

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2014

Nikolai Neradko

SOLUKAPSELOINTIIN KÄYTETTÄVIEN BIOMATERIAALIEN HUOKOISTAMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Nikolai Neradko

SOLUKAPSELOINTIIN KÄYTETTÄVIEN BIOMATERIAALIEN HUOKOISTAMINEN

Biomateriaalien tavoite on parantaa tai korvata biologisia toimintoja. Biomateriaaleja voidaan käyttää sellaisenaan tai niihin voidaan kapseloida soluja. Kudosteknologiassa käytettävien biomateriaalien tärkeimmät ominaisuudet ovat huokoisuus ja mekaaniset ominaisuudet (kuten elastinen moduuli), joiden pitää vastata kohdekudoksia. Opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä huokoisuutta silikapohjaiseen biomateriaaliin ja valmistaa huokoista materiaalia solukapselointia varten.

Silikapohjaiset biomateriaalit valmistettiin sooli-geelimenetelmällä. Menetelmällä valmistettu materiaali on helposti muokattavissa ja ominaisuuksiltaan viskoelastinen. Materiaalin huokoisuutta lisättiin vaahdottamalla sekä lisäämällä huokoistajia, eli porogeenejä, jotka liuotettiin pois soluviljelyolosuhteissa. Materiaalien reologisia ominaisuuksia ja stabiilisuutta tutkittiin reometrillä.

Opinnäytetyössä valmistettujen materiaalien huokostilavuutta saatiin lisättyä moninkertaiseksi vaahdottamalla. Partikkelien liutusmenetelmällä vaahdotettujen materiaalien huokostilavuus nousi vielä noin 1-5 % huokostilavuutta, riippuen porogeenistä ja sen pitoisuudesta. Materiaalit olivat elastiselta moduuliltaan stabiileja viiden vuorokauden ajan soluviljelyolosuhteissa. Valmistettujen materiaalien elastisten moduulien perusteella materiaaleja voidaan käyttää esimerkiksi lihassolujen kapseloinnissa.

ASIASANAT:

biomateriaali, solukapselointi, hydrogeeli, silika, huokoistaminen, huokoinen, reologia, reometri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2014 | 84

Mika Jokinen, Principal Lecturer

Nikolai Neradko

ENHANCEMENT OF BIOMATERIAL POROSITY FOR CELL ENCAPSULATION

The purpose of biomaterials is to improve or replace biological functions. Biomaterials can be used as such or cells can be encapsulated into biomaterials. The critical characteristics of biomaterials are porosity and certain mechanical properties (such as elastic modulus), which must correspond to the properties of the target tissue. The purpose of this thesis was to increase porosity in silica-based materials and produce a porous material for cell encapsulation.

Silica-based biomaterials were produced by the sol-gel method. The material produced by this method is easily customizable and has viscoelastic properties. The porosity of the material was enhanced by foaming and adding porogens, which were removed by dissolution in cell culture conditions. The rheological properties and stability of the materials were studied by rheometry.

Multifold porosity of the materials produced in this thesis was achieved by foaming and the porosity of the foamed material was increased by around a further 1 to 5 % by the particle dissolution method, depending on the porogen and its concentration. The elastic modulus of silica based materials is stable for five days in cell culture conditions. The silica-based materials produced in this thesis can be used for encapsulation of muscle cells.

KEYWORDS:

biomaterials, encapsulation, hydrogel, silica, porogen, porous, rheology, rheometer

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	8
1 JOHDANTO	9
2 KUDOSTEKNOLOGIA	11
3 BIOMATERIAALIT	13
3.1 Solukantajamateriaalit	13
3.2 Hydrogeelit	15
3.2.1 SiO ₂ -hydrogeelit	17
3.3 Materiaalin huokoistaminen	17
3.3.1 Partikkelien liuotusmenetelmä	18
3.3.2 Vaahdotusmenetelmä	18
4 REOLOGIA	19
4.1 Viskositeetti	19
4.2 Materiaalityypit	21
4.3 Oskillaatio	26
4.3.1 Amplitudipyyhkäisy	29
4.3.2 Frekvenssipyyhkäisy	31
4.4 Mittausgeometria	32
4.5 Kapillaariviskosimetri	33
4.6 Reometri	35
5 SiO₂:N SOOLI-GEELIPROSESSOINTI	38
5.1 Geelin muodostuminen	41
5.2 Komposiittigeelit	43
6 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	44
6.1 Soolin valmistus	44
6.2 Komposiittisoolien valmistus	45
6.3 Mediumin valmistus	46
6.4 Geelin muodostuminen	46
6.5 Vaahdotetun geelin valmistus	47
6.6 Reologiset mittaukset	49
6.6.1 Amplitudipyyhkäisy	49

6.6.2 Frekvenssipyyhkäisy	49
6.7 Porogeenin liuottaminen vaahdotetusta geelistä ja vaahdotettujen geelien stabilisuusseuranta soluviljelyolosuhteissa	50
6.8 Glukoosin ja dekstriinin määrittäminen spektrofotometrisesti	51
6.9 Dekstriinin pilkkominen glukoosimolekyyleiksi	52
7 TULOKSET	53
7.1 Vaahdotetun geelin muodostuminen	53
7.2 LVE-alueen määrittäminen	53
7.3 Frekvenssipyyhkäisymittaukset	54
7.3.1 Vaahdotettujen glukoosigeelien reologia	55
7.3.2 Vaahdotettujen dekstriinigeelien reologia	58
7.3.3 Mediumin vaikutus vaahdon reologiaan	65
7.3.4 Sooli-mediumsuhteen vaikutus vaahdon reologiaan	67
7.4 Glukoosin ja dekstriinin määrittäminen spektrofotometrisesti	68
7.4.1 Glukoosin määrittäminen spektrofotometrisesti	68
7.4.2 Dekstriinin määrittäminen spektrofotometrisesti	70
7.4.3 Sooli-mediumsuhteen vaikutus dekstriinin vapautumiseen	74
7.5 Dekstriinin pilkkominen glukoosimolekyyleiksi	75
8 POHDINTA	78
9 JOHTOPÄÄTÖKSET	82
LÄHTEET	83
 KUVAT	
Kuva 1. Kudosteknologian periaate. Kuvan alkuperäislähde (Joensuu, 2006).	11
Kuva 2. Kantajamateriaalin rakenne.	14
Kuva 3. Newtonin viskositeettimalli (Mezger, 2011).	19
Kuva 4. Nopeuden muutos tasojen välissä Newtonisessa mallissa (Mezger, 2011).	20
Kuva 5. Jousimalli (Iljinih, 2005).	24
Kuva 6. Maxwellin malli (Iljinih, 2005).	25
Kuva 7. Kelvin/Voigtin malli (Iljinih, 2005).	26
Kuva 8. Oskillaation Newton-malli (Mezger, 2011).	26
Kuva 9. Oskillaatiomittauksen malli (Mezger, 2011).	27
Kuva 10. Amplitudipyyhkäisy (Mezger, 2011).	30
Kuva 11. Frekvenssipyyhkäisy (Mezger, 2011).	32
Kuva 12. Kartio-levymittapää (Mezger, 2011).	32
Kuva 13. Levy-levymittapää (Mezger, 2011).	33

Kuva 14. Übbelohde-kapillaariviskosimetri (Mezger, 2011).	34
Kuva 15. Piialkoksidi.	38
Kuva 16. Silikan polymerisaatio Ilerin mukaan.	40
Kuva 17. Sooli-geeliprosessoidun silikageelin polymeeriverkon muodostuminen (Jokinen, et al., 2010).	41
Kuva 18. Geelitymisprosessit eri menetelmillä (Jokinen, et al., 1998).	42
Kuva 19. Geelin vaahdotus kuoppalevyllä Ultra-Turrax T25 -homogenisaattorilla.	48
Kuva 20. Sokerien pelkistys 3,5-dinitrosalisyylihapolla.	51
Kuva 21. Vaahdotettu geeli. A: R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 ((DMEM / FBS / NaOH)), B: R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 ((RPMI / FBS / NaOH)), C: R70-geeli, dekstriini 10 %, 3:1 ((RPMI / FBS / NaOH)).	53

KUVIOT

Kuvio 1. Newtoniset ja ei-newtoniset fluidit.	22
Kuvio 2. Ei-newtoniset fluidit.	23
Kuvio 3. Tiksotrooppinen käyttäytyminen. Kuvio 4. Reopektinen käyttäytyminen.	24
Kuvio 5. Oskillaatio sinikäyränä esitettynä.	28
Kuvio 6. AS-testin kuvaaja.	31
Kuvio 7. Esimerkkikuvaaja AS-mittauksesta.	54
Kuvio 8. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, glukoosi 10 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	55
Kuvio 9. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, glukoosi 10 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	56
Kuvio 10. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, glukoosi 20 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	56
Kuvio 11. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, glukoosi 20 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	57
Kuvio 12. Säilytyksen vaikutus glukoosivaahdojen elastiseen moduuliin.	57
Kuvio 13. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	59
Kuvio 14. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	59
Kuvio 15. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 20 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	60
Kuvio 16. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 20 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	60
Kuvio 17. Säilytyksen vaikutus dekstriinivaahdojen elastiseen moduuliin.	61
Kuvio 18. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 10 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	62
Kuvio 19. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 10 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	63
Kuvio 20. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 20 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).	63
Kuvio 21. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaaho, dekstriini 20 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).	64
Kuvio 22. Säilytyksen vaikutus dekstriini-amylaasivaahdojen elastiseen moduuliin.	64
Kuvio 23. Mediumin vaikutus R70-vaahdon elastiseen moduuliin.	66
Kuvio 24. Sooli-mediumsuhteen vaikutus elastiseen moduuliin soluviljelyolosuhteissa.	67
Kuvio 25. Glukoosin standardisuora.	69

Kuvio 26. Glukoosin vapautuminen vaahdoista.	70
Kuvio 27. Dekstriinin standardisuora.	71
Kuvio 28. Dekstriinin vapautuminen vaahdoista.	72
Kuvio 29. Dekstriinin vapautuminen vaahdoista, jotka sisälsivät dekstriiniä ja amylaasia.	73
Kuvio 30. Sooli-mediumsuhteen vaikutus dekstriinin vapautumiseen.	75
Kuvio 31. Liuoksien kinemaattinen viskositeetti suhteessa polymeeriliuosten konsentraatioon.	77

TAULUKOT

Taulukko 1. Kudosten ja materiaalien elastisia moduuleja (Dubrovsky, 2003; Sharkeev, 2013).	15
Taulukko 2. Anton Paar MCR 102:n ominaisuudet (Anton Paar, 2011).	36
Taulukko 3. Näytteet.	48
Taulukko 4. Vaahdotettujen glukoosigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.	58
Taulukko 5. Vaahdotettujen dekstriinigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.	61
Taulukko 6. Vaahdotettujen dekstriini-amylaasigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.	65
Taulukko 7. Tulokset mediumin vaikutuksesta R70-vaahdon elastiseen moduuliin.	66
Taulukko 8. Tulokset sooli-mediumsuhteen vaikutuksesta R70-vaahdon elastiseen moduuliin.	67
Taulukko 9. Tulokset glukoosin standardiliuoksille.	68
Taulukko 10. Tulokset glukoosin vapautumisesta vaahdoista.	69
Taulukko 11. Tulokset dekstriinin standardiliuoksille.	70
Taulukko 12. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista.	71
Taulukko 13. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista, jotka sisälsivät dekstriiniä ja amylaasia.	73
Taulukko 14. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista, jotka muodostettiin sooli-mediumsuhteilla 2:1, 3:1 ja 4:1.	74
Taulukko 15. Tulokset liuoksien valumisajoista Übbelohde-kapillaariviskosimetrissa ja niiden kinemaattiset viskositeetit.	76

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

SiO ₂	piiksid, silika
PEG	polyetyleeniglykoli
PAA	polyakrylihappo
TEOS	tetraetyyliortosilikaatti
TMOS	tetrametyyliortosilikaatti
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
FBS	Fetal Bovine Serum
EtOH	Etanoli, etyylialkoholi
NaOH	Natriumhydroksidi
HCl	Suolahappo
AS	<i>Amplitude sweep</i> , amplitudipyyhkäisy
FS	<i>Frequency sweep</i> , frekvenssipyyhkäisy
LVE	Lineaarinen viskoelastinen alue
EC	<i>Electrically commutated</i> , sähköisesti kommutoitu
DNS	3,5-dinitrosalisyylihappo
τ	Leikkausnopeus
τ_0	Myötöraja
$\dot{\gamma}$	Leikkausnopeus
γ	Leikkausliukuma
γ_L	Raja-arvo
η	Dynaaminen viskositeetti
ν	Kinemaattinen viskositeetti
G	Leikkausmoduuli
G'	Elastinen moduuli
G''	Viskoottinen moduuli
G*	Kompleksinen moduuli
$\tan \delta$	Häviötekijä

1 JOHDANTO

Kudosteknologiassa yhdistetään soluja biomateriaaleihin, joilla korjataan kudosten vaurioita. Biomateriaalin on oltava sopiva fysiologiseen ympäristöön, muuten materiaalin ja vastaanottavan kudoksen välille voi tulla yhteensopivuusongelmia. Biomateriaaliin voidaan kapseloida soluja, jotka auttavat materiaalin sopeutumista fysiologiseen ympäristöön ja auttavat kudoksen kasvussa. Biomateriaalilta vaaditaan kolme yleistä ominaisuutta, jotta siitä saataisiin kaikki hyöty irti; materiaalin mekaaniset ominaisuudet on oltavat samat kuin vastaanottavan kudoksen ominaisuudet sekä materiaalin rakenne on oltava kolmiulotteinen ja huokoinen, jotta solut pääsevät kasvamaan materiaalissa.

Tämä opinnäytetyö on tehty Cell-in-Gel-projektissa, joka toimii Turun Ammattikorkeakoulussa. Projektin tavoitteena on hydrogeelien ja vaahtojen valmistus ja kehitys, sekä solukapseloinnin optimointi. Hydrogeelejä käytetään biomateriaalina kudosteknologiassa, eli ihmisen varaosina ja kudosparanemisen nopeuttajana, kudoksensisäisessä lääkeannostelussa, kolmiulotteisissa solututkimuksissa ja biokatalyytteinä bioreaktoreissa.

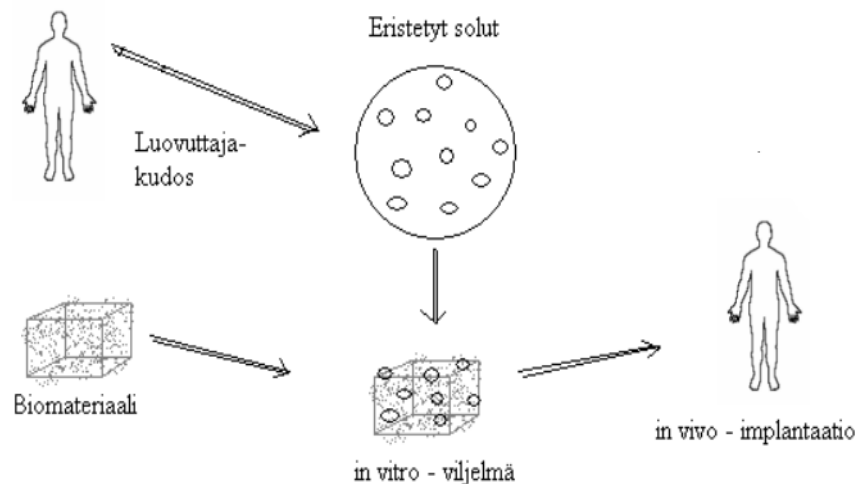
Tässä opinnäytetyössä materiaalina on käytetty silikapohjaisia hydrogeelejä, jotka ovat valmistettu sooli-geelimenetelmällä. Aiemmin on havaittu, että solut eivät selviydy geelin sisällä kovin pitkään. Geelin sisällä ei todennäköisesti ole tarpeeksi tilaa (huukoisia) soluille, eivätkä ne saa riittävästi ravintoa geelin sisällä selvitäkseen, vaikka silikapohjainen sooli-geelimenetelmällä valmistettu geeli on jo valmiiksi huokoinen.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä silikapohjaisen materiaalin huokoisuutta. Huokoisuutta lisättiin materiaaliin kahdella menetelmällä; vaahdottamalla ja lisäämällä materiaaleihin vesiliukoisia huokoistajia (porogeenejä). Porogeeneinä käytettiin dekstriiniä ja glukoosia. Huokoisuutta tutkittiin havainnoimalla materiaalin tilavuusmuutoksia sekä mittaamalla porogeenien vapautumista materiaalista. Materiaalin mekaanisia ominaisuuksia ja materiaalin stabiilisuutta soluviljelyolosuhteissa tutkittiin reometrilla.

Materiaalin mekaanisia ominaisuuksia verrattiin kudosten mekanisiin ominaisuuksiin.

2 KUDOSTEKNOLOGIA

Kudosteknologian tavoitteena on korvata eläviä kudoksia tai elimiä. Tämä tarkoittaa, että elävä kudos tai elin voidaan korjata tai korvata vastaavanlaisella keinotekoisella materiaalilla, joka sopeutuu fysiologiseen ympäristöön. Kudosteknologian kolme pääkomponenttia ovat: 1) proteiinit tai muut biomolekyylit, 2) solut, joita käytetään kudosten uusiutumisessa ja 3) kantajamateriaali, joka jäljittelee solunulkoista ainetta. Tyypiesimerkki kudosteknologisesta sovelluksesta on, että ensin eristetään ihmiseltä soluja, joita sitten kasvatetaan *in vitro*, istutetaan biomateriaalille ja viedään vaurioituneeseen kudokseen, jossa solut muodostavat uutta kudosta. Tämä prosessi on esitetty kuvassa 1. (Brown, 2007)



Kuva 1. Kudosteknologian periaate. Kuvan alkuperäislähde (Joensuu, 2006).

Materiaalin pintaominaisuudet vaikuttavat solujen kiinnittymiseen ja leviämiseen fysiologisessa ympäristössä. Solut ovat ratkaiseva tekijä kudosteknologiassa, koska ne valmistavat kudosta. Kun solu saadaan turvallisesti liitettyä, se alkaa tuottamaan kasvutekijöitä, jotka toimivat signaaleina muille soluille siirtyä ja liittyä kudokseen. (Brown, 2007)

Kudosteknologiassa käytetään myös biohajoavia matriiseja. Materiaali voi korvata esimerkiksi puuttuvaa luuta tietyn ajan. Biomateriaali hajoaa ajan mittaan ja korvautuu kokonaan uudella kudoksella. (Brown, 2007)

3 BIOMATERIAALIT

Biomateriaali on materiaali, jolla korvataan tai hoidetaan vahingoittuneita eläviä kudoksia tai elimiä (Tretjakov, 2008). Biomateriaaliksi luokitellaan materiaalit, jotka ovat vuorovaikutuksessa elävien kudosten, organismien tai mikro-organismien kanssa (Vert, et al., 2012). Biomateriaalit voi jakaa kolmeen ryhmään; transplantit, implantit ja kudosteknologiset materiaalit. (Hench & Jones, 2005)

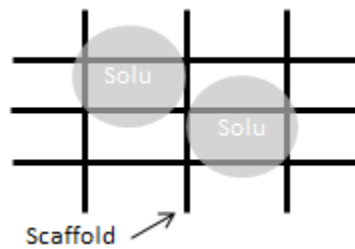
Transplanti on kudos tai elin, joka on siirretty toisesta kehosta. Transplantit voi jakaa kolmeen tyyppiin; autografti (samasta kehosta toiseen paikkaan siirretty kudos tai elin), allografti (saman lajin eri kehojen välillä siirretty kudos tai elin) ja ksenografti (toisen lajin kehosta siirretty kudos tai elin, esimerkiksi siasta ihmiseen) (Hench & Jones, 2005).

Implantti on usein synteettinen materiaali, joka ei varsinaisesti liity elävään kudokseen. Se voi olla tehty polymeereistä, metalleista, keraamisista aineista tai komposiiteista. Ero transplantiin on se, että synteettinen materiaali ei ole elävä ja näin bioyhteensopivuus tulee tutkia. Materiaali ei myöskään pysty itsekorjautumaan eikä adaptoitumaan fysiologiseen ympäristöön kuten elävä kudos. Implanttimateriaali voi aiheuttaa ärsytystä kudoksissa. (Hench & Jones, 2005; Tretjakov, 2008).

Biomateriaalien valmistukselle on asetettu korkeat laatuvaatimukset, joista on varmistettava materiaalien yhteensopivuus elimistön kanssa sekä arvioitava tuotteen riski-hyötysuhde. Erityiset vaatimukset suuntautuvat biomateriaalien kemiallisiin, fysikaalisiin, biologisiin ominaisuuksiin ja steriiliyteen. (Valvira, 2014)

3.1 Solukantajamateriaalit

Solukantajamateriaali (*scaffold*) on materiaali, jonka tulee jäljittää terveen kudoksen soluväliainetta. Sen tehtävänä on ylläpitää solujen kasvua ja elämää. (Brown, 2007)



Kuva 2. Kantajamateriaalin rakenne.

Kudosteknologiassa käytettävän biomateriaalin rakenteen pitää olla kolmiulotteinen (3D), jotta solut pääsevät kasvamaan luonnollisesti. Jotta kudokasvaisi kolmiulotteisesti, materiaalin on koostuttava makrokokoisista huokoisista, jotka muodostavat verkoston. Tämä huokosverkosto on välttämätön soluille, sillä niitä pitkin elatusaineet tavoittavat solut ja näin ne pääsevät kasvamaan koko matriisissa. (Hench & Jones, 2005)

Materiaalin mekaanisten ominaisuuksien pitää olla vastaavat kuin vastaanottavan kudoksen ominaisuudet. Mekaanisia ominaisuuksia ovat mm. viskoelastisuus ja elastisuus. Implantin ja vastaavan kudoksen erilaiset mekaaniset ominaisuudet johtavat paikallisrasitukseen. Taulukossa 1 on esitetty kudosten elastisia moduuleita. (Hench & Jones, 2005)

Taulukko 1. Kudosten ja materiaalien elastisia moduuleja (Dubrovsky, 2003; Sharkeev, 2013).

Materiaali	Elastinen moduuli (Pa)
elastiini	$10^5 - 10^6$
kollageeni	$10^7 - 10^8$
punasolujen kalvo	$4 \cdot 10^7$
sileät lihassolut	10^4
lihas levossa	$9 \cdot 10^5$
luu	$2 \cdot 10^9$
iho	$2,3 - 4,4 \cdot 10^6$
jänne	$1,6 \cdot 10^8$
hermo	$18,5 \cdot 10^6$
verisuoni	$8,5 \cdot 10^5$
valtimo	$5 \cdot 10^4$
puu	$12 \cdot 10^9$
kumi	$5 \cdot 10^6$
teräs	$2 \cdot 10^{11}$

Kudosteknologiassa solut voidaan lisätä kahdella tavalla: solujen istuttaminen valmiiseen 3D-materiaaliin ja solususpension lisääminen sooliin, josta muodostuu geeli sooli-geelimenetelmällä. Hydrogeelejä suositaan lähtömateriaalina kudosteknologiassa, sillä niistä on helppo valmistaa 3D-rakenne. (Hench & Jones, 2005)

3.2 Hydrogeelit

Geeli on kahden faasin homogeeninen seos, jonka dispergoitu faasi on neste ja dispersioväliaine (jatkuva faasi) on kiinteä. Sana hydro viittaa veteen, joka on dispergoitu faasi hydrogeelissä. Hydrogeeli sisältää suurimmaksi osaksi vettä. (Jokinen, 2013)

Hydrogeeli rakentuu siten, että sen sisällä on polymeerejä, jotka muodostavat keskenään veden sisälle sidoksia. Sidoksista rakentuu verkostoja ja vesi jää syntyneiden rakenteiden välille ja lopulta muodostuu geeli. (Hench & Jones, 2005)

Hydrogeelien kiintoainefaaseja on kahta lajia: luonnonpolymeerit ja synteettiset polymeerit. Luonnonpolymeerit ovat esim. kitosaani, kollageeni ja gelatiini. Synteettisiä ovat esim. polyetyleeniglykoli (PEG), polyakryylihappo (PAA) ja silika. (Hench & Jones, 2005)

Hydrogeelin hyvät ominaisuudet biomateriaalien kannalta ovat paisuminen, veden määrä, materiaalin hajoaminen sekä mekaaniset ominaisuudet. Kudosteknologiassa hydrogeelin mekaaniset arvot ovat tärkeitä, jotta hydrogeelien ominaisuudet vastaavat korvattavien kudoksien ominaisuuksia. Hydrogeelien korkea vesipitoisuus vaikeuttaa niiden reologisia mittauksia, sillä mittausten aikana saattaa hydrogeelistä esim. haihtua vettä (Hench & Jones, 2005). Veden korkea pitoisuus on kuitenkin myös etu, koska silloin materiaali muistuttaa luonnon pehmeitä kudoksia, jotka ovat kosteita. (Hawkins, 2012)

Luonnonpolymeereista muodostuneet hydrogeelit hajoavat tyypillisesti entsyymaattisesti, jolloin entsyymit pilkkovat hydrogeelin rakenteen halutussa ympäristössä. Synteettiset hydrogeelit on suunniteltu niin, että ne hajoavat hydrolyyttisesti. Hydrogeelin hajoamisnopeus on tärkeää, koska se säätelee hydrogeelien sisällä olevien aineiden (solujen, lääkeaineiden) vapautumista ympäristöön (Hench & Jones, 2005). Biohajoavien materiaalien hyvä puoli on, että injektointua materiaalia tai implanttia ei tarvitse poistaa sen jälkeen, kun ne ovat biologisessa ympäristössä. (Hawkins, 2012)

Paisuminen liittyy suoraan mekaanisiin ominaisuuksiin, sillä se vaikuttaa hydrogeelin koostumukseen ja sen sisällä olevien verkostojen tiheyteen. Paisuminen tarkoittaa sitä, kuinka paljon hydrogeelin polymeeriverkot venyvät. Solukapseloinnissa tällä on tärkeä rooli, sillä se pitää kapseloituja soluja paremmin elossa. (Hench & Jones, 2005)

3.2.1 SiO₂ -hydrogeelit

SiO₂ -hydrogeeli on geeli, jonka jatkuva faasi on silika eli piioksidi ja dispergoitu faasi on vesi. SiO₂ -hydrogeeli on synteettinen ja se valmistetaan sooli-geeliprosessilla. Geelin valmistukseen käytetään happamia silikasooleja, jotka ovat synteettisesti valmistettuja kolloidaalisia silikadispersioita. Geeli muodostuu, kun partikkelien koko kasvaa ja ne aggregoituvat. Silikahydrogeelit sisältävät 35 – 98% vettä. (Jokinen, et al., 2010)

Sooli-geelimenetelmällä valmistettu amorfinen silika on rakenteeltaan huokoinen (Jokinen, et al., 2010). Sooli-geelimenetelmällä valmistettu geeli on helposti muokattavissa ja näin myös huokoisuutta pystytään säätämään lisäämällä erilaisia apuaineita, kuten glukoosia. Sokereita käytetään suurentamaan geelien huokoskokoja. Lisäksi sokerit toimivat myös ravintona soluille. Huokoisuudella on suuri merkitys, sillä se parantaa kaasujen, ravinteiden ja solujen kulkua materiaalissa. Geelin huokoiset ovat kokoluokaltaan tyypillisesti 1-50 nm:n välillä. (Jokinen, et al., 2010; Nieto, et al., 2009)

Amorfisen silikan on todettu olevan myrkytön, bioyhteesopiva ja biohajoava elävässä kudoksessa. Sitä pidetään yleisesti turvallisena ja se on hyväksytty käytettäväksi elintarvikkeiden ja rehujen ainesosissa. Todella suurten määrien amorfista silikaa on kuitenkin todettu olevan haitallista. (Nieto, et al., 2009)

SiO₂ -hydrogeeliä voidaan käyttää implanttien valmistamiseen tai kapselointimateriaalina. Geeliin voidaan kapseloida soluja, viruksia tai lääkeaineita. (Jokinen, et al., 2010; Nieto, et al., 2009)

3.3 Materiaalin huokoistaminen

Sooli-geeliteknologian avulla valmistetun hydrogeelin rakenne on verkkomainen ja huokoinen. Tyypillisesti vain orgaanisista polymeereista valmistettujen hydrogeelien rakenne paisuu. (Jokinen, 2014)

Joskus materiaalin huokoisuutta halutaan lisätä tai huokoskokoa halutaan suurentaa. Kuten jo aikaisemmin mainittu, huokoisuudella on tärkeä rooli solujen kasvulle, liikkumiselle ja ravinteiden saannille, mikä estää solukuolemaa. Optimihuokoskoko riippuu istutettavien solujen tyypistä (Hawkins, 2012). Huokoisuuden lisäämiseen on käytetty useita tekniikoita, kuten esimerkiksi partikkeleiden tai polymeerien liuotusta, vaahdotusta tai kuivausta. (Hench & Jones, 2005)

3.3.1 Partikkelien liuotusmenetelmä

Materiaalin huokoistamiseen käytetään yleisesti porogeenejä, jotka poistetaan materiaalista liuottamalla. Porogeeneiksi kutsutaan aineita, jotka luovat huokoisuutta. Porogeenit sekoitetaan polymeeriliuokseen, jonka jälkeen liuos geeliiytyy muodostaen polymeeriverkkoja. Muodostunut geeli sisältää lisättyjä porogeenejä, jotka liuotetaan geelistä pois. Poistuvat porogeenit aiheuttavat aukkoja geeliin, joita kutsutaan huokoisiksi. Kun tätä menetelmää käytetään hydrogeeleissä, on tärkeää varmistua, että polymerisointiliuos ei aiheuta partikkelien liukenemistä. Porogeeneina on käytetty erilaisia polymeerejä, suoloja ja jopa metalleja. (Hawkins, 2012)

3.3.2 Vaahdotusmenetelmä

Huokoisten muodostamista voidaan saada aikaan sekoittamalla ilmaa nesteeseen / materiaaliin tai lisäämällä aineita materiaaliin, jotka muodostavat kaasua. Karbonaattiyhdisteiden hajoaminen on yksi yleisimmistä vaahdottamistekniikoista. Karbonaattiyhdisteet hajoavat hiilidioksidiksi altistuessaan hapolle. Hiilidioksidi, joka on kaasu, kuplittaa polymeerivesiliuoksen, josta tulee hydrogeeli. Tekniikan vaikeus on siinä, että valvottavana on kaksi prosessia; hydrogeelin muodostus sekä vaahtoaminen. (Hawkins, 2012; Fennema, 1985)

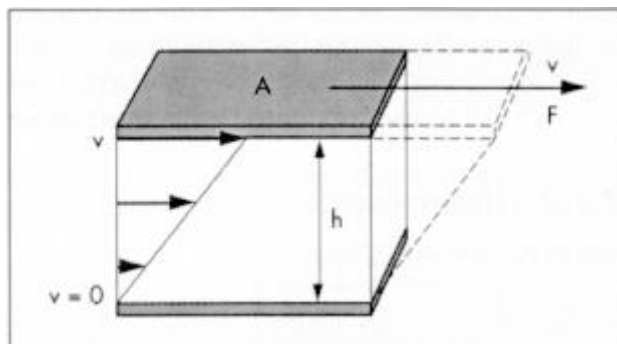
4 REOLOGIA

Reologia on tiede, joka tutkii aineen virtaus- ja muodonmuutosominaisuuksia. Sana "reologia" tulee kreikan kielestä: "*rheos*" tarkoittaa "virrata". Reologiset tutkimukset eivät kuitenkaan kerro pelkästään nesteiden virtausominaisuuksista, vaan myös kiinteiden aineiden muodonmuutoksista. Muodonmuutoksella tarkoitetaan, että kovalla rasituksella voidaan saada monia kiinteitä materiaaleja virtaamaan eli vaihtamaan olomuotoa. (Mezger, 2011 & Iljinih, 2005)

4.1 Viskositeetti

Viskositeetti on suure, joka kuvaa nesteen kykyä vastustaa virtausta. Viskositeettia on kahta lajia; dynaaminen ja kinemaattinen viskositeetti. Fluidi on aine, joka ei pysyvästi vastusta muodonmuutosta. Fluidiksi luokitellaan sellaiset aineet, jotka selkeästi osoittavat virtausominaisuuksia, eli kaasut ja nesteet. (Mezger, 2011)

Viskositeetti voidaan esittää Newtonin viskositeettimallin avulla, joka on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Newtonin viskositeettimalli (Mezger, 2011).

Alempi taso on liikkumaton. Ylempään tasoon vaikuttaa leikkausvoima F , jolloin ylempi taso liikkuu nopeudella v . Molemmat levyt on samanlaisia, ja niiden ala on A . Tasojen välillä on välimatka h , ja näyte on levyjen välissä. Tason

liikkuessa näytteeseen syntyy leikkausvoimaa tasoittava sisäinen voima, jota sanotaan leikkausjännitykseksi (*shear stress*) Leikkausjännitys on esitetty yhtälössä 1. (Mezger, 2011)

$$\tau = F/A \quad , \text{ jossa} \quad (1)$$

τ leikkausjännitys, Pa = N/m² = kg/m · s²

F leikkausvoima, N = kg · m/s²

A tason pinta-ala, m²

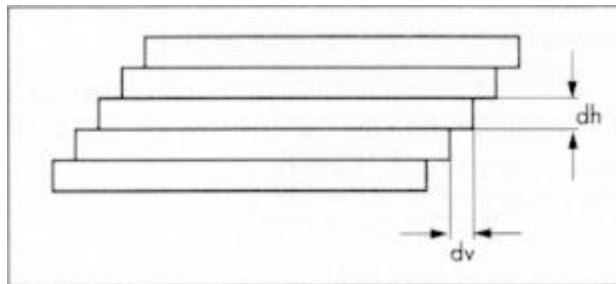
Leikkausnopeus (*shear rate*) kuvaa näytteen nopeuden muutosta tasojen välissä. Nopeuden muutos esitetty kuvassa 4 ja yhtälössä 2. (Mezger, 2011)

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} \quad , \text{ jossa} \quad (2)$$

$\dot{\gamma}$ leikkausnopeus, s⁻¹

dv nopeus, m/s

dh tasojen korkeusero, m



Kuva 4. Nopeuden muutos tasojen välissä Newtonisessa mallissa (Mezger, 2011).

Dynaaminen viskositeetti voidaan laskea leikkausjännityksen ja leikkausnopeuden avulla ja tämä on esitetty yhtälössä 3. (Mezger, 2011)

$$\eta = \tau/\dot{\gamma} \quad , \text{ jossa} \quad (3)$$

η dynaaminen viskositeetti, Pa·s

Dynaamiseen viskositeettiin vaikuttaa siis edellä esitettyjen leikkausnopeuden ja leikkausjännityksen lisäksi myös aika, lämpötila ja paine. (Mezger, 2011)

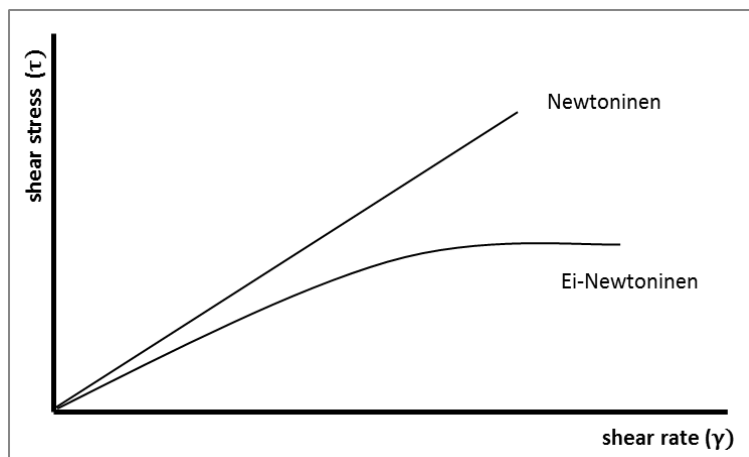
Ajalla tarkoitetaan näytteen mittausaikaa. Jos leikkausnopeudeksi on valittu pieni arvo, mittausajan täytyy olla riittävän pitkä, jotta tuloksista tulee luotettavat. Kun taas leikkausnopeudeksi laitetaan liian suuri arvo, kitka aiheuttaa lämpötilamuutoksen, jolloin tulokset ovat epäluotettavia. (Mezger, 2011)

Lämpötilalla on vaikutusta viskositeettiin. Useammissa tapauksissa lämpötilan nostaminen laskee viskositeetin arvoa. Nesteillä viskositeetti laskee lämpötilan kasvaessa, koska neste laajenee ja nesteen sisällä olevien molekyylien välinen etäisyys kasvaa ja voimat heikkenevät. Kaasuilla viskositeetti kasvaa lämpötilan noustessa vain matalissa paineissa, korkeissa paineissa viskositeetti laskee. Nesteiden viskositeetti myös laskee, jos paine laskee. Nesteiden viskositeetti kasvaa eksponentiaalisesti paineen kasvaessa, poikkeuksena on vesi. (Mezger, 2011)

Aineen dynaamista viskositeettiä mitataan yleensä rotaatiomenetelmällä. Rotaatiomittauksessa mittapää pyörii yhteen suuntaan näytteen päällä. Rotaatiomittauksissa oletusarvoina on joko leikkausnopeus tai leikkausjännitys. Leikkausjännitys valitaan oletusarvoksi, kun halutaan tutkia aineen myötörajaa. Myötöraja on se piste, jolloin materiaali deformoituu ja alkaa muuttaa olomuotoa tietyn leikkausjännityksen kohdassa. Kinemaattista viskositeettia mitataan yleisesti kapillaariviskosimetreillä. (Mezger, 2011)

4.2 Materiaalityypit

Fluidit jaetaan kahteen pääluokkaan: newtonisiin ja ei-newtonisiin, sen mukaan onko leikkausjännitys lineaarinen suhteessa leikkausnopeuteen. Jos viskositeetti ei riipu leikkausnopeudesta tai ajasta, silloin fluidi on newtoninen. Fluidien pääluokat on esitetty kuviossa 1. Newtonisia fluideja ovat kaikki kaasut ja matalan viskositeetin omaavat nesteet, kuten vesi. (Chhabra, 2010)



Kuvio 1. Newtoniset ja ei-newtoniset fluidit.

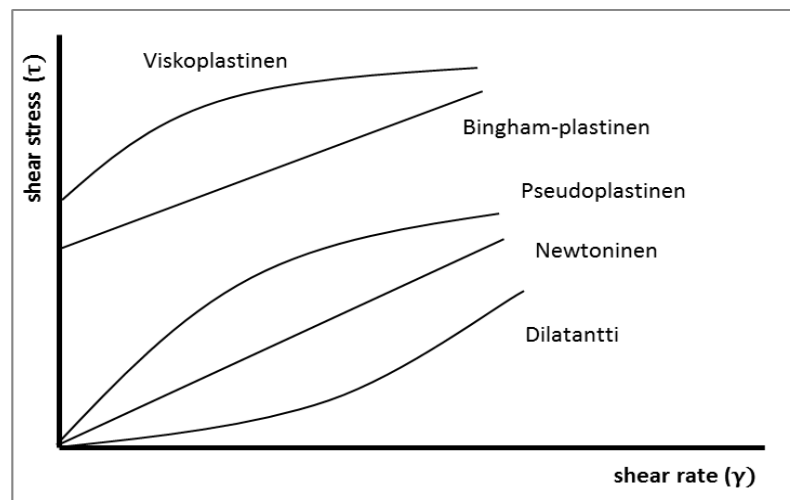
Ei-newtoniset nesteet ovat leikkausnopeudesta tai ajasta riippuvaisia ja niitä ovat esimerkiksi suspensiot ja emulsiot (Jokinen, 2013). Ei-newtoniset leikkausnopeudesta riippuvaiset fluidit voidaan jakaa kolmeen ryhmään: pseudoplastiset, dilatantit ja viskoplastiset nesteet. (Chhabra, 2010)

Useimmat ajasta riippumattomat ei-newtoniset fluidit ovat pseudoplastisia eli leikkausohenevia. Niiden viskositeetti pienenee leikkausnopeuden kasvaessa (Chhabra, 2010). Leikkausohenevia fluideja ovat esimerkiksi polymeeriliuokset, joiden kuiva-ainepitoisuus ei ole kovin korkea. Mittauksen alussa pienessä leikkausnopeudessa seos käyttäytyy newtonisesti, seoksessa olevat partikkelit eivät vastusta liikettä. Suurilla leikkausnopeuksilla seoksessa olevat partikkelit alkavat vaihtamaan muotoa tai flokkuloituneet partikkelit irtoamaan toisistaan, jolloin seokseen ei tarvita enää niin paljon leikkausjännitystä ja näin viskositeetti pienenee. (Jokinen, 2013)

Dilatanttien fluidien viskositeetti kasvaa leikkausnopeuden kasvaessa. Dilatanteja fluideja kutsutaan myös nimellä leikkauspaksunevat. Leikkauspaksunevia fluideja ovat esimerkiksi polymeeriliuokset, joiden kuiva-ainepitoisuus on korkea. Mittauksen alussa leikkausnopeus on pieni, seoksessa on tarpeeksi nestettä voidellakseen hiukkasten liikkeitä ja näin minimoidaan kitkaa. Suurilla leikkausnopeuksilla seos laajenee hieman niin, että seoksen

käytettävissä oleva neste ei enää riitä täyttämään lisääntyntä tyhjää tilaa ja tämän takia kitkaa on enemmän ja viskositeetti kasvaa. (Chhabra, 2010)

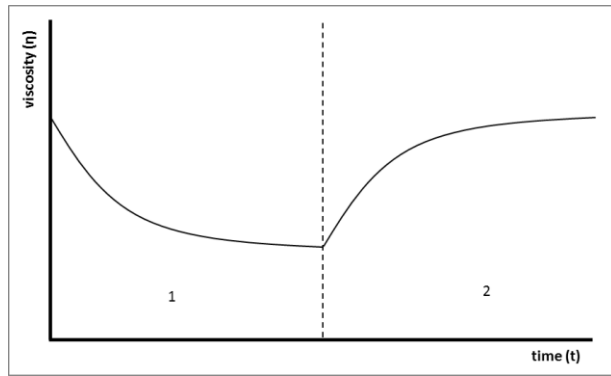
Viskoplastiset fluidit käyttäytyvät kuten kiinteät elastiset aineet myötörajan asti, jonka jälkeen aine deformatuu ja alkaa valua. Myötörajan jälkeen aine käyttäytyy newtonisesti. Fluidi, jonka leikkausnopeus on lineaarinen suhteessa leikkausjännitykseen, mutta $\tau > \tau_0$ (τ_0 = myötöraja) kutsutaan Bingham-plastiseksi fluidiksi. (Chhabra, 2010)



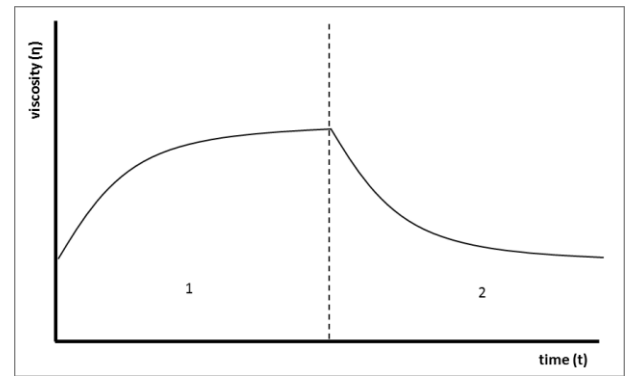
Kuvio 2. Ei-newtoniset fluidit.

Ei-newtoniset nesteet, jotka ovat ajasta riippuvaisia voidaan jakaa kahteen ryhmään: tiksotrooppiset ja reopektiset. (Mezger, 2011)

Tiksotrooppisella aineella leikkausjännitys pienenee rasituksen aikana eli aine alkaa hajoamaan, mutta rasituksen loputtua palaa takaisin alkutilaan. Reopektinen on tiksotrooppisen vastakohta. Reopektisellä aineella leikkausjännitys kasvaa rasituksen aikana eli aineen rakenteellinen lujuus kasvaa, mutta rasituksen loputtua se laskee ja palaa takaisin alkutilaan. Tiksotrooppinen ja reopektinen käyttäytyminen esitetty kuvioissa 3 ja 4. (Mezger, 2011)

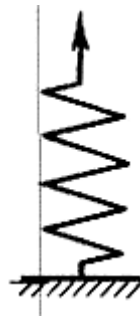


Kuvio 3. Tiksotrooppinen käyttäytyminen.



Kuvio 4. Reopektinen käyttäytyminen.

Ideaalisen elastisesti käyttäytyvän materiaalin voidaan esittää Hooken lailla ja sen jousimallilla, joka on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Jousimalli (Iljinih, 2005).

Jouseen kiinnitetään kuormaa, jolloin jousi puristuu kasaan. Kuorman poiston jälkeen jousi palautuu heti alkuperäiseen asentoon. Tästä saadaan selville, että muodonmuutos tapahtuu kuorman ansiosta. Idealinen elastinen materiaali palautuu siis heti alkutilaan rasituksen jälkeen. (Mezger, 2011)

Hooken laki esitetään yhtälössä 4:

$$\tau = G \cdot \gamma \quad , \text{ jossa} \quad (4)$$

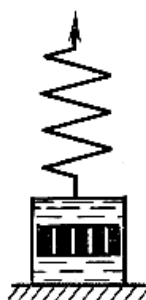
τ leikkausjännitys, Pa

γ muodonmuutos, [1]

G leikkaus moduuli, Pa

Viskoelastiset materiaalit osoittavat aina viskoosin ja elastisen käyttäytymisen samanaikaisesti. Viskoosi osa käyttäytyy Newtonin lain mukaisesti ja elastinen osa käyttäytyy Hooken lain mukaisesti. Viskoelastisten nesteiden ja kiinteiden materiaalien reologinen käyttäytyminen kuitenkin eroaa toisistaan. (Mezger, 2011)

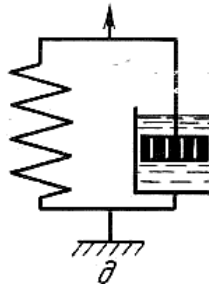
Viskoelastiset nesteet käyttäytyvät Maxwellin mallin mukaisesti, joka on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Maxwellin malli (Iljinih, 2005).

Maxwellin malli koostu jousesta ja vaimentimesta, jotka ovat liitetty yhteen. Jousi esittää elastista käyttäytymistä ja vaimennin Newtonista käyttäytymistä. Kun malliin osoitetaan hetkellinen kuormitus, mallissa reagoi pelkkä jousi, joka venyy ja palautuu takaisin alkutilaan. Kun malliin osoitetaan kuormitus ja ylläpidetään jousen venymistä, jousi alkaa vetää vaimenninta mukanaan. Kuormituksen lakattua jousi palaa takaisin alkutilaan eli se käyttäytyy elastisesti, mutta vaimennin jää paikalleen. Kuormituskierroksen jälkeen tällaiset näytteet säilyvät osittain deformoituina. (Mezger, 2011)

Viskoelastiset kiinteät aineet käyttäytyvät Kelvin/Voigtin mallin mukaisesti, joka on esitetty kuvassa 7.

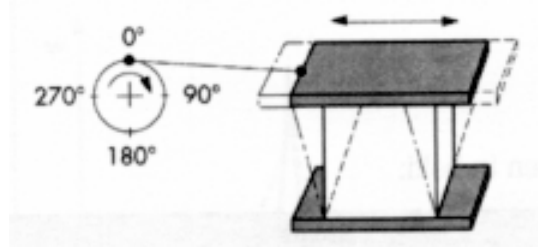


Kuva 7. Kelvin/Voigtin malli (Iljinih, 2005).

Kelvin/Voigtin mallissa, kuten Maxwellinkin, jousi ja vaimennin on yhdistetty, mutta rinnakkain. Kun malliin osoitetaan hetkellinen kuormitus, malli pysyy paikallaan eli se käyttäytyy kuin kiinteä materiaali. Jos kuormitus pidetään jatkuvana, jousi alkaa venyä ja samanaikaisesti vetää vaimenninta mukanaan. Kuormituksen lakattua jousi ja vaimennin palaavat alkutilaan, mutta se vie aikaa, sillä vaimennin ei relaxoidu yhtä nopeasti kuin jousi. (Mezger, 2011)

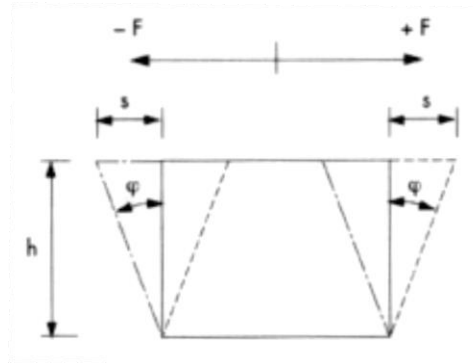
4.3 Oskillaatio

Oskillaatiomittauksissa mitataan aineen käyttäymistä kohdistuen siihen värähtelevää liikettä. Oskillaatiomittauksista käytetään myös nimitystä DMA (*dynamic mechanical analysis*). Oskillaatiomittauksessa, kuten rotaatiomittauksessa, materiaaliin kohdistuu voimaa ja materiaalin muoto voi muuttua. (Menard, 1999). Värähtelevällä liikkellä voidaan tutkia aineen elastisia ominaisuuksia. (Jokinen, 2013) Oskillaatio voidaan esittää myös Newtonin mallilla, joka on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Oskillaation Newton-malli (Mezger, 2011).

Kuvassa esitetään, miten ylempi taso voi liikkua. Alempi taso on liikkumaton ja ylempi taso pyörii edestakaisin tietyllä voimalla $\pm F$ aiheuttaen värähtelyliikettä. Näyte on kahden tason välissä. Kuvassa 9 esitetään, kuinka värähtely aiheuttaa näytteelle siirtymän tasojen välissä. (Mezger, 2011)



Kuva 9. Oskillaatiomittauksen malli (Mezger, 2011).

Kuvassa 9 esitettyjen suureiden merkinnät tarkoittavat:

F	leikkausvoima, N
h	tasojen välinen etäisyys (<i>shear gap</i>), m
s	poikkeamisalue, m
φ	poikkeamiskulma, °

Näyte, joka on tasojen välissä, joko venyy eli on elastinen tai muuttaa muotoaan. Muodonmuutos (*shear strain*) voidaan esittää yhtälöllä 5.

$$\gamma = s/h \quad , \text{ jossa} \quad (5)$$

γ	deformaatioliukuma, [1]
s	tasojen siirtymä, m
h	tasojen välinen etäisyys, m

Kun mitataan täysin elastisesti käyttäytyvää kiinteätä ainetta tasaisessa lämpötilassa, leikkausjännityksen ja deformaatioliukuman suhdetta sanotaan

leikkausmoduuliksi, G (*shear modulus*). Leikkausmoduuli kertoo materiaalin jäykkyydestä. Mitä jäykkeempi materiaali, sitä korkeampi G -arvo on. G -arvon yksikkö ilmaistaan pascaleina, $\text{Pa} = \text{N}/\text{m}^2$. (Mezger, 2011)

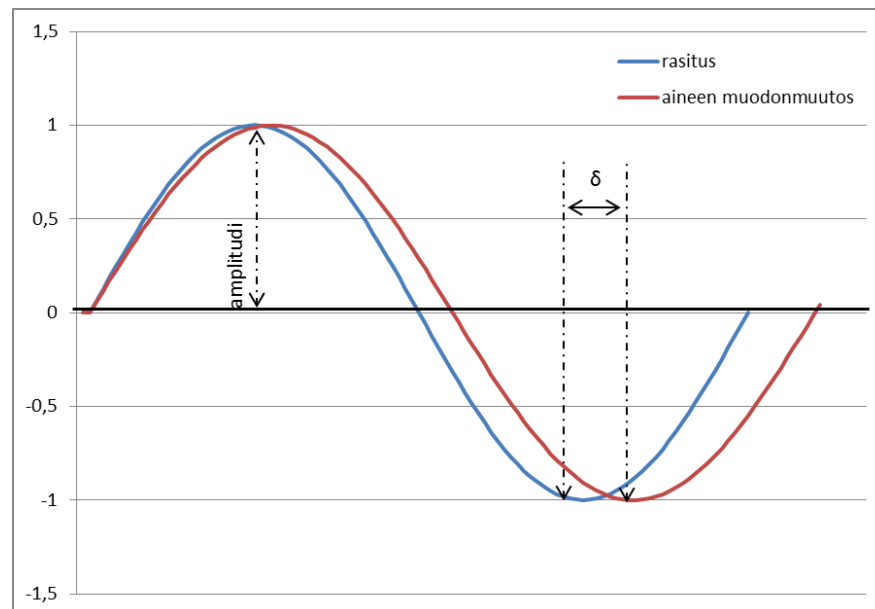
Muodonmuutosta voidaan esittää myös sinikäyrällä graafisesti kuviossa 5 ja matemaattisesti yhtälöllä 6.

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t \quad , \text{ jossa} \quad (6)$$

$\gamma(t)$ deformaatioliukuma ajassa t , [1]

γ_A amplitudiliukuma, %

ω kulmataajuus, rad/s



Kuvio 5. Oskillaatio sinikäyränä esitettynä.

Mittaukselle valitaan tietty kulmataajuus ja amplitudi. Amplitudi mitataan nollassa käyrän kärkeen yhdestä suunnasta. Kuviossa 5 nähdään miten mitattavan aineen sinikäyrä viivästyy moottorin rasituksesta ja tätä käyrien viive-eroa kutsutaan häviötekijäksi (*loss factor*). (Mezger, 2011)

Häviötekijä merkitään $\tan \delta$ ja se kertoo aineen elastisista ja viskoosisista ominaisuuksista. Täysin elastisilla materiaaleilla $\tan \delta > 1$ ja täysin viskoottisilla materiaaleilla $\tan \delta < 1$. (Mezger, 2011)

Oskillaatiomittauksista saatava kompleksimoduuli voidaan esittää yhtälöllä 7:

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad , \text{ jossa} \quad (7)$$

G^* kompleksimoduuli, Pa

G' elastinen moduuli, Pa

G'' viskoottinen moduuli, Pa

Elastinen moduuli (G') on suure, joka kertoo kuinka paljon näyte on varastoinut muodonmuutosenergiaa rasituksen aikana. Elastinen moduuli kertoo materiaalin elastisista ominaisuuksista. (Mezger, 2011)

Viskoottinen moduuli (G'') on suure, joka kertoo kuinka paljon näyte on hävittänyt muodonmuutosenergiaa rasituksen aikana (Mezger, 2011). Energian hävittämällä tarkoitetaan sitä, kun rasitus aiheuttaa materiaalissa liikettä partikkelien välillä, joka aiheuttaa sitä, että energiaa menetetään lämmönsynnyn vuoksi (Jokinen, 2013). Viskoosimoduuli kertoo materiaalin viskoosisista ominaisuuksista. (Mezger, 2011)

Elastisen ja viskoottisen moduulin arvoilla on merkitystä sooli-geeliprosessissa. Kun $G'' > G'$, aineella on virtaavia ominaisuuksia enemmän kuin elastisia ja aine on soolimuodossa. Kun $G' > G''$, aineella on enemmän elastisia ominaisuuksia kuin virtaavia ja aine on geelimuodossa. Kun $G' = G''$, ollaan geelipisteessä, jossa aine muuttuu soolista geeliksi. (Mezger, 2011)

4.3.1 Amplitudipyyhkäisy

Amplitudipyyhkäisymittaukset (AS) ovat oskillaatiotestejä, jossa amplitudi muuttuu taajuuden ollessa vakio. AS-mittauksia suoritetaan enimmäkseen lineaarisen viskoelastisen alueen (LVE) selvittämiseksi. AS-mittaukset voivat

olla kahdentyyppisiä: kontrolloitu deformaatioliukuma (*shear strain*) tai leikkausjännitys (*shear stress*). Yleisempi testityyppi on kontrolloitu deformaatioliukuma. Testin voi kuvata yhtälöllä 8. (Mezger, 2011)

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t \quad , \text{ jossa} \quad (8)$$

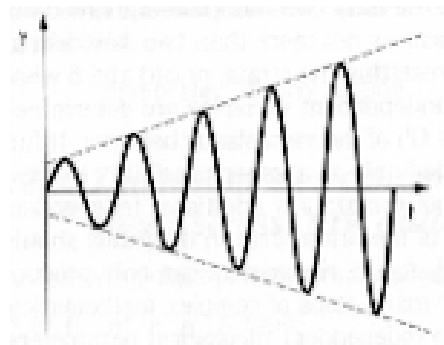
γ deformaatioliukuma, [1]

γ_A amplitudiliukuma, %

ω kulmataajuus, rad/s

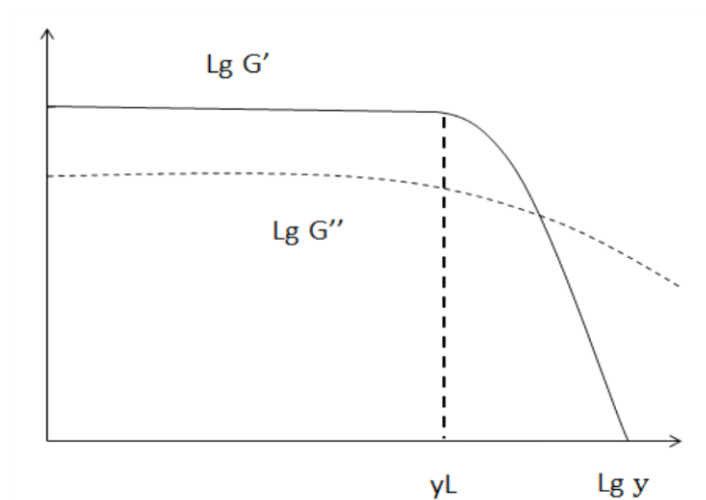
t aika, s

Kulmataajuus on vakio ja amplitudiliukuma muuttuu ajan funktiona. Mittauksissa jokaiselle amplitudille on vakioaika, vain amplitudi, eli mittapään kääntökulma muuttuu. AS-mittauksen periaate on esitetty kuvassa 10. (Mezger, 2011)



Kuva 10. Amplitudipyyhkäisy (Mezger, 2011).

Linearisella viskoelastisella alueella deformaatioliukuma ei hajota näytteen rakennetta. Raja-arvon (γ_L) saavutettuaan rakenne muuttuu ja materiaali käyttäytyy eri tavalla. Esimerkki kuvaaja esitetty kuviossa 6. (Mezger, 2011)



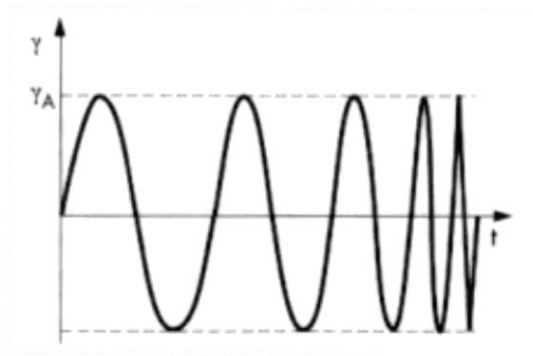
Kuvio 6. AS-testin kuvaaja.

AS-mittauksissa G' ja G'' -kuvaajat esitetään y-akselilla ja amplitudiliukuma x-akselilla. (Mezger, 2011)

4.3.2 Frekvenssipyyhkäisy

Frekvenssipyyhkäisy (FS) on oskillaatiomittaus, jossa amplitudi on vakio ja frekvenssi muuttuu. Mittauksella tutkitaan aikariippuvaista muodonmuutoskäyttäytymistä, sillä taajuus on käänteinen ajan arvo. (Mezger, 2011)

Niin kuin AS-mittauksissa, testit voivat olla kahdentyyppisiä; vakiona on joko deformaatioliukuma (*shear strain*) tai leikkausjännitys (*shear stress*). Yleisempi tyyppi on kontrolloitu deformaatioliukuma. Tämän voi kuvata yhtälöllä 8. Tässä mittauksessa amplitudiliukuma eli mittapään kääntökulma on vakio ja amplitudi muuttuu. Toimintaperiaate on esitetty kuvassa 11. (Mezger, 2011)



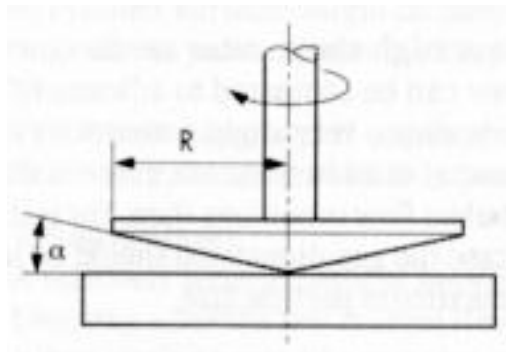
Kuva 11. Frekvenssipyyhkäisy (Mezger, 2011).

Yleensä FS-mittauksen kuvaajan x-akseliin ilmoitetaan ω ja y-akseliin tulevat G' ja G'' . Molemmat akselit ovat logaritmisia. (Mezger, 2011)

4.4 Mittausgeometria

Tässä opinnäytetyössä käytettyyn Anton Paar MCR 102-reometriin oli saatavana kahdenlaisia mittapäitä ja ne ovat kartio-levy- ja levy-levymittapäät.

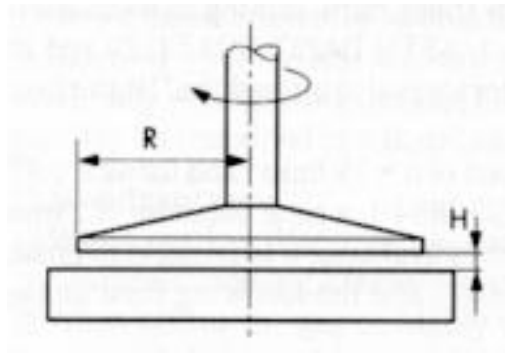
Kartio-levymittapää on esitetty kuvassa 12.



Kuva 12. Kartio-levymittapää (Mezger, 2011).

Mittapää on ylempi osa, joka kiinnitetään reometrin moottoriin. Alempi levy on liikkumaton. Mittapää on kartionmallinen ja kartion kulma on ilmoitettu asteissa. ISO-standardin mukaisesti kartion kulman pitää olla $1-4^\circ$, joista yhden asteen kartio kulma on yleisin. DIN-standardin mukaan, levyn halkaisija on oltava 2 – 20 cm. Kartio-levy ei sovellu geelien mittaamiseen. Levyjen väliin jäävä rako ei

ole tasainen yhden asteen kulman ansiosta ja näin kiinteiden ja geelien viskoelastista ominaisuuksista johtuen näytteen pitää olla levossa kauan, jotta näyte on tasapainossa. Geelien mittamiseen suositellaan levy-levymittapää, jota tässä opinnäytetyössä on myös käytetty. Levy-levymittapää on esitetty kuvassa 13. (Mezger, 2011)

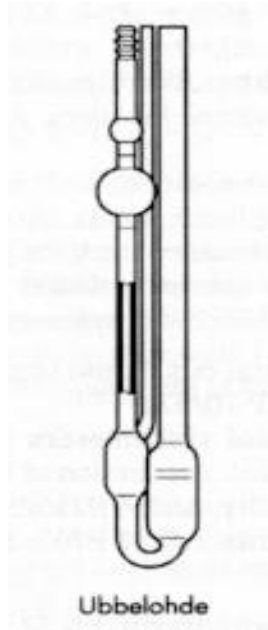


Kuva 13. Levy-levymittapää (Mezger, 2011).

Levy-levymittaussysteemi koostuu kahdesta levystä, joista ylempi on liikkuva osa ja alempi liikkumaton. DIN-standardin mukaan levyjen välinen matka on oltava paljon pienempi mitä levyn säde on ($H \gg R$). (Mezger, 2011)

4.5 Kapillaariviskosimetri

Kapillaariviskosimetrejä käytetään Newtonisten ja ei-newtonisten nesteiden viskoositeettimittauksissa. Toimintaperiaate perustuu nesteiden valuumiseen painovoiman avulla. Übbelohde-kapillaariviskosimetri on esitetty kuvassa 14. (Mezger, 2011)



Kuva 14. Übbelohde-kapillaariviskosimetri (Mezger, 2011).

Kapillaariviskosimetrit ovat yleensä tehty lasista. Viskosimetrissä on sisällä pitkä kapillaari, jolla on tietty halkaisija ja pituus. Viskosimetri laitetaan suoraan pystyyn ja täytetään nesteellä. Nesteen annetaan valua painovoiman ansiosta kapillaaria pitkin. Valumisaika otetaan ylös, kun neste on valunut kapillaarin merkkien välistä. Valumisajan perusteella voidaan laskea kinemaattinen viskositeetti. Kinemaattinen viskositeetti voidaan esittää yhtälöllä 9. (Mezger, 2011)

$$v = \eta / \rho \quad , \text{ jossa} \quad (9)$$

v kinemaattinen viskositeetti, mm^2/s

η viskositeetti, $\text{Pa}\cdot\text{s}$

ρ tiheys, kg/m^3

Kapillaariviskosimetrin tärkein kriteeri on kapillaarin sisällä oleva virtaus. Virtauksen on oltava laminaarinen ja tämän takia valumisajan pitää olla 100–200 s, jotta tulokset olisivat luotettavia (Mezger, 2011; Iljinih, 2005). Kapillaarin sisällä ei saisi olla ilmakuplia, koska ne vaikuttavat nesteen valumiseen.

Nesteen valumiseen vaikuttaa myös esimerkiksi nesteen vaahtoaminen tai haihtuminen. Kapillaariviskosimetrin on oltava myös täysin pystysuorassa mittausten aikana. Lämpötila vaikuttaa viskositeettiin, joten sen on oltava tasainen koko kapillaarin sisällä. (Mezger, 2011)

4.6 Reometri

Mekaanisia ominaisuuksia voidaan mitata monella erilaisella mittausvälineellä. Modernein niistä on reometri. Reometrit voidaan jakaa kahteen ryhmään: rotaatio- ja oskillaatioreometrit. Rotaatiolla mitataan yleensä materiaalin viskoottisia ominaisuuksia ja oskillaatiolla materiaalin elastisia ominaisuuksia. Tämän opinnäytetyön materiaalien mekaanisiin ominaisuuksien tutkimiseen on käytetty Anton Paar MCR 102-reometriä. (Mezger, 2011)

Anton Paar MCR 102-reometrissa on mahdollista suorittaa sekä rotaatio- että oskillaatiomittauksia. Reometrin EC-moottorin (*electrically commutated*) ansiosta reometrillä on laaja ja tarkka mittausalue. Reometrin tärkeimmät ominaisuudet on esitetty taulukossa 2. (Anton Paar, 2011)

Taulukko 2. Anton Paar MCR 102:n ominaisuudet (Anton Paar, 2011).

Tekniset tiedot	Yksikkö	MCR 102
min. Vääntömomentti, rotaatio	nNm	50
min. Vääntömomentti, oskillaatio	nNm	10
max. Vääntömomentti	mNm	200
min. Kulmanopeus	rad/s	10^{-4}
max. Kulmanopeus	rad/s	314
max. Nopeus	1/min	3000
min. Kulmataajuus	rad/s	10^{-3}
max. Kulmataajuus	rad/s	628
Lämpötila-alue	°C	-150 - 1000

EC-moottorin roottori on varustettu kestopagneeteilla. Staattorin kelat on myös varustettu magneeteilla, joilla on vastakkainen polariteetti kuin roottorin magneeteilla. Roottorin ja kelan magneetit vetävät toisiaan puoleensa niin, että kelojen virta tuottaa roottorin kitkatonta synkronista liikettä. Moottorin vääntömomenttia mitataan staattorien kelojen kautta. Tällaisella moottorilla on vääntömomentilla ja staattorikelan virralla lineaarinen suhde, mikä on edullista vääntömomentin kontrolloinille ja mittaukselle. Nämä ominaisuudet mahdollistavat tarkat reologiset mittaukset. (Anton Paar, 2011)

Moottoria tukee kaksi ilmalaakeria; radiaali ilmalaakeri keskittää ja vakauttaa akselia ja aksiaalinen ilmalaakeri kantaa pyörivien osien painon. Tämä teknologia on riippumaton kaikista ulkopuolisista vaikutteista, kuten esimerkiksi elektronisesta ohjauksesta. Ilmalaakeriteknologian ansiosta vääntömomenttialue on laajempi ja se mahdollistaa pienen vääntömomentin mittaukset vähintään 2 nNm asti. (Anton Paar, 2011)

MCR-mallisessa reometrissa on patentoitu TruGaptm -järjestelmä, joka mittaa ja säätää automaattisesti ja tarkasti halutun levyn ja mittapään välisen etäisyyden, riippumatta lämpötilasta ja lämpölaajenemisesta. Aukon suuruus on tärkeä

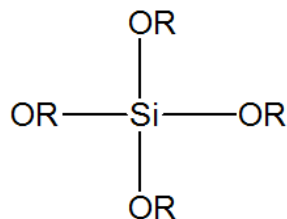
reologisissa mittauksissa ja se näkyy tuloksissa, jos se on epätarkka tai vaihteleva. TruGaptm -mittausjärjestelmä perustuu magneettiseen induktioon. Kaksi kelaa on asennettu pohjalevyn alle. Virta kulkee ensimmäisen kelan läpi, joka indusoi jännitteen toiselle kelalle. Piiri on suljettu magneettisella levyllä, joka on ylhäällä oleva mittapää. Tällä jännitteellä reometri mittaa ja säätää mittapään etäisyyttä. (Anton Paar, 2011)

5 SiO₂:N SOOLI-GEELIPROSESSOINTI

Tässä opinnäytetyössä käytetyt geelit on valmistettu sooli-geelimenetelmällä. Menetelmä on yleinen silikan valmistuksessa. (Jokinen, et al., 2010)

Sooli-geelimenetelmällä valmistetun silikan lähtöaineet ovat yleisesti alkoksidgeja, alkyylialkoksidgeja, aminoalkoksidgeja tai epäorgaanisia silikaatteja, jotka hydrolyysissä muodostavat piihappoa. Piihapon kondensoituminen johtaa silikapartikkelien muodostumiseen, jotka muodostavat soolin. Partikkelit aggregoituvat ja lopulta muodostuu geeli. (Jokinen, et al., 2010).

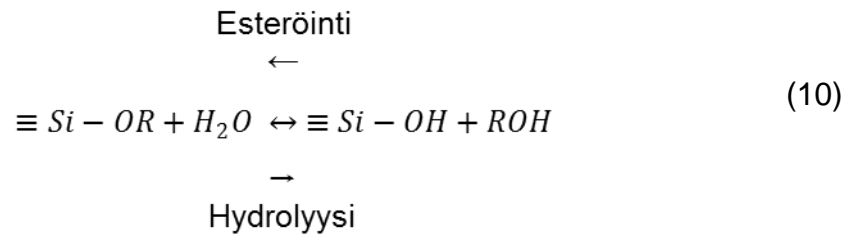
Geelin valmistukseen käytetään happamia silikasooleja. Sooleja valmistetaan hydrolysoimalla alkoksidgeja, hapon tai emäksen katalysoimana. Reaktiota kutsutaan hydrolyysiksi, koska hydroksyyli-ioni kiinnittyy metalliatomiin. Käytetyimmät alkoksidit ovat tetraetyyliortosilikaatti (TEOS) ja tetrametyyliortosilikaatti (TMOS). Molemmat ovat rakenteeltaan samanlaisia, erona ovat alkoksiryhmään kiinnittyneet molekyylit; etyyli ja metyyli (esitetty kuvassa 15). Reaktion sivutuotteena TEOS:lla muodostuu etanolia ja TMOS:lla metanolia. (Brinker & Scherer, 1990)



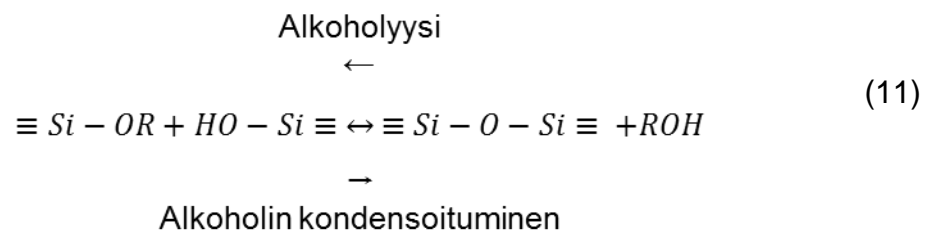
Kuva 15. Piialkoksidi.

Soolin muodostuminen voidaan jakaa kolmeen osaan: hydrolyysi, alkoholin kondensoituminen ja veden kondensoituminen. Hydrolyysissä lähtöaine reagoi veden kanssa niin, että alkoksiryhmä (-OR) vaihtuu hydroksyyliiryhmään (-OH). Sivutuotteena muodostuu alkoholia (ROH). Reaktioyhtälö on esitetty yhtälössä 10. Hydrolyysireaktio tapahtuu nopeammin ja täydellisemmin, kun käytetään happamia katalyyttejä, esimerkiksi suolahappoa tai typpihappoa. Katalyyttinä

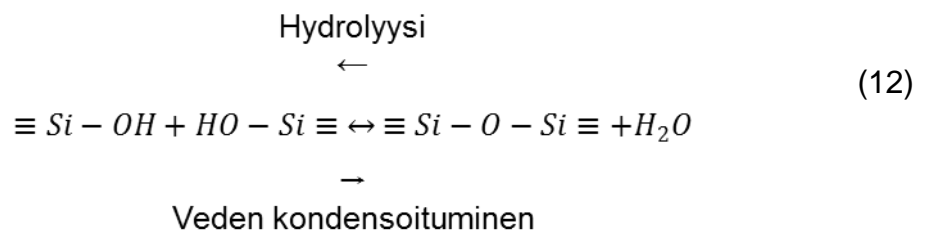
voidaan käyttää kuitenkin myös emästä. Katalyytillä on merkitystä geelin muodostumisaikaan. (Brinker & Scherer, 1990)



Kondensoitumisreaktiossa muodostuu alkoholia (ROH), kun hydroksyyliiryhmä (-OH) hapettuu ja jäljelle jäänyt happimolekyyli muodostaa siloksaanisidoksen (Si-O-Si). (Brinker & Scherer, 1990) Alkoholin kondensoitumisen reaktioyhtälö on esitetty yhtälössä 11.

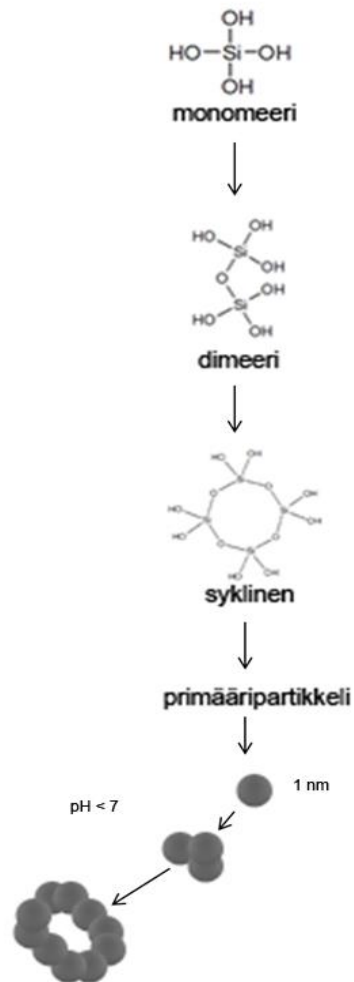


Veden kondensoitumisreaktiossa hydroksyyliiryhmät reagoivat ja muodostuu vettä ja jäljelle jäänyt happimolekyyli muodostaa siloksaanisidoksen. Reaktioyhtälö on esitetty yhtälössä 12. Kummatkin kondensoitumisreaktiot tapahtuvat yleensä jo, ennen kuin hydrolyysireaktio on valmis. (Brinker & Scherer, 1990)



Kondensoitumisreaktio on jatkuva ja johtaa siihen, että monomeerista muodostuu polymeeri. Siloksaanisidokset voivat olla monomeeri-, dimeeri-, lineaarinen trimeeri-, syklinen trimeeri-, syklinen tetrameeri- tai rengasmuodossa. Polymeerit muodostavat partikkeleita, jotka aggregoituvat ja

muodostavat polymeeriverkon pintavarausten ja van der Waals – vuorovaikutuksen takia. Prosessi on esitetty kuvassa 16. (Brinker & Scherer, 1990)



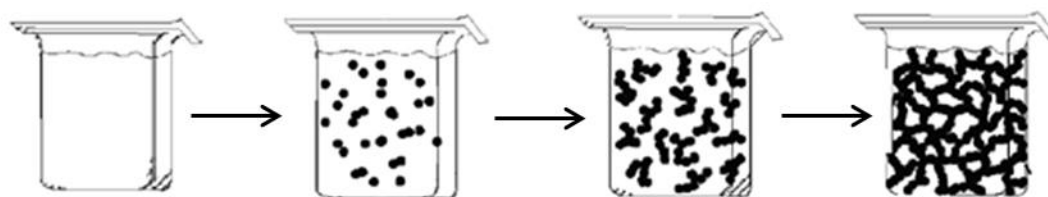
Kuva 16. Silikan polymerisaatio Ilerin mukaan.

Kondensoitumisreaktio tapahtuu hitaammin happamissa olosuhteissa. Sooli muodostaa geelin kondensoitumisreaktiossa joko pH:n nostolla tai ajan kuluessa (Jokinen, et al., 2010). Silikasoolille yleinen pH hydrolyysissä on 2, koska se on silikan isoelektrinen piste (Brinker & Scherer, 1990). Isoelektrisessä pisteessä molekyylien ulkoinen varaus on nolla ja molekyylit eivät liiku ulkoista varausta kohti. (Zumdahl, 1997)

Soolin ominaisuudet ovat hyvin hallittavissa. Soolien koostumusta ilmaistaan yleensä R-arvolla, joka on veden ja TEOS:n moolisuhde. Mitä suurempi R-arvo, sitä enemmän suspensiossa on vettä suhteessa silikaan (Brinker & Scherer, 1990). Suuri R-arvo kiihdyttää alkoksidin hydrolyysia, joka tietyissä olosuhteissa nopeuttaa silikan liukenemistä (Nieto, et al., 2009). Pienin R-arvo voi olla <1 , mutta jotta hydrolyysireaktio tapahtuisi teoreettisesti täydellisesti ja kaikki lähtöaineet reagoisi, R-arvon tulee olla vähintään 2. (Brinker & Scherer, 1990).

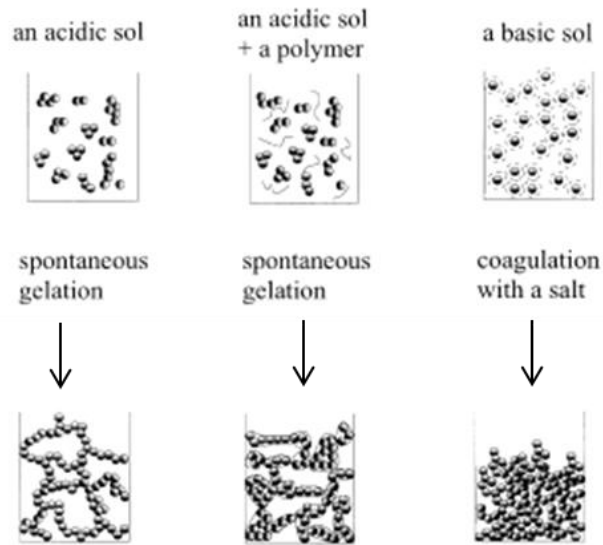
5.1 Geelin muodostuminen

Geeliä muodostuu, kun hydrolyysi- ja kondensaatioreaktiot johtavat partikkeleiden kasvuun ja aggregoitumiseen. Partikkelit muodostavat keskenään sidoksia ja sidokset muodostavat verkostoja. Geelin verkostojen muodostuminen on esitetty kuvassa 17. (Jokinen, et al., 2010)



Kuva 17. Sooli-geeliprosessoidun silikageelin polymeeriverkon muodostuminen (Jokinen, et al., 2010).

Geelin muodostumiseen vaikuttaa pH, soolin kuiva-ainepitoisuus, soolin etanolipitoisuus ja soolin ikä. Isoelektrisessä pisteessä molekyylit eivät liiku varausta kohti ja näin siloksaanisidoksia syntyy hitaammin ja geelin muodostuminen hidastuu. Happamien soolien kondensoitumisreaktiota voidaan nopeuttaa nostamalla pH alueelle 5-7, mikä nopeuttaa soolin spontaania geeliytymistä. (Jokinen, et al., 2010) Geelin muodostumista voidaan nopeuttaa myös lisäämällä suoloja tai solumediumpuskuria. Kuvassa 18 on esitetty geeliytymisprosesseja eri menetelmillä. (Jokinen, et al., 1998; Nieto, et al., 2009)



Kuva 18. Geeliytymisprosessit eri menetelmillä (Jokinen, et al., 1998).

Kun geeliytyminen yritetään saavuttaa lisäämällä suolaa, partikkelit koaguloituvat ja rakenne on erilainen kuin happamasta silikasoolista valmistettu. Koaguloitulla geelillä rakenne on heikompi kuin happamalla geelillä. (Jokinen, et al., 1998)

Soolin kuiva-ainepitoisuus vaikuttaa geelin rakenteeseen. Mitä suurempi R-arvo, sitä vähemmän suspensiossa on kuiva-ainetta, silikaa. Mitä vähemmän kuiva-ainetta, sitä kauemmin kestää polymeeriverkostojen muodostuminen. Soolin kuiva-ainepitoisuutta voidaan säädellä veden lisäyksellä. (Jokinen, et al., 2010)

Etanolia muodostuu soolin reaktiossa ja se hidastaa geelin muodostumista (Jokinen, et al., 2010). Solukapseloinnissa etanolin määrä pyritään minimoimaan, koska solut vahingoittuvat siitä. Etanolin määrää voidaan pienentää haihduttamalla hydrolyysireaktion jälkeen. Etanolin teoreettinen määrä soolissa lasketaan ja tilalle lisätään etanolille korvausvettä ennen haihduttamisen aloittamista tai haihdutuksen aikana, jotta geelin muodostumista ei tapahdu liian nopeasti. (Nieto, et al., 2009)

Soolin kondensaatioreaktio tapahtuu myös matalassa pH:ssa; partikkelit aggregoituvat, muodostavat verkostoja ajan funktiona ja jossain vaiheessa sooli geeliiytyy kokonaan. Matala lämpötila hidastaa kondensaatioreaktiota. Sooli, jossa on jo valmiiksi muodostettuja verkostoja, geeliiytyy nopeammin pH:n nostamisella kuin tuore sooli. (Jokinen, et al., 2010)

5.2 Komposiittigeelit

Komposiitti on useamman materiaalin yhdistelmä. Komposiittigeeli on geeli, johon lähtöaineen lisäksi on lisätty muita apuaineita.

Geelien huokoisuutta voidaan lisätä käyttämällä vesiliukoisia porogeenejä. Porogeenejä ovat mm. natriumkloridi, glukoosi ja dekstriini. Solukapseloinnissa solut voivat käyttää huokoisuuden nostossa käytettyä glukoosia myös ravintona. (Nieto, et al., 2009)

Glukoosi on monosakkaridi ja dekstriini on glukoosia sisältävä polymeeri. Dekstriini on tärkkelyksen pilkkomistuote. Tärkkelys voidaan jakaa kahteen fraktioon: amyloosiin ja amylopektiiniin. Amyloosia on noin 20 % tärkkelyksestä ja se on veteen liukeneva. Amyloosin täydellisessä hydrolyysissä muodostuu glukoosia. Amylopektiinia on 80 % tärkkelyksestä ja se on veteen liukenematon. Amylopektiinin osittaisessa hydrolyysissä muodostuu dekstriiniä. Dekstriinin hydrolyysissä muodostuu maltoosia ja isomaltoosia, jotka pilkkoutuvat glukoosiksi. (Fessenden & Fessenden, 1998)

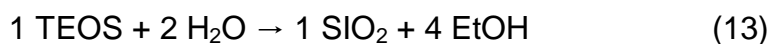
Glukoosi liukenee nesteisiin hyvin, 1 g glukoosia liukenee 0,8 ml:aan vettä 30 °C:ssa (Merck Index, 1996). Solut käyttävät glukoosia suoraan ravintona. Dekstriini on glukoosipolymeeri ja on siis glukoosia isompi molekyyli. Dekstriini liukenee hitaasti veteen. Dekstriinimateriaaleihin lisätty amylaasi (entsyymi) pilkkoo dekstriiniä glukoosiksi, jota solut voivat käyttää ravintona. (Nelson & Cox, 2000)

6 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

Kokeellisen osuuden tavoitteena oli lisätä biomateriaalin huokoisuutta ja valmistaa huokoista biomateriaalia. Biomateriaalina käytettiin silikapohjaisia hydrogeelejä. Hydrogeelit valmistettiin sooli-geelimenetelmällä. Huokoisuutta muodostettiin geeliin kahdella menetelmällä: liuottamalla partikkeleita ja vaahdottamalla. Partikkelien liutusmenetelmässä käytettiin kahta porogeeniä; glukoosia ja dekstriiniä. Porogeenit liuotettiin materiaalista pois ja liunneiden porogeenien pitoisuus määritettiin. Vaahdottamiseen käytettiin homogenisaattoria ja vaahdon muodostumiseen käytettiin pinta-aktiivisia aineita sisältävää naudan sikiön seerumia. Pinta-aktiivisten aineiden ansiosta soolin pintajännitys laskee ja ilma tunkeutuu sooliin helpommin. Vaahdotettujen geelien mekaanisia ominaisuuksia tutkittiin reometrilla ja tuloksia verrattiin elävien kudosten ominaisuuksiin. Vaahdotettujen geelien stabilisuutta (elastinen moduuli) tutkittiin viiden päivän ajan soluviljelyolosuhteissa.

6.1 Soolin valmistus

Tässä opinnäytetyössä käytetyt silikageelit valmistettiin sooli-geeliprosessilla. Opinnäytetyössä valmistettiin vain R70-sooleja. Soolin lähtöaineena käytettiin TEOS:a (Sigma Aldrich, 98 %). Hydrolyysireaktion katalyyttinä käytettiin 1 M suolahappoa. Reaktioyhtälö on esitetty yhtälössä 13.



Sooli valmistettiin dekanterilasissa. Hydrolyysireaktiossa annetaan veden ja TEOS:n reagoida alhaisessa pH-arvossa (pH=2). Reaktio on eksoterminen. Sooli oli valmis, kun seos oli kirkas ja lämpötila tasaantui. R70-soolin silikapitoisuus on 40,5 mg / ml soolia.

Hydrolyysireaktion jälkeen etanolia haihdutettiin. Yhtälöstä 13 laskettiin reaktiossa muodostuva etanolin määrä. Tämä määrä vettä nelinkertaisena lisättiin sooliin haihdutettavan etanolin tilalle. Tällä tavalla varmistuttiin, että

prosessi on joka kerta samanlainen. Etanolia haihdutettiin pois kuumentamalla seos 63 °C:seen ja haihdutusprosessi kesti noin 60–90 min. Etanolia ei voi näin haihduttaa kokonaan pois, mutta sen määrä vähenee huomattavasti. Etanolin haihdutuksen jälkeen sooli jäähdytettiin, jätettiin alhaiseen pH-arvoon ja säilytettiin kylmässä.

6.2 Komposiittisoolien valmistus

Materiaalin huokoisuutta voidaan lisätä käyttämällä vesiliukoisia porogeenejä. Tässä opinnäytetyössä on käytetty kahta porogeeniä; glukoosia ja dekstriiniä.

Kirjallisuudessa on käytetty 21 % (w/w) glukoosia soolissa ja sen havaittiin olevan optimimäärä solukapseloiteja varten. (Nieto, et al., 2009) Tässä opinnäytetyössä glukoosia (VWR, D-glucose anhydrous) lisättiin sooleihin 10- ja 20 % (w/w). Glukoosi liukeni sooliin hyvin.

Myös dekstriiniä lisättiin sooleihin 10- ja 20 % (w/v). Dekstriini (Fluka, dextrin from potato starch) ei liennut sooliin, vaan jäi suspensioksi. Dekstriini laskeutui ajan mittaan pohjalle. Ennen dekstriinisoolin käyttämistä, sooli ravistettiin hyvin, jotta dekstriiniä olisi tasaisesti soolissa.

Kolmantena näytteenä oli dekstriinisooli, johon oli lisätty α -amylaasia (Sigma, α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*). Valmistaja ilmoittaa, että amylaasi sisälsi 250 yksikköä / g ja yksi yksikkö pilkkoo 5,26 g tärkkelystä optimiolosuhteissa. Optimiolosuhteet α -amylaasille ovat 70–90 °C lämpötila ja pH-alue 5,5 – 6,5.

Dekstriinipitoisuudet näissä sooleissa olivat samat kuin dekstriinisoolissa. Amylaasia oli laskettu sopiva määrä, punnittu ja lisätty sooliin. Dekstriinisooleihin, jotka sisälsivät 10 % dekstriiniä, lisättiin amylaasia 0,69 g eli 172,5 yksikköä. Dekstriinisooleihin, jotka sisälsivät 20 % dekstriiniä, lisättiin amylaasia 1,33 g eli 332,5 yksikköä.

Kaikki näytteet on esitetty taulukossa 3.

6.3 Mediumin valmistus

Soolin geelyttämisessä käytettiin kahta eri mediumia: RPMI-1640 (Gibco) ja DMEM / F-12 (Gibco), joihin oli lisätty 10 vol-% FBS-seerumia ja 4,34 vol-% 1 M natriumhydroksidia. 45 ml:aan mediumia lisättiin 4,5 ml FBS:a ja 1,955 ml NaOH:a.

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) -medium sisältää itsessään L-glutamiinia ja 15 mM HEPEStä. Lisäksi se sisältää biotiinia, B-12-vitamiinia ja PABA, joita ei löydy DMEM-mediumista. Medium sisältää myös glukoosia (2000 mg/l). RPMI-mediumia käytetään solumediumina solukasvatuksissa. (Gibco, 2014)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) / F-12 Nutrient mixture suhteessa 1:1 sisältää itsessään myös L-glutamiinia ja 15 mM HEPEStä. DMEM-medium sisältää itsessään korkeat pitoisuudet glukoosia (3151 mg / l), aminohappoja ja vitamiineja. (Gibco, 2014)

FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco) on naudan sikiön seerumia ja yleisin käytetty soluviljelyn lisäaine.

6.4 Geelin muodostuminen

Geelin muodostumista tutkittiin koeputkissa. Koeputkeen lisättiin 1 ml soolia, pH:n nostaminen tehtiin mediumilla, tilavuussuhteilla 2:1, 3:1 ja 4:1 (sooli : medium). Reagenssit olivat huoneenlämpöisiä. Geelin katsottiin muodostuneen, kun koeputken kääntäessä ylösalaisin materiaali ei enää valunut koeputkesta. Geelytymisajat otettiin ylös sekuntikellolla. Geelytymisajalla tarkoitetaan tässä työssä aikaa, joka kuluu soolin pH:n nostosta geelipisteeseen. Soolien geelytymisajat on esitetty taulukossa 3.

6.5 Vaahdotetun geelin valmistus

Vaahdotetut geelit valmistettiin 6-kuoppalevyille, koska se oli sopiva reologisia mittauksia ja porogeenin liuottamisprosessia varten. Kuoppaan pipetoitiin 2 ml soolia ja pH:n nostaminen tehtiin mediumilla, tilavuussuhteilla 2:1, 3:1 ja 4:1. Mediumiin valmiiksi lisättyjen pinta-aktiivisten sisältävien aineiden ansiosta vaahdottaminen oli helpompaa. Heti kun medium oli lisätty, aloitettiin vaahdotus. Soolin lisätty medium nostaa soolin pH:ta ja soolin geelityminen nopeutuu. Materiaalien vaahdottaminen tehtiin Ultra-Turrax T25 -homogenisaattorilla (8000 rpm). Homogenisaattorin homogenisointiterän halkaisija oli 18 mm. Vaahdotusaika oli puolet soolin geelitymisajasta (taulukko 3), jotta geeli ei muodostu ennen vaahdottamisen lopettamista. Kuva 19 esittää geelin vaahdotuksen kuoppalevyllä.

Vaahdotteja tehtiin viisi / näyte kuoppalevyille niin, että joka päivälle oli oma vaahdottegeeli reologisia mittauksia varten. Porogeenin liuottamista varten vaahdotte tehtiin eri kuoppalevyille, niin että rinnakkaisia oli kolme / näyte. Soolit, jotka vaahdotettiin, olivat etukäteen tehtyjä ja vaahdotuspäivinä ne olivat 3-4 päivää vanhoja. Vaahdotte tehtiin kuoppalevyille siten, että pinta oli tasainen, jotta päälle tuleva medium peittäisi vaahdon tasaisesti ja porogeenien liuottaminen olisi kaikissa kuopissa vastaavanlainen. Päälle tuleva medium simuloi soluviljelyolosuhteita. Vaahdotuksessa käytettävät soolit ja mediumit olivat huoneenlämpöisiä. Vaahdotetut geelit säilytettiin 37 °C ennen reologisia mittauksia.

Taulukko 3. Näytteet.

Sooli	Porogeeni	Soolin porogeeni-pitoisuus (%)	Medium	Sooli-medium tilavuussuhde	Geelitymisaika (min)	Vaahdotusaika (min)
R70	glukoosi	10 (w/w)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	12	6
R70	glukoosi	10 (w/w)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	12	6
R70	glukoosi	20 (w/w)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	12	6
R70	glukoosi	20 (w/w)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	12	6
R70	dekstriini	10 (w/v)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	7	3
R70	dekstriini	10 (w/v)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	6 ½	3
R70	dekstriini	20 (w/v)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	12 ½	4
R70	dekstriini	20 (w/v)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	9	4
R70	dekstriini + amylaasi	10 (w/v)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	4 ½	2
R70	dekstriini + amylaasi	10 (w/v)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	4 ½	2
R70	dekstriini + amylaasi	20 (w/v)	DMEM / FBS / NaOH	3:1	5 ½	2 ½
R70	dekstriini + amylaasi	20 (w/v)	RPMI / FBS / NaOH	3:1	5 ½	2 ½
R70	-	-	DMEM / FBS / NaOH	3:1	10	5
R70	-	-	RPMI / FBS / NaOH	3:1	8 ½	4
R70	dekstriini	10 (w/v)	DMEM / FBS / NaOH	2:1	5 ½	2 ½
R70	dekstriini	10 (w/v)	RPMI / FBS / NaOH	4:1	25	5*

* geelin vaahdottaminen suoritettiin siten, että mediumin lisäyksen jälkeen odotettiin 10 min, jonka jälkeen vaahdotettiin 5 min.



Kuva 19. Geelin vaahdotus kuoppalevyllä Ultra-Turrax T25 -homogenisaattorilla.

6.6 Reologiset mittaukset

Reologiset mittaukset suoritettiin Anton-Paar MCR 102-reometrillä. Mittaukset suoritettiin levy-levymittapöydällä, jonka halkaisija oli 15 mm. Mittapään ja levyn välinen etäisyys (*shear gap*) oli vakio (1 mm). Näytteiden mittaustemperatura oli 25 °C.

6.6.1 Amplitudipyyhkäisy

Amplitudipyyhkäisy tehtiin vaahdolle ensimmäisenä, jolloin määritettiin lineaarinen viskoelastinen alue. Mittauksien parametrit olivat:

- mittauspisteitä 21 kpl
- amplitudiliukuma 0,01 – 100 %
- kulmakerroin 5 mittauspistettä / dekad
- kulmataajuus 10 rad/s

6.6.2 Frekvenssipyyhkäisy

Kun AS-mittaus oli suoritettu, seuraava mittaus oli frekvenssipyyhkäisy. Tässä mittauksessa tarkasteltiin G' :n ja G'' :n käyttäytymistä suhteessa frekvenssiin. AS-mittauksessa määritettiin lineaarinen viskoelastinen alue. Amplitudi, joka oli vakio, valittiin AS-mittausten perusteella ja muuttujana oli frekvenssi. FS-mittauksien parametrit olivat:

- mittauspisteitä 16 kpl
- frekvenssialue 100 – 0,1 rad/s
- kulmakerroin on 5 mittauspistettä / dekad
- amplitudiliukuma 1 %, joka on vakio.

6.7 Porogeenin liuottaminen vaahdotetusta geelistä ja vaahdotettujen geelien stabilisusseuranta soluviljelyolosuhteissa

Vaahdon annettiin muotoutua 3-4 tuntia ennen ensimmäisiä reologisia mittauksia tai porogeenien liuottamista. Muodostuneeksi vaahdoksi katsottiin sitä, kun vahto oli visuaalisesti tasalaatuinen ja stabiili, eikä valunut astiasta reunoja pitkin.

Vaahtojen, jotka olivat kuoppalevyllä, päälle pipetoitiin kaksinkertainen määrä mediumia soolin tilavuuden suhteen, eli 4 ml mediumia simuloimaan soluviljelyolosuhteita. Mediumin käyttötarkoitus oli myös liuottaa vaahdotetun geelin sisällä olevia porogeenejä. Aikaisempien tutkimuksien mukaan, kaksinkertainen määrä materiaalin päälle tulevaa mediumia on optimimäärä porogeenien liuttamista varten. Mediumina käytettiin DMEM- tai RPMI-mediumia, ilman natriumhydroksidin tai FBS:n lisäystä. DMEM- medium lisättiin DMEMiä sisältävien materiaalien päälle ja vastaavasti RPMI-mediumia sisältävien materiaalien päälle RPMI-mediumia. Medium lisättiin huoneenlämpöisenä ja kun se oli lisätty, kuoppalevy suljettiin kannella ja kansi tiivistettiin parafilmillä, jotta vaahdon päällä oleva medium ei haihtuisi niin nopeasti. Kuoppalevyt vietiin säilytettäväksi lämpökaappiin 37 °C:seen yön yli noin 20–24 tunniksi. Lämpökaapin lämpötila tarkistettiin lämpömittarilla.

Seuraavana päivänä vaahtojen päältä pipetoitiin medium pois ja vaahdolle tehtiin reologisia mittauksia; amplitudi- ja frekvenssipyyhkäisyjä. Mittausten tuloksia verrattiin edelliseen päivään. Vaahtojen päällä oleva medium vaihdettiin päivittäin tuoreeseen. Stabiilisuuden seuranta jatkui viiden päivän ajan soluviljelyolosuhteissa.

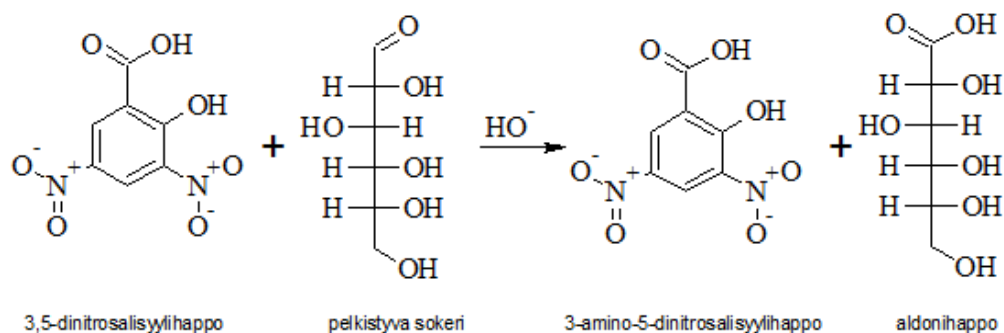
Vaahdoista tutkittiin myös porogeenin poisliukeneminen. Porogeeneinä tässä tutkimuksessa käytettiin glukoosia ja dekstriiniä. Porogeenien liuottamisessa käytetty 0,2 M natriumfosfaattipuskuria, koska DMEM- ja RPMI- medium itsessään sisältää jo glukoosia, joten liuonnan glukoosimäärän tutkiminen olisi hankalaa. Kuten mediumien kanssa, natriumfosfaattipuskuri oli lisätty materiaalien päälle kuoppalevylle, jonka jälkeen kuoppalevy vietiin säilyttäväksi

37 °C:seen yön yli noin 20–24 tunniksi. Seuraavana päivänä kuoppalevyistä pipetoitiin neste pois, johon porogeeni oli liuennut ja määritettiin porogeenin pitoisuus. Vaahtojen päällä oleva puskuuri vaihdettiin päivittäin tuoreeseen. Porogeenien liotusprosessi kesti neljän päivän ajan, josta saatiin selville neljän päivän aikana liunneen porogeenin kokonaismäärä.

6.8 Glukoosin ja dekstriinin määrittäminen spektrofotometrisesti

Glukoosin ja dekstriinin pitoisuudet määritettiin spektrofotometrisellä menetelmällä. Menetelmä on alun perin vuonna 1959 Millerin kehittämä (Miller, 1959). Tässä opinnäytetyössä Millerin menetelmää on modifioitu ja määrittäykset on tehty sen mukaan.

Sokerit pelkistyvät johtuen sokerimolekyylin vapaista aldehydi- ja ketoniryhmistä. Sokerit voidaan pelkistää 3,5-dinitrosalisyylihapolla, jossa aldehydyryhmä hapettuu aldohapoksi. 3,5-dinitrosalisyylihapo muuttuu reaktiossa 3-amino-5-nitrosalisyylihapoksi, joka antaa oranssin värin ja värin intensiteetti riippuu sokerin pitoisuudesta. Reaktio on esitetty kuvassa 20.



Kuva 20. Sokerien pelkistys 3,5-dinitrosalisyylihapolla.

DNS-reagenssiliuos valmistettiin liuottamalla 10 g 3,5-dinitrosalisyylihappoa (Sigma Aldrich), 0,5 g natriumsulfiittia ja 10 g natriumhydroksidia litraan vettä. DNS-liuosta ja sokeriliuosta pipetoitiin sama määrä koeputkeen, 1 ml kumpaakin. Koeputki suljettiin korkilla ja sisällä oleva liuos kuumennettiin 90 °C:seen, jolloin tapahtui värinmuutos. Värinmuutos tapahtui noin 5-15

minuutissa. Tämän jälkeen liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä 540 nm:n aallonpituudella. Tulokset laskettiin standardisuoran mukaan.

Dekstriinimäärityksissä käytettiin apuna α -amylaasia, koska kyseinen menetelmä ei ole spesifinen dekstriinille. Dekstriiniliuoksiin lisättiin tarvittava määrä amylaasia, jonka jälkeen dekstriiniä pilkottiin 70 °C:ssa tunnin verran. Dekstriinin pilkkomisen jälkeen liuokset pidettiin 60 °C:ssa. Tämän jälkeen otettiin 1 ml dekstriiniliuosta ja lisättiin siihen sama määrä DNS-liuosta, jonka jälkeen liuos kuumennettiin 90 °C:seen. Värimuutoksen jälkeen liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä.

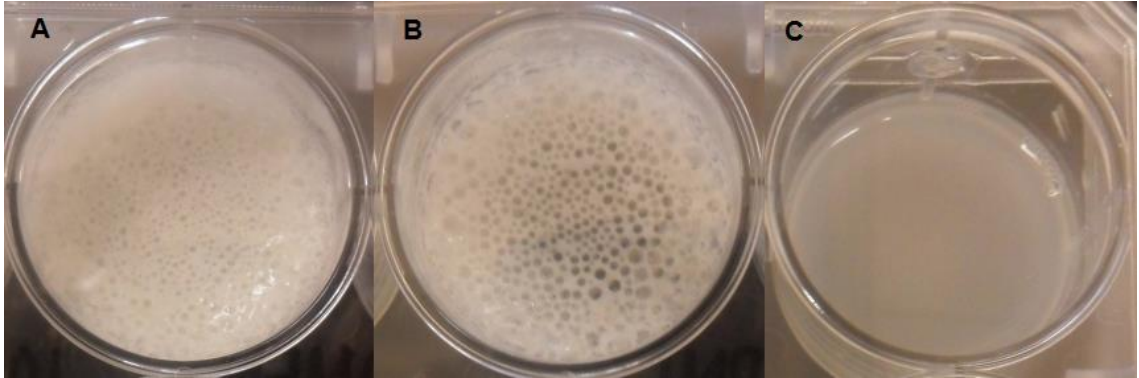
6.9 Dekstriinin pilkkominen glukoosimolekyyleiksi

Koska dekstriinimäärityksissä on käytetty α -amylaasia, tutkittiin miten amylaasi vaikuttaa dekstriiniin ja miten se pilkkoo sitä pienemmiksi molekyyleiksi. Dekstriinin pilkkoutumista tutkittiin määrittämällä polymeeriliuosten viskositeettejä. Liuoksista mitattiin kinemaattinen viskositeetti Übbelohde (App Nr 40992) kapillaariviskosimetrillä. Periaatteena on se, että suurimolekyyliset liuokset valuvat hitaammin kapillaaria pitkin, kuin pieni molekyyliset. Lisäksi suurimolekyylisten aineiden viskositeetti on vahvemmin riippuvainen konsentraatiosta. Dekstriini on glukoosia sisältävä polymeeri.

Dekstriinistä valmistettiin standardiliuos eri pitoisuuksilla; 2,5 % - 10 %, tasavälein. Dekstriiniliuoksiin lisättiin tarvittava määrä amylaasia pilkkomista varten. Pilkkominen tapahtui 70 – 90 °C:ssa tunnin ajan. Pilkkomisen jälkeen mitattiin pilkottujen dekstriiniliuosten kinemaattinen viskositeetti Übbelohde-kapillaariviskosimetrillä 60 °C:ssa. Tulokset esitetään kuvaajissa konsentraation suhteen. Amylaasilla pilkottujen dekstriinistandardien tuloksia verrattiin dekstriini- ja glukoosistandardeihin. Kapillaariviskosimetrin kapillaarin halkaisija oli 0,63 mm.

7 TULOKSET

7.1 Vaahdotetun geelin muodostuminen

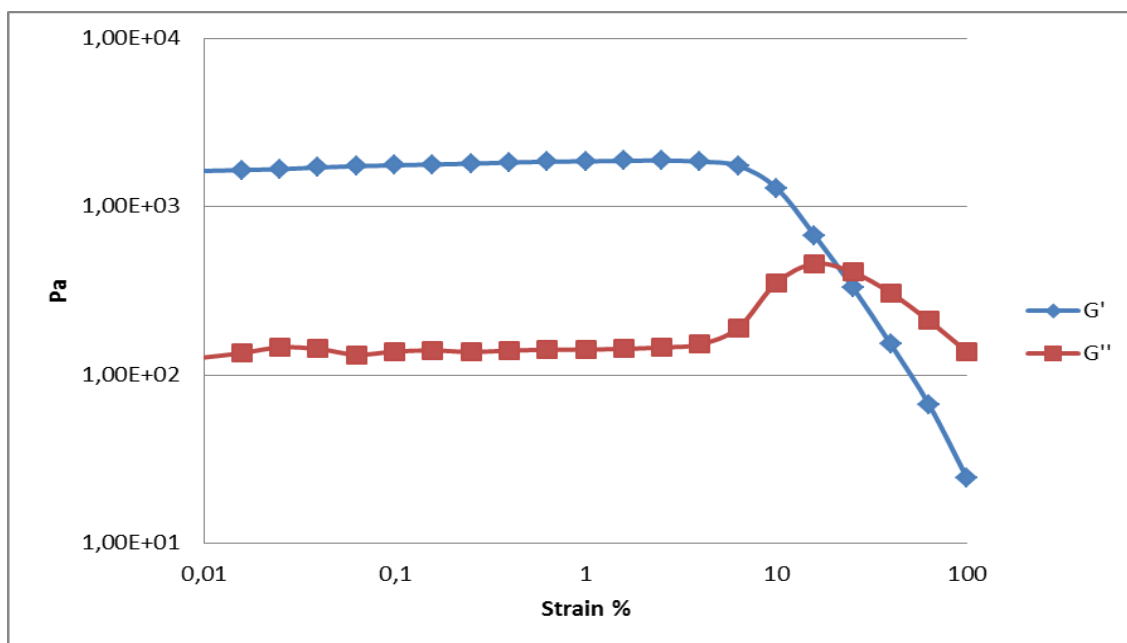


Kuva 21. Vaahdotettu geeli. A: R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 ((DMEM / FBS / NaOH)), B: R70-vaaho, dekstriini 10 %, 3:1 ((RPMI / FBS / NaOH)), C: R70-geeli, dekstriini 10 %, 3:1 ((RPMI / FBS / NaOH)).

Kuten aiemmin mainittiin, kuopalle lisätyn soolin määrä oli 2 ml ja mediumia lisättiin sooliin 0,5 - 1 mL. Kuopan kokonaistilavuus on 15,5 ml. Kuvasta 21 näkee, että vaahdon (A ja B) tilavuus on selvästi kasvanut verrattuna soolin ja mediumin yhteismäärään (C). Vaahdon pinta on tasainen.

7.2 LVE-alueen määrittäminen

Ennen FS-mittauksia näytteille määritettiin LVE-alue tekemällä AS-mittaus. LVE-alue määritettiin jokaisesta näytteestä. Yhden näytteen AS-mittauksen esimerkkipäätelmä on esitetty kuviossa 7.



Kuvio 7. Esimerkkikuvaaja AS-mittauksesta.

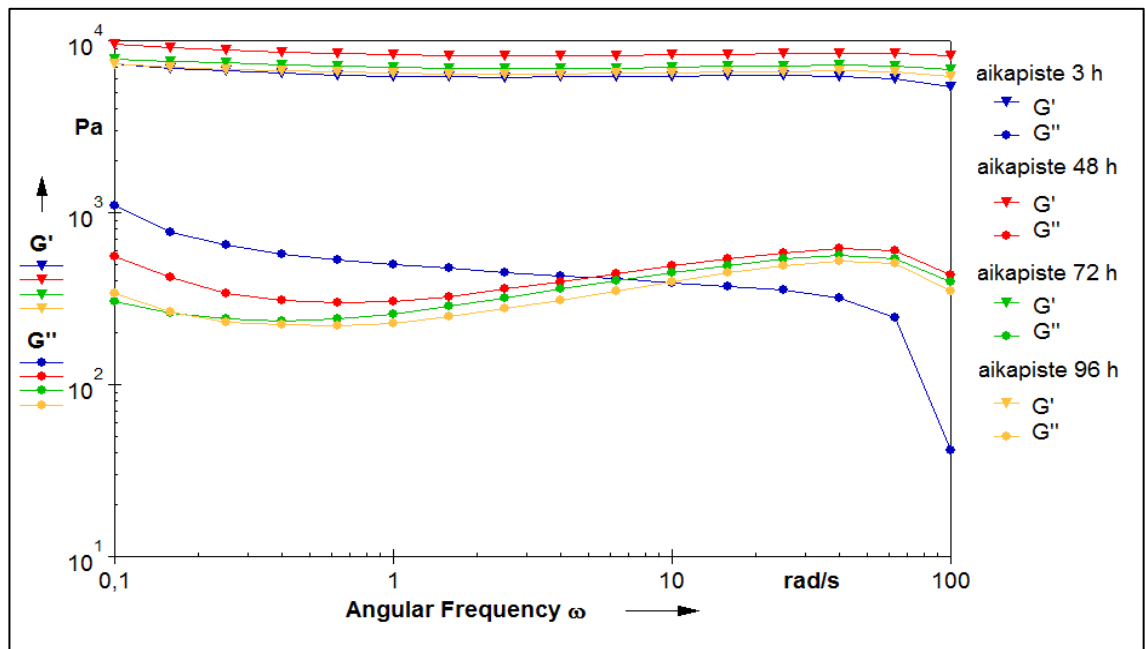
AS-mittauksen tarkoituksena oli tutkia LVE-alue. Kaikissa, kuten tässäkin näytteessä, LVE-alue loppuu noin 4 % kohdalla. FS-mittauksen perusteella amplitudiliukuman arvoksi valittiin 1 %.

7.3 Frekvenssipyyhkäisymittaukset

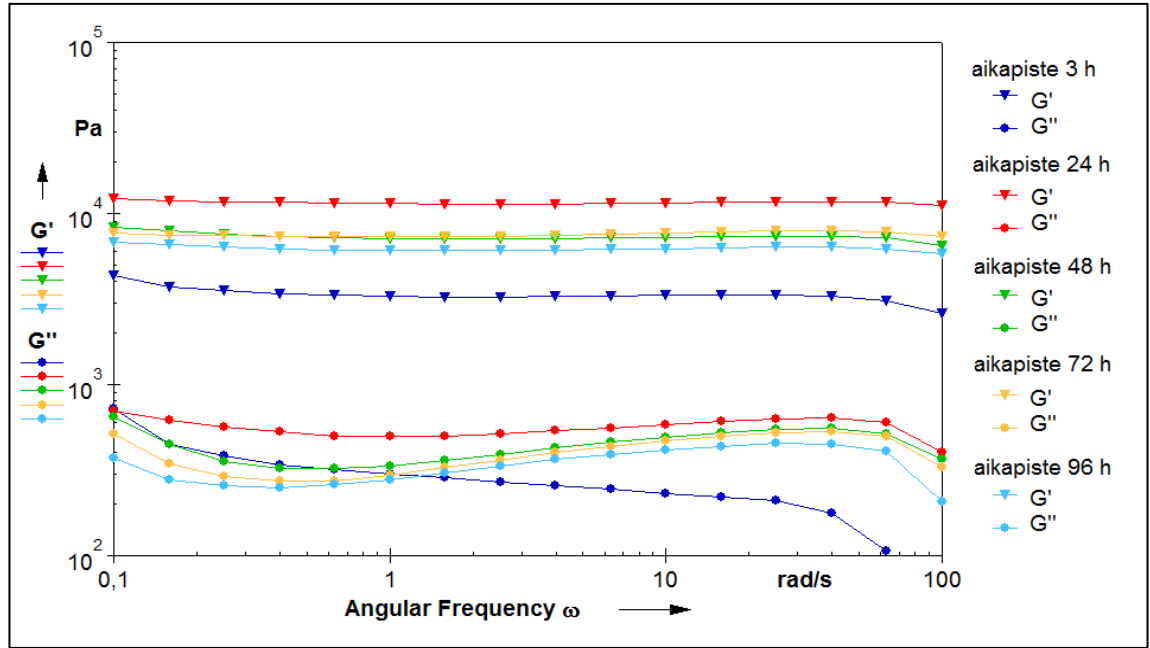
Vaahdotettujen geelien reologiaa tutkittiin ajan funktiona. Tuloksiin vaikutti mahdollinen geelin muutos ajan funktiona sekä porogeenien liukeneminen pois rakenteesta. FS-mittauksella tulokseksi saatiin elastinen ja viskoottinen moduuli ja niiden ominaisuuksien käyttäytyminen ajan funktiona (frekvenssi on ajan käänteinen arvo). FS-tuloksista eniten kiinnostaa elastinen moduuli, koska se kertoo materiaalin elastisista ominaisuuksista. Materiaalin elastisen moduulin tulosta verrataan kudoksen elastiseen moduuliin. Tämä tieto kertoo, mihin kudostyyppiin materiaali soveltuu.

7.3.1 Vaahdotettujen glukoosigeelien reologia

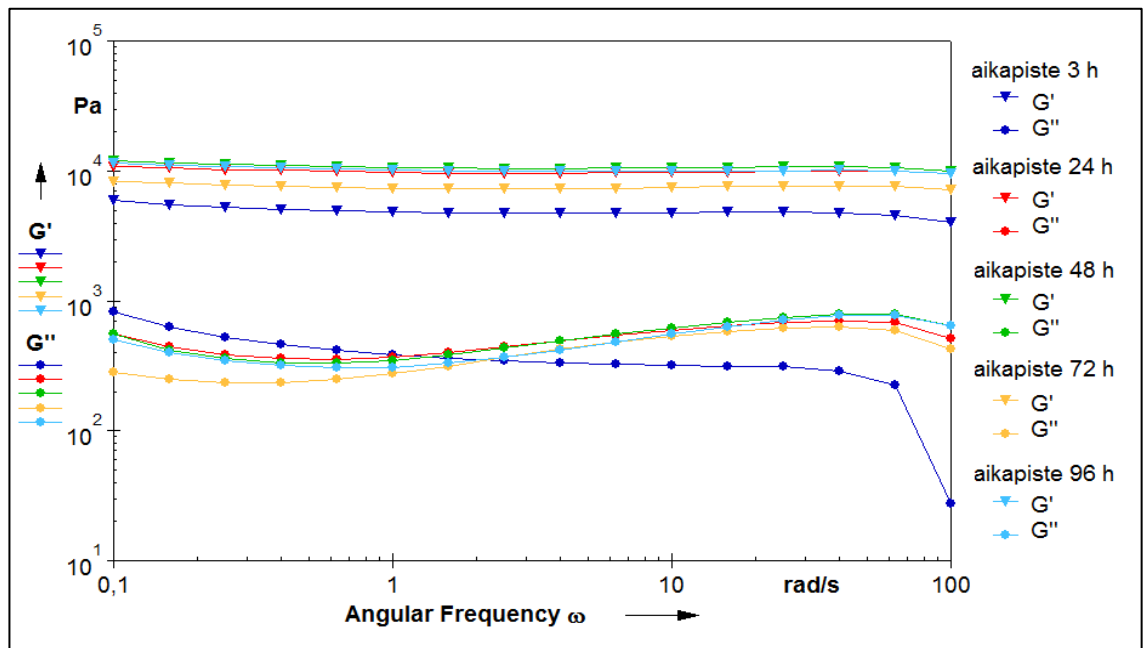
Kuvioissa 8, 9, 10 ja 11 on esitetty vaahdotettujen glukoosigeelien frekvenssipyyhkäisytuloksia. Elastinen moduuli on esitetty kuvioissa kolmiolla ja viskoottinen moduuli pallolla. Mittaukset suoritettiin 25 °C:ssa, amplitudiliukuma oli vakio 1 % ja materiaalin päältä poistettiin soluviljelyolosuhteita simuloiva medium pois mittauksien ajaksi.



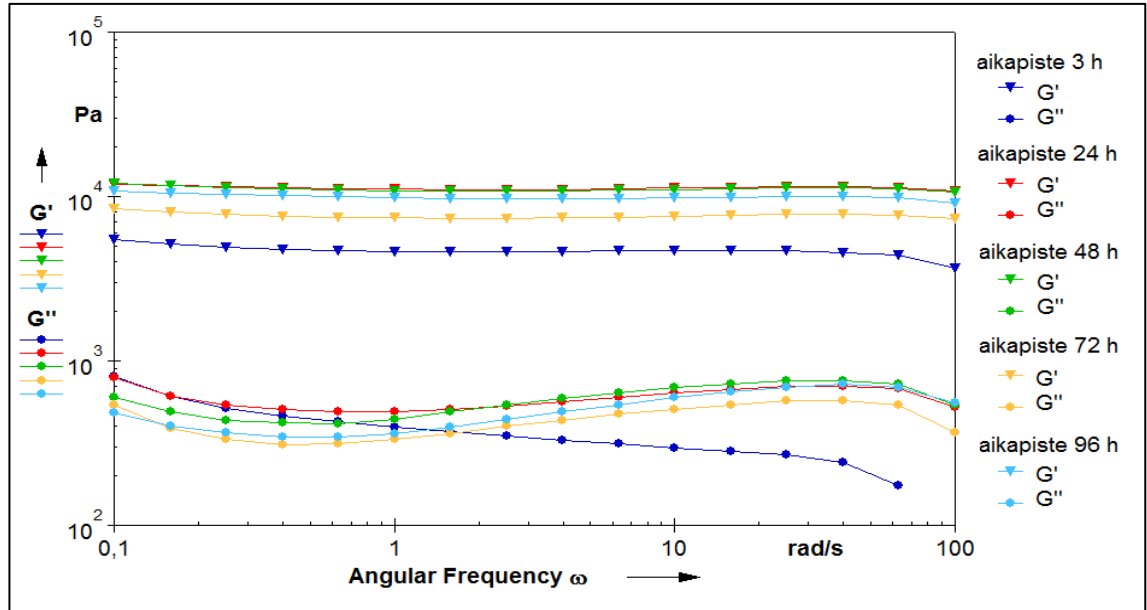
Kuvio 8. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaahdo, glukoosi 10 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).



Kuvio 9. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, glukoosi 10 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).

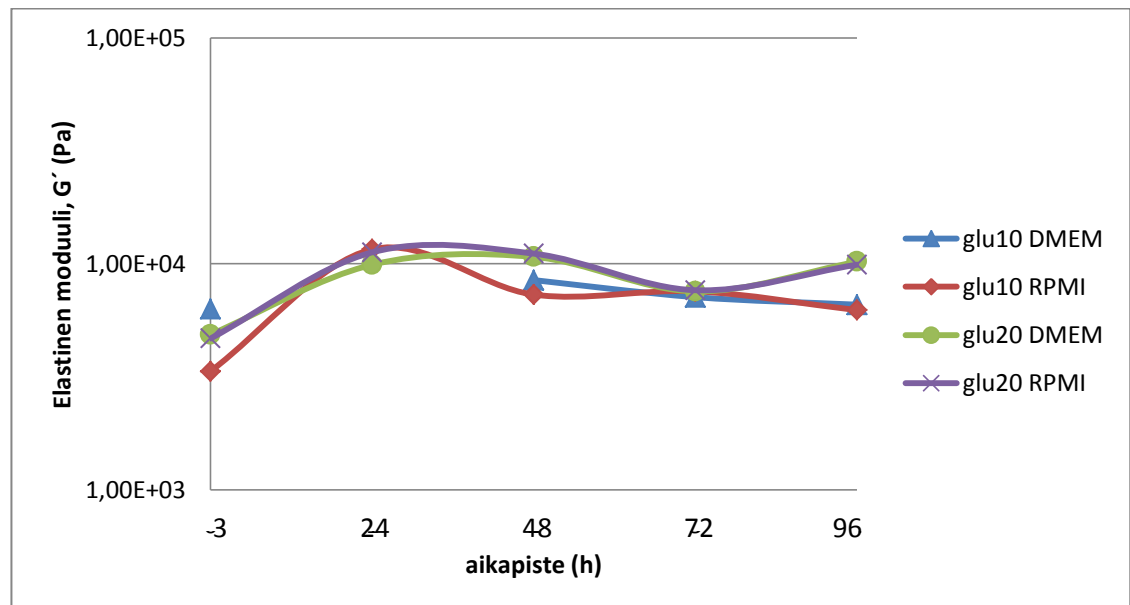


Kuvio 10. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, glukoosi 20 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).



Kuvio 11. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vaahdo, glukoosi 20 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).

Kuviossa 12 on esitetty vaahdotettujen glukoosigeelien elastinen moduuli suhteessa aikaan tunteina ja tarkat arvot elastisista moduuleista ovat taulukoituna taulukossa 4. Kuviossa ja taulukossa olevat elastisen moduulin arvot ovat keskiarvoja kyseisistä aikapisteistä. Frekvenssipyyhkäisymittauksissa amplitudiliukuman arvona käytettiin 1 % ja mittaustilana 25 °C.



Kuvio 12. Säilytyksen vaikutus glukoosivaahtojen elastiseen moduuliin.

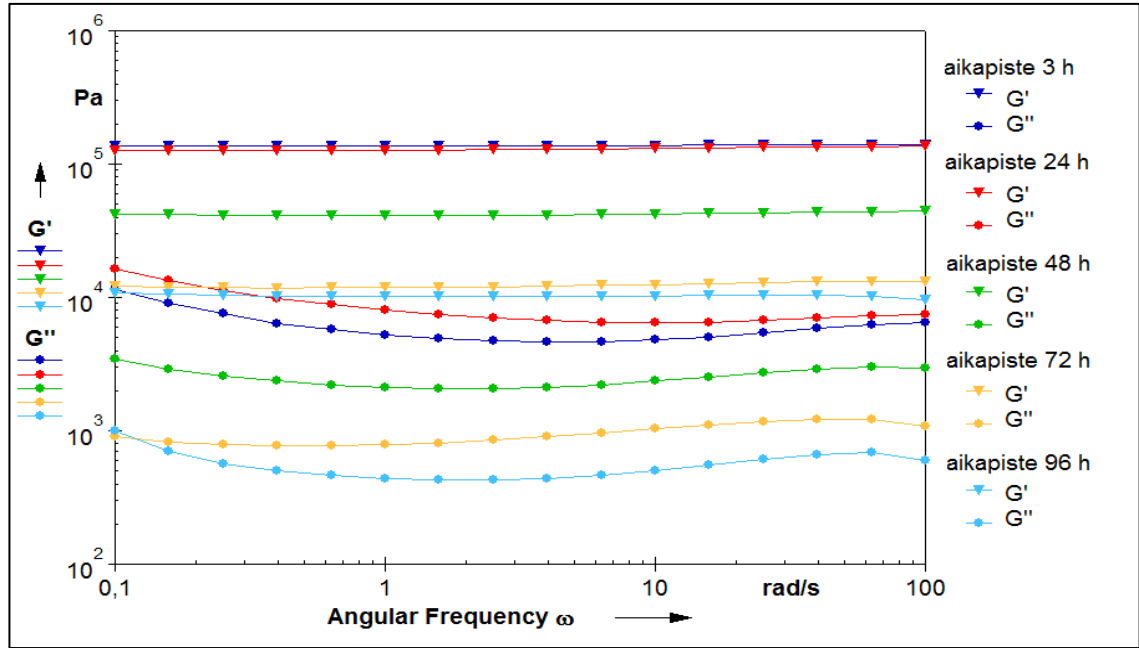
Taulukko 4. Vaahdotettujen glukoosigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.

Näyte	Aikapiste (h)					
	3	24	48	72	96	
Glukoosi 10 % DMEM	Elastinen moduuli (Pa)	6,31E+03	-	8,48E+03	7,13E+03	6,60E+03
Glukoosi 10 % RPMI		3,35E+03	1,16E+04	7,31E+03	7,56E+03	6,24E+03
Glukoosi 20 % DMEM		4,87E+03	9,91E+03	1,07E+04	7,56E+03	1,02E+04
Glukoosi 20 % RPMI		4,67E+03	1,13E+04	1,11E+04	7,65E+03	9,93E+03

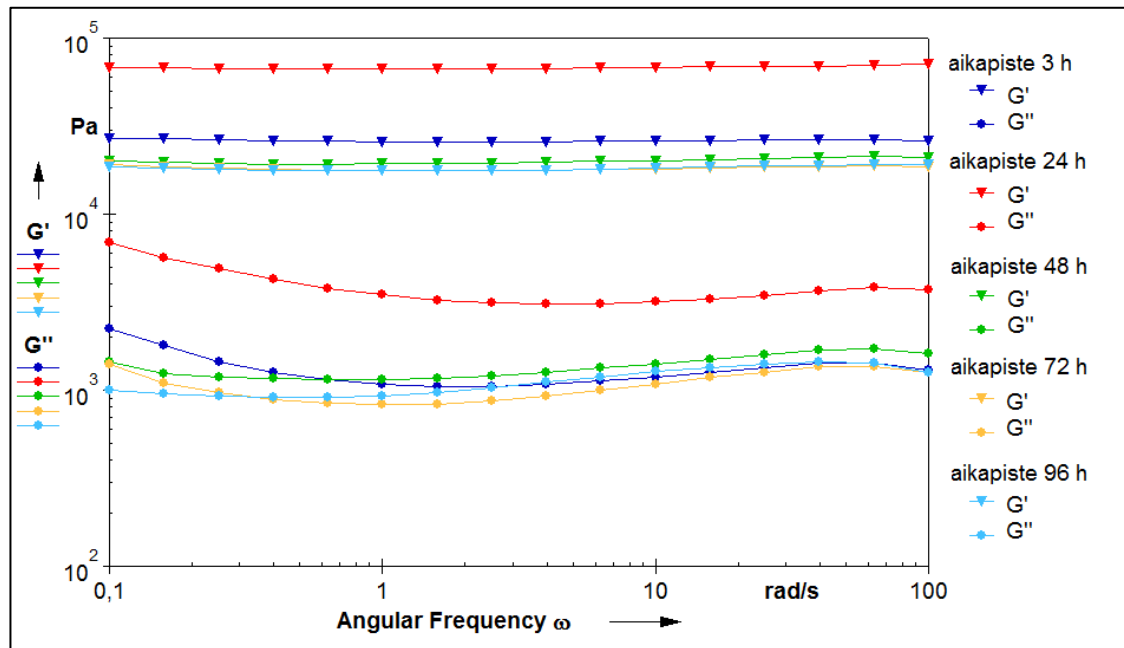
Elastinen moduuli laskee neljän päivän säilytyksen aikana, paitsi 24 tunnin ajankohdassa, jolloin se nousee. Mediumien välillä on eroja; DMEM-mediumilla valmistettujen vaahtojen elastinen moduuli on suurempi kuin RPMI-mediumilla valmistettujen. Vaahdoilla, jotka sisälsivät 20 % glukoosia, elastinen moduuli on korkeampi kuin 10 % sisältävillä vaahdoilla.

7.3.2 Vaahdotettujen dekstriinigeelien reologia

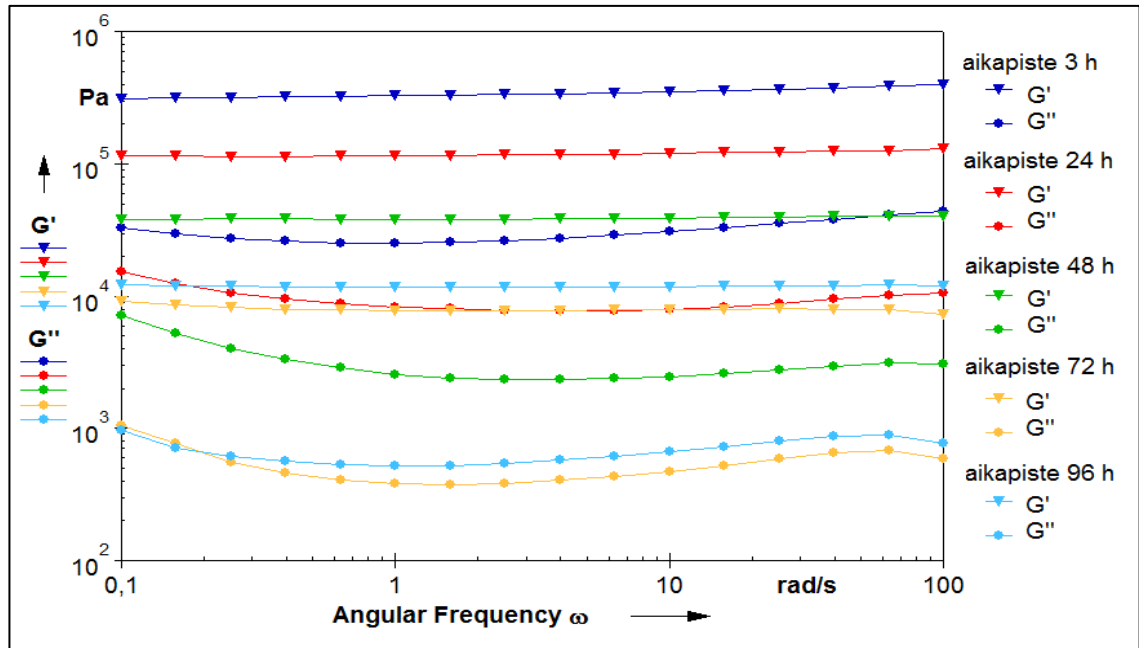
Kuvioissa 13, 14, 15 ja 16 on esitetty vaahdotettujen dekstriinigeelien frekvenssipyyhkäisytuloksia. Elastinen moduuli on esitetty kuvioissa kolmiolla ja viskoottinen moduuli pallolla. Mittaukset suoritettiin 25 °C:ssa, amplitudiliukuma oli vakio 1 % ja materiaalin päältä poistettiin soluviljelyolosuhteita simuloiva medium pois mittauksien ajaksi.



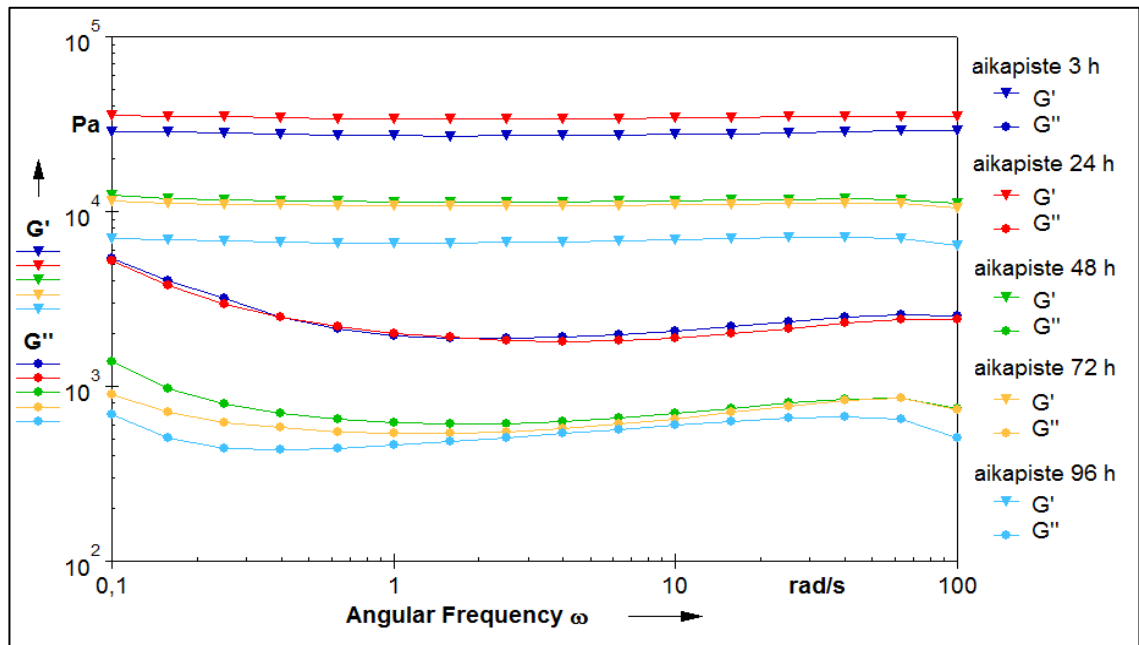
Kuvio 13. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 10 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).



Kuvio 14. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 10 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).



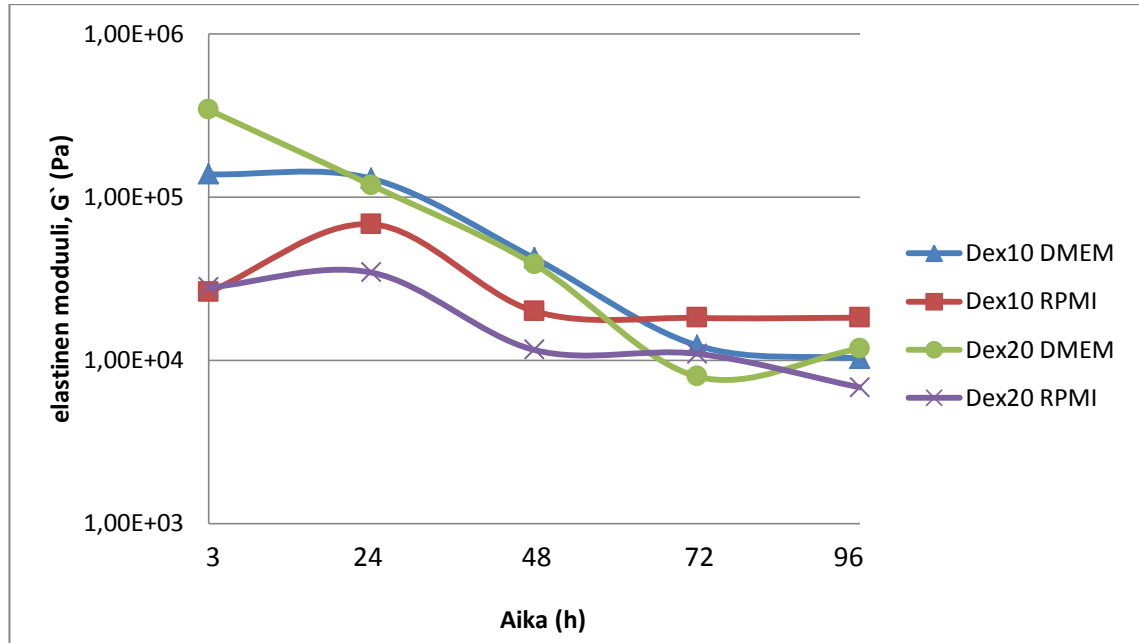
Kuvio 15. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 20 %, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).



Kuvio 16. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 20 %, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).

Kuviossa 17 on esitetty vaahdotettujen dekstriinigeelien elastinen moduuli suhteessa aikaan tunteina ja tarkat arvot elastisista moduuleista ovat

taulukoituna taulukossa 5. Kuviossa ja taulukossa olevat elastisen moduulin arvot ovat keskiarvoja kyseisistä aikapisteistä. Frekvenssipyyhkäisymittauksissa amplitudiliukuman arvona käytettiin 1 % ja mittaustilana 25 °C.



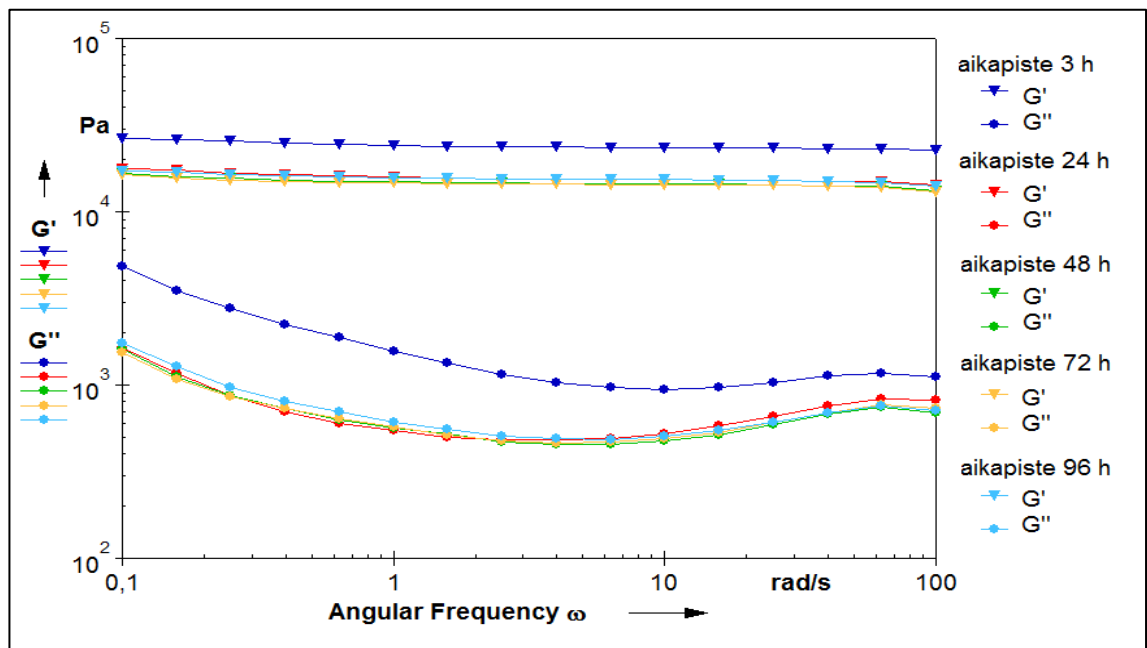
Kuvio 17. Säilytyksen vaikutus dekstriinivaahtojen elastiseen moduuliin.

Taulukko 5. Vaahdotettujen dekstriinigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.

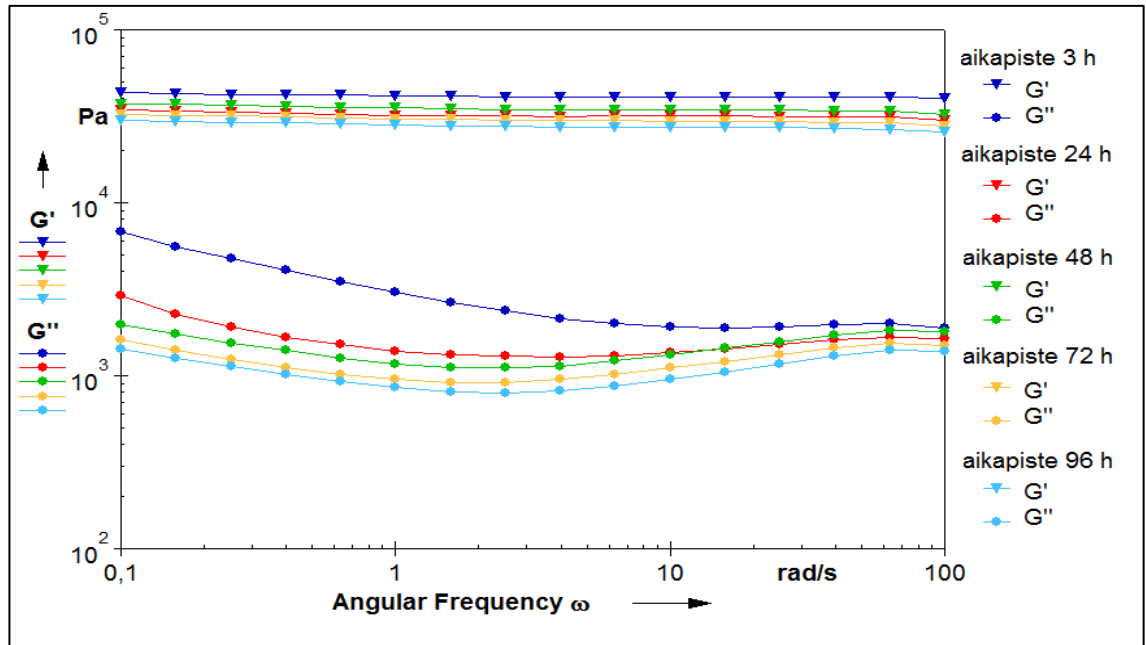
		Aikapiste (h)				
Näyte		3	24	48	72	96
Dekstriini 10 %	Elastinen moduuli (Pa)					
DMEM		1,38E+05	1,30E+05	4,22E+04	1,23E+04	1,03E+04
Dekstriini 10 %						
RPMI		2,62E+04	6,82E+04	2,00E+04	1,82E+04	1,82E+04
Dekstriini 20 %						
DMEM	3,43E+05	1,18E+05	3,87E+04	7,95E+03	1,18E+04	
Dekstriini 20 %						
RPMI	2,79E+04	3,45E+04	1,16E+04	1,10E+04	6,82E+03	

Elastinen moduuli laskee neljän päivän säilytyksen aikana, mutta ei 24 h aikana kaikissa tapauksissa. Mediuimeilla on eroa; DMEM-mediumilla valmistettujen vaahtojen elastinen moduuli on suurempi kuin RPMI-mediumilla valmistettujen. Vaahdoilla, jotka sisälsivät 20 % dekstriiniä, elastinen moduuli oli vähän suurempi kuin 10 % sisältävillä vaahdoilla ajankohdassa 3 h, muina ajankohtina 10 % vaahtojen elastinen moduuli on suurempi kuin 20 % dekstriiniä sisältävien vaahtojen.

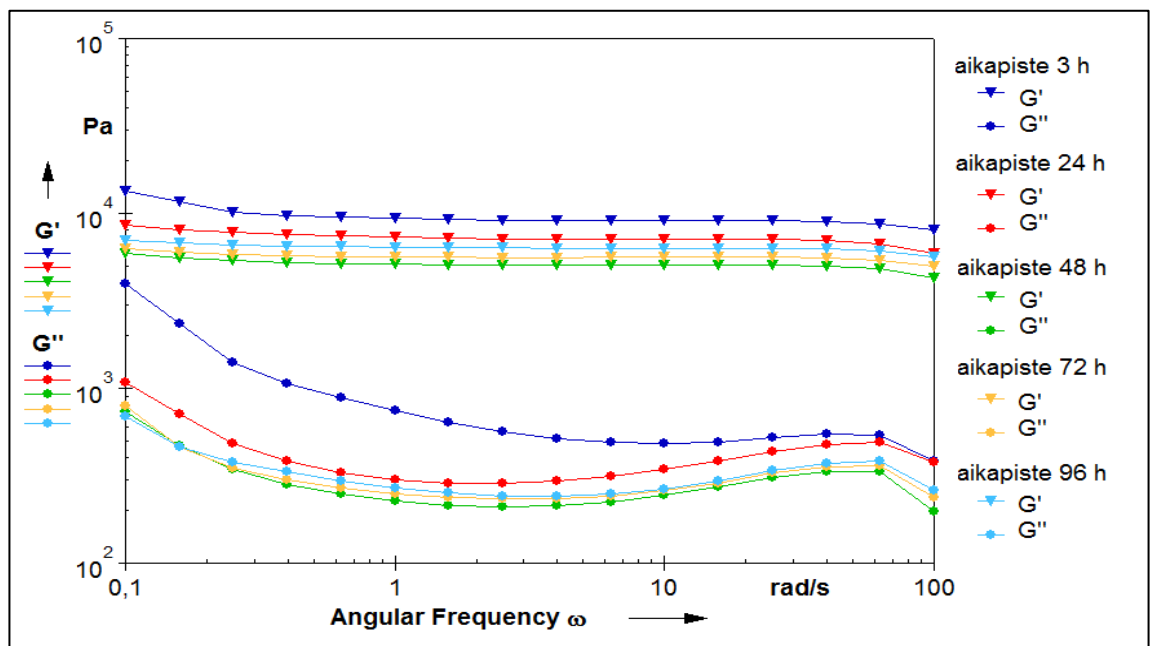
Kuvioissa 18, 19, 20 ja 21 on esitetty vaahtotettujen dekstriini-amylaasigeelien frekvenssipyyhkäisytuloksia. Elastinen moduuli on esitetty kuvioissa kolmiolla ja viskoottinen moduuli pallolla. Mittaukset suoritettiin 25 °C:ssa, amplitudiliukuma oli vakio 1 % ja materiaalin päältä poistettiin soluviljelyolosuhteita simuloiva medium pois mittauksien ajaksi.



Kuvio 18. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 10 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).



Kuvio 19. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 10 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (RPMI / FBS / NaOH)).



Kuvio 20. Säilytyksen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin. Näytteenä R70-vahto, dekstriini 20 %, amylaasi, 3:1 (sooli : (DMEM / FBS / NaOH)).

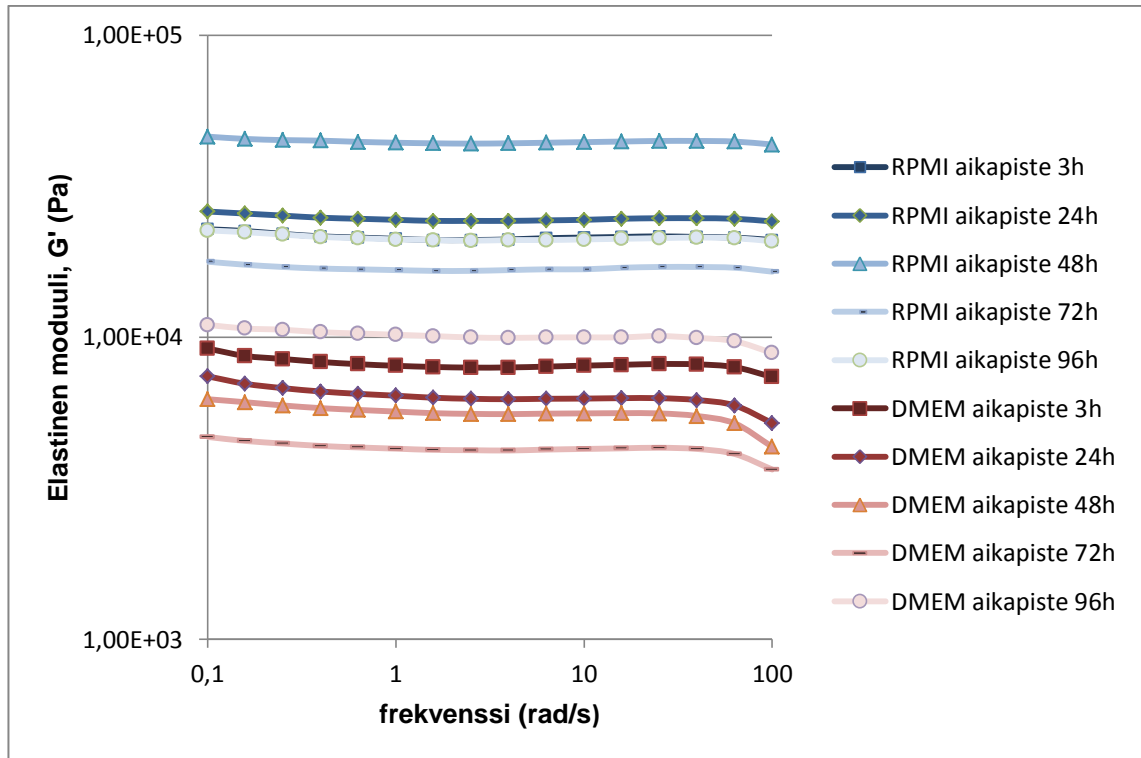
Taulukko 6. Vaahdotettujen dekstriini-amylaasigeelien elastiset moduulit suhteessa aikaan.

		Aikapiste (h)				
Näyte		3	24	48	72	96
Dekstriini 10 %	Elastinen moduuli (Pa)					
DMEM		2,41E+04	1,57E+04	1,48E+04	1,45E+04	1,56E+04
Dekstriini 10 %						
RPMI		4,14E+04	3,21E+04	3,50E+04	3,02E+04	2,78E+04
Dekstriini 20 %						
DMEM		9,60E+03	7,26E+03	5,12E+03	5,65E+03	6,38E+03
Dekstriini 20 %						
RPMI		1,16E+04	9,66E+03	9,09E+03	7,06E+03	9,01E+03

Elastinen moduuli laskee neljän päivän säilytyksen aikana. Mediuimeilla on eroa; RPMI-mediumilla valmistettujen vaahdojen elastinen moduuli on suurempi kuin DMEM-mediumilla valmistettujen. Vaahdoilla, jotka sisälsivät 20 % dekstriiniä, elastinen moduuli on pienempi kuin 10 % sisältävillä vaahdoilla.

7.3.3 Mediumin vaikutus vaahdon reologiaan

Kuviossa 23 on esitetty RPMI- ja DMEM-mediumin vaikutukset elastiseen moduuliin R70-vaahdossa. R70-vaahdo valmistettiin 3:1 sooli-mediumsuhteella. Frekvenssipyyhkäisymittauksissa amplitudiliukuman arvona käytettiin 1 % ja mittaustilana 25 °C. Taulukossa 7 on esitetty tarkat arvot elastisista moduuleista.



Kuvio 23. Mediumin vaikutus R70-vaahdon elastiseen moduuliin.

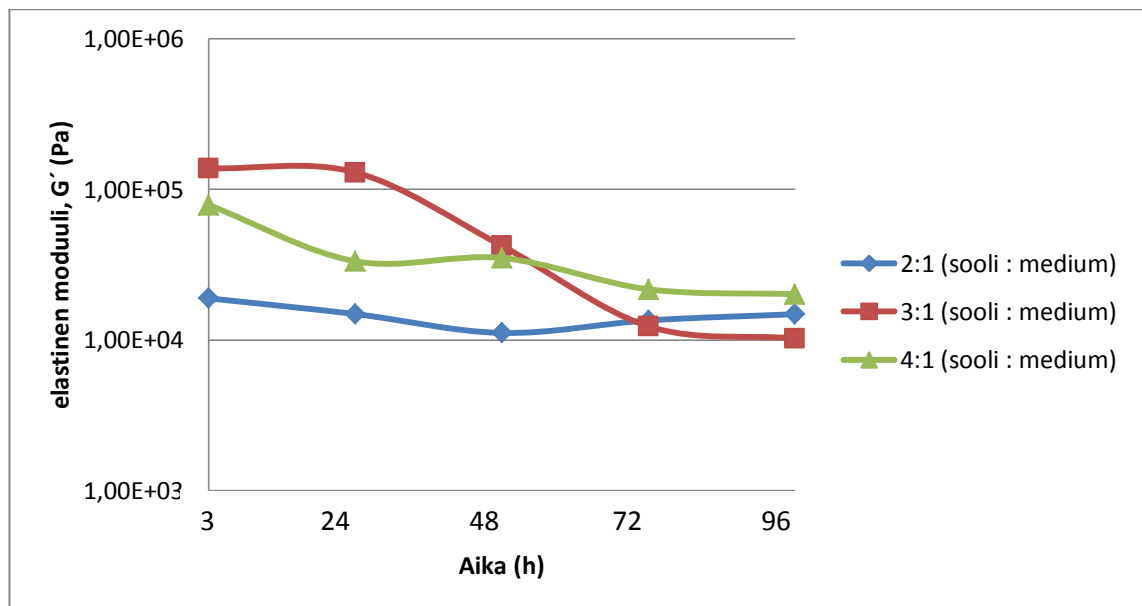
Taulukko 7. Tulokset mediumin vaikutuksesta R70-vaahdon elastiseen moduuliin.

		Aikapiste (h)				
		3	24	48	72	96
DMEM	Elastinen moduuli (Pa)	8,16E+03	6,38E+03	5,61E+03	4,28E+03	1,01E+04
RPMI		2,15E+04	2,48E+04	4,45E+04	1,69E+04	2,14E+04

3 h:n elastisen moduulin arvo on pienempi kuin 24 h:n arvo, muuten elastinen moduuli laskee neljän päivän säilytyksen aikana. RPMI-mediumilla valmistettujen vaahtojen elastinen moduuli on suurempi kuin DMEM-mediumilla valmistettujen.

7.3.4 Sooli-mediumsuhteen vaikutus vaahdon reologiaan

Kuviossa 24 on esitetty sooli-mediumsuhteen vaikutusta elastiseen moduuliin soluviljelyolosuhteissa R70-vaahdossa. R70-vaahdot valmistettiin 2:1, 3:1 ja 4:1 sooli-mediumsuhteilla. Mediumina käytetty DMEM-mediumia. Frekvenssipyöhykäsämittauksissa amplitudiliukuman arvona käytettiin 1 % ja mittauslämpötilana 25 °C. Taulukossa 9 on esitetty tarkat arvot elastisista moduuleista. Kuviossa ja taulukossa olevat elastisen moduulin arvot ovat keskiarvoja kyseisistä aikapisteistä.



Kuvio 24. Sooli-mediumsuhteen vaikutus elastiseen moduuliin soluviljelyolosuhteissa.

Taulukko 8. Tulokset sooli-mediumsuhteen vaikutuksesta R70-vaahdon elastiseen moduuliin.

		Aikapiste (h)				
Sooli-mediumsuhde	Elastinen moduuli (Pa)	3	24	48	72	96
2:1			1,89E+04	1,49E+04	1,11E+04	1,35E+04
3:1		1,38E+05	1,30E+05	4,22E+04	1,23E+04	1,03E+04
4:1		7,88E+04	3,33E+04	3,50E+04	2,17E+04	2,01E+04

Elastinen moduuli laskee neljän päivän säilytyksen aikana. Tuloksista todetaan, että ensimmäisten mittausten ajankohdassa sooli-mediumsuhteilla on eroa, mutta ero tasantuu neljän vuorokauden jälkeen.

7.4 Glukoosin ja dekstriinin määritykset spektrofotometrisesti

Tulokset laskettiin käyttäen standardisuoria. Mittaustuloksista piirrettiin standardisuora, jonka yhtälön avulla laskettiin porogeenien vapautunut massa. Laskukaava on esitetty yhtälössä 14.

$$y = kx + b \rightarrow = \frac{y-b}{k}, \text{ jossa} \quad (14)$$

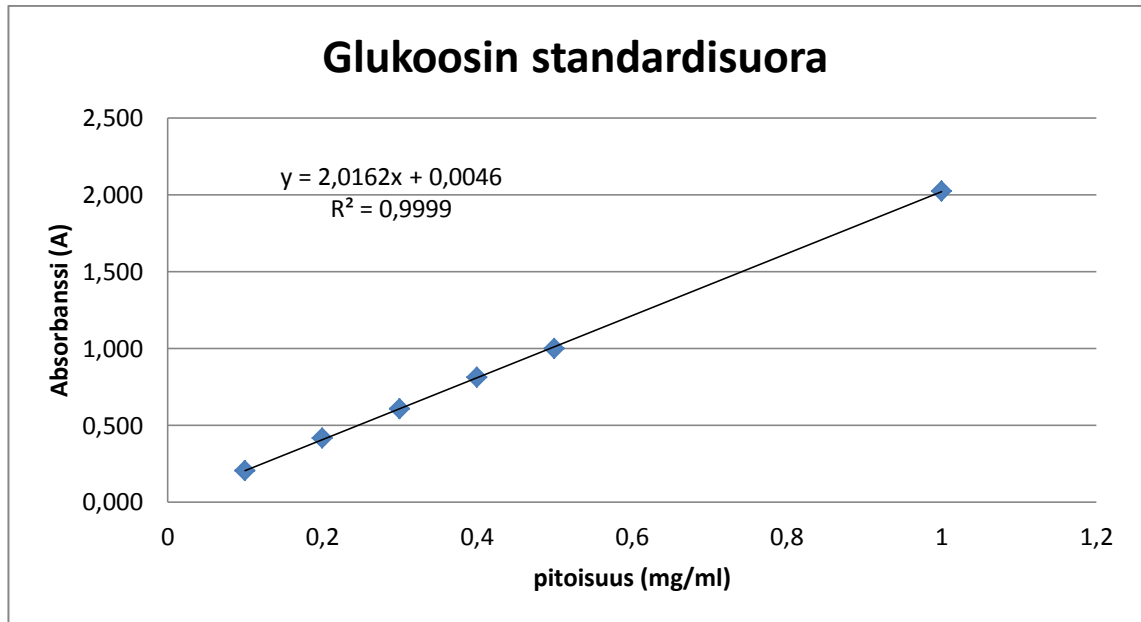
y	y-akselin arvo
k	suoran kulmakerroin
x	x-akselin arvo
b	standardisuoran ja y-akselin leikkauspiste

7.4.1 Glukoosin määrittäminen spektrofotometrisesti

Taulukossa 10 on esitetty glukoosin standardisuoran standardiliuosten tulokset ja kuvio 25 esittää näiden tulosten pohjalta saatua standardisuoraa

Taulukko 9. Tulokset glukoosin standardiliuoksille.

Pitoisuus (mg / ml)	Absorbanssi (A)
0,1	0,204
0,2	0,417
0,3	0,608
0,4	0,813
0,5	1,001
1	2,025

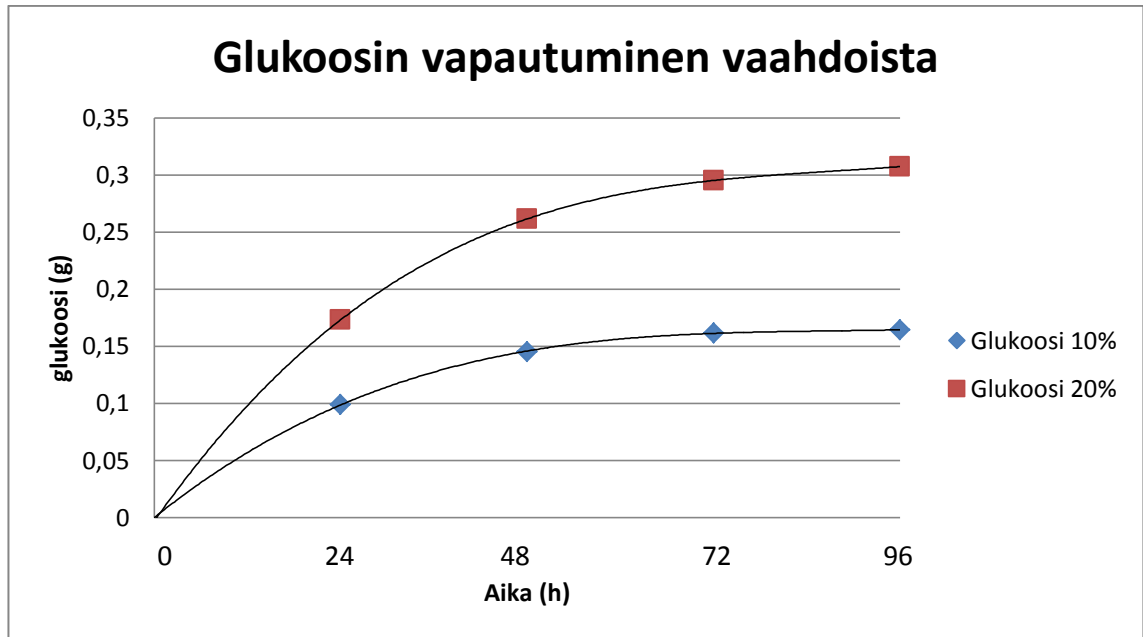


Kuvio 25. Glukoosin standardisuora.

Taulukossa 10 on esitetty tulokset glukoosin määrittämisestä vaahdoista ja kuvio 26 esittää vapautuneen glukoosin määrää vaahdoista neljän päivän aikana.

Taulukko 10. Tulokset glukoosin vapautumisesta vaahdoista.

R70				
	Absorbanssi	Näytteen	m / näyte	m _{kumulatiivinen}
Glukoosi 10 %	(A)	laimennus	(mg)	(g)
aikapiste 24 h	1,252	1/40	98,990	0,099
aikapiste 48 h	1,17	1/20	46,241	0,145
aikapiste 72 h	1,664	1/5	16,461	0,162
aikapiste 96 h	0,268	1/5	2,613	0,164
Glukoosi 20 %				
aikapiste 24 h	2,187	1/40	173,189	0,173
aikapiste 48 h	1,49	1/30	88,408	0,262
aikapiste 72 h	1,701	1/10	33,655	0,295
aikapiste 96 h	0,617	1/10	12,150	0,307



Kuvio 26. Glukoosin vapautuminen vaahdoista.

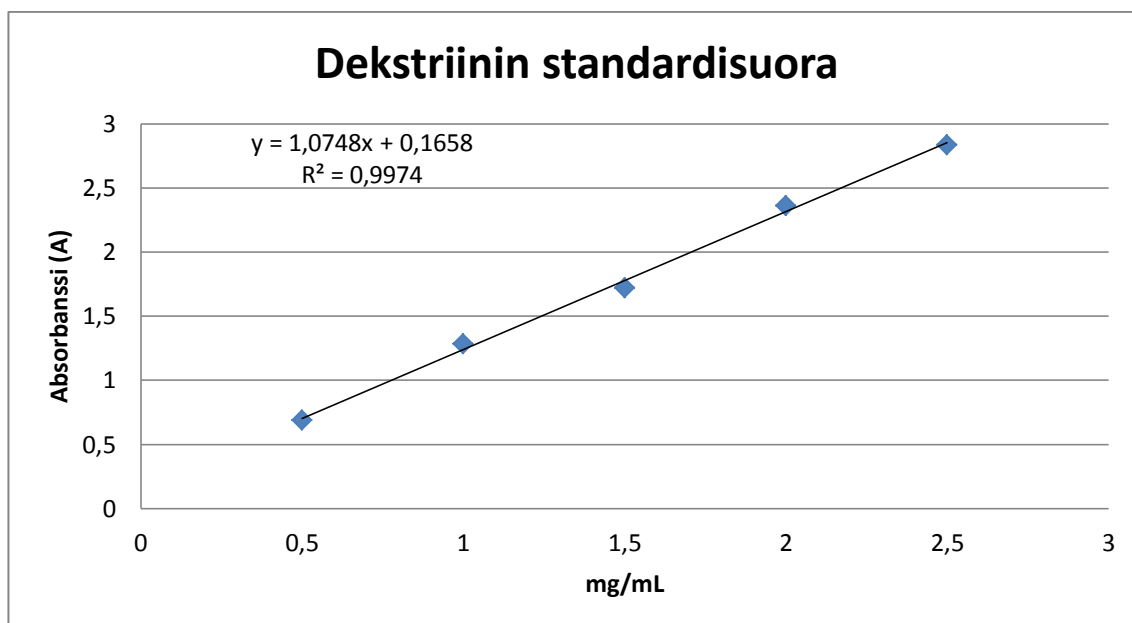
20 % glukoosia sisältävässä vaahdossa oli 0,398 g glukoosia / 2 ml soolia ja 10 % glukoosia sisältävässä vaahdossa oli 0,199 g glukoosia / 2 ml soolia. Vaahdoista, jotka sisälsivät 20 % glukoosia, liukeni 77 % glukoosia ja vaahdoista, jotka sisälsivät 10 % glukoosia, liukeni 82 % glukoosia.

7.4.2 Dekstriinin määrittäminen spektrofotometrisesti

Taulukossa 11 on esitetty dekstriinin standardisuoran standardiliuosten tulokset ja kuvio 27 esittää näiden tulosten pohjalta saatua standardisuoraa.

Taulukko 11. Tulokset dekstriinin standardiliuoksille.

Pitoisuus (mg / ml)	Absorbanssi (A)
0,5	0,688
1	1,283
1,5	1,722
2	2,361
2,5	2,836

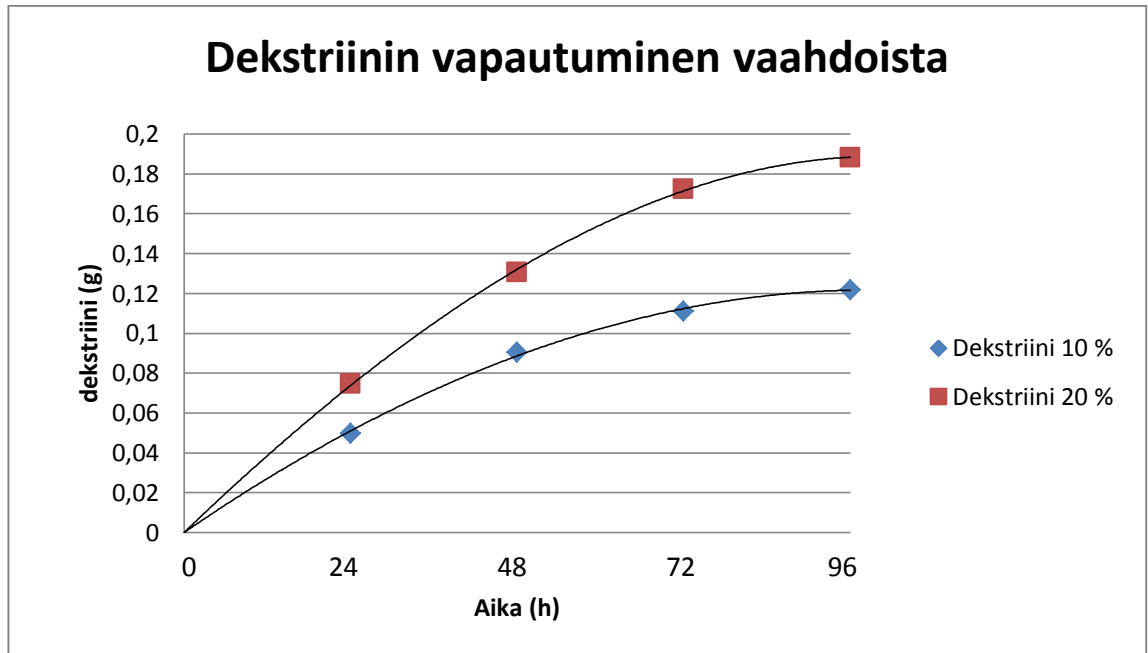


Kuvio 27. Dekstriinin standardisuora.

Taulukossa 12 on esitetty tulokset dekstriinin määrittämisestä vaahdoista ja kuvio 28 esittää dekstriinin vapautumismäärää vaahdoista neljän päivän aikana.

Taulukko 12. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista.

R70				
	Absorbanssi	Näytteen	m / näyte	m _{kumulatiivinen}
Dekstriini 10 %	(A)	laimennus	(mg)	(g)
aikapiste 24 h	2,843	1/5	49,818	0,050
aikapiste 48 h	2,351	1/5	40,662	0,090
aikapiste 72 h	1,279	1/5	20,715	0,111
aikapiste 96 h	0,742	1/5	10,722	0,122
Dekstriini 20 %				
aikapiste 24 h	2,173	1/10	74,700	0,075
aikapiste 48 h	1,671	1/10	56,018	0,131
aikapiste 72 h	2,404	1/5	41,649	0,172
aikapiste 96 h	1,013	1/5	15,766	0,188



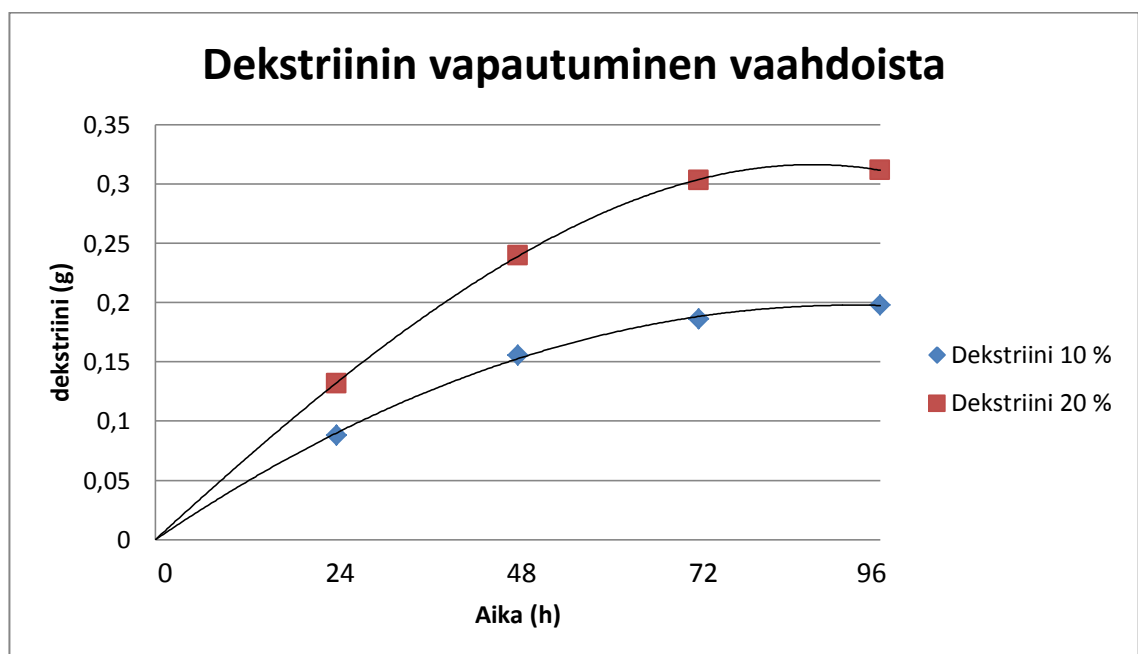
Kuvio 28. Dekstriinin vapautuminen vaahdoista.

20 % dekstriiniä sisältävässä vaahdossa oli 0,4 g dekstriiniä / 2 ml soolia ja 10 % dekstriiniä sisältävässä vaahdossa oli 0,2 g dekstriiniä / 2 ml soolia. Vaahdoista, jotka sisälsivät 20 % dekstriiniä, liukeni 47 % dekstriiniä ja vaahdoista, jotka sisälsivät 10 % dekstriiniä, liukeni 61 % dekstriiniä.

Taulukossa 13 on esitetty tulokset dekstriinin määrittämisestä vaahdoista, jotka sisälsivät dekstriiniä ja α -amylaasia. Kuvio 29 esittää dekstriinin vapautumismäärää vaahdoista neljän päivän aikana.

Taulukko 13. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista, jotka sisälsivät dekstriiniä ja amylaasia.

R70				
	Absorbanssi	Näytteen	m / näyte	m _{kumulatiivinen}
Dekstriini 10 %	(A)	laimennus	(mg)	(g)
aikapiste 24 h	2,532	1/10	88,061	0,088
aikapiste 48 h	1,98	1/10	67,518	0,156
aikapiste 72 h	1,82	1/5	30,782	0,186
aikapiste 96 h	0,793	1/5	11,671	0,198
Dekstriini 20 %				
aikapiste 24 h	1,937	1/20	131,835	0,132
aikapiste 48 h	1,617	1/20	108,016	0,240
aikapiste 72 h	1,018	1/20	63,431	0,303
aikapiste 96 h	0,617	1/10	8,396	0,312



Kuvio 29. Dekstriinin vapautuminen vaahdoista, jotka sisälsivät dekstriiniä ja amylaasia.

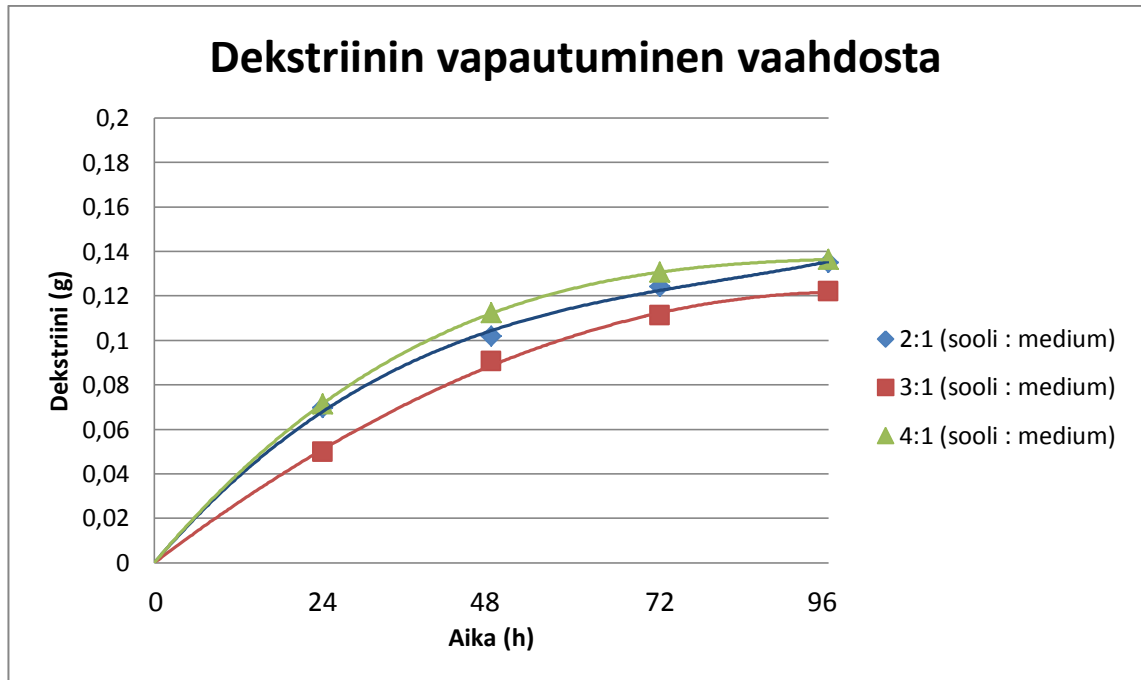
20 % dekstriiniä sisältävässä vaahdossa oli 0,4 g dekstriiniä ja 6,9 yksikköä amylaasia / 2 ml soolia ja 10 % dekstriiniä sisältävässä vaahdossa oli 0,2 g dekstriiniä ja 13,3 yksikköä amylaasia / 2 ml soolia. Vaahdoista, jotka sisälsivät 10 % dekstriiniä, liukeni 99 % dekstriiniä ja vaahdoista, jotka sisälsivät 20 % dekstriiniä, liukeni 78 % dekstriiniä.

7.4.3 Sooli-mediumsuhteen vaikutus dekstriinin vapautumiseen

Taulukossa 14 on esitetty tulokset dekstriinin määrittämisestä vaahdoista, jotka oli valmistettu 2:1, 3:1 ja 4:1 sooli-mediumsuhteilla. Mediumina käytettiin DMEM-mediumia. Kaikki vaahdot oli valmistettu R70-dekstriinisoolista, jotka sisälsivät 10 % dekstriiniä. Kuvio 30 esittää dekstriinin vapautumismäärää vaahdoista neljän päivän aikana.

Taulukko 14. Tulokset dekstriinin vapautumisesta vaahdoista, jotka muodostettiin sooli-mediumsuhteilla 2:1, 3:1 ja 4:1.

R70				
	Absorbanssi	Näytteen	m / näyte	
2:1	(A)	laimennus	(mg)	m _{kumulatiivinen} (g)
aikapiste 24 h	2,041	1/10	69,775	0,070
aikapiste 48 h	1,026	1/10	32,026	0,102
aikapiste 72 h	1,370	1/5	22,408	0,124
aikapiste 96 h	0,744	1/5	10,765	0,135
3:1				
aikapiste 24 h	2,843	1/5	49,818	0,049
aikapiste 48 h	2,351	1/5	40,662	0,090
aikapiste 72 h	1,279	1/5	20,715	0,111
aikapiste 96 h	0,742	1/5	10,772	0,122
4:1				
aikapiste 24 h	2,087	1/10	71,500	0,071
aikapiste 48 h	1,264	1/10	40,883	0,112
aikapiste 72 h	1,143	1/5	18,184	0,131
aikapiste 96 h	0,482	1/5	5,878	0,136



Kuvio 30. Sooli-mediumsuhteen vaikutus dekstriinin vapautumiseen.

Suhteella 2:1 valmistetusta vaahdosta vapautuu 67,5 % dekstriiniä, 3:1 suhteella 61 % ja 4:1 suhteella vapautuu 68 % dekstriiniä.

7.5 Dekstriinin pilkkominen glukoosimolekyyleiksi

Tulokset laskettiin ajoista, jotka otettiin ylös, kun kapillaariviskosimetrin kapillaarin merkkien välistä valui liuoksia. Laskukaava on esitetty yhtälössä 15.

$$v = K \cdot t_{KA} \quad , \text{ jossa} \quad (15)$$

v kinemaattinen viskositeetti, mm^2 / s

K kapillaariviskosimetrin vakio, 0,00971

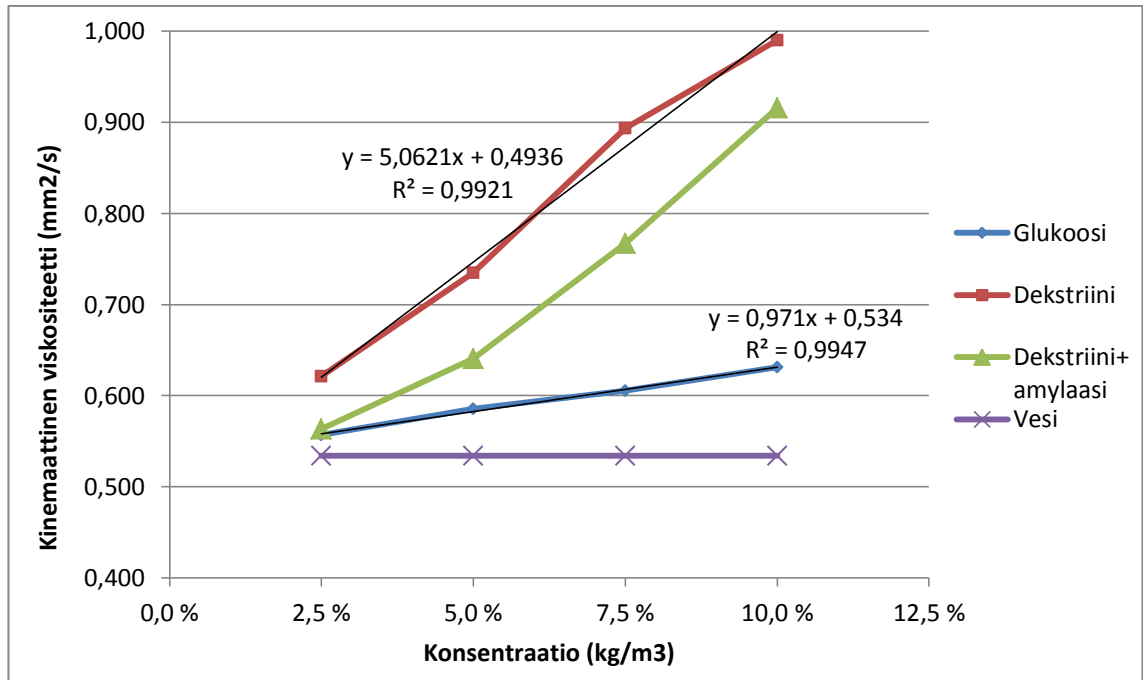
t_{KA} valumisaika (keskiarvo), s

Taulukossa 16 on esitetty valumisaikoja, joiden perusteella laskettiin kinemaattinen viskositeetti. Kinemaattinen viskositeetti on esitetty suhteessa konsentraatioon ja tämä on esitetty kuviossa 31. Dekstriiniliuokseen lisättiin

tarvittava määrä α -amylaasia, joka pilkkoi dekstriiniä glukoosimoleekyyleiksi. Pilkkomislämpötila oli 70 °C ja pilkkomisprosessin kesto oli noin 60 minuuttia. Kinemaattisen viskositeetin mittaukset suoritettiin 60 °C:ssa.

Taulukko 15. Tulokset liuoksien valumisajoista Übbelohde-kapillaariviskosimetrissa ja niiden kinemaattiset viskositeetit.

Liuoksien valumisajat ja niiden kinemaattiset viskositeetit					
Valumisaika viskosimetrissä (s)					
konsentraatio (kg/m ³)	t ₁	t ₂	t ₃	t _{KA}	ν (mm ² /s)
Glukoosi					
2,5	57	57	57	57	0,557
5	60	61	60	60	0,586
7,5	63	62	62	62	0,605
10	65	65	65	65	0,631
Dekstriini					
2,5	64	64	64	64	0,621
5	76	75	76	76	0,735
7,5	91	93	92	92	0,893
10	102	102	102	102	0,990
Dekstriini + amylaasi					
2,5	58	58	58	58	0,563
5	66	66	66	66	0,641
7,5	79	79	79	79	0,767
10	94	95	94	94	0,916
Vesi					
	55	55	55	55	0,534



Kuvio 31. Liuoksien kinemaattinen viskositeetti suhteessa polymeeriliuosten konsentraatioon.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä huokoisuutta silikapohjaisiin hydrogeeleihin. Huokoisuutta lisättiin kahdella menetelmällä; vaahdottamisella ja partikkeleiden liuottamisella materiaalista. Vaahdottaminen onnistui, kun sooliin lisättiin pinta-aktiivisia aineita, joita oli naudan sikiön seerumissa ja yhdessä tapauksessa käytettiin myös amylaasia. Pinta-aktiiviset aineet laskevat pintajännitystä, jolloin ilma pääsee materiaaliin helpommin ja vaahdottaminen on tehokkaampaa. Kaikkiin sooleihin oli lisätty FBS mediumin mukana ja joihinkin dekstriinisooleihin vielä α -amylaasia, joka on entsyymi. Vaahdot, jotka sisälsivät amylaasia, vaahtosivat enemmän kuin soolit, joihin ei lisätty sitä. Ilman pinta-aktiivisia aineita soolin vaahtoaminen ei onnistunut. Vaahdoissa, jotka oli valmistettu DMEM-mediumilla, huokoiset näyttivät visuaalisesti tasaisemmilta kuin RPMI-mediumilla valmistetuissa ja tämän voi huomata kuvasta 21. Syy tähän on todennäköisesti RPMI- ja DMEM-mediumin erilainen koostumus. DMEM-mediumin aminohappo- ja glukoosikoostumus on erilainen kuin RPMI-mediumilla. Mediumit vaikuttavat eri tavalla soolin pintajännitykseen ja tämän takia vaahdosta tulee erilainen. Vaahdoissa, joihin oli lisätty amylaasia, huokokset näyttivät visuaalisesti kaikista vaahtonäytteistä tasaisimmilta. Vaahdottamisen jälkeen syntynyt materiaali oli geelin ja vaahton yhdistelmä.

Geelin tilavuuden muutosta vaahtoamisen aikana tutkittiin visuaalisesti. Kuoppalevyn kuopan tilavuus on 15,5 ml ja kuopalle lisättiin 2 ml soolia, joka vaahdotettiin ja geelytettiin mediumilla ja mediumia lisättiin suhteessa 1:3 (medium : sooli) eli 0,665 ml. Kun vaahto oli muodostunut, vaahton päälle lisättiin kaksinkertainen määrä mediumia soolin nähden, eli 4 ml simuloimaan soluviljelyolosuhteita. Kun medium oli lisätty, kuoppa oli melko täynnä, eli tästä voidaan laskea, että geelin tilavuus nousi vaahtotuksen aikana 3 – 4 kertaisesti.

Sooliin lisätty porogeeni liuotettiin muodostuneesta vaahdosta, kun tutkittiin vaahton säilyvyyttä soluviljelyolosuhteissa. Porogeeniä liukeni vaahdotetusta geelistä 47 - 99 %. Tämä tarkoittaa sitä, että vaahdotettuun materiaaliin syntyy

1,2 – 4,95 % lisää tilaa, jos materiaalin tilavuus kasvoi kolminkertaisesti vaahdotuksen aikana (aineiden tiheyttä ei otettu laskuissa huomioon). Joissakin materiaaleissa porogeeniä joko jäi vielä vaahtoon tai sokerien määritysmenetelmä ei ollut luotettava. Jos porogeeniä jäi vaahtoon, niin se voi olla myös etu soluille, sillä ne käyttävät sitä ravintona, ainakin glukoosin tapauksessa.

Vaahdotettujen geelien mekaanisia ominaisuuksia tutkittiin reometrilla. Elastisen moduulin stabiilisuutta seurattiin viiden päivän aikana soluviljelyolosuhteissa. Elastinen moduuli laski pääsääntöisesti päivittäin. Tämän voi perustella sillä, että materiaaliin muodostuu huokoisuutta, kun porogeeni liukenee materiaalista ja huokokset täyttyvät mediumilla. Vaahdotuksessa muodostuneet ilmakuplat korvautuvat mediumilla. Kun ilmakuplien kaasua korvautuu nesteellä, materiaalista tulee pehmeämpi ja elastinen moduuli laskee, koska neste pienentää kiintoaineen massaosuutta materiaalissa. Materiaalin rakenne pysyy stabiilina vähintään viiden vuorokauden ajan. Pidemmällä seuranta-ajalla rakenne saattaa hajota, koska silikaa liukenee soluviljelymediumiin.

Joillakin materiaaleilla, mm. vaahdotetuilla glukoosigeeleillä, ensimmäisen päivän elastinen moduuli on alhaisempi kuin seuraavien päivien elastinen moduuli. Syy tähän on todennäköisesti se, että vaahto-geeliyhdistelmän rakenne kehittyi vielä ensimmäisen päivän aikana, eikä 3 – 4 tunnin odotusaika riittänyt rakenteen stabiloitumiseen. Visuaalisesti vaahdotettu geeli näytti muodostuneen ja se ei valunut astiasta reunoja pitkin, mutta voi olla, että materiaalin sisällä rakenne oli vielä soolimainen.

Vaahdotettujen geelien elastista moduulia voidaan verrata kudosten elastisiin ominaisuuksiin, joita on esitetty taulukossa 1. Materiaalin huokoisuus on suurimmillaan aikapisteessä 96 h ja tämän aikapisteen elastiset moduulit vaihtelevat 6,2 kPa:sta 27,8 kPa:iin. Elastisen moduulin perusteella materiaaleja voidaan käyttää esimerkiksi lihassolujen solukapseloinnissa.

Myös soluviljelymediumeilla on vaikutusta materiaalien elastiseen moduuliin. Vaahdoissa, joissa ei ollut lisättyä porogeeniä, RPMI-mediumilla valmistettujen

vaahtojen elastinen moduuli on suurempi kuin DMEM-mediumilla valmistettujen. DMEM-mediumilla valmistetuissa glukoosi- ja dekstriinivaahdoissa elastinen moduuli oli suurempi kuin RPMI-mediumilla valmistetuissa. Syy tähän on ainakin mediumien sisältö, joka on erilainen. DMEM-mediumissa mm. glukoosipitoisuus on korkeampi kuin RPMI-mediumilla ja aminohappokoostumus on erilainen. Sokeripitoisuus vaikuttaa reologisiin ominaisuuksiin, koska se vaikuttaa kiintoaineen osuuteen materiaalissa. Myös mittausepävarmuus vaikuttaa tuloksiin. Kaikki materiaalit valmistettiin ja mitattiin täsmälleen samalla menetelmällä, mutta ne valmistettiin erikseen, yksi materiaali kerrallaan. Materiaalin rakenne voi olla joissakin näytteissä erilainen kun toisessa, joka saattaa vaikuttaa tuloksiin.

Sooli-mediumsuhteen vaikutusta reologisiin ominaisuuksiin ja porogeenin vapautumiseen tutkittiin myös. Sooli-mediumsuhteita olivat 2:1, 3:1 ja 4:1. Sooli-mediumsuhde vaikuttaa geeliin rakenteeseen, partikkeleiden verkostoitumiseen ja materiaalin kuiva-ainepitoisuuteen. Mitä vähemmän mediumia, sitä suurempi on geelin kuiva-ainepitoisuus. Mitä suurempi kuiva-ainepitoisuus, sitä suurempi elastinen moduuli on. Reologisten mittauksien mukaan 3:1-suhteella geelytettyllä vaahdolla oli 10-kertaisesti suurempi elastinen moduuli kuin 2:1-suhteella geelytettyllä vaahdolla 3 h:n aikapisteessä. Tämä saattaa johtua siitä, että jotkut vaahdotetut geelit eivät olleet ehtineet stabiloitua odotusajassa, ennen 3 h:n aikapisteen mittausta. 96 h:n aikapisteessä elastiset moduulit eivät eroa toisistaan, joten tutkituilla sooli-mediumsuhteilla ei ole vaikutusta reologisiin ominaisuuksiin. Tuloksien mukaan sillä ei ollut myöskään vaikutusta porogeenin vapautumiseen.

Dekstriinin pilkkoutumista pienimmiksi molekyyleiksi tutkittiin käyttämällä amylaasia. Tuloksien perusteella dekstriinin pilkkominen pienemmiksi molekyyleiksi ei ole onnistunut hyvin ja menetelmää on vielä kehitettävää. Kuviosta 31 näkee, että pilkotun dekstriinin suoralla ja glukoosin suoralla on sama lähtötaso, mutta suorien kulmakerroin on erilainen. Suorien kulmakerroin kertoo sen, että suurimolekyylinen liuos on vahvemmin riippuvainen konsentraatiosta, eli amylaasilla pilkottu dekstriiniliuos ei pilkkoutunut täysin

glukoosimolekyyleiksi. Amylaasilla käsitellyn dekstriinin viskositeettitasot laskivat hieman verrattuna dekstriiniin. Tämä auttaa spektrofotometrisessä menetelmässä, koska pienmolekyylisten sokereiden toteamisraja on alhaisempi.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Silikapohjaisen, sooli-geelimenetelmällä valmistetun biomateriaalin huokoisuutta voidaan lisätä vaahdottamalla ja käyttämällä vesiliukoisia porogeenejä. Vaahdotusmenetelmällä silikapohjaisen biomateriaalin tilavuutta saatiin lisättyä noin kolminkertaiseksi ja porogeenin liutusmenetelmällä tilavuutta lisättiin vaahdotettuun materiaaliin 1,2 – 4,95 % riippuen porogeenistä ja sen pitoisuudesta materiaalissa, 96 tunnin aikana soluviljelyolosuhteissa.

Opinnäytetyössä kehitetyt silikapohjaiset biomateriaalit olivat stabiileja elastisen moduulin osalta vähintään viiden vuorokauden ajan soluviljelyolosuhteissa. Silikapohjaisten biomateriaalien elastisten moduulien perusteella materiaaleja voidaan käyttää esimerkiksi lihassolujen solukapseloinnissa.

LÄHTEET

Anton Paar, 2011. *MCR The Modular Compact Rheometer Series esite*.

Barnes, H. A., Hutton, J. F. & Walters, K., 1989. *An Introduction to Rheology*.

Brinker, J. & Scherer, G., 1990. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*.

Brown, M. E., 2007. *Approaches to molecular imprinting on polysiloxane scaffolds*. University of Kentucky Master's Theses.

Budavari, S., 1996. *The Merck Index twelfth edition*. Merck & CO., Inc, Whitehouse Station.

Chhabra, R. P., 2010. *Non-Newtonian fluids: An introduction*.

Fennema, R. O., 1985. *Food chemistry, second edition*. Marcel Dekker, Inc, New York.

Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., 1998, *Organic chemistry 6th edition*. Brooks/Cole Publishing company, Pacific Grove.

Hawkins, M. A., 2012. *Biodegradable hydrogels and nanocomposite polymers: synthesis and characterization for biomedical applications*. University of Kentucky Master's Theses.

Ilijin, V. V., 2005. *Engineer's rheology*.

Joensuu, K., 2006. *Mesenkymäläisten kantasolujen induktio luuta muodostaviksi osteoblasteiksi biomateriaalilla*. Tampereen yliopisto, Lääketieteellisen teknologian instituutti.

Jokinen, M. (2013). *Prosessiteknikka 2*. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.

Jokinen, M., Györfy, E. & Rosenholm, J., 1998. *Viscoelastic characterization of three different sol-gel derived silica gels. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 141(2)*.

Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A.-P. & Koskinen, M., 2010. *Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof*. s.l. Patenttinro US 20100119500 A1.

Jones, J. & Hench, L., 2005. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*.

Menard, K., 1999. *Dynamic mechanical analysis: a practical introduction*.

Mezger, T. G., 2011. *The Rheology Handbook*. 3rd toim. Hannover: Vincentz Network.

Nelson, D. & Cox, M., 2000. *Lehninger principles of biochemistry, third edition*. Worth Publishers, New York.

Nieto, A., Areva, S., Wilson, T., Viitala, R., & Vallet-Regi, M., 2009. Cell viability in wet silica gel. *Acta Biomaterialia*, 5(9).

Tretjakov, U. D., 2008. *Alphabet of Nanotechnology*.

Valvira, 2014. *Biomateriaalit*. Noudettu osoitteesta Sosiaali- ja terveystieteiden tutkimuskeskus ja valvontavirasto:

http://www.valvira.fi/luvat/terveydenhuollon_laitteet_ja_tarvikkeet/biomateriaalit

Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinauldo, M. & Schue, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2).

Zumdahl, S. S., 1997. *Chemistry, fourth edition*. Houghton Mifflin Company, Boston.