

# **Hydrogeelit lääketieteessä ja niiden soveltaminen rintasyöpähoidoissa**

TkK-tutkielma  
Turun yliopisto  
Kone- ja materiaalitekniikan laitos  
Materiaalitekniikka  
Nea Karpelin

21.4.2024

Turku

Kandidaatintutkielma

**Oppiaine:** Materiaalitekniikka

**Tekijä:** Nea Karppelin

**Otsikko:** Hydrogeelit lääketieteessä ja niiden soveltaminen rintasyöpähoidoissa

**Ohjaaja:** Yliopisto-opettaja Valtteri Vinni

**Sivumäärä:** 29 sivua

**Päivämäärä:** 21.4.2024

Rintasyöpä on tällä hetkellä johtavin diagnosoitu syöpä maailmalla. Vuonna 2020 uusia rintasyöpätapauksia tilastoitiin noin 2,3 miljoonaa. Uusien rintasyöpädiagnoosien on arvioitu kasvavan yli 40 % ja rintasyöpäkuolleisuuden yli 50 % vuoteen 2040 mennessä. Perinteiset rintasyövän hoitomuodot, kuten kemoterapia, eivät ole riittävän tehokkaita sellaisenaan ja niistä aiheutuvat sivuvaikutukset voivat olla erittäinkin haitallisia. Lisäksi uusien syöpälääkkeiden kehitys ja rintasyövän tutkimus vaatii edistyneempää kudostekniikkaa jäljittelemään paremmin aitoa kasvainmikroympäristöä.

Hydrogeelejä on tutkittu lupaavin tuloksin uudenlaisina lääkkeenantojärjestelminä paikalliseen ja kontrolloituun lääkeannosteluun, sekä myös 3D-soluviljelmien matrikseina. Tutkielmassa perehdytään erilaisten hydrogeelien sovelluksiin rintasyöpähoitoja varten sekä rintasyövän uusiutumisen estämiseksi. Lisäksi selvitetään hydrogeelien soveltuvuutta kudostekniikkaan uusien rintasyövän vastaisten strategioiden kehittämiseksi.

Hydrogeelit ovat yksi tutkituimmista polymeerisistä lääkkeenantojärjestelmistä. Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia verkkorakenteita, jotka kykenevät sitomaan paljon vettä itseensä. Verkkorakenteet ovat silloittuneiden hydrofiilisten polymeeriketjujen muodostamia. Lääkeaineiden säännöstely vapauttaminen perustuu hydrogeelin kykyyn kontrolloida turpoamista, eli veden sitomista. Tutkielmassa keskitytään rintasyöpähoidoissa käytettäviin hydrogeelityyppeihin, joita ovat lämpötila-, pH- ja valoherkät sekä kaksoisreagoivat.

**Avainsanat:** hydrogeelit, biopolymeerit, kitosaani, polymeeriset lääkkeenantojärjestelmät, LCST, rintasyöpä, MCF-7, 3D-soluviljelmät

## Lyhenteet

<b>AHA</b>	Dialdehydi-hyaluronihappo
<b>CMCS</b>	Karboksimetyylikitosaani
<b>COS-GMA</b>	Glysidyyliimetakryloitu kito-oligosakkari
<b>ER</b>	Estrogeenireseptori
<b>GC</b>	Glykolikitosaani
<b>GNRs</b>	Kultananosauvat (engl. gold nanorods)
<b>GO</b>	Grafeenioksidi
<b>HA</b>	Hyaluronihappo
<b>HA-Cys-GMA</b>	Kystamiini- ja glysidyyliimetakrylaatti-modifoitu hyaluronihappo
<b>HA-SH</b>	Tiolimodifoitu hyaluronihappo
<b>HECS</b>	Hydroksietyylikitosaani
<b>HER2</b>	Ihmisen epidermaalinen kasvutekijä 2
<b>HNTs</b>	Tioidut halloysiitti nanoputket (engl. halloysite nanotubes)
<b>IA</b>	Itakoni happo
<b>LCST</b>	Alempi kriittinen liuoslämpötila (engl. lower critical solution temperature)
<b>MWCNT</b>	Moniseinäinen hiilinanoputki (engl. multi-walled carbon nanotubes)
<b>NIPAAm</b>	Isopropyliakryyliamidi
<b>NIR</b>	Lähi-infrapunvalo (engl. near infrared)
<b>PAA</b>	Polyakryylihappo
<b>PAAm</b>	Polyakryyliamidi

<b>PDEAm</b>	Poly(N,N-dietyyli-akryyliamidi)
<b>PDMAEMA</b>	Poly(dimetyyliaminoetyyli-metakrylaatti)
<b>PECA</b>	Metoksyyli-poly(etyleeniglykoli)-poly( $\epsilon$ -kaprolaktoni)-akryloyylikloridi
<b>PEG</b>	Polyetyleeniglykoli
<b>PEGDA</b>	Polyetyleeniglykoli-diakrylaatti
<b>PEI</b>	Poly(etyleeni-imidi)
<b>PEO-PPO-PEO</b>	Poly(etyleenioksidi)-poly(propyleenioksidi)-poly(etyleenioksidi)
<b>PF127</b>	Pluronic® F127 -hydrogeeli
<b>PHB-P</b>	Poly[(R)-3-hydroksibutyraatti]-poly(dimetyyliaminoetyyli-metakrylaatti)
<b>pLysAAm</b>	Poly(N <sub>ε</sub> -akryloyyli-L-lysiini)
<b>PMAA</b>	Poly(metakryylihappo)
<b>PNIPAAm</b>	Poly(N-isopropyliakryyliamidi)
<b>PNVCL</b>	Poly(N-vinyyli-kaprolaktaami)
<b>PR</b>	Progesteronireseptori
<b>Sur-ASON</b>	Surviviinin antisense-oligonukleotidi
<b>UCST</b>	Ylempi kriittinen liuoslämpötila (engl. upper critical solution temperature)

# Sisältö

## Lyhenteet

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Hydrogeelit lääketieteessä</b>	<b>3</b>
2.1	Lämpötilaherkät hydrogeelit	4
2.2	pH-herkät hydrogeelit	7
2.3	Valoherkät hydrogeelit	8
2.4	Kaksoishervät hydrogeelit	10
<b>3</b>	<b>Hydrogeelit rintasyövän tutkimisessa ja hoidoissa</b>	<b>13</b>
3.1	Rintasyöpäkasvaimen jäljitteleminen	14
3.2	Rintasyövän hoito	16
3.2.1	Lämpöaktivoitu geelityminen	16
3.2.2	pH-riippuvainen lääkkeen vapauttaminen	17
3.2.3	Valoherkät hydrogeelit ja fototerminen terapia	18
3.2.4	Kaksoisreaktiivisuuden sovelluksia	18
3.3	Kasvaimen uusiutumisen estäminen	19
<b>4</b>	<b>Hydrogeelien haasteet ja tulevaisuus rintasyöpähoidoissa</b>	<b>22</b>
4.1	Hydrogeelien haasteet	22
4.2	Hydrogeelien tulevaisuuden näkymät	24
<b>5</b>	<b>Yhteenveto ja pohdintaa</b>	<b>25</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>30</b>

# 1 Johdanto

Rintasyöpä on vuoden 2020 tilastojen mukaan yleisin diagnosoitu syöpä kattaen noin 11,7 % kaikista syöpädiagnooseista ja 24,5 % naisten syöpätapauksista. Kaikista syöpäkuolemista yhteensä 6,9 % on rintasyöpäperäisiä ja naisten syöpäkuolemista 15,5 % on rintasyövän aiheuttamia [1, s. 209, 214]. Rintasyöpädiagnoosien arvioidaan kasvavan vuoteen 2040 mennessä yli 40 % ja rintasyöpäkuolleisuuden jopa yli 50 %. Syöpähoitojen ja varhaisen syövän havaitsemisen edistymisestä huolimatta syöpä on edelleen vakava maailmanlaajuinen ongelma [2, s. 1–2]. Haasteita rintasyöpähoidolle aiheuttaa esimerkiksi rintasyövän reagoimattomuus tai resistenssi perinteisille hoitomuodoille [2, s. 2], kuten kemoterapialle ja sädehoidolle [3, s. 145]. Lisäksi rintasyöpätutkimus ja uusien syöpälääkkeiden kehittäminen on puutteellista perinteisesti käytetyillä kaksikulotteisilla *in vitro* -soluviljelmillä [4, s. 131–132].

Rintasyövän hoitoon käytettävät perinteiset hoitomuodot, kuten kemoterapia ja sädehoito, eivät ole sellaisenaan kovin tehokkaita. Kemoterapiassa koko elimistöön kohdistuvan lääkeannostelun haitalliset sivuvaikutukset ovat merkittäviä ja lääkeaineiden liukoisuus on heikkoa. Sädehoito voi puolestaan aiheuttaa säteilyvaurioita ympäröivään normaaliin kudokseen, minkä vuoksi sädehoidon käyttö on rajoitettua [5, s. 303]. Tehokkaamman syöpähoidon saavuttamiseksi ja haitallisten sivuvaikutusten minimoimiseksi hydrogeelit ovat herättäneet paljon huomiota uudenlaisina lääkkeenantojärjestelminä [6, s. 1]. Lisäksi rintasyövän uusiutumisen estämistä hydrogeeleillä on tutkittu, jolloin leikkausoperaatiosta jäljelle jääviä syöpäsoluja hoidetaan injektoitavan hydrogeelin avulla [5, s. 303]. Tutkielmassa käydään läpi rintasyöpähoitoja varten tutkittuja ja käytettyjä hydrogeelejä sekä niiden sovellettavuutta.

Uusien syöpälääkkeiden kehittämiseksi pitkään käytetyt 2D-soluviiljelmät eivät vastaa aitoa kasvainmikroympäristöä esimerkiksi tasomaisen morfologiansa vuoksi. Tasomainen morfologia muuttaa syöpäsolujen invaasiota, migraatiota, lisääntymistä ja antiapoptoosia. Lisäksi solut eivät pääse vuorovaikuttamaan keskenään tarpeeksi. 3D-soluviiljelmät voivat ratkaista 2D-viljelmien rajoitteita, kun solut pääsevät esimerkiksi vuorovaikuttamaan kaikkiin suuntiin ja solujen migraatio on mahdollista [4, s. 131–132]. Rintasyöpäkasvaimen mikroympäristöä jäljittelevinä 3D-soluviiljelmien matrikseina on tutkittu hydrogeelejä lupaavin tuloksin [7, s. 768].

Hydrogeelit ovat tällä hetkellä sovelletuimpia polymeerisistä lääkkeenantojärjestelmistä. Ne kykenevät kuljettamaan ja vapauttamaan lääkeaineita sekä kontrolloimaan lääkevapautumista pidemmälläkin aikavälillä [8, s. 748]. Hydrogeelit ovat silloittuneiden polymeerien kolmiulotteisia rakenteita, jotka kykenevät sitomaan paljon vettä itseensä [9, s. 1]. Hydrogeelien aktivointi voi perustua fysikaalisiin, kuten lämpötilaan, kemiallisiin, kuten pH tai biologisiin, kuten glukoosi, ärsykkeisiin [10, s. 1]. Rintasyöpähoidoissa käytettäviä hydrogeelityyppejä ovat lämpötilaan, pH:n muutoksiin ja valoon reagoivat sekä kaksoisherkilliset hydrogeelit [6, s. 1; 11, s. 1835]. Tutkielmassa perehdytään rintasyöpähoidoissa käytettävien hydrogeelityyppien käyttäytymiseen fysiologisessa ympäristössä.

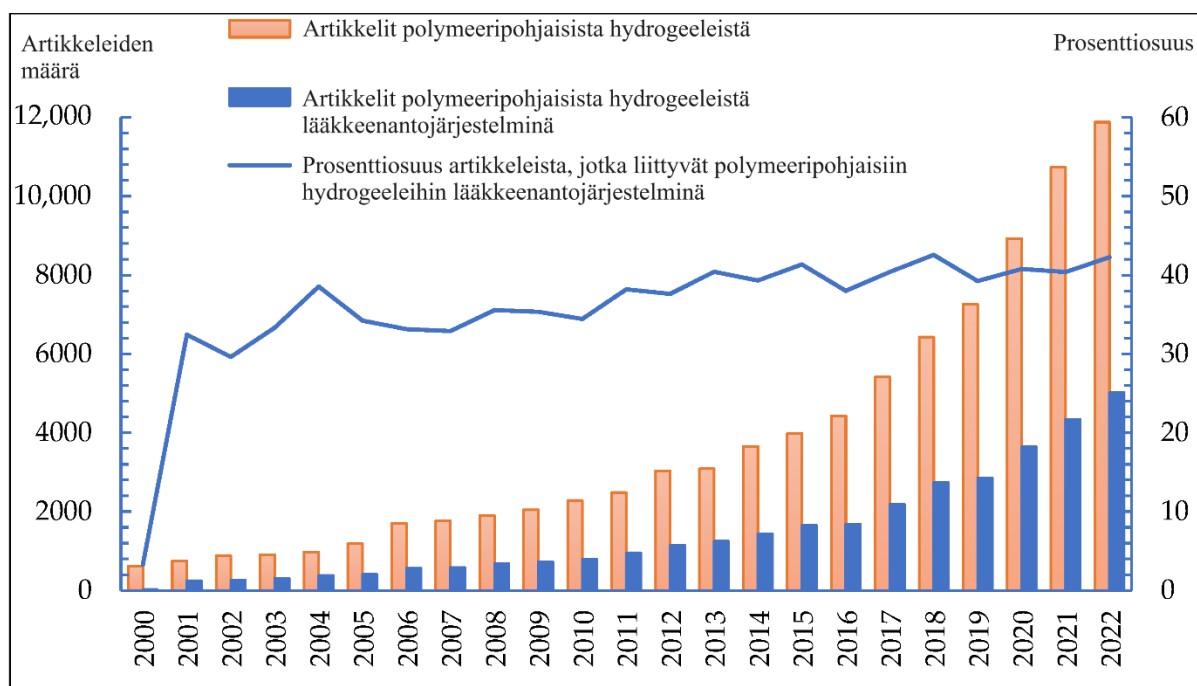
Tutkielmassa keskitytään pääasiassa hydrogeeleihin lääkkeenantojärjestelminä rintasyöpähoidoissa, mutta lisäksi tarkastellaan hydrogeelejä myös kudostekniikassa rintasyövän tutkimusta ja lääkekehitystä varten. Tämän tutkielman on tarkoitus vastata seuraaviin kysymyksiin: miten hydrogeelit käyttäytyvät fysiologisessa ympäristössä, miten käyttäytymistä voidaan soveltaa rintasyöpähoidoissa ja millaisia haasteita hydrogeeleillä on nyt ja tulevaisuudessa.

## 2 Hydrogeelit lääketieteessä

Perinteiset lääkevalmisteet ja lääkkeenantojärjestelmät ovat monilta ominaisuuksiltaan rajoittuneita. Niillä on lyhyt puoliintumisaika, heikko liukoisuus ja pieni biologinen hyötyosuus. Lääkeaineen vapautumiseen kuluva aika ei välttämättä ole riittävä tehokkaan lääkeainekonsentraation saavuttamiseksi veriplasmassa. Tämä voi edellyttää esimerkiksi lääkeaineen toistuvaa annostelua. Vaihtoehtoinen tapa ratkaista perinteisten lääkevalmisteiden rajoitteita ovat polymeeriset lääkkeenantojärjestelmät, joista hydrogeelit ovat yksi tutkituimmista ja sovelletuimmista. Polymeeripohjaiset hydrogeelit pystyvät sitomaan runsaasti vettä ja biologisia nesteitä itseensä, ja niillä on ainutlaatuisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, joiden ansiosta ne kykenevät säännöstelemään lääkeaineen vapautumista pidemmällä aikavälillä. Lisäksi ne ovat bioyhteesopivia ja koostumukseltaan pehmeitä ja huokoisia, minkä ansiosta ne jäljittelevät elävää kudosta. Hydrogeelien monipuoliset ominaisuudet lääkeaineiden kantamisessa ja säännöstelyissä vapautusmekanismeissa mahdollistavat esimerkiksi kohdennetun lääkehoidon tiettyihin kudoksiin tai elimiin. [8, s. 748; 9, s. 1–2]

Polymeeripohjaisten hydrogeelien tutkimus on lisääntynyt merkittävästi 2000-luvun alusta. Tutkimustoiminnan laajeneminen voidaan havaita polymeeripohjaisia hydrogeelejä käsittelevien julkaistujen artikkeleiden kasvavasta määrästä vuosien 2000 ja 2022 välillä (kuva 1). Lisääntynyt tutkimus ja artikkeleiden kasvava määrä osoittavat hydrogeelien olevan lupaavia biolääketieteellisissä sovelluksissa. Julkaistujen artikkeleiden määrä on ollut tasaisessa kasvussa vuosien 2005 ja 2015 välillä, ja vuodesta 2015 tähän päivään on tapahtunut huomattava loikkaus. Vuonna 2022 polymeeripohjaisia hydrogeelejä koskevien artikkeleiden määrä nousi yli 12 000, ja niistä yli 5 000 keskittyi hydrogeeleihin lääkkeenantojärjestelmiin. Hydrogeelien tutkimuksen voidaan odottaa kasvavan vielä entisestään tulevaisuudessa tarjoten tehokkaampia ja kehittyneempiä lääkkeenantojärjestelmiä. [9, s. 27]





Kuva 1. Polymeeripohjaisia hydrogeelejä ja niitä lääkkeenantojärjestelminä käsittelevien julkaisujen määrät vuosien 2000 ja 2022 välillä. [9, s. 28]

Hydrogeelit ovat hydrofiilisten polymeeriketjujen muodostamia kolmiulotteisia verkkorakenteita. Polymeerit ovat silloittuneita, mikä mahdollistaa 3D-rakenteen muodostumisen ja pysymisen [9, s. 1; 12, s. 175]. Geelimäinen rakenne puolestaan muodostuu, kun hydrofiiliset polymeerit turpoavat veden vaikutuksesta. Lääkeaineiden säännöstellä vapautuminen perustuu hydrogeelin kykyyn kontrolloida turpoamista, ja hydrogeelin turpoamista voidaan muokata reagoimaan vain haluttuun tai haluttuihin ärsykkeisiin [9, s. 2].

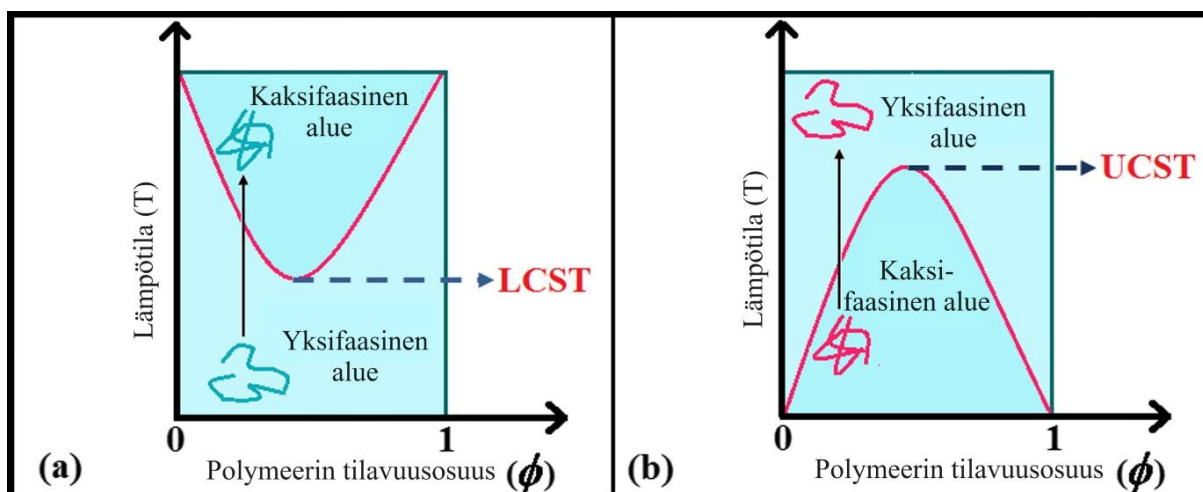
Hydrogeelejä aktivoivat ärsykkeet voidaan jakaa fysikaalisiin, kemiallisiin ja biologisiin ärsykkeisiin. Fysikaalisia ärsykejä ovat lämpötila, valo, paine, sähkö- ja magneettikentät, ultraääni ja leikkausjännitys. Kemiallisia ärsykejä ovat pH ja ionit. Biologisia ärsykejä ovat entsyymit ja glukoosi [8, s. 749; 10, s. 1]. Tässä tutkielmassa keskitytään erityisesti rintasyöpähoidoissa käytettäviin hydrogeelityyppeihin, joita ovat lämpötilaan, pH-arvoon ja valoon reagoivat sekä kaksoisherkilliset hydrogeelit [6, s. 1; 11, s. 1835].

## 2.1 Lämpötilaherkät hydrogeelit

Lämpötilaherkät hydrogeelit ovat yksi tutkituimmista ja sovelletuimmista hydrogeelityypeistä ja lääkkeenantojärjestelmistä. Tällainen hydrogeeli voidaan aktivoida tarkasti kohdennetun ulkoisen lähteen avulla. Lisäksi erilaiset patologiset tekijät, kuten tulehdukset tai kasvaimet,

voivat aiheuttaa paikallista lämpötilan muutosta ympäristössään [13, s. 3]. Terveydenhuollossa injektoitavia lämpötilaherkkiä hydrogeelejä sovelletaan lääkkeiden ja geenien kuljetukseen, solukapselointiin, kudosten uusiutumiseen ja operaatioiden jälkeisen kiinnittymisen estämiseen [12, s. 184]. Eniten tutkittuja lämpötilaherkkiä hydrogeelejä ovat poly(N-isopropyyliakryyliamidi) (PNIPAAm) -polymeeripohjaiset hydrogeelit [13, s. 3]. Muita käytettyjä lämpötilaherkkiä polymeerejä ovat esimerkiksi polyakryyliamidi (PAAm), poly(N-vinyyliakrolaktaami) (PNVCL) ja poly(N,N-dietyyliakryyliamidi) (PDEAm) [10, s. 3].

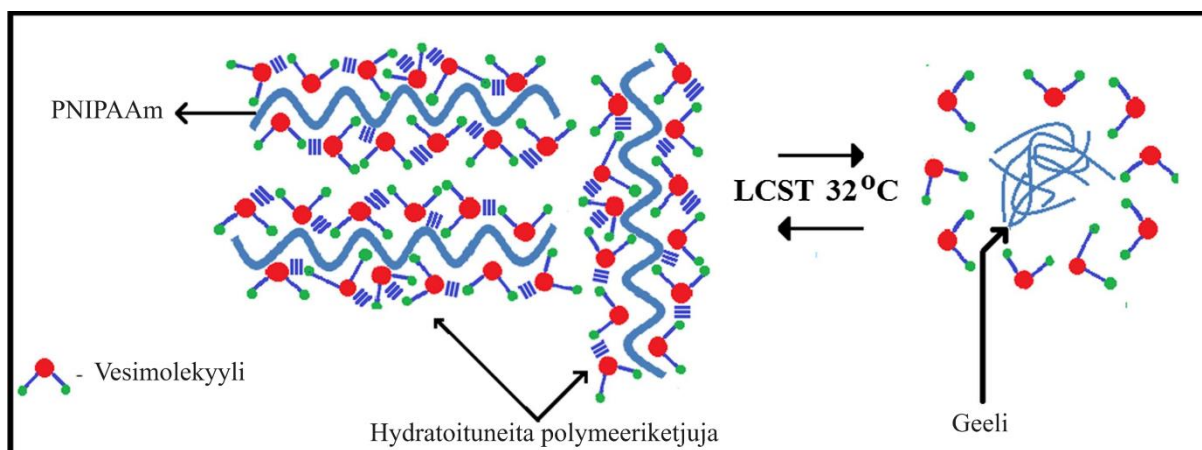
Lämpötilan muutos aiheuttaa lämpötilaherkässä hydrogeelissä turpoamiskäyttäytymisen tai liuos–geeli-välisen siirtymän muutoksia. Hydrogeelissä tapahtuu tilavuusfaasitransitio, kun se saavuttaa tietyn lämpötilan. Kyseessä on alempi kriittinen liuoslämpötila (engl. lower critical solution temperature, LCST), kun aktivoivan lämpötilan alapuolella hydrogeeli on turvonnut sitoen paljon vettä itseensä. Kun hydrogeeli saavuttaa LCST:n, sen vedensitomiskyky heikentyy huomattavasti, mikä aiheuttaa kutistumisen [9, 18; 13, 3], ja geeli muuttuu kaksifaasiseksi [10, s. 2] (kuva 2a). Ylemmän kriittisen liuoslämpötilan (engl. upper critical solution temperature, UCST) omaavat hydrogeelit ovat puolestaan kaksifaasisia alle kyseisen lämpötilan ja kokevat turpoamisen vasta, kun lämpötila saavuttaa UCST:n [9, s. 18; 13, s. 3] (kuva 2b).



Kuva 2. Polymeeriliuoksen faasidiagrammi (a) LCST-polymeereillä ja (b) UCST-polymeereillä. [10, s. 3]

Hydrogeelit, joiden rakennepolymeerit omaavat LCST:n, ovat negatiivisesti lämpöherkkiä (engl. negative thermosensitive). Hydrogeelin turpoaminen tämän lämpötilan alapuolella ja kutistuminen sen yläpuolella perustuu polymeeriketjujen välisiin vuorovaikutuksiin ja niiden hydrataatioon. Polymeerit ovat hydratoituneet alle LCST:n, jolloin hydrogeeli on yksifaasista

geeliä. Kun lämpötila nousee LCST:hen, polymeerin ja liuottimen väliset vuorovaikutukset heikentyvät samalla, kun polymeerien väliset vuorovaikutukset keskenään lisääntyvät [10 s. 2–3; 14, s. 130] (kuva 3). Tämä johtaa tilavuusfaasitransitioon, jolloin yhden faasin sijasta muodostuu kaksi faasia. PNIPAAm on negatiivisesti lämpöherkkä polymeeri, jonka LCST on 32 °C. Muita negatiivisesti lämpöherkkiä polymeerejä ovat polyvinyylietterit, polyakryyliamidit ja polyoksatsoliinit. [10, s. 3]



Kuva 3. LCST:n vaikutus PNIPAAm:n polymeerirakenteeseen. [10, s. 4]

UCST-polymeeripohjaiset hydrogeelit ovat puolestaan positiivisesti lämpöherkkiä (engl. positive thermosensitive). Positiivisesti lämpöherkkiä polymeerejä ovat PAA:sta ja PAAM:sta koostuvat polymeeriverkostot sekä poly(akryyliamidi-ko-butyylimetakrylaatti). Reversiibelisti lämpöherkät (engl. thermoreversible) hydrogeelit kokevat tilavuusfaasitransition liuoksesta geeliksi, kun lämpötila muuttuu. Näitä valmistetaan usein poly(eteenioksidi)-poly(propeenioksidi)-poly(eteenioksidi) (PEO-PPO-PEO) -blokkipolymeereistä. [10, s. 3]

LCST-pohjaiset eli negatiivilämpöherkät hydrogeelit ovat eniten raportoitu lämpötilaan reagoiva hydrogeelityyppi. Näissä lääkeaineiden diffuusio geeliin on tehokasta alle LCST:n geelin turvonneen rakenteen ansiosta. Lääkeaineet siirtyvät polymeeriketjujen muodostamiin verkkorakenteisiin. Kun lämpötila nousee ja polymeerien väliset vuorovaikutukset lisääntyvät, verkkorakenteet tiivistyvät. Tällöin lääkeaineiden diffuusio hydrogeelistä ympäristöönsä vaikeutuu, mikä mahdollistaa kontrolloidun ja pitkäaikaisen vapautumisen [13, s. 3]. LCST-käyttäytymistä voidaan muokata geelin polymeeriketjujen hydrofiilisten ja hydrofobisten ryhmien perusteella tai lisäämällä rakenteisiin hydrofiilisiä tai hydrofobisia monomeerejä [8, s. 750, 752].

Lämpötilaherkät hydrogeelit sopivat injektoitaviksi materiaaleiksi, mikä on herättänyt paljon kiinnostusta terveydenhuollossa. Perinteisen implantaation sijasta injektointi minimoi operaatiosta aiheutuvan kivun, infektiot ja arvet. Huoneenlämmössä nestemäinen liuos on helppo injektoida, ja geeliytyminen tapahtuu nopeasti injektoinnin jälkeen noin 37 °C asteessa [10, s. 3; 12, s. 184]. Injektoitavia lämpötilaherkkiä hydrogeelejä on myös tutkittu rintasyöpähoitoihin liittyen [6, s. 1].

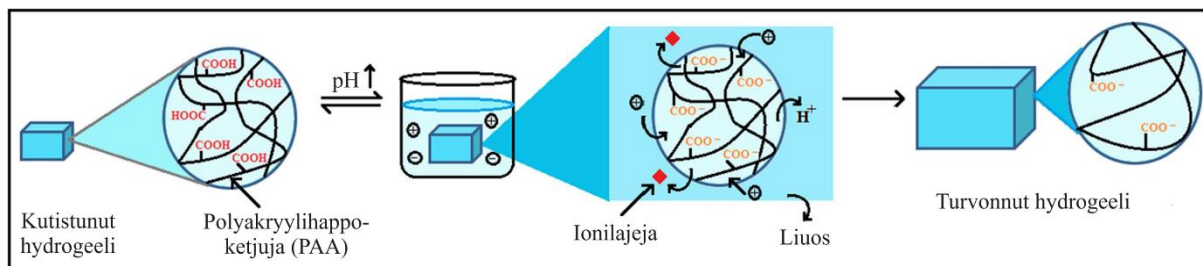
## 2.2 pH-herkät hydrogeelit

Hydrogeelit, joiden turpoamiskäyttäytyminen perustuu ympäristön pH-arvoon ja sen muutokseen, ovat pH-herkkiä hydrogeelejä. Näiden hydrogeelien rakennepolymeerit sisältävät kevyesti ionisoituvia emäksisiä tai happamia sivuryhmiä, jotka reagoivat vastaaviin olosuhteisiin. Sivuryhmän ionisaatio tai deionisaatio pH:n muutoksen seurauksena vaikuttaa hydrogeelin varaustiheyteen ja hydrofiilisyyteen, mikä puolestaan vaikuttaa geelin kykyyn sitoa vettä ja turvota. Luonnollisia pH-herkkiä hydrogeelejä ovat esimerkiksi kitosaani-, alginaatti-, gelatiini-, hyaluronihappo- ja dekstraanipohjaiset. [9, s. 18; 10, s. 14–15]

pH-herkkien hydrogeelien yleisiä sivuryhmiä ovat karboksyylihappo-, fosfaatti-, imidatsoli-, pyridiini- ja sulfoniryhmät sekä amino- ja amiiniryhmät [9, s. 19; 10, s. 14]. Polymeerejä, joissa on useampia happoryhmiä, kutsutaan polyanioineiksi tai polyhappoiksi, ja ne luovuttavat protoneita korkeassa pH:ssa muodostaen negatiivisesti varautuneita polymeeriketjuja. Yleisimpiä polyhappoja ovat polyakryylihappo (PAA), poly(metakryylihappo) (PMAA) ja poly(sulfonamidit). Useampia emäsryhmiä sisältäviä polymeerejä kutsutaan polykationeiksi tai polyemäksiksi, ja ne puolestaan vastaanottavat protoneita matalassa pH:ssa muodostaen positiivisesti varautuneita polymeeriketjuja. Yleisimpiä polyemäksiä ovat poly(dimetyyliaminoetyyli-metakrylaatti) (PDMAEMA), poly(etyleenimidi) (PEI) ja poly(4-vinyylipyridiini). [10, s. 14]

pH-herkän hydrogeelin turpoaminen perustuu polyelektrolyyttien eli negatiivisesti tai positiivisesti varautuneiden polymeeriketjujen samanmerkkisten varausten väliseen sähköstaattiseen hylkimiseen [8, s. 794]. Hylkimisen seurauksena polymeeriverkosto venyy, mikä puolestaan antaa tilaa vesimolekyyleille hydrogeelissä. Lisäksi myös osmoottinen paine auttaa veden kulkeutumista geeliin ja siten geelin turpoamista [6, s. 6]. Esimerkiksi ionisoituvat karboksyylihapporyhmät muodostavat polyhappoja, jotka luovuttavat protoneita korkeassa pH:ssa muodostaen negatiivisesti varautuneita polymeerejä, ja puolestaan vastaanottavat protoneita matalammassa eli happamassa ympäristössä. Tällöin hydrogeeli on happamassa

ympäristössä kutistunut ja korkeammassa pH:ssa eli neutraalimmassa tai emäksisessä ympäristössä turvonnut. [9, s. 19; 10, s. 14] (kuva 4)



Kuva 4. pH:n muutoksen aiheuttama hydrogeelin tilavuuden ja polymeerirakenteen muutos. [10, s. 17]

Muokkaamalla rakennepolymeerien sivuryhmiä ja niiden konsentraatiota voidaan vaikuttaa hydrogeelin reagoivaan pH-alueeseen. Lisäksi polymeerien silloittumistiheyden muutoksilla voidaan vaikuttaa pH-reagoituvuuteen. pH-reagoivuus ja sen muokattavuus mahdollistaa näiden hydrogeelien erittäin monipuoliset käyttömahdollisuudet biolääketieteen ja bioteknologian sovelluksissa. Erityisesti lääkkeenantojärjestelmissä pH-herkillä hydrogeeleillä on monia sovellusmahdollisuuksia [9, s. 19]. Esimerkiksi syöpäsolujen epänormaali ja nopea glukoosimetabolia muodostaa happaman solunulkoisen ympäristön kasvaimen ympärille, jolloin emäksisiä sivuryhmiä sisältävät hydrogeelit voivat toimia syöpien lääkehoidoissa [6, s. 6; 11, s. 1841].

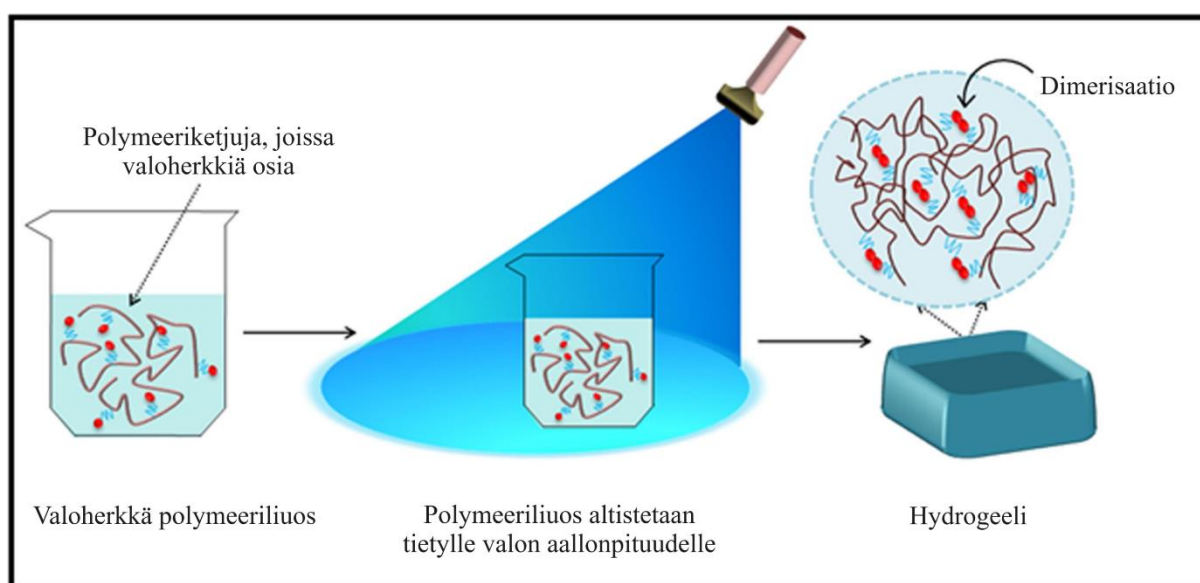
### 2.3 Valoherkät hydrogeelit

Valoherkissä polymeeripohjaisissa hydrogeeleissä tapahtuu palautumiskykyisiä muutoksia niiden fysikaalisissa ja kemiallisissa ominaisuuksissaan, kun ne altistuvat valolle. Valoherkkyys perustuu hydrogeelissä oleviin valoherkkiin komponentteihin tai fotoaktiivisiin molekyyliin, jotka reagoivat tiettyyn valon aallonpituuteen. Yleisimpiä valoherkkiä osia ovat spirooksatsiini-, spiropyraani-, fulgidi- ja atsobentseenijohdannaiset [9, s. 19; 10, s. 6]. Lisäksi myös esimerkiksi kuparimonosulfidin, rautaoksidin, molybdeenidisulfidin ja kultananopartikkeleiden on havaittu toimivan valoherkkinä aineina [6, s. 7]. Niiden etuja muihin ärsykkeisiin reagoiviin geeleihin ovat esimerkiksi laajan aallonpituusalueen hyödyntämiskyky aina UV-säteilystä infrapunasäteilyyn, valon annostelun säätelymahdollisuus ja materiaalin reagoituvuuden neliulotteinen hallitseminen. [10, s. 6]

Valoherkät hydrogeelit voidaan jakaa kahteen pääryhmään perustuen siihen, liittyykö reagoivuuteen lämmön tuottamista. Fototermisesti reagoivissa hydrogeeleissä on polymeerejä

tai nanopartikkeleita, jotka tuottavat lämpöä, kun ne reagoivat valoon. Lämmön muuntaminen valoenergiasta voi tapahtua esimerkiksi plasmonisen absorption tai fototermisen muuntamisen avulla. Lämmön seurauksena hydrogeelin liuos–geeli-välisessä siirtymässä, turpoamisessa tai mekaanisissa ominaisuuksissa voi tapahtua muutoksia. [9, s. 19]

Toisen pääryhmän, eli yksinkertaisesti valoherkkien hydrogeelien reagointiin ei liity lämmön tuottamista. Geelin valoherkissä osissa eli fotokromeissa tapahtuu valoindusoitua isomeroitumista, valohajoamista sekä fotodimeroitumista eli kahden identtisen ja lähekkäisen molekyylin kovalenttisen sidoksen muodostumista valosäteilyn aiheuttamana (kuva 5). Näistä seuraa muutoksia konformaatioissa tai silloittumisessa. [9, s. 19; 10, s. 6]

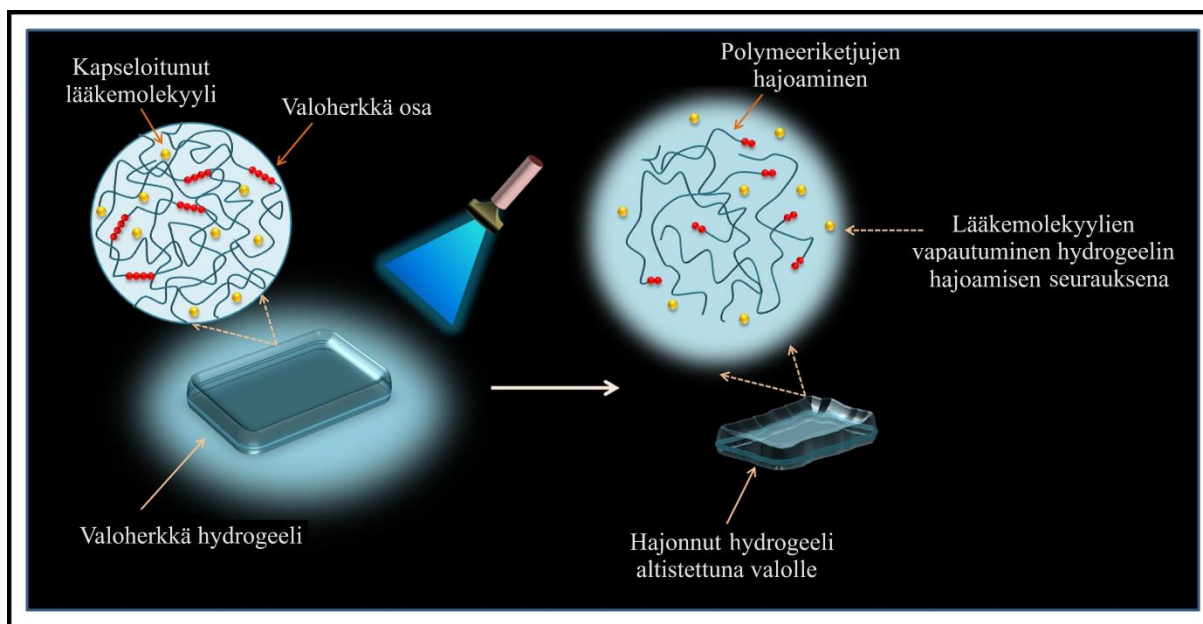


Kuva 5. Fotodimerisaatio fotoherkkien osien välillä valon stimuloimana aiheuttaa geeliytymisen. [10, s. 7]

Valoindusoitua isomeroitumista tapahtuu esimerkiksi, kun atsobentseeni reagoi UV-säteilyyn, jonka aallonpituus on 300-360 nanometriä, jolloin se muodostaa atso-sidoksen ( $-N=N-$ ) metastabiiliin *cis*-isomeerin. Kun aallonpituus kasvaa näkyvän valon pituiseksi, joka on yli 420 nanometriä, sidoksen *cis*-isomeeri palautuu takaisin stabiiliin *trans*-isomeeriin. Isomerian muutoksen nopea ja puhdas fotokemia mahdollistaa liuos–geeli- tai geeli–liuos-välisen muutoksen. [9, s. 19; 10, s. 6]

Valohajoaminen eli sidosten fotolyysi on tietyn aallonpituuden valosäteilyn seurauksena tapahtuva sidosten katkeaminen. Sidosten katkeaminen puolestaan vapauttaa lääkkeen hydrogeelistä. Esimerkiksi polyetyleeniglykolista (PEG) ja poly( $\gamma$ -*o*-nitrobentsyyli-L-glutamaatista) syntetisoitu hydrogeeli on itsekokoontuva, joka perustuu poly( $\gamma$ -*o*-

nitrobensyyli-L-glutamaatti) -osien hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. Kun hydrogeeli altistetaan UV-valosäteilylle, *o*-nitrobensyyliesteriryhmän hydrofobiset sidokset katkeavat, minkä seurauksena lääkeaine pääsee vapautumaan hallitusti geelistä. [10, s. 6–7] (kuva 6)



Kuva 6. Valoherkkien osien fotolyysi muodostaa hajonneen hydrogeelin rakenteen. [10, s. 8]

Fotokromien sekä polymeeriverkoston muokkaamisen lisäksi valoherkkien hydrogeelien ominaisuuksiin, kuten turpoamiskäyttäytymiseen ja hydrofiilisyyteen tai -fobisuuteen, voidaan vaikuttaa ulkoisilla parametreilla. Näitä ovat esimerkiksi valon aallonpituus ja intensiteetti sekä aika, jona materiaali altistetaan valolla. [9, s. 19; 10, s. 6]

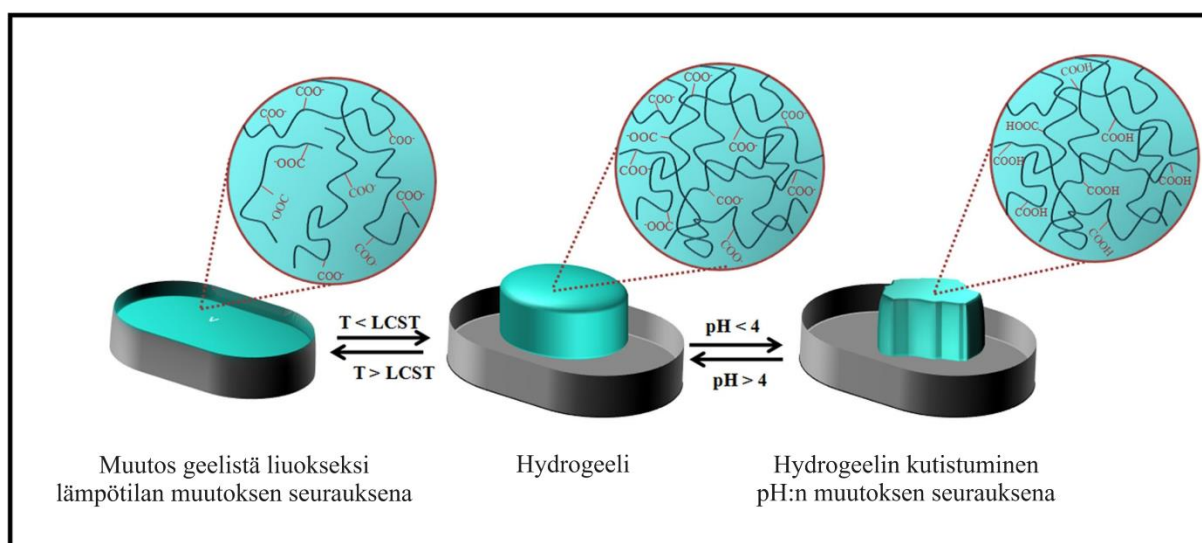
Biolääketieteellisissä sovelluksissa valoherkkien hydrogeelien voidaan sanoa olevan seuraavan sukupolven polymeeripohjaisia materiaaleja, sillä niiden avulla kytetään esimerkiksi jäljittelemään dynaamisia ja heterogeenisiä eläviä mikroympäristöjä 4D-soluvijelmiä varten [10, s. 6]. Erityisesti fototermitiset hydrogeelit yhdistelminä kemoterapian, immunoterapian tai fotodynaamisen terapian kanssa ovat osoittaneet mielenkiintoisia tuloksia syöpäsolujen tappamisessa. Nämä fototermitiset hydrogeelit absorboivat lähi-infrapunavaloa (engl. near infrared, NIR) tuottaen lämpöä, mikä voi aiheuttaa paikallista hypertermiaa, lääkkeen lisääntyntä vapautumista tai immuunivasteen [6, s. 7].

## 2.4 Kaksoishervät hydrogeelit

Biologiset ympäristöt, joihin lääkeaineita halutaan kuljettaa hydrogeelin avulla, koostuvat usein monista erilaisista ärsykkeistä. Useampaan, kuin yhteen ärsykkeeseen reagoivat hydrogeelit

ovat mielenkiintoisia kehityskohteita tällä hetkellä, sillä niiden reagoitakyvyn hallitseminen on helpompaa [10, s. 22]. Tällaisten hydrogeelien bioyhteensopivuuden, hajoamisnopeuden, mekaanisen lujuuden ja muiden ominaisuuksien hienosäätäminen on mahdollista [9, s. 9]. Esimerkiksi, kun lämpötilaan reagoiva polymeeriliuos injektoidaan elimistöön, muutos huoneenlämmöstä fysiologiseen lämpötilaan saa aikaan geeliytymisen. Geeliytyminen voi alkaa jo injektioneulassa aiheuttaen neulaan tukoksen. Tällöin hydrogeeliin voidaan lisätä pH-herkkiä osia, jotka voivat puolestaan estää geeliytymisen tapahtumista neulassa [11, s. 1843].

Kaksoisherkit hydrogeelit reagoivat kahteen eri ärsykkeeseen, joita voivat olla esimerkiksi lämpötila ja pH (kuva 7), glutationi ja pH, glukoosi ja pH tai lämpötila ja magneettikenttä [6, s. 9; 11, s. 1843]. Ne koostuvat keskenään erilaisista rakennepolymeeriketjuista, joilla on erilaisia ominaisuuksia. Myös yhdellä polymeerityypillä voi olla useampaan ärsykkeeseen reagoivia ominaisuuksia. Esimerkiksi PNIPAAm on eniten tutkittu lämpötilaherkkä polymeeri, mutta myös pH:n on dokumentoitu vaikuttavan merkittävästi hydrogeelin turpoamiskäyttäytymiseen. [10, s. 24]



Kuva 7. Lämpötilaan ja pH:n muutoksiin reagoivan hydrogeelin käyttäytyminen kummankin ärsykkeen stimuloimana. [10, s. 27]

Glutationi ja pH ovat patofysiologisia ominaisuuksia, jotka voidaan yhdistää hydrogeelin aktivoiviksi ärsykkeiksi. Hydrogeelissä voidaan käyttää pH-herkkien osien lisäksi glutationiin reagoivana sivuryhmänä esimerkiksi disulfidiryhmää, joka vastaanottaa elektroneita glutationin tioliryhmältä pelkistäen sen. Lääkeaineita vapautuu, kun hydrogeelin polymeeriverkostot hajoavat glutationin pelkistämisen seurauksena esimerkiksi kasvainympäristössä. Hydrogeelissä, jossa oli glutationin pelkistäviä disulfididisidoksia ja pH-herkkiä asetaaliryhmiä,



havaittiin lisääntyntä turpoamista ja purskahdusmaista lääkeaineen vapauttamista. Nämä havainnot tehtiin ympäristössä, jossa oli glutationia vastaavaa ainetta, ja jonka pH oli 3 ja 5 verraten fysiologiseen pH-arvoon 7,4. [6, s. 9]

Lämpömagneetti-kaksoisherkkiä hydrogeelejä on hyödynnetty syöpähoidoissa. Esimerkiksi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  -nanopartikkeleilla voidaan muuttuvan magneettikentän avulla tuottaa lämpöä hydrogeelissä ja siten paikallista hypertermiaa. Lämpötilan nousun seurauksena tapahtuu palautuva geeli-liuos-siirtymä. Kun  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  -nanopartikkeleita lisättiin PEG-polymeereihin yhdessä  $\alpha$ -syklodekstriinin kanssa, saatiin injektoitava kaksoisherkkä hydrogeeli. Magneettisen vaikutuksen seurauksena syntyi hypertermiaa, jolloin hydrogeeli muuttui nesteeksi. Kyseinen hydrogeeli pystyy kuljettamaan kahta erilaista syöpälääkettä, ja kykenee rintasyövän leikkaushoidon jälkeen estämään syövän uusiutumisen täyttäen leikkaushaavan. [6, s. 9]

Lämpötila-pH-kaksoisherkkät ominaisuudet ovat saaneet paljon huomiota hydrogeeleissä lääkkeenantojärjestelminä [13, s. 6]. Eräässä tutkimuksessa syntetisoitiin pH-herkstä polymeeristä ja lämpötilaherkstä polymeeristä injektoitavaa kaksoisherkkää hydrogeeliä. pH-herkkänä polymeerinä käytettiin glykolikitosaania (GC) ja lämpötilaherkkänä käytettiin PEG-poly(propyleeniglykoli)-PEG-polymeeriketjua, jonka molempiin päihin oli sitoutunut bentsaldehydyryhmiä. Tavallisessa fysiologisessa ympäristössä näiden polymeerien liuos geeliytyi, kun polymeerit muodostivat bentsoehappo-imiinisidoksia. Lämpötilan nousu yli LCST:n tai pH:n lasku miedosti happamaan, kuten 6,8-6,5, saivat aikaan nopeamman lääkeaineen vapautumisen hydrogeelistä [11, s. 1843].

Isopropyyliakryyliamidista (NIPAAm) ja itakonihaposta (IA) syntetisoidun poly(NIPAAm-ko-IA) on raportoitu reagoivan pH:n ja lämpötilan muutoksiin. Kun syntetisoituun polymeeriseokseen lisättiin ionisen silloituksen avulla kitosaania, muodostuneen hydrogeelin turpoamiskäyttäminen oli pH-lämpötilariippuvaista, lääkeaineen vapauttaminen oli nopeampaa happamassa (pH=5,5) ympäristössä kuin fysiologisessa (pH=7,4) ympäristössä ja hydrogeeli oli injektoitavaa. [6, s. 9]

### 3 Hydrogeelit rintasyövän tutkimisessa ja hoidoissa

Vuosittaisista syöpätapauksista naisten rintasyöpä on tällä hetkellä maailmanlaajuisesti johtavin. Vuonna 2020 uusia rintasyöpätapauksia raportoitiin lähes 2,3 miljoonaa, mikä vastaa 11,7 % kaikista raportoiduista syöpätapauksista. Yksi neljästä naisten syöpätaudista on rintasyöpä, ja se on yksi kuudesta syöpäkuoleman aiheuttajasta. Esiintyvyydeltään rintasyöpä on ensimmäisellä sijalla 159 maassa 185 maasta, ja kuolemaan johtavista tapauksista ensimmäisenä 110 maassa. Vuonna 2020 rintasyöpä aiheutti yhteensä 685 000 kuolemaa ympäri maailmaa [1, s. 19]. Naisten lisäksi maailman terveysjärjestön WHO:n (World Health Organization) mukaan myös noin 0,5–1 % rintasyövästä esiintyy miehillä [15]. On arvioitu, että uusien rintasyöpädiagnoosien määrä kasvaa yli 40 % ja rintasyöpäkuolleisuus yli 50 % vuoteen 2040 mennessä [2, s. 1].

Rintasyöpätyypit jaetaan kolmeen pääluokkaan perustuen kolmeen eri merkkiaineeseen, joita ovat estrogeenireseptori (ER), progesteronireseptori (PR) ja ihmisen epidermaalinen kasvutekijä 2 (HER2). Rintasyöpätyypit ovat hormonireseptori+ tai HER2-, HER2+ ja kolmoisnegatiivinen, josta ei löydy mitään näistä kolmesta biomarkkerista [6, s. 2]. Eniten tutkittu rintasyöpäsolulinja on MCF-7, jonka solut ovat ER- ja PR-positiivisia ja HER2-negatiivisia [16].

Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä on haasteellisin sen korkeamman uusiutumisen ja alhaisemman eloonjäämisennusteen vuoksi. HER2+ -tyypin rintasyövän tärkein liitännäishoito on kemoterapia, ja sitä käytetään myös hormonireseptori+ -tyypin hoidoissa hormonihoidon kanssa. Lisäksi kolmoisnegatiivisen rintasyövän hoitoihin käytetään kemoterapiaa. Kemoterapia aiheuttaa kuitenkin pitkäaikaisen altistuksen seurauksena muun muassa pahoinvointia, oksentelua, väsymystä, luuytimen vajaatoimintaa ja monien tärkeiden elinten vaurioitumista. Näiden ja monien muiden haitallisten sivuvaikutusten vähentämiseksi on kehitettävä uudenlaisia lääkkeenantojärjestelmiä, ja hydrogeelit ovat herättäneet yhä enemmän kiinnostusta tämän ratkaisemisessa. [6, s. 2]

Uusien syöpälääkkeiden kehittäminen on pitkään perustunut syöpäsolujen tutkimisessa kaksisolotteisiin *in vitro* -soluviljelmiin. Nämä 2D-kasvainmallit eivät kuitenkaan kykene tehokkaasti jäljittelemään fysiologista mikrokasvainympäristöä, minkä vuoksi syöpälääkkeiden kehittäminen niiden avulla on puutteellista. 2D-kasvainmallit eivät pysty esimerkiksi solujen väliseen kommunikaatioon tai solun ja soluväliaineen välisiin vuorovaikutuksiin, jotka

puolestaan ohjaavat syöpäsolujen kasvua ja toimintaa [4, s. 131–132]. 3D-soluviljelmien on puolestaan yhä useampien tutkimusten perusteella havaittu jäljittelevän aitoa kasvainmikroympäristöä. Rintasyöpäkasvaimien 3D-viljemien matrikseina on tutkittu hydrogeelejä, ja ne ovat osoittautuneet lupaaviksi niiden rakenteensa ja koostumuksensa ansiosta [7, s. 768].

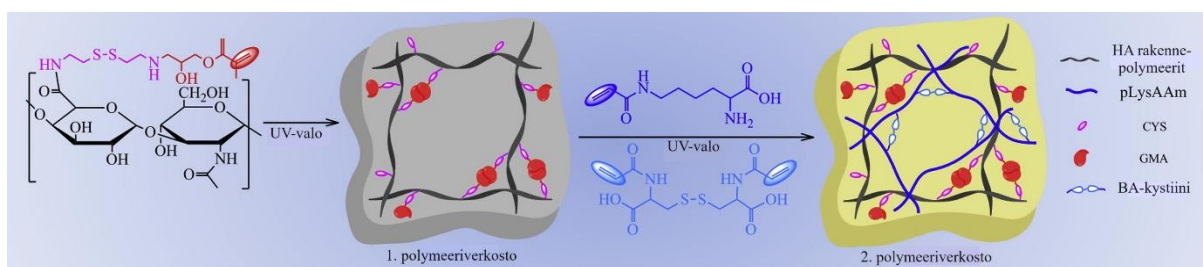
### 3.1 Rintasyöpäkasvaimen jäljitteleminen

Viimeisten vuosikymmenten aikana soluviljelmät ja eläinkudossiirteet ovat olleet suosituimmat tavat tutkia uusia syövän vastaisia strategioita, mutta niillä on rajoitteita [7, s. 768]. Soluviljelmiä on pitkälti tehty 2D-systeemeinä, joissa soluilla on tasomainen morfologia. 2D-soluviljelmät eivät kuitenkaan kykene täysin jäljittelemään kasvainmikroympäristöä, sillä esimerkiksi tasomainen morfologia muuttaa solujen lisääntymistä, invaasiota, migraatiota ja antiapoptoosia [4, s. 131]. 2D-viljelmien solujen mekaaniset ja kemialliset signaalit ovat vähäisiä, minkä vuoksi ne osoittautuvat vähemmän pahalaatuisemmiksi. Eläinkudossiirteet eivät puolestaan kykene täysin jäljittelemään ihmiskasvaimien ominaisuuksia, sillä immuunivasteet ja kasvutekijöiden ilmentyminen ovat lajikohtaisia. Yli 90 % prekliinisillä tutkimuksilla tehokkaiksi todetuista lääkkeistä eivät läpäise kliinisiä tutkimuksia. Eläinkudossiirteillä tehtävät tutkimukset ovat lisäksi kalliita ja pitkäaikaisia. [7, s. 768]

Dynaaminen kasvainmikroympäristö koostuu kasvainsoluista, soluväliaineesta, liposyyteistä, välisoluista ja verisuonista. 3D-soluviljelmissä syöpäsolut ovat usein huokoisessa materiaalissa, mikä mahdollistaa solujen ja solu–soluväliaineen väliset vuorovaikutukset kaikkiin suuntiin sekä solujen migraation. 3D-kasvainmallien on havaittu olevan aggressiivisempia, paremmin resistenttejä lääkaineille sekä lisäävän pro-angiogeenisten kasvutekijöiden muodostumista verrattaessa 2D-malleihin. Lisäksi 3D-viljelmien soluilla on erittäin invasiivinen fenotyyppi, ja ne muodostavat *in vivo* -tyyppisiä fenotyyppisiä ja morfologiaa. [4, s. 132; 7, s. 768]

Weijun Xu ja kollegat syntetisoivat rintasyövän kasvainmikroympäristöä jäljittelevän hydrogeelin poly( $N_\epsilon$ -akryloyyli-L-lysiinistä) (pLysAAM) ja hyaluronihaposta (HA) kolmiulotteista soluviljelmää varten [4]. pLysAAM/HA-hydrogeeli syntetisoitiin kaksivaiheisella valopolymerisaatioprosessilla. Ensimmäisessä vaiheessa HA-polymeeriverkosto syntetisoitiin kystamiini- ja glysidyyli-metakrylaatti-modifoiduista HA (HA-Cys-GMA) -makromolekyyleistä UV-valon avulla. Toisessa vaiheessa LysAAM-polymeerit

liitettiin syntetisoituun HA-verkoston UV-valon avulla, ja BA-kystiiniä käytettiin polymeerien silloittajana, jolloin muodostui pLysAAm-verkosto [4, s. 131, 134] (kuva 8)



Kuva 8. pLysAAm/HA-hydrogeelin kaksivaiheinen synteesi. [4, s. 135]

Valmistetun pLysAAm/HA-hydrogeelin turpoamista, viskoelastisuutta, hajoamista ja HA:n metakrylaatioasteen vaikutuksia morfologiaan tutkittiin. Tutkimuksessa käytettiin ihmisen MCF-7 rintasyöpäsoluja, joiden kasvua ja toimintaa tutkittiin. Standardina vertailua varten käytettiin 2D-soluviljelmää. pLysAAm/HA-hydrogeeli oli rakenteeltaan erittäin huokoista. Havaittiin, että HA:n metakrylaatioaste vaikutti hydrogeelin mekaanisiin ominaisuuksiin sekä turpoamiskäyttäytymiseen ja hajoamiseen. MCF-7 solut kykenivät kiinnittymään, lisääntymään ja erittämään kasvutekijöitä hydrogeelissä, sekä muodostamaan monipuolisia solumorfologioita. 2D-viljelmien soluihin verrattuna hydrogeelissä viljeltyjen solujen migraatio- ja invaasiokyvyt olivat huomattavasti parempia. Tutkimustulosten perusteella voidaan osoittaa, että pLysAAm/HA-hydrogeelissä kasvatetut solut muodostavat paremmin aitoa rintasyöpäkasvainta jäljittelevän mikroympäristön. [4, s. 131–132]

Guanghai Hou ja kollegat valmistivat hydroksietyylikitosaani (HECS) -hydrogeelin HECS:stä ja dialdehydi-hyaluronihaposta (AHA) [7]. Hydrogeelin kykyä jäljitellä rintasyöpäkasvaimen soluväliainetta arvioitiin. Synteesi tehtiin Schiffin emäsreaktion kautta, ja AHA toimi hydrogeelissä silloittajana. Schiffin emäsreaktio mahdollisti HECS:n pH-herkkyyden. Myös tässä tutkimuksessa käytettiin MCF-7 rintasyöpäsoluja, joiden viabiliteettia, lisääntymistä, kasvutekijöiden ilmentymistä, migraatiota ja klusteroitumista tutkittiin. HECS-hydrogeeli oli rakenteeltaan erittäin huokoista ja vastasi jäykkyydeltään rintakudosta. Lisäksi havaittiin, että AHA-silloittajien määrä vaikutti turpoamiskäyttäytymiseen merkittävästi, ja hydrogeeli absorboi vettä nopeasti. Alustavissa *In vitro* -tutkimuksissa havaittiin, että MCF-7 solut olivat taipuvaisia kasvamaan sferoideiksi, ja hydrogeeli edisti solujen kiinnittymistä ja kasvamista. 2D-soluviljelmiin verrattuna HECS-hydrogeelissä kasvatetut solut vastasivat morfologialtaan enemmän kasvaimia, ja kasvutekijöiden ilmentyminen ja migraatiokyky olivat lisääntyneitä.

Hydrogeeli vahvisti solujen pahanlaatuista fenotyyppiä, minkä vuoksi HECS:iä voidaan pitää lupaavana rintasyöpäteknikassa ja syöpälääkekehityksessä. [7, s. 768–769, 774]

Rafael Schmid tiimensä kanssa tutki ja vertaili rintasyöpäsolulinjoilla MDA-MB-231 ja MCF-7 3D-biotulostusta varten kolmea hydrogeeliä, joiden biologiset ja mekaaniset ominaisuudet olivat erilaisia [17]. Tutkimuksissa käytettiin hydrogeeleinä alginaattia, gelatiinilla silloitettua alginaattidialdehydiä (ADA-GEL) ja tiolimodifioitua HA:ta (polyetyleeniglykoli-diakrylaatilla (PEGDA) silloitettu HA-SH). Hydrogeelien vaikutuksia syöpäsolujen kasvuun, metaboliseen aktiivisuuteen ja solujen selviämiseen tutkittiin. Tutkimus osoitti, että eri solulinjoilla on erilaisia ominaisuuksia, ja optimaalisen *in vivo* -ympäristön jäljittelevyyden saavuttamiseksi hydrogeeli on valittava huolellisesti solulinjan vaatimusten tai tutkimuskysymyksen mukaan. [17, s. 1–3, 16–18]

### 3.2 Rintasyövän hoito

Perinteisesti rintasyövän hoitoon käytettävä kemoterapia ei ole riittävän tehokasta, sillä se kohdistuu koko elimistöön. Systeminen kemoterapia aiheuttaa vaurioita terveisiin kudoksiin, heikentää lääkkeiden tehokkuutta ja lisää haitallisia sivuvaikutuksia, kuten pahoinvointia, väsymystä ja oksentelua [6, s. 1]. Lisäksi syöpäsolujen apoptoosiproteiinien inhibiittoreiden lisääntynyt erittyminen voi aiheuttaa kemoterapia- ja sädehoitoresistenssiä [3, s. 145]. Injektoitavat *in situ* -geelityvät hydrogeelit ovat herättäneet paljon kiinnostusta vaihtoehtoisena lääkkeenantojärjestelmänä, sillä paikallisesti kohdennettu ja kontrolloitu lääkehoito parantaa lääkkeiden tehokkuutta ja vähentää sivuvaikutuksia. [6, s. 1]

#### 3.2.1 Lämpöaktivoitu geelityminen

LCST-lämpötilaherkkien hydrogeelien polymeerien väliset vuorovaikutukset lisääntyvät ja veden sitominen vähentyy LCST:n yläpuolella, jolloin tapahtuu geelityminen. Monet tutkimusryhmät ovat muodostaneet lämpötilaherkkien hydrogeelien hybridirakenteita, joiden tarkoituksena on toimia yhdistelmähoitona. Syöpälääkkeet liitetään nanopartikkeleihin, jotka yhdistetään lämpötilaherkkiin polymeereihin. Tällainen lämpötilaherkkä hydrogeeli valmistettiin oksas-kopolymeroimalla kitosaania ja HA:ta PNIPAAm:iin. Foolihappoon konjugoituneisiin grafeenioksidi (GO) -hiukkasiin lisättiin syöpälääkeainetta, jotka kapseloitiin valmistettuun lämpötilaherkkään hydrogeeliin. Muodostetun hydrogeelin liuos-geelisiirtymälämpötila oli noin 31 °C. Havaittiin, että lääkeaineet vapautuivat GO-hiukkasista

hitaammin. Lisäksi hydrogeelin havaittiin estävän rintasyöpäkasvaimen kasvua MCF-7 soluilla tehdyissä *in vivo* -tutkimuksissa. [6, s. 4–5]

Dan Zhao ja kollegat kehittivät rintasyövän hoitoon tarkoitetun uudenlaisen geeninkantajan lämpötilaherkästä hydrogeelistä [3]. Negatiivisesti varautuneen surviiniin antisense-oligonukleotidin (Sur-ASON) ja positiivisesti varautuneen poly[(R)-3-hydroksibutyraatti]-PDMAEMA:n eli PHB-b-PDMAEMA:n (PHB-P) väliset sähköstaattiset vuorovaikutukset muodostivat kopolymeerin, joka yhdistettiin lämpötilaherkkään Pluronic® F127 (PF127) -hydrogeeliin. PF127 kuuluu poly(etyleenioksidi)-poly(propyleenioksidi)-poly(etyleenioksidi) (PEO-PPO-PEO) -blokkipolymeeriperheeseen. Valmistettu Sur-ASON/PHB-P/PF127-hydrogeeli geeliytyi injektion jälkeen, ja kykeni vapauttamaan yhtämittaisesti geeniä enimmillään jopa 16 päivän ajan. Pitkäaikainen vapauttaminen paransi Sur-ASON:n vaikutusta, ja lisäksi havaittiin, että hydrogeeli kykeni merkittävästi estämään lääkeresistentin kasvaimen kasvua. Tutkimusten perusteella voitiin todeta, että kyseinen hydrogeeli on lupaava, edullinen ja käytännöllinen vaihtoehto syöpähoidoissa, jonka pitkäaikaisen geeninvapauttamisen ansioista myös injektointitiheys on minimaalinen. [3, s. 145–146, 151–152]

### 3.2.2 pH-riippuvainen lääkkeen vapauttaminen

pH on merkittävä tekijä lääkkeen vapauttamisessa rintasyöpähoitoihin käytettävissä injektoitavissa hydrogeeleissä. Syöpäkasvaimen ympäristö on hapan johtuen solujen epänormaalista glukoosimetaboliasta, minkä takia emäksiset polymeerit lääkkeiden kuljetuksessa ja säännöstelyssä ovat osoittautuneet paremmiksi syöpähoidoissa. GC/PF127-hydrogeeli valmistettiin glykolikitosaanin aminoryhmän ja karboksyloidun PF127 karboksyyli ryhmän muodostamien sidosten perusteella, jolloin muodostui GC/PF127-misellejä. Lääkeaineet integroituivat miselleihin, joista valmistettiin  $\alpha$ -syklodekstriinin avulla injektoitava hydrogeeli. *In vitro* -tutkimukset osoittivat, että lääkeaineiden vapauttaminen oli lisääntynyttä happamammassa ympäristössä. [6, s. 6–7]

Kitosaani- ja alginaattipohjainen hydrogeeli valmistettiin ensin konjugoimalla lääkeaineet sukkinoituun kitosaaniin, jonka jälkeen hapetettua alginaattia käytettiin silloittajana. pH-herkkä hydrogeeli muodostui sukkinoidun kitosaanin amiiniryhmien ja hapetetun alginaatin aldehydiryhmien välisten reaktioiden seurauksena. MCF-7 solujen *in vitro* -tutkimuksissa hydrogeelin havaittiin estävän tehokkaasti solujen kasvua. Lisäksi hydrogeeli esti tehokkaasti myös MDA-MB-231 solujen kasvua kudossiirteissä hiirissä. Hydrogeelin havaittiin lisäävän lääkkeen vapautumisnopeutta 5 %:sta 7,4 pH:ssa 65 %:iin, kun pH laski arvoon 5. [11, s. 1841]

### 3.2.3 Valoherkät hydrogeelit ja fototerminen terapia

Integroidut yhdistelmäominaisuudet valoherkissä hydrogeeleissä ovat herättäneet suurta kiinnostusta terapeuttisen tehokkuuden parantamiseksi ja syöpäsolujen tuhoamiseksi. Fototerminen terapiaan kanssa voidaan yhdistää esimerkiksi immunoterapiaa, kemoterapiaa tai fotodynaamista terapiaa. Kitosaaniagaroosi-hydrogeeli valmistettiin fototerminen ja kemoterapian yhdistelmäksi MCF-7 soluja vastaan. NIR-reagoivina vaikuttajina hydrogeelissä käytettiin GO:ta ja pelkistettyä GO:ta, ja kemoterapeuttisina vaikuttajina kahta eri lääkeainetta. Hydrogeelin yhdistelmäominaisuuksien ansiosta syöpäsolujen viabiliteetti laski 34 %:iin, joka oli paljon alhaisempi, kuin ilman NIR-reagoivuutta saatu arvo. [6, s. 8]

Huijuan Zhang ja kollegat valmistivat valopolymerisaation avulla uudenlaisen valoherkän hydrogeelin, jossa yhdistyi fotodynaaminen ja fototerminen terapia sekä kemoterapia [18]. PEGDA:a käytettiin hydrogeelissä polymeerimatriksina. Valoherkkinä ja fototerminä aineina käytettiin titaanioksidista ja moniseinäisistä hiilinanoputkista ( $\text{TiO}_2$ @MWCNT) koostuvia nanopartikkeleita. Titaanioksidipartikkelit ovat erittäin fotoaktiivisia, mutta niillä on taipumus absorboida vain UV-valoa, joka on elimistölle haitallista. Ne eivät myöskään kykene selektiivisesti kertymään kasvainympäristöön, minkä vuoksi ne eivät ole tarpeeksi tehokkaita. MWCNT:n avulla voidaan parantaa titaanioksidin NIR-absorptiota, sillä muodostuvat C–O–Ti-sidokset kykenevät tehostamaan pitkän aallonpituuden absorptiota. [18, s. 1–3]

PEGDA:sta, syöpälääkeaineista ja  $\text{TiO}_2$ @MWCNT:sta koostuva liuos geeliytyi nopeasti *in vivo* NIR-aktivaation avulla injektoinnin jälkeen. Hydrogeelin havaittiin kykenevän yhtämittaiseen lääkkeen vapauttamiseen yli kymmenen päivän ajan. Lisäksi NIR-laservalolla, jonka aallonpituus oli 808 nanometriä, saatiin aikaan  $\text{TiO}_2$ @MWCNT:n aiheuttama paikallinen hypertermia. NIR sai aikaan myös hapen reaktiivisia muotoja, jotka yhdessä hypertermian ja lääkeaineiden kanssa samanaikaisesti aiheuttivat syöpäsolujen tuhoutumista. MCF-7 solujen *in vitro* -tutkimuksissa hydrogeelin havaittiin vaikuttavan merkittävästi solujen kasvuun. Voidaan uskoa, että yksi annos hydrogeeliä kykenee kuljettamaan suuren määrän lääkeaineita, toimii pitkäaikaisesti lääkkeiden vapauttajana ja pystyy hyödyntämään jatkuvaa valohoitoa. Lisäksi hydrogeelin valmistusprosessi on yksinkertainen ja se on edullista. [18, s. 1–3, 15]

### 3.2.4 Kaksoisreaktiivisuuden sovelluksia

Xiali Zhu tiimeineen kehitti injektoitavan lämpömagneetti-kaksoisherkän hydrogeelin, joka syntetisoitiin kitosaanista ja lämpötilaherkästä  $\beta$ -glyserofosfaatista [19]. Magneettiherkkinä

osina käytettiin super-paramagneettisia GO-partikkeleita, jotka liitettiin PEI-polymeereihin stabiilisuuden varmistamiseksi fysiologisissa liuoksissa. Lämpötilan muutoksen seurauksena tapahtui liuos–geeli-välisen siirtymän muutos, ja magneettikentän avulla saatiin aikaan paikallinen hypertermia. MCF-7 solujen *in vitro* -tutkimuksissa havaittiin PEI-modifioituihin GO-partikkeleihin lisättyjen lääkeaineiden läpäisevän solukalvoja tehokkaammin, mikä puolestaan aiheutti enemmän apoptoosia verrattuna vapaaseen lääkeaineeseen. *In vivo* -tutkimuksissa havaittiin, että hydrogeeli pystyi selektiivisesti tuhoamaan syöpäsoluja, ja vähentämään lääkeaineiden sivuvaikutuksia normaalissa kudoksessa. [19, s. 1–2, 12]

Samiullah Khan ja kollegat valmistivat lämpötilaherkästä PNIPAAm-polymeeristä ja pH-herkää karboksimeetylikitosaanista (CMCS) kaksoisherkän hydrogeelin [20]. Karboksimeetylikitosaanin on amfoteerinen polyelektrolyytti, joka sisältää aminoryhmiä ja karboksyyli-ryhmiä. Geelitysmisilämpötilan ja -ajan havaittiin olevan riippuvaisia kummankin komponentin konsentraatioista [20, s. 1–2, 8]. CMCS:n havaittiin vaikuttavan turpoamiskäyttäytymiseen happamassa (pH=2,1) ja neutraalimassa (pH=7,4) liuoksessa. Turpoaminen oli merkittävämpää happamassa liuoksessa johtuen aminoryhmien lisääntyneestä protonien vastaanottamisesta, mikä puolestaan aiheutti varausten keskinäistä hylkimistä ja siten polymeeriverkoston venymistä. Toisaalta turpoaminen neutraalimassa liuoksessa esitettiin johtuvan CMCS:n karboksyyli-ryhmistä. [20, s. 12]

Injektoitavan ja *in situ* -geelityvän poly(CMCS-g-NIPAAm) -hydrogeelin todettiin *in vitro* -tutkimuksissa vapauttavan lääkeaineita eniten happamassa liuoksessa alle LCST:n. Korkein turpoamisaste saavutettiin 25 °C asteessa, kun pH oli 2,1. Hydrogeelin bioyhteensopivuutta ja sytotoksisuutta tutkittiin MCF-7 syöpäsoluilla, ja verrattiin vapaaseen lääkeluokseen. Hydrogeeliin kapseloitujen lääkeaineiden havaittiin kykenevän hallitusti tuhoamaan soluja, mikä vahvistaa hydrogeelin sytotoksisen potentiaalin verrattuna vapaaseen lääkeluokseen. Tutkimuksien perusteella voitiin todeta, että valmistettu pH-lämpötilaherkä hydrogeeli toimii potentiaalisena lääkkeenantojärjestelmänä kasvaimen sisäisessä lääkehoidossa. [20, s. 1, 15]

### 3.3 Kasvaimen uusiutumisen estäminen

Leikkaushoidon jälkeinen rintasyövän uusiutuminen voi olla kohtalokasta, ja tehokas uusiutumisen esto on edelleen kliininen haaste. Jo varhainen paikallisen syöpäkasvaimen uusiutumisen estäminen on erittäin tärkeää [21, s. 1]. Suurimmassa osassa varhaisen vaiheen rintasyöpätapauksia leikkaushoito on suositeltavin hoitomuoto, jolloin mahdollisimman suuri osa kasvainkudosta pyritään poistamaan. Kaikkien pahanlaatuisten kasvainsolujen ja



perifeerisesti soluttautuneiden osien poistaminen tavallisella leikkaushoidolla on kuitenkin melko mahdotonta. Kasvaimen uusiutumisen riski on edelleen suuri, sillä leikkaushoidon jälkeen kymmenen vuoden aikana 4–18 % I ja II vaiheen rintasyövästä uusiutuu. Etenkin tapauksissa, joissa rintakudosta säästetään, uusiutumisen riski on korkea. [5]

Yleinen primaarikasvaimen kirurgisen poistamisen jälkeinen hoito koostuu koko elimistöön kohdistuvasta sisäisestä lääkehoidosta ja rinnan paikallisesta sädehoidosta. Koko elimistöön kohdistuvalla lääkeannostelulla on paljon sivuvaikutuksia eikä se ole tehokasta, ja paikallisen sädehoidon aiheuttamat säteilyvauriot ympäröivään normaaliin kudokseen rajoittavat sädehoidon hyödyntämistä. Paikallisella lääkehoidolla, kuten injektoitavilla lääkkeenantojärjestelmillä, on havaittu suurta potentiaalia leikkaushoidosta jäljelle jäävien syöpäsolujen hoitamisessa [5]. Vähäisten sivuvaikutustensa ja toksisuutensa ansiosta hydrogeelit ovat tällä hetkellä parhaita ehdokkaita paikalliseen ja kontrolloituun lääkkeenantoon [21, s. 1].

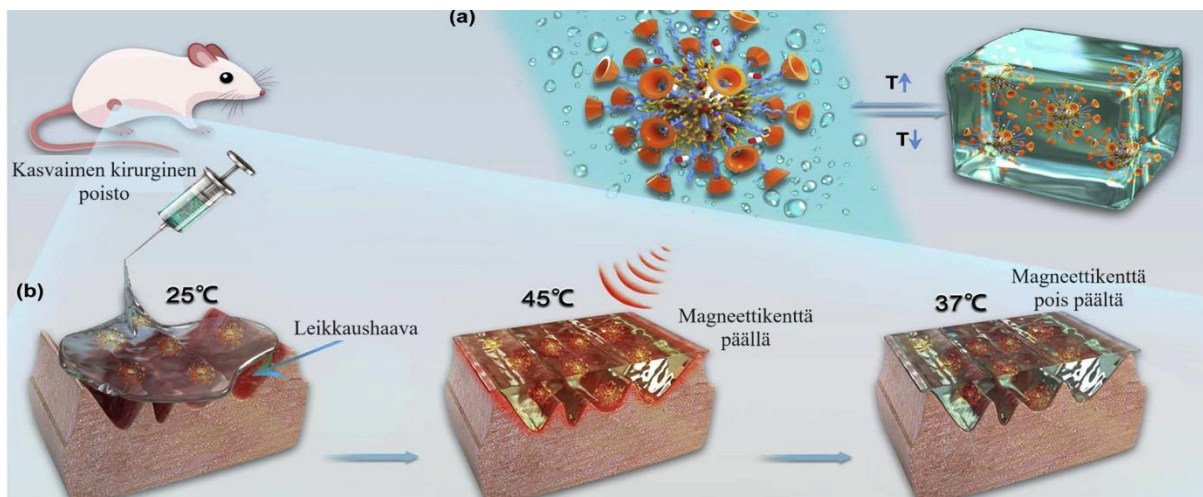
Ying Qu ja kollegat valmistivat paikallisen rintasyövän uusiutumisen estämiseksi lämpötilaherkän yhdistelmähydrogeelin, jossa yhdistyi lääkehoito ja fototerminen terapia [21]. Lämpötilaherkkiin NIPAAm-polymeereihin integroitiin NIR-reagoivia kultananosauvoja (engl. gold nanorods, GNRs), joiden liittämiseen kopolymeereinä käytettiin glysidyylietakryloituja kito-oligosakkarideja (COS-GMA) ja akryyliamidia. GNR:t toimivat fototermisesti, ja ne kykenevät estämään syövän kasvua. Lisäksi metoksyyli-poly(etyleeniglykoli)-poly( $\epsilon$ -kaprolaktoni)-akryloyylikloridia (PECA) käytettiin väliaineena polymeeriverkostossa. NIR-aktivaation seurauksena GNR:t toimivat fototermisesti, mikä puolestaan saa aikaan lämpötilaherkän hydrogeelin kutistumisen ja siten lääkeaineiden vapauttamisen. [21, s. 1–3]

Leikkauksen jälkeistä paikallisen uusiutumisen estämistä tutkittiin *in vivo* 4T1 rintasyöpäsoluilla. Hydrogeelin tehokkuutta tutkittiin lääkeaineiden kanssa ja ilman sekä NIR-säteilyn kanssa ja ilman. NIR-aktivoitu hydrogeeli, johon oli lisätty lääkeaineita, osoittautui tehokkaimmaksi, kun kasvaimen uusiutuminen laski 16,7 %:iin. Tutkimuksen avulla voitiin osoittaa NIR-reagoivan lämpötilaherkän hydrogeelin olevan potentiaalinen leikkaushoidon jälkeisen rintasyövän uusiutumisen hoitamisessa. [21, s. 1]

Riwang Li ja hänen tiiminsä valmistivat injektoitavan pH-herkän hydrogeelin syöpäsolujen hoitamiseksi ja myöhemmin kudoksen uudelleenrakentamiseksi leikkaushoidon jälkeen [22]. Hydrogeeli valmistettiin tioloidusta kitosaanista, johon lisättiin tioloituja halloysiitti

nanoputkia (engl. halloysite nanotubes, HNTs) mekaanisen lujuuden ja pidennetyn lääkeainevapauttamisen lisäämiseksi. Lääkeaineet lisättiin HNTs:iin, jotka silloittuivat tioloidun kitosaanin kanssa muodostaen hydrogeelin. Valmistettu halloysiitti-g-kitosaani hydrogeeli oli lisäksi lämpötilaherkkä, sillä huoneenlämmössä se oli nestemäistä, mutta geeliytyi muutamassa minuutissa fysiologisessa lämpötilassa 37 °C asteessa. *In vitro* -tutkimuksissa havaittiin, että lääkeaineen vapauttaminen oli nopeampaa happamassa kasvainmikroympäristössä, kuin normaalissa fysiologisessa pH:ssa, ja hydrogeeli kykeni tehokkaasti estämään MCF-7 solujen kasvua. *In vivo* -tutkimuksien perusteella voitiin todeta, että hydrogeeli kykeni estämään kasvaimen uusiutumista, parantamaan selviytymisastetta ja korjaamaan haavakudosta. [22, s. 1, 9, 13]

Haoan Wu ja kollegat valmistivat magneettisen supramolekulaarisen hydrogeelin lääkeaineiden ja lämpöterapeuttisten aineiden kuljettamiseksi [5]. Hydrogeeli syntetisoitiin PEG:iin liitetyistä rautaoksidi-nanopartikkeleista ja  $\alpha$ -syklodekstriinistä, jonka tuloksena saatiin kontrolloitava reversiibelisti lämpötilaherkkä geeli-liuos-välinen muutos (kuva 9a). Kun hydrogeeli injektoidiin leikkaushaavaan ja se altistettiin vaihtomagneettikentälle, hydrogeelissä tapahtui magnetokalorinen geeli-liuos-siirtymä (kuva 9b). Magneettisesti aiheutettu lämpö sai aikaan lääkeaineiden vapautumista ja hypertermiaa, joka aiheutti soluvaurioita. Geeli kykeni täyttämään epäsäännöllisen haava-alueen täydellisesti ja se oli joustava haavassa. [5]



Kuva 9. a) Lämpöaktivoitu geeliytyminen. b) Magnetokalorinen geeli-liuos-siirtymä ja hypertermia. [5]

## 4 Hydrogeelien haasteet ja tulevaisuus rintasyöpähoidoissa

Tämänhetkinen hydrogeelien tutkimus ja tulevaisuudennäkymät ovat osoittaneet haasteita, jotka rajoittavat hydrogeelien soveltamista, kestävyyttä ja kliinistä käyttöä [23, s. 36]. Yksi merkittävimmistä haasteista on hydrogeelien bioyhteensopivuus [6, s. 10] ja polymeerien tai muiden komponenttien hajoamattomuus elimistössä [8, s. 764]. Moniin haasteisiin on kuitenkin esitetty erilaisia lähestymistapoja ja ratkaisumahdollisuuksia, kuten hydrogeelin rakenteen muokkaaminen biohajoamista edistävillä partikkeleilla.

Hydrogeelien tutkiminen lääketieteellisissä sovelluksissa ja rintasyöpähoidoissa on vielä kesken. Kuitenkin nykyinen hydrogeelien tutkimus on jo osoittanut niiden potentiaalisuuden esimerkiksi kudostekniikassa ja syöpähoidoissa [23, s. 40]. Tavoitteena onkin tällä hetkellä ja tulevaisuudessa tutkia ratkaisuja haasteisiin ja löytää uusia lähestymistapoja [9, s. 27].

### 4.1 Hydrogeelien haasteet

Lääkkeenantojärjestelminä ja kudostekniikassa käytettävien hydrogeelien on usein suunniteltu pysyvän ja toimivan elimistössä pitkään. Tällöin on otettava huomioon kaikkien hydrogeelin komponenttien pitkäaikainen bioyhteensopivuus ja biohajoavuus, jotka voivat nostaa esiin toksikologisia haasteita [24, s. 4]. Esimerkiksi hydrogeelien synteeseissä käytettävät monomeerit tai silloittajat eivät välttämättä ole bioyhteensopivia, vaan ne voivat olla myrkyllisiä, karsinogeenisiä tai teratogeenisiä [8, s. 764].

Erytisesti synteettisten pH-herkkien hydrogeelien yksi merkittävin haaste on niissä käytettävien polymeerien biologinen hajoamattomuus. Polymeerit, jotka eivät ole biohajoavia elimistössä, täytyy poistaa käytön jälkeen. Tämä rajoittaa pH-herkkien hydrogeelien käyttömahdollisuuksia. Yksi suora ratkaisu synteettisten pH-herkkien polymeerien biohajoamattomuuteen on luonnollisten polymeerien, kuten polysakkaridien käyttö. Esimerkiksi kitosaani on tällainen luonnollinen pH-herkkä polymeeri. [8, s. 764; 10, s. 14–15]

Myös monien luonnollisten [23, s. 36] ja synteettisten lämpötilaherkkien polymeerien, kuten PNIPAAm:in, haasteena on biohajoamattomuus. Hajoamattomia polymeerejä voi kertyä elimistöön, mikä voi aiheuttaa tulehdusreaktion. Tämä rajoittaa kyseisten hydrogeelien moninkertaista käyttöä. PNIPAAm-pohjaisten hydrogeelien biohajoamattomuutta on pyritty ratkaisemaan erilaisten tekniikoiden avulla. Ensisijainen tekniikka on PNIPAAm-ketjujen kopolymerointi silloittajien kanssa, minkä perusteella saadaan aikaan polymeerien

hydrolyyttinen hajoaminen. Esimerkiksi dimetyyliakrylaatti-silloittajia, jotka sisältävät hydrolysoituvia osia, kuten polykaprolaktonia, käytetään biologisesti hajoavissa lämpötilaherkissä hydrogeeleissä. [10, s. 4]

Hydrogeelit koostuvat hydrofiilisistä polymeereistä [9, s. 1]. Kuitenkin noin 40 %:lla markkinoilla olevista lääkkeistä ja noin 90 %:lla kehityksessä olevista terapeuttisista aineista on heikko vesiliukoisuus. Hydrofobisilla lääkkeillä on yleensä pieni biologinen hyötyosuus ja hidas liukenemisnopeus, minkä vuoksi ne voivat edellyttää suurempia annostelumääriä paikallisesti. Hydrofobisten lääkkeiden liukoisuutta on pyritty parantamaan lisäämällä hydrogeelin rakenteeseen hydrofobisia osia tai molekyyliä, kuten syklodesktriinejä, jotka kykenevät muodostamaan inkluusiokomplekseja. Lisäksi lääkeaineiden kapselointia nanopartikkeleihin ja niiden kompleksien lisäämistä hydrogeeliin on tutkittu. [24, s. 4]

Etenkin injektoitavien hydrogeelien suunnittelussa immunologinen yhteensopivuus on tärkeä biologinen parametri. *In situ* -geelitymisen aikana on minimoitava kaikenlaiset mahdolliset immuunivasteet, joita hydrogeeli voi aiheuttaa elimistössä. Mahdollisia immunologisia reaktioita ovat esimerkiksi yliherkkyysoireet, fibroosi ja tulehduskaskadit. Immunologiseen reaktioon voi liittyä myös hydrogeelin fysikaalis-kemiallisia muutoksia tai reagointia esimerkiksi paikalliseen lämpötilaan tai pH:n muutokseen. Nämä voivat puolestaan vaikuttaa hydrogeelimateriaalin suorituskykyyn, toimintaan ja sovelluksiin. [23, s. 39]

Monien hydrogeelien biolääketieteellinen sovellettavuus on osittain rajoitettua, sillä niiden mekaaninen lujuus on heikkoa [6, s. 13]. Heikko mekaaninen lujuus voi joissakin tapauksissa aiheuttaa esimerkiksi lääkeainemolekyylien huuhtoutumisen [8, s. 764]. Mekaanista lujuutta on kuitenkin pyritty parantamaan lisäämällä hydrogeelin rakenteeseen erilaisia lujittavia partikkeleita, kuten esimerkiksi tutkielmassa aiemmin käsitellyjä HNTs-partikkeleita [22, s. 1]. Hydrogeeli joutuu elimistössä jatkuvan kuormituksen kohteeksi, minkä vuoksi myös geelin mekaaninen kestävyys on myös otettava huomioon. Matalan viskositeetin ja riittävän joustavuuden ylläpitäminen ovat toistaiseksi suuria suunnitteluhaasteita [23, s. 38].

Hydrogeelien kliininen käyttöönotto on haasteellista, sillä kliinistä käyttöönottoa rajoittaa esimerkiksi tarkasti määritellyt ja valvotut sääntelyohjeet, hyvät tuotantokäytännöt ja teknologiset haasteet kuten hydrogeelien kemia. Hydrogeelien valmistusjärjestelmien kehitys ja laboratoriovalmistamisesta kliiniseen valmistamiseen on arvioitu kustantavan vaihtelevasti 50 miljoonasta Yhdysvaltain dollariin jopa 800 miljoonaan Yhdysvaltain dollariin. [23, s. 39]

Eräänä haasteena voidaan pitää myös hydrogeelien monimuotoisuutta ja niiden lainsäädännöllistä hyväksymistä. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston FDA:n (U.S. Food and Drug Administration) hyväksyntäprosessi uusille hydrogeeleille kestää vuosia, ennen kuin hydrogeeli päätyy laboratoriosta markkinoille. Etenkin injektoitavissa hydrogeeleissä käytettävien monien erilaisten silloittajien ja biomateriaalien lainsäädännöllinen luokittelu ja hyväksyminen on haastavaa. [23, s. 40]

## 4.2 Hydrogeelien tulevaisuuden näkymät

Kuten haasteiden perusteella havainnollistettua, hydrogeelien lääketieteellinen sovellettavuus vaatii yhä paljon laajaa tutkimusta, eikä kaikkiin hydrogeelien rajoituksiin ole vielä selkeitä ratkaisuja. Voidaan kuitenkin uskoa, että hydrogeelien innovatiiviset näkymät mahdollistavat etenkin kudostekniikan, lääkkeiden tai muiden terapeuttisten aineiden kuljettamisen ja annostelun sekä syöpähoitojen mullistuksia. Lisäksi haasteiden ja rajoitusten havaitseminen mahdollistaa entistäkin tehokkaampien ja kekseliäämpien sovelluksien kehittämisen. [23, s. 40]

Tavoitteena tämänhetkissä ja tulevaisuuden tutkimuksissa on edistää alaa löytämällä ratkaisuja nykyisiin haasteisiin ja tarkastelemalla innovatiivisia lähestymistapoja. Tulevaisuudessa todennäköisesti tutkimusten keskiössä ovat biohajoavuus ja kestävyys, bioaktiivisuus, kohdennettu lääkekuljetus, yhdistelmäterapiat, 3D-tulostus ja muut edistyneet lääkkeen vapauttamisstrategiat. [9, s. 27–28]

Hydrogeelien tutkimuksessa ja kehittämisessä rintasyöpähoitoihin keskitytään tällä hetkellä kolmeen pääpainopisteeseen. Näitä ovat kaksoisreagoivuuden kehittäminen yhdistelemällä kahta tai useampaa polymeeriä, hybridirakenteiden kehittäminen erilaisten nanopartikkeleiden tai molekyylien avulla ja syöpähoitojen tehostaminen useiden syöpähoitomenetelmien yhdistelemisellä. Useiden syöpähoitomenetelmien integrointi voi tarkoittaa esimerkiksi kemoterapian, fototermisen ja fotodynaamisen hoidon sekä immunoterapian yhdistämistä yhteen hydrogeeliin. [6, s. 13]

Hydrogeelien kehittäminen vaatii monialaista yhteistyötä, jotta materiaalien kehittäminen, hydrogeelien biologinen arvioiminen ja mallintaminen sekä kliiniset kokeet voidaan toteuttaa optimaalisesti. Osaaminen ja tietämys materiaaleista, farmakologiasta ja -kinetiikasta sekä fysiologiasta ovat välttämättömiä hydrogeelien lääketieteellisessä ja rintasyöpähoitoihin liittyvässä tutkimuksessa. [6, s. 13]

## 5 Yhteenveto ja pohdintaa

Rintasyöpä maailmanlaajuisesti yleisin syöpä jopa 2,3 miljoonalla tapauksella (vuonna 2020), ja kuolemaan johtavia tapauksia oli vuonna 2020 685 000. Lisäksi rintasyövän uusiutumisen riski on korkea. Perinteisesti käytetyt hoitomuodot, kuten kemoterapia ja sädehoito, eivät ole riittävän tehokkaita ja niillä on paljon haitallisia sivuvaikutuksia. Kemoterapiassa koko elimistöön kohdistuva sisäinen lääkehoito pitkäaikaisena hoitomuotona aiheuttaa muun muassa väsymystä, pahoinvointia, oksentelua ja elinvaurioita. Sädehoidon käyttö on rajoitettua, sillä se aiheuttaa säteilyvaurioita myös ympäröivään terveeseen kudokseen. Lisäksi syöpäsolut saattavat kehittää kemoterapia- tai sädehoitoresistenssiä. Hydrogeelit ovat vaihtoehtoinen hoitomuoto perinteisille hoidoille, sillä ne mahdollistavat paikallisen ja kontrolloidun lääkehoidon pitkäaikaisesti.

Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia polymeeriverkostoja, jotka kykenevät sitomaan runsaasti vettä tai muita biologisia nesteitä itseensä. Polymeeriverkoston sitoessa vettä itseensä se turpoaa, jolloin muodostuu geelimäinen rakenne. Lääkeaineiden säännöstelty vapauttaminen perustuu hydrogeelin kykyyn kontrolloida turpoamista. Hydrogeelin rakenteita voidaan muokata laaja-alaisesti halutun käyttökohteen mukaan. Rakenteita muokkaamalla voidaan määrittää hydrogeeli reagoimaan tiettyyn tai tiettyihin ärsykkeisiin, joita voivat olla fysikaaliset, kemialliset tai biologiset ärsykkeet.

Lämpötilaherkät hydrogeelit ovat tällä hetkellä yksi sovelletuimmista hydrogeelityypeistä. Lämpötilaherkän hydrogeelin turpoamiskäyttäytyminen perustuu lämpötilan muutokseen. LCST-hydrogeeli on turvonnut alle LCST:n, ja kun lämpötila saavuttaa LCST:n, vedensitomiskyky heikentyy, jolloin geeli kutistuu. Nämä ovat eniten tutkittu ja sovellettu lämpötilaan reagoiva hydrogeelityyppi. UCST-hydrogeeli puolestaan on kutistunut alle UCST:n, ja turpoaa vasta, kun lämpötila saavuttaa UCST:n. Reversiibelisti lämpötilaherkässä hydrogeelissä tapahtuu tilavuusfaasitransitio lämpötilan muutoksen seurauksena. Lämpötilaherkkien hydrogeelien geelilytyminen ja tilavuusfaasitransitio voi olla palautuva tai palautumaton.

pH-herkät hydrogeelit reagoivat pH:n muutokseen. Hydrogeelin polymeeriketjut sisältävät kevyesti ionisoituvia happo- tai emäsryhmiä. Ympäristön pH:n muutoksen seurauksena hydrogeelin happo- tai emäsryhmät ionisoituvat, jolloin muodostuu polyelektrolyyttejä. Samanmerkkisesti varautuneet polyelektrolyytit hylkivät toisiaan, jolloin hydrogeelin

polymeeriverkosto venyy. Venyminen antaa tilaa vesimolekyyleille verkostossa, jolloin geeli turpoaa.

Valoherkissä hydrogeeleissä tapahtuu fysikaalisia ja kemiallisia muutoksia valon altistuksen seurauksena. Hydrogeelin rakenteessa on komponentteja tai fotoaktiivisia molekyylejä, jotka reagoivat valon säteilyyn tietyllä aallonpituudella. Valoherkkien hydrogeelien toimintaan voi liittyä lämmön tuottamista, jolloin kyseessä on fototerminen reaktio. Fototermissyyttä voidaan hyödyntää lämpötilaherkkien polymeerien aktivointiin tai paikallisen hypertermian aiheuttamiseen.

Kaksoishervät hydrogeelit reagoivat kahteen ärsykkeeseen. Kaksoisherkkien hydrogeelien ominaisuuksien, kuten hajoamisnopeuden ja bioyhteensopivuuden hienosäätäminen on mahdollista. Useimmat fysiologiset ympäristöt sisältävät monia erilaisia ärsykeitä, minkä vuoksi kaksoisreagoivat hydrogeelit ovat herättäneet paljon mielenkiintoa.

Monenlaisia hydrogeelejä on tutkittu mahdollisina lääkkeenantojärjestelminä rintasyöpähoitoja varten. Lisäksi niitä on tutkittu 3D-soluviljelmien matrikseina uusien syövänvastaisten strategioiden, kuten uusien lääkkeiden tutkimiseen. Tutkielmassa käsitellyt rintasyöpähoitojen osalta tutkitut hydrogeelit, hydrogeelin reagoivuus sekä sovelluskohde ja tutkimustulosten nostot on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Käsitellyt hydrogeelit, niiden reagoivuus, sovellus ja tutkimustulokset.

Hydrogeeli	Reagoivuus	Sovellus	Tutkimustulosten nostot	Lähde
pLysAAm/HA	Valo	Rintasyövän kasvainmikroympäristön jäljittelyminen	Paremmiin aitoa kasvainmikroympäristöä jäljittelyvä ympäristö kuin 2D-viljelmissä	[4]
HECS	pH	Rintasyövän kasvainmikroympäristön jäljittelyminen	MCF-7 solut kasvoivat sferoideiksi, solujen pahanlaatuisen fenotyypin vahvistui	[7]
PNIPAAm/ kitosaani/ HA/GO	Lämpötila (LCST)	Rintasyövän hoito, lämpöaktivoitu geelilytyminen	Lääkeaineiden vapautuminen hitaampaa GO-hiukkasista, MCF-7 solujen kasvun estyi <i>in vivo</i>	[6]
Sur-ASON/ PHB-P/PF127	Lämpötila	Rintasyövän hoito, lämpöaktivoitu geelilytyminen	Geeniä vapautui yhtämittaisesti jopa 16 päivän ajan, lääkeresistentin kasvaimen kasvu estyi	[3]

Hydrogeeli	Reagoivuus	Sovellus	Tutkimustulosten nostot	Lähde
GC/PF127	pH	Rintasyövän hoito, pH-riippuvainen lääkkeen vapauttaminen	Lääkeaineiden vapauttaminen lisääntyntä happamassa pH:ssa	[6]
Kitosaani-alginaatti	pH	Rintasyövän hoito, pH-riippuvainen lääkkeen vapauttaminen	Lääkkeen vapautumisnopeus nousi 65 %:iin, kun pH=5	[11]
Kitosaani-agarooosi/GO	Valo (NIR)	Rintasyövän hoito, fototerminen terapia	MCF-7 solujen viabiliteetti laski 34 %:iin	[6]
PEGDA/Ti <sub>2</sub> O @MWCNT	Valo (NIR)	Rintasyövän hoito, valopolymerisaatio sekä fotodynaaminen ja fototerminen terapia	Yksi annos hydrogeeliä voi kuljettaa suuren määrän lääkeaineita ja kykenee pitkäaikaiseen lääkeainevapauttamiseen	[18]
Kitosaani/β-glysero-fosfaatti/GO	Magneettikenttä, lämpötila	Rintasyövän hoito, lämpöaktivoitu geeliytyminen ja magneettikentällä aiheutettu hypertermia	Tehokkaampi solukalvon läpäiseminen aiheutti enemmän apoptoosia <i>in vitro</i> , selektiivinen syöpäsolujen tuhoaminen <i>in vivo</i>	[19]
Poly(CMCS-g-NIPAAm)	Lämpötila, pH	Rintasyövän hoito, lämpötila- ja pH-riippuvainen geeliytyminen ja lääkkeenvapauttaminen	Korkein turpoamisaste saavutettiin lämpötilassa 25 °C, pH:ssa 2,1	[20]
NIPAAm/COS-GMA/akryyliamidi/PECA/GNRs	Lämpötila, valo (NIR)	Kasvaimen uusiutumisen esto, lämpöaktivoitu geeliytyminen, fototerminen terapia	Kasvaimen uusiutuminen laski 16,7 %:iin	[21]
Halloysiitti-g-kitosaani	Lämpötila, pH	Kasvaimen uusiutumisen esto	Lääkeaineen vapauttaminen nopeampaa happamassa kasvinympäristössä kuin normaalissa fysiologisessa pH:ssa	[22]
PEG/rauta-oksidi/α-syklodekstriini	Magneettikenttä, lämpötila (reversiibelisti lämpötila-herkkä)	Kasvaimen uusiutumisen esto, lämpöaktivoitu geeliytyminen ja lääkeainevapautuminen, magneettikentällä aiheutettu hypertermia	Hypertermia aiheutti soluvaurioita, geeli täytti haava-alueen täydellisesti ja oli joustava	[5]

Kitosaani, hyaluronihappo ja NIPAAm esiintyvät useammassa tutkielmassa käsitellyssä tapauksessa hydrogeelin rakennepolymeerinä. Nämä ovat kaikki osoittaneet lupaavia tutkimustuloksia. Hyaluronihappo näyttää soveltuvan rintasyövän hoitoon sekä kudostekniikkaan rintasyövän kasvainmikroympäristön jäljittelemiseksi. NIPAAm:ia ja kitosaania on tutkittu sekä kasvaimen uusiutumisen estämiseksi, että rintasyövän hoitamiseksi.



Näiden polymeerien ominaisuudet ovat monipuolisia, mikä mahdollistaa niiden laaja-alaisen soveltamisen.

Erilaisten ominaisuuksien, kuten esimerkiksi valoherkkyyden aiheuttaman fototerminen terapian ja pH-herkkyyteen perustuva lääkeainevapauttaminen, mahdollistavat monipuolisemman hydrogeelihoidon. Tarve muille hoitomuodoille, kuten sädehoidolle, voi olla vähäisempää, kun useampi terapia on yhdistettynä yhteen injektioon. Tämä voi vähentää potilaan ja elimistön stressiä, ja todennäköisesti myös hoitohenkilökunnan työtaakkaa.

Valoherkkien hydrogeelien mahdollistama fototerminen terapia aiheuttaa paikallisia soluvaurioita hypertermian avulla ympäröivään solukkoon. Vaikka hydrogeeli toimii paikallisesti, on tutkittava, miten syvälle kudokseen hypertermia aiheuttaa soluvaurioita. Sädehoidon käyttöä rajoittaa sen aiheuttamat soluvauriot myös terveeseen kudokseen. Vaikka sädehoito kohdistuu merkittävästi laajemmalle alueelle kehoa, kuin hydrogeelin fototerminen terapia, on silti tutkittava fototerminen komponenttien turvallisuutta kasvainta ympäröivään terveeseen kudokseen.

Hydrogeelien avulla voidaan kohdentaa lääkehoito paikallisesti vain tiettyyn kudokseen tai elimeen. Erityisesti injektoitavuus on tärkeä ominaisuus, jonka avulla voidaan minimoida hydrogeelin asettamisesta aiheutuvat arvet, infektiot ja kipu. Lääkeaineiden teho on huomattavasti parempi, kun niiden annostelu ja vapauttaminen kohdistuu vain syöpäsolukkoon, eikä systeemisesti koko elimistöön, kuten perinteinen kemoterapia. Lääkeaineiden sivuvaikutukset ovat myös vähäisempiä, kun ne eivät pääse vaikuttamaan koko elimistöön. Lisäksi annostelusyklarit määrä on vähäisempää ja lääkeannokset voivat olla pienempiä, mikä on kannattavampaa niin potilaan, kuin hoitoalan ammattilaisten ja resurssien kannalta.

Ympäristön hyvinvoinnin näkökulmasta ajatellen voisi toisaalta pohtia hydrogeelien olevan ympäristöystävällisempi ratkaisu, kuin koko elimistöön kohdistuvan kemoterapian. Synteettisesti valmistettuja ja ympäristölle haitallisia lääkeaineita tarvitsee tuottaa vähemmän hydrogeelejä varten. Toisaalta on tutkittava hydrogeeleissä käytettävien polymeerien ja muiden komponenttien ympäristöhaittoja, ennen kuin voidaan sanoa toisen vaihtoehdon olevan toista ympäristöystävällisempi.

Tämänhetkinen tutkimus hydrogeelien sovellettavuudesta rintasyöpähoitoihin ja 3D-viljelmiin on osoittanut lupaavia tuloksia. Kuitenkin suuria haasteita on vielä ratkaistavana, joista merkittävimpinä ovat joidenkin hydrogeelin komponenttien biohajoamattomuus, heikot

mekaaniset ominaisuudet, immunologinen yhteensopivuus ja kliininen käyttöönotto, joka vaatii lainsäädännöllisen hyväksynnän ja voi olla kallista. Monia erilaisia lähestymistapoja ja ratkaisuja on tutkittu, ja osasta on lupaavaa näyttöä. Käytettyjen polymeerien ja muiden komponenttien monimuotoisuus kuitenkin aiheuttavat sen, että monet ratkaisuehdotuksista ovat toimivia vain yhden tai muutaman hydrogeelin osalta. Tämän takia ratkaisuja on tutkittava usein hydrogeeli- ja sovelluskohtaisesti.

Hydrogeelien tutkimus on vielä kesken ja ala vaatii tarkempaa perehtymistä, mutta niiden voidaan jo todeta tulevaisuudessa olevan potentiaalinen lääkkeenantojärjestelmänä ja 3D-viljelmien matriksina. Tätä tukee jatkuvasti kasvava kiinnostus alaa kohtaan ja halu tutkia hydrogeelejä. Viimeisen kymmenen vuoden ajalta on kasvavissa määrin tarjolla artikkeleita, jotka käsittelevät hydrogeelejä rintasyövän ratkaisuvaihtoehtona.

## Lähteet

- [1] H. Sung *ym.*, ”Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, vsk. 71, nro 3, ss. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] A. Mazurakova *ym.*, ”Therapy-resistant breast cancer in focus: Clinically relevant mitigation by flavonoids targeting cancer stem cells”, *Front. Pharmacol.*, vsk. 14, 2023, Viitattu: 3. maaliskuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1160068>
- [3] D. Zhao *ym.*, ”Novel facile thermosensitive hydrogel as sustained and controllable gene release vehicle for breast cancer treatment”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, vsk. 134, ss. 145–152, kesä 2019, doi: 10.1016/j.ejps.2019.03.021.
- [4] W. Xu *ym.*, ”A double-network poly(Nε-acryloyl l-lysine)/hyaluronic acid hydrogel as a mimic of the breast tumor microenvironment”, *Acta Biomater.*, vsk. 33, ss. 131–141, maaliskuu 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.027.
- [5] H. Wu *ym.*, ”Injectable magnetic supramolecular hydrogel with magnetocaloric liquid-conformal property prevents post-operative recurrence in a breast cancer model”, *Acta Biomater.*, vsk. 74, ss. 302–311, heinäkuu 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.052.
- [6] H. Xin ja S. Naficy, ”Drug Delivery Based on Stimuli-Responsive Injectable Hydrogels for Breast Cancer Therapy: A Review”, *Gels*, vsk. 8, nro 1, Art. nro 1, tammikuu 2022, doi: 10.3390/gels8010045.
- [7] G. Hou *ym.*, ”Hydroxyethyl chitosan hydrogels for enhancing breast cancer cell tumorigenesis”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vsk. 184, ss. 768–775, elokuu 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.110.
- [8] N. Sood, A. Bhardwaj, S. Mehta, ja A. Mehta, ”Stimuli-responsive hydrogels in drug delivery and tissue engineering”, *Drug Deliv.*, vsk. 23, nro 3, ss. 748–770, maaliskuu 2016, doi: 10.3109/10717544.2014.940091.
- [9] N. H. Thang, T. B. Chien, ja D. X. Cuong, ”Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview”, *Gels*, vsk. 9, nro 7, Art. nro 7, heinäkuu 2023, doi: 10.3390/gels9070523.
- [10] D. Qureshi, S. K. Nayak, S. Maji, A. Anis, D. Kim, ja K. Pal, ”Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications”, *Eur. Polym. J.*, vsk. 120, s. 109220, marraskuu 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109220.

- [11] M. Norouzi, B. Nazari, ja D. W. Miller, "Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy", *Drug Discov. Today*, vsk. 21, nro 11, ss. 1835–1849, marras 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.006.
- [12] Y.-L. Wu, X. Chen, W. Wang, ja X. J. Loh, "Engineering Bioresponsive Hydrogels toward Healthcare Applications", *Macromol. Chem. Phys.*, vsk. 217, nro 2, ss. 175–188, 2016, doi: 10.1002/macp.201500172.
- [13] C. Alvarez-Lorenzo, V. Y. Grinberg, T. V. Burova, ja A. Concheiro, "Stimuli-sensitive cross-linked hydrogels as drug delivery systems: Impact of the drug on the responsiveness", *Int. J. Pharm.*, vsk. 579, s. 119157, huhti 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119157.
- [14] J. Wiedemair *ym.*, "In-Situ AFM Studies of the Phase-Transition Behavior of Single Thermoresponsive Hydrogel Particles", *Langmuir*, vsk. 23, nro 1, ss. 130–137, tammi 2007, doi: 10.1021/la061288u.
- [15] "Breast cancer". Viitattu: 3. maaliskuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- [16] A. V. Lee, S. Oesterreich, ja N. E. Davidson, "MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years", *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vsk. 107, nro 7, s. djv073, heinä 2015, doi: 10.1093/jnci/djv073.
- [17] R. Schmid *ym.*, "Comparison of Hydrogels for the Development of Well-Defined 3D Cancer Models of Breast Cancer and Melanoma", *Cancers*, vsk. 12, nro 8, Art. nro 8, elo 2020, doi: 10.3390/cancers12082320.
- [18] H. Zhang *ym.*, "Near-infrared-triggered in situ hybrid hydrogel system for synergistic cancer therapy", *J. Mater. Chem. B*, vsk. 3, nro 30, ss. 6310–6326, heinä 2015, doi: 10.1039/C5TB00904A.
- [19] X. Zhu, H. Zhang, H. Huang, Y. Zhang, L. Hou, ja Z. Zhang, "Functionalized graphene oxide-based thermosensitive hydrogel for magnetic hyperthermia therapy on tumors", *Nanotechnology*, vsk. 26, nro 36, s. 365103, elo 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/36/365103.
- [20] S. Khan, N. Akhtar, M. U. Minhas, ja S. F. Badshah, "pH/Thermo-Dual Responsive Tunable In Situ Cross-Linkable Depot Injectable Hydrogels Based on Poly(N-Isopropylacrylamide)/Carboxymethyl Chitosan with Potential of Controlled Localized and Systemic Drug Delivery", *AAPS PharmSciTech*, vsk. 20, nro 3, s. 119, helmi 2019, doi: 10.1208/s12249-019-1328-9.

- [21] Y. Qu *ym.*, "A biodegradable thermo-responsive hybrid hydrogel: therapeutic applications in preventing the post-operative recurrence of breast cancer", *NPG Asia Mater.*, vsk. 7, nro 8, ss. e207–e207, elo 2015, doi: 10.1038/am.2015.83.
- [22] R. Li *ym.*, "Injectable halloysite-g-chitosan hydrogels as drug carriers to inhibit breast cancer recurrence", *Compos. Part B Eng.*, vsk. 221, s. 109031, syys 2021, doi: 10.1016/j.compositesb.2021.109031.
- [23] S. Almawash, S. K. Osman, G. Mustafa, ja M. A. El Hamd, "Current and Future Prospective of Injectable Hydrogels—Design Challenges and Limitations", *Pharmaceuticals*, vsk. 15, nro 3, Art. nro 3, maalis 2022, doi: 10.3390/ph15030371.
- [24] D. Rafael *ym.*, "Thermo-responsive hydrogels for cancer local therapy: Challenges and state-of-art", *Int. J. Pharm.*, vsk. 606, s. 120954, syys 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120954.