen substraattiin (A). HA:n hajotessa syntyy pienimoolimassaisia (low-molecular-weight, LMW) HA-fragmentteja (B). Nämä LMW-fragmentit houkuttelevat luontaisia immuunisoluja, kuten neutrofiilejä, infektiolueelle (C). Lopulta immuunisolut kykenevät tuhoamaan bakteerit (D).

HA-hydrogeelien toimintamekanismi biofilmin muodostamisen estämisessä perustuu HA:n antimikrobisten ominaisuuksien lisäksi hydrogeelin tarjoamaan fyysiseen suojaan. Kun haava peitetään hydrogeelillä, mikrobit eivät pääse kosketuksiin suoraan kudoksen kanssa. HA-hydrogeeleillä on tähän tarkoitukseen sopiva kolmiulotteinen ja tiheä verkostorakenne [28, s. 63–64]

HA-hydrogeelien pintaominaisuudet rajoittavat myös bakteerien kasvua. Esimerkiksi hydrofiilisen HA-hydrogeelin pintaan muodostuva vesimolekyylikerros estää bakteerin soluvälimatriisin tuotantoa tai bakteerien kiinnittymistä HA:n pintaan. Pinnan vesimolekyylit vaikeuttavat bakteerien pinnan tunnistamista, jolloin irralliset bakteerit eivät pysty

kiinnittymään pinnalle. Lisäksi biofilmin polymeerimatriisilla saattaa olla riittämättömästi hydrofiilisiä kiinnityskohtia, jolloin se ei ole tarpeeksi stabiili pysyäkseen hydratoituneella pinnalla. Myös pinnan elastisuus vaikuttaa biofilmin muodostumiseen. On havaittu, että mitä pehmeämpi HA-hydrogeelin pinta oli, sitä vaikeampi *E. coli* -bakteerien oli liikkua siinä ja muodostaa biofilmiä. Pinnan korkealla hydratoitumisasteella oli kuitenkin suurempi vaikutus biofilmin muodostumisen ehkäisyssä. [29] Negatiivisesti varautuneiden bakteerien kohdalla myös negatiivisesti varautunut HA-hydrogeelin pinta hylkii niitä, jolloin bakteerin adheesio estyy. Varauksen ja pinnan hydratoitumisen vaikutusta on havainnollistettu kuvassa 3 iii). [27]

## 4. HA-HYDROGEELIEN ERILAISET KEMIALLISET MUOKKAUKSET

### 4.1 Antibakteeriset aineet

HA-hydrogeelin antibakteerisia ominaisuuksia voidaan parantaa lisäämällä siihen antibakteerisia aineita, jotka tappavat bakteereja (bakterisidit) tai hidastavat niiden kasvua (bakteriostaatit). Antibakteeriset aineet sidotaan hydrogeeliin esimerkiksi kovalenttisilla tai ionisilla sidoksilla ja ne vapautuvat hydrogeelistä diffuusiolla tai kun hydrogeeli hajoaa. Antibakteeriset aineet ovat hyödyllisiä, kun halutaan pitkäaikaista suojaa bakteerien kasvua vastaan, sillä hydrogeeli voidaan suunnitella vapauttamaan antibakteerisia aineita hitaasti.

Antibakteeriset aineet voivat olla luonnollisia, kuten antimikrobiset peptidit tai synteettisiä, kuten metallinanopartikkelit. Antibakteerisia aineita HA-hydrogeeleissä on tutkittu paljon ja seuraavissa alaluvuissa esitellään niistä lupaavimpia.

#### 4.1.1 Antibiootit

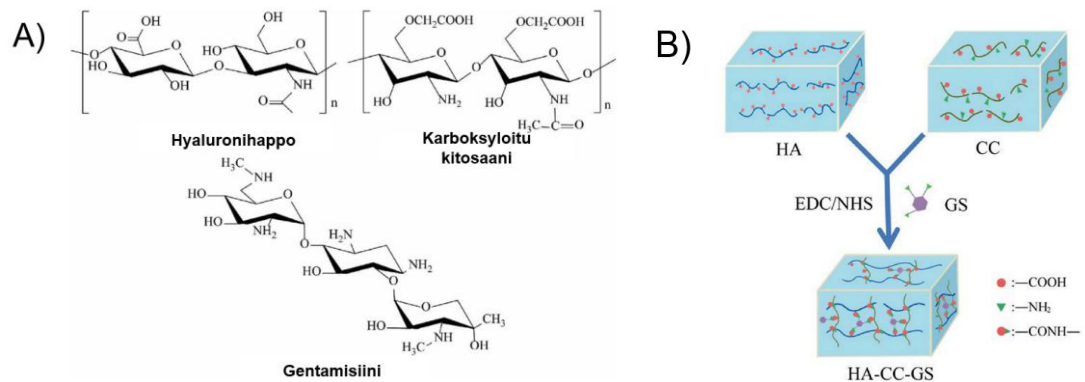
Antibiootit ovat kemikaaleja, jotka selektiivisesti estävät virulenttien mikro-organismien kasvua ja samalla aiheuttavat mahdollisimman vähän vahinkoa isäntäsoluille. Antibiootteja käytetään bakteri-infektioiden hoidossa. Erilaisia antibiootteja on useita ja niiden toimintamekanismit eroavat hieman toisistaan. Pääperiaatteena antibiootit estävät proteiini- ja DNA-synteesin bakteerissa, jolloin bakteerien kasvu estyy. [30, s. 1–2, 10–11] Antibioottien lisääminen HA-hydrogeeliin parantaakin sen antibakteerisia ominaisuuksia antibiootin vaikutuskohteena olevia bakteereja vastaan. Teoriassa mitä tahansa antibioottia voi lisätä HA-hydrogeeliin ja useita antibiootteja onkin testattu. Seuraavissa kappaleissa mainittujen antibioottien lisäksi muun muassa ampisilliinia [31] ja vankomysiiniä [32] on lisätty HA-hydrogeeliin onnistuneesti.

Andrade del Olmo et al. [4] tutkivat kolmea eri antibioottia: kefuroksiimia (cefuroxime, CFX), amoksisilliiniä (amoxicillin, AMX) ja tetrasykliiniä (tetracycline, TCN), jotka absorboitiin HA-DVS-hydrogeeleihin. Divinyylisulfonaattia (DVS) käytetään HA-hydrogeelin ristosilloitukseen. Se parantaa hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia ja stabiilisuutta. Hydrogeelien antibakteerista tehoa tutkittiin *S. aureusta* vastaan. TCN:ää sisältävä hydrogeeli pystyi estämään bakteerien kasvun, kun taas CFX:ää ja AMX:ää sisältävät hydrogeelit eivät toimineet toivotulla tavalla. Kun kaikkiin eri hydrogeeleihin lisättiin vielä anti-

inflammatorista asetyylisalisyylihappoa, hydrogeelien antibakteeriset ominaisuudet paranivat huomattavasti. Kaikkia eri antibiootteja sisältävissä hydrogeeleissä bakteerit kuolivat kokonaan kuuden tunnin aikana fysiologisissa olosuhteissa. Tätä anti-inflammatorisen aineen ja antibiootin yhteisvaikutusta kutsutaan synergistiseksi vaikutukseksi. Voidaan havaita, että synergistinen vaikutus tehoi myös antibiootille resistentteihin kantoihin, jotka eivät kuolleet pelkän antibiootin vaikutuksesta.

Andrade del Olmo et al. [4] tarkastelivat myös pidempiaikaista antibakteerista vaikutusta. Hydrogeeli vapauttaa antibiootteja diffuusiomekanismilla. Antibiootit ovat hydrogeelissä kiinni fysikaalisilla sidoksilla. Positiivisesti varautuneet antibiootit, kuten TCN ja AMX, vuorovaikuttavat vahvemmin HA:n negatiivisesti varautuneiden karboksylaattiryhmien kanssa. Tämän takia TCN:n ja AMX:n puoliintumisaika on pidempi ja hydrogeelin antibakteerinen vaikutus voi kestää yli 10 päivää, kun taas CFX vapautui kokonaan 10 päivässä. HA-DVS hydrogeelien haittana on DVS:n myrkyllisyys ihmisluille, mikä vaatii lisää tutkimusta.

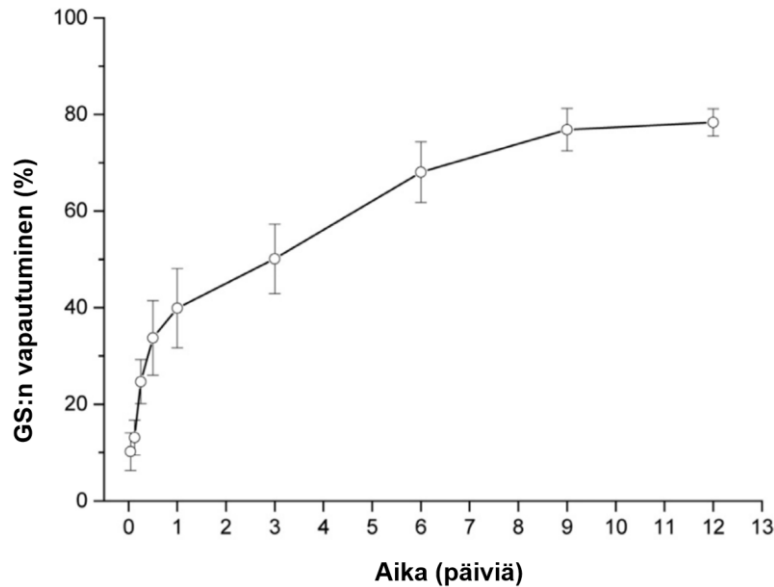
Gentamisiini (gentamicin, GS) on laajakirjoinen aminoglykosidiantibiootti, jota on myös tutkittu HA-hydrogeeleissa. Huang et al. [23] kehittivät hydrogeelikalvon ristosilloittamalla kemiallisesti HA:ta, karboksyloitua kitosaania (carboxylated chitosan, CC) ja gentamisiinia. CC omaa samankaltaisia ominaisuuksia HA:n kanssa. Kuvassa 4 on havainnollistettu HA-CC-GS-hydrogeelin ristosilloittaminen karboksyyli- ja aminoryhmien avulla.



**Kuva 4.** A) Hyaluronihapon (HA), karboksyloidun kitosaanin (CC) ja gentamisiinin (GS) rakennekaavat. B) HA-CC-GS-hydrogeelin ristosilloittaminen amidisidoksella. 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli) karbodi-imidiä (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) ja N-hydrosuksukkinimidia (NHS) käytetään reaktioagenteina. Muokattu lähteestä [23].

Huang et al. [23] toteuttivat FTIR-analyysin, jossa havaittiin, että GS-molekyylit kiinnittyivät HA- ja CC-molekyyleihin amidisidoksella. HA-CC-GS-hydrogeeliin muodostui siten enemmän amidisidoksia kuin HA-CC hydrogeelin. Tämän vuoksi GS:n lisääminen hidasti hydrogeelin hajoamista. Ristosilloitettu antibiootti vapautuu hitaammin verrattuna fysikaalisiin sidoksiin linkittyneille antibiooteille. Ristosilloitettu antibiootti vapautuu samaan

tahtiin hydrogeelin hajoamisen kanssa, kun taas absorpoitu antibiootti vapautuu diffuusiomekanismilla. Tutkimuksessa osa GS:stä ei kuitenkaan ristsilloittunut vaan vapautui diffuusiomekanismilla, jolloin ensimmäisen vuorokauden aikana sitä vapautui enemmän, kuten kuvasta 5 voi nähdä. Tämä voi olla haavanhoidon kannalta epäedullista, koska kerralla vapautuva suuri antibioottimäärä voi olla myrkyllistä.



**Kuva 5.** GS:n vapautuminen HA-CC-GS-hydrogeelistä ajan funktiona. Muokattu lähteestä [23].

HA-CC-GS-hydrogeeli myös edesauttoi fibroblastien eli sidekudossolujen kasvua haavassa. Hydrogeeli esti *P. aeruginosa* ja *S. aureus* -bakteerien kasvua tehokkaammin verrattuna kontrolliryhmiin. GS:n hyödyntäminen HA-CC hydrogeelifilmissä onkin lupaava sovellus haavasidoksissa. GS heikensi hydrogeelin turpoamisastetta eikä sillä ollut anti-inflammatorista vaikutusta hydrogeeliin. Yleisesti ottaen antibiootit eivät paranna hydrogeelin mekaanisia tai anti-inflammatorisia ominaisuuksia.

HA-hydrogeelien avulla antibiootteja voidaan hyödyntää tehokkaammin, sillä HA-hydrogeeliin sidottu antibiootti vapautuu pitkällä aikavälillä [4,23]. Tällöin antibiootteja tarvitsee ottaa harvemmin ja annostelu on tasaisempi verrattuna esimerkiksi suun kautta otettaviin antibiootteihin. Lisäksi HA-hydrogeeleillä antibiootteja voidaan annostella paikallisesti, jolloin niitä tarvitaan vähemmän. [33] Tämä vähentää antibioottien haittavaikutuksia verrattuna esimerkiksi suun kautta otettaviin tai suonensisäisiin antibiootteihin, jotka vaikuttavat koko elimistöön. Antibioottien vähäisempi käyttö vähentää myös antibioottiresistanttien bakteerikantojen kehittymistä, sillä antibiootit eivät ole biohajoavia vaan vapautuvat jätevesien mukana ympäristöön [34]. Lisäksi HA-hydrogeeleihin sidotuilla antibiooteilla voidaan hoitaa paremmin antibioottiresistenttien bakteerikantojen aiheuttamia tulehduksia, esimerkiksi synergistisen vaikutuksen avulla [4]. Ristiriitaisesti antibioottien

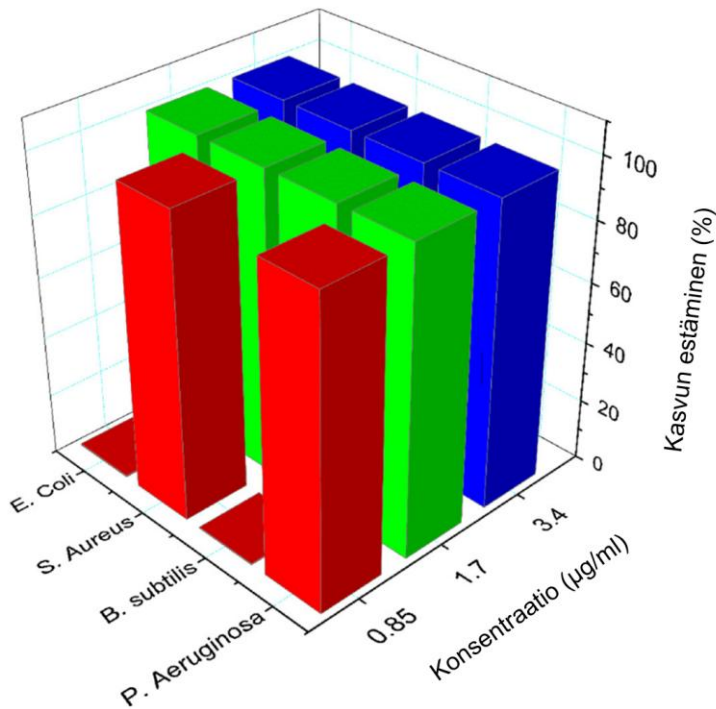
pienempäänkin käyttöön liittyy silti riski resistenttien bakteerikantojen kehittymiselle, joten antibioottien käyttöä HA-hydrogeeleissä tulee tarkastella kriittisesti.

#### 4.1.2 Metallinanopartikkelit

Metallinanopartikkelit ovat 1–100 nm kokoisia metallipartikkeleita tai niiden yhdisteiden, kuten sulfidien, hydroksidien ja oksidien, muodostamia partikkeleita. Niiden pieni koko ja suuri pinta-ala suhteessa tilavuuteen tekevät niistä kemiallisesti aktiivisempia, stabiilimpia ja herkempiä isompiin metallikappaleisiin verrattuna. Metallinanopartikkeleita hyödynnetään eri biolääketieteen aloilla. Tarkkaa mekanismia metallinanopartikkeleiden antibakteerisuudelle ei tiedetä, mutta tämänhetkisen tiedon mukaan ne vaurioittavat bakteerien solukalvoa, vapauttavat metalli-ioneja ja muodostavat happiradikaaleja. Nämä aiheuttavat rakenteellista vahinkoa bakteereille ja häiriöitä niiden aineenvaihduntareitteihin. Koska metallinanopartikkeleiden toimintamekanismit poikkeavat antibioottien mekanismeista, metallinanopartikkelit voivat tehotta resistentteihin bakteerikantoihin. [35] Eniten tutkittuja antibakteerisia metallinanopartikkeleita ovat hopea-, kulta-, kupari-, kuparioksi- ja sinkkioksidinanopartikkelit [36].

Hopeananopartikkelit (AgNP) ovat yksi eniten tutkituista antibakteerisista aineista. Niiden valmistus on vaatinut myrkyllisiä aineita mutta niille on kehitetty yhä kestävämpiä ja kustannustehokkaampia valmistusmenetelmiä [14]. AgNP:illä on havaittu olevan bakterisidista vaikutusta niin Gram-positiivisia kuin Gram-negatiivisia bakteereja vastaan. AgNP:itä pidetäänkin lupaavana ratkaisuna mikrobiresistenssiin, sillä se tehoaa moniin eri bakteerikantoihin sekä niiden resistentteihin muotoihin [37]. Lisäksi HA-hydrogeelit mahdollistavat niiden kontrolloidun vapautumisen ja pidemmän vaikutusajan.

Makvandi et al. [10] valmistivat termosensitiivisiä ja injektoitavia hydrogeelejä HA:sta, maissisilkkiuutteesta (corn silk extract, CSE) ja AgNP:eistä. CSE:tä käytetään AgNP:iden synteessissä ja lisäksi se edistää haavan parantumista. AgNP:t lisättiin hydrogeeliin diffuusiolla, jolloin ne kiinnittyivät hydrogeeliin fysikaalisilla sidoksilla. Hydrogeelin havaittiin omaavan hyvät antibakteeriset ominaisuudet niin Gram-positiivisia (*B. subtilis*, *S. aureus*) kuin Gram-negatiivisia (*P. aeruginosa*, *E. coli*) bakteereja vastaan. Kuvasta 6 voidaan havaita, että 1,7 µg/ml:n tai suuremman konsentraation liuoksilla bakteerien kasvu saatiin estettyä lähes kokonaan. Lisäksi hydrogeelien käyttö haavanhoidossa vaikuttaa lupaavalta, sillä hydrogeelillä hoidetut haavat sulkeutuivat 80 % ja kontrolliryhmän haavat 40 % 48 tunnin aikana.



**Kuva 6.** AgNP:iden konsentraation vaikutus liuoksen antibakteerisen tehokkuuteen 24 tunnin jälkeen. Mittaukset on toistettu kolmesti. Muokattu lähteestä [10].

Pérez-Rafael et al. [11] kehittivät tioloidusta HA:sta (thiolated hyaluronic acid, HA-SH) ja hopealigniininanopartikkeleista (Ag@Lig NP) hydrogeelin kroonisten haavojen hoitoon. Ligniinin käyttö kapselointi- ja pelkistysaineena vähentää hopean toksisuutta. Ag@Lig NP:t ristisilloitettiin hydrogeeliin fysikaalisesti. Tällä prosessilla saatiin reversiibeli hydrogeeli, jolla oli hyvä leikkausohentuvuus ja itsekorjautuvuus. Hydrogeelissä oli itsejärjestäytyviä vuorovaikutuksia HA-SH:n ja Ag@Lig NP:n välillä, jolloin injektoitu hydrogeeli jähmettyy uudelleen haavassa.

Ag@Lig NP:t tekivät hydrogeelistä bakterisidisen *S. aureusta* ja *P. aeruginosaa* vastaan sekä paransivat sen antioksidanttisuutta. Hydrogeeli tehoi paremmin Gram-negatiiviseen *P. aeruginosaan* kuin Gram-positiiviseen *S. aureukseen*, koska *S. aureuksen* ulko-kuoren mureiinikerros on kymmenen kertaa paksumpi kuin *P. aeruginosan* lipopolysakkaridikerros.

Hydrogeeli vapautti hopeaa lineaarisesti. Mitä enemmän Ag@Lig NP:a ja HA-SH:a hydrogeelissä oli, sitä stabiilimpi ja ristisilloitetumpi se oli ja sitä hitaammin se vapautti hopeaa. Hopean vapautumisnopeutta onkin helppo säädellä konsentraatioiden avulla. Bakteri-infektioissa kudoksen vapauttama hyaluronidaasi nopeutti myös hopean vapautumista. Hopean tasainen vapautuminen on erittäin tärkeää tehokkuuden optimoimiseksi ja myrkyllisen vaikutuksen minimoimiseksi.

Suoran antibakteerisen vaikutuksen lisäksi AgNP:illä HA-hydrogeeleissä on muita ominaisuuksia, jotka lisäävät niiden hyötyjä antibakteerisena materiaalina. AgNP:t parantavat HA-hydrogeelien mekaanisia ominaisuuksia, jolloin ne kestävät paremmin käyttöä [10,38] Lisäksi AgNP:illä on HA-hydrogeelissä tulehdusta lievittävää vaikutusta, mikä edesauttaa haavojen parantumista ja ehkäisee infektoita [39]. Esimerkiksi Ag@Lig NP:n käyttö vähensi tulehdukseen liittyvien entsyymien määrää kudoksessa [11].

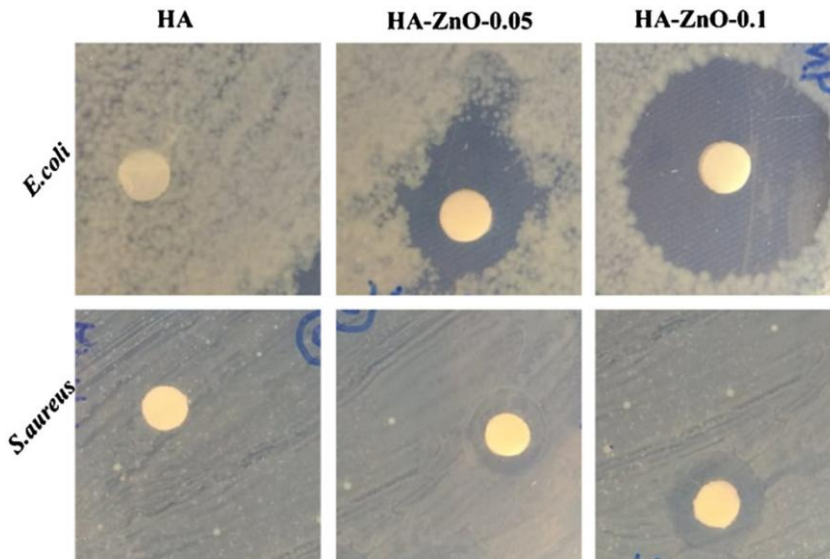
AgNP:t ovat suosittuja antibakteerisissa sovelluksissa mutta niiden myrkyllisyydestä johtuvat haasteet voivat rajoittaa niiden käyttöä. Tämän takia muitakin metallinanospartikkeleita on tutkittu. Metallioksidit, kuten kuparioksidi, titaanioksidi, magnesiumoksidi, rautaoksidi ja sinkkioksidi, ovat herättäneet kiinnostusta niiden antibakteeristen ja fotokatalyyttisten ominaisuuksien vuoksi. Metallioksidien antibakteerinen teho perustuu pääosin happiradikaalien tuotantoon. Happiradikaaleja muodostuu UV-valon vaikutuksesta, kun elektronit siirtyvät metallioksidista molekulaariselle hapelle. Bakteerisolussa happiradikaalit aiheuttavat vahinkoa solun lipideille, proteiineille ja nukleiinihapoille, jolloin bakteerin solukalvo ja DNA vaurioituvat ja solu kuolee. [36]

Sinkkioksidin nanopartikkeleilla (ZnONP) on metallioksidien nanopartikkeleista parhaat antibakteeriset ominaisuudet useita eri bakteerikantoja vastaan [40]. Sen valmistaminen on kustannustehokkaampaa AgNP:ihin verrattuna [41]. Lisäksi sinkki on vähemmän myrkyllinen nisäkkäiden soluille kuin hopea [42]. Sinkki on välttämätön mikroelementti soluille [36] ja se poistuu tehokkaammin elimistöstä esimerkiksi hien ja virtsan mukana [43]. Sitä kuitenkin tarvitaan enemmän kuin hopeaa antibakteerisen vaikutuksen saavuttamiseksi [42]. Sinkkioksidia on kuitenkin tutkittu HA-hydrogeeleissä vielä melko vähän.

Haasteena ZnONP:iden käytössä on niiden tarvitsema riittävä valo, jota fotokatalyysiin tarvitaan, etenkin jos hydrogeeliä käytetään syvemmällä kudoksessa. Rao et al. [24] valmistivat HA-ZnONP-hydrogeelin, jossa HA ristosilloitettiin BDDE:llä (1,4-butaanidiolidiglycidyyli-eetteri) ja ZnONP:t kapseloitiin hydrogeelin sisälle vety- ja dipoli-dipolisidoksin. ZnONP:t muokattiin nanovyörakenteiseksi, jolloin niiden pinta-ala on suurempi ja ne absorboivat paremmin valoa. Hydrogeeliä valmistettaessa niihin lisättiin 0,05 tai 0,1 M  $Zn(NO)_3_2$ :a, joka reagoi ZnONP:ksi. Näin saatiin hydrogeeliä kahdella eri ZnONP-pitoisuudella.

Hydrogeelillä oli hyvä antibakteerinen ominaisuus *S. aureusta* ja *E. colia* vastaan. Kuvasta 7 voidaan havaita, kuinka suurempi ZnONP-pitoisuus esti paremmin bakteerien kasvua. Hydrogeeli tehosi hieman heikommin *S.aureukseen*, koska siinä on karotenoidipigmenttiä, joka neutraloi happiradikaaleja. Hydrogeeli oli kuitenkin riittävän tehokas

kumpaakin bakteeria vastaan. Huomattiin, että korkeammalla ZnONP-pitoisuudella bakteerien kiinnittyminen lisääntyi hieman. Vain HA:ta sisältävällä hydrogeelillä bakteerien kiinnittymistä ei havaittu. HA on siis hyvä hydrogeelin pohjamateriaali, sillä se estää bakteerien kiinnittymistä. ZnONP:t paransivat hydrogeelin viskoelastisia ominaisuuksia ja turpoamisastetta. Myös hydrogeelin biohajoavuus parani, kun ZnONP:iden vapauttamat happiradikaalit hajottivat hydrogeeliä. Lisäksi ZnONP:t edistivät veren hyytymistä, mikä voi olla hyödyllinen ominaisuus esimerkiksi haavanhoidossa.

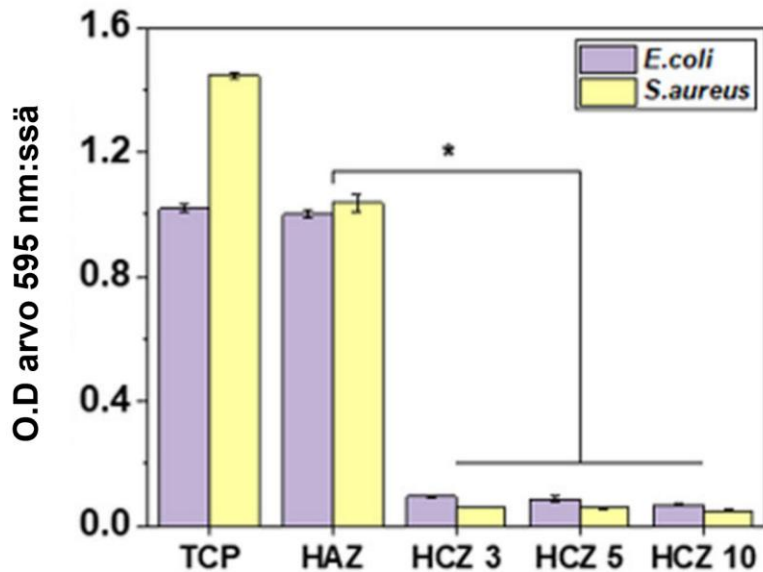


**Kuva 7.** HA-ZnO- ja HA-hydrogeelin antibakteerisen ominaisuuden testaaminen *in vitro*. Ravinneagarilevyille kaadettiin bakteeriviljelmästä 100  $\mu$ L:n näyte ja sille asetettiin hydrogeelilevyt (hal-kaisija 6 mm) 24 tunniksi. HA-ZnO-0,05- ja HA-ZnO-0,1-hydrogeelit muodostivat 14 ja 19 mm:n (*E. coli*) ja 8 ja 11 mm:n (*S. aureus*) inhibiiovyöhykkeet. Pelkkä HA-hydrogeeli ei hillinnyt bakteerien kasvua ollenkaan. Muokattu lähteestä [24].

Hwang et al. [44] ratkaisivat ongelman valon vähyydestä valmistamalla katekoli-ZnONP-komplekseja, jotka voivat muodostaa happiradikaaleja ilman valonlähdettä, ja lisäsivät niitä HA-hydrogeeliin. Katekolilla (catechol, CA) on hyvät tarttumisominaisuudet metallioksidiin ja se muodostaa hyvin happiradikaaleja. Happiradikaaleja muodostuu elektroninsiirrolla, kun katekoli hapettuu o-semikinoniksi, jolloin ZnONP toimii katalyyttinä ja muuttaa happimolekyylejä happiradikaaleiksi. HCZ-hydrogeelin rakenne muodostui amidisidoksilla HA:n ja funktionalisoitujen katekoliryhmien välille ja koordinaatiosidoksilla ZnONP:iden ja katekoliryhmien välille. Hydrogeelillä oli korkeampi turpoamisaste, vastustuskyky entsyymaattiselle hajoamiselle ja kiinnittymisvoima kudokseen kuin vain kemiallisesti ristisilloitetulla hydrogeelillä.

Hydrogeeliä tutkittiin *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan. ZnONP:itä lisättiin 3, 5 ja 10 m-%:ia HA-CA:n massasta. Katekoliton HAZ-hydrogeeli valmistettiin vertailuryhmäksi. Havaittiin, että HCZ-hydrogeelillä oli huomattavasti paremmat antibakteeriset ominaisuudet

verrattuna HAZ-hydrogeeliin, kuten kuvasta 8 voidaan nähdä. Happiradikaalien muodostamisen lisäksi ZnONP:lla oli antibakteerista vaikutusta sen myrkyllisyyden ansiosta, kun ZnONP:t vapauttavat myrkyllisiä  $Zn^{2+}$ -ioneja. HCZ 10 -hydrogeelissä solujen elinvoimakärsi, mikä tarkoittaa, että ZnO-pitoisuus oli liian suuri. 3 m-%:n ZnO-konsentraatio todettiin parhaaksi. Lisäksi katekoli-ZnONP-kompleksit paransivat hydrogeelin anti-inflammatorisia ominaisuuksia ja injektoitavuutta. Katekoli-ZnONP-kompleksit ovat myös biohajoavia.



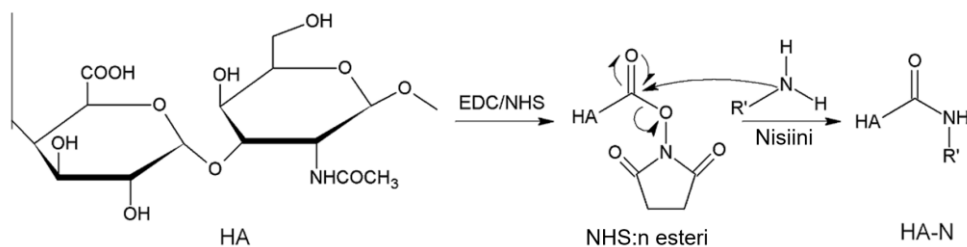
**Kuva 8.** Hydrogeelien bakterisidinen tehokkuus in vitro *E. coli* ja *S. aureus* vastaan 24 tunnin itämisaikan jälkeen. O.D arvo (optical density) korreloi bakteerien konsentraation kanssa. Muokattu lähteestä [44].

Metallinanopartikkeleiden käyttöön liittyy yleisesti haasteita. Ne ovat taipuvaisia hapettumiselle ja aggregaatiolle, mikä heikentää niiden stabiiliutta ja tehokkuutta. Lisäksi metallinanopartikkelit ovat myrkyllisiä suurina pitoisuuksina. Metallinanopartikkelit voivat aiheuttaa hapetusstressiä tai vuorovaikuttaa immuunijärjestelmän kanssa ja siten laukaista tulehdusreaktion. HA-hydrogeeleissä metallinanopartikkeleihin liittyy riski epätasaisesta vapautumisesta, jolloin epätarkoituksenmukaisesti liian suuri määrä metallinanopartikkeleita vapautuu lyhyessä ajassa. Tällöin suuri konsentraatio voi olla myrkyllinen. Metallinanopartikkelit voivat kerääntyä elimistöön tai ympäristöön ja aiheuttaa vahinkoa ihmisille tai ekosysteemeille. Niiden myrkyllisyyttä pitkän aikavälin käytössä ei ole tutkittu tarpeeksi. Näiden syiden takia metallinanopartikkeleiden käyttöä säädellään paljon, ja niiden käyttömahdollisuudet ovat rajalliset. [35]

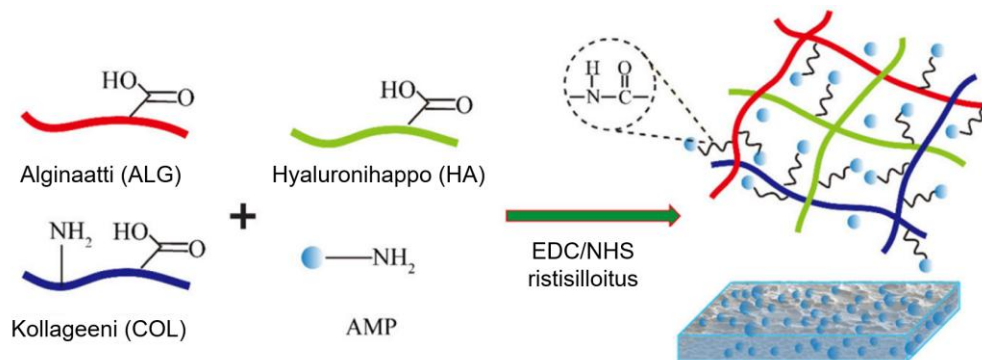
### 4.1.3 Antimikrobiset peptidit

Antimikrobiset peptidit (AMP) ovat pieniä polypeptidejä ja osa monien organismien immuunijärjestelmää. Antibakteerinen vaikutus syntyy, kun kationinen AMP koskettaa bakteeria, jolloin sen solukalvo hajoaa ja solu kuolee. Erilaisia AMP:itä tiedetään useita satoja ja niillä on monia hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten bioyhteensopivuus, biohajoavuus ja helppo valmistus ja muokkaus. [3]

AMP:itä lisätään HA-hydrogeeliin yleensä kemiallisesti ristosilloittamalla. Nisiinin ristosilloitusreaktio esitetään kuvassa 9. HA muutetaan ensin esteriksi karbodiimidien, kuten 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli) karbodiimidin (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC), avulla, jolloin reaktio nisiinin kanssa on mahdollinen. N-hydroksisukkinimidia (NHS) käytetään synteesissä estämään N-asyyliurean muodostumista, jossa karbodiimidi reagoi itsensä kanssa. Lisäksi NHS estää nisiinin polymerisaation. Lopuksi aktivoitun HA-molekyylin karboksyyli-ryhmä ja nisiinin aminoryhmä reagoivat ja muodostavat amidisidoksen. [19] Hydrogeelirakenteen muodostumista ALG/HA/COL-AMP-hydrogeelille havainnollistetaan kuvassa 10. AMP:nä käytetty Tet213 kiinnitetään myös amidisidoksin hydrogeeliin. Alginaatti (ALG) ja kollageeni (collagen, COL) edistävät haavan paranemista. [22]

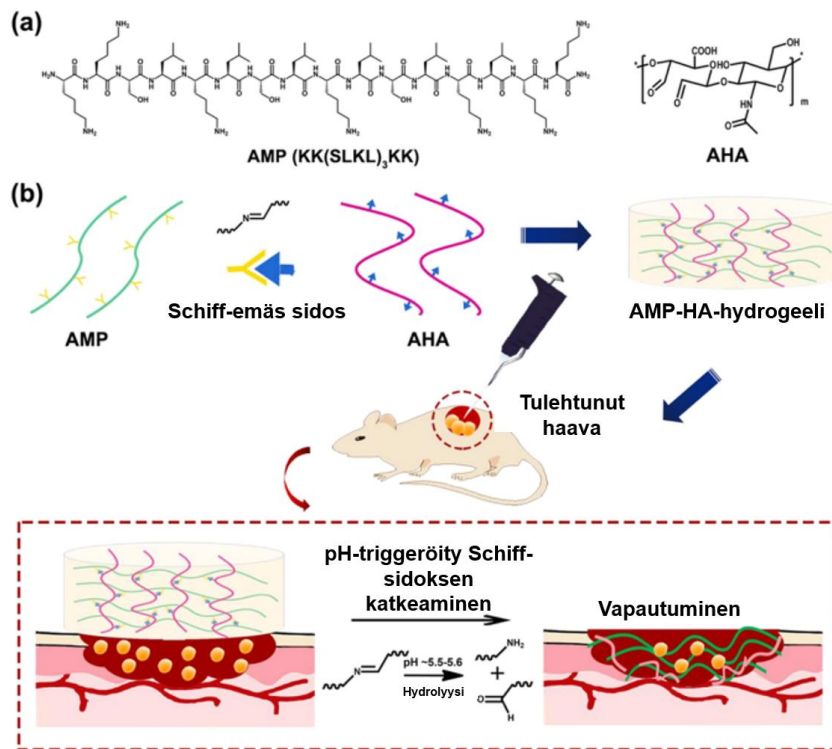


**Kuva 9.** Nisiinin ja HA:n ristosilloitusreaktio. Muokattu lähteestä [19].



**Kuva 10.** ALG/HA/COL-AMP-hydrogeelin valmistus. Muokattu lähteestä [22].

AMP:ita voidaan sitoa myös Schiff-emäs reaktiolla. Suo et al. [20] valmistivat hydrogeelin KK(SLKL)3KK-peptidistä ja aldehydihyaluronihaposta (aldehyde containing hyaluronic acid, AHA). KK(SLKL)3KK-peptidin ja AHA:n rakenteet esitetään kuvassa 11 a). Schiff-emäs reaktio tapahtuu AMP:n primaaristen amiinien ja AHA:n välillä, jolloin muodostuu Schiff-emäs sidos eli kaksoissidos typen ja hiilen välille. Ristisilloitusta havainnollistetaan kuvassa 11 b). AHA on muokattu versio HA:sta ja osa sen hydroksyyli ryhmistä on hapeitettu aldehydeiksi, joten se muodostaa enemmän sidoksia verrattuna HA:han. Schiff-emäs sidoksin koottu hydrogeeli kaksoissidoksineen on mekaanisesti vahvempi verrattuna amidisidoksin ristisilloitettuun hydrogeeliin. Lisäksi Schiff-emäs reaktio mahdollistaa tavanomaista ristisilloitusta nopeamman ristisilloituksen ja hydrogeelin paremman biotyhteensopivuuden ja mekaanisen vahvuuden.



**Kuva 11.** a) KK(SLKL)3KK- ja AHA-molekyyliden rakenteet b) AMP-HA-hydrogeelin ristisilloittaminen ja vapautuminen haavassa. Muokattu lähteestä [20].

Schiff-emäs sidokset katkeavat happamissa olosuhteissa. Kuvassa 11 b) esitetään pH:n muutoksen aiheuttama hydrogeelin hajoaminen. Tällöin hydrogeeli hajoaa ja alkaa vapauttamaan AMP:itä pH:n muuttuessa, jolloin vapautuminen on tasaisempaa ja tapahtuu vasta kohteessa. Esimerkiksi krooniset haavat ovat happamia ja niiden pH on noin 5,5. Hydrogeeliä testattiin 7,4 ja 5,5 pH:n ympäristössä ja jälkimmäinen tuotti paremman antibakteerisen vasteen. [20]

Kaikki tässä esitellyt AMP-HA-hydrogeelit todettiin tehokkaiksi, laajakirjoisiksi ja bakterisidiksi. Hydrogeeli, jossa käytettiin Tet213:a, oli myös tehokas MRSA:aa vastaan [22]. Suoran antibakteerisen vaikutuksen lisäksi hydrogeelit lisäävät kollageenin kertymistä [19,22], angiogeneesiä eli uusien verisuonien syntymistä [22] ja epitelisaatiota eli uuden ihon kasvamista [19,22]. Lisäksi AMP-HA-hydrogeelit ovat bioyhteensopivia [19,22], mekaanisesti vahvoja [20,22] sekä biostabiilisia ja injektoitavia [20]. Haasteita AMP:ien käyttöönottoon tuottavat valmistuskustannukset, myrkyllisyys suurina pitoisuuksina, herkkyys proteolyysille, eli hajoamiselle entsyymien vaikutuksesta, ja siten stabiilisuusongelmat [45].

## 4.2 Luonnolliset polymeerit

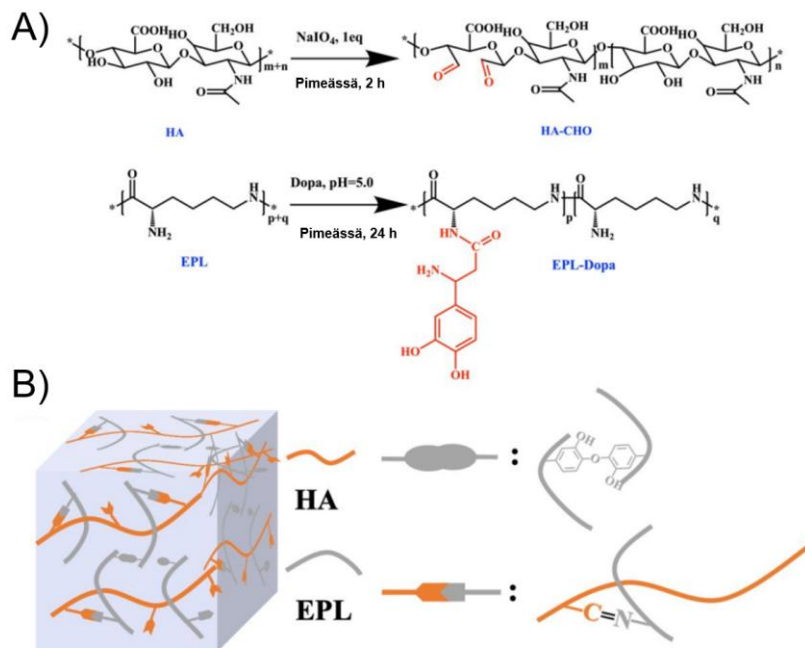
Antibakteerisissa hydrogeeleissä käytetyt luonnolliset polymeerit ovat yleensä polysakkarideja, kuten HA tai kitosaani tai polyamiineja, kuten  $\epsilon$ -polylyysiini. HA:lla on useita hyviä ominaisuuksia, kuten bioyhteensopivuus ja tulehduksen lievittäminen, mutta sen antibakteeriset ominaisuudet ovat rajalliset. Siksi sitä ristosilloitetaan yhdessä muiden polymeerien kanssa, joilla on parempia antibakteerisia ominaisuuksia. Tällöin saadaan kunkin polymeerin parhaat ominaisuudet yhdistettyä.

### 4.2.1 $\epsilon$ -polylyysiini

$\epsilon$ -polylyysiini (EPL) on polyamiini, joka koostuu useista lysiiniaminohapoista, jotka on yhdistetty toisiinsa  $\epsilon$ -amino- ja  $\alpha$ -karboksyyliryhmien välisillä peptidisidoksilla. EPL on luonnollinen polymeeri, ja sitä tuottavat tietyt *Streptomyces*-suvun bakteerit. EPL:n aminoryhmä on positiivisesti varautunut vedessä, mikä tekee EPL:stä antibakteerisen. Positiivisesti varautuneet kationiset aminoryhmät voivat elektrostatisesti adsorboitua bakteerin pinnalle ja aiheuttaa bakteerin soluseinän ulkokalvon irtoamisen. EPL tehoaa myös MRSA:aa vastaan [46]. EPL sietää hyvin lämpöä ja on biohajoava sekä helposti muokattava. EPL:ää valmistetaan teollisesti mikrobeilla mutta se on vielä kallista. [47] Lisäksi EPL sitoo vettä, koska sillä on hydrofiilinen primäärinen aminoryhmä. Hydrogeelin kyky sitoa vettä on liitoksissa sen turpoamisominaisuuteen. Turvonneet hydrogeelit, joilla on suuri huokoisuus, edistävät haavan paranemista. [15] EPL voi säädellä immuunivasteita ja vähentää sytokiinien määrää ja siten edistää haavan paranemista [48].

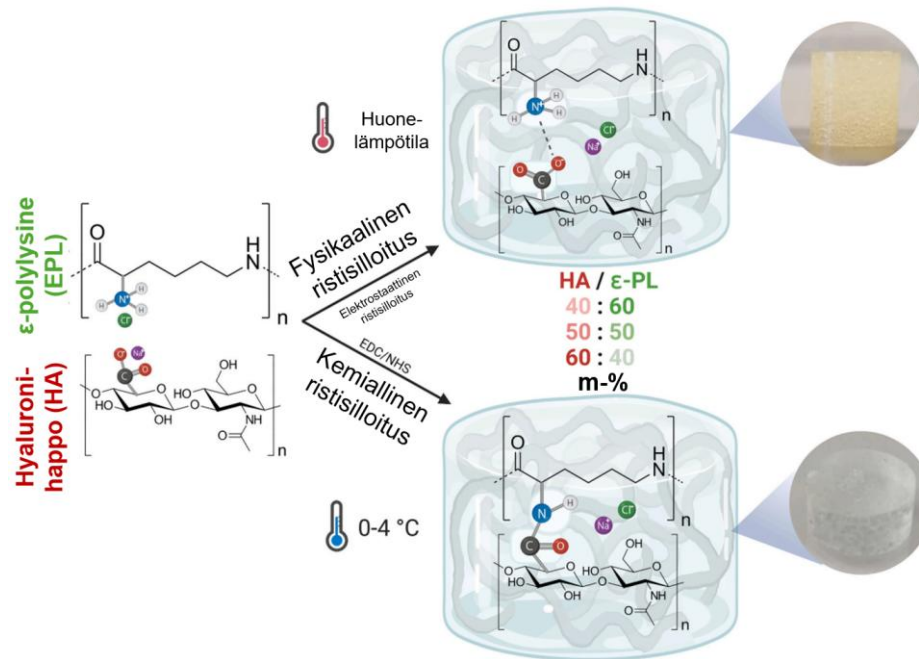
Liu et al. [21] ristosilloittivat hapetettua HA:a (HA-CHO) ja EPL:ää, johon on lisätty dopamiinia (EPL-Dopa). HA-CHO:n ja EPL-Dopa:n kaavakuvat esitetään kuvassa 12 A) ja HA/EPL-hydrogeelin ristosilloitus kuvassa 12 B). Hydrogeeli valmistettiin Schiff-emäs re-

aktiolla ja entsyymaattisella katalyysireaktiolla. Schiff-emäs reaktiossa EPL:n aminoryhmä ja HA:n aldehydiryhmä muodostivat asyylihydratsonisidoksen, joka on kestävämpi vedessä kuin tavallinen Schiff-emäs sidos. Katalyysireaktio muodosti kovalenttisen sidoksen kahden EPL-Dopa:n välille. HA/EPL-hydrogeeli tappoi tehokkaasti (yli 90 %) niin *S. aureus*- kuin *E. coli*-bakteereja. Tämän lisäksi hydrogeelissä oleva HA tehosti haavan parantumista. Hydrogeelin ominaisuuksia, kuten turpoamisastetta, hajoamisnopeutta ja kiinnittymisvahvuutta, pystyi säätämään helposti. Tutkimuksessa käytettiin 10 ja 20 m-%:n EPL-pitoisuuksia. Näistä suurempi pitoisuus oli tehokkaampi mutta ei niin suuri, että se olisi ollut myrkyllinen.



**Kuva 12.** A) Kaavakuva synteettisestä HA-CHO:sta ja EPL-Dopa:sta. B) HA/EPL-hydrogeelin ristosilloitus. Muokattu lähteestä [21].

Salma-Ancane et al. [15] valmistivat HA/EPL-hydrogeeliä kahdella eri tavalla, fysikaalisen ja kemiallisesti ristosilloittamalla. Ristosilloitusta havainnollistetaan kuvassa 13. Hydrogeelejä valmistettiin kolmella eri EPL-pitoisuudella, 40, 50 ja 60 m-%:lla. Fysikaalisesti ristosilloitetut hydrogeelit tappoivat 99,999 % *E. coli*-bakteereista. Kemiallisesti ristosilloitetuilla hydrogeeleillä teho oli huomattavasti heikompi, koska bakteereja tappavia EPL:n vapaita aminoryhmiä ( $NH_3^+$ -ryhmiä) on siinä vähemmän. Kemiallisesti ristosilloitetussa hydrogeelissä osa  $NH_3^+$ -ryhmistä reagoi ja muodostaa amidisidoksia, joilla ei ole antibakteerista vaikutusta.



**Kuva 13.** HA-EPL-hydrogeelin valmistusprosessi fysikaalisesti ja kemiallisesti ristsilloittamalla. Fysikaalisessa ristsilloituksessa anionisen HA:n ja kationisen EPL:n välille muodostuu ionisidos. Kemiallisessa ristsilloituksessa HA:n karboksyyliiryhmä ja EPL:n aminoryhmä muodostavat amidididoksen. Kumpaakin hydrogeeliä valmistettiin kolmella eri massasuhteella. Muokattu lähteestä [15].

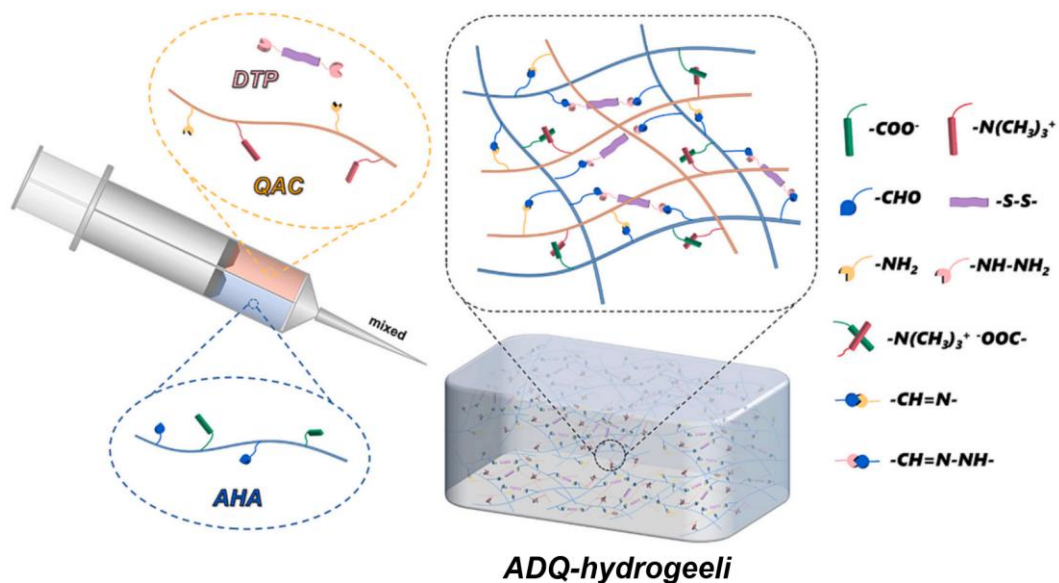
Havaittiin, että parhaimman antibakteerisen vaikutuksen tekevät yli 3,91 mg/mL:n EPL-konsentraatiot olivat myrkyllisiä. Hydrogeeleissä voi käyttää myös pienempää EPL-pitoisuutta, kuten esimerkiksi Liu et al. [21] tekivät, jolloin myrkyllisyys ei ole ongelma. Tällöin antibakteerinen vaikutus ei kuitenkaan ole yhtä tehokas. Lisäksi fysikaalisesti ristsilloitetut hydrogeelit heikensivät solujen elinkelpoisuutta. Kemiallisesti ristsilloitettu hydrogeeli olikin bioyhteensopivampi kuin fysikaalisesti ristsilloitettu hydrogeeli.

#### 4.2.2 Kitosaani

Kitosaani on lineaarinen polysakkaridi, joka saadaan kitiinin deasetyloinnilla. Kitiiniä esiintyy luonnossa esimerkiksi äyriäisten kuorissa. Kitosaani koostuu  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-sidoksin liittyneistä 2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopyranoosista ja 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopyranoosista. Kitosaanilla on paljon hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten biohajoavuus, myrkyttömyys, bioyhteensopivuus ja kyky sitoa metalli-ioneja. Kitosaania on helppo ja edullista valmistaa. Kitosaanin aminoryhmät protonoituvat happamassa ympäristössä, jolloin siitä tulee kationinen. Uskotaan, että tämä positiivinen varaus saa aikaan kitosaanin antibakteerisen ominaisuuden. Positiivisesti varautunut kitosaani rikkoo negatiivisesti varautuneen bakteerin solukalvon. [49] Teoria on sama kuin AMP:ien ja EPL:n kohdalla. Kitosaanilla on anti-inflammatorisia ominaisuuksia ja se edistää kudosten uusiutumista.

Kitosaanipohjaisia hydrogeelejä on tehty mutta HA:n kanssa sitä on yhdistetty vielä melko vähän. [50] Kitosaania voidaan lisätä hydrogeeliin kemiallisella ristosilloituksella, esimerkiksi Michael-additiolla [51] tai Schiff-emäs reaktiolla [52], tai fysikaalisella ristosidonnalla [25].

Yang et al. [25] valmistivat ADQ-hydrogeelin monidynaamisella ristosidonnalla AHA:sta, 3,3'-ditiobis(propionyylihydratsidi):sta (DTP) ja kvaternaarisesta kitosaanista (quaternized chitosan, QAC). Kitosaanin kvaternisointi parantaa sen liukoisuutta veteen [53]. DTP:tä käytettiin tukena ristosilloituksessa parantamaan hydrogeelin itsekorjautuvuutta ja QAC:tä parantamaan antibakteerisia ominaisuuksia. QAC linkittyi AHA:aan ionisidoksella. Ionisidos ja hydrogeelin muut sidokset esitetään kuvassa 14.



**Kuva 14.** ADQ-hydrogeelin muodostuminen. Kuvassa näkyviä sidoksia ovat Schiff-emäs sidos, hydratsonisidos, disulfidisidos ja ionisidos. Sidokset ovat reversiibeilejä ja siten parantavat hydrogeelin itsekorjautuvuutta. Muokattu lähteestä [25].

ADQ-hydrogeeli tappoi 100 % *E. coli*-bakteereista ja yli 75,9 % *S. aureus*-bakteereista maljaviljelytekniikkaa käyttäen. AD-hydrogeelille vastaavat luvut olivat 97,9 % ja 46,8 %. Kitosaanilla oli siis merkittävä vaikutus hydrogeelin antibakteerisuuteen, etenkin *S. aureusta* vastaan. Kitosaani tehoaa myös MRSA:aa vastaan HA-hydrogeeleissä [54]. Lisäksi hydrogeeli korjautui itsestään hyvin nopeasti, vain tunnin kuluessa. Hydrogeeli oli hyvin yhteensopiva isäntäsolujen kanssa. Hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia olisi hyvä parantaa, jos sitä käytetään kehon liikkuvissa osissa, kuten rustossa.

### 4.3 Kemiallisten muokkauksien vertailua

HA-hydrogeeliä voi muokata kemiallisesti lisäämällä siihen antibakteerisia aineita tai luonnollisia polymeerejä. Edellisten lukujen pohjalta taulukossa 1 on listattu kemiallisten muokkausten edut ja haasteet.

**Taulukko 1.** Kemiallisten muokkausten edut ja haasteet sekä lähteet.

Muokkaus	Edut	Haasteet	Lähteet
Antibiootit	+ tehoaa joihinkin resistentteihin bakteeri kantoihin synergistisen vaikutuksen avulla + tutkittu paljon + hyvä kustannustehokkuus	- antibiootiresistenttien bakteerien kehittyminen - kohtalainen myrkyllisyys suurina pitoisuuksina - ei paranna mekaanisia ominaisuuksia tai lievitä tulehdusta - ei biohajoava	[4,23]
AgNP	+ tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin + parantaa hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia + lievittää tulehdusta + tutkittu paljon + hyvä kustannustehokkuus	- suuri myrkyllisyys suurina pitoisuuksina - hapettuminen ja aggregaatio - kerääntyminen ja ympäristöhaitat	[14,37,10,38,39,35]
ZnONP	+ tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin + lievittää tulehdusta ja edistää veren hyytymistä + biohajoava + erittäin hyvä kustannustehokkuus	- kohtalainen myrkyllisyys suurina pitoisuuksina - tarvitsee valoa happiradikaalien muodostamiseen - tutkittu vähän - kerääntyminen ja ympäristöhaitat	[40,24,44]
AMP	+ tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin + pH-kontrolloitu vapautuminen + lievittää tulehdusta ja edistää kudoksen uusiutumista + biohajoava	- suuri myrkyllisyys suurina pitoisuuksina - herkkyys proteolyysille ja stabiilisuusongelmat - ei paranna mekaanisia ominaisuuksia - huono kustannustehokkuus - tutkittu vähän	[3,19,22,20,55]
EPL	+ tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin + biohajoava + sietää lämpöä + lievittää tulehdusta + mekaanisia ominaisuuksia helppo säätää	- suuri myrkyllisyys suurina pitoisuuksina - huono kustannustehokkuus - tutkittu vähän	[15,47,21]
Kitosaani	+ tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin + biohajoava + myrkyttömyys + kustannustehokas + lievittää tulehdusta + tutkittu paljon	- veteen huonosti liukeneva - ei paranna mekaanisia ominaisuuksia	[49,25,53]

Selkeyden vuoksi ja vertailun helpottamiseksi taulukkoon 2 on koottu kemiallisten muokkausten tärkeimpiä ominaisuuksia taulukon 1 pohjalta.

**Taulukko 2.** Kemiallisten muokkausten tärkeimpiä ominaisuuksia. Vihreä tarkoittaa hyvää ominaisuutta, keltainen kohtalaista ja punainen huonoa. Taulukko perustuu taulukon 1 lähteisiin.

Kemiallinen muokkaus	Tehoaa resistenteihin kantoihin	Myrkyllisyys suurina pitoisuuksina	Biohajoava	Parantaa mekaanisia ominaisuuksia	Lievittää tulehdusta	Tutkittu HA-hydrogeeleissä	Kustannustehokkuus
Antibiootit	Joskus	Kohtalainen	Ei	Ei	Ei	Paljon	Hyvä
AgNP	Kyllä	Suuri	Ei	Paljon	Paljon	Paljon	Hyvä
ZnONP	Kyllä	Kohtalainen	Kyllä	Paljon	Paljon	Vähän	Erittäin hyvä
AMP	Kyllä	Suuri	Kyllä	Ei	Paljon	Vähän	Huono
EPL	Kyllä	Suuri	Kyllä	Paljon	Paljon	Vähän	Huono
Kitosaani	Kyllä	Ei	Kyllä	Ei	Paljon	Paljon	Erittäin hyvä

Antibiootit ovat yleisimmin tutkittuja ja käytettyjä antibakteerisia aineita, mutta niiden suurimpana haasteena on lisääntyvä antibioottiresistenssi. Muut tutkitut antibakteeriset aineet ovat osoittautuneet tehokkaiksi ainakin yhtä antibioottiresistenttiä bakteeria vastaan, erityisesti MRSA:aa. Eri antibakteeristen aineiden tehokkuutta on kuitenkin vaikea vertailla, sillä tutkimuksissa käytetyt menetelmät ja testattavat bakteerikannat vaihtelevat. Kaikki tässä tarkastellut aineet ovat kuitenkin osoittaneet antibakteerista aktiivisuutta, joko bakteerikasvuston hillitsemisenä *in vitro* tai haavamalleissa.

Yleisin haaste antibakteerisissa aineissa on niiden myrkyllisyys suurina pitoisuuksina. Ainoastaan kitosaani on täysin myrkytön [49]. AgNP:t, AMP:t ja EPL ovat erittäin myrkyllisiä suurina pitoisuuksina. Antibiootit ja ZnONP:t ovat hieman vähemmän myrkyllisiä. Metallinanopartikkeleihin liittyy vielä erityinen haaste, sillä ne kerääntyvät ekosysteemeissä, mikä voi aiheuttaa ympäristöhaittoja [35]. Lisäksi antibiootit ja AgNP:t eivät ole biohajoavia, mikä lisää niiden myrkyllisyshaittoja.

Antibakteeriset aineet parantavat hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia, lukuunottamatta antibiootteja, AMP:itä ja kitosaania. Muut kuin antibiootit lievittävät myös tulehdusta haavassa. Kitosaanilla ja ZnO:lla on puolestaan paras kustannustehokkuus. Antibioottien ja AgNP:iden kustannustehokkuus on hyvä. AMP:n ja EPL:n valmistuskustannukset ovat suuret. Antibiootit, AgNP:t ja kitosaani ovat eniten tutkittuja antibakteerisia aineita. Muita on tutkittu vielä melko vähän HA-hydrogeeleissä.

Antibiootit ovat paljon käytetty antibakteerinen aine, mutta antibioottiresistanssin lisääntymisen takia niiden käyttöä on vähennettävä. Antibioottien ominaisuudet ovat muuten-

kin heikommalla verrattuna muihin aineisiin. AgNP:t ovat erittäin tehokkaita ja laajasti tutkittuja, mutta niiden suurimmat haasteet liittyvät myrkyllisyyteen sekä kertymiseen ihmiskehoon ja ympäristöön. ZnONP:t ovat vähemmän myrkyllisiä kuin AgNP:t mutta niiden antibakteerinen teho on heikompi ja lisäksi niitä on tutkittu vielä melko vähän. ZnONP:illä on kuitenkin mielenkiintoinen ominaisuus, sillä niiden teho paranee UV-valon vaikutuksesta [24]. Tämä voi olla haaste syvälle kudoksiin kohdistuvassa käytössä mutta myös hyödyllinen ominaisuus valokontrolloidussa lääkehoidossa.

AMP:t vaikuttavat lupaavilta, mutta niidenkin myrkyllisyys on haaste. Lisäksi niiden kustannustehokkuus on huono, mikä johtuu osin siitä, ettei niitä ole tutkittu vielä paljon. Toisaalta AMP:itä on lukuisia erilaisia, joten tulevaisuudessa niistä voi löytyä erityisen tehokkaita ja turvallisia yhdisteitä. Lisäksi AMP:ien ristosilloitus mahdollistaa pH-kontrolloidun vapautumisen, mikä tarkoittaa AMP:ien kohdentamista [20]. EPL:llä on samoja haasteita AMP:ien kanssa mutta EPL:n etuna on sen kyky parantaa hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia.

Kitosaani näyttäisi taulukon 2 mukaan parhaalta vaihtoehdolta, erityisesti koska se on myrkytön ja kustannustehokas. Kitosaani kuitenkin heikentää HA-hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia, joten sen käyttömahdollisuudet ovat rajallisemmat. Lopulta onkin mahdotonta nimetä yhtä parasta antibakteerista muokkausta, sillä kaikilla tarkastelluilla yhdisteillä on sekä vahvuuksia että heikkouksia. Eri aineet voivat sopia eri käyttötarkoituksiin ja yhdistelemällä eri aineita voidaan saada muodostettua parempia HA-hydrogeelejä. Ainoastaan antibioottien käyttöä on syytä vähentää antibioottiresistenssin kasvun vuoksi. Antibioottien ominaisuudet ovat muutenkin heikommalla verrattuna muihin muokkauksiin.

## 5. ANTIBAKTEERISTEN HA-HYDROGEELIEN SOVELLUKSIA

Antibakteerisia HA-hydrogeelejä voidaan käyttää useissa lääketieteellisissä sovelluksissa, kuten haavanhoidossa [17], kudosteknologioissa [17,56], ihonhoidossa [17], hammaslääketieteessä [56] ja lääkeaineen kuljetuksessa [56]. HA-hydrogeelien antibakteerisuutta on tutkittu eniten haavanhoidossa, jossa se on kriittinen ominaisuus. HA-hydrogeelit ovat erityisen hyviä vaihtoehtoja, kun hoidetaan vaikeahoitoisia diabeetikkojen kroonisia haavoja [52] sekä merivedelle altistuvia haavoja [57]. Kudosteknologioissa HA-hydrogeelistä tehdään tukirakenteita, jotka laitetaan vaurioituneeseen kudokseen. Tukirakenteet edistävät uuden kudoksen kasvua ja uusi kudos korvaa vähitellen tukirakenteen. Tukirakenteita voidaan käyttää esimerkiksi ihossa, hermoissa, aivoissa, verisuonissa, luissa, rustossa, lihaksissa ja hampaissa. Tukirakenteen tulee olla myös antibakteerinen, jotta kudos ei tulehdu. [56] Antibakteerisia HA-hydrogeelejä voidaan hyödyntää myös implanttien sekä lääketieteellisten välineiden kuten katetrien pinnoilla, jossa ne ehkäisevät bakteerien kasvua [58].

Annostelukohdan sijainti vaikuttaa oleellisesti antibakteeristen aineiden ja ristosilloitustavan valintaan. Esimerkiksi liikkuvissa osissa, kuten nivelissä ja rustossa hydrogeelin mekaaninen vahvuus ja itsekorjautuvuus ovat tärkeitä ominaisuuksia [3]. Kehon sisällä, kuten verisuonissa tai hermoissa, antibakteerisen aineen epätasainen vapautuminen ja myrkyllisyys ovat usein vaarallisempia kuin esimerkiksi ihon- tai haavanhoidossa. Erilaisia antibakteerisia HA-hydrogeelejä voidaan tehdä paljon yhdistelemällä erilaisia kemiallisia muokkauksia, jolloin saadaan hyödynnettyä kunkin aineen parhaita ominaisuuksia. Esimerkiksi gentamisiinia ja kitosaania voidaan yhdistää [23].

Taulukosta 2 voidaan havaita, että HA-hydrogeeleillä on useita haasteita. Lähes kaikki antibakteeriset aineet ovat myrkyllisiä suurina pitoisuuksina, jolloin niiden annostelun ja vapautumisen täytyy olla tarkkaan optimoitu. Hydrogeelien suunnittelussa suurimpia haasteita onkin antibakteerisen tehokkuuden ja myrkyllisyyden tasapainottaminen [3]. Fysikaalisesti ristosilloitettu hydrogeeli vapauttaa antibakteerisen aineen nopeammin kuin kemiallisesti ristosilloitettu. Usein fysikaalisesti ristosilloitettu hydrogeeli onkin tehokkaampi bakteereja vastaan mutta sen vaikutusaika on lyhyempi. Kemiallisesti ristosilloitetun hydrogeelin antibakteerinen vaikutusaika on puolestaan pidempi ja heikompi, mutta hydrogeeli on turvallisempi ja mekaanisesti vahvempi. Kemiallisessä ristosilloituksessa tarvitaan usein myrkyllisiä reaktion käynnistäjiä tai kemiallisia katalyyttejä, joten fysikaalista ristosilloitusta kannattaa suosia, jos se toimii sovelluksessa.

Hydrogeelien myrkyllisyyden arviointi on haastavaa useiden muuttujien takia. Mahdollista sytotoksisuutta arvioidaan yleisimmin standardin ISO 10993-5: 2009 (Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity) mukaisesti [59]. Standardin mukaan materiaali luokitellaan sytotoksiseksi, jos solujen elinkyky heikkenee yli 30 % verrattuna kontrolliin. Standardi on kuitenkin vain suuntaa antava, sillä solulinjan valinta, uuttomenetelmä ja inkubaatioaika ovat testaajan itse valittavissa. [60]

Kuten taulukosta 2 näkee, erilaisia kemiallisia muokkauksia on tutkittu HA-hydrogeeleissä vaihtelevasti. Etenkin ZnONP:n, AMP:ien ja EPL:n kohdalla lisää tutkimusta tarvitaan. Lisäksi antibakteerisia hydrogeelejä on tutkittu lähinnä terveillä ja nuorilla hiirillä, joten ei tiedetä, miten hydrogeelit toimivat vanhoilla tai sairailta eläimillä. Pienten eläinten haavojen paraneminen eroaa myös ihmisten haavoista, minkä vuoksi hydrogeelejä olisi syytä testata enemmän ihmisillä. Lisäksi monissa tutkimuksissa todetaan, että hydrogeelit ovat bioyhteensopivia, vaikka hydrogeelien turvallisuutta on tutkittu vain lyhyellä aikavälillä. Monet antibakteeriset aineet voivat kertyä elimistöön tai ekosysteemeihin ja aiheuttaa siten haittaa pitkällä aikavälillä.

Antibakteeristen HA-hydrogeelien käyttöönotossa on myös haasteita. Hydrogeelit ovat alttiita hajoamiselle kuljetuksessa ja varastoinnissa, jolloin niiden rakenne voi vaurioitua ja lääkeaine päästä vuotamaan [3]. Lisäksi, kuten taulukosta 2 voi havaita, huono kustannustehokkuus rajoittaa uusien muokkauksien tuotekehitystä ja käyttöönottoa. Tällä hetkellä HA-hydrogeelejä on kaupallistettu vasta lähinnä ilman antibakteerisia muokkauksia [3]. Pitkällä aikavälillä ja suuressa käytössä bakteerit voivat kehittää resistenssiä joillekin uusillekin aineille, kuten AgNP:ille [61]. Siksi on tärkeää tutkia ja kehittää useita erilaisia antibakteerisia HA-hydrogeelejä, jotta käyttöön jää vaihtoehtoja mahdollisten haasteiden, kuten resistenssin kehittymisen, varalta.

Antibakteeriset HA-hydrogeelit ovat haasteistaan huolimatta lupaavia monissa lääketieteellisissä sovelluksissa, erityisesti antibiootiresistenttien bakteerikantojen torjunnassa. Niiden hallittu ja pitkäkestoinen vapautuminen, paikallinen annostelu sekä pH:n tai valon avulla stimuloitava vapautus tekevät niistä perinteisiä antibiootteja tehokkaampia ja tarkemmin kohdistuvia. Lisäksi niiden parempi mekaaninen lujuus ja bioyhteensopivuus tukevat käyttöä muun muassa haavanhoidossa ja tukirakenteissa. [62]

## 6. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli tutkia, miten HA-hydrogeelejä voidaan kemiallisesti muokata antibakteeristen ominaisuuksien parantamiseksi. Työssä pohdittiin myös, mitä etuja ja haasteita erilaisilla kemiallisilla muokkauksilla on. Tämän avulla verrailtiin erilaisia kemiallisia muokkauksia. Työssä tutkittiin antibiootteja, AgNP:ta, ZnONP:itä, AMP:itä, kitosaania ja EPL:ä.

Antibiootteja on tutkittu ja käytetty paljon HA-hydrogeeleissä ja niillä onkin hyvä kustannustehokkuus. Ne ovat kuitenkin huonoin vaihtoehto tutkituista muokkauksista lukuisista eri syistä. Antibioottiresistenssin takia ne eivät tehoa kaikkiin bakteerikantoihin ja niiden käyttöä tulisi välttää, jotta antibioottiresistenssi ei kasvaisi. Antibioottien muutkin ominaisuudet ovat heikot. Ne eivät paranna hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia tai lievitä tulehdusta. Lisäksi ne ovat melko myrkyllisiä suurina pitoisuuksina eivätkä ole biohajoavia.

Antibioottien lisäksi AgNP:itä on käytetty HA-hydrogeeleissä paljon. Ne ovatkin hyvin tutkittuja ja kustannustehokkaita. AgNP:t tehoavat resistentteihin bakteerikantoihin, lievittävät tulehdusta ja parantavat hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia. Niiden haasteena on kuitenkin niiden myrkyllisyys suurina pitoisuuksina. Myrkyllisyyden haittoja lisää se, että ne kerääntyvät elimistöön ja ekosysteemeihin ja voivat näin aiheuttaa pidempiaikaista haittaa.

ZnONP:t ovat vielä melko tuore mutta lupaava tutkimuskohde HA-hydrogeeleissä. Ne tehoavat resistentteihin bakteerikantoihin ja niillä on erittäin hyvä kustannustehokkuus. ZnONP:t lievittävät tulehdusta, edistävät veren hyytymistä ja parantavat hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia. Ne ovat biohajoavia ja AgNP:eihin verrattuna ne ovat hieman vähemmän myrkyllisiä. ZnONP:t tarvitsevat kuitenkin UV-valoa antibakteerisen vaikutuksen maksimoimiseksi. Sovelluskohteen mukaan tämä voi olla joko mielenkiintoinen tai haastava ominaisuus.

AMP:itä on tutkittu vielä melko vähän ja niillä on huono kustannustehokkuus. Ne tehoavat hyvin resistentteihin bakteerikantoihin, lievittävät tulehdusta ja edistävät kudoksen uusiutumista. AMP:t ovat myrkyllisiä suurina pitoisuuksina, niillä on haasteita stabiilisuuden kanssa eivätkä ne paranna hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia. AMP:illä on kuitenkin ainutlaatuinen ominaisuus, sillä ristosilloitettuna ne voivat vapautua pH:n muutoksesta. Lisäksi AMP:itä on useita erilaisia, joten niistä voi löytyä vielä paremmat ominaisuudet omaavia yhdisteitä.

EPL:llä on paljon samoja ominaisuuksia AMP:ien kanssa. Kuten AMP:t, EPL:ää on tutkittu vielä vähän ja sillä on huono kustannustehokkuus. Lisäksi se tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin ja lievittää tulehdusta. EPL omaa kuitenkin erittäin hyvät mekaaniset ominaisuudet, joita on helppo säätää. Se myös sietää lämpöä. Kuten monet muutkin muokkaukset, EPL on myrkyllinen suurina pitoisuuksina, mikä vaikeuttaa sen turvallista käyttöä.

Kitosaani on ainoa tutkituista muokkauksista, joka on myrkytön suurinakin pitoisuuksina. Sillä on muutenkin erinomaiset ominaisuudet, sillä se tehoaa resistentteihin bakteerikantoihin, lievittää tulehdusta ja on biohajoava. Kitosaania on myös tutkittu paljon ja sen valmistus on kustannustehokasta. Kitosaani kuitenkin heikentää hydrogeelin mekaanisia ominaisuuksia, mikä rajoittaa sen käyttömahdollisuuksia.

Kaikilla kemiallisilla muokkauksilla on etuja ja haasteita ja on mahdotonta nimetä yhtä parasta muokkausta. Eri muokkaukset voivat sopia eri käyttötarkoituksiin, kuten haavanhoitoon, kudosteknologiaan ja infektioiden ehkäisyyn. Lisäksi eri aineita yhdistelemällä voidaan saada muodostettua parempia HA-hydrogeelejä. Ainoastaan antibioottien käyttöä on syytä tarkastella kriittisesti antibioottiresistenssin kasvun vuoksi. Antibioottien muutkin ominaisuudet ovat huomattavasti heikommat muihin vaihtoehtoihin verrattuna.

Suurin haaste antibakteeristen HA-hydrogeelien kehityksessä on tehokkuuden ja myrkyllisyyden tasapainottaminen. Lisäksi kustannustehokkuus vaikuttaa ratkaisevasti siihen, mitkä muokkaukset voidaan lopulta kaupallistaa. Turvallisuuden ja taloudellisen toteutettavuuden parantamiseksi tarvitaan lisää tutkimusta, erityisesti pitkäaikaisessa käytössä ja ihmisillä. Ajan myötä selviää, mitkä kemialliset muokkaukset osoittautuvat käytännössä toimiviksi ja markkinoille soveltuviksi. Kokonaisuudessaan antibakteeriset HA-hydrogeelit edustavat lupaavaa uutta lähestymistapaa antibakteeristen materiaalien kehityksessä.

## LÄHTEET

- [1] Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 2022;399:629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [2] Davies CE, Wilson MJ, Hill KE, Stephens P, Hill CM, Harding KG, et al. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: Chronic wounds reevaluated. *Wound Repair and Regeneration* 2001;9:332–40. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2001.00332.x>.
- [3] Kapusta O, Jarosz A, Stadnik K, Giannakoudakis DA, Barczyński B, Barczak M. Antimicrobial Natural Hydrogels in Biomedicine: Properties, Applications, and Challenges—A Concise Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24:2191. <https://doi.org/10.3390/ijms24032191>.
- [4] Andrade del Olmo J, Alonso JM, Sáez Martínez V, Ruiz-Rubio L, Pérez González R, Vilas-Vilela JL, et al. Biocompatible hyaluronic acid-divinyl sulfone injectable hydrogels for sustained drug release with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*. *Materials Science and Engineering: C* 2021;125:112102. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112102>.
- [5] Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria | FEMS Microbiology Reviews | Oxford Academic n.d. <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/276/3089981> (accessed October 8, 2024).
- [6] Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985;27:619–24. <https://doi.org/10.1128/aac.27.4.619>.
- [7] Farazin A, Shirazi FA, Shafiei M. Natural biomarcomolecule-based antimicrobial hydrogel for rapid wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023;244:125454. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125454>.
- [8] Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science* 2012;336:1124–8. <https://doi.org/10.1126/science.1214804>.
- [9] Sicari BM, Londono R, Dziki JL, Badylak SF. Chapter 5 - Extracellular matrix as a bioscaffold for tissue engineering. In: De Boer J, Blitterswijk CAV, Uquillas JA, Malik N, editors. *Tissue Engineering (Third Edition)*, Academic Press; 2023, p. 137–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824459-3.00005-6>.
- [10] Makvandi P, Ali GW, Della Sala F, Abdel-Fattah WI, Borzacchiello A. Biosynthesis and characterization of antibacterial thermosensitive hydrogels based on corn silk extract, hyaluronic acid and nanosilver for potential wound healing. *Carbohydrate Polymers* 2019;223:115023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115023>.
- [11] Pérez-Rafael S, Ivanova K, Stefanov I, Puiggali J, del Valle LJ, Todorova K, et al. Nanoparticle-driven self-assembling injectable hydrogels provide a multi-factorial approach for chronic wound treatment. *Acta Biomaterialia* 2021;134:131–43. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.020>.
- [12] Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* 2008;53:397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.
- [13] Ding Y-W, Wang Z-Y, Ren Z-W, Zhang X-W, Wei D-X. Advances in modified hyaluronic acid-based hydrogels for skin wound healing. *Biomater Sci* 2022;10:3393–409. <https://doi.org/10.1039/D2BM00397J>.
- [14] Della Sala F, Longobardo G, Fabozzi A, di Gennaro M, Borzacchiello A. Hyaluronic Acid-Based Wound Dressing with Antimicrobial Properties for Wound Healing Application. *Applied Sciences* 2022;12:3091. <https://doi.org/10.3390/app12063091>.
- [15] Salma-Ancane K, Sceglavs A, Tracuma E, Wychowanec JK, Aunina K, Ramata-Stunda A, et al. Effect of crosslinking strategy on the biological, antibacterial and physicochemical performance of hyaluronic acid and  $\epsilon$ -polylysine based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* 2022;208:995–1008. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.207>.
- [16] Siqueira E, França J, Souza R, Leoterio D, Cordeiro J, Bogdan D. Mechanisms of the chemical crosslinking to obtain the hydrogels: Synthesis, conditions of crosslinking and biopharmaceutical applications. *Research, Society and Development* 2023;12:e18312943072. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i8.43072>.

- [17] Luo Z, Wang Y, Li J, Wang J, Yu Y, Zhao Y. Tailoring Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials* 2023;33:2306554. <https://doi.org/10.1002/adfm.202306554>.
- [18] Khabarov VN, Boykov PY, Selyanin MA, Polyak F. *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine*. Newark, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated; 2015.
- [19] Lequeux I, Ducasse E, Jouenne T, Thebault P. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. *European Polymer Journal* 2014;51:182–90. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.11.012>.
- [20] Suo H, Hussain M, Wang H, Zhou N, Tao J, Jiang H, et al. Injectable and pH-Sensitive Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with On-Demand Release of Antimicrobial Peptides for Infected Wound Healing. *Biomacromolecules* 2021;22:3049–59. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00502>.
- [21] Mussel-Inspired Dual-Cross-linking Hyaluronic Acid/ $\epsilon$ -Polylysine Hydrogel with Self-Healing and Antibacterial Properties for Wound Healing | *ACS Applied Materials & Interfaces* n.d. <https://pubs-acsc-org.libproxy.tuni.fi/doi/10.1021/acsami.0c00782> (accessed January 30, 2025).
- [22] Lin Z, Wu T, Wang W, Li B, Wang M, Chen L, et al. Biofunctions of antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019;140:330–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.087>.
- [23] Huang S, Chen H-J, Deng Y-P, You X, Fang Q, Lin M. Preparation of novel stable microbicidal hydrogel films as potential wound dressing. *Polymer Degradation and Stability* 2020;181:109349. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109349>.
- [24] Rao KM, Suneetha M, Zo S, Duck KH, Han SS. One-pot synthesis of ZnO nanobelt-like structures in hyaluronan hydrogels for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers* 2019;223:115124. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115124>.
- [25] Yang K, Yang J, Chen R, Dong Q, Yang H, Gu S, et al. Antibacterial hyaluronic acid hydrogels with enhanced self-healing properties *via* multiple dynamic bond crosslinking. *International Journal of Biological Macromolecules* 2024;256:128320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128320>.
- [26] Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, Bernard GW. Bacteriostatic Effects of Hyaluronic Acid. *Journal of Periodontology* 1999;70:370–4. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.4.370>.
- [27] Zamboni F, Wong CK, Collins MN. Hyaluronic acid association with bacterial, fungal and viral infections: Can hyaluronic acid be used as an antimicrobial polymer for biomedical and pharmaceutical applications? *Bioactive Materials* 2023;19:458–73. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.04.023>.
- [28] Neves NM, Reis RL. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*. Newark, UNITED STATES: John Wiley & Sons, Incorporated; 2016.
- [29] Vigué A, Vautier D, Kaytoue A, Senger B, Arntz Y, Ball V, et al. Escherichia coli Biofilm Formation, Motion and Protein Patterns on Hyaluronic Acid and Polydimethylsiloxane Depend on Surface Stiffness. *Journal of Functional Biomaterials* 2022;13:237. <https://doi.org/10.3390/jfb13040237>.
- [30] Bhattacharjee MK. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. Cham: Springer International Publishing; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40746-3>.
- [31] Özbaş Z, Özkahraman B, Bayrak G, Kılıç Süloğlu A, Perçin I, Boran F, et al. Poly(vinyl alcohol)/(hyaluronic acid-g-kappa-carrageenan) hydrogel as antibiotic-releasing wound dressing. *Chem Pap* 2021;75:6591–600. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01824-3>.
- [32] Liao C-H, Chen CS, Chen Y-C, Jiang N-E, Farn CJ, Shen Y-S, et al. Vancomycin-loaded oxidized hyaluronic acid and adipic acid dihydrazide hydrogel: Bio-compatibility, drug release, antimicrobial activity, and biofilm model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2020;53:525–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.08.008>.
- [33] Zhang Z, Suner SS, Blake DA, Ayyala RS, Sahiner N. Antimicrobial activity and biocompatibility of slow-release hyaluronic acid-antibiotic conjugated particles. *International Journal of Pharmaceutics* 2020;576:119024. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119024>.
- [34] Alexy R, Kämpel T, Kümmerer K. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 2004;57:505–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.024>.

- [35] Truong TT, Mondal S, Doan VHM, Tak S, Choi J, Oh H, et al. Precision-engineered metal and metal-oxide nanoparticles for biomedical imaging and healthcare applications. *Advances in Colloid and Interface Science* 2024;332:103263. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103263>.
- [36] Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* 2020;10:292. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>.
- [37] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 2009;145:83–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>.
- [38] Qiu Y, Sun X, Lin X, Yi W, Jiang J. An injectable metal nanoparticle containing cellulose derivative-based hydrogels: Evaluation of antibacterial and in vitro-vivo wound healing activity in children with burn injuries. *International Wound Journal* 2022;19:666–78. <https://doi.org/10.1111/iwj.13664>.
- [39] Hu Q, Nie Y, Xiang J, Xie J, Si H, Li D, et al. Injectable sodium alginate hydrogel loaded with plant polyphenol-functionalized silver nanoparticles for bacteria-infected wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023;234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123691>.
- [40] Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 2008;279:71–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x>.
- [41] Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials* 2014;7:2833–81. <https://doi.org/10.3390/ma7042833>.
- [42] Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch Toxicol* 2013;87:1181–200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>.
- [43] Nikolova MP, Chavali MS. Metal Oxide Nanoparticles as Biomedical Materials. *Biomimetics* 2020;5:27. <https://doi.org/10.3390/biomimetics5020027>.
- [44] Hwang C, Choi M-H, Kim H-E, Jeong S-H, Park J-U. Reactive oxygen species-generating hydrogel platform for enhanced antibacterial therapy. *NPG Asia Mater* 2022;14:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00420-5>.
- [45] Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews* 2019;39:831–59. <https://doi.org/10.1002/med.21542>.
- [46] Chen J, Su Y, Huo J, Zhou Q, Li P. Bacteria-responsive hydrogel for on-demand release of antimicrobial peptides that prevent superbug infections and promote wound healing. *Colloid and Interface Science Communications* 2023;57:100752. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100752>.
- [47] Shukla SC, Singh A, Pandey AK, Mishra A. Review on production and medical applications of  $\epsilon$ -polylysine. *Biochemical Engineering Journal* 2012;65:70–81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.001>.
- [48] Tian B, Wang N, Jiang Q, Tian L, Hu L, Zhang Z. The immunogenic reaction and bone defect repair function of  $\epsilon$ -poly-L-lysine (EPL)-coated nanoscale PCL/HA scaffold in rabbit calvarial bone defect. *J Mater Sci: Mater Med* 2021;32:1–12. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06533-7>.
- [49] Shariatnia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science* 2019;263:131–94. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>.
- [50] Xu J, Chang L, Xiong Y, Peng Q. Chitosan-Based Hydrogels as Antibacterial/Antioxidant/Anti-Inflammation Multifunctional Dressings for Chronic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials* 2024;13. <https://doi.org/10.1002/adhm.202401490>.
- [51] Hu H, Ye B, Lv Y, Zhang Q. Preparing antibacterial and *in-situ* formable double crosslinking chitosan/hyaluronan composite hydrogels. *Materials Letters* 2019;254:17–20. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.06.102>.
- [52] Zhong H, Fang Y, Luo M, Wang L, Huang J, Dai G, et al. Deferoxamine-Loaded Injectable Chitosan-Grafted Chlorogenic Acid/Oxidized Hyaluronic Acid Hybrid Hydrogel with Antibacterial, Anti-inflammatory, and Angiogenesis-Promoting Properties for Diabetic Wound Repair. *ACS Appl Mater Interfaces* 2024;16:28209–21. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c04677>.
- [53] de Souza WR, Quevedo BV, Garcia PS, da Silva LCSC, Komatsu D, de Rezende Duek EA. Synthesis and physical–chemical characterization of chitosan grafted with hyaluronic acid as

- potential application in biomaterials. *Polymer Bulletin* 2024. <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05595-1>.
- [54] Xu C, Chen Y, Lin C, Xiao J-A, Li P, Su W. NIR photo-responsive injectable chitosan/hyaluronic acid hydrogels with controlled NO release for the treatment of MRSA infections. *International Journal of Biological Macromolecules* 2025;300:140304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140304>.
- [55] Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;38:217–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004>.
- [56] Chen H, Xue H, Zeng H, Dai M, Tang C, Liu L. 3D printed scaffolds based on hyaluronic acid bioinks for tissue engineering: a review. *Biomaterials Research* 2023;27:137. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00460-0>.
- [57] Wang X, Xu P, Yao Z, Fang Q, Feng L, Guo R, et al. Preparation of Antimicrobial Hyaluronic Acid/Quaternized Chitosan Hydrogels for the Promotion of Seawater-Immersion Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00360>.
- [58] Andrade del Olmo J, Alonso JM, Sáez-Martínez V, Benito-Cid S, Pérez-González R, Vilas-Vilela JL, et al. Hyaluronic acid-based hydrogel coatings on Ti6Al4V implantable biomaterial with multifunctional antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 2023;301:120366. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120366>.
- [59] SFS-EN ISO 10993-5:en n.d. <https://sales.sfs.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CEN-ISO/ID2/1/131543.html.stx#> (accessed May 23, 2025).
- [60] Gruber S, Nickel A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Front Med Technol* 2023;5:1195529. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2023.1195529>.
- [61] Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 2018;13:65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.
- [62] Li S, Dong S, Xu W, Tu S, Yan L, Zhao C, et al. Antibacterial Hydrogels. *Advanced Science* 2018;5. <https://doi.org/10.1002/advs.201700527>.