

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

2025

Noora Jalo

3D-tulostettujen alginaatti- implanttien geometrian vaikutus nisiinipeptidin vapautumisprofiiliin

Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikka

2025 | 61 sivua + 21 sivua liitteitä

Noora Jalo

3D-tulostettujen alginaatti-implanttien geometrian vaikutus nisiinipeptidin vapautumisprofiiliin

Opinnäytetyö suoritettiin Turun ammattikorkeakoululle, ja se oli osa 3D-Cure projektia. Opinnäytetyössä tutkittiin kolmen eri nisiiniä sisältävän hydrogeeli-implantin dissoluutiota ja implanttien kolmiulotteisen rakenteen vaikutusta nisiinipeptidin vapautumiseen. Nisiinin tarkoituksena oli simuloida pienimolekyylisiä biologista lääkeainetta. Lääkeaineiden kontrolloidun vapautumisen avulla voidaan optimoida lääkehoidon tehoa ja mahdollistaa yksilöllisten hoitoratkaisujen luominen.

Työssä optimoitiin tulostettavan hydrogeelin koostumus. Optimoidulla hydrogeelillä tulostettiin kolme implanttia: puolipallo, kartio ja tabletti. Implanteille suoritettiin dissoluutiokokeet vapautuvan nisiinimäärän selvittämiseksi. Implantteja liuotettiin viikon ajan ihmiskehoa simuloivissa olosuhteissa ja näytteitä otettiin tietyin väliajoin. Dissoluutionäytteet analysoitiin micro BCA-menetelmää käyttäen.

Implantit eivät pysyneet koossa dissoluutiokokeiden aikana, minkä vuoksi geometrian vaikutusta nisiinin vapautumisprofiiliin ei pystytty tarkastelemaan. Liukenemiskäyrien perusteella voidaan päätellä, että nisiiniä vapautui implanteista sekä diffuusiolla että liukenemalla. Viiden vuorokauden tarkastelujakson aikana puolipallojen vapautumisprosentit jäivät alle 85 %. Kartiot ja tabletit saavuttivat 100 % vapautumisen.

Asiasanat:

3D-tulostus, nisiini, proteiinipitoisuus, dissoluutio, vapautumisprofiili, hydrogeelit, ristosilloitus

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2025 | 61 pages + 21 pages in the appendix

Noora Jalo

Effect of geometry of 3D printed alginate implants on release profile of nisin

The thesis was commissioned by Turku University of Applied Sciences, and it was part of the 3D-Cure project. The thesis investigated the dissolution of three different hydrogel implants containing nisin and the effect of the three-dimensional structure of the implants on the release of nisin. The purpose of nisin was to simulate a small molecule biological drug. Controlled release of drugs can optimize the effectiveness of drug therapy and allow the creation of personalized treatment solutions.

The project involved optimizing the composition of the hydrogel to be printed. The optimized hydrogel was used to print three implants: a hemisphere, a cone and a tablet. Dissolution tests were performed to determine the amount of nisin released from the implants. The implants were dissolved for one week under conditions simulating the human body and sampled at regular intervals. Dissolution samples were analyzed using the micro BCA method.

The implants degraded during the dissolution tests, so the effect of geometry on the nisin release profile could not be examined. The dissolution curves suggest that nisin was released from the implants by both diffusion and dissolving. During the five-day observation period the release rates of hemispheres remained below 85%. Cones and tablets achieved 100% release.

Keywords:

3D printing, dissolution, nisin, hydrogels, release profile, cross-linking, protein concentration

Sisältö

Käytetyt lyhenteet	7
1 Johdanto	8
2 Nisiini	9
2.1 Nisiinin toiminta	11
2.2 Nisiinin analyysimenetelmät	11
2.3 Nisiinin käyttö	12
3 Hydrogeelit	14
3.1 Alginaatti	16
3.2 Ristisilloitus	19
4 3D-tulostus	22
4.1 3D-biotulostusprosessi	23
4.2 Biotulostusmenetelmät	24
4.3 Biotulostuksen sovellukset	26
4.4 Biotulostuksen tulevaisuus ja haasteet	27
5 Dissoluutio	29
5.1 Geometrian vaikutus lääkeaineen vapautumiseen	31
6 Kokeellinen osuus	33
6.1 Esiristisilloitus kalsiumkoridilla	33
6.2 Hydrogeelin valmistus ja koostumuksen optimointi	35
6.3 Geelin 3D-tulostusparametrit	39
6.4 Dissoluutiokokeet	41
6.4.1 Puolipallot	41
6.4.2 Kartiot	46
6.4.3 Tabletit	47
7 Tulokset	49
7.1 Puolipallot	49

7.2 Kartiot	50
7.3 Tabletit	53
7.4 Tulosten yhteenveto	54
8 Loppupohdinta	56
Lähteet	58

Liitteet

Liite 1. Dissoluutiokokeiden laskut	
Liite 2. Puolipallo 1 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 3. Puolipallo 2 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 4. Puolipallo 3 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 5. Kartio 1 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 6. Kartio 2 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 7. Kartio 3 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 8. Tabletti 1 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 9. Tabletti 2 dissoluutiokokeen tulokset	
Liite 10. Tabletti 3 dissoluutiokokeen tulokset	

Kuvat

Kuva 1. Nisin A rakenne (Kamal ym. 2022).	9
Kuva 2. Hydrogeelien rakenne (muokattu Li & Mooney 2016).	14
Kuva 3. Alginaatin kemiallinen rakenne (Paques ym. 2014).	16
Kuva 4. Alginaattigeelin muodostuminen kalsiumioni ristosilloituksella (Paques ym. 2014).	18
Kuva 5. 3D-tulostusprosessin vaiheet (muokattu Gu ym. 2020).	24
Kuva 6. 3D-tulostusmenetelmät (muokattu faCellitate 2025.).	25
Kuva 7. 5 m-% nisiini + 3 m-% alginaatti + 27,7 m-% CaCl ₂ geelin valmistus.	36

Kuva 8. 2,5 m-% nisiini + 3 m-% alginaatti + 27,7 m-% CaCl ₂ geelin valmistus.	37
Kuva 9. Tulostetut muodot.	39
Kuva 10. Puolipallojen dissoluutiotesti.	42
Kuva 11. Kartioiden dissoluutiokoe.	47
Kuva 12. Tablettien dissoluutiokoe.	48

Kuviot

Kuvio 1. Standardisuora.	44
Kuvio 2. Alustava puolipallojen kumulatiivinen vapautumiskäyrä.	45
Kuvio 3. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti puolipalloista.	50
Kuvio 4. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti kartioista.	51
Kuvio 5. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti 0–8 h välillä kartioista.	52
Kuvio 6. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti tableteista.	54
Kuvio 7. Keskiarvot implanttien nisiinin kumulatiivisista vapautumisprosentteista.	55

Taulukot

Taulukko 1. Tulostusparametrit.	39
Taulukko 2. Kappaleiden mitat, painot ja nisiinin määrä kappaleissa.	40
Taulukko 3. Näytteenottoaikataulu.	42
Taulukko 4. Nisiini standardien valmistus.	43
Taulukko 5. Puolipallo 1 alustavat tulokset.	45

Käytetyt lyhenteet

Amfifiilinen	Amfifiilisessä yhdisteessä on sekä vesiliukoinen (hydrofiilinen), että rasvaliukoinen (hydrofobinen) osa (Tieteen termipankki 2025a).
BCA	Bisinkoniinihappo kokonaisproteiinin määrittäminen. (<i>engl.</i> bicinchoninic acid assay)
Biomuste	Biomusteet ovat yleensä hydrogeelejä, jotka pystytään tulostamaan ja jotka kykenevät pitämään tulostetun rakenteen (Golebiowska ym. 2019).
Diffuusio	Diffuusiolla aineet liikkuvat suuremmasta pitoisuudesta pienempään, kunnes pitoisuusero on tasoitettu. Diffuusio tapahtuu itsestään, eikä siihen tarvita ulkopuolista energiaa. (Solunetti 2006.)
<i>In vitro/vivo</i>	<i>In vitro</i> tarkoittaa koeolosuhteita, jotka tapahtuvat elimistön, eliön tai muun luonnollisen ympäristön ulkopuolella. Normaalisti tapahtuva reaktio toteutetaan esimerkiksi koeputkessa. <i>In vivo</i> puolestaan tarkoittaa koetta, joka tapahtuu elävässä elimistössä, solussa, kudoksessa tai muussa luonnollisessa biologisessa ympäristössä. (Tieteen termipankki 2025b; Tieteen termipankki 2025c.)

1 Johdanto

Lääkeaineiden hallittu vapautuminen on keskeinen tutkimusalue biolääketieteessä, sillä sen avulla voidaan tuottaa henkilökohtaisia ratkaisuja ja optimoida lääkehoidon tehoa. Opinnäytetyön aiheena on nisiinin vapautumisprofiilin tutkiminen 3D-tulostettujen hydrogeelikappaleiden avulla. Nisiini on luonnollinen antimikrobinen peptidi, jota hyödynnetään laajasti elintarvike ja biolääketieteellisissä sovelluksissa sen tehokkaan antibakteerisen aktiivisuuden ansiosta. Opinnäytetyön tavoitteena on selvittää 3D-tulostetun hydrogeelin geometrisen muodon vaikutusta vapautuvan nisiinin määrään. Työ toteutettiin Turun ammattikorkeakoululle osana 3D-Cure projektia.

Aiheen valinta perustuu 3D-tulostuksen kasvavaan merkitykseen lääketieteessä, sekä personoidun lääkehoidon tarpeeseen. 3D-tulostuksen avulla voidaan suunnitella ja valmistaa rakenteita, joiden avulla lääkeaineen vapautumista voidaan optimoida halutulla tavalla. Biomateriaalien ja 3D-tulostuksen yhdistäminen lääketieteellisiin sovelluksiin on nopeasti kehittyvä ala ja tämä tutkimus tarjoaa lisää tietoa 3D-tulostettujen hydrogeelien käytöstä lääkeaineiden hallitussa vapautumisessa.

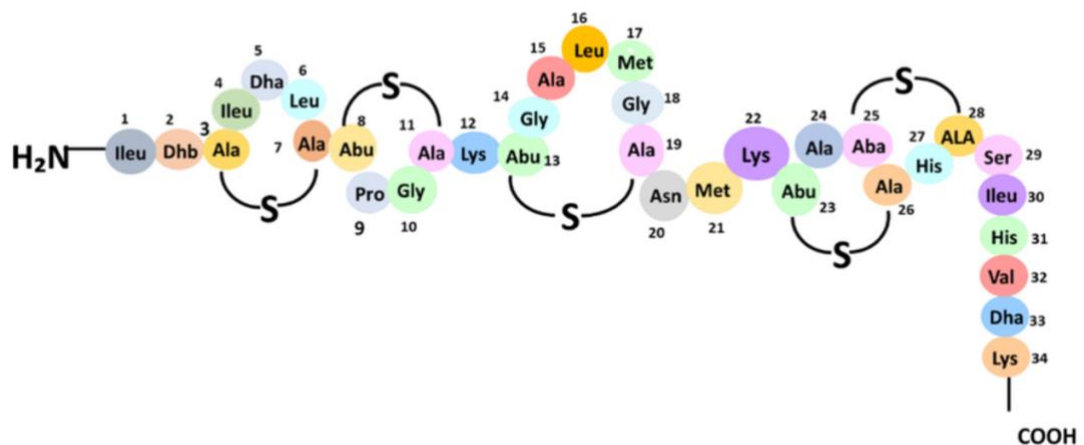
Hydrogeelit ovat lupaavia lääkeannostelun välineitä niiden korkean vesipitoisuuden ja bioyhteensopivuuden ansiosta. Hydrogeelikappaleet suunniteltiin simuloimaan lääkeimplanteja, joiden kehityksessä on keskeistä ymmärtää materiaalin rakenteen ja muodon vaikutus vaikuttavan aineen vapautumiseen. Tämä tieto on olennaista erityisesti silloin, kun tavoitteena on saavuttaa pitkäkestoinen ja tasainen lääkeaineen vapautuminen.

Tässä tutkimuksessa keskitytään nisiinin vapautumisnopeuden analysointiin ja sen riippuvuuteen hydrogeelikappaleiden muodosta. Kolme erilaista muotoa – tabletti, kartio ja puolipallo – valittiin tarkasteltavaksi. Hypoteesina oli, että kappaleen pinta-ala vaikuttaa lääkeaineen diffuusionopeuteen. Suuremman pinta-alan omaava kappale pystyy vapauttamaan enemmän nisiiniä nopeammin.

2 Nisiini

Työssä nisiiniä käytettiin pienmolekyylilääkettä simuloivana aineena hydrogeeli-implanteissa. Käytetty nisiini oli ultrapuhdasta nisiini A:ta, jotta välttyttiin muissa kaupallisissa nisiinivalmisteissa esiintyviltä sivutuotteilta. Nisiini on lisäksi vesiliukoinen ja sen analysointi onnistuu BCA-menetelmällä, mikä mahdollistaa implanteista vapautuneen nisiinin määrän tarkastelun.

Nisiinit ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan samankaltaisten antimikrobisten polypeptidien ryhmä, joita tuotetaan käymisprosessin avulla *Lactococcus lactis* -bakteerissa. Nisiini toimii yleisnimenä eri variantille, jotka eroavat toisistaan hieman aminohapposekvensseiltään ja rakenteiltaan, mikä voi vaikuttaa myös niiden antimikrobisiin ominaisuuksiin. Tähän mennessä on tunnistettu 12 nisiinin luonnollista muunnosta. (FAO 2013; Chan ym. 2023.) Tärkein tuotettu polypeptidi on Nisiini A (Kuva 1). Nisiiniä tuotetaan fermentoimalla steriilissä väliaineessa, joka sisältää rasvatonta maitojauhetta tai muita maidottomia vaihtoehtoja, kuten hiivaa ja hiilihydraattien kuiva-ainesta. (FAO 2013.)



Kuva 1. Nisin A rakenne (Kamal ym. 2022).

Kun käyminen on päättynyt, nisiini konsentroidaan ja puhdistetaan käyttämällä tekniikoita kuten steriiliä injektiota, kalvosuodatusta, happamoittamista, suolasaostusta, ultrasuodatusta tai sumutuskuivatusta. Puhdistettu nisiini

sekoitetaan sitten natriumkloridiin, jotta saavutetaan haluttu aktiivisuustaso. (FAO 2013.)

Nisiini liukenee parhaiten happamissa ympäristöissä ja nisiinin liukoisuus vähenee pH:n noustessa. Nisiinin liukoisuus pH 2,2:ssa on 56 000 mg/l, kun taas pH:ssa seitsemän se laskee jo 1 000 mg/l:ssa. Elintarvikesäilytyksessä tarvittava nisiinipitoisuus harvemmin ylittää yli 50 mg/ml, joten liukoisuus on harvoin rajoittava tekijä nisiinin kanssa toimittaessa elintarviketeollisuudessa. (Williams & Delves-Broughton 2003.) Kokeellisessa osuudessa nisiinin liukoisuus muodostui haasteeksi. Nisiiniä yritettiin ensin liuottaa neutraalissa pH:ssa, joka vastaa paremmin ihmiskehon olosuhteita. Nisiinin liukoisuus jäi kuitenkin alhaiseksi, minkä takia hydrogeelin valmistusprosessia jouduttiin muokkaamaan. Tavoitteena oli saada implanteista vapautumaan vähintään 2 µg/ml nisiiniä, jotta se olisi analysoitavissa micro BCA-menetelmällä.

Kaupallinen nisiinivalmiste on erittäin stabiili ja säilyttää aktiivisuutensa vähintään kaksi vuotta, kun se säilytetään kuivassa, valolta suojatussa tilassa alle 25 °C:ssa (Williams & Delves-Broughton 2003). Nisiini kestää kuumuutta happamissa ympäristöissä pH 3:een asti. (FAO 2013).

Kaupallisesti nisiiniä myydään useimmiten valmisteena, joka sisältää 2,5 m-% nisiiniä ja yli 50 m-% natriumkloridia. Muita ainesosia ovat lisäksi maitojauhe ja käymisen sivutuotteet kuten proteiinit ja hiilihydraatit. (FAO 2013.) Nisiiniä on saatavilla myös ultrapuhaana versiona, joka sisältää 95 % nisiiniä (Handary 2025). Sivutuotteet saattavat aiheuttaa sameaa suspensiota vedessä, mutta ne eivät vaikuta nisiinin tehokkuuteen (Williams & Delves-Broughton 2003). Nisiinin aktiivisuus mitataan kansainvälisinä yksikköinä (international unit, IU), joissa 1 IU vastaa 0,025 µg nisiiniä (FAO 2013). Nisiinin aktiivisuus perustuu määritelmään, jossa sen määrä ilmaistaan pitoisuutena, joka tarvitaan estämään yhden *Streptococcus agalactia*- solun kasvu yhdessä millilitrassa kasvatusmediumia (Williams & Delves-Broughton 2003).

2.1 Nisiinin toiminta

Vaikka nisiinivariantteja on monenlaisia, ne kaikki kuuluvat bakteriosiiniperheeseen eli pieniin mikrobilääkepeptideihin, joita esiintyy luonnostaan. Bakteriosiinit, kuten nisiini, auttavat estämään bakteerien, sienten ja joidenkin loisten kasvua erityisesti, kun saatavilla on rajoitetusti ravinteita. (Chan ym. 2023.)

Nisiini on erittäin tehokas hyvin alhaisissa pitoisuuksissa, ja sillä on vahva aktiivisuus monia grampositiivisia bakteereja, myös merkittäviä elintarvikepatogeeniä ja antibiooteille vastustuskykyisiä kantoja vastaan. Sen vaikutuksia gramnegatiivisiin bakteereihin ei kuitenkaan tunneta yhtä hyvin. Nisiinin teho gramnegatiivisia bakteereja vastaan on rajallinen, ellei sitä yhdistetä muihin aineisiin. (Chan ym. 2023.)

Vaikka monissa tutkimuksissa on tutkittu nisiinin antibakteerista mekanismia, se on edelleen vain osittain ymmärretty. Yleisimmin hyväksytyyn teorian mukaan nisiini toimii kationisen pinta-aktiivisen aineen tavoin hyödyntäen amfifiilistä rakennettaan häiritäkseen bakteerien solukalvojen muodostumista. Nisiini siis tuottaa reikiä bakteerien solukalvoon estäen näin niiden toiminnan. (Chan ym. 2023.)

2.2 Nisiinin analyysimenetelmät

Agardiffuusiomääritys on yleisimmin käytetty menetelmä nisiinin analysoimiseksi elintarvikenäytteistä. Tällä menetelmällä voidaan mitata antimikrobista aktiivisuutta tiettyjä indikaattoribakteerikantoja vastaan. Tällä menetelmällä on kuitenkin useita rajoituksia, kuten testattavan organismin valinta, käymisliemen tai elintarvikeuutteiden sisältämien aineiden mahdolliset häiriöt, näytteiden alhaisen pH:n vaikutus sekä agarin pitoisuuden ja syvyyden vaihtelut. (Soliman & Donkor 2010.)

Nisiiniä voidaan analysoida myös käyttämällä immunomäärityksiä ja biomäärityksiä. Immunomääritykset ovat erittäin herkkiä pienille pitoisuuksille.

Tästä huolimatta ne eivät ole täysin luotettavia, koska ne voivat aiheuttaa ristireaktioita rakenteellisesti samankaltaisten yhdisteiden kanssa.

Bioanalyseilla on puolestaan useita haittoja, kuten pitkät analyysiajat, vaativa näytteen valmistus ja haasteet useiden näytteiden samanaikaisessa käsittelyssä. Lisäksi bioanalyysien spesifisyys ja herkkyys ovat usein alhaisia. Nisiini määrittämisessä on viime aikoina käytetty myös entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä (ELISA). Menetelmän herkkyys ja tarkkuus ovat korkeat, yleensä muutaman prosentin luokkaa. ELISA pystyy kuitenkin havaitsemaan sekä aktiivisen että inaktiivisen nisiinin, minkä vuoksi se ei sovellu aktiivisuuteen perustuviin määrittämiin. (Soliman & Donkor 2010.)

Nisiinin pitoisuus voidaan myös määrittää käyttämällä korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). Tässä menetelmässä nisiiniä sisältävä nestemäinen näyte analysoidaan käyttämällä hydrofobista C18 kapeapohjaista HPLC-kolonnaa, ja gradientteliuutinta. Nisiinin pitoisuus määritetään mittaamalla kromatogrammin piikin pinta-ala ja vertaamalla sitä standardivalmisteseen. Tämä menetelmä mahdollistaa tarkan kvantifoinnin, jonka havaitsemisraja on noin 10 mg/l. (Williams & Delves-Broughton 2003).

BCA on kolorimetrinen menetelmä, jota käytetään kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämiseen. Tämä menetelmä on yhteensopiva amfiifilisten molekyylien kanssa ja perustuu bikinokiinihappokemiaan (BCA). Menetelmä toimii Biuret-reaktiolla pelkistämällä kupari-ioneja ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) emäksisessä ympäristössä. Syntyvät kupari-ionit (Cu^+) muodostavat BCA:n kanssa violetinvärisen kompleksin. Tämä kompleksi absorboi valoa 562 nm:ssä. Valon absorptaatio on melkein lineaarinen proteiinkonsentraation suhteen. Reaktioherkkyys riippuu proteiinin rakenteesta, peptididisidoksista ja tiettyjen aminohappojen esiintymisestä. (Thermo Fisher Scientific Inc 2025.)

2.3 Nisiinin käyttö

Alun perin nisiiniä käytettiin elintarvikkeiden säilöntään sen vahvojen antibakteeristen ominaisuuksien ja turvallisuuden vuoksi. Viime vuosikymmenen

aikana noin 37 % nisiiniä koskevasta julkaistusta tutkimuksesta on kuitenkin keskittynyt biolääketieteellisiin sovelluksiin, kun taas vain 29 % on omistettu sen käytölle elintarviketeollisuudessa. (Chan ym. 2023.)

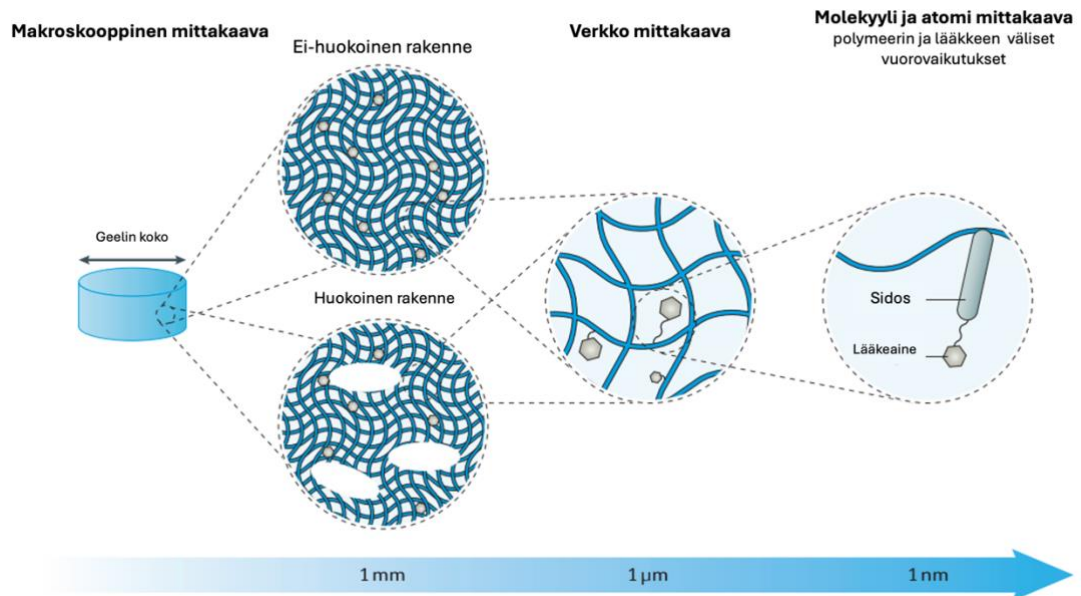
Nisiiniä käytetään yleisesti säilöntäaineena maitotuotteissa, säilykkeissä, kasviproteiineissa, suolakurkuissa ja pikkelöidyssä lihassa. Viime aikoina sen sovellukset ovat laajentuneet elintarviketeollisuuden lisäksi biolääketieteeseen. Antimikrobisten ominaisuuksiensa, amfiifiilisen luonteensa, vähäisen myrkyllisyytensä ja stabiilisuutensa vuoksi nisiiniä on tutkittu käytettäväksi systeemisten infektioiden hoidossa, syöpähoitossa, bio-nanomateriaaleissa, elintarvikepakkausissa, eläinlääketieteessä, naisten terveydessä, ehkäisyssä ja ihonhoidossa. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on selvitetty nisiinin potentiaalia hammaslääketieteellisten ongelmien ratkaisemisessa palauttamalla suun mikrobiologinen tasapaino. (Chan ym. 2023.)

Tutkijat ovat tunnistaneet ja tutkineet sekä luonnollisia että geneettisesti muunnettuja nisiinivariantteja, joilla kullakin on ainutlaatuisia mikrobilääkeominaisuuksia, mitkä soveltuvat eri tarkoituksiin. Nisiini on osoittanut tehokkaita antibakteerisia vaikutuksia sekä *in vivo* että *in vitro* tutkimuksissa ja se on osoittanut hyvää bioturvallisuutta, bioyhteensopivuutta ja kykyä toimia vuorovaikutuksessa bakteerien solukalvojen kanssa. Joidenkin tutkimusten mukaan nisiinillä on myös anti-biofilmiominaisuuksia, jotka voivat estää bakteerien ja jopa kasvainten kasvua. Lisäksi sitä on yhdistetty perinteisiin lääkkeisiin ja biologisiin materiaaleihin, kuten nanorakenteisiin ja biofilmeihin, sen vaikutusten tehostamiseksi ja optimoimiseksi. (Chan ym. 2023.)

Tällä hetkellä suuri osa tutkimuksesta keskittyy nisiiniä sisältäviin materiaaleihin, mikä korostaa sen mahdollisuuksia vähentää antibioottien käyttöä, minimoida sivuvaikutuksia ja torjua antibioottiresistenssiä kliinisissä ympäristöissä. Tulevaisuudessa nisiinin ja muiden hoitomuotojen uudet yhdistelmät voivat johtaa innovatiivisiin sovelluksiin. (Chan ym. 2023.)

3 Hydrogeelit

Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia, ristosilloitettuja hydrofiilisiä polymeerien verkostoja, jotka voivat imeä itseensä runsaasti nestettä samalla kuitenkin säilyttäen rakenteensa (Kuva 2). Hydrogeelien kolmiulotteisessa rakenteessa hydrofiiliset polymeerit linkittyvät toisiinsa verkkomaisesti. Tämän verkkorakenteensa ansiosta hydrogeelit voivat paisua imemällä suuria määriä nesteitä säilyttäen rakenteensa. Hydrogeelien valmistuksessa polysakkarideilla on useita etuja synteettisiin polymeereihin verrattuna. Vaikka luonnollisilla polysakkarideilla on rajoituksia prosessoinnissa ja reaktiivisuudessa, voidaan niitä käyttää modifioinnin jälkeen (ristisilloitus, sekoitus). Polysakkaridit, kuten natriumalginaatti, ovat erityinen kiinnostuksen kohde niiden biologisen yhteensopivuuden ja biologisen hajoavuutensa ansiosta. (Abasalizadeh ym. 2020.)



Kuva 2. Hydrogeelien rakenne (muokattu Li & Mooney 2016).

Makroskooppisella tasolla hydrogeelien rakenteet voivat olla joko ei-huokoisia tai huokoisia. Huokosten koko voi vaihdella 10–500 μm välillä. Kuvassa 2 nähdään, että mikroskooppisella tasolla polymeerimolekyylien välinen etäisyys

toisistaan on säädettävissä ja vaihtelee tyypillisesti noin 5–100 nm:n välillä. Molekyylit tai atomitasolla lääkkeet voivat olla vuorovaikutuksessa polymeeriverkoston kanssa eri mekanismeilla. Yksi esimerkki on Kuvassa 2 esitetty kovalenttisen sidoksen muodostuminen lääkkeen ja polymeeriketjun välille. (Li & Mooney 2016.)

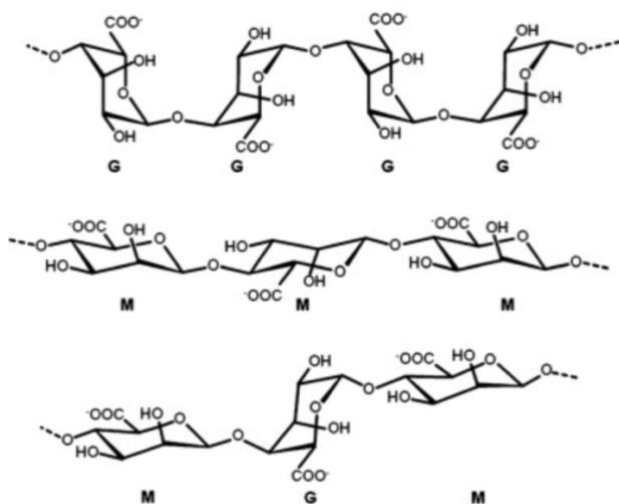
2D- ja 3D-kudosteknologiassa hydrogeelien käyttö on yleistä. Hydrogeelien säädettävissä olevat mekaaniset ominaisuudet, hallittu hajoaminen ja kyky funktionalisoida tekevät niistä ihanteellisia jäljittelemään natiivia solunulkoista matriisia (ECM). Injektoitavat hydrogeelit ovat paljon tutkittuja ja tärkeitä kliinisessä käytössä. Injektoitavien hydrogeelien on kyettävä virtaamaan kohtalaisessa paineessa, muodostamaan nopeasti geeli ja säilyttämään rakenteellinen eheys valmistuksen jälkeen. Kun injektotavia hydrogeelejä käytetään biomusteina, ne yhdistetään soluihin tai muihin biokemiallisiin komponentteihin, kuten ECM-molekyyleihin. Ominaisuuksiltaan ihanteellisten hydrogeelien kehittäminen biomusteina käytettäviksi on edelleen merkittävä haaste, sillä vain harvat hydrogeelit täyttävät tarvittavat vaatimukset. (Guvendiren ym. 2017.)

3D-biotulostuksessa yleisesti käytetyt hydrogeelit ovat peräisin joko luonnollisista polymeereistä, kuten algiinatista, gelatiinista, selluloosasta ynnä muusta tai synteettisistä polymeereistä, kuten polyuretaanista ja poly(etyleeniglykolista). Ne voivat olla myös synteettisten ja luonnollisten polymeerien sekoituksia. Näiden hydrogeelien geeliytymisprosessia ja fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia voidaan säätää kemiallisin, fysikaalisin tai entsyymaattisin keinoin tai hyödyntämällä herkkyttä lämpötilalle tai pH:lle. (Guvendiren ym. 2017.)

Monikerroksisten rakenteiden aikaansaamiseksi tarvitaan yleensä suuria polymeeripitoisuuksia. Tiheät hydrogeelirakenteet voivat kuitenkin vaikuttaa negatiivisesti solujen kapseloitumiseen rajoittamalla ravinteiden ja aineenvaihdunnan tuotteiden kulkeutumista, rajoittamalla rakenteen uudelleenmuodostumista ja estämällä tulostetun rakenteen toiminnallista integroitumista. (Guvendiren ym. 2017.)

3.1 Alginaatti

Alginaatti on vesiliukoinen lineaarinen polysakkaridi, joka koostuu epäsäännöllisistä β -D-mannuronihappolohkoista (M), sekä 1–4-sidoksisesta α -L-guluronihappo (G) jäämistä (kuva 3). Alginaatin rakenne koostuu homogeenisista lohkoista, joissa on peräkkäin vain M tai G lohkoja (poly-M, poly-G) tai sekalohkoista (MG). Näiden lohkojen järjestys aiheuttaa erilaisia geometrioita G-lohkossa, M-lohkossa ja vuorottelevilla alueilla. Alginaatin geelilujuus riippuu G-lohkojen osuudesta, sekä polymeerin molekyyllipainosta. Vaikka algiinihappo itsessään ei liukene veteen tai orgaanisiin liuottimiin, sen monovalenttiset suolamuodot ovat vesiliukoisia ja muodostavat stabiileja liuoksia. pH:n laskeminen alle pKa- alueen 3,38–3,65 johtaa kuitenkin alginaatin saostumiseen. Liukoisuuteen vaikuttavat myös ionivahvuus ja hyytelöivien ionien läsnäolo. (Abasalizadeh ym. 2020.)



Kuva 3. Alginaatin kemiallinen rakenne (Paques ym. 2014).

Alginaatteja uutetaan ruskolevien soluseinistä sekä tietyistä bakteereista. Näistä lähteistä voidaan saada alginaattia jopa 40 % kuivapainosta. Termi alginaatti viittaa algiinihappoon ja sen johdannaisiin, myös suoloihin. Alginaatin uutaminen aloitetaan käsittelemällä levää laimealla suolahapolla. Tämän jälkeen suodatettuun uutteeseen lisätään natriumkloridia tai kalsiumkloridia, jolloin natrium- tai kalsiumalginaattikuidut saostuvat. Näitä käsitellään edelleen

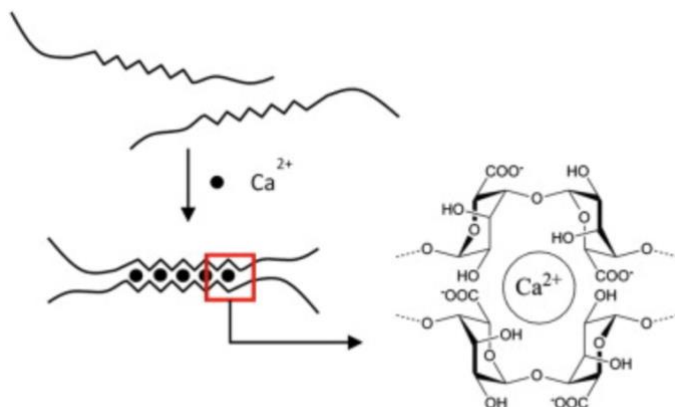
happokäsittelyn puhdistuksen ja lyofilisoinnin avulla, jolloin saadaan natriumalginaattijauhetta. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Alginaattia on kaupallisesti saatavilla eri koostumuksissa, molekyylipainoissa ja M- ja G-lohkon rakenteiden jakaumina. Nämä kaikki vaikuttavat alginaatin fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin, kuten viskositeettiin, nesteestä geeliksi muuttumiseen ja veden imeytymiseen. Alginaattiliuosten viskositeetti on pH riippuvainen: pH:n laskiessa viskositeetti kasvaa, mikä johtuu alginaattirungon karboksyyliyhmiin protonoitumisesta, mikä johtaa vetysidosten muodostumiseen. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Kaupallisissa tuotteissa alginaatin molekyylipaino on yleensä 33 000–400 000 g/mol. Suuremman molekyylipainon omaava alginaatti johtaa viskoosisempään liuokseen ja voi vaikuttaa merkittävästi sen muodostamien geelien fysikaalisiin ominaisuuksiin. Vaikka yksiarvoiset alginaattisuolat ja -esterit ovat vesiliukoisia, itse algiinihappo on liukenematon sekä veteen että orgaanisiin liuottimiin. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Alginaatin käyttäytyminen alhaisessa pH:ssa riippuu sen rakenteesta: poly-M- tai poly-G-alginaatit saostuvat, kun taas MG-lohkojen vuorotteleva rakenne pysyy liukoisessa tilassa. Näiden ainutlaatuisten ominaisuuksiensa ansiosta alginaatti on arvokas elintarvike- ja lääketeollisuudessa, jossa sitä käytetään suspensioiden ja emulsioiden stabilointiaineena, sakeuttamisaineena ja viskositeetin lisääjänä. Sen kyky siirtyä neste- ja geelitilojen välillä mahdollistaa puolikiinteiden tai kiinteiden rakenteiden muodostamisen. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Alginaatin geelilytyminen tapahtuu hellävaraisissa olosuhteissa käyttäen myrkyttömiä aineita. Tässä prosessissa gluronihappoyksiköiden natriumionit korvataan kaksiarvoisilla kationeilla, kuten Ca^{2+} :lla, jotka ristisilloittavat polymeeriketjut ”munakennomallin” avulla (kuva 4). Vaihtoehtoisesti geelilytyminen voidaan saavuttaa laskemalla pH-arvo alle alginaattimonomeerin pKa:n, tyypillisesti käyttämällä esimerkiksi d-glukonolaktonia. (Abasalizadeh ym. 2020.)



Kuva 4. Alginaattigeelin muodostuminen kalsiumioni ristosilloituksella (Paques ym. 2014).

Geelytymisnopeus on keskeinen tekijä prosessin hallinnassa, sillä hitaampi geelytyminen takaa paremman mekaanisen eheyden ja tasaisemmat geelirakenteet. Kalsiumkationien tiedetään auttavan nopeaa ja hallitsematonta alginaatin geelytymistä. Karboksylaatti- ja fosfaattiryhmät voivat kuitenkin kilpailla kalsiumionien kanssa hidastaen geelytymisprosessia. Kalsiumkloridi, joka on ensisijainen kalsiumionien lähde, johtaa nopeaan ja hallitsemattomaan geelytymiseen, kun taas huonommin liukenevat kalsiumlähteet, kuten kalsiumsulfaatti ja kalsiumkarbonaatti, hidastavat geelin muodostumista. Myös lämpötila vaikuttaa geelytymisnopeuteen, sillä alhaisemmat lämpötilat vähentävät kalsiumionien reaktiivisuutta. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Alginaatin M/G-suhde on toinen kriittinen tekijä, joka vaikuttaa sen fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin. Tämä suhde vaihtelee eri ruskolevälajien välillä ja jopa saman kasvin osien sisällä. G-lohkot ovat taipuneita tai vääristyneitä, kun taas M-lohkoilla on nauhamainen rakenne. Ainoastaan G-lohkot osallistuvat molekyylien väliseen ristosilloittumiseen kaksiarvoisten kationien, kuten Ca^{2+} :n kanssa muodostaen timantinmuotoisia onkaloita, joihin Ca^{2+} -ionit mahtuvat. Runsaasti G-lohkoja sisältävät alginaattigeelit ovat jäykkiä, mekaanisesti vakaita ja huokoisia, ja niiden kutistuminen on minimaalista geelytymisen aikana. Niissä ei myöskään ole merkittävää turpoamista

kuivauksen jälkeen. Enemmän M-lohkoja sisältävät alginaattigeelit ovat puolestaan pehmeämpiä ja joustavampia. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Kaupallisesti alginaatti on usein saatavana natriumalginaattijauheena. Uuttoprosessi on suoraviivainen ja se aloitetaan yleensä laimealla mineraalihanalla kuivattujen levien käsittelemiseksi. Syntynyt algiinihappo muunnetaan vesiliukoiseksi natriumalginaatiksi natriumkarbonaatin avulla, joka voidaan sitten muuntaa muihin muotoihin tarpeen mukaan. Natriumalginaatti on suosittu hyytelöimisaine mm. elintarviketeollisuudessa.

Natriumalginaattihydrogeelit ovat hyödyllisiä bioaktiivisten molekyylien kontrolloidun vapautumisen kannalta ja natriumalginaattia käytetäänkin paljon kudosteknologiassa. (Abasalizadeh ym. 2020.)

3.2 Ristisilloitus

Työssä tulostettavat hydrogeelikappaleet tulee ristisilloittaa, jotta niitä voidaan käsitellä. Ilman ristisilloittamista hydrogeelikappaleet eivät ole tarpeeksi vahvoja liikutettavaksi. 3 % alginaattigeeli ei myöskään yksinään ole riittävän vahvaa säilyttääkseen muotonsa tulostuksen aikana. Geelin rakenteen vahvistamiseksi se on esiristisilloitettava jo geelin valmistusvaiheessa lisäämällä siihen kalsiumkloridia, jotta tietty määrä karboksyyliyhdistä saadaan ristisilloitettua. Työssä ristisilloitukseen käytettiin ioniristisilloitusta kalsiumkloridin avulla.

Hydrogeelimusteen suunnittelussa luodaan polymeeriliuos, joka muodostaa verkoston välittömästi tulostuksen jälkeen joko fysikaalisen tai kemiallisen ristisilloittumisen avulla. Ristisilloittuminen voi käynnistyä ulkoisten ärsykkeiden kuten valon, lämpötilan tai ionikonsentraation vaikutuksesta. Fysikaalisesti ristisilloitetut hydrogeelit ovat edullisia, koska niissä vältetään kemiallisten aineiden käyttöä ja vähennetään näin myrkyllisyyttä. Ne ovat kuitenkin mekaanisesti vähemmän kestäviä kuin kemiallisesti ristisilloitetut hydrogeelit, jotka muodostavat kovalenttisia sidoksia. Kemiallisesti ristisilloitetut hydrogeelit ovat mekaanisesti vakaampia, mutta ne ovat alttiita merkittävämmille tilavuuden muutoksille. (Guvendiren ym. 2017.)

Alginaattihydrogeelejä voidaan ristosilloittaa eri menetelmillä. Yleisin käytetty tekniikka on ioninen ristosilloitus, mutta myös kovalenttisella ristosilloittamisella, faasimuutoksella (lämpögeelytyminen), soluristosilloituksella ja vapaiden radikaalien polymerisaatiolla voidaan ristosilloittaa alginaatti hydrogeelejä. (Gajić ym. 2023.)

Alginaattihydrogeelien ioniseen ristosilloittamiseen käytetään yleensä kaksiarvoisia kationeja, kuten Ca^{2+} ja Mg^{2+} , jotka ovat vuorovaikutuksessa polymeerin G-lohkojen kanssa muodostaen ionisilloja ja luoden ”munalaatikkorakenteen”. M-lohkoilla on myös heikko vuorovaikutus näiden kationien kanssa. Kalsiumkloridi on yleisin ristosilloitusaine, mutta sen käyttö johtaa nopeaan geelytyymiseen, koska se liukenee hyvin helposti veteen, jolloin geelin tasaisuutta ja lujuutta on vaikea hallita. Geelytyymisen hidastamiseksi voidaan käyttää vähemmän liukenevia aineita, kuten kalsiumsulfaattia tai kalsiumkarbonaattia, jotka pidentävät alginaatin geelytyymisaikaa. Lisäksi fosfaattipuskurit voivat kilpailla alginaatin karbosylaattiryhmien kanssa kalsiumioneista, mikä vähentää entisestään geelytyymisnopeutta. Lämpötilalla on myös ratkaiseva merkitys: sen alentaminen hidastaa kaksiarvoisten kationien reaktiota, jolloin geelytyminen hidastuu ja mekaaniset ominaisuudet paranevat, koska ristosilloitettu verkosto on järjestäytyneempi. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Kovalenttisessa ristosilloittamisessa käytetään silloitusaineita kahden polymeeriketjun yhdistämiseen funktionaalisten ryhmien (-OH, -COOH ja -NH₂) ja silloitusaineiden välisten reaktioiden avulla. Alginaattigeeleissä kovalenttinen ristosilloittuminen tapahtuu tyypillisesti, kun eri alginaattihaarojen karboksyyli-ryhmät reagoivat primaarisia diamiineja sisältävän ristosilloittajan kanssa. Tuloksena syntyvien hydrogeelien mekaanisiin ominaisuuksiin ja turpoamiskäyttäytymiseen vaikuttavat käytetyn silloitusaineen tyyppi ja silloitustiheys. Suurempi silloitustiheys parantaa mekaanista lujuutta, kun taas turpoamisominaisuuksiin vaikuttaa enemmän silloittavien molekyylien luonne. Hydrofiilisten silloitusaineiden käyttö voi auttaa säilyttämään geelin hydrofiilisen

luonteen silloitusprosessista huolimatta, jolloin nämä hydrogeelit soveltuvat biolääketieteellisiin sovelluksiin. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Soluristisilloittuminen tarkoittaa solujen kykyä osallistua geelinmuodostukseen sitoutumalla polymeeriketjujen ligandeihin. Vaikka alginaattiketjuissa itsessään ei ole solujen kiinnittymiseen tarvittavia bioaktiivisia ligandeja, niitä voidaan muokata soluadheesiopeptideillä, kuten RGD-sekvenssillä, jonka avulla solut voivat sitoutua polymeeriin. Tämä sitoutuminen johtaa palautuvan polymeeriverkoston muodostumiseen ilman kemiallisia ristosilloitusaineita. Kun soluja lisätään RGD-modifioituun alginaattiliuokseen, ne hajaantuvat tasaisesti liuokseen ja muodostavat reseptori-ligandi-vuorovaikutusten kautta polymeeriverkoston, mikä edistää geelin muodostumista. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Faasimuutos on menetelmä, jolla tuotetaan lämpöä vastustavia hydrogeelejä, joissa polymeeri käy läpi faasimuutoksen, kun lämpötila nousee tietyn kynnyksarvon yläpuolelle. Tätä kynnyksarvoa kutsutaan alemmaksi kriittiseksi liuoslämpötilaksi. (Abasalizadeh ym. 2020.)

Vapaaradikaalinen polymerisaatio on prosessi, jossa lineaarinen polymeeri muuttuu 3D-verkoksi, mikä voi tapahtua fysiologisessa pH:ssa ja lämpötilassa sopivien kemiallisten käynnistäjien avulla. Tässä menetelmässä alginaattiketjut muunnetaan funktionaalisilla ryhmillä, kuten metakrylaateilla. Tämän jälkeen ne polymeroidaan käyttämällä fotoinitiaattoria ja UV-valoa. Prosessi mahdollistaa solujen tai bioaktiivisten molekyylien kapseloinnin ja ristosilloittamisen fysiologisissa olosuhteissa. Ioninen ristosilloittaminen tarjoaa korkean solujen elinkelpoisuuden, mutta vapaaradikaalipolymerisaatio muodostaa kovalenttisia sidoksia metakrylaattiryhmien välille, mikä tekee hydrogeelistä vakaamman ja injektoitavamman, jolloin geeli soveltuu paremmin kliniseen käyttöön. Lisäksi metakryloidut alginaattihydrogeelit tarjoavat mahdollisuuden hallita mekaanisia ominaisuuksia, turvotusta ja hajoamisnopeutta säätämällä pintakonsentraatioita, fotoinitiaattoreita ja UV-altistusta. Menetelmän yksinkertaisuuden ansiosta hydrogeeliin on helppo integroida erilaisia kemikaaleja. (Abasalizadeh ym. 2020.)

4 3D-tulostus

3D-tulostus on nopeasti kehittyvä ala, vaikka teknologiana se ei olekaan uusi keksintö. 1980-luvulla otettiin 3D-tulostuksen alkuaskeleet Charles Hullin toimesta, kun Hull haki patenttia ensimmäiselle kaupalliselle 3D-tulostustekniikalle vuonna 1984. Tämä on luonut pohjan myös 3D-biotulostukselle. Biotulostuksen historia puolestaan alkoi vuonna 1988, kun Robert J. Klebe hyödynsi mustesuihketulostinta ensimmäistä kertaa solujen tulostamiseen. Tämän urauurtavan aloitteen jälkeen ala on kehittynyt jatkuvasti ja uusia menetelmiä sekä tekniikoita otetaan käyttöön jatkuvasti. (UPM Biomedicals n.d.)

3D-tulostus tunnetaan myös lisäävänä valmistuksena tai nopeana prototyyppivalmistuksena. 3D-tulostus on menetelmä, jossa tuotteet valmistetaan kerros kerrokselta poikkileikkausten avulla. 3D-biotulostus on poikkitieteellinen ala, joka yhdistää lääketieteen, biologian, konetekniikan ja materiaalitieteen. Bioprinttausta voidaan karkeasti tarkastella kahdesta näkökulmasta: laajan määritelmän mukaan 3D-bioprinttaus kattaa kaiken biolääketieteeseen liittyvän 3D-tulostuksen, kun taas suppean määritelmän mukaan se tarkoittaa prosessia, jossa soluja sisältäviä bioaineita käytetään elävien rakenteiden valmistamiseen. Laajaa määritelmää voidaan myös avata enemmän ja jakaa se neljään eri tasoon: ensimmäinen taso pitää sisällään ei-bioyhteensopivat rakenteet kuten 3D-tulosteet, joita käytetään kirurgisten toimenpiteiden suunnittelussa. Tasoon kaksi kuuluvat bioyhteensopivat, mutta hajoamattomat rakenteet, kuten titaaniset nivelet tai silikoniproteesit. Bioyhteensopivat ja hajoavat tuotteet, kuten keraamiset luunkorvikkeet ja biohajoavat verisuonistentit puolestaan kuuluvat tasoon kolme. Viimeinen taso pitää sisällään suppean määritelmän biotulostuksen, jossa eläviä soluja käytetään biomimeettisten 3D-kudosten, kuten ihon ja verisuonten valmistukseen. (Gu ym. 2020.)

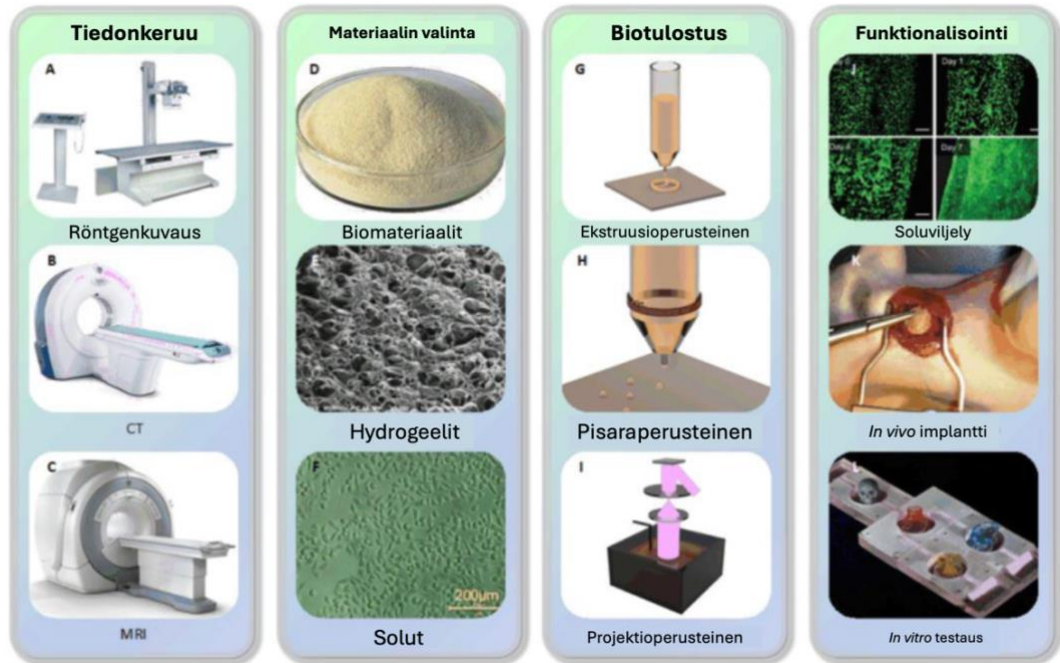
4.1 3D-biotulostusprosessi

Kuvassa 5 on esitelty 3D-biotulostusprosessin keskeiset vaiheet lyhyesti. 3D-biotulostusprosessin ensimmäisessä vaiheessa kerätään tarvittavat tiedot tulostettavasta rakenteesta. Tämä voi tapahtua hyödyntämällä esimerkiksi skannaustekniikoita, kuten röntgenkuvausta tai magneettikuvausta, tai käyttämällä tietokoneavusteisen suunnittelun (CAD) ohjelmistoja. Saatu 3D-malli tulee jakaa 2D-viipaleiksi, joiden suuntaus voidaan mukauttaa ohjelmistojen avulla. Näitä tietoja jalostetaan edelleen bioprinttausmenetelmän edellyttämiksi hiukkasiksi tai filamenteiksi. Näistä filamenteista tulostetaan haluttuja kudoksia. (Gu ym. 2020.)

Toisessa vaiheessa valitaan sopivat materiaalit, jotka voivat olla soluja, kasvutekijöitä ja/tai hydrogeelejä. Usein tulostettavat materiaalit ovat yhdistelmiä eri aineista. Solut ja kasvutekijät vaativat apuaineen ollakseen tulostettavissa, sillä pelkät solut eivät muodosta rakennetta, joka säilyttäisi muotonsa. Nämä apuaineet voivat olla esimerkiksi gelatiinia tai alginaattia. Nämä materiaalit, joita kutsutaan myös biomusteiksi, muodostavat rakenteiden perustan. Materiaalien valinta on keskeisessä roolissa, sillä niiden tulee täyttää bioyhteensopivuuden, tulostettavuuden ja mekaanisten ominaisuuksien vaatimukset. (Gu ym. 2020.)

Kolmannessa vaiheessa siirrytään itse tulostusprosessiin. Tulostusmenetelmän valinta perustuu käytettävään materiaaliin ja haluttuun lopputulokseen. Tässä vaiheessa tulostusparametrit on määriteltävä huolellisesti ja prosessia on seurattava tarkasti mahdollisten ongelmien korjaamiseksi tulostuksen aikana. (Gu ym. 2020.)

Viimeisessä vaiheessa pyritään saamaan hajallaan olevat solut muodostamaan yhteyksiä ja jäljittelemään luonnollisen kudoksen tai elimen toimintoja. Tämä voidaan saavuttaa fysikaalisen ja kemiallisen simulaation avulla, mikä auttaa soluja organisoitumaan ja aktivoitumaan halutulla tavalla. (Gu ym. 2020.)

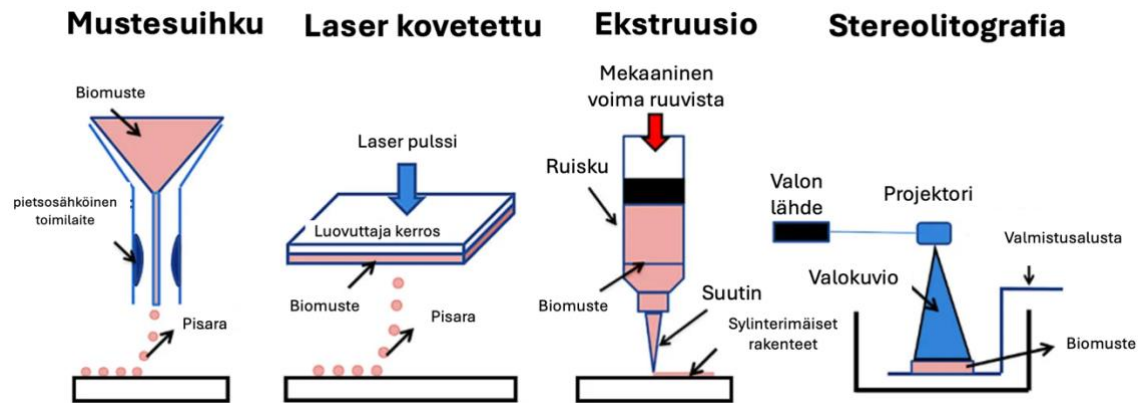


Kuva 5. 3D-tulostusprosessin vaiheet (muokattu Gu ym. 2020).

4.2 Biotulostusmenetelmät

3D-biotulostus voidaan jakaa kolmeen pääasialliseen menetelmään, jotka perustuvat käytettyihin laitteisiin ja tulostusmenetelmiin: ekstruusiopohjaiseen, pisarapohjaiseen ja valokovetteiseen biotulostukseen (kuva 6).

Ekstruusiopohjaisessa menetelmässä biomustetta puristetaan ulos jatkuvina filamentteina, joista rakentuu haluttu rakenne. Pisarapohjaisessa biotulostuksessa bioaineksia vapautetaan pieninä pisaroina, jotka kerrostuvat ja muodostavat rakenteen. Valokovetteinen biotulostus puolestaan hyödyntää valokovetteisia materiaaleja, jotka kovettuvat kerros kerrokselta valon avulla muodostaen 3D-mallin. (Gu ym. 2020.)



Kuva 6. 3D-tulostusmenetelmät (muokattu faCellitate 2025.).

Opinnäytetyössä käytettävä tulostusmenetelmä toimii ekstruusioperiaatteella. Ekstruusiopohjaisessa bioprintauksessa pneumaattinen paine tai mekaaninen voima puristaa materiaaleja ulos tulostuspään kautta. Samoin kuin FDM-tekniikassa, materiaalit kerrostetaan jatkuvasti kerros kerrokselta, kunnes haluttu muoto on valmis. Koska ekstruusiosprosessissa ei käytetä kovaa lämmitystä, sitä sovelletaan erityisesti kudosteknisiin rakenteisiin, jotka sisältävät soluja ja kasvutekijöitä. Biomusteet eli soluilla ja biologisilla materiaaleilla rikastetut biomateriaalit ovat keskeisessä osassa ekstruusiopohjaisessa biotulostuksessa, sillä tämä tekniikka mahdollistaa solujen elinkyvyn säilymisen. (Tappa & Jammalammadka 2018.)

Ekstruusiopohjainen bioprinttaus minimoii tulostamisesta mahdollisesti aiheutuvat soluvauriot. Sen etuja ovat solujen tarkan asettelun lisäksi myös solujen jakautumisnopeuden hallinta ja nopea valmistusprosessi, jotka ovat merkittävästi laajentaneet tekniikan käyttöä elävien kudosten valmistuksessa. Lisäksi ekstruusiopohjainen 3D-tulostus mahdollistaa tulostuksen monenlaisilla materiaaleilla, joiden viskositeetti vaihtelee ja joissa voi olla suuri solutiheys. Käytetyn biomusteen polymeerityypistä riippuen voidaan valmistaa monimutkaisia biologisia kudoksia ja tukirakenteita. Tämän tekniikan avulla voidaan hyödyntää useita tulostuspäitä, joihin voidaan ladata eri solulinjoja, mikä mahdollistaa monimutkaisten monisoluisien rakenteiden tulostamisen. Ekstruusiobioprinttausta on käytetty laajasti erilaiset kudosten ja tukirakenteiden valmistuksessa. (Tappa & Jammalammadka 2018.)

4.3 Biotulostuksen sovellukset

Biotulostuksen sovelluksia on useita ja ne voidaan jakaa neljään pääluokkaan: kasvainmallinnus, solubiologia, lääketutkimus ja regeneratiivinen lääketiede. Kasvainmallinnus keskittyy kasvainten patologisten mallien luomiseen, kasvainten syntymekanismien tutkimukseen ja kohdennettujen hoitojen kehittämiseen. Solubiologia puolestaan pitää sisällään yksittäisten solujen ja monisoluisien rakenteiden valmistuksen, sekä muun muassa solujen kasvun, vuorovaikutuksen ja siirtogeenisyyden tutkimuksen. Lääketutkimus kattaa farmakokinetiikan, lääkeaineiden seulonnan ja uusien lääkkeiden kehittämisen. Regeneratiivinen lääketiede on erityisen läheisessä yhteydessä bioprinttaukseen. Regeneratiivinen lääketiede sisältää keinotekoisien kudosten ja elinten valmistuksen, sekä kudosten verisuonituksen ja soluhoidot. (Guy ym. 2020.)

3D-tulostus tarjoaa ratkaisun moniin kudosisäilytys- ja elinsiirtojen haasteisiin, sillä 3D-biotulostuksella pystytään mahdollistamaan yksilöllisesti räätälöityjen elinten ja kudosten valmistus. Tämä lisää muun muassa elinsiirtojen onnistumismahdollisuuksia ja vähentää hylkimisreaktioita kehossa. Tähän mennessä 3D-biotulostuksella on pystytty luomaan muun muassa rustoja ja luita, sekä verisuonia, ihoa, hermokudosta ja jopa keinotekoisia korvia. Kun verrataan 3D-biotulostuksella valmistettuja kudoksia ja elimiä perinteisiin kudostekniikkamenetelmiin, voidaan todeta biotulostuksen mahdollistavan tarkemman ja kehittyneemmän anatomisen rakenteen. Kaiken kaikkiaan 3D-biotulostuksen hyödyntäminen kudosisäilytys- ja elinsiirroissa parantaa kudosisäilytys- ja elinten morfologiaa. (Qin ym. 2024.) Lisäksi yksi kudostekniikan keskeisistä tavoitteista on kehittää *in vitro* -malli, lääkeaineiden seulontaa ja toksikologista tutkimusta varten. Tällaisen mallin avulla voidaan tarkasti ja luotettavasti ennustaa, miten ihmiskeho reagoi lääkkeisiin ja millaisia mahdollisia riskejä niihin liittyy. (Guy ym. 2020.)

Lääkeainetutkimuksessa ja -kehityksessä 3D-biotulostuksella on erityinen merkitys, sillä sen avulla voidaan luoda malleja, jotka matkivat ihmisten

elimistön mikroympäristöjä tarkemmin kuin kaksikulotteiset *in vitro*- viljelmät. Tämä parantaa lääkaineiden annostelun, vaikutusten ja turvallisuuden ennustettavuutta. (Yang ym. 2024.)

4.4 Biotulostuksen tulevaisuus ja haasteet

Vaikka biotulostus on saavuttanut merkittäviä edistysaskelia, materiaalien valinta ja rakenteiden mekaaninen lujuus pysyvät edelleen merkittävänä haasteina. Muun muassa monimutkaisten kudosten verisuonituksen luominen on yhä ratkaisematon ongelma. Yhdeksi tämän ongelman ratkaisuksi on kehitetty menetelmiä, joissa käytetään uhrimateriaaleja, jotka integroidaan rakenteeseen tulostuksen aikana. Jälkikäsitellyssä nämä materiaalit poistetaan, jolloin rakenteeseen jää tyhjiöitä, jotka toimivat verisuonikanavina. (Tappa & Jammalammadka 2018.)

Luonnonpolymeereihin perustuvat biomusteet, kuten kollageeni, alginaatti ja gelatiini, ovat biologisesti yhteensopivia, mutta niiden alkuperästä ja valmistuserien vaihtelusta aiheutuu epäyhtenäisyyttä. Yksi keskeisimmistä haasteista biotulostuksessa liittyykin biomusteisiin. Tämä vaikeuttaa standardointia ja kliinistä hyväksyntää. Lisäksi jokainen kudostyyppi vaatii usein oman spesifin biomusteensa, eikä vielä ole olemassa yleiskäyttöistä ratkaisua. Kliinisessä käytössä myös solujen alkuperä on yksi suurimmista kysymyksistä. Potilaasta peräisin olevat solut vähentävät hyljinnän riskiä, mutta niiden kerääminen, kasvatus ja tulostukseen valmistaminen vie paljon aikaa. (Vijayavenkataraman 2023.)

Biotulostimien teknologia myös kehittyy jatkuvasti, mutta erityisesti laajamittaisessa kudosten tulostamisessa solujen säilyminen pitkien tulostusprosessien aikana on kriittinen haaste. Samalla kaivataan parempia reaaliaikaisia valvontamenetelmiä solujen elinkyvyn seuraamiseen. Tulevaisuudessa biotulostimien käytön pitäisi olla mahdollista myös kliinisessä ympäristössä, mutta nykyiset järjestelmät vaativat vielä teknistä osaamista ja monialaista tiimiä. (Vijayavenkataraman 2023.)

Vaikka 3D-biotulostuksella voidaan säästää merkittävästi resursseja, suuri teollinen tuotanto on edelleen haasteellista, sillä henkilökohtainen 3D-biotulostus vaatii runsaasti resursseja sekä aikaa. Tulevaisuudessa tekoälyn hyödyntäminen reaaliaikaiseen parametrien automaattiseen säätöön voi kuitenkin mahdollistaa tehokkaamman ja laajemman tuotannon. (Qin ym. 2024.)

5 Dissoluutio

Liukenemis- eli dissoluutioprosessissa aine sekoittuu liuottimeen muodostaen liuoksen. Dissoluutiotestauksen avulla voidaan arvioida kuinka nopeasti ja laajasti aine vapautuu kappaleesta. Lääkkeen liukenemisella on keskeinen merkitys sen saatavuudelle ja hoitoteholle. Termejä ”dissoluutio” ja ”lääkeaineen vapautuminen” käytetään usein toistensa synonyymeinä. (USP 2025.)

Lääkeaineen liukenemisen ymmärtäminen on tärkeää, kun suunnitellaan ja optimoidaan kontrolloidusti vapautuvia lääkeainesysteemejä. Erityisesti kun käytetään kiinteitä lääkeaineita, sillä niiden on ensin liuettava, jotta ne voivat kulkeutua elimistössä. Lääkeaineen siirtyminen kiinteästä olomuodosta liuokseen on siis keskeinen tekijä lääkeimplanttien suunnittelussa. Yhä useammat uudet yhdisteet ovat erittäin huonosti liukenevia ja esimerkiksi kiinteän lääkeaineen kapselointi huokoiseen implantaattiin tuo haasteita kiinteän aineen liukoisuuden vuoksi. Tällaisessa järjestelmässä liukeneminen ja diffuusio vaikuttavat yhdessä lääkkeen vapautumisen. Näiden kahden toisiaan säätelevän prosessin vuorovaikutusta ei kuitenkaan tunneta yhtä hyvin kuin muita aineensiirtoon liittyviä ilmiöitä. (Jain ym. 2023.)

Monimutkaisia lääkeaineiden liukenemistä kuvaavia malleja on kehitetty paljon viime vuosikymmenten aikana. Nämä mallit voidaan yleisesti luokitella kahteen pääryhmään: liikkuvan rajapinnan malleihin ja jatkuvan alueen malleihin. Liikkuvan rajapinnan mallissa liukenemisprosessi kuvataan rajapintana, joka erottaa liuenneen lääkeaineen vielä liukenemattomasta aineesta. Tätä menetelmää on sovellettu kiinteisiin lääkevalmisteisiin, mutta myös tilanteisiin, joissa lääkeaine on kapseloitu matriisiin. Liikkuvan rajapinnan malli perustuu massatasapainoon liukenemisrajapinnassa, mikä tarkoittaa, että lääkeaineen diffuusion liukenemisrintamasta ympäröivään nesteeseen on oltava yhtä nopeaa kuin kiinteän aineen liukeneminen. Tämän mallin avulla voidaan määrittää matemaattisesti liukenemisrintaman etenemisnopeus. (Jain ym. 2023.)

Jatkuvan alueen mallia puolestaan käytetään yleensä, kun kyse on inerttiin matriisiin ladatuista lääkkeistä, sillä silloin liikkuvaa rajapintaa ei tarvita. Tällöin oletetaan, että neste imeytyy nopeasti, näin mahdollistaen lääkeaineen liukenemisen matriisin läpi heti. Liukenemisnopeuden oletetaan siis olevan suoraan verrannollinen paikalliseen pitoisuusyliäärään. (Jain ym. 2023.)

Useissa aiemmissa tutkimuksissa on keskitytty yhtenäisiin järjestelmiin, joissa lääkeaine on jakautunut tasaisesti koko materiaaliin. Joissain tapauksissa lääkeaine on kuitenkin kapseloituna kappaleen sisällä ja sitä ympäröi passiivinen ulkokerros, joka on suunniteltu säätelemään lääkeaineen vapautumista. Tämä lähestymistapa on käytössä esimerkiksi lääkeaineella täytetyissä implanteissa, jotka ovat useimmiten hyvin pienikokoisia. Näissä lääkeimplanteissa lääkeaine asetetaan onttoon ytimeen, jolloin ei tarvita polymeerikantajia, sen sijaan lääkeaineen vapautumista ohjataan diffuusiolla huokoisen ulkoseinämän läpi. Implanteissa huokoisella rakenteella ja seinämän paksuudella on ratkaiseva merkitys. (Jain ym. 2023.)

Dissoluutiokontrolloiduissa lääkeaineen annostelusteemeissä polymeerikantajan faasieroosio tapahtuu makromolekyyliketjujen liukenemisen myötä, joko nopeasti tai hitaasti. Jotkin lääkeaineen annostelujärjestelmät perustuvat turpoamisohjattuun vapautumiseen, jossa polymeerikantaja imee vähitellen nestettä, laajenee ja joko liukenee tai hajoaa, mikä johtaa lääkeaineen vapautumiseen. Näillä järjestelmillä, jotka säätelevät lääkeaineen vapautumista polymeerin liukenemisen avulla, on yhtäläisyyksiä biohajoavien lääkekantojen kanssa. Faasieroosioon perustuvat järjestelmät toimivat hajottamalla polymeerin joko kemiallisen hajoamisen tai liukenemisen kautta, jolloin lääke vapautuu ympäristöönsä. (Narasimhan & Peppas 1996.)

Turpoamisohjatuissa lääkeainesysteemeissä lääkeaine on joko liuotettuna tai sekoitettuna polymeerimatriisiin. Kun vesi pääsee polymeeriin, se aiheuttaa turpoamista ja muodostaa kumimaisen polymeerikerroksen. Tämä kerros mahdollistaa lääkkeen nopeamman vapautumisen. Geelikerroksen paksuus vaikuttaa siihen, miten lääke vapautuu. Vapautumisen aikana turpoaminen ja liukeneminen toimivat toisiaan vastaan: ensin geelikerros paksuuntuu

tuvotuksen vuoksi, sitten se kuitenkin vakaantuu, kun turvotus, lääkeaineen diffuusio ja liukeneminen tasapainottuvat. Lopuksi geelin paksuus pienenee liukenemisen myötä. (Narasimhan & Peppas 1996.)

5.1 Geometrian vaikutus lääkeaineen vapautumiseen

Fickin ensimmäisen diffuusiolain mukaan aineen diffuusionopeus on verrannollinen pinta-alaan, kun pitoisuus pysyy vakiona. Toisin sanoen, kun verrataan näytteiden liukenemistä samalla konsentraatiolla, suurempi pinta-ala johtaa suurempaan diffuusionopeuteen, mikä voidaan havaita jyrkempänä kaltevuutena konsentraatio–aika kaaviossa. (Afkhami ym. 2025.)

Kun neste virtaa huokoisen matriisin läpi, se liuottaa kiinteän rakenteen osia ja luo kanavia, niin sanottuja ”madonreikiä”. Kun materiaali liukenee, läpäisevyys kasvaa näillä alueilla, mikä mahdollistaa nopeamman aineensiirron ja nopeuttaa liukenemisprosessia. Tämä johtaa haarautuvien kanavien kehittymiseen. Näiden liuenneiden rakenteiden muodostuminen on monimutkainen epälineaarinen prosessi, jota ohjaa nestevirtauksen ja liukenemisdynamiikan vuorovaikutus. (Qin & Yan 2024.)

Kiinteän lääkeaineen liukenemisnopeus riippuu sekä ympäröivän nesteen ominaisuuksista ja sen liikkeistä, sekä itse lääkeaineen kemiallisista ominaisuuksista. Kappaleen muoto ja geometria vaikuttavat ympäröivän nesteen virtaukseen ja siten tabletin liukenemisnopeuteen. Kappale voi myös häiritä tasaista virtausta aiheuttaen turbulenssia ja sekoittumista nesteessä, mikä vaikuttaa myös liukenemisnopeuteen. Liukenemisnopeuteen vaikuttavat siis huokosten muoto, sijainti ja koko sekä ympäröivän nesteen nopeus ja ominaisuudet. Liukenemisnopeus kasvaa virtausnopeuden kasvaessa. (Chakrabarti & Southard 1996.)

Vaikka tableteilla olisi samanlainen massa tai tilavuus, niiden geometriaa voidaan muokata näin saavuttaen hyvin erilaisia vapautumisprofileja. Sama lääkeainepitoisuus voidaan siis annostella joko välittömästi vapautuvana tai kontrolloidusti vapautuvana kiinteän annosmuodon geometriasta riippuen.

Pinta-ala ja pinta-ala tilavuussuhde ovat kriittisiä tekijöitä tablettien liukenemiskäyttäytymisessä. Pinta-alan lisääminen johtaa tehostuneeseen vapautumiseen. (Afkhami ym. 2025.)

Suurempi pinta-alan ja tilavuuden suhde tarkoittaa, että suurempi osa näytteestä on kosketuksissa liuottimen kanssa, mikä lisää vapautumisnopeutta. Tämä aiheuttaa kuitenkin myös muutoksia näytteen muodossa ja pinta-alassa nopeammin, mikä hidastaa diffuusiota ajan myötä. (Afkhami ym. 2025.)

Vaikka pinta-alan ja tilavuuden suhteella on keskeinen rooli yksinkertaisten muotojen liukenemisessä, ne eivät riitä selittämään täysin monimutkaisempien muotojen käyttäytymistä. Näissä tapauksissa esimerkiksi näytteen sisäinen rakenne ja se kuinka helposti liuotin pääsee näytteen eri alueille vaikuttavat merkittävästi liukenemiseen. Pelkkään pinta-alan ja tilavuuden suhteeseen vetoaminen ei siis välttämättä riitä ja tämä korostaa tarvetta ottaa huomioon muita tekijöitä, kun suunnitellaan kehittyneitä lääkeainesysteemejä. (Afkhami ym. 2025.)

6 Kokeellinen osuus

Kokeellisessa osuudessa valmistettiin kolmea eri muotoa hydrogeeli-implantteja nisiinistä ja alginaatista. Työ aloitettiin optimoimalla tulostettavan geelin koostumus, jonka jälkeen tulostettiin hydrogeelikappaleet dissoluutiotestejä varten. Dissoluutiotestien avulla pyrittiin selvittämään geometrian vaikutusta nisiinin vapautumisprofiiliin.

6.1 Esiristisilloitus kalsiumkoridilla

Geelin koostumuksen optimoinnissa hyödynnettiin esiristisilloitusta kalsiumkloridilla jo geelin valmistusvaiheessa. Tavoitteena oli esiristisilloittaa osa geelin karboksyyliiryhmistä jo geelin valmistusvaiheessa. Tarkoituksena oli esiristisilloittaa 25 % geelin karboksyyliihapporyhmistä, joka vastaa noin 0,277 mmol.

Alla esimerkkilasku ensimmäisen alginaatti-nisiinigeelin valmistuksesta. Geelin haluttu koostumus: 5 m-% nisiini + 3 m-% alginaatti + 25 % CaCl₂. Muut geelit ovat valmistettu saman kaavan mukaan:

Valmistetaan geeliä 10 g. Nisiiniä on geelissä 5 m-%, joten nisiini jauhetta tulee punnita:

$$10 \text{ g} * 5 \% = 0,50 \text{ g}$$

Alginaattipitoisuuden geelissä halutaan olevan 3 m-%, joten alginaattijauhetta tulee punnita:

$$10 \text{ g} * 3,00 \% = 0,30 \text{ g}$$

Natriumalginaatin moolimassa vaihtelee 12 000–40 000 Da välillä (Sigma Aldrich n.d.). Koska varmaa tietoa moolimassasta ei ole, käytetään keskiarvoa 26 000 Da. Alginaatin yhden monomeerin moolimassa on 194,14 g/mol (PubChem 2025.). Yksi alginaatin monomeeri sisältää aina yhden karboksyyliiryhmän, joten alginaatin sisältämien karboksyyliiryhmien määrä:

$$\frac{26\,000\text{ Da}}{194,14\text{ g/mol}} = 133,924\text{ monomeeriä eli karboksyyliiryhmää}$$

Alginaatin ainemäärä:

$$n = \frac{m}{M} = \frac{1\text{ g}}{26\,000\text{ g/mol}} = 0,000038\text{ mol}$$

Karboksyyliiryhmien moolimäärä:

$$0,000038\text{ mol} * 194,14\frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,00738\text{ mol}$$

Tämä tarkoittaa että 1 g alginaattia sisältää 7,38 mmol karboksyyliiryhmiä.
Punnitussa määrässä alginaattia (0,30 g) on siis karboksyylihapporyhmiä:

$$7,38\text{ mmol/g} * 0,30\text{ g} = 2,214\text{ mmol}$$

Kalsiumioni pystyy sitomaan kaksi COO-ryhmää eli todellisuudessa kalsiumia tarvitaan puolet:

$$\frac{2,214\text{ mmol}}{2} = 1,107\text{ mmol}$$

1,107 mmol kalsiumia vastaa 100 % ristosilloitettua geeliä. Esiristosilloitus vaiheessa halutaan kuitenkin geelin olevan vain 25 % ristosilloitettu, jolloin 0,1 M kalsiumkloridia tarvitaan:

$$1,107\text{ mmol} * 0,25 = 0,277\text{ mmol}$$

$$\frac{0,277\text{ mmol}}{0,1\text{ mmol/ml}} = 2,77\text{ ml}$$

Geelin karboksyyliiryhmien esiristosilloitus 25 %:n tasolle, vastaa 0,277 mmol CaCl₂:n käyttöä. Tämä ainemäärä saadaan lisäämällä 2,77 ml 0,1 M CaCl₂-liuosta 10 g geelierian joukkoon. Geelierän kokonaismassaan suhteutettuna tämä vastaa 27,7 m-% 0,1 M CaCl₂.

Natriumfosfaattipuskuria 10 gramman geelin valmistuksessa tarvitaan (kun oletetaan 1 ml CaCl₂ painavan 1 g):

$$m(\text{puskuri}) = \text{geelin kokonaismäärä} - \text{alginaattijauhe} - \text{nisiinijauhe} - \text{CaCl}_2$$

$$m(\text{H}_2\text{O}) = 10 \text{ g} - 0,30 \text{ g} - 0,50 \text{ g} - 2,77 \text{ ml} = 6,43 \text{ g}$$

6.2 Hydrogeelin valmistus ja koostumuksen optimointi

Geeliä päädyttiin valmistamaan 10 gramman erinä, jolloin geeliä oli tarpeeksi, jotta se pystyttiin sekoittamaan helposti käyttäen sekä magneettisekoittajaa että ULTRA-TURRAX®-homogenisaattoria. Geelin koostumuksen optimointi aloitettiin testaamalla 5 m-% nisiini + 3 m-% alginaatti + 27,7 m-% CaCl₂ seosta. Tällöin geelissä olisi laskennallisesti 0,277 mmol kalsiumioneja (mikä vastaa 27,7 m-% 0,1 M kalsiumkloridia), jolloin 25 prosenttia alginaatin hydroksyyliyhdistä on esiristisilloitettu jo geelin valmistusvaiheessa (lasku kohdassa 6.1 Esiristisilloitus kalsiumkloridilla). Nisiini luotettiin ensin natriumfosfaattipuskuriin (pH 6), mutta sen liukoisuus osoittautui erittäin heikoksi. Lisäksi liuksen tumma väri (kuva 7) vaikeutti visuaalista arviointia mahdollisista liukenemattomista partikkeleista. Liutusta yritettiin nopeuttaa käyttämällä avuksi sekä magneettisekoittajaa että ultraäänihaudetta. Alginaatti lisättiin nisiinin ja puskurin joukkoon samalla sekoittaen magneettisekoittajalla ja lopuksi ultra turraxilla, jotta seos homogenisoitui kunnolla. Tämän jälkeen seoksen joukkoon lisättiin CaCl₂ 500 µl erissä samalla sekoittaen ultra turraxilla. Valmis geeli käsiteltiin tyhjiöuunissa 30 minuutin ajan ilmakuplien poistamiseksi. Lopputuloksena geeli oli liian löysää tulostettavaksi ja muodostuneet rakenteet levisivät eivätkä säilyttäneet muotoaan (kuva 7).



Kuva 7. 5 m-% nisiini + 3 m-% algiinaatti + 27,7 m-% CaCl_2 geelin valmistus.

Koska ensimmäisessä kokeessa nisiini ei liennut kunnolla, päädyttiin selvittämään nisiinin maksimiliukoisuutta eri pH:ssa (ks. luku 2 Nisiini). Nisiinin määrää vähennettiin 3,5 m-%:iin ja puskurin pH säädettiin 2,2:een käyttämällä 1M suolahappoa. Alempi pH parantaa nisiinin liukoisuutta. Nisiinin liuottamiseen käytettiin edelleen ultraäänihaudetta ja magneettisekoittajaa mutta huomattiin, että pelkkä magneettisekoittaja toimi paremmin nisiinin liuottamiseen. Nisiiniä liuotettiin tunnin ajan, jotta kaikki nisiini saatiin varmasti liukenemaan. Tämän jälkeen joukkoon lisättiin algiinaatti ja CaCl_2 . Kalsiumkloridilisäyksen jälkeen geeli muuttui vetiseksi eikä ollut tulostettavissa. Geelin vetisyys saattoi aiheutua pH:n muutoksesta ja sen vaikutuksesta algiinaatin käyttäytymiseen ja karboksyyliyhmiin varaukseen.

Valmistettiin kontrolligeeli ilman nisiiniä (3 m-% algiinaatti + 27,7 m-% CaCl_2). Valmistettiin geeli pH 2,2 puskurilla. Algiinaatin lisäys ja CaCl_2 lisäys suoritettiin samalla tavalla kuin aiemmin. Havaittiin, että geeli muodostui normaalisti ja viskositeetin laskua ei havaittu, mikä viittaa siihen, että nisiini vaikuttaa geelin rakenteeseen. Liukenemattomat nisiini partikkelit saattavat estää kalsiumin sitoutumista algiinaatin hydroksyyliyhmiin kanssa, jolloin sen sijaan että geelistä tulisi paksumpaa aiheuttaakin nestemäärän lisäys geelin löystymistä.

Koska aiemmissa geeleissä nisiinin liukeneminen oli haasteellista ja geeli jäi vetiseksi, päätettiin nisiinin pitoisuutta vähentää edelleen 2,5 m-%:iin. Nisiini

liuotettiin pH 2,2 puskuriin, minkä jälkeen puskurin pH nostettiin 4,5:een 1 M natriumhydroksidilla. Tämä pH:n säätö tehtiin, jotta geelin rakenteellisia ominaisuuksia saataisiin parannettua, sillä alhainen pH saattaa vaikuttaa alginaatin käyttäytymiseen. Alginaatti lisättiin pH 4,5 seokseen, minkä jälkeen joukkoon lisättiin kalsiumkloridi. Tuloksena syntynyt geeli oli aiempia kokeita paksumpaa (kuva 8), mutta edelleen liian löysää säilyttääkseen muotonsa tulostettaessa. Geeliä valui 0,25 µm metallikärjestä liikaa kerralla ja muodot levisivät ja romahtivat itsestään (kuva 8).



Kuva 8. 2,5 m-% nisiini + 3 m-% alginaatti + 27,7 m-% CaCl₂ geelin valmistus.

Geelin koostumuksen parantamiseksi kokeiltiin esiristisilloituksen lisäämistä nostamalla CaCl₂-pitoisuutta 30 %:iin ja 35 %:iin. Valmistus suoritettiin samalla tavalla kuin aiemmassa geelissä. Kalsiumkloridimäärän lisääminen auttoi geeliytymistä hieman ja geeleissä oli puuomainen koostumus. Geelit eivät valuneet tulostusputkissa, mikä oli myös parannus aiempiin kokeisiin verrattuna. Geelien koostumus ei silti ollut optimi, vaan geelit jäivät edelleen liian löysiksi, eivätkä olleet tulostettavissa.

Koska kalsiumkloridin lisäys ei parantanut geelin tulostettavuutta riittävästi, seuraavaksi kokeiltiin alginaattipitoisuuden nostamista ilman esiristisilloitusta. Valmistettiin ensin kontrolligeelit ilman nisiiniä. Valmistettiin 8 m-% ja 10 m-% alginaattigeelit. Geelit olivat liian paksuja sekoitettavaksi pelkästään magneettisekoittajalla, joten sekoitus täytyi tehdä loppuun käyttäen ultra turraxia. Geeleistä poistettiin ilmakuplat tyhjiöuunissa. Tulostettaessa havaittiin että 8 m-% geeli oli edelleen liian löysää mutta 10 m-% alginaattigeeli säilytti

rakenteensa paremmin ja tulostetut muodot vastasivat paremmin haluttua lopputulosta. Päädyttiin siis valmistamaan geeli, joka sisälsi 10 m-% alginaattia ja 2,5 m-% nisiiniä.

Lopullisen geelin valmistus:

Punnittiin 0,25 g nisiiniä ja 8,72 g natriumfosfaattipuskuria (pH 2,2). Lisättiin nisiini pienissä erissä puskurin joukkoon samalla sekoittaen magneettisekoittajalla. Nisiiniä liuotettiin yksi tunti ennen alginaatin lisäystä. Kun nisiini oli liuennut, nostettiin seoksen pH 4,5 käyttäen 1 M natriumhydroksidia. pH lisäyksen jälkeen liuos punnittiin uudelleen, jotta pystyttiin selvittämään pH lisäyksestä aiheutunut kokonaismassan kasvu. pH säädöstä tuli kokonaismassaan lisää painoa 0,38 g. Punnittiin 1,00 g alginaattia ja lisättiin se liuoksen joukkoon pienissä erissä samalla sekoittaen magneettisekoittajalla. Magneettisekoittajan leikkausvoima ei riittänyt sekoittamaan koko 1 g alginaattierää, joten loppusekoitus suoritettiin käyttäen ultra turraxia. Seosta sekoitettiin 15 minuutin ajan ultra turraxilla. Tämän jälkeen seos siirrettiin tulostusputkeen ja vietiin tyhjiöuuniin ilmakuplien poistoon 30 minuutin ajaksi. Geeliä säilytettiin jääkaapissa korkilla tiiviisti suljettuna tulostukseen asti.

Koska pH säädössä käytetty natriumhydroksidi kasvattaa geelin kokonaismassaa 0,38 grammaa, vaikuttaa tämä geelin lopulliseen nisiini- ja alginaattipitoisuuteen. Geelin todellinen nisiini ja alginaatti pitoisuus onkin siis seuraava:

$$\begin{aligned} \text{Nisiini } m - \% &= \frac{\text{Punnittu nisiini määrä (g)}}{\text{Geelin kokonaismassa (g)}} * 100 \% = \frac{0,25 \text{ g}}{10,38 \text{ g}} * 100 \% \\ &= 2,41 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Alginaatti } m - \% &= \frac{\text{Punnittu alginaatti määrä (g)}}{\text{Geelin kokonaismassa (g)}} * 100 \% = \frac{1 \text{ g}}{10,38 \text{ g}} * 100 \% \\ &= 9,63 \% \end{aligned}$$

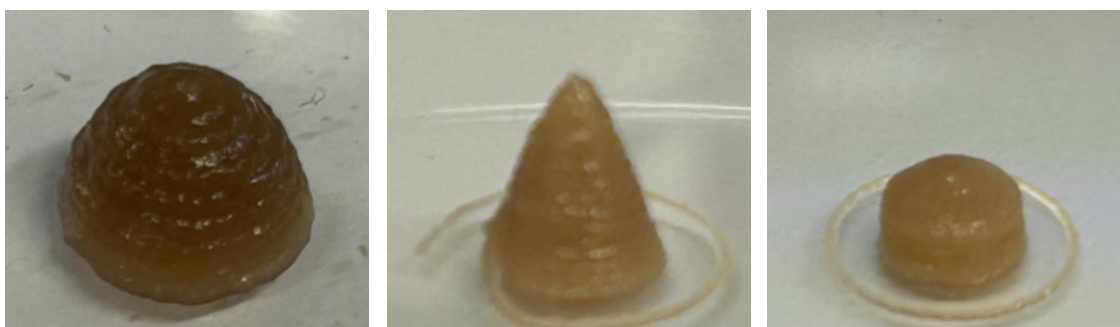
6.3 Geelin 3D-tulostusparametrit

Implantit/kappaleet tulostettiin Brinter® -monimateriaalitulostimella. Optimoidulla geelillä (9,63 m-% alginaattia ja 2,41 m-% nisiiniä) tulostettiin kolme eri muotoa: puolipallo (D= 7,26 mm & h=3,63 mm), kartio (D=7,39 mm & h=7 mm) ja tabletti (D= 6,5 mm & h= 3 mm). Tulostusparametrit eri muodoille löytyvät taulukosta 1. Tulostamiseen käytettiin 0,41 mm muovisia kartiokärkiä (Nordson EFD Precision Tips 7018298), sillä geeli oli liian paksua tulostettavaksi metallikärjestä. Kärjen kokoa huijattiin isommaksi, jotta geeli tulisi kärjestä ulos ohuempana filamenttina. Tämä huijaus kasvattaa kerroskorkeutta, mikä vastaa paremmin tulostettavan geelinauhan halkaisijaa. Näin vältettiin kärjen uppoaminen muodon sisään tulostuksen edetessä.

Taulukko 1. Tulostusparametrit.

Muoto	Kärjen koko oikea (mm)	Kärjen koko "huijattu" (mm)	Paine (mbar)	Shell count	First layer height (mm)	Layer height (mm)	Nopeus (output) (mm/s)	First layer print speed	Shell coating
Puolipallo	0,41	0,51	850	10	0,31	0,41	6	5	0,5
Kartio	0,41	0,51	850	10	0,31	0,46	5	5	0,5
Tabletti	0,41	0,51	850	10	0,31	0,46	5	5	0,5

Tulostetuissa muodoissa erottuu selvästi eri kerrokset. Muotojen väri on vaaleanruskea ja niiden ulkonäkö muistuttaa mehiläispesää. Ennen ristisilloitusta rinnakkaisten muotojen välillä ei ole silminnähtäviä eroja, mikä viittaa näytteiden yhdenmukaisuuteen. Muodot nähtävissä kuvassa 9.



Kuva 9. Tulostetut muodot.

Muodot ristosilloitettiin 0,1 M kalsiumkloridilla 30 minuutin ajan. Tulostettujen muotojen päälle kaadettiin kalsiumkloridia, kunnes muodot peittyivät kokonaan. 30 minuutin jälkeen kalsiumkloridi kaadettiin pois ja muodot huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä. Tämän jälkeen kappaleet kuivattiin varovasti paperilla ja punnittiin uudelleen. Kappaleiden mitat, painot ja kappaleiden sisältämä nisiinin määrä on esitelty taulukossa 2. Kappaleiden mitoista huomataan, että kappaleet tulostuivat hieman isompina kuin, mitä mitat malleissa olivat. Rinnakkaisten muotojen koot olivat kuitenkin lähellä toisiaan. Kartioissa suurempi korkeus selittyy todennäköisesti sillä, kun neula nousee tulostuksen loppuksi ylös, vetää se geelimassaa mukanaan, näin tehden kartioista hieman korkeampia ja teräväkärkisempiä. Tabletit olivat myös hieman pyöreitä päältä, joka viittaa siihen, että geeliä on tullut neulasta liikaa kerralla ja näin kappaleesta on tullut hieman isompi kuin mallin mitoissa.

Taulukko 2. Kappaleiden mitat, painot ja nisiinin määrä kappaleissa.

Muoto	Paino		Nisiinin määrä kappaleessa (mg)	Korkeus (mm)	Halkaisija (mm)
	Paino (mg)	ristisilloituksen jälkeen (mg)			
Puolipallo 1	123	154	2,96	4,7	7,9
Puolipallo 2	118	150	2,84	4,6	7,8
Puolipallo 3	120	152	2,89	4,7	7,9
Kartio 1	118	133	2,85	7,7	8,5
Kartio 2	122	157	2,95	8,1	8,4
Kartio 3	118	150	2,84	8,1	8,4
Tabletti 1	99,4	133	2,40	3,4	7,2
Tabletti 2	96,1	136	2,32	3,3	7,2
Tabletti 3	100	138	2,42	3,5	7,4

Kappaleiden sisältämä nisiinin määrä laskettu seuraavasti:

$$\text{Paino (mg)} * \text{painosta nisiiniä (\%)} = 123 \text{ mg} * 2,41 \% = 2,96 \text{ mg}$$

Ristisilloituksen aikana implanttien pohjat pyöristyivät hieman. Tämä todennäköisesti johtuu siitä, että implantit ovat kiinni astiassa, eikä kalsiumkloridiliuos pääse heti muotojen alle. Implanttien pyöristymistä voisi hillitä varmistamalla, että implantit irtoavat alustastaan ristisilloituksen alkaessa. Implantit asetettiin ristisilloituksen jälkeen 50 ml falcon-putkiin kostean pumpulin kanssa, jotta vältettiin muotojen kuivuminen. Falcon putket asetettiin jääkaappiin odottamaan dissoluutiokokeita.

6.4 Dissoluutiokokeet

Dissoluutiokokeiden tarkoituksena oli selvittää tulostetuista implanteista vapautuvan nisiinin määrä. Dissoluutiokokeiden kesto oli 104 tuntia ja näytteet analysoitiin käyttäen micro-BCA menetelmää. Dissoluutiokokeet aloitettiin puolipalloilla testaten vain yhtä muotoa kerralla. Tämä lähestymistapa valittiin, jotta saataisiin ensin suuntaa antava käsitys nisiinin vapautumismäärästä eri muodoissa. Lisäksi ensimmäisistä muodoista tehty BCA-analyysi auttoi määrittämään, mille tarkkuudelle standardisuora tulisi laatia.

6.4.1 Puolipallot

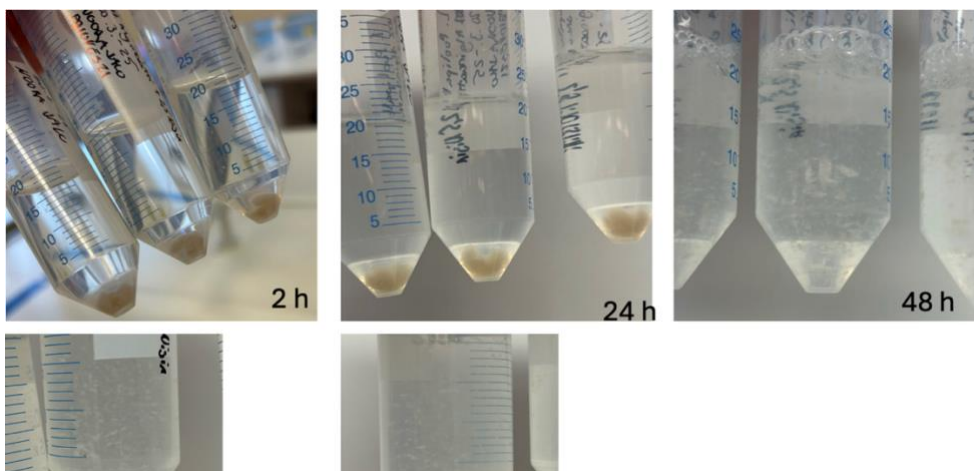
Kolme rinnakkaista tulostettua puolipalloa asetettiin 50 ml falcon putkiin 20 ml natriumfosfaattipuskurin (20 mM) kanssa (pH 6). Näytteet asetettiin lämpöravistelijaan 37 °C ja 60 rpm. Näiden olosuhteiden oli tarkoitus simuloida ihmiskehoa. Näytteitä otettiin aina 5 ml ja puskuria lisättiin takaisin saman verran. Näytteidenottoaikataulu taulukossa 3.

Taulukko 3. Näytteenottoaikataulu.

1. vuorokausi (tuntia)	2. Vuorokausi (tuntia)	3. Vuorokausi (tuntia)	4. Vuorokausi (tuntia)	5. Vuorokausi (tuntia)
0	24	48	72	96
2	28	56	80	104
4	32			
6				
8				

Kuvassa 10 on esitelty puolipallojen dissoluutiokokeen etenemistä.

Dissoluutiokokeissa puolipallot turposivat ja muuttuivat hattaramaiseksi jo heti kokeen alussa. Puolipallon muotoisissa implanteissa oli havaittavissa selkeää halkeamista jo neljän tunnin kohdalla. Kuuden tunnin kohdalla implantit olivat hajonneet osiin. Tämä implanttien hajoaminen vaikuttaa implantin pinta-alaan ja näin implanteista vapautuvan nisiinin määrään. Tämä viittaa siihen, että jos kaikki implantit hajoavat, niin vertailua geometrisen rakenteen perusteella nisiinin vapautumisnopeuteen, ei voida suorittaa. Mikäli kaikki implantit hajoavat dissoluutiokokeissa, täytyy vertailu eri implanttien välillä tehdä koon tai painon perusteella. Kun implantit alkoivat hajota hiutaleiksi puskurin joukkoon, sentrifugoitiin näytteet 5000 g kolmen minuutin ajan ennen näytteenottoa, jotta voitiin välttyä pipetoimasta geelipaloja mukaan näytteeseen. Sentrifugoinnissa



Kuva 10. Puolipallojen dissoluutiotesti.

geelipalat painuvat falcon putken seinämiin, josta ne irrotettiin puskuria pipetoimalla. Sentrifugointi saattoi myös hajottaa kappaleita lisää, mutta ilman sentrifugointia puskurissa on liikaa geelipaloja pipetoitavaksi.

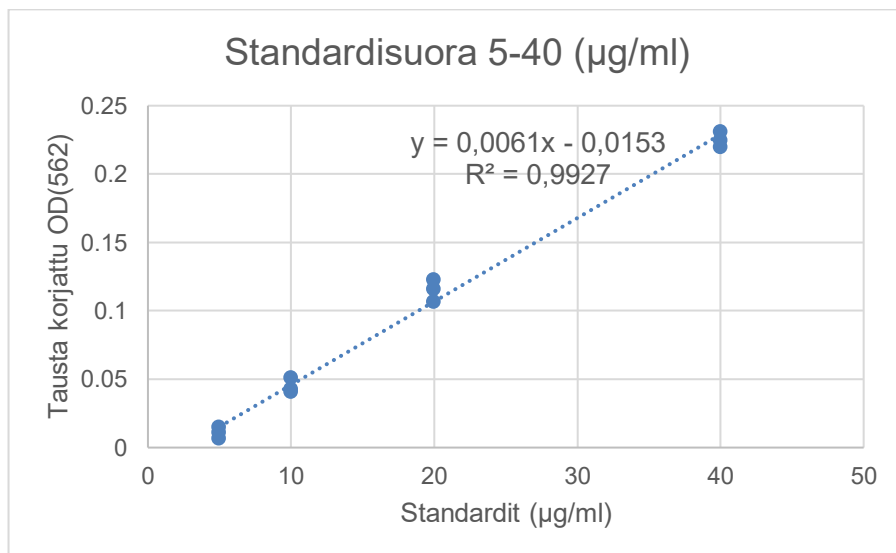
Nisiinipitoisuus määritettiin näytteistä micro BCA analyysillä. Valmistettiin ensin 2 µg/ml nisiini A ultra pure kantaliuos. Punnittiin 10,03 mg ultrapuhdasta nisiiniä dekantterilasiin ja pipetoitiin joukkoon 5 millilitraa 20 mM natriumfosfaattipuskuria (pH 2,2). Sekoitettiin magneettisekoittajalla 30 minuutin ajan, jotta nisiini saatiin liukenemaan kunnolla. Tämän jälkeen valmistettiin standardit kantaliuoksesta micro BCA kitin ohjeiden mukaan (taulukko 4).

Taulukko 4. Nisiini standardien valmistus.

Pullo	Puskurin määrä (ml)	Nisiinin määrä ja lähde	Lopullinen nisiinin konsentraatio (µg/ml)
A	4,5	0,5 ml kantaliuosta	200
B	8,0	2,0 ml pullon A laimennosta	40
C	4,0	4,0 ml pullon B laimennosta	20
D	4,0	4,0 ml pullon C laimennosta	10
E	4,0	4,0 ml pullon D laimennosta	5

Näytteitä ja standardeja pipetoitiin kuoppalevyille 150 µl ja aina kolme rinnakkaista. Puskuria, johon standardit oli valmistettu, käytettiin nollanäytteenä. Tämän jälkeen jokaiseen kaivoon pipetoitiin 150 µl työliuosta ja levy sekoitettiin kuoppalevyravistelijassa 30 sekunnin ajan. Kuoppalevy peitettiin kuoppalevykalvolla haihtumisen estämiseksi ja näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyn annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja absorbanssi mitattiin käyttäen Hidex Sense - monikuoppalevylukijaa aallonpituudella 562 nm. Standardisuora on näkyvissä

kuviossa 1. Standardisuora varten on mitattu vain standardit välillä 5–40 µg/ml, sillä oletuksena nisiiniä ei vapaudu yli 40 µg/ml. Näin myös varmistettiin suoran parempi korrelaatiokerroin.



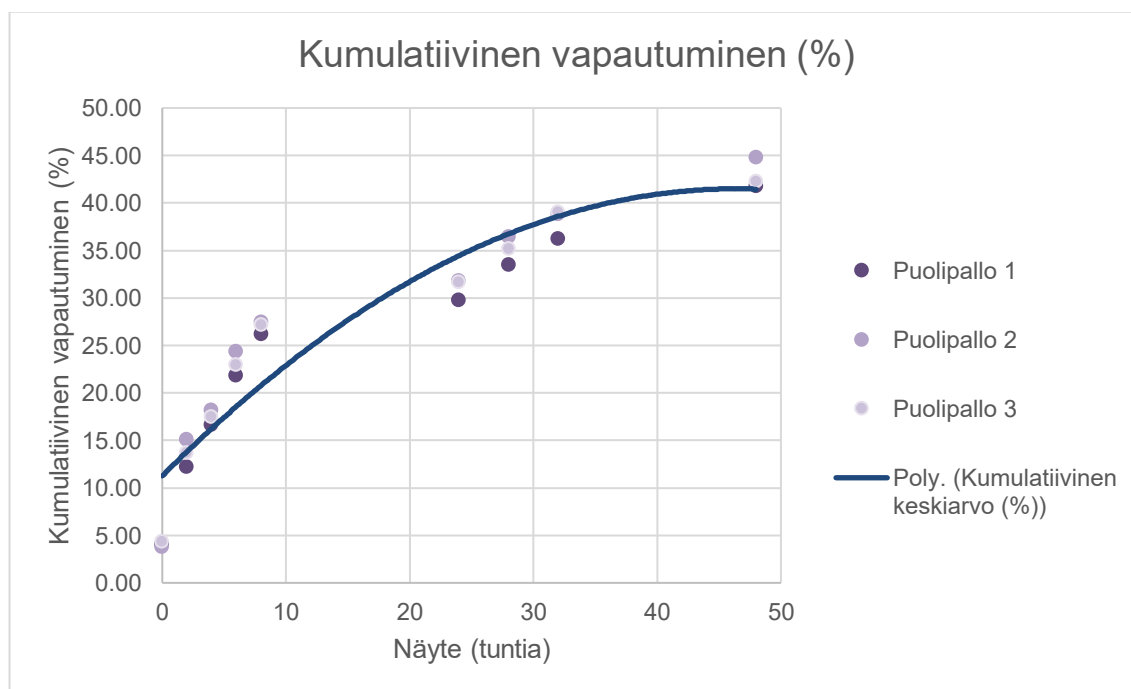
Kuvio 1. Standardisuora.

Taulukosta 5 löytyy puolipallo 1-näytteistä lasketut mittaustulokset esimerkkinä. Tulosten laskeminen on esitelty liitteessä 1. Kuviossa 2 on nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti kaikkien puolipallojen osalta. Kuvioista huomataan, että vapautuminen on aluksi (0–8 h) nopeampaa ja hidastuu ajan myötä. Tällainen vapautumismalli on tyypillistä diffuusioperusteisessa vapautumisessa, jossa ensin havaitaan niin sanottu "burst release" eli näytettä vapautuu ensin suuri määrä liuokseen ennen vapautumisnopeuden tasoittumista. Puolipallojen välillä on havaittavissa pieniä eroja, mutta ne kuitenkin noudattavat kaikki samanlaista trendiä. Tuloksista huomattiin myös toistuva trendi, jossa yön jälkeiset mittauspisteet eivät kasvaneet oikeastaan juuri ollenkaan edellisen päivän viimeiseen mittaukseen verrattuna (ks. taulukko 5 tunti 8 vs. tunti 24). Tämä havaittiin jokaisen puolipallon kohdalla, jolloin voidaan olettaa kyseessä olevan näyteaineen ominaisuus, eikä kyseessä ole mittausrvirhe. Todennäköisesti tämä aiheutuu siitä, että yön yli kestäneiden taukojen takia pidempi puskurinvaihtoväli hidastaa nisiinin diffuusiota. Pidemmän puskurinvaihtovälin takia liuos alkaa kyllästyä nisiinistä, mikä johtaa

vapautumisen hidastumiseen. Konsentraatioero puskuriliuoksen ja implantin välillä ei ole tarpeeksi iso, jotta nisiiniä pääsisi vapautumaan implantista liuokseen. Tätä ongelmaa voidaan yrittää korjata suuremmalla puskuritulavuudella tai puskurinvaihtotilavuutta kasvattamalla näytteenotossa. Keskiarvokäyrästä (kuvio 2) nähdään, että nisiinin vapautuminen hidastuu ajan myötä, eikä nisiinin vapautuminen siis ole täysin lineaarista.

Taulukko 5. Puolipallo 1 alustavat tulokset.

Näyte (tuntia)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	6,01	4,50	6,01	120,11	120,11	4,05
2	16,55	12,41	12,05	240,96	361,07	12,18
4	18,96	14,22	6,54	130,85	491,91	16,59
6	21,96	16,47	7,74	154,89	646,80	21,82
8	22,89	17,17	6,42	128,39	775,19	26,15
24	22,45	16,84	5,29	105,71	880,90	29,72
28	22,34	16,76	5,50	110,08	990,98	33,43
32	20,81	15,61	4,06	81,12	1072,10	36,17
48	23,87	17,91	8,26	165,27	1237,38	41,74



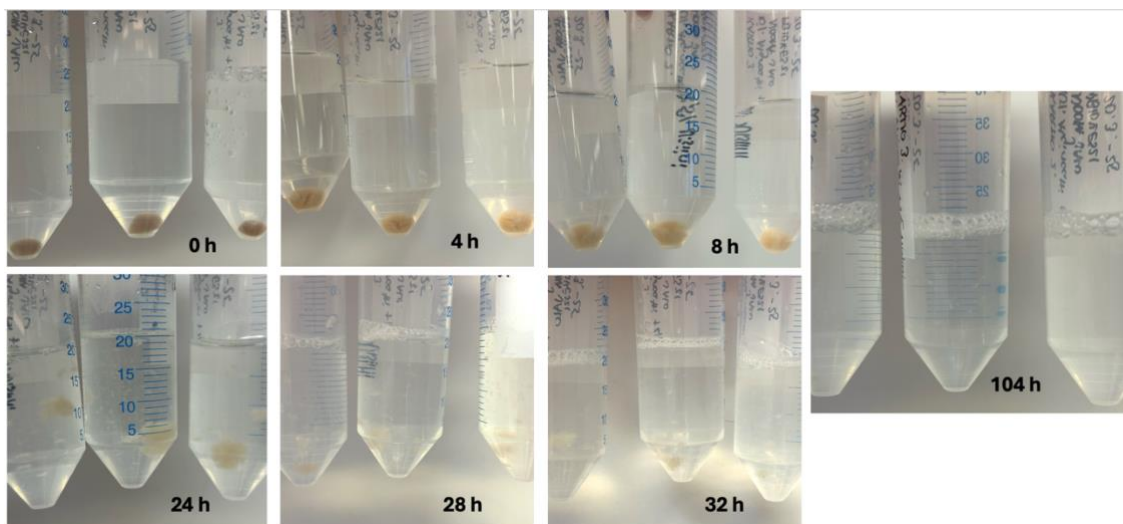
Kuvio 2. Alustava puolipallojen kumulaatiivinen vapautumiskäyrä.

Alustavan analyysin perusteella päädyttiin lisäämään puskurinvaihtotilavuutta muille implanteille. Puskurinvaihtotilavuudeksi muille implanteille valittiin 10 ml. Näin pyrittiin saamaan kaikki nisiini vapautumaan muista implanteista.

6.4.2 Kartiot

Kartioiden dissoluutiokokeet ja BCA-analyysi suoritettiin samalla kaavalla kuin puolipallojen. Poikkeuksena puskurinvaihto näytteenotossa oli 10 ml. Kun näytteet alkoivat hajota palasiksi 24 tunnin jälkeen, näytteet sentrifugoitiin 5000 g kolmen minuutin ajan aina ennen näytteenottoa. Näin pyrittiin välttämään geelipalojen pääsyä näytteeseen.

Kuvassa 11 on esitelty kartioiden käyttäytymistä dissoluutiokokeiden aikana. Neljän tunnin kohdalla implantit alkoivat haljeta muodon pohjasta, mikä viittaa rakenteen heikkenemiseen. Kahdeksan tunnin kohdalla halkeamat olivat selkeästi suurempia ja implantit alkoivat menettää alkuperäistä muotoaan. 24 tunnin jälkeen kaikki rinnakkaiset implantit olivat hajonneet useiksi palasiksi, jotka leijuivat puskuriliuoksessa. 28 tunnin kohdalla kappaleet olivat hajonneet edelleen hiutaleiksi puskuriliuokseen. Nämä hiutaleet jatkoivat pienenemistään testien aikana ja katosivat ja liukenivat lopulta melkein kokonaan puskuriliuokseen. Viimeisessä näytteenotossa 104 tunnin aikana liuoksessa oli kuitenkin havaittavissa vielä hiutaleita. Näiden havaintojen perusteella, voidaan todeta, että implantit eivät pysy ehjinä, vaan hajoaminen tapahtuu vaiheittain pinnan rikkoutumisesta aina hiutalemaiseen liukenemiseen saakka. Tämä implanttien hajoaminen vaikuttaa myös nisiinin vapautumismekanismiin. Nisiiniä todennäköisesti vapautuu implanteista myös rakenteen fysikaalisen hajoamisen seurauksena, eikä pelkästään diffuusiolla.



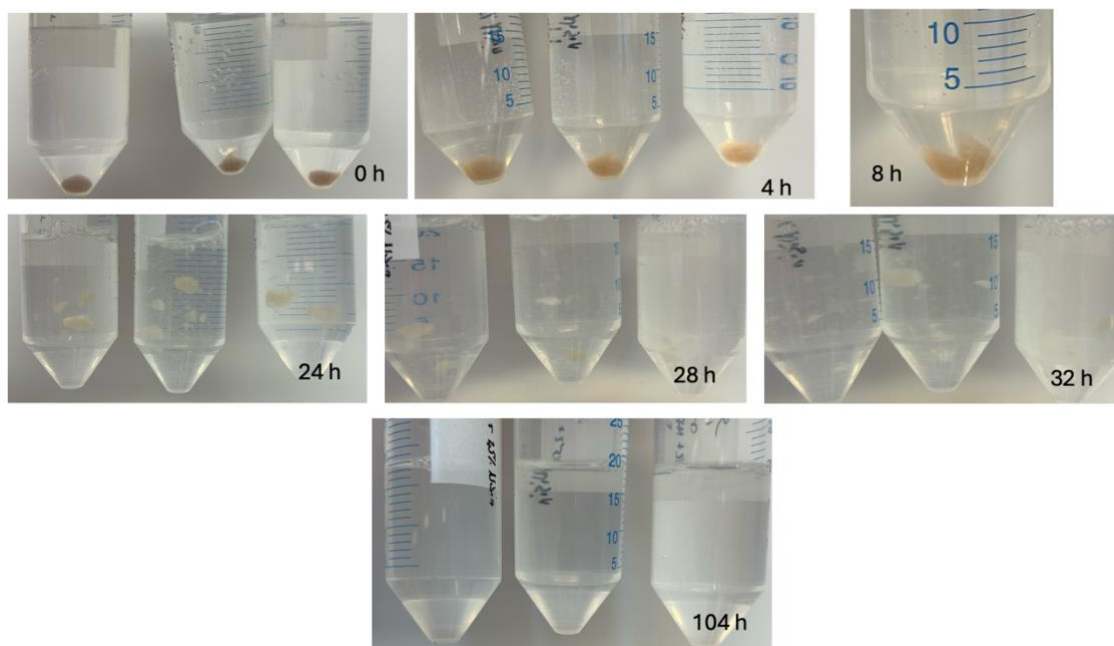
Kuva 11. Kartioiden dissoluutiokoe.

6.4.3 Tabletit

Tablettien dissoluutiokokeet ja analyysi suoritettiin kartioiden tapaan, käyttäen puskurinvaihdossa 10 ml ja sentrifugoiden näytteet 24 tunnin jälkeen aina ennen näytteenottoa.

Kuvassa 12 on esitelty dissoluutiokokeen havaintoja tablettien osalta. Kartioiden ja puolipallojen tapaan myös tableteissa oli havaittavissa halkeamista jo neljän tunnin kohdalla. Kahdeksan tunnin kohdalla halkeamat olivat jo isot ja lähes koko muoto oli hajonnut osiin. Vuorokauden kuluttua implantti oli hajonnut kappaleiksi ja 28 tunnin kohdalla puskuriliuoksessa leijailleet kappaleet olivat lienneet huomattavasti. Nämä hiutaleet jatkoivat liukenemistään dissoluutiokokeiden aikana ja viimeisessä näytteenotossa 104 tunnin kohdalla puskuriliuoksessa ei ollut enää silmin havaittavia hiutaleita. Voidaan siis olettaa, että tabletit liukenivat kokonaan liuokseen. Kartioiden tapaan myös tableteissa voidaan todeta, että implantit eivät pysy ehjinä dissoluutiokokeiden aikana, jolloin geometrian vaikutuksesta nisiinin vapautumiseen ei pystytä tarkastelemaan. Myös tableteissa hajoaminen tapahtuu vaiheittain pinnan halkeamisesta muotojen sirpaloitumiseen saakka. Nisiiniä vapautuu myös

tableteissa sekä rakenteen fysikaalisen hajoamisen seurauksena, sekä diffuusiolla.



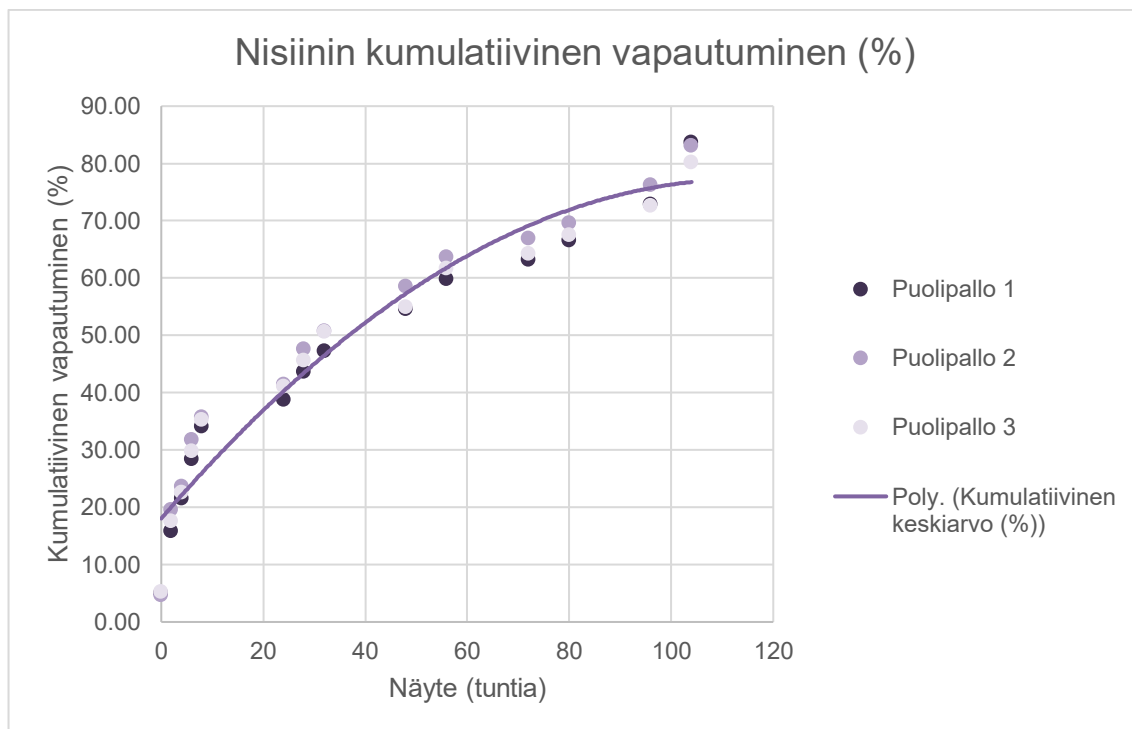
Kuva 12. Tablettien dissoluutiokoe.

7 Tulokset

Tässä luvussa on esitelty dissoluutiokokeiden tulokset ja tulosten analysointi kaikkien implanttien osalta.

7.1 Puolipallot

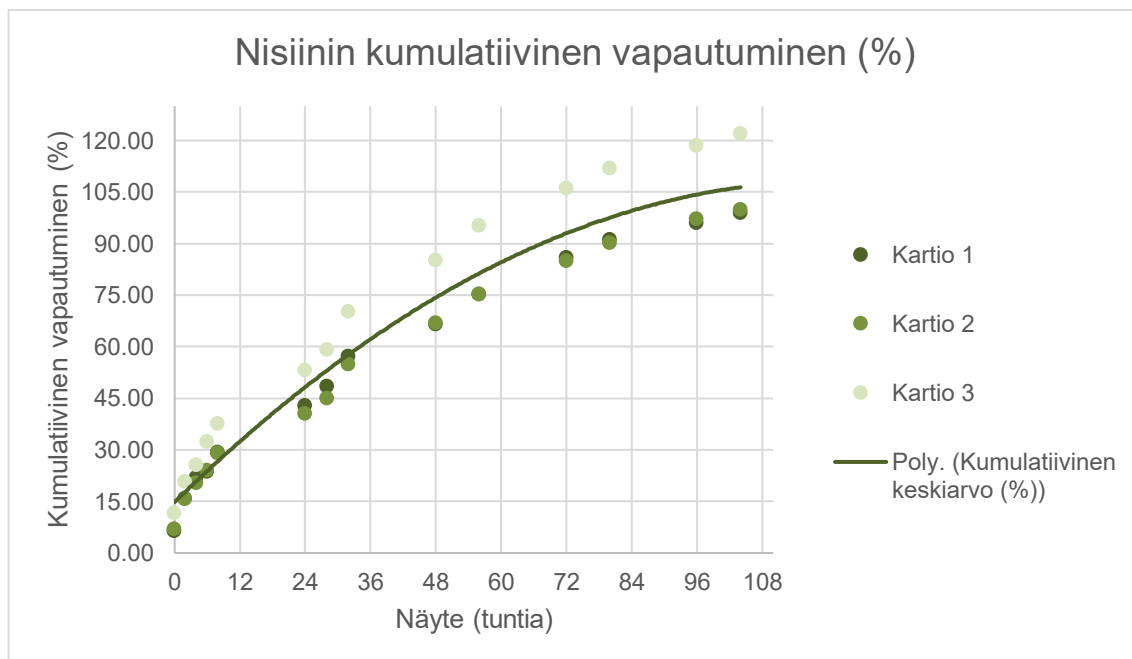
Puolipallojen lopulliset mittaustulokset on esitelty liitteissä 2–4. Mittaustulokset on laskettu liitteen 1 mukaan. Kuviossa 3 on esitelty kaikkien puolipallojen tulokset erikseen, sekä kumulatiivisen keskiarvon polynominen kuvaaja. Kaikkien puolipallojen vapautumisprofiilit olivat samankaltaisia. Nisiinin vapautuminen oli nopeinta ensimmäisen kahdeksan tunnin aikana ja tämän jälkeen vapautuminen hidastui. Puolipallo 1 ja puolipallo 2 vapauttivat eniten nisiiniä, noin 83 %. Puolipalloilla 1 ja 2 on lähes identtiset vapautumisprofiilit. Puolipallo 3 vapautti hieman vähemmän nisiiniä muihin verrattuna (80 %). Kaikkien puolipallojen osalta vapautuminen jäi alle 85 %. Tästä voidaan päätellä, että kaikki nisiini ei päässyt vapautumaan implanteista. Tämä todennäköisesti johtuu siitä, että konsentraatioero liuoksen ja implantin välillä ei ollut tarpeeksi suuri, jolloin nisiiniä ei päässyt vapautumaan liuokseen ja vapautumisprosentti jäi alle 85 %. Dissoluutiokokeiden lopuksi jäljelle jääneissä hiukkasissa oli myös havaittavissa haalea ruskea väri. Tämä viittaa myös siihen, että kaikki nisiini ei päässyt vapautumaan.



Kuvio 3. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti puolipalloista.

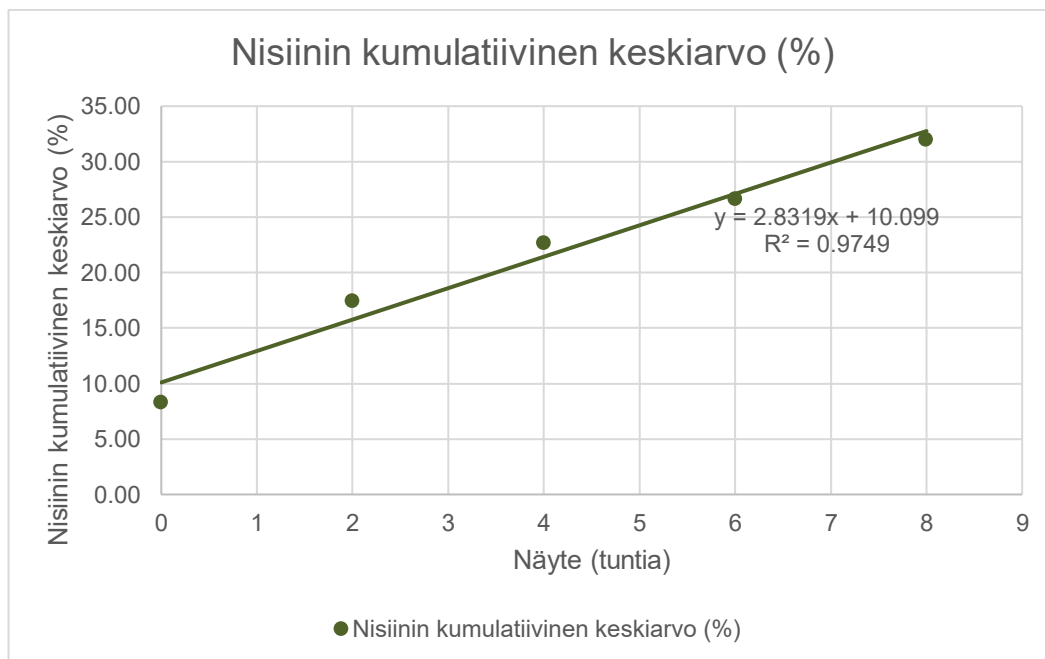
7.2 Kartiot

Kartioiden mittaustulokset löytyvät liitteistä 5–7 ja mittaustulosten laskemiseen käytetyt kaavat on esitelty liitteessä 1. Kartioiden BCA-mittauksen tuloksia on esitelty kuviossa 4, josta näkyy jokaisen kartion havainnot erikseen, sekä kumulatiivisen keskiarvon polynominen käyrä. BCA-mittaus rinnakkaisista kartion muotoisista implanteista osoitti yhtenevää, mutta kuitenkin hieman vaihtelevaa vapautumiskäyttäytymistä. Kaikki kolme kartiota vapauttivat ensimmäisen kahdeksan tunnin aikana nisiiniä liuokseen nopeasti, mikä on tyypillistä diffuusioperusteisessa vapautumisessa. Tämän jälkeen vapautuminen hidastui (kuvio 4).



Kuvio 4. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti kartioista.

Koska implantit myös turpoavat ja hajoavat dissoluutiotestien aikana vapautuu nisiiniä todennäköisesti sekä liukenemalla että diffuusioperusteisesti. Tämä voidaan havaita, kun otetaan käsittelyyn vain ensimmäisen kahdeksan tunnin aikana saadut tulokset (Kuvio 5). Tällöin voidaan huomata vapautumisen olevan melko lineaarista. Tämä viittaa nisiinin vapautumiseen materiaalin liukenemisen vaikutuksesta.



Kuvio 5. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti 0–8 h välillä kartioista.

Rinnakkaisten näytteiden välillä on havaittavissa eroja lopullisessa nisiinin vapautusmäärässä. Kartio 3 vapautti hieman enemmän nisiiniä verrattuna muihin kartion muotoisiin implantteihin. Tämä viittaa mahdollisiin eroihin yksittäisten geelikartioiden rakenteessa, kuten esimerkiksi koossa tai mahdollisesti nisiinin jakautumisessa geelin sisällä. Mikäli geelin valmistusvaiheessa nisiini ei ole liuennut kunnolla tai se on sekoittunut epätasaisesti geelin joukkoon, voi se aiheuttaa eron muihin implantteihin verrattuna.

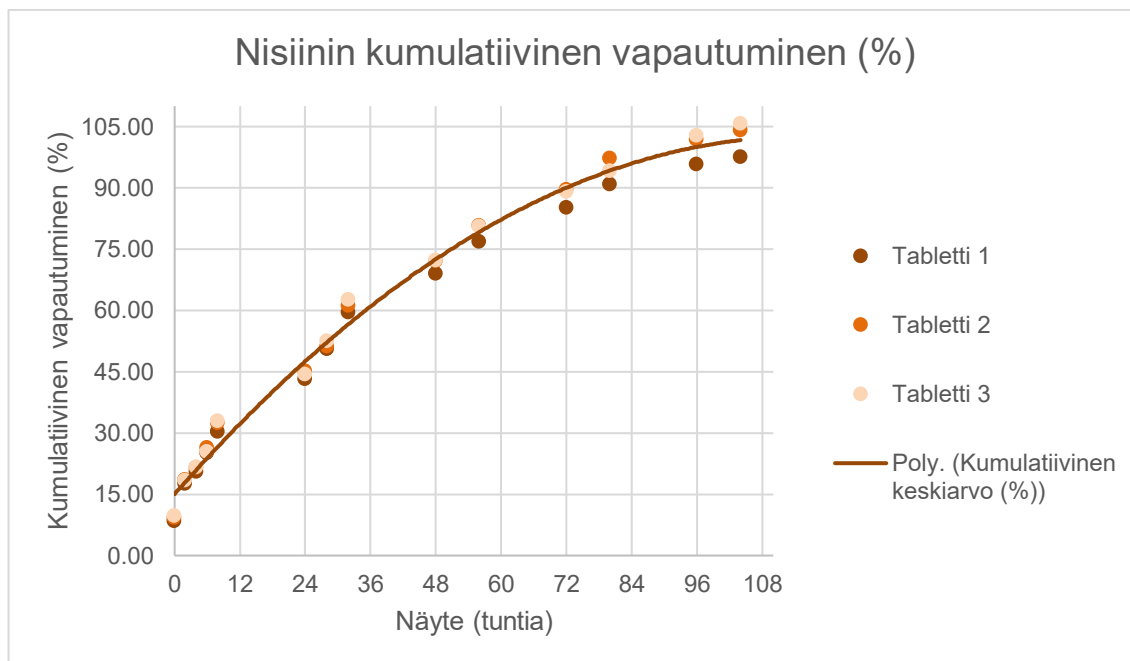
Yleisesti ottaen kaikki kolme kartiota kuitenkin noudattivat samanlaista vapautumiskäyttäytymistä. Kartio 1:n vapautumisprofiili eteni tasaisesti ja saavutti 99 %:n kumulatiivisen vapautumisen 104 tunnin kohdalla. Kartio 2:n vapautuminen oli aluksi hieman nopeampaa, ja se saavutti 100 % vapautumisen noin 104 tunnissa. Kartio 3 vapautti muodoista kaikkein eniten nisiiniä ja sen vapautumisprosentti oli jo alussa suurempi muihin verrattuna. Kartio 3 saavutti yli 100 % kumulatiivisen vapautumisen dissoluutiokokeiden aikana. Tämä viittaa siihen, että kartiossa 3 on joko ollut suurempi määrä nisiiniä tai vapautuminen on ollut nopeampaa esimerkiksi geelin rakenteellisten

erojen takia. Yli 100 % vapautuminen voi viitata joko pitoisuuden paikalliseen saturoitumiseen tai pieneen mittausepä tarkkuuteen.

Dissoluutiokokeet aloitettiin vain puolipalloilla, jolloin muut muodot jäivät jääkaappiin odottamaan testejä. Muodot säilöttiin falcon putkissa kostutetun pumpulin kanssa, jotta vältettäisiin muotojen kuivuminen. Jos kuitenkin pumpuli on ollut liian kosteaa tai falcon putkeen on päässyt tiivistymään vettä jääkaappisäilytyksen aikana, on mahdollista, että geelipaloista on päässyt jo vapautumaan nisiiniä tiivistyneen veden joukkoon. Dissoluutiotestejä aloitettaessa falcon putkissa ei kuitenkaan ollut havaittavissa suurta määrää kosteutta, vain muutamia pisaroita tiivistyneenä putken seinämiin.

7.3 Tabletit

Tablettien mittaustulokset löytyvät liitteistä 8–10. Mittaustulosten laskut on esitelty liitteessä 1. Kuviossa 6 on esitetty tablettien dissoluutiokokeiden BCA analyysin tuloksia. Kuviossa 6 näkyy jokaisen tabletin tulokset erikseen, sekä kumulatiivisen vapautumisen keskiarvon polynominen käyrä. Kaikissa tableteissa on myös havaittavissa diffuusioperusteista vapautumista. Kaikissa tableteissa havaittiin alussa nopeaa vapautumista ja ensimmäisen kahdeksan tunnin aikana nisiiniä vapautui noin 32 % kokonaismassasta. Tämän jälkeen vapautuminen hidastui asteittain (ks. kuvio 6). Koska tabletti-implantit hajosivat puskuriliuokseen, tapahtuu nisiinin vapautumista myös liukenemalla.



Kuvio 6. Nisiinin kumulatiivinen vapautumisprosentti tableteista.

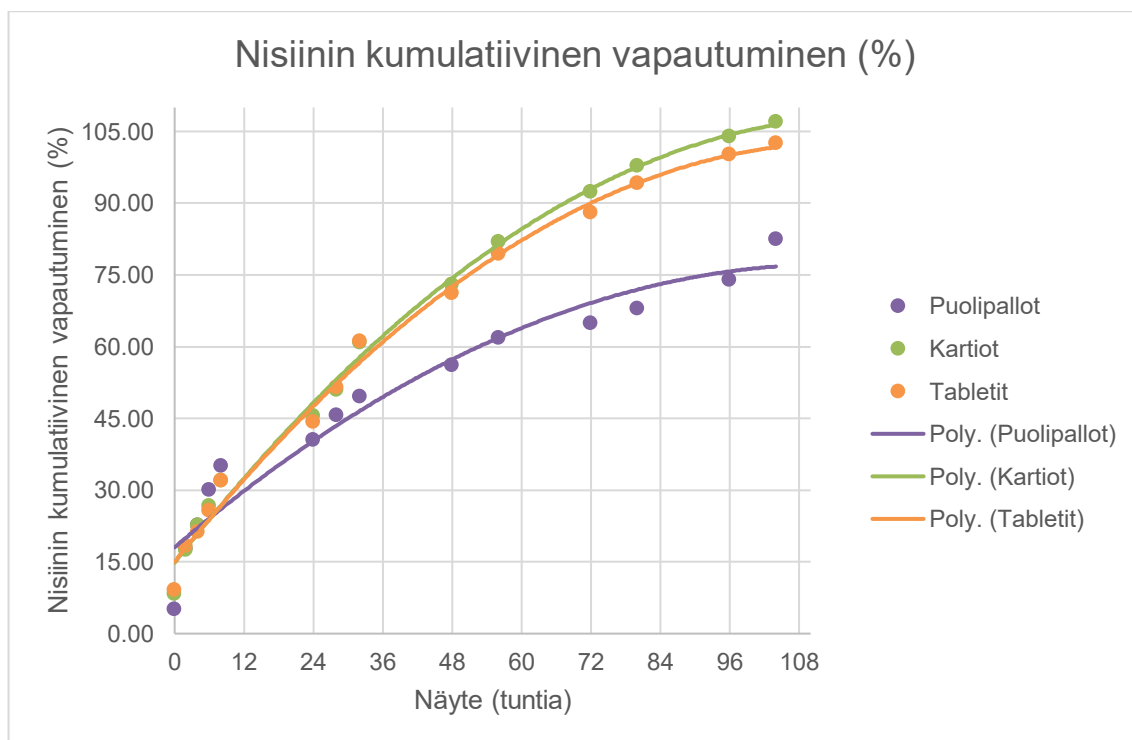
Kuviosta 6 nähdään, että tablettien vapautumisprofiilit olivat keskenään hyvin samankaltaisia koko testien ajan. Havaittavissa on vain hyvin pieniä eroja myöhemmissä aikapisteissä. Tabletilla 3 oli suurin kumulatiivinen vapautumisprosentti (106 %). Tabletin 2 vapautumisprosentti oli hyvin lähellä tablettia 3 ja tabletin 1 vapautumisprosentti oli hieman alhaisempi. Kaikki tabletit kuitenkin saavuttivat yli 95 % vapautumisen jo 96 tunnin kohdalla, mikä osoittaa, että kaikki nisiini vapautui testien aikana.

7.4 Tulosten yhteenveto

Kuviossa 7 on esitelty kaikkien implanttien kumulatiivisen vapautumisen keskiarvot. Koska kaikki implantit hajosivat kappaleiksi jo ensimmäisen vuorokauden aikana, ei implanttien geometrian vaikutusta nisiinin vapautumisprofiiliin pystytä tarkastelemaan. Vapautuminen tapahtui kappaleiden hajoamisen jälkeen sekä diffuusioperusteisesti, että liukenemalla.

Vaikka kuviossa 7 näkyy eroja vapautumiskäyrissä, nämä erot eivät selity geometrian kautta, vaan erot voivat liittyä esimerkiksi implanttien alkuperäiseen

massaan tai implanteissa olleeseen nisiinin määrään. Alginaatin ristisilloittumisen erot voivat myös vaikuttaa vapautuneen nisiinin määrän. Kuviosta voidaan myös todeta, että näytteenottotilavuudella oli merkitystä nisiinin vapautumiseen. Kun näytteenottotilavuutta kasvatettiin, nisiini ei enää saturoitunut liuokseen, vaan nisiini pääsi vapautumaan paremmin kartioista ja tableteista. Kartioissa ja tableteissa saavutettiin 100 % vapautuminen, kun näytteenottotilavuutta kasvatettiin. Tämä siis vähensi nisiinin saturoitumista liuoksessa.



Kuvio 7. Keskiarvot implanttien nisiinin kumulatiivisista vapautumisprosentteista.

8 Loppupohdinta

Työssä tarkasteltiin nisiinin vapautumisprofiilia erimuotoisista implanteista. Nisiini osoittautuikin monilta osin haasteelliseksi. Yksi suurimpia haasteita nisiinin kanssa oli sen liukoisuus. Nisiini liukenee parhaiten happamissa olosuhteissa (ks. luku 2 Nisiini) mutta opinnäytetyössä tarkoituksena oli suorittaa testit ihmiskehoa simuloivissa olosuhteissa, joissa pH on neutraalin puolella. Tämä aiheutti vaikeuksia hydrogeelin valmistuksessa ja geelin koostumuksen optimointi tulostettavaksi osoittautuikin odotettua haastavammaksi. Nisiinin lisäys alginaattihydrogeelin joukkoon muutti geelin käyttäytymistä tavoilla, joita ei osattu ennustaa. Nisiini teki geelistä hyvin löysää, tämä todennäköisesti johtuu siitä, että nisiini vaikuttaa alginaatin ristisilloittumiseen kalsiumkloridin kanssa. Kun alginaatti pitoisuutta kasvatettiin ja esiristisilloitus jätettiin pois, saatiin geelistä tulostettavaa. Nisiinin vaikutusta alginaatin hydroksyyliyhdyntymiseen esiristisilloituksessa tulisi tutkia enemmän.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää eri muotoisten implanttien geometrian vaikutusta nisiinin vapautumiseen. Geometrian vaikutuksen tarkastelu vapautumisprofiiliin ei kuitenkaan käytännössä onnistunut, sillä dissoluutiotesteissä muodot hajosivat osiin melko nopeasti. Tästä syystä muodon vaikutus vapautumisprofiiliin jäi epäselväksi, ja vapautuminen tapahtui todennäköisesti sekä diffuusion että materiaalin hajoamisen seurauksena liukenemisena. Geelin koostumusta pitää siis optimoida, jotta implanttien kestävyttä voidaan parantaa. Näin päästäisiin myös tutkimaan geometrian vaikutusta vapautumiseen.

Havaintojen perusteella nisiinin vapautuminen vaikutti olevan osittain yhteydessä geelin liukenemiseen. Vapautumiskokeiden aikana alginaattigeelin rakenne heikkeni asteittain. Tämä viittaa siihen, että nisiini ei vapautunut pelkästään diffuusion kautta, vaan osittain myös geelin rakenteen hajoamisen ja liukenemisen seurauksena. Nopeaa vapautumista nähtiin kokeiden alussa samanaikaisesti geelin hajotessa, mikä tukee hypoteesia, että nisiinin

vapautuminen on ainakin osin liukenemiseen perustuvaa. Tulokset viittaavat siihen, että geelin liukeneminen on merkittävä vapautumiseen vaikuttava tekijä.

Työssä käytettiin myös hyödyksi sentrifugia näytteenotossa, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa kappaleiden eheyteen ja näin nisiinin vapautumiseen. On mahdollista, että fuugaus hajotti rakenteita entisestään ja aiheutti näin implanttien hajoamista osiin. Sentrifugoinnin jälkeen kappaleet ovat myös lievästi kiinni dissoluutioputkien seinämissä, jolloin ne täytyy sieltä irrottaa. Tämä voi myös osittain vaikuttaa implanttien kasassa pysymiseen, sekä nisiinin vapautumiseen. Näytteiden sentrifugointi ennen näytteenottoa oli kuitenkin tärkeää, sillä näin välttyttiin pipetoimasta geelipaloja näytteeseen. Mikäli implantit olisivat pysyneet kasassa ja lienneet ”kerros kerrokselta” olisi sentrifugointi voitu jättää pois. Näin olisi voitu välttää sentrifugoinnin vaikutus kappaleiden hajoamiseen. Jatkossa tulisi joko geelin koostumusta optimoida niin, että implantit eivät hajoa tai löytää näytteenottoon keino, jolla vältetään geelipalojen päätyminen näytteeseen ilman, että implantit hajoavat lisää käsittelyssä.

Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että kaikista muodoista vapautui merkittävästi nisiiniä. Näytteenottotilavuuden vaihdolla oli huomattava vaikutus nisiinin vapautumismäärään. Puolipallojen kohdalla vapautuminen jäi alle 85 % mikä viittaa liuoksen saturoitumiseen. Mikäli nisiini pitoisuus puskurissa on noussut liian nopeasti lähelle liukoisuusrajaa, diffuusiovoimat eivät enää riitä vapauttamaan nisiiniä geelistä, mikä rajoittaa vapautumista.

Näytteenottotilavuutta kasvattamalla tästä ongelmasta päästiin kuitenkin eroon ja kartioiden, sekä tablettien vapautumisprosentti oli lähellä 100 %. Materiaali soveltuu siis osittain nisiinin kontrolloituun annosteluun. Implanttien hajoaminen heikensi kontrolloidun vapautumisen ennustettavuutta ja saattoi johtaa nopeampaan vapautumiseen. Jatkokehityksessä olisi tärkeää parantaa materiaalin rakennetta ja muodon pysyvyyttä dissoluutiokokeiden aikana, jotta saataisiin aikaan paremmin hallittu ja toistettava vapautumisprofiili.

Lähteet

Abasalizadeh, F.; Moghaddam, S.V.; Alizadeh, E; Akbari, E.; Kashani, E.; Mohammad Bagher Fazljou, S.; Torbati, M. & Akbarzadeh, A. 2020. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. Elsevier. Journal of Biological Engineering 14, Article 8. Viitattu 23.1.2025.
<https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>

Afkhami, S.; Abdi, M. & Baserinia, R. 2025. Effect of geometry on the dissolution behaviour of complex additively manufactured tablets. MDPI. Journal of Manufacturing and Materials Processing. Viitattu 10.2.2025.
<https://doi.org/10.3390/jmmp9010011>

Chakrabarti, S. & Southard, M. 1996. Control of poorly soluble drug dissolution in conditions simulating the gastrointestinal tract flow. 1. effect of tablet geometry in buffered medium. Elsevier. Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 85 issue 3. Viitattu 10.2.2025. <https://doi.org/10.1021/js9502682>

Chan, K.; Song, X.; Shen, L.; Liu, N.; Xhou, X.; Cheng, L. & Chen, J. 2023. Nisin and its application in oral diseases. Elsevier. Journal of Functional Foods. Volume 105. Viitattu 12.2.2025. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105559>

FaCellitate. 2025. What are the types of 3D bioprinting technologies? Viitattu 17.2.2025. <https://facellitate.com/what-are-the-types-of-3d-bioprinting-technologies/>

FAO/WHO. (2013). Nisin. (Monograph 14). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Viitattu 12.2.2025.
https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph14/additive-295-m14.pdf

Gajić, I.; Savić, I. & Svirčev, Z. 2023. Preparation and Characterization of Alginate Hydrogels with High Water-Retaining Capacity. Polymers 15, no. 12: 2592. Viitattu 3.2.2025. <https://doi.org/10.3390/polym15122592>

Gu, Z.; Fu, J.; Lin, H. & He, Y. 2020. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. Elsevier. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 15 issue 5. Viitattu 24.1.2025.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>

Guvendiren, M.; Molde, J.; MD Soares, R. & Kohn, J. 2017. Designing biomaterials for 3D printing. National institute of health. Viitattu 23.1.2025. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5181796/>

Golebiowska, A; Kim, H; Camci-Unal, G. & Nukavarapu, S. 2019. Integration of Technologies for Bone Tissue Engineering. Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Elsevier. Viitattu 25.3.2025. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11063-3>

Handary. 2025. NisinA® P Ultrapure nisin. Viitattu 7.4.2025. <https://www.handary.com/product-show-NisinA-P-Ultrapure-Nisin-A>

Jain, A. King, D. Pontrelli, G. & McGinty, S. 2023. Controlling release from encapsulated drug-loaded devices: insights from modeling the dissolution front propagation. Journal of Controlled Release. Volume 360 Pages 225–235. Viitattu 3.2.2025. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.06.019>.

Kamal, I. Ashfaq, U. Hayat, S. Aslam, B. Sarfraz, M. Yaseen, H. Rajoka, M. Shah, A. & Khurshid, M. 2022. Prospects of antimicrobial peptides as an alternative to chemical preservatives for food safety. ResearchGate. Biotechnology Letters 45. Viitattu 3.3.2025. [10.1007/s10529-022-03328-w](https://doi.org/10.1007/s10529-022-03328-w)

Li, J. & Mooney, D. 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Nature reviews materials. Artikkelin nro. 16071. Viitattu 12.2.2025. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>

Narasimhan, B. & Peppas, N. A. 1996. Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 86, Issue 3. Viitattu 3.2.2025. <https://doi.org/10.1021/js960372z>

Paques, J.; Linden, E.; Rjin, C. & Sagis, L. 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. Elsevier. Advances in Colloid and Interference Science. Volume 209. Viitattu 12.2.2025. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>

PubChem. 2025. Alginate. National library of medicine. Viitattu 17.2.2025. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alginate>

Quin, H. & Quanzi, Y. 2024. Dissolution of porous media with disordered geometry. Elsevier. Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering

Aspects. Volume 701. Viitattu 10.2.2025.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134891>

Qin, Y.; Fan, L.; Zhan, L.; Sun, J.; Liu, J.; Gao, C.; Ma, S.; Pu, X.; Zhao, L.; Zheng, Y.; Jiang, L.; Zhou, C & Fan, Y. 2024. Biofabrication: Bioprinting Process, Printing Materials, and the Frontier Applications in Biomedicine. Elsevier. Additive Manufacturing Frontiers. Volume 3, Issue 4. Viitattu 25.1.2025. <https://doi.org/10.1016/j.amf.2024.200175>.

Sigma-Aldrich. n.d. Sodium alginate. Viitattu 17.2.2025.

<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/product/aldrich/w201502?srsId=AfmBOop cOjXVMZRQrOIWSZAJ0roNyubJVLLCRIUbYnila26YySDBYPG6>

Soliman, L & Donkor, K. 2010. Method development for sensitive determination of nisin in food products by micellar electrokinetic chromatography. Elsevier. Food Chemistry. Volume 119 Issue 2. Viitattu 3.3.2025.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.062>

Solunetti. 2005. Diffuusio. Viitattu 25.3.2025.

<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/diffuusio/2/>

Tappa, K. & Jammalammadka, U. 2018. Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques. MDPI. Journal of functional biomaterials. Volume 9 Issue 1. Viitattu 24.1.2025. <https://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/17>

Thermo Fisher Scientific Inc. 2025. User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit. PDF. Viitattu 13.3.2025.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A55864/tabs?defaultTab=2>

Tieteen termipankki. 2025a. Nimitys: amfifiilinen. Viitattu 25.3.2025.

<https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:amfifiilinen>

Tieteen termipankki. 2025b. Nimitys: in vivo. Viitattu 25.3.2025.

https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:in_vivo

Tieteen termipankki. 2025c. Nimitys: in vitro. Viitattu 25.3.2025.

https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:in_vitro

UPM Biomedicals n.d. What is 3D bioprinting. Viitattu 24.1.2025.

<https://www.upmbiomedicals.com/solutions/life-science/what-is-3d-bioprinting/>

USP. 2025. Dissolution methods database. Viitattu 3.2.2025.
<https://www.usp.org/resources/dissolution-methods-database>

Vijayavenkataraman, S 2023. 3D Bioprinting: Challenges in Commercialization and Clinical Translation. *Journal of 3D Printing in Medicine*. Volume 7, issue 2. Viitattu 17.4.2025. <https://doi.org/10.2217/3dp-2022-0026>

Williams, G.C. & Delves-Broughton, J. 2003. Nisin. Elsevier. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Viitattu 3.3.2025. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00829-4>

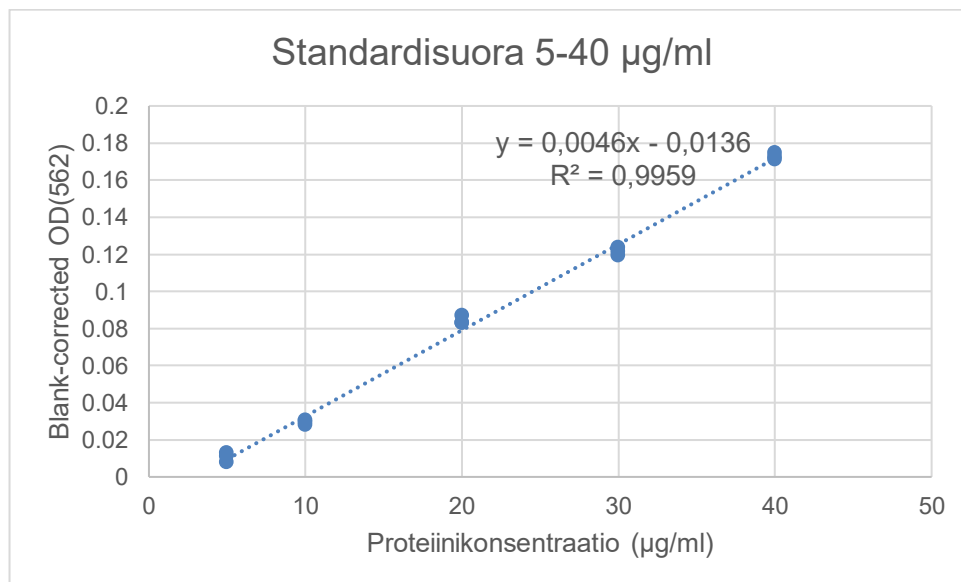
Yang, K.; Wang, L.; Vijayavenkataraman, S.; Yuan, Y.; C.K. Tan, E. & Kang, L. 2024. Recent applications of three-dimensional bioprinting in drug discovery and development. Elsevier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 214. Viitattu 25.1.2025. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115456>.

Dissoluutiokokeiden laskut

Esimerkkilaskut laskettu käyttäen puolipallo 1-näytteen lopullisen analyysin tuloksia.

Konsentraatio

Konsentraatio on laskettu standardisuoran yhtälöä ja blank-corrected absorbanssiarvoja käyttäen seuraavasti:



Suoran yhtälö $y=kx+b$, jossa y = absorbanssi ja x = konsentraatio.

$$x = \frac{y - b}{k}$$

$$x = \frac{0,022 - (-0,0136)}{0,00416} = 7,74 \mu\text{g/ml}$$

Keskiarvot

Kolmesta rinnakkaisesta mittaustuloksesta on määritetty keskiarvot ja seuraavat laskut on laskettu keskiarvoja käyttäen.

$$\text{Keskiarvo} = \frac{7,74 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} + 8,39 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} + 6,65 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{3} = 7,59 \mu\text{g/ml}$$

Pitoisuus, kun huomioidaan puskurinlisäyksen vaikutus

$$\text{keskiarvo} * \frac{15}{20} = 7,59 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} * \frac{15}{20} = 5,70 \mu\text{g/ml}$$

Vapautuneen nisiinin määrä

ensimmäiselle näytteelle (0 h) tämä arvo on sama kuin keskiarvo $7,59 \mu\text{g/ml}$.

Näytteelle 2 h kohdalla ja sen jälkeen lasketaan seuraavasti:

keskiarvo – edellinen arvo pitoisuudesta, jossa huomioitu puskurinlisäys

$$= 21,58 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} - 5,70 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 16,18 \mu\text{g/ml}$$

Vapautuneen nisiinin massa

*Vapautuneen nisiinin määrä * dissoluutio tilavuus*

$$= 7,59 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} * 20 \text{ ml} = 151,88 \mu\text{g}$$

Kumulatiivinen vapautuminen

Ensimmäiselle näytteelle (0 h) tämä arvo on yhtä suuri kuin vapautuneen nisiinin massa $151,88 \mu\text{g}$. Näytteelle 2 tunnin kohdalla ja muille näytteille kumulatiivinen vapautuminen lasketaan seuraavasti:

Vapautuneen nisiinin massa näytteenottohetkellä

+ edellinen kumulatiivinen vapautuminen

$$317,68 \mu\text{g} + 1515,88 \mu\text{g} = 469,57 \mu\text{g}$$

Kumulatiivinen vapautuminen (%)

$$\frac{\text{Kumulatiivinen vapautuminen } (\mu\text{g}) \text{ näytteenottohetkellä}}{\text{Implantin massa } (\mu\text{g})} * 100 \% = 5,12 \%$$

Puolipallo 1 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,022	7,74	7,59	5,70	7,59	151,88	151,88	5,12
	0,025	8,39						
	0,017	6,65						
2	0,084	21,22	21,58	16,18	15,88	317,68	469,57	15,84
	0,085	21,43						
	0,088	22,09						
4	0,105	25,78	24,77	18,58	8,58	171,67	641,23	21,63
	0,1	24,70						
	0,096	23,83						
6	0,12	29,04	28,75	21,57	10,18	203,55	844,78	28,50
	0,116	28,17						
	0,12	29,04						
8	0,119	28,83	29,99	22,49	8,42	168,41	1013,19	34,18
	0,13	31,22						
	0,124	29,91						
24	0,125	30,13	29,41	22,05	6,92	138,33	1151,52	38,85
	0,121	29,26						
	0,119	28,83						
28	0,123	29,70	29,26	21,95	7,21	144,13	1295,65	43,71
	0,115	27,96						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,125	30,13						
32	0,117	28,39						
	0,105	25,78	27,23	20,42	5,29	105,72	1401,38	47,28
	0,113	27,52						
48	0,128	30,78						
	0,131	31,43	31,29	23,47	10,87	217,32	1618,70	54,61
	0,132	31,65						
56	0,137	32,74						
	0,136	32,52	31,36	23,52	7,89	157,90	1776,59	59,93
	0,119	28,83						
72	0,119	28,83						
	0,115	27,96	28,46	21,35	4,94	98,84	1875,43	63,27
	0,118	28,61						
80	0,114	27,74						
	0,108	26,43	26,36	19,77	5,01	100,29	1975,72	66,65
	0,101	24,91						
96	0,122	29,48						
	0,117	28,39	29,12	21,84	9,34	186,88	2162,61	72,96
	0,122	29,48						
104	0,159	37,52						
	0,161	37,96	37,88	28,41	16,05	320,94	2483,55	83,78
	0,162	38,17						

Puolipallo 2 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,02	7,30	6,72	5,04	6,72	134,49	134,49	4,73
	0,018	6,87						
	0,014	6,00						
2	0,097	24,04	26,29	19,72	21,25	424,93	559,42	19,67
	0,129	31,00						
	0,096	23,83						
4	0,093	23,17	25,42	19,07	5,70	114,06	673,48	23,68
	0,107	26,22						
	0,11	26,87						
6	0,133	31,87	30,64	22,98	11,57	231,45	904,93	31,82
	0,126	30,35						
	0,123	29,70						
8	0,117	28,39	28,68	21,51	5,70	114,06	1018,99	35,83
	0,119	28,83						
	0,119	28,83						
24	0,124	29,91	29,62	22,22	8,11	162,25	1181,23	41,54
	0,121	29,26						
	0,123	29,70						
28	0,132	31,65	30,93	23,20	8,71	174,20	1355,43	47,66
	0,127	30,57						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,127	30,57						
32	0,118	28,61						
	0,116	28,17	27,59	20,70	4,40	87,97	1443,41	50,76
	0,106	26,00						
48	0,144	34,26						
	0,124	29,91	31,87	23,90	11,17	223,48	1666,88	58,61
	0,131	31,43						
56	0,135	32,30						
	0,126	30,35	31,14	23,36	7,24	144,86	1811,74	63,71
	0,128	30,78						
72	0,12	29,04						
	0,117	28,39	28,03	21,02	4,67	93,41	1905,14	66,99
	0,109	26,65						
80	0,1	24,70						
	0,098	24,26	24,77	18,58	3,75	74,93	1980,07	69,63
	0,103	25,35						
96	0,119	28,83						
	0,114	27,74	27,96	20,97	9,38	187,61	2167,68	76,22
	0,112	27,30						
104	0,131	31,43						
	0,122	29,48	30,86	23,14	9,89	197,75	2365,43	83,18
	0,132	31,65						

Puolipallo 3 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,027	8,83	7,74	5,80	7,74	154,78	154,78	5,35
	0,022	7,74						
	0,017	6,65						
2	0,092	22,96	23,54	17,65	17,73	354,64	509,42	17,61
	0,095	23,61						
	0,097	24,04						
4	0,102	25,13	24,91	18,68	7,26	145,22	654,64	22,64
	0,096	23,83						
	0,105	25,78						
6	0,116	28,17	29,04	21,78	10,36	207,17	861,81	29,80
	0,118	28,61						
	0,126	30,35						
8	0,122	29,48	29,70	22,27	7,91	158,26	1020,07	35,27
	0,119	28,83						
	0,128	30,78						
24	0,127	30,57	30,71	23,03	8,44	168,77	1188,84	41,11
	0,132	31,65						
	0,124	29,91						
28	0,12	29,04	29,62	22,22	6,59	131,81	1320,65	45,67
	0,123	29,70						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,125	30,13						
32	0,127	30,57						
	0,121	29,26	29,48	22,11	7,26	145,22	1465,87	50,69
	0,118	28,61						
	0,109	26,65						
48	0,117	28,39	28,25	21,18	6,14	122,75	1588,62	54,93
	0,123	29,70						
	0,137	32,74						
56	0,127	30,57	31,07	23,30	9,89	197,75	1786,38	61,77
	0,124	29,91						
	0,109	26,65						
72	0,108	26,43	26,94	20,21	3,64	72,75	1859,13	64,29
	0,114	27,74						
	0,108	26,43						
80	0,098	24,26	24,99	18,74	4,78	95,58	1954,71	67,59
	0,098	24,26						
	0,107	26,22						
96	0,106	26,00	26,07	19,55	7,33	146,67	2101,38	72,66
	0,106	26,00						
	0,128	30,78						
104	0,127	30,57	30,57	22,92	11,01	220,22	2321,59	80,28
	0,126	30,35						

Kartio 1 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,028	9,04	9,04	4,52	9,04	180,87	180,87	6,36
	0,027	8,83						
	0,029	9,26						
2	0,07	18,17	18,03	9,01	13,51	270,14	451,01	15,86
	0,067	17,52						
	0,071	18,39						
4	0,063	16,65	17,74	8,87	8,72	174,49	625,51	22,00
	0,077	19,70						
	0,064	16,87						
6	0,042	12,09	11,22	5,61	2,35	46,96	672,46	23,65
	0,035	10,57						
	0,037	11,00						
8	0,05	13,83	13,68	6,84	8,07	161,45	833,91	29,32
	0,048	13,39						
	0,05	13,83						
24	0,107	26,22	26,07	13,04	19,23	384,64	1218,55	42,85
	0,103	25,35						
	0,109	26,65						
28	0,086	21,65	21,00	10,50	7,96	159,28	1377,83	48,45
	0,079	20,13						
	0,084	21,22						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
32	0,093	23,17	22,96	11,48	12,46	249,13	1626,96	57,21
	0,091	22,74						
	0,092	22,96						
48	0,1	24,70	24,91	12,46	13,43	268,70	1895,65	66,66
	0,097	24,04						
	0,106	26,00						
56	0,103	25,35	24,77	12,38	12,31	246,23	2141,88	75,32
	0,099	24,48						
	0,099	24,48						
72	0,114	27,74	27,52	13,76	15,14	302,75	2444,64	85,96
	0,116	28,17						
	0,109	26,65						
80	0,081	20,57	21,14	10,57	7,38	147,68	2592,32	91,16
	0,084	21,22						
	0,086	21,65						
96	0,074	19,04	17,52	8,76	6,95	138,99	2731,30	96,04
	0,063	16,65						
	0,064	16,87						
104	0,05	13,83	12,88	6,44	4,12	82,46	2813,77	98,94
	0,045	12,74						
	0,042	12,09						

Kartio 2 dissoluutiokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,035	10,57	10,28	5,14	10,28	205,51	205,51	6,99
	0,034	10,35						
	0,032	9,91						
2	0,067	17,52	17,88	8,94	12,75	254,93	460,43	15,66
	0,071	18,39						
	0,068	17,74						
4	0,058	15,57	15,93	7,96	6,99	139,71	600,14	20,41
	0,057	15,35						
	0,064	16,87						
6	0,045	12,74	13,25	6,62	5,28	105,65	705,80	24,01
	0,044	12,52						
	0,053	14,48						
8	0,055	14,91	14,04	7,02	7,42	148,41	854,20	29,05
	0,055	14,91						
	0,043	12,30						
24	0,101	24,91	23,97	11,99	16,95	338,99	1193,19	40,58
	0,092	22,96						
	0,097	24,04						
28	0,075	19,26	18,61	9,30	6,62	132,46	1325,65	45,09
	0,072	18,61						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,069	17,96						
32	0,095	23,61						
	0,091	22,74	23,90	11,95	14,59	291,88	1617,54	55,01
	0,103	25,35						
48	0,127	30,57						
	0,122	29,48	29,55	14,78	17,60	352,03	1969,57	66,99
	0,118	28,61						
56	0,106	26,00						
	0,114	27,74	26,87	13,43	12,09	241,88	2211,45	75,21
	0,11	26,87						
72	0,117	28,39						
	0,11	26,87	27,88	13,94	14,45	288,99	2500,43	85,04
	0,117	28,39						
80	0,08	20,35						
	0,085	21,43	21,51	10,75	7,57	151,30	2651,74	90,19
	0,091	22,74						
96	0,084	21,22						
	0,084	21,22	21,14	10,57	10,39	207,83	2859,57	97,26
	0,083	21,00						
104	0,05	13,83						
	0,056	15,13	14,41	7,20	3,83	76,67	2936,23	99,87
	0,052	14,26						

Kartio 3 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,065	17,09	16,51	8,25	16,51	330,14	330,14	11,61
	0,06	16,00						
	0,062	16,43						
2	0,087	21,87	21,29	10,64	13,04	260,72	590,87	20,78
	0,084	21,22						
	0,082	20,78						
4	0,073	18,83	17,59	8,80	6,95	138,99	729,86	25,66
	0,065	17,09						
	0,064	16,87						
6	0,068	17,74	18,32	9,16	9,52	190,43	920,29	32,36
	0,069	17,96						
	0,075	19,26						
8	0,063	16,65	16,72	8,36	7,57	151,30	1071,59	37,68
	0,062	16,43						
	0,065	17,09						
24	0,123	29,70	30,49	15,25	22,13	442,61	1514,20	53,25
	0,126	30,35						
	0,131	31,43						
28	0,096	23,83	23,68	11,84	8,43	168,70	1682,90	59,18
	0,093	23,17						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,097	24,04						
32	0,112	27,30						
	0,108	26,43	27,59	13,80	15,75	315,07	1997,97	70,26
	0,12	29,04						
	0,156	36,87						
48	0,143	34,04	35,06	17,53	21,26	425,22	2423,19	85,21
	0,144	34,26						
	0,127	30,57						
56	0,127	30,57	31,87	15,93	14,34	286,81	2710,00	95,30
	0,145	34,48						
	0,133	31,87						
72	0,13	31,22	31,29	15,64	15,36	307,10	3017,10	106,09
	0,128	30,78						
	0,098	24,26						
80	0,096	23,83	24,04	12,02	8,40	167,97	3185,07	112,00
	0,097	24,04						
	0,081	20,57						
96	0,078	19,91	21,36	10,68	9,34	186,81	3371,88	118,57
	0,095	23,61						
	0,061	16,22						
104	0,061	16,22	15,64	7,82	4,96	99,13	3471,01	122,06
	0,053	14,48						

Tabletti 1 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,049	10,41	10,10	5,05	10,10	201,98	201,98	8,43
	0,047	10,04						
	0,046	9,85						
2	0,081	16,33	16,15	8,07	11,10	221,98	423,95	17,70
	0,079	15,96						
	0,08	16,15						
4	0,056	11,70	11,52	5,76	3,44	68,89	492,84	20,57
	0,054	11,33						
	0,055	11,52						
6	0,055	11,52	11,21	5,60	5,45	109,01	601,85	25,12
	0,053	11,15						
	0,052	10,96						
8	0,056	11,70	11,83	5,91	6,22	124,44	726,30	30,32
	0,057	11,89						
	0,057	11,89						
24	0,108	21,33	21,40	10,70	15,48	309,63	1035,93	43,24
	0,108	21,33						
	0,109	21,52						
28	0,107	21,15	19,54	9,77	8,85	176,91	1212,84	50,63
	0,096	19,11						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,092	18,37						
32	0,104	20,59						
	0,103	20,41	20,41	10,20	10,64	212,72	1425,56	59,51
	0,102	20,22						
48	0,114	22,44						
	0,108	21,33	21,64	10,82	11,44	228,77	1654,32	69,06
	0,107	21,15						
56	0,101	20,04						
	0,1	19,85	20,10	10,05	9,28	185,56	1839,88	76,80
	0,103	20,41						
72	0,11	21,70						
	0,094	18,74	20,10	10,05	10,05	200,99	2040,86	85,19
	0,1	19,85						
80	0,079	15,96						
	0,084	16,89	16,83	8,41	6,78	135,56	2176,42	90,85
	0,088	17,63						
96	0,072	14,67						
	0,071	14,48	14,42	7,21	6,01	120,12	2296,54	95,87
	0,069	14,11						
104	0,047	10,04						
	0,042	9,11	9,36	4,68	2,15	42,96	2339,51	97,66
	0,041	8,93						

Tabletti 2 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,051	10,78	10,84	5,42	10,84	216,79	216,79	9,36
	0,05	10,59						
	0,053	11,15						
2	0,079	15,96	16,21	8,10	10,79	215,80	432,59	18,68
	0,076	15,41						
	0,086	17,26						
4	0,052	10,96	11,46	5,73	3,35	67,04	499,63	21,57
	0,053	11,15						
	0,059	12,26						
6	0,059	12,26	11,33	5,67	5,60	112,10	611,73	26,41
	0,049	10,41						
	0,054	11,33						
8	0,067	13,74	12,63	6,31	6,96	139,26	750,99	32,43
	0,06	12,44						
	0,056	11,70						
24	0,106	20,96	21,15	10,57	14,83	296,67	1047,65	45,24
	0,109	21,52						
	0,106	20,96						
28	0,088	17,63	17,63	8,81	7,06	141,11	1188,77	51,33
	0,09	18,00						
	0,086	17,26						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
32	0,104	20,59	20,35	10,17	11,53	230,62	1419,38	61,29
	0,098	19,48						
	0,106	20,96						
48	0,122	23,93	22,69	11,35	12,52	250,37	1669,75	72,10
	0,111	21,89						
	0,113	22,26						
56	0,107	21,15	21,46	10,73	10,11	202,22	1871,98	80,83
	0,11	21,70						
	0,109	21,52						
72	0,106	20,96	20,96	10,48	10,23	204,69	2076,67	89,67
	0,106	20,96						
	0,106	20,96						
80	0,102	20,22	19,30	9,65	8,81	176,30	2252,96	97,28
	0,09	18,00						
	0,099	19,67						
96	0,073	14,85	14,91	7,46	5,27	105,31	2358,27	101,82
	0,074	15,04						
	0,073	14,85						
104	0,048	10,22	10,22	5,11	2,77	55,31	2413,58	104,21
	0,047	10,04						
	0,049	10,41						

Tabletti 3 dissoluutiokokeen tulokset

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
0	0,053	11,15	11,70	5,85	11,70	234,07	234,07	9,71
	0,056	11,70						
	0,059	12,26						
2	0,08	16,15	16,33	8,17	10,48	209,63	443,70	18,41
	0,085	17,07						
	0,078	15,78						
4	0,06	12,44	12,20	6,10	4,03	80,62	524,32	21,76
	0,059	12,26						
	0,057	11,89						
6	0,054	11,33	10,47	5,23	4,37	87,41	611,73	25,38
	0,049	10,41						
	0,045	9,67						
8	0,071	14,48	14,42	7,21	9,19	183,70	795,43	33,01
	0,072	14,67						
	0,069	14,11						
24	0,105	20,78	20,90	10,45	13,69	273,83	1069,26	44,37
	0,105	20,78						
	0,107	21,15						
28	0,104	20,59	20,22	10,11	9,77	195,43	1264,69	52,48
	0,102	20,22						

Näyte (tuntia)	Blank-corrected OD(562)	Proteiini konsentraatio (µg/mL)	Keskiarvot (µg/mL)	Pitoisuus kun huomioidaan puskurilisäys	Vapautunut nisiinin määrä (µg/mL)	Vapautuneen nisiinin massa (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (µg)	Kumulatiivinen vapautuminen (%)
	0,1	19,85						
32	0,112	22,07						
	0,11	21,70	22,38	11,19	12,27	245,43	1510,12	62,66
	0,119	23,37						
48	0,124	24,30						
	0,11	21,70	22,88	11,44	11,69	233,70	1743,83	72,36
	0,115	22,63						
56	0,105	20,78						
	0,107	21,15	21,46	10,73	10,02	200,37	1944,20	80,67
	0,114	22,44						
72	0,107	21,15						
	0,106	20,96	20,96	10,48	10,23	204,69	2148,89	89,17
	0,105	20,78						
80	0,081	16,33						
	0,082	16,52	16,58	8,29	6,10	121,98	2270,86	94,23
	0,084	16,89						
96	0,098	19,48						
	0,091	18,19	18,68	9,34	10,39	207,78	2478,64	102,85
	0,092	18,37						
104	0,061	12,63						
	0,065	13,37	12,94	6,47	3,60	71,98	2550,62	105,83
	0,062	12,81						