

Hidrogel injektagarriak eta haien aplikazioak ehun ingeniari-tzan

(Injectable hydrogel and its applications in tissue engineering)

Sheila Maiz-Fernández^{1,2*}, Leyre Pérez-Álvarez^{1,2}, Leire Ruiz-Rubio^{1,2},
José Luis Vilas-Vilela^{1,2}

¹ Kimika Makromolekularreko taldea (LABQUIMAC), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

² BCMaterials, Basque Centre for Materials, Applications and Nanostructures

LABURPENA: Ehun ingeniari-tzak kaltetuta dauden ehunen orde-zko funtzionalak sintetizat-zeko helburua dauka. Horretarako, zelulaz, molekula bioaktiboz eta euskarri porotsuz osatutako matrizeak beharrezkoak dira, hazkuntza eta zelulen diferentziazio prozesuak gerta daitez-en. Matrize horiek solidotzeko gai den aitzindari baten injektzioz eratu daitezke kaltetuta dauden ehunetan. Hori dela eta, hidrogel injektagarriak ikerkuntza arlo biomedikoa-n izugarri hedatu dira azken urteotan. Biomaterial horien injektagarriak izateko gaitasuna sare poli-merikoen *in situ* gurutzaketan oinarritzen da. Gurutzaketa horiek, alde batetik, interakzio fisiko itzulgarrien bi-dez gerta daitezke. Hala, hidrogel termosentikor-
rak, pH-sentikor-
rak edo ionikoak eratz-en dira. Bestalde, erreakzio kimikoetan ere oinarritu daitezke, zeinetan hidrogel fotopolimerizagarriak edo entzimek katalizatutako gurutzaketa bidezko hidrogelak lor daitezkeen. Lan honen helburua da hidrogel injektagarriak sintetizat-zeko erabiltzen diren estrategien eta ehun ingeniari-tzan ikertutako sistemen aplikazioen berrikuspen bat egitea.

HITZ GAKOAK: Polimero, hidrogel, injektagarri, gurutzaketa, biomaterial.

ABSTRACT: Tissue engineering aims to create functional substitutes for damaged or diseased tissues through complex constructions of living cells, bioactive molecules and three-dimensional porous scaffolds that support the union, proliferation and differentiation of cells. These constructions can be formed by injection of a precursor which can solidify into the defective tissue, which has converted biomaterials such as injectable hydrogels into one of the most promising biomedical research areas of recent years. Injectable hydrogels are based on the *in-situ* crosslinking of polymer networks. The mechanisms involved in the formation of these gels can be very varied, and are based on both reversible physical interactions, forming thermosensitive hydrogels, sensitive or ionic pH, and chemical reactions, as is the case of photocrosslinked hydrogels or enzymatically crosslinked. This paper aims to review the main strategies currently used for the formation of injectable hydrogels and, in addition, to show brief results on the formation of injectable hydrogels based on chitosan by physical and chemical crosslinking.

KEYWORDS: Polymer, hydrogel, injectable, crosslinking, biomaterial.

* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Sheila Maiz-Fernández, Kimika Makromolekular taldea (LABQUIMAC), Kimika Fisikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n 48940, Leioa, Euskal Herria. – sheila.maiz@bcmaterials.net – <https://orcid.org/>

Nola aipatu / How to cite: Maiz-Fernández, Sheila; Pérez-Álvarez, Leyre; Ruiz-Rubio, Leire; Vilas-Vilela, José Luis (2020). «Hidrogel injektagarriak eta haien aplikazioak ehun ingeniari-tzan»; *Ekaia*, 37, 2020, 129-143. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.20837>).

Jasoa: 10 maiatza, 2019; Onartua: 14 urria, 2019.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2020 UPV/EHU

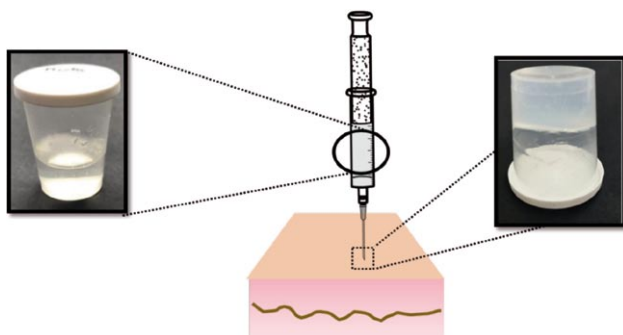


Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

1. SARRERA

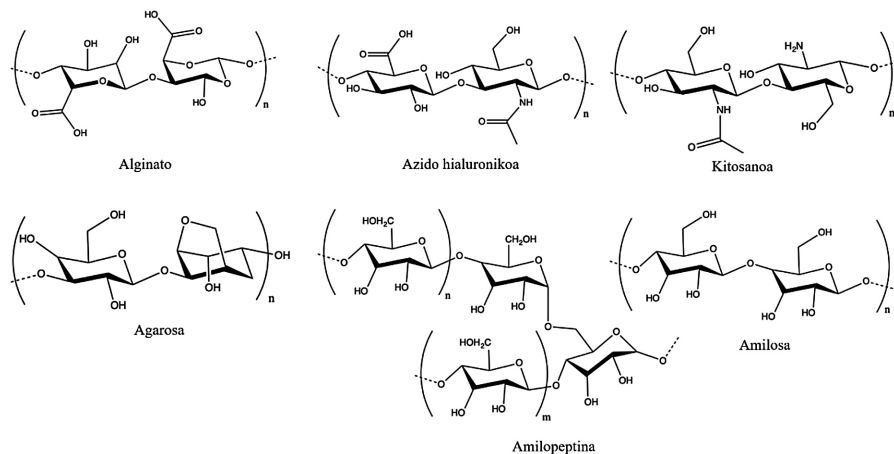
Hidrogelak ahalmen hidrofiliako handia eta ura edo bestelako fluido biologikoak barnean mantentzeko gaitasuna duten hiru dimentsioko sare polimerikoak dira. [1] Sare polimeriko horiek deformatzeko ahalmena eskaintzen dute, berez daukaten malgutasuna dela eta. Horrela, disolbatzaile molekularak egituraren barnean mantetzeko gai dira disolbatu barik. XX. mendetik aurrera, hidrogelak ukipen lente modura erabiltzen hasi zirenetik, haien erabilera areagotuz joan da. Gaur egun hainbat aplikazio biomedikotan erabiltzen dira, hala nola farmakoen emate eta askatze kontrolatuan [2], kosmetika arloan betetze-material modura [3] edo hiru dimentsioko zelula-aldamio (*scaffold*) gisa ehun bizidunen birsorkuntzan [4].

Hiru dimentsioko eraikuntza hauek material biologikoz eratuta daude, hala nola zelulaz, proteinaz edo hazkuntza faktorez, eta egiturazko materialez, oro har material polimerikoz. *Scaffold*dek bete behar duten propietate nagusia giza zelulaz kanpoko matrizeen (ECM) antza izatea da. Horregatik, material polimerikoak oso aproposak dira matrize horiek antzeratzeko, haien hiru dimentsioko egituragatik, elastikotasunagatik, eta ur kantitate handiak eta eduki biokimikoak biltegiratzeko eta askatzeko gaitasuna dutelako. Ehun ingeniartzak bereizte eta proliferazio zelularra sustatzen duten mikroingurune zelularrak imitatzekeo gai diren materialen premia dauka, eta horrek material mota horien fabrikazioaren garrantzia sustatu du [5]. Hidrogel injektagarriok gorputzean injektatu baino lehen likido egoeran aurkitzen dira, eta, behin ingurune fisiologikopean, kanpo estimulu (pH, tenperatura...) baten bidez *sol-gel* trantsizioa jasaten dute. Ondorioz, gelifikazioa gertatzen da injektaturiko lekuan (1. irudia) [6]. Propietate horri esker, ohiko hidrogelak dituzten desabantailak gainditzen dira; izan ere, hidrogel injektagarriak ebakuntza kirurjikoak saihesten ditu, metodo ez-inbasiboak direlako eta akzioa injektaturiko lekuan gertatzen delako. Egitura injektagarri hauek oso interesgarriak dira ikuspuntu klinikotik ehunen edozein akats betetzeko gai direlako, nahiz eta halakoek forma eta tamaina irregularra izan.



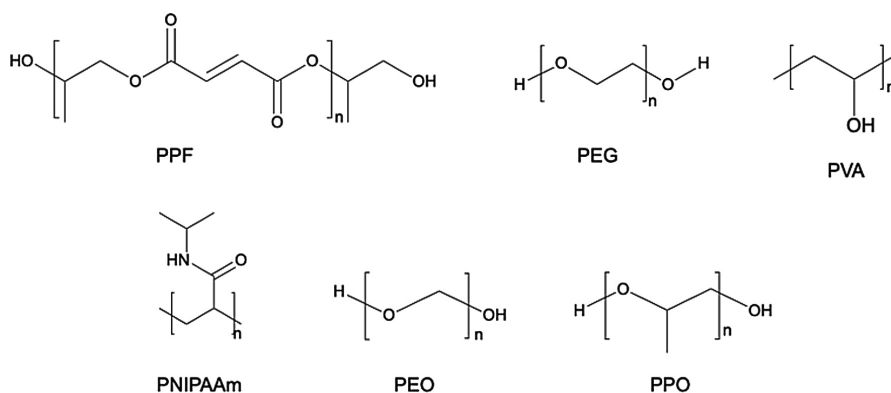
1. irudia. Sol-gel trantsizio zelulen presentzia hidrogel injektagarrietan.

Hidrogel hauen ekoizpenerako jatorri natural zein sintetikoa duten polimeroak erabili ohi dira. Hidrogel injektagarrien garapenerako gehien erabili diren polimero naturalak honako hauek dira: agarosa [5], alginatoa [6] (itsas algen pareta zelularrean aurkitzen dena), azido hialuronikoa [7] (animalia helduen zenbait ehunetan aurkitzen dena) eta kitosanoa [8] (krustazeo oskoletatik lortzen ahal dena). Polisakarido horiek modu onuragarrian interakzionatzen dute *in vivo*, eta, gainera, giza zelulaz kanpoko matrizearen antza daukate. Bestalde, gelatina [9], kolagenoen hidrolisitik sintetizatua, oso erabilia izan ohi da. Ildo beretik, amilosa eta amilopektina [10], almidoiaren osagai nagusiak direnak, hidrogel injektagarrien formulazio berrien ikerkuntzan asko aztertu diren beste-lako biopolimeroak dira. 2. irudian, aipatutako biopolimeroen egitura kimikoa adierazten da.



2. irudia. Hidrogel injektagarrien sintesirako gehien erabiltzen diren polimero naturalen egitura kimikoak.

Polimero naturalek daukaten abantaila garrantzitsuena biodegradagarritasuna da. Polimero sintetikoetan, ordea, propietate kimikoak, hala nola pisu molekularra, egitura, dentsitate eta abar, zehatzagoak dira, eta, horren ondorioz, polimero horietaz osaturiko egiturak kontrolatuagoak dira. Azken urteotan, askotariko polimero sintetiko biobateragarriak erabili dira biomedikuntzan. Hala ere, gehien ikertu direnak poli(etilenglikol)-a (PEG) [11], poli(binil alkohola) (PVA) [12], poli(*N*-isopropilakrilamida) (PNIPAAm) [13], poli(propilen fumaratoa) (PPF) [14], poli(etilen oxidoa) (PEO) [15] eta poli(propilen oxidoa) (PPO) dira [16]. (3. irudia)



3. irudia. In situ hidrogelen fabrikazioan gehien erabiltzen diren polimero sintetikoek egitura kimikoak.

In situ gelifikazioa hainbat mekanismoren bitartez gerta daiteke, eta, horien artean, lotura kobalente berrien bidez sortzen diren mekanismo kimikoak edo elkarrekintza fisiko itzulgarrietan oinarritzen diren mekanismo fisikoak bereiz daitezke. Alde batetik, hidrogel kimikoek egonkortasun mekaniko handia eskaintzen dute. Hala ere, gelifikazio denborak ere luzeagoak izaten dira [17]. Hidrogel hauen beste desabantaila bat gurutzaketa eragiteko erabiltzen diren kanpoko substantziak edo agenteak dira; izan ere, sarritan toxizitate indize altuak dituzte. Halaber, gurutzaketa fisikoa, gelifikazio denbora laburragoak izateaz gain, gurutzaketa agenterik gabe egin daiteke.

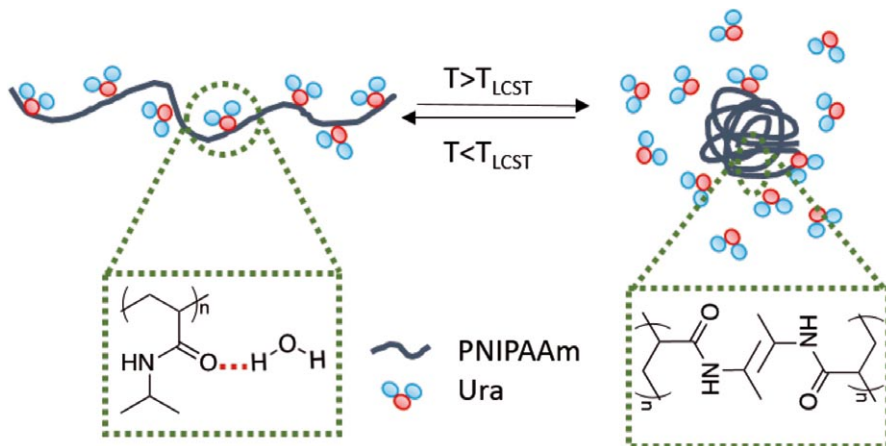
2. IN SITU GELIFIKAZIO MEKANISMOAK

Gelifikazio prozesua gertatzeko hainbat estimulu daude. Hori dela eta, hidrogel injektagarri mota anitz desberdintzen dira: termosentikorrak [10], pH-sentikorrak [18], fotosentikorrak [19], gurutzaketa entzimatikoz gurutzaturiko hidrogelak [20], edo erantzun bikoitza duten hidrogelak [7].

2.1. Hidrogel termosentikorrak

Polimero batzuek beren agregazio egoeran edo disolbagarritasunean aldaketak jasan ditzakete tenperaturaren eraginez. Arlo honetan, tenperatura horrek eragindako nahaskortasun-aldaketari goi edo behe nahaskortasun tenperatura kritiko deritza (UCST, *Upper Critical Solution Temperature* eta LCST, *Lower Critical Solution Temperature*, hurrenez hurren). UCST bi osagaien banaketa gertatzeko tenperatura maximoa da, tenperatura ho-

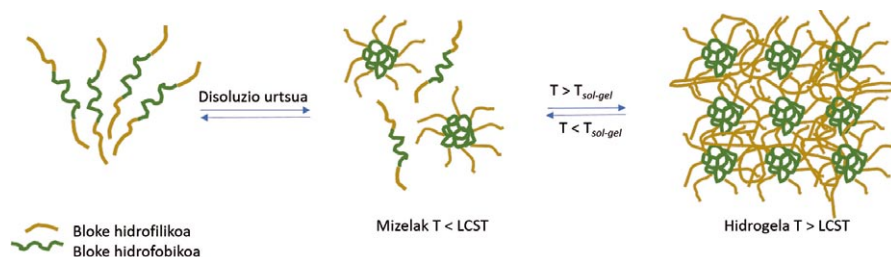
rretatik gora bi osagaiak guztiz nahaskorrak dira. Bestalde, LCST alderantzizko prozesuari dagokio; temperatura hori duten materialek likidotik (giro temperatura) gorputz temperaturan gelifikazioa indultzeko erabiltzen dira. Zehazki, polimeroetan fase trantsizio hori ezaguna da, eta osagai hidrofobikoen eta hidrofilikoen elkarrekintzen arteko oreka aldaketaren ondorioz gertatu ohi da [21]. Adibidez, LCST duten polimeroetan, LCST baino temperatura baxuagotan polimeroaren eta uraren arteko hidrogeno loturak polimero-polimero elkarrekintza hidrofobikoak baino ugariagoak dira, eta, ondorioz, haien disolbagarritasuna faboratzen da. Bestalde, LCSTa gainditzen denean, hidrogeno loturak ahultzen dira, eta elkarrekintza hidrofobikoak nagusitzen dira, eta, ondorioz, polimeroa prezipitatu da. PNIPAAm-ek LCSTa temperatura fisiologikotik (32 °C) hurbil erakusten du, eta giza gorputzaren temperaturan fase trantsizio bat jasaten du. Horregatik, azken urteotan, gelifikazio termosentikorrek gehien erabili den makromolekula da [15] (4. irudia). Sarritan, polimero sintetiko hau hidrogel injektagarrien sintesirako erabilia izan da beste biopolimero natural batzuekin kopolimerizatuz.



4. irudia. PNIPAAm-ren fase trantsizioa LCSTaren menpean.

Bestelako polimero sintetikoak ere erabili ohi dira hidrogel injektagarriak garatzeko, hala nola polimero sintetiko anfifilikoak (hau da, alde hidrofílico eta alde hidrofobikoa dituztenak). Arlo honetan, sistema termosentikor ohikoena PEO-PPO-PEO (Pluronic ®) da. Sistema hauetan, PPO polimero katea PEO kateak baino hidrofílicoak dira, eta, beraz, PEO-PPO-PEO kopolimeroa inguru urtsuan eta kontzentrazio egokian, alegia, mizelen kontzentrazio kritikoan (MKK), beren buruarekin agregatzen dira, eta mizela egiturak sorrarazten. Mizela horiek *sol-gel* trantsizioa jasaten dute temperatura aldaketaren ondorioz, eta, gainera, temperatura hori moldaga-

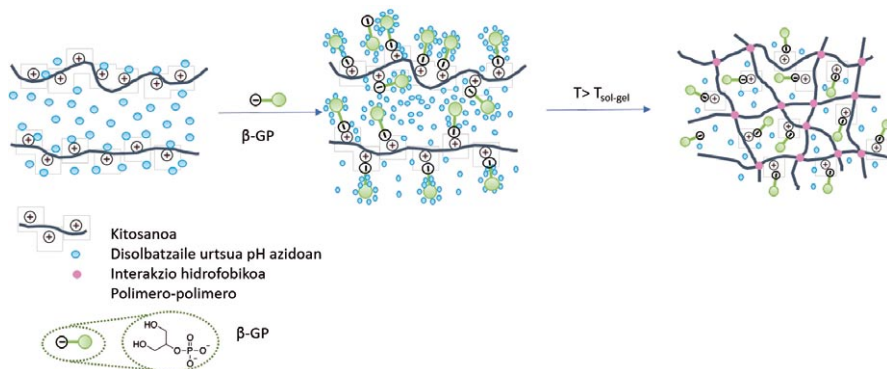
ria da polimeroaren pisu molekularren edo konposizioaren arabera [13]. Tenperaturaren igoerak MKKaren jaitiera dakar, eta, horregatik, tenperatura baxu samarretan ($T < T_{sol-gel}$) mizelen eraketa bultzatzen da. Tenperatura altuetan, ordea, mizelen paketatzeak gel makroskopikoaren eraketa bultzatzen du (5. irudia). Hala ere, PNIPAAm polimeroarekin gertatzen den moduan, Pluronic®-ren aplikazioa biomedikuntza arloan oso mugatuta dago, biodegradagarria ez delako, eta horregatik, eskuarki, bestelako polimero biodegradagarriekin kopolimerizatzen da, adibidez, poli(azido laktiko)-rekin, poli(kaprolaktona)-rekin edo poli(hidroxibutirato)-rekin [22].



5. irudia. Pluronic® makromolekularen gelifikazio prozesuaren oinarriaren irudi eskematikoa.

Polimero naturalak erakargarriak bilakatu dira hidrogel termosentikoren garapenerako. Arlo honetan azpimarratu daitekeen ikerketa Chenite eta bestek [23, 24] argitaratutakoa da. Horretan, kitosanoan oinarritutako hidrogel injektagarri termosentikorra garatu zen. Kitosanoa polimero natural, lineal eta kationikoa da. Izaera kationiko horrek amino funtzio-taldeak ematen dio. Horregatik, pK_a (~6.5) baliotik beherako pH tartean positiboki kargatuta agertuko da ($-NH_3^+$). Baina pK_a -ren baliotik gorako pH-balioetan, amino funtzio-taldea molekula arteko eta molekula barneko hidrogeno loturak eratzeke gai izango da. Horregatik, kitosanoa disolbaezina da disolbatzaile eta ingurune gehienetan, disoluzio azidoetan izan ezik. Baldintza azidoetan amino taldeak protonatuta agertzen dira, eta, ondorioz, aldarapen elektrostatikoak sortzen dira kate polimeriko guztian zehar. Aldarapen horiei esker, kate polimerikoen artean sortzen diren erakarpen indarrak (hidrogeno loturak) apurtzen dira, eta kitosanoa pH azidoetan disolbatzea posiblea da. Chenite eta laguntzaileek kitosanoaren disolbagarritasun arazoa konpondu zuten polisakaridoa β -glizerol fosfato disodiko (β -GP) gatz basikoarekin nahastuz. Hidrogel horren berezitasuna da gatz basikoaren gehikuntzak interakzio hidrofobikoen eta hidrogeno lotura itzulgarrien kontrola ahalbidetzen duela. Horrela, kitosanoa disoluzioan mantentzeko pH neutroan eta tenperatura baxuetan. Hala ere, tenperaturaren igoerak kitosano-kitosano interakzioa sustatzen du, eta horrek tenperatura fisiologikotik hurbil gertatzen den gelifikazio espontaneoak dakar (6. irudia).

Kitosanoaz gainera, hidrogel termosentikorrek sortzeko gaitasuna daukaten bestelako polimero naturalak erabili izan dira. Adibidez, gelatina eta agarosa, amilosa eta amilopectina edo zelulosaren eratorriak dira ohikoena. Zelulosaren eratorrien kasuan, horiek hidrofobikoki eraldatzen dira, eta temperatura igo ahala ura disolbatzaile gisa ahulduz doa, eta polimero-polimero elkarrekintzak nagusitzen dira eta polimeroen gelifikazioa eragiten. Gelifikazio-mekanismo hori metilzelulosa eta hidroxipropilzelulosa konposatuetan beha daiteke, adibidez.

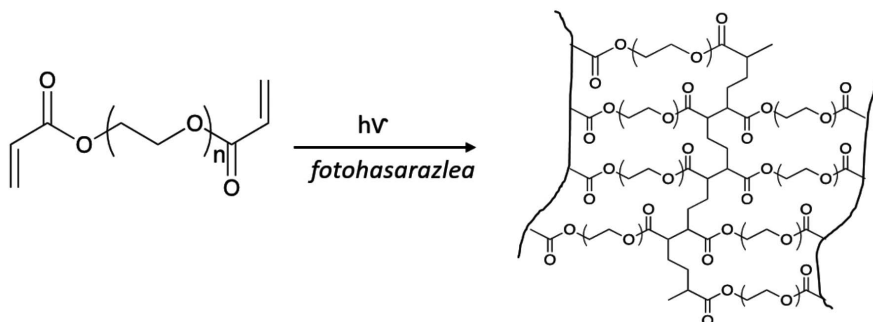


6. irudia. Kitosanoan eta β-GP-n oinarrituta dauden hidrogel termosentikorraren gelifikazio mekanismoa inguru fisiologikoan.

2.2. Ionikoki gurutzatutako hidrogelak

Ionikoki gurutzatuta dauden hidrogelak anioi edo katioi di/tribalenteen eta kargatutako kate polimerikoen arteko elkarrekintza elektrostatikoetan oinarritzen dira. Hidrogel mota horietatik aipagarriena alginatoa da. Alginatoa algetatik datorren polisakarido natural anionikoa da. Gelak eratzeko gaitasun handia dauka disoluzioan katioiak gehituz, hala nola kaltzioa (Ca^{2+}), zinka (Zn^{2+}) edo magnesioa (Mg^{2+}). Katioi horiek pH egokian ($\text{pK}_{\text{a, alginato}} \approx 3,5$) [25] alginatoaren osagaiak diren azido manuronikoaren eta azido guluronikoaren talde karboxilatoekin ($-\text{COO}^-$) interakzionatzen dute, eta gelifikazioa eragiten dute zubi ionikoak eratzen dituztelako (7. irudia). Ikertzaileek alginato hidrogel ionikoak garatu dituzte pH egokian ($\approx 4,5$) kaltzio kloruroa eta beste gatz batzuk gehituz. Hidrogel horien arazoetariko bat da baldintza fisiologikoetan egonkortasun mekaniko txikia dutela. Horregatik, hidrogel mota horiei gehienetan gurutzaketa kimikoa gehitzen zaie egonkortasun mekanikoa hobetu nahian. Kasu horietan, lotura bikoitzekin (talde akrilikoekin, binilikoekin...) eraldatutako alginato hidrogelak nabarmendu daitezke. Eraldatutako kate polimeriko horiek kaltzio katioi dibalenteekin interakzionatuz fisikoki gurutzatu daitezke, eta, lo-

dira. Polimero hori eskuarki kopolimerizatzen da, adibidez poli(α -hidroxiazido)-arekin edo poli(fumarato propilen-ko-etilenglikol)-arekin; izan ere, azken horrek asegabetasun puntu desberdinak aurkezten ditu polimero katean zehar, zeinek erreaktivotasun gehiago ematen dioten, eta, ondorioz, gelifikazio denbora murrizteko edo propietate mekanikoak hobetzeko aukera paregabea eskaintzen du.



8. irudia. Polimetakrilatoan oinarritutako hidrogel injektagarriaren fotogurutzamendua adierazteko irudi eskematikoa.

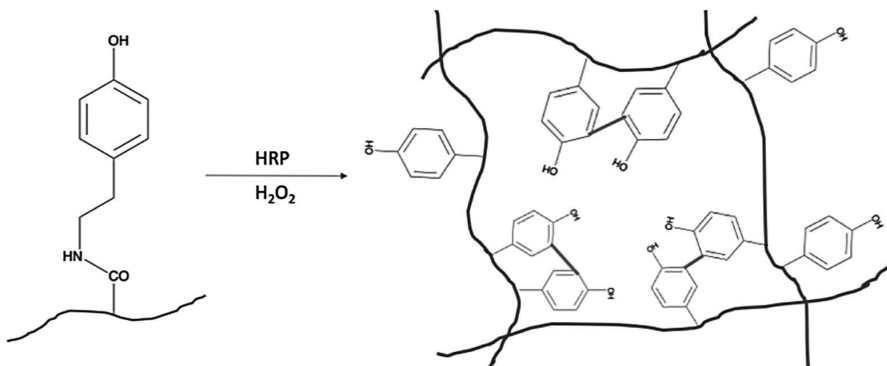
2.4. Erantzun bikoitzeko hidrogelak

Fisikoki gurutzatutako hidrogel termosentikorren edo pH-sentikorren desabantaila nagusiak egonkortasun eza eta gorputzpean aurkezten duten propietate mekaniko txarrak dira. Arazo horiek konpontzeko erantzun bikoitzeko hidrogelak garatu dira. Adibidez, Xiao *et al.* [30] pH-ari eta tenperaturari erantzuteko gai diren hidrogelak fabrikatu dituzte. Horretarako, PNIPAAm pH-ari erantzuteko gai diren segmentuekin, hala nola, poli(azido propilakriliko)-arekin (PPAA), poli(azido *N*-isopropilmalamiko)-arekin (PNIPMAA) eta poli(azido metakriliko)-arekin (PMAA) kopolimerizatu zuten. Emaitzetan oinarrituz hidrogeletan dauden talde karboxilikoei esker gelifikazioa pH basikoetan gertatzen zela (pH \approx 12-13) azaldu zuten. Beste aldetik, P(NIPAAm-ko-NIPMAA)-ren termosentikortasun ona PNIPAAm polimeroak duen LCST-ri esker ematen zela ondorioztatu zuten eta, horrela, erantzun bikoitza duen hidrogela ekoiztu zuten.

Aldi berean, fotosentikorrek eta termosentikorrek diren hidrogel sistemei ere erantzun bikoitzeko hidrogelak deritze. Adibidez, Tai *et al.* [31] uretan disolbagarria zen eta 32°C-ko LCST-a duen kopolimero bat (PEGMEMA-PPGMA-EGDMA) ekoiztu zuten. Sistema horrek dituen talde metakrilikoak fotogurutzatzeko ahalmena aurkeztu dute eta gainera, LCST-ak ematen dion termosentikortasunarekin konbinatuz gero, propietate mekanikoen hobekuntza ekarri zuten.

2.5. Entzimatikoki gurutzatutako hidrogelak

Gurutzamendu kimikorako erabiltzen diren hasarazleen toxizitateak gurutzamendu entzimatikoaren garapena bultzatu du. Entzimek lotura kimikoak apurtzeko edota lotura berriak eratzeko aukera ematen dute beste metodo baino eraginkortasun handiagoarekin, izan ere, erreakzio denbora laburrak eta espezifikotasun handiak eragiteaz gain albo erreakzioak emateko aukera murrizten dute. Erreakzio entzimatikoak erreakzio baldintza leunetan ematen dira, hau da, ingurune urtsuetan, pH neutroetan eta tenperatura epeletan. Hidrogel kimikoen garapenerako gehien erabili diren entzima errefau peroxidasa, transglutaminasa, tirosinasa, fosfopanteteinil-transferasa eta lisil oxidasa dira. Errefau peroxidasa, HRP (Horseradish peroxidase) moduan ere ezaguna dena, hidrogelak entzimatikoki katalizatzeke entzima interesgarrietariko bat da. Izan ere, denbora laburretan (4 minutu) erresistentzia mekaniko handia duten hidrogelak ekoizteko aukera ematen du. HRP-k fenolen akoplamendu oxidatzailea katalizatzen du hidrogeno peroxidoaren (H_2O_2) presentzian (9. Irudia). HRP eta H_2O_2 sistema katalizatzaileak alde aurretik talde fenolikoekin modifikatutako polimeroetan askotan erabili dira, hala nola, kitosanoarekin, azido hialuronikoarekin, dextranoarekin edota gelatinarekin, ondoren, ehun ingeniartzan aplikatzeko. Adibidez, Feijen eta kolaboratzaileek [32] gurutzamendu entzimatikoa HRP entzima erabiliz aztertu zuten kitosanoan oinarritutako hidrogelatan. Lehendabizi, kitosanoak uretan aurkeztzen duen disolbaezintasuna konpontzeko, polisakaridoa azido glikolikoarekin modifikatu zuten eta, ondorioz, azido 3-(4-hidroxifenil) propionikoarekin modifikatu zuten HRP-ak polimeroaren talde fenolikoekin akoplamendu oxidatzailea katalizatu ahal izateko. Gelifikazio denbora nahastearren (polimeroa + HRP + H_2O_2) injekzioetik eta baldintza fisiologikoetan 4 minututik 10 minutura gertatu zen talde fenolikoekin ugaritasuna edo entzimaren kontzentrazioaren arabera.



9. irudia. Aldez aurretik talde fenolikoekin modifikatutako polimero baten sol-gel trantsizioa gurutzamendu katalitikoaren bidez HRP eta H_2O_2 erabiliz.

3. APLIKAZIOAK EHUN INGENIARITZAN

Ehun ingeniartzan jakintza-alor anitz bat-egiten duen esparrua da. Horrek materialen zientzia eta biozientzien oinarriak kontuan edukiz, ehun zelularrak berritu, konpondu, mantendu edo hobetzeko gai izango diren teknologia berrien garapenean oinarritzen da. Teknologia horiek funtzio biologikoak ordezkatu edo hobetzen dituzte eta horregatik, gaur egun, horren interes handia piztu dute. Ehun ingeniartzaren estrategien helburu nagusia aldamio zelular edo *scaffold* ideal baten eraketa da [33]. Hazkuntza zelularra gorputz barneko inguru hiru dimentsiotako inguru aldakor batean gertatzen da, hainbat prozesu eta funtzio zelular sustatzen dituelarik, hala nola, migrazioa edota diferentziazioa. Aurretik ikusi den moduan, hidrogel polimeriko injektagarriak biomaterial oso egokiak dira *in vivo*-zko mikroinguru zelularrak imitatzeke eta, horregatik, gaur egun, mota askotariko ehunak birsortzeko ikerketetan asko erabiltzen dira, hala nola, gihar ehunak, kartilago ehunak, hezur ehunak, eta abar.

Pertsona helduen desgaitasunen kausa nagusienetarikoa hezur-akatsak dira. Nahiz eta autoinjertoa hezur-akatsak konpontzeko aukera erabilienean izan, era ditzaketen efektu kaltegarriak direla eta (albo erreazioak, infekzioak...) nahiko mugatuta dago. Hori dela eta, hezur-ehunen ingeniartzak arreta handia bereganatu du.

Ehun ingeniartzan ikasketa askok kitosanoaren aplikazioa erakutsi dute hezur-ehunen konponketarako. Adibidez, Niranjana eta kolaboratzaileek [34] kitosanoan eta β -glizerol fosfato gatzan oinarritzen den hidrogel termosentikorra garatu zuten. *Scaffold* horren froga zelularrak osteblastoen egin ziren eta matrize polimerikoa zelula horien diferentziazioa egiteko gaitasuna zuela frogatu zen. Bestaldetik, antibakterianoa, biobateragarria eta biodegradagarria zela behatu zuten eta horregatik, polisakarido eta gatz horietan oinarritutako hidrogelak hezur-ehunen birkonponketarako hautagai oso aproposak direla ondorioztatu zuten.

Polimero termosentikorrak, aurretik esan den moduan, hezur-ehunen akatsak konpontzeko oso aproposak diren materialak dira, izan ere, ehun gaixoak dituen akatsen formara eta tamainara moldatzeko gaitasuna daukatela frogatu dute. Adibidez, Bai eta lankideek [35] interakzio fisikoak eta gurutzaketa kimikoa konbinatzen dituen PNIPAAm-ean, ziklodextrinan eta adamantanoan oinarritutako hidrogel injektagarria garatu zuten. Ikertzaile horiek hezur konponketako probak egin zituzten, eta lortutako emaitzek frogatu zuten hazkuntza faktoreak eta zelulak hidrogel injektagarrietan hezur-ehuna 14 egunean erabat konpontzeko gai zirela.

Beste behar kliniko bat kartilago ehunen birsorkuntza da; izan ere, kartilagoaren lesio traumatikoek eta endekapenezko lesioek, oro har, pertsona helduen artean desgaitasunak sortu ohi dituzte. Horregatik, hidrogel injek-

tagarriek inpaktu kliniko handia daukate kartilagoaren hobekuntzan edo birsorkuntzan. Palumbo eta lankideek [5] kondrozitoak kapsulatzen *in situ* hidrogel bat ekoiztu eta ezaugarritu zuten. Gelifikazioa 30 minutuan gertatu zen, eta lortutako hidrokeleak hidrolisi entzimatoarekiko erresistentzia paregabea eskaintzen zuten (28 egun). Gainera, inkubazio egun baten ostean behatu zen kondrozitoak hidrogelaren barnean modu eraginkorrean ugaltzen zirela. Beste kasu arrakastatsu bat arlo honetan, aurretik aipatutako Feijen eta lankideen [32] kartilago ehunen birsorkuntzarako hidrogela da. Aurretik esandakoa goraiatuz, kitosanoan oinarritutako hidrogel horren erakuntza HRPk katalizatutako gurutzaketa entzimatoaren bitartez gertatu da, kitosanoa talde fenolikoekin eraldatu ostean. Emaitzek adierazi zuten hidrogel hau hautagai aproposa dela kartilago ehunen birsorkuntzarako. Izan ere, propietate mekanikoak (1-5.5 kPa) eta gelifikazio denbora (10 s-tik 4 min-ra) egokiez batera, kondrozitoen hazkuntza esperimenteruek gel horiek biobateragarritasun ona eta zelula ugalketako prozesua bultzatzen zituztela baieztatu zuten.

In situ hidrogelen beste aplikazio arlo bat gihar ehunen birsorkuntza da. Europako biztanleriari gehien erasaten dion gihar gaixotasuna gaixotasun arterial periferikoa da. Zoriturrez, gaur egun, muskulu eskeletiko iskemikoa sendatzeko terapia gutxi izaten dira, eta gaurko biomaterialen erabilera ez da guztiz eraginkorra izan, ez baitituzte gihar-mikroinguruak ondo imitatzen. Ke *et al.* [36] bezalako ikertzaileek kitosano/ β -glizerolfosfatoan eta kolagenoan oinarritutako hidrogel termosentikor bat garatu zuten giharehunen birsorkuntzarako. Ikertzaile horiek frogatu zuten hidrogel barnean ko-kultibatutako zelula ama mesenkimalek desberdintzeko gaitasuna zutela eta, ondorioz, hidrogel injektagarri horrek etorkizun oparoa zuela gihar-zelula eskeletikoen kultiborako.

4. ONDORIOAK

Baldintza fisiologikotik hurbil *sol-gel* trantsizioa duten polimeroak etorkizun oparoa erakusten ari dira Ehun Ingeniaritzan, hidrogel injektagarriak sintetizatzen aukera paregabea bilakatu direlako. Biomaterial horiek Ehun Ingeniaritzan asko erabili dira ehun ugari konpontzeko, gihar, kartilago edo hezur-ehunak esate baterako.

In situ gelifikazioa gertatzeko polimero sintetikoetan edo naturaletan oinarritzen diren hainbat mekanismo bereizten dira. Mekanismo horiek tenperatura, pH eta gatz kontzentrazio aldaketan ondorioz edo argi ultramorea- ren eta akzio entzimatoaren ondorioz gerta daitezke. Estimuluekiko erantzuteko gaitasun desberdina eta erretikulazio mekanismo desberdina duten polimeroen konbinazioak hidrogel injektagarrien munduan aurrerapen handiak egiteko aukera eskaintzen du. Ondorioz, hazkuntza, ugaltze eta dife-

rentziazio zelularra gertatzeko hiru dimentsioko mikroinguru biobateragarriak eratzeko aukera eskaintzen dute.

5. ESKER ONAK

Egileek dirulaguntza eskertzen dute (μ 4F, ELKARTEK, Grupos de Investigación, IT718-13).

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] MAITRA, J., SHUKLA, V. K. 2014. «Cross-linking in Hydrogels – A Review». *American Journal of Polymer Science*, **4**, 25-31.
- [2] JEONG, B., BAE, Y. H., LEE, D. S., KIM, S. W. 1997. «Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems». *Nature*, **388**, 860-862.
- [3] VARMA, D. M., GOLD, G. T., TAUB, P. J., NICOLL, S. B. 2014. «Injectable carboxymethylcellulose hydrogels for soft tissue filler applications». *Acta Biomaterialia*, **10**, 4996-5004.
- [4] ZHU, J. 2010. «Bioactive Modification of Poly(ethylenglykol) Hydrogels for Tissue Engineering». *Biomaterials*, **31**, 4639-4656.
- [5] PALUMBO, F. S., FIORICA, C., DI STEFANO, M., PITARRESI, G., GULINO, A., AGNELLO, S., GIAMMONA, G. 2015. «In situ forming hydrogels of hyaluronic acid and inulin derivatives for cartilage regeneration». *Carbohydrate Polymers*, **122**, 408-416.
- [6] CHOU, A. I., AKINTOYE, S. O., NICOLL, S. B. 2009. «Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells in vivo». *Osteoarthritis and Cartilage*, **17**, 1377-1384.
- [7] KONDIAH, P. J., CHOONARA, Y. E., KONDIAH, P. P. D., MARIMUTHU, T., KUMAR, P., DU TOIT, L. C., PILLAY, V. 2016. «A review of injectable polymeric hydrogel systems for application in bone tissue engineering». *Molecules*, **21**, 1324-1335.
- [8] MA, G., YANG, D., LI, Q., WANG, K., CHEN, B., KENNEDY, J. F., NIE, J. 2010. «Injectable hydrogels based on chitosan derivative / polyethylene glycol dimethacrylate / N, N-dimethylacrylamide as bone tissue engineering matrix». *Carbohydrate Polymers*, **79**, 620-627.
- [9] WANG, W. B., HUANG, D. J., KANG, Y. R., WANG, A. Q. 2013. «One-step in situ fabrication of a granular semi-IPN hydrogel based on chitosan and gelatin for fast and efficient adsorption of Cu²⁺ion». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **106**, 51-59.
- [10] YANGLING, L., CHANG, L., YING, T., KUN, X., CUGE, L., PIXIN, W. 2014. «In situ hydrogel constructed by starch-based nanoparticles via a Schiff base reaction». *Carbohydrate Polymers*, **110**, 87-94.

- [11] WIELAND, J. A., HOUCHIN-RAY, T. L., SHEA, L. D. 2009. «Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels Julie». *Journal of Controlled Release*, **120**, 233-241.
- [12] DRURY, J. L., MOONEY, D. J. 2003. «Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications». *Biomaterials*, **24**, 4337-4351.
- [13] KLOUDA, L., MIKOS, A. G. 2008. «Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications –a review». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**, 34-45.
- [14] TAN, H., MARRA, K. G. 2010. «Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications». *Materials*, **3**, 1746-1767.
- [15] RUEL-GARIÉPY, E., LEROUX, J. C. 2004. «In situ-forming hydrogels – Review of temperature-sensitive systems». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**, 409-426.
- [16] CHUNG, H. J., LEE, Y., PARK, T. G. 2008. «Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery». *Journal of Controlled Release*, **127**, 22-30.
- [17] ASSAAD, E., MAIRE, M., LEROUGE, S. 2015. «Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance». *Carbohydrate Polymers*, **130**, 87-96.
- [18] RIZWAN, M., YAHYA, R., HASSAN, A., YAR, M., AZZAHARI, A. D., SELVANATHAN, V., SONSUDIN, F., ABOULOULA, C. N. 2017. «pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications». *Polymers*, **9**, 4, 137.
- [19] ELISSEFF, J., ANSETH, K., SIMS, D., MCINTOSH, W., RANDOLPH, M., LANGER, R. 1999. «Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 3104-3107.
- [20] YU, F., CAO, X., L, Y., ZENG, L., YUAN, B., CHEN, X. 2014. «An injectable hyaluronic acid/PEG hydrogel for cartilage tissue engineering formed by integrating enzymatic crosslinking and Diels–Alder “click chemistry”». *Polymer Chemistry*, **5**, 1082-1090.
- [21] ALLCOCK, H. R., DUDLEY, G. K. 1996. «Lower critical solubility temperature study of alkyl ether based polyphosphazenes». *Macromolecules*, **29**, 1313-1319.
- [22] LI, J., STACHOWSKI, M., ZHANG, Z. Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications. 2015, pp. 259-298.
- [23] CHENITE, A., CHAPUT, C., WANG, D., COMBES, C., BUSCHMANN, M., HOEMANN, C., LEROUX, J., ATKINSON, B., BINETTE, F., SELMANI, A. 2000. «Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ». *Biomaterials*, **21**, 2155-2161.
- [24] CHENITE, A., BUSCHMANN, M., WANG, D., CHAPUT, C., KANDANI, N. 2001. «Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions». *Carbohydrate Polymers*, **46**, 39-47.

- [25] DRAGET, K. I., SKJAK BRAEK, G., SMIDSOD, O. 1994. «Alginate gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight». *Carbohydrate Polymers*, **25**, 31-38.
- [26] JEON, O., POWELL, C., SOLORIO, L. D., KREBS, M. D., ALSBERG, E. 2011. «Affinity-based growth factor delivery using biodegradable photocrosslinked heparin-alginate hydrogels». *Journal of Controlled Release*, **154**, 258-266.
- [27] HENNINK, W. E., VAN NOSTRUM, C. F. 2012. «Novel crosslinking methods to design hydrogels». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 223-236.
- [28] KIM, S. H., CHU, C. C. 2000. «Synthesis and characterization of dextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM». *Journal of Biomedical Materials Research*, **49**, 517-527.
- [29] BAHRAM, M., MOHSENI, N., MOGHTADER, M. Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels. 2015.
- [30] XIAO DING, X., XIAN ZHENG, Z., SI XUE, C., REN XI, Z., KENNEDY, J. F. 2007. «A strategy to introduce the pH sensitivity to temperature sensitive PNIPAAm hydrogels without weakening the thermosensitivity». *Carbohydrate Polymers*, **68**, 416-423.
- [31] TAI, H., HOWARD, D., TAKAE, S., WANG, W., VERMONDEN, T., HENNINK, W. E., STAYTON, P. S., HOFFMAN, A. S., ENDRUWEIT, A., ALEXANDER, C., HOWDLE, S. M., SHAKESHEFF, K. M. 2009. «Photo-cross-linked hydrogels from thermoresponsive PEGMEMA-PPGMA-EGDMA copolymers containing multiple methacrylate groups: Mechanical property, swelling, protein release, and cytotoxicity». *Biomacromolecules*, **10**, 2895-2903.
- [32] FEIJEN, J., JIN, R., TEIXEIRA, L. S. M., DIJKSTRA, P. J., KARPERIEN, M., BLITTERSWIJK, C. A. VAN, ZHONG, Z. Y. 2009. «Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering». *Biomaterials*, **30**, 2544-2551.
- [33] VAN VLIERBERGHE, S., DUBRUEL, P., SCHACHT, E. 2011. «Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review». *Biomacromolecules*, **12**, 1387-1408.
- [34] NIRANJAN, R., KOUSHIK, C., SARAVANAN, S., MOORTHI, A., VAIRAMANI, M., SELVAMURUGAN, N. 2013. «A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ β -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering». *International Journal of Biological Macromolecules*, **54**, 24-29.
- [35] BAI, X., LÜ, S., CAO, Z., GAO, C., DUAN, H., XU, X., SUN, L., GAO, N., FENG, C., LIU, M. 2016. «Self-reinforcing injectable hydrogel with both high water content and mechanical strength for bone repair». *Chemical Engineering Journal*, **288**, 546-556.
- [36] KE, D., YANG, Z., YU-LONG, Z., JIAN-ZHONG, X. 2013. «Injectable thermosensitive chitosan/-glycerophosphate/collagen hydrogel maintains the plasticity of skeletal muscle satellite cells and supports their in vivo viability». *Cell biology international*, **37**.