

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

2022

Sini-Maarit Lempinen

Bioaktiivisen lasigranulan liekkipyöröstysmenetelmän kehittäminen



Opinnäytetyö (AMK) | tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikka

2022 | 39+6 sivua

Sini-Maarit Lempinen

Bioaktiivisen lasigranulan liekkipyöritysmenetelmän kehittäminen

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi BonAlive Biomaterials Ltd, joka tuottaa lääkinällisiä laitteita luukudosvauroihin bioaktiivista S53P4-lasia hyödyntäen. Bonalive® granules -tuotteissa lasi on murskattu granuloiksi, mutta Bonalive® putty- ja putty MIS-tuotteissa käytetään lisäksi pyöreitä lasihelmiä. Niiden ansiosta tuote on helpommin injektoitavissa, jolloin leikkaus voidaan suorittaa pienemmästä haavasta.

Työn tarkoituksena oli kehittää liekkipyöritysmenetelmää, johon edeltävän kehitysprojektin perusteella oli valittu asetyleeniliekki. Työn keskeisiksi testattaviksi parametreiksi valittiin lasigranulan syöttönopeus ja -kohta, syöttökohdan etäisyys polttimesta sekä asetyleenin ja paineilman virtausnopeuksien suhde. Tavoitteena oli saada pyörityttyä granulasta yli 95 %.

Testiajot suoritettiin BonAliven tiloissa. Tulosten arvioimista varten näytteistä otettiin SEM-kuvat Åbo Akademiilla. Kuvista saatiin näyttöä optimaalisesta syöttökohdasta, mutta niiden perusteella lopulliseen tavoitteeseen ei päästy. Tulosten pohjalta on kuitenkin helpompi jatkaa menetelmän jatkokehitystä.

Asiasanat:

Bioaktiivinen lasi, liekkipyöritys, S53P4, lääkinällinen laite

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2022 | 39+6 pages

Sini-Maarit Lempinen

Development of flame spheroidization for bioactive glass granules

This thesis project was carried out for BonAlive Biomaterials Ltd, which produces medical devices to repair bone tissue defects out of bioactive glass S53P4. The Bonalive® granules product family uses granules of bioactive glass, whereas in Bonalive® putty and putty MIS products, also glass spheres are added, making the product easier to inject. Therefore, surgery can be performed with a smaller incision.

The main objective of this project was to develop flame spheroidization. The development was initially commenced with a master's thesis project in 2021. According to the results of the previous project, acetylene was utilized as the source of the flame. The current project focused on testing the effect of granule feeding rate, feeding point on both x- and z-axis, and the ratio of the flow rates of acetylene and pressurized air. The aim was to spheroidize a minimum of 95 percent of granules.

The test runs were executed at BonAlive. For evaluation of results, SEM images of samples were taken. The results showed the most optimal feeding point but the objective was not reached during this project. However, the results of this project will help develop flame spheroidization in the future.

Keywords:

Bioactive glass, flame spheroidization, S53P4, medical device

Sisältö

Käytetyt lyhenteet ja sanasto	7
1 Johdanto	8
2 Bioaktiivinen lasi	10
2.1 Rakenne	10
2.2 Lasin valmistaminen	11
2.3 Lasihelmien valmistaminen	13
2.4 Analysointimenetelmiä	15
3 Valmistusmenetelmän kehittäminen	16
3.1 Testimatriisi	16
3.2 Liekkipyörästyslaitteisto	19
3.3 Testiajojen toteutus	19
3.4 Näytteiden analysointi	21
4 Tulokset	23
4.1 Mikroskooppikuvat	23
4.2 SEM-kuvat	25
4.3 Puskuriliuoksen pH-arvon määrittäminen	34
5 Pohdinta	35
Lähteet	37

Liitteet

Liite 1. Mikroskooppikuvat ja havainnot

Kuvat

Kuva 1. Bonalive® putty (Bonalive Biomaterials Ltd 2021)	9
--	---

Kuva 2. Mikroskooppikuva. Yläriivi: testiajot 1-3, keskirivi: testiajot 4-6, alarivi: testiajot 7-9	24
Kuva 3. Mikroskooppikuva. Yläriivi: testiajot 10, 13 ja 14, alarivi: testiajot 15-17	24
Kuva 4. SEM-kuvia 30x-suurennoksella. Yläriivi: testiajo 1, keskirivi: testiajo 4, alarivi: testiajo 13.	25
Kuva 5. SEM-kuvia 30x-suurennoksella. Yläriivi: testiajo 14, keskirivi: BG, alarivi: Mo.	26
Kuva 6. SEM-kuvia testiajosta 1. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	27
Kuva 7. SEM-kuvia testiajosta 4. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	28
Kuva 8. SEM-kuvia testiajosta 13. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	29
Kuva 9. SEM-kuvia testiajosta 14. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	30
Kuva 10. SEM-kuvia lasigranuloista. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	31
Kuva 11. SEM-kuvia lasisfääreistä. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.	32
Kuva 12. SEM-kuva mitoilla testiajosta 4.	33
Kuva 13. SEM-kuva mitoilla vertailuna olleista lasisfääreistä.	33

Kuviot

Kuvio 1. Henchin faasidiagrammi (Kaur 2017, s. 100)	10
---	----

Kuvio 2. Piialkoxidin hydrolyysi (Kaur 2017, s. 116)	12
Kuvio 3. Polymerointi, geelityminen ja dehydraatio (Kaur 2017, s. 117)	12
Kuvio 4. Lasihelmien valmistusmenetelmiä. a) sooli-geeli -menetelmä, b) liekkipyöritysmenetelmä ja c) putkiuunimenetelmä (Hossain ym. 2014)	13
Kuvio 5. Pystysuora liekkipyöritysmenetelmä (Lee ym. 2017)	14
Kuvio 6. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate (University of Cambridge 2022).	15
Kuvio 7. Asetyleeni-happiliekin lämpötilajakauma (Oy Linde Gas Ab)	16
Kuvio 8. Prosessikaavio liekkipyöritysmenetelmästä.	19
Kuvio 9. Esimerkkikuvaaja testiajon aikaisista hiilidioksidipitoisuuksista.	20
Kuvio 10. Esimerkkikuvaaja testiajon aikaisista lämpötiloista putken eri kohdissa sekä keräysastiassa.	21
Kuvio 11. Näytteiden puskuriliuosten pH ajan funktiona.	34

Taulukot

Taulukko 1. Alustava testimatriisi	17
Taulukko 2. Lopullinen testimatriisi. Tähdellä merkittynä testiajot, joilla saavutettiin parhaimmat tulokset mikroskooppitarkastelun perusteella.	18
Taulukko 3. Optimaalisimmat parametrit mikroskooppitarkastelun perusteella.	23

Käytetyt lyhenteet ja sanasto

Aggregaatio	Lääketieteen termi, jolla tarkoitetaan ryhmittymistä/takertumista; tässä työssä aggregoituneilla viitataan yhteen liittyneisiin lasipartikkeleihin (Duodecim Terveyskirjasto 2016a)
Antibakteerinen	Materiaali, jonka ominaisuudet tekevät ympäristöstä bakteereille epäsuotuisan. Mekanismi voi joko tappaa bakteereja tai estää niiden lisääntymistä (Duodecim Terveyskirjasto 2016b; Fagerlund ja Hupa 2017)
Osteokonduktiivinen	Materiaali, joka mahdollistaa luuta muodostavien solujen liikkumisen siirrealueella, jolloin kehon oma luukudos vähitellen korvaa vierasmateriaalin (Wypych 2018)
Osteostimulatiivinen	Materiaali, joka esimerkiksi tiettyjen ionien vapauttamisella lisää kehon omien luuta muodostavien solujen määrää ja aktiivisuutta (Merkku 2014)
Revaskularisaatio	Verenkierron palauttaminen (Tarnanen ym. 2015)
SEM	Lyhenne sanoista Scanning Electron Microscope, suomeksi pyyhkäisyelektronimikroskooppi (Swapp 2017)
TRIS	Lyhenne tris(hydroksimetyyli)aminometaanista. Kemiallisissa analyyseissä usein käytetty puskuriliuos, jonka pH on välillä 7–9. (Helmenstine 2019)

1 Johdanto

Sote-alaa kuormittavat monet ongelmat, joista merkittävänä esimerkkinä toimivat leikkauksen jälkeiset infektiot sekä moniresistentit bakteerit. Tilanteen helpottamiseksi biomateriaalien tutkimus- ja kehitystyö ovat tärkeässä asemassa. (BonAlive Biomaterials Ltd 2021.) Biomateriaalilla tarkoitetaan materiaalia, joka asetetaan ihmiselimistöön ja on täten tekemisissä elävän kudoksen kanssa. Sen tulee siis olla bioyhteensopiva, jotta välttytään hylkimisreaktioilta. (Edvardsson 2018.)

Bioaktiivista lasia on hyödynnetty lääketieteessä luukudoksen korjaamiseen jo 1960-luvun lopulta (BonAlive Biomaterials Ltd 2021). Lasi on biomateriaalina parhaimmillaan sekä osteokonduktiivinen, osteostimulatiivinen että antibakteerinen. Se liukenee elimistössä ioninvaihtomekanismin kautta, jolloin lasiin alkaa muodostua apatiittikerros, mikä taas stimuloi elimistön luuta muodostavia soluja, osteosyyttejä. Samalla vapautuvat ionit nostavat pH:ta tehden ympäristöstä epäsuotuisan mikrobeille. (Brauer ja Möncke 2017.) Bioaktiivista lasia voidaan valmistaa esimerkiksi sulattamalla ja muovaamalla ne kuutioksi. Kun kuutio murskataan, saadaan epäsäännöllisen muotoista lasigranulaa. (Fagerlund ja Hupa 2017.) Lasigranulaa taas voidaan pyöristää lasihelmiksi lasityypistä riippuen eri keinoin, esimerkiksi liekkipyöristys- tai sooli-geeli-menetelmällä (Hossain ym. 2014).

Tämä opinnäytetyö toteutettiin toimeksiantona BonAlive Biomaterials Ltd:lle, joka on turkulainen bioaktiiviseen S53P4-lasiin pohjautuvia lääkintälaitteita valmistava ja kehittävä yritys. Sen tarkoituksena oli kehittää bioaktiivisen lasigranulan pyöristämistä liekkimenetelmällä. Pyöreitä lasihelmiä, ns. biolasisfäärejä, käytetään Bonalive® putty- ja putty MIS -tuotteissa (Kuva 1).



Kuva 1. Bonalive® putty (Bonalive Biomaterials Ltd 2021)

Opinnäytetyö on jatkoa vuonna 2021 tehdylle diplomi-insinööriyölle (Lukin 2022), jonka pohjalta lasigranulan pyöristämiseen valittiin asetyleeniliekki. Tavoitteena oli löytää optimaaliset parametrit, joilla saataisiin mahdollisimman suuri saanto (yli 95 %) pyörityneitä ja kiteettömiä lasihelmiä, jotta valmistus saataisiin kannattavaksi ja sitä voitaisiin edelleen kehittää tuotantoon soveltuvaksi. Lisäksi tavoitteena oli valmistaa halkaisijaltaan yli 500 μm lasisfäärejä.

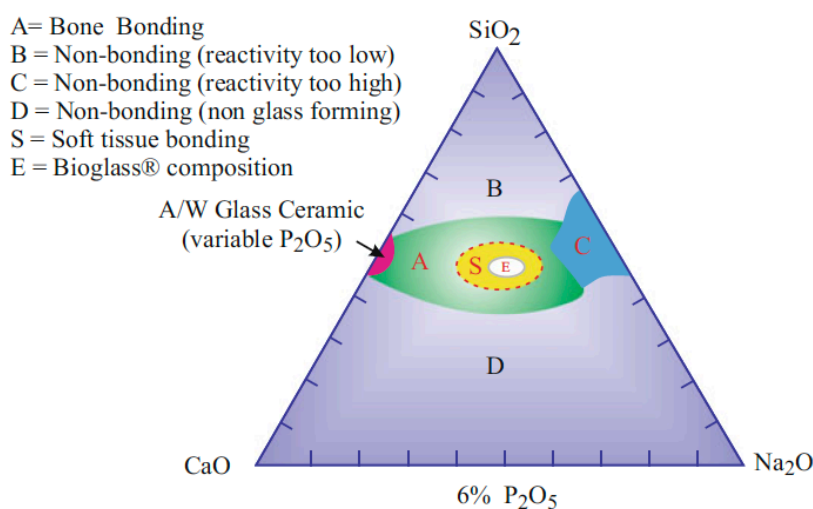
Opinnäytetyön tuloksena saatiin näyttöä optimaalisesta syöttökohdasta sekä asetyleenin ja paineilman virtausnopeuden suhteesta. Tämän raportin loppupäätelmissä on esitetty opinnäytetyön tuloksista syntyneitä jatkokehitysajatuksia.

2 Bioaktiivinen lasi

Bioaktiivisen lasin historia ulottuu 1960-luvulle, jolloin professori Larry Hench kehitti Henchin lasiksi kutsutun bioaktiivisen 45S5-lasin, nykyisin nimeltään Bioglass®. Lasi on todettu soveltuvan erinomaisesti luukudosvaurioiden korjaamiseen, joten sen tärkeimpiä käyttöalueita ovat ortopediset, kallon alueen ja hammaslääketieteen operaatiot. Lasilla on monia toivottuja kudosteknologisia ominaisuuksia, kuten revaskularisaation edistäminen, entsyymiaktiivisuus sekä kantasolujen erilaistumisen aktivointi. (BonAlive Biomaterials Ltd 2021; Kaur 2017 s. 99.) Lisäksi se on osteokonduktiivinen, osteostimulatiivinen, antibakteerinen ja toksiton (Hupa ja Karlsson 2017).

2.1 Rakenne

Yksinkertaisuudessaan lasi, niin teollinen kuin bioaktiivinenkin lasi, on amorfinen sekoitus oksideja, kuten alkali-, maa-alkali-, alumiini-, boori- tai piidioksideja. Vain tietyt yhdistelmät tekevät lasista bioaktiivisen ja bioyhteensopivan. (Fagerlund ja Hupa 2017.) Kehittäessään Bioglass®-lasi, Hench kuvasi faasidiagrammina käyttämiensä oksidien suhteellisten määrien vaikutusta lasin ominaisuuksiin (Kuvio 1).



Kuvio 1. Henchin faasidiagrammi (Kaur 2017, s. 100)

Bioaktiiviset lasit jaetaan kolmeen pääluokkaan: silikaatti-, fosfaatti- ja boraatti-pohjaisiin lasihin. Niiden rakenteista on erotettavissa verkonmuodostajaoksia, kuten piidioksidi, ja verkonmuokkaajaoksia, kuten alkalioksia. Bioaktiivisen lasin lyhenteestä näkee näiden oksidien suhteellisen määrän, kuten 45S5-lasissa on silikaattia 45 massaprosenttia ja S53P4-lasissa 53. Silikaattipohjaisessa lasissa perusyksikkönä, eli verkonmuodostajaoksidina, on tetrahedri, jossa piihin on kiinnittyneenä neljä happiatomia. Tetrahedrit kiinnittyvät toisiinsa happisiltojen välityksellä. Kun tähän lisätään verkonmuokkaajaoksia, happisiltojen määrä vähenee, jolloin yhdisteen dominoiva kemiallinen sidostyyppi kovalenttisesta sidoksesta ionisidokseen. Samalla yhdisteen bioaktiivisuus lisääntyy. (Brauer ja Möncke 2017.)

Lasin tekee bioaktiiviseksi sen kyky muodostaa päälle hydroksiapatiittikerros, lyhennettynä HA-kerros, joka on vastaava kuin varsinaisessa luukudoksessa. Bioaktiivinen lasi reagoi elimistön nesteiden kanssa, jolloin se liukenee ioninvaihdon kautta muodostaen silikageelin, jonka pinnalle HA-kerros muodostuu. Lisäksi ioninvaihto nostaa nesteen pH-arvoa, jolloin siitä tulee bakteereille epäsuotuisa kasvualusta. (Brauer ja Möncke 2017; Fagerlund ja Hupa 2017.)

HA-kerroksen vuoksi lasi on osteokonduktiivinen ja -stimulatiivinen, jolloin kehon oma luukudos korvaa hiljalleen implantoidun lasin (Fagerlund ja Hupa 2017). Jotkin bioaktiiviset lasit voivat olla lisäksi osteoinduktiivisia, joka tarkoittaa, että ne aiheuttavat elimistössä luukudoksen uudismuodostusta, kun kantasolut erilaistuvat luukudoksen soluiksi (Kaur 2017, s. 303).

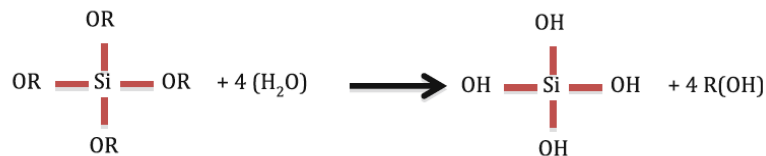
2.2 Lasin valmistaminen

Bioaktiivista lasia voidaan valmistaa joko sulattamalla, jolloin tuloksena on mekaanisesti kestävämpi lasi, tai sooli-geeli -menetelmällä, jolla valmistetaan huokoisempaa lasia. Koska useimmat biolasin sovellukset ovat tarkoitettu käytettäväksi luukudoksen kanssa, on sulatusmenetelmä yleisempi. Kiinnostus biolasia kohtaan on kuitenkin lisääntynyt myös pehmytkudosteknologian saralla, ja biolasta rakennetut huokoiset tukirangat ovat laajalti tutkimuksen kohteena.

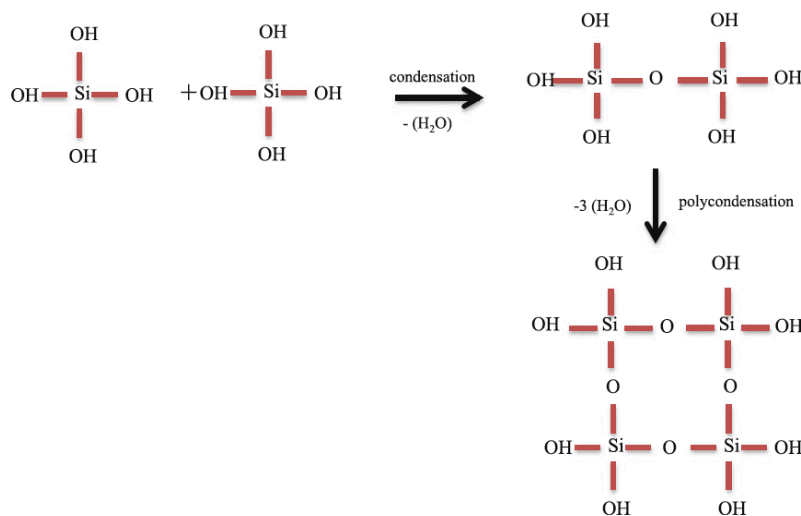
(Fagerlund ja Hupa 2017; Kaur 2017 s. 112.) Huokoisia tukirankoja voidaan hyödyntää esimerkiksi säädellysti lääkeainetta vapauttaviin tuotteisiin (Kaya ym. 2021).

Sulatusmenetelmässä raaka-aineet sekoitetaan 500-celsiusasteisessa myllyssä, jolloin syntyy jauhetta. Kun lämpötila nostetaan 1200–1500 celsiusasteeseen, jauhe sulaa ja se kaadetaan muottiin. (Kaur 2017 s. 113.) Jäähdytynyt lasikappale voidaan esimerkiksi murskata granuloiksi. Jäähdytysajan tulisi olla riittävän lyhyt kiteytymisen estämiseksi, koska kiteet heikentävät lasin bioaktiivisuutta. (Arstila 2008; Fagerlund ja Hupa 2017.) Toisinaan kiteytymisellä voidaan tarkoituksellisesti muovata lasin bioaktiivisuutta (Massera ym. 2011).

Sooli-geeli -menetelmällä voidaan valmistaa silikaattipohjaista lasia, joka sisältää jopa 90 mol-% piidioksidia. Menetelmän päävaiheet ovat hydrolyysi (Kuvio 2), polymerointi, geelilytyminen ja dehydraatio (Kuvio 3).



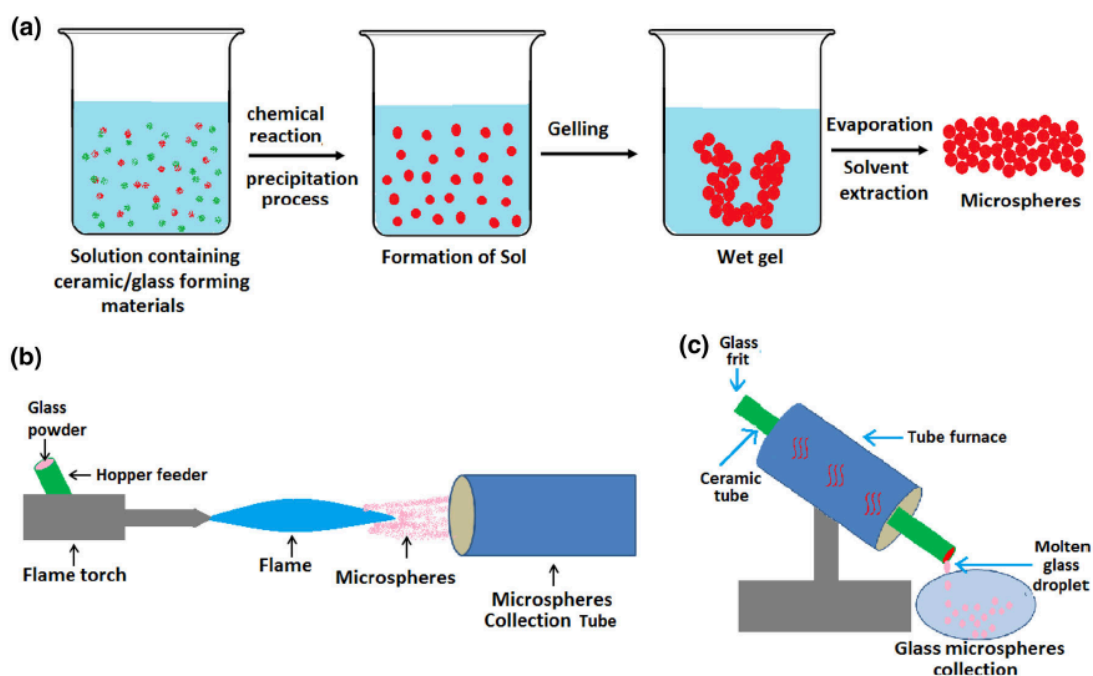
Kuvio 2. Piialkoxidin hydrolyysi (Kaur 2017, s. 116)



Kuvio 3. Polymerointi, geelilytyminen ja dehydraatio (Kaur 2017, s. 117)

2.3 Lasihelmien valmistaminen

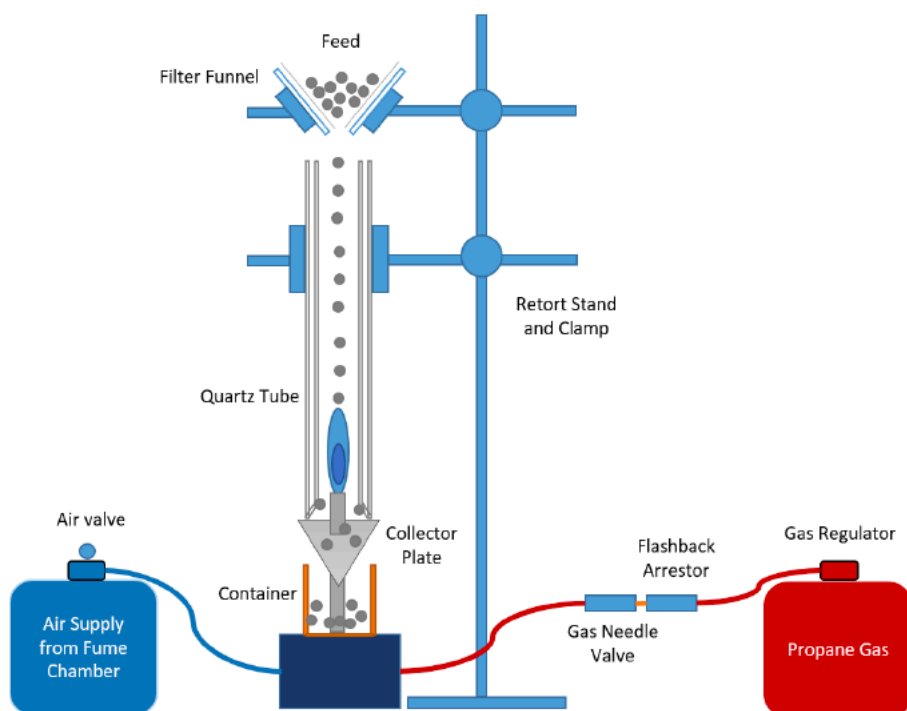
Pyöreät lasihelmet, joita kutsutaan myös lasisfääreiksi, voivat olla onttoja tai kiinteitä. Usein puhutaan mikrosfääreistä, joilla tarkoitetaan halkaisijaltaan 1–200 µm -kokoisia lasihelmiä, mutta isompiakin sfäärejä on mahdollista valmistaa. (Lee ym. 2017.) Lasisfäärien valmistusmenetelmät noudattavat vastaavia periaatteita kuin bioaktiivisen lasinkin – epäsäännöllisen lasipartikkelit voidaan muovata pyöreiksi lasisfääreiksi joko korkeaa lämpötilaa hyödyntäen tai sooli-geeli -menetelmällä (Kuvio 4, Hossain ym. 2014).



Kuvio 4. Lasihelmien valmistusmenetelmiä. a) sooli-geeli -menetelmä, b) liekki-pyöritysmenetelmä ja c) putkiuunimenetelmä (Hossain ym. 2014)

Lasipartikkeleita voidaan kuumentaa joko liekillä tai uunissa. Pääperiaatteena on, että korkea lämpötila aiheuttaa viskositeetin madaltumisen, jolloin partikkelin pintajännitys aiheuttaa kappaleelle pyöreän muodon. Liekki-pyörityksessä voidaan käyttää esimerkiksi propaani-butaani-happi -seosta, asetyleeni-paineilma-seosta tai pelkkää propaania. Liekin lämpötila vaihtelee käytetystä kaasusta riippuen (600–2000 °C). Menetelmässä huomioitavia tekijöitä ovat muun muassa liekin lämpötila, raaka-aineen syöttökohta ja aika, jonka partikkelit ovat korkeassa

lämpötilassa. (Barros ym.; Bortot ym. 2012.) Liekki voidaan suunnata vaakatasoon, kuten Kuvio 4, tai pystysyntyään, kuten Kuvio 5 (Lee ym. 2017).



Kuvio 5. Pystysuora liekkipyöritysmenetelmä (Lee ym. 2017)

Myös putkiuunimenetelmät poikkeavat toisistaan putkiuunin linjauksen suhteen. Se voi olla suoraan pystyssä tai vinossa, kuten Kuvio 4. Lämpötila uunissa vaihtelee yleensä 375 ja 1300 celsiusasteen välillä. Lasijauhe puhalletaan uuniin ja pidetään se siellä esimerkiksi pienellä argonvirtauksella. (Ward ym. 2010).

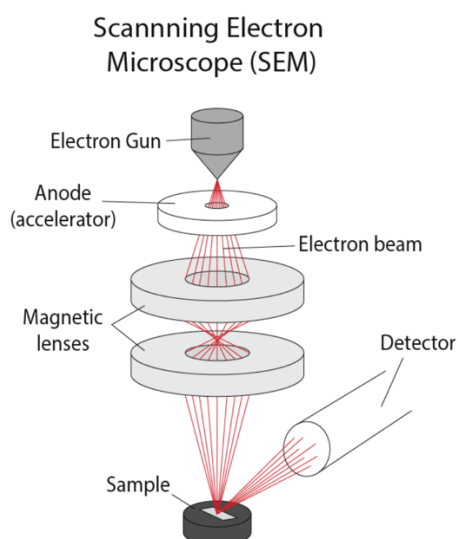
Bioaktiivisten lasisfäärien käyttökohteita on monia. Kiinteillä lasisfääreillä halutaan yleensä lisätä sovelluksen mekaanista kestävyttä, liukenemisaikaa ja injektointavuutta. (Lukin 2022.) Ontoilla lasisfääreillä on myös potentiaalia lääkehoidon välineenä. Lääkeaine voidaan sitoa huokoisten lasisfäärien muodostamaan rakenteeseen, joka vapauttaa lääkeaineen säädellysti kohde-elimessä. (Kaya ym. 2021.) Jopa sisäistä, paikannettua sädehoitoa on tutkittu lasisfääreillä toteutettuna (Barros ym.).

2.4 Analysointimenetelmiä

Bioaktiivista lasia analysoitaessa kiinnostuksen kohteena ovat lähinnä sen vaikutus ympäröivän nesteen pH-arvoon ja ionikonsentraatioihin sekä HA-kerroksen muodostumisnopeus ja sen paksuus. pH-arvon käyttäytymisestä voidaan päätellä kyseisen lasin bioaktiivisuutta sekä antibakteerisuutta. Lisäksi siitä voidaan päätellä kyseisen lasin liukenemisnopeus. pH-mittaukset suoritetaan puskuriliuoksessa, jolloin pH asettuu lopulta, yleensä 168 tunnin sisällä, tietylle tasolle. (Fagerlund ja Hupa 2017.)

Määrittämällä esimerkiksi natriumin, kalsiumin tai fosforin pitoisuus eri aikapistissä voidaan arvioida lasin bioaktiivisuutta. Mittaukset voidaan suorittaa spektrofotometrillä. (Lukin 2022)

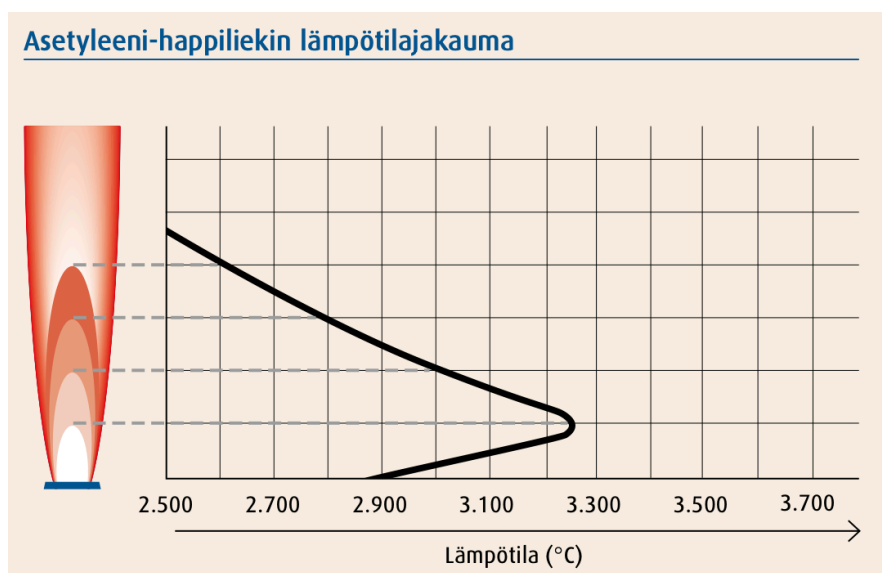
Mikroskoopilla voidaan kartoittaa partikkelien kokoa ja muotoa. Partikkelien pintarakennetta eli morfologiaa voidaan esimerkiksi tarkastella pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM, Kuvio 6), jolla saadaan kuvia nanometriä tarkkuudella. SEMillä voidaan myös havaita HA-kerroksen muodostuminen. Poikkileikkaamalla partikkelit voidaan SEM-kuvista määrittää myös HA-kerroksen paksuus. (Kaur 2017, s. 228)



Kuvio 6. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate (University of Cambridge 2022).

3 Valmistusmenetelmän kehittäminen

Valmistusmenetelmässä on useita huomioitavia kohteita, kuten lasigranulan koko ja syöttökohta, liekin lämpötila, putken koko ja jäähdytys sekä keräysastian malli ja jäähdytys. Tässä opinnäytetyössä valmistusmenetelmän kehittämiseen valittiin testattavaksi neljä parametria: lasigranulan syöttönopeus, syöttökohta ylhäältä katsottuna eli osuuko lasigranulat suoraan ylimpänä olevaan liekkiin vai kahden liekin väliin, syöttökohdan etäisyys polttimesta eli ohjataanko lasigranula heti liekin alkuun vai edemmäs liekin kuumimpaan kohtaan (Kuvio 7) sekä asetyleenin ja paineilman virtausnopeuksien suhde eli onko kyseessä pelkistävä vai hapettava liekki.



Kuvio 7. Asetyleeni-happiliekkin lämpötilajakauma (Oy Linde Gas Ab)

3.1 Testimatriisi

Parametreista tehtiin alustava testimatriisi (Taulukko 1), jossa oli esitettyä kaikki mahdolliset kombinaatiot valituista parametreista. Jokaisen testiajon jälkeen näytteitä tarkasteltiin mikroskoopilla, minkä perusteella valittiin seuraavan ajon parametrit.

Taulukko 1. Alustava testimatriisi

Testinro	Syöttönopeus			Syöttökohta		Etäisyys		Asetyleeni:ilma			Testinro	Asetyleeni:ilma		
	Matala	Keski	Korkea	Keskelle liekkiä	Liekkien väliin	Kuumimpaan kohtaan	Viileämpään kohtaan	1/11,0	1/8,0	1/6,0		1/9,6	1/8,0	1/6,0
1	x			x		x		x			37	x		
2	x				x	x		x			38	x		
3	x			x			x	x			39	x		
4	x				x		x	x			40	x		
5	x			x		x			x		41		x	
6	x				x	x			x		42		x	
7	x			x			x		x		43		x	
8	x				x		x		x		44		x	
9	x			x		x				x	45			x
10	x				x	x				x	46			x
11	x			x			x			x	47			x
12	x				x		x			x	48			x
13		x		x		x		x			49	x		
14		x			x	x		x			50	x		
15		x		x			x	x			51	x		
16		x			x		x	x			52	x		
17		x		x		x			x		53		x	
18		x			x	x			x		54		x	
19		x		x			x		x		55		x	
20		x			x		x		x		56		x	
21		x		x		x				x	57			x
22		x			x	x				x	58			x
23		x		x			x			x	59			x
24		x			x		x			x	60			x
25			x	x		x		x			61	x		
26			x		x	x		x			62	x		
27			x	x			x	x			63	x		
28			x		x		x	x			64	x		
29			x	x		x			x		65		x	
30			x		x	x			x		66		x	
31			x	x			x		x		67		x	
32			x		x		x		x		68		x	
33			x	x		x				x	69			x
34			x		x	x				x	70			x
35			x	x			x			x	71			x
36			x		x		x			x	72			x

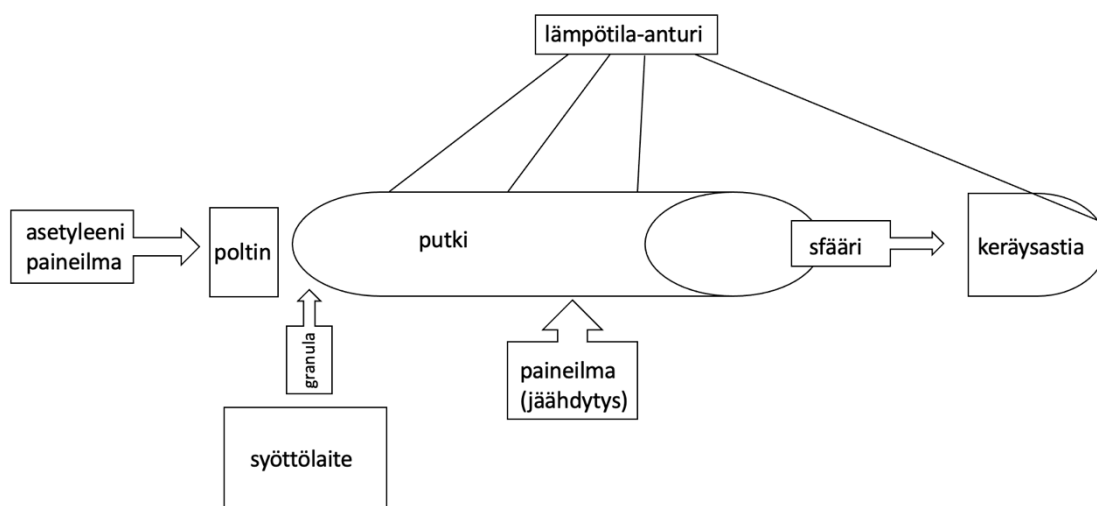
Lopulliseen testimatriisiin valittiin 18 variaatiota (Taulukko 2), joista kustakin suoritettiin vähintään kolme rinnakkaista testiajtoa.

Taulukko 2. Lopullinen testimatriisi. Tähdellä merkittynä testiajot, joilla saavutettiin parhaimmat tulokset mikroskooppitarkastelun perusteella.

id	Syöttönopeus	Syöttökohta	Asetyleeni	Ratio
1*	Korkea	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Pelkistävä
2	Korkea	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Hapettava
3	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Alhainen	Hapettava
4*	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Alhainen	Pelkistävä
5	Alhainen	Viileämpään kohtaan	Korkea	Pelkistävä
6	Alhainen	Viileämpään kohtaan	Alhainen	Hapettava
7	Korkea	Viileämpään kohtaan	Alhainen	Hapettava
8	Korkea	Viileämpään kohtaan	Korkea	Pelkistävä
9*	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Pelkistävä
10	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Alhainen	Pelkistävä
11	Alhainen	Viileämpään kohtaan	Korkea	Hapettava
12	Alhainen	Viileämpään kohtaan	Korkea	Pelkistävä
13*	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Pelkistävä
14*	Korkea	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Pelkistävä
15	Korkea	Viileämpään kohtaan	Korkea	Pelkistävä
16	Alhainen	Viileämpään kohtaan	Korkea	Pelkistävä
17*	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Korkea	Pelkistävä
18	Alhainen	Kuumempaan kohtaan	Alhainen	Hapettava

3.2 Liekkipyörästyslaitteisto

Testiajot suoritettiin laitteistolla (Kuvio 8), joka koostui polttimesta, syöttölaitteesta, putkesta ja keräysastiasta. Polttimesta saatiin yhteensä yhdeksän asetyleeni liekkiä. Putkeen oli asennettu paineilmalla toimiva jäähdytysjärjestelmä.

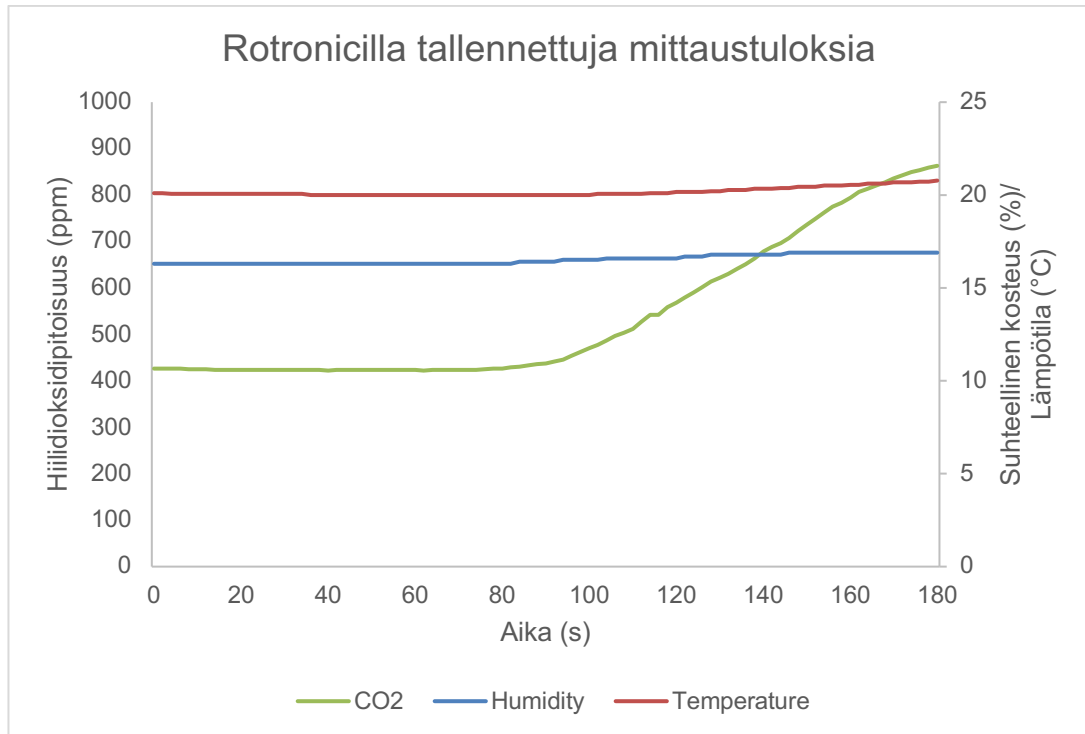


Kuvio 8. Prosessikaavio liekkipyörästysmenetelmästä.

3.3 Testiajojen toteutus

Testiajoihin käytettiin Bonaliven lasigranulaa (eränro BG-12/19), joka oli halkaisijaltaan 90–500 µm. Kunkin testiajon aikana lasigranulaa syötettiin liekkiin kahden minuutin ajan. Tämän jälkeen keräysastia tyhjennettiin ja putki puhdistettiin mekaanisesti. Fraktiot punnittiin, jotta saatiin arvioitua syöttönopeuden tasaisuutta sekä putkeen jäävän lasin määrää. Jotta testiajot olivat paremmin verrattavissa keskenään, uusi ajo aloitettiin vasta, kun putki oli jäähtynyt alle 50-asteiseksi.

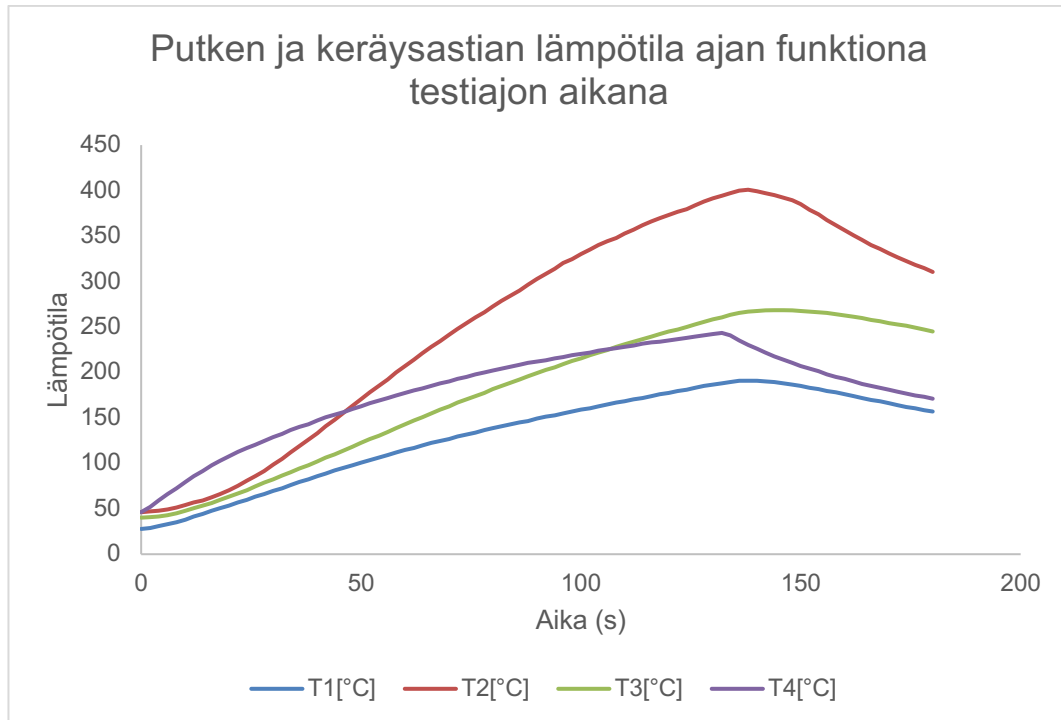
Työturvallisuuden ylläpitämiseksi huoneen hiilidioksidipitoisuutta monitoroitiin jatkuvasti Rotronic-laitteella (Kuvio 9) sekä käytettiin Sundströmin puolinaamaria partikkeli- ja kaasusuodattimella.



Kuvio 9. Esimerkkikuvaaja testiajon aikaisista hiilidioksidipitoisuuksista.

Rotronicilla mitattiin myös huoneen lämpötilaa ja suhteellista kosteutta testiajon aikana. Suhteellinen kosteus muodostuu ongelmaksi biolasituotannossa sen ylitäessä 60 prosenttia.

Sen lisäksi putken ja keräysastian lämpötilaa seurattiin Teston lämpömittarilla, jonka neljästä lämpötila-anturista kolme asetettiin tasaisin välimatkoin putkeen ja yksi keräysastian takaseinään (Kuvio 10). Tuloksista piirretyistä kuvaajista sai lisäksi dataa jatkoa varten esimerkiksi jäähdytysjärjestelmän tehokkuudesta, johon tämän projektin aikana ei keskitytty.



Kuvio 10. Esimerkkikuvaaja testiajon aikaisista lämpötiloista putken eri kohdissa sekä keräysastiassa.

3.4 Näytteiden analysointi

Testiajon jälkeen fraktiot kerättiin ja ne käytiin läpi DinoLite-mikroskoopilla. Sen lisäksi, että tulosten perusteella muutettiin parametrejä, valittiin myös lisäanalyysijä varten ainoastaan parhaat eli ne, joissa silmämääräisesti oli lasigranulasta suurin osa pyörästynyt. Huomiota kiinnitettiin myös biolasisfäärien kokoon, sillä jatkossa on tavoite pyöristää myös halkaisijaltaan yli 500 µm lasigranulaa.

Näytteistä otettiin tarkemmat mikroskooppikuvat Åbo Akademilla. Kuvia varten pieni määrä näytettä kiinnitettiin teipillä metallilevyyn. Niiden perusteella edustavimmat fraktiot siivilöitiin 500 µm-siivilällä mahdollisten aggregoituneiden sfäärien sekä muiden epäpuhtauksien poistamiseksi. Tämän jälkeen fraktiot yhdistettiin yhdeksi näytteeksi. Kustakin näytteestä otettiin SEM-kuvat Åbo Akademilla kolmella eri suurennoksella: 30x, 1000x ja 10 000x. Vertailuna otettiin vastaavat kuvat lasigranulasta ja kaupallisesta biolasisfäärituotteesta.

Lisäksi mitattiin näytteiden vaikutusta TRIS-puskuriliuoksen pH-arvoon. Näytteistä valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä punnitsemalla kolmeen Falcon-putkeen 1,8 g näytettä ja lisäämällä automaattipipetillä 6 ml 0,05-molaarista TRIS-puskuria (pH 7,4). Falcon-putket säilytettiin vesihauteessa pH-mittausten välillä (37 °C, 150 rpm). pH-arvo mitattiin 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 ja 168 tunnin kohdalla. Vertailuna käytettiin lasigranulaa (BG) sekä kaupallista biolasisfäärituotetta (Mo), joista kummastakin valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä.

4 Tulokset

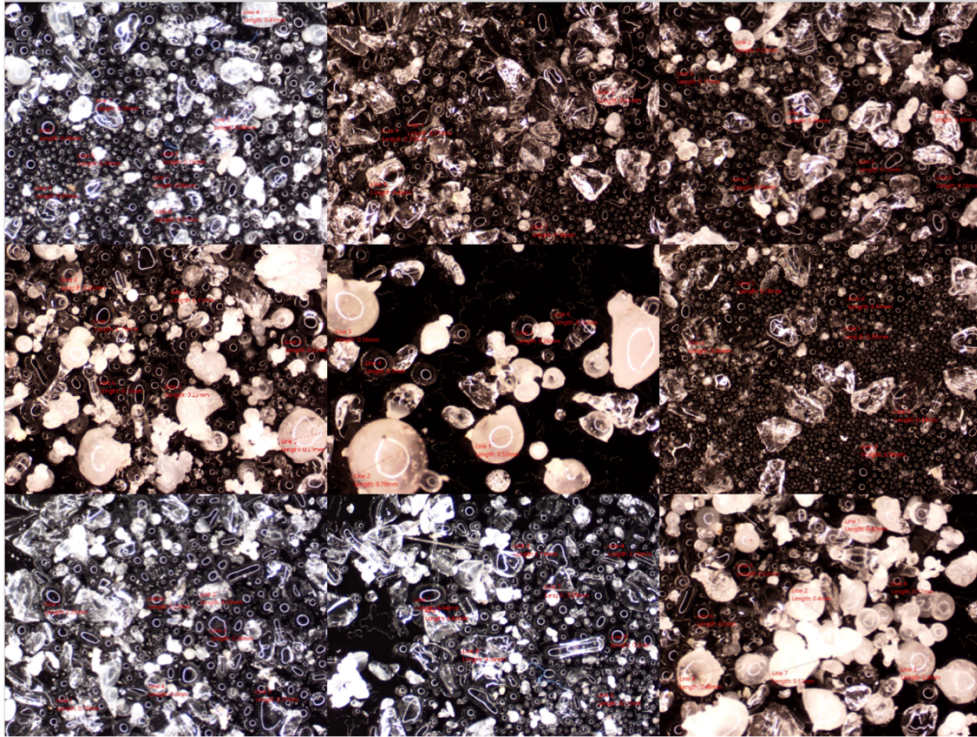
Työn tuloksena onnistuttiin pyöristämään lasigranulaa asetyleeniliekkiä käyttäen. Optimaalisimmat parametrit (Taulukko 3) arvioitiin silmämääräisesti mikroskooppilla ottaen huomioon pyörityneiden lasihelmien suhteellisen määrän ja laadun. Huomiota kiinnitettiin myös kokonaissaantoon eli siihen, paljonko putkeen jäi hukkaan biolasia. Kerätyistä fraktiosta yhdistetyt näytteet vaikuttivat TRIS-puskuriliuoksen pH-arvoon oletetusti.

Taulukko 3. Optimaalisimmat parametrit mikroskooppitarkastelun perusteella.

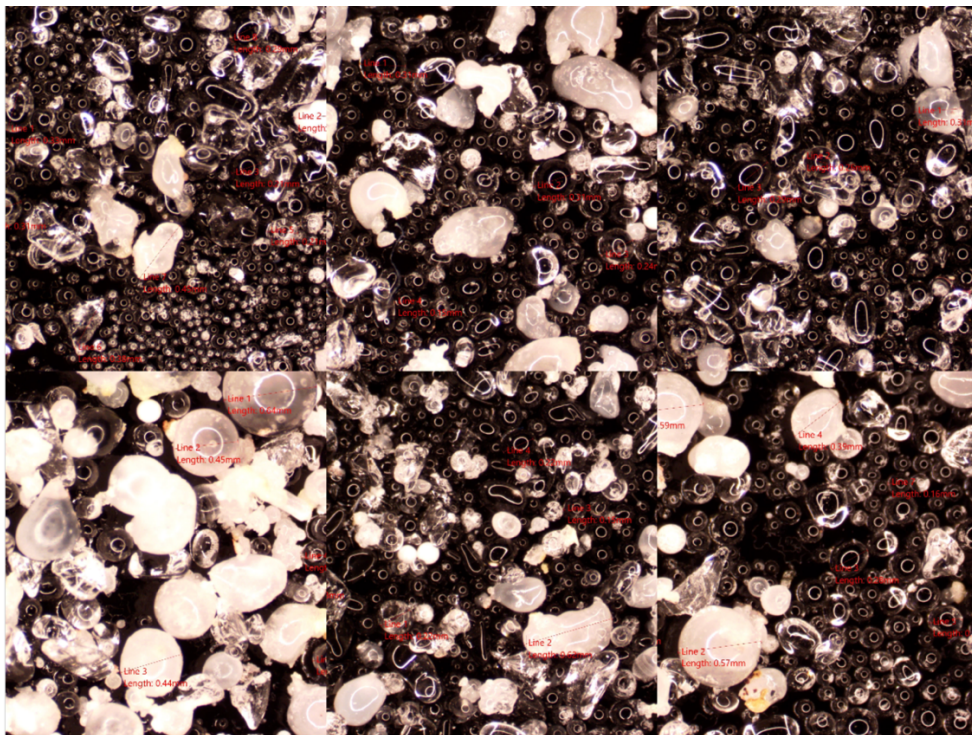
Syöttökohta	Liekkien väliin
Syöttökohdan etäisyys polttimesta	Liekin kuumimpaan kohtaan
Syöttönopeus	Alhainen
Pelkistävä/hapettava liekki	Pelkistävä

4.1 Mikroskooppikuvat

Mikroskooppikuvien (Kuva 2 ja Kuva 3) perusteella voitiin havaita pyöritymistä tapahtuneen vaihtelevalla saantoprosentilla. Jokaisessa testiajossa jäi osa granulasta pyöritymättä, mutta hapettavalla liekillä granulan osuus oli selkeästi suurempi. Pyöritymättömät partikkelit olivat poikkeuksetta isoimpia partikkeleja. Syöttönopeuden lisääminen korreloi suoraan aggregoituneiden lasipartikkeleiden määrää. Lisäksi virtausnopeuden laskiessa materiaalia ajautui herkemmin putken sisäseinämiin, josta se saattoi irrota aggregoituneiden lasipartikkelien kimpuna. Tarkemmat havainnot ja kuvat löytyy koottuna myös liitteistä (Liite 1).



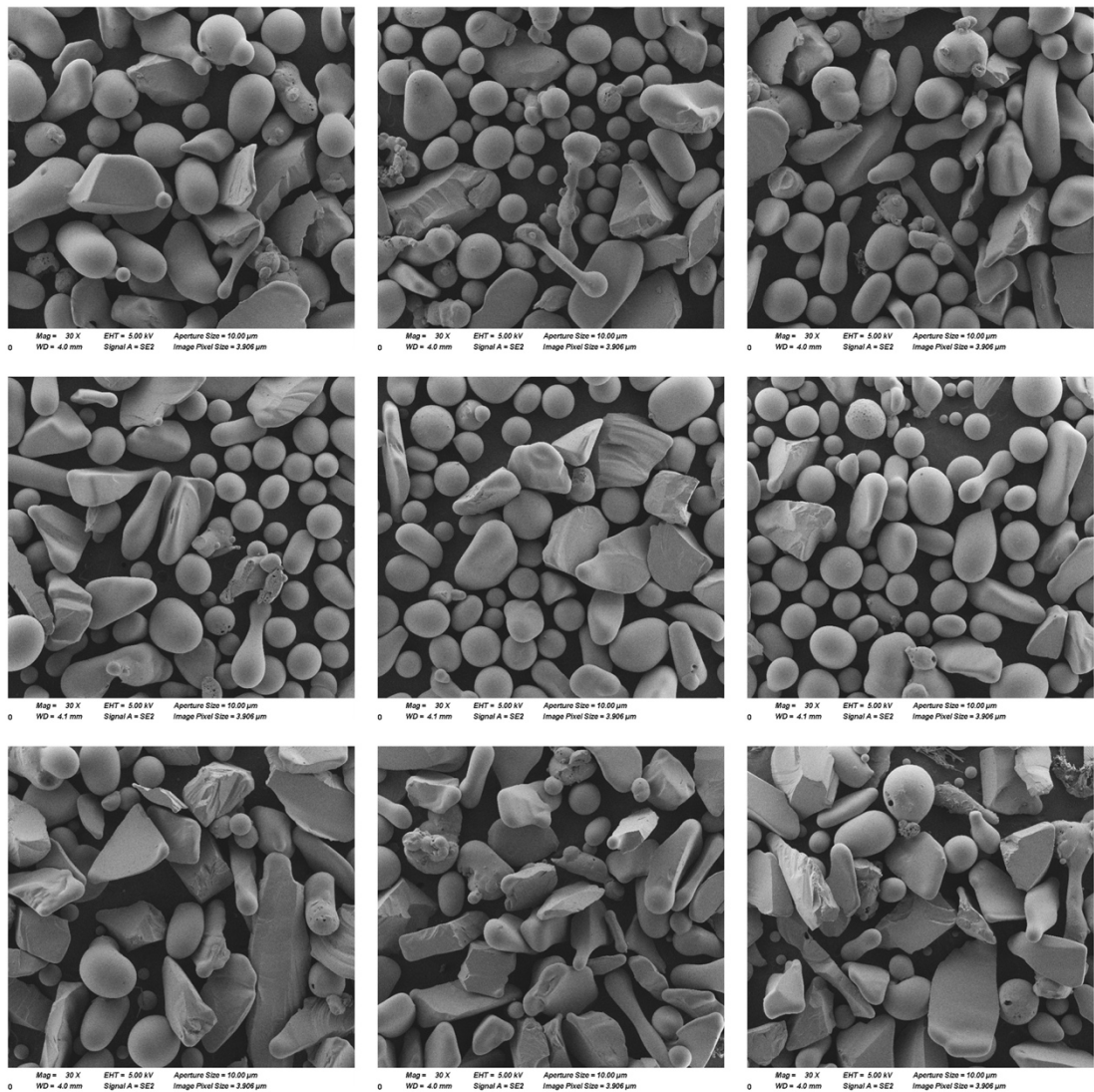
Kuva 2. Mikroskooppikuva. Yläriivi: testiajot 1-3, keskirivi: testiajot 4-6, alarivi: testiajot 7-9



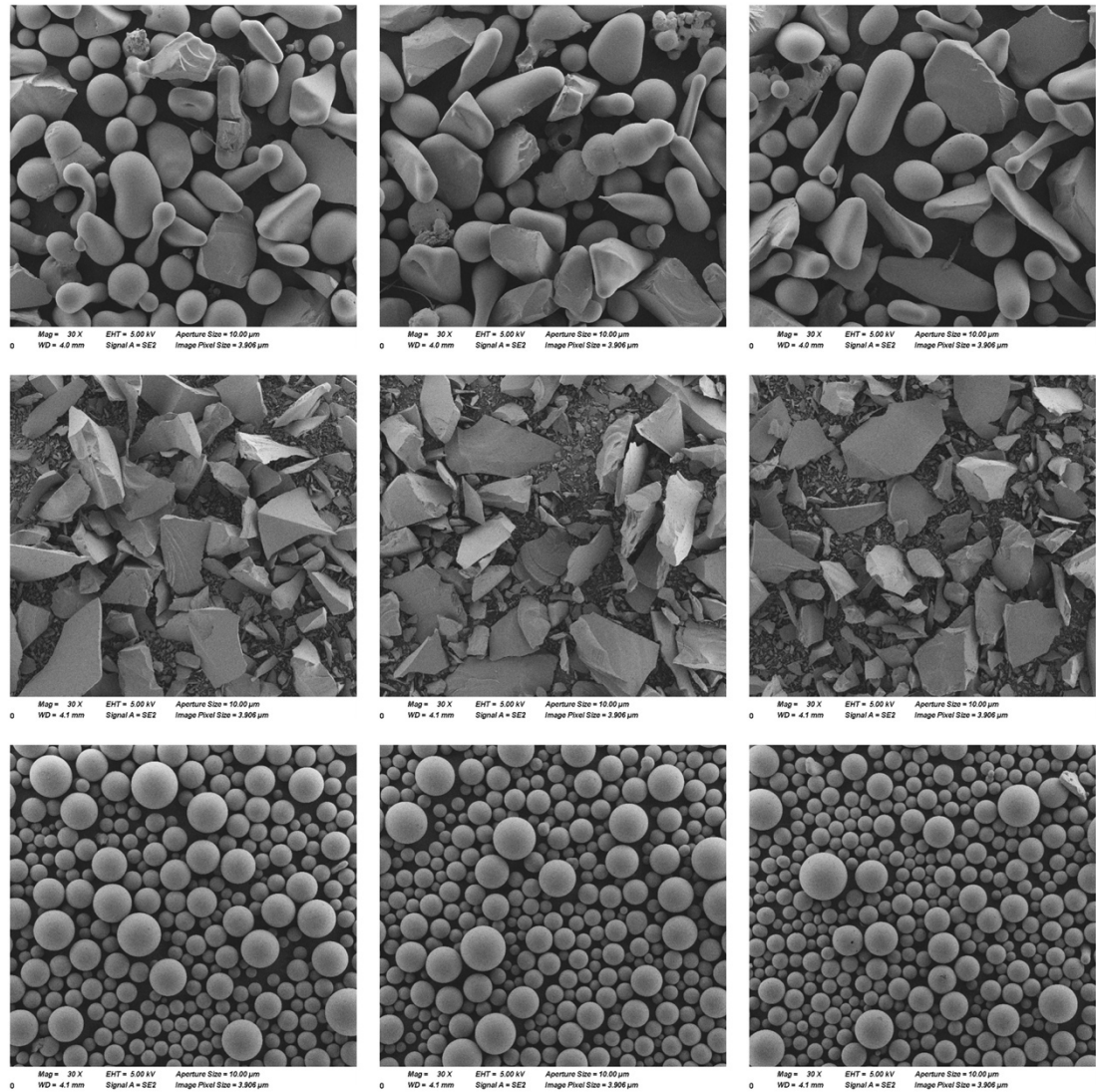
Kuva 3. Mikroskooppikuva. Yläriivi: testiajot 10, 13 ja 14, alarivi: testiajot 15-17

4.2 SEM-kuvat

SEM-kuvat otettiin testiajoista 1, 4, 13 ja 14. Vertailuna käytettiin lasigranulaa (BG) sekä kaupallista lasisfääriä (Mo). 30x-suurennoksella (Kuva 4 ja Kuva 5) nähtiin kokonaiskuva lasisfäärien suhteellisesta määrästä. Kuvien perusteella onnistuneimmat ajot olivat 1 ja 4. Testiajon 13 ja 14 näytteissä oli nähtävissä huomattavasti enemmän epäsäännöllisiä partikkeleita.

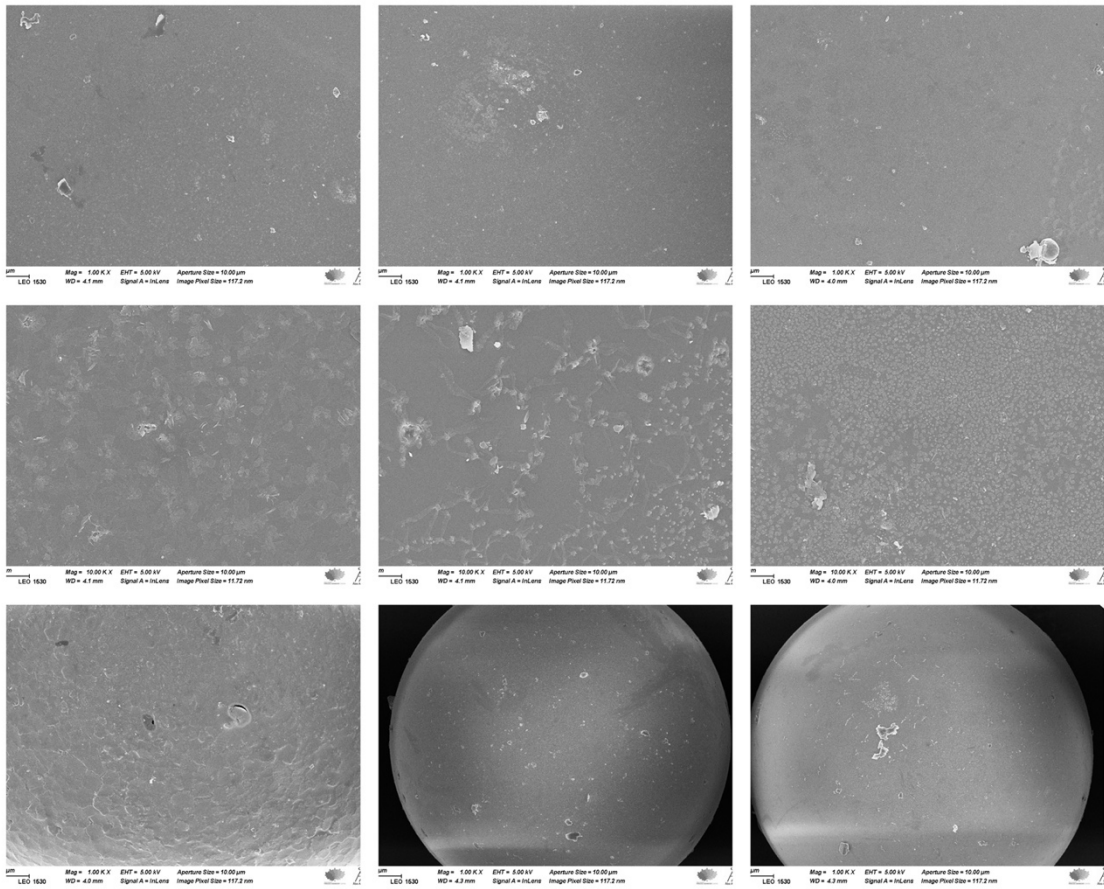


Kuva 4. SEM-kuvia 30x-suurennoksella. Yläriivi: testiajo 1, keskiriivi: testiajo 4, alariivi: testiajo 13.



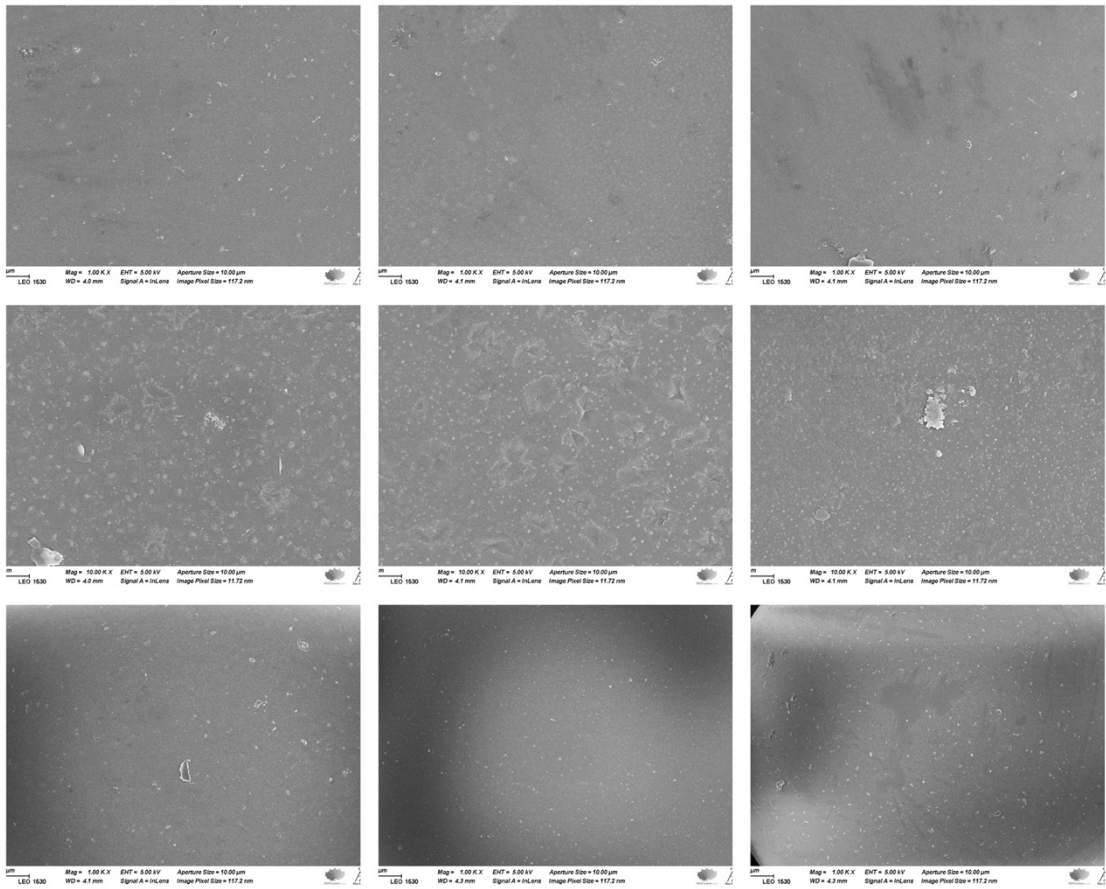
Kuva 5. SEM-kuvia 30x-suurennoksella. Yläriivi: testiajo 14, keskirivi: BG, alarivi: Mo.

1000x- ja 10 000x- suurennoksilla tarkasteltiin lasipartikkelien pintarakennetta, jolloin voitiin kartoittaa niiden kiteytymistä. Kiteytymistä havaittiin jokaisessa näytteessä, myös vertailunäytteissä, vaikka näytteet olivat säilytetty asianmukaisesti eksikaattorissa kosteudelta suojattuna eikä testiajojen aikana suhteellinen kosteus noussut ongelmaksi. Kidemäiseltä näyttävä rakenne voi johtua myös hydroksiapatiittikerroksesta. Testiajo 1:n kuvissa (Kuva 6) havaittiin verrattaen isoja-kin kiteitä partikkeleiden pinnalla.



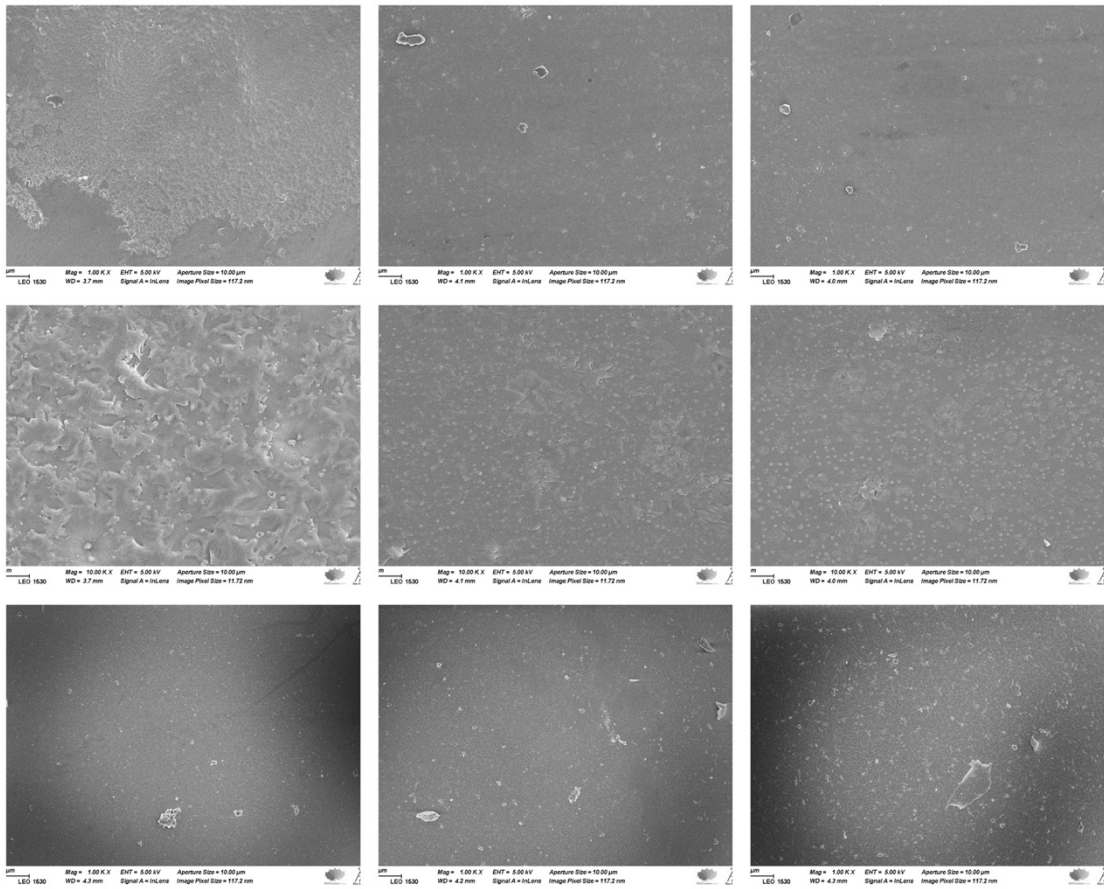
Kuva 6. SEM-kuvia testiajosta 1. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskiriivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alariivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

Testiajo 4:n partikkelien pinnassa oli havaittavissa edellistä vähemmän kide-
mäistä rakennetta (Kuva 7), vaikkakaan ero ei ollut suuri.



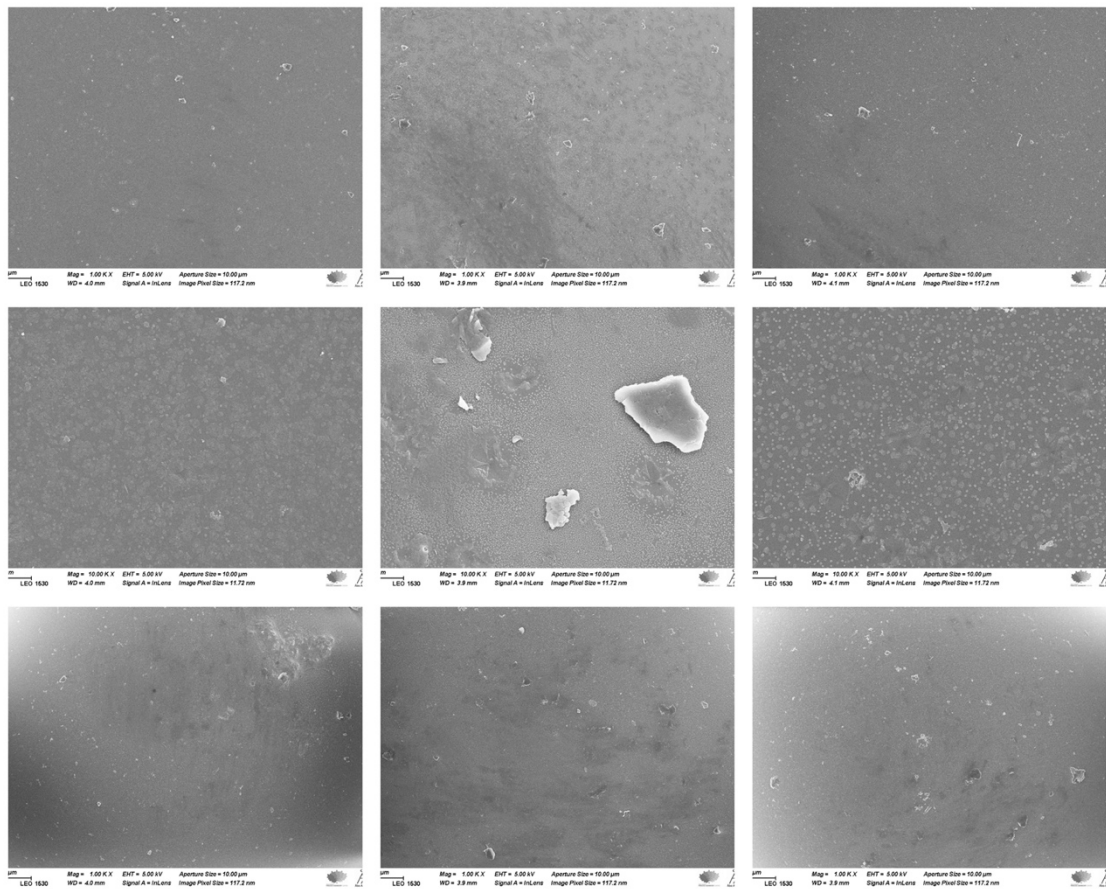
Kuva 7. SEM-kuvia testiajosta 4. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskirivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

Myös testiajo 13:n (Kuva 8) partikkeleiden pinnassa havaittiin satunnaisesti iso-jakin kiteitä.



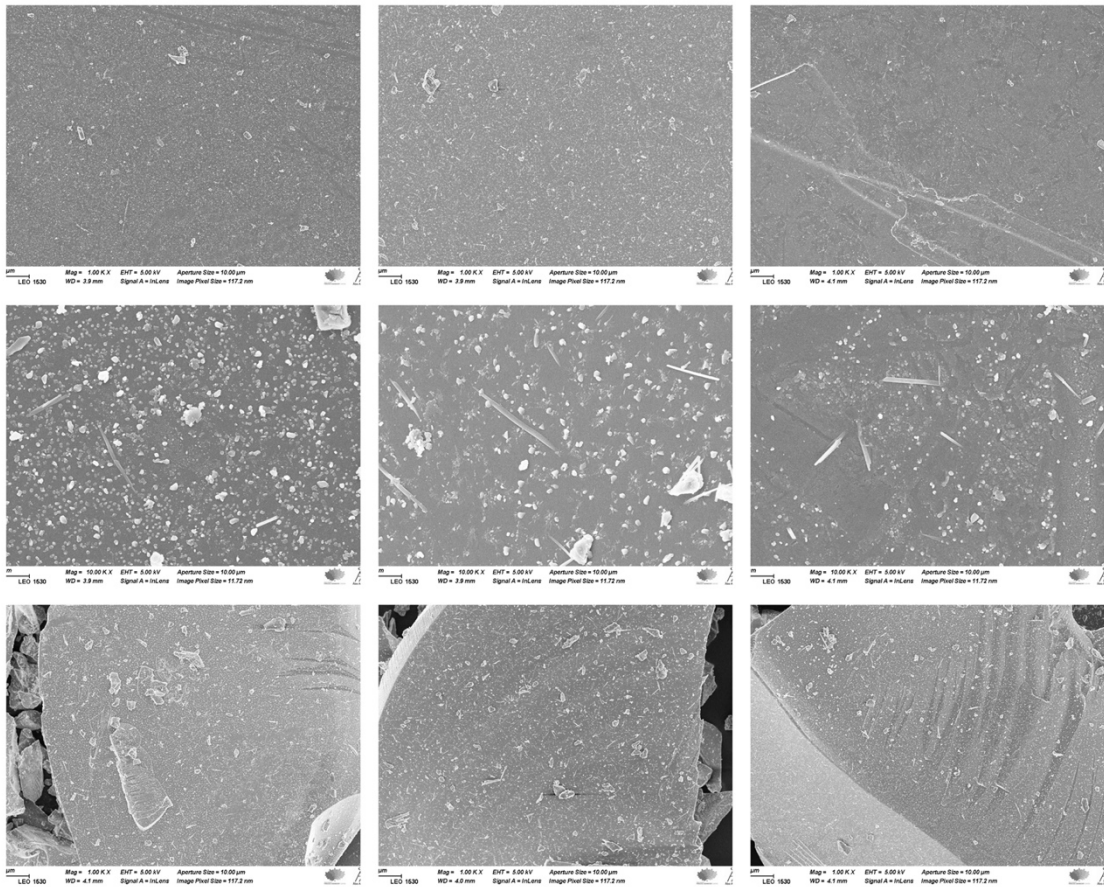
Kuva 8. SEM-kuvia testiajosta 13. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskiriivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

Testiajo 14:n kuvissa (Kuva 9) havaittiin suurin yksittäinen kite partikkelin pinnassa.



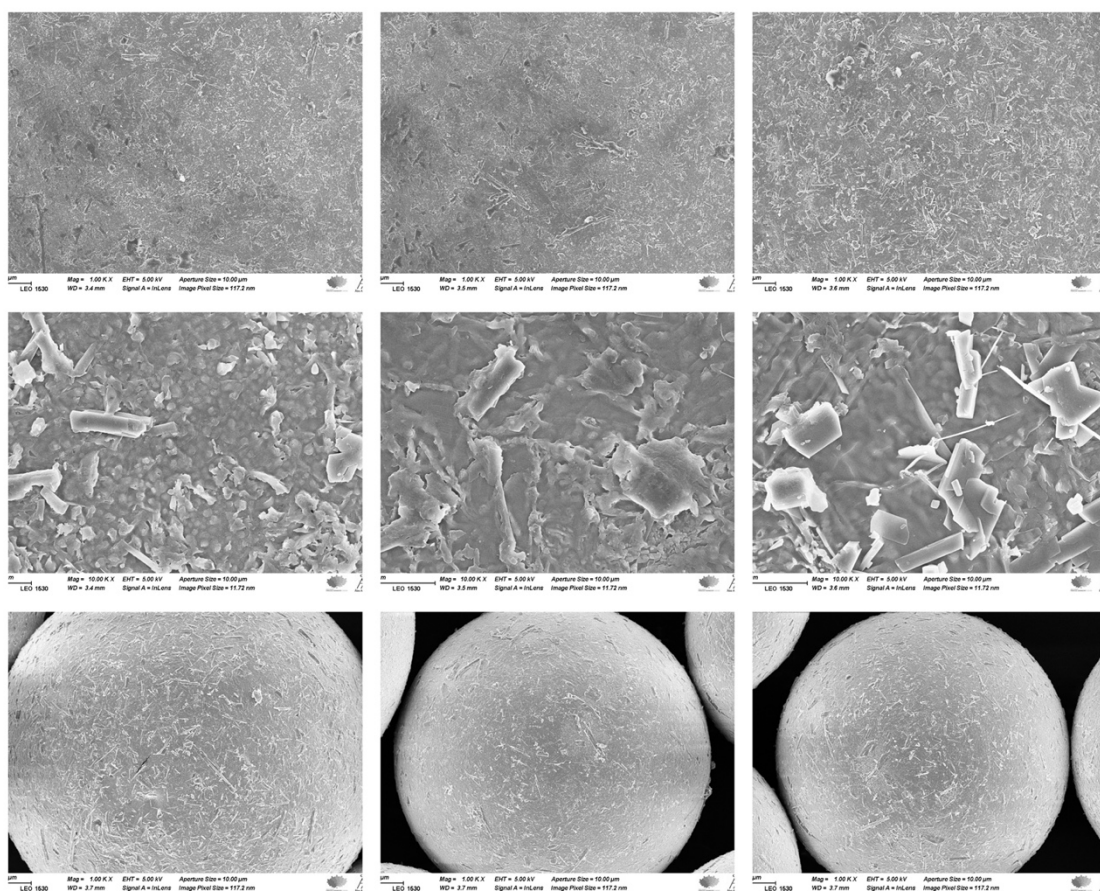
Kuva 9. SEM-kuvia testiajosta 14. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskiriivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

Lasigranulan pinnassa havaittiin testiajojen kuviin verrattuna enemmän kiteitä (Kuva 10), mikä osaltaan selittää kidemäisen rakenteen myös testiajojen partikkelien pinnassa. Kiteet olivat suhteellisen pienikokoisia. Osa kiteistä voi myös olla epäpuhtauksia.



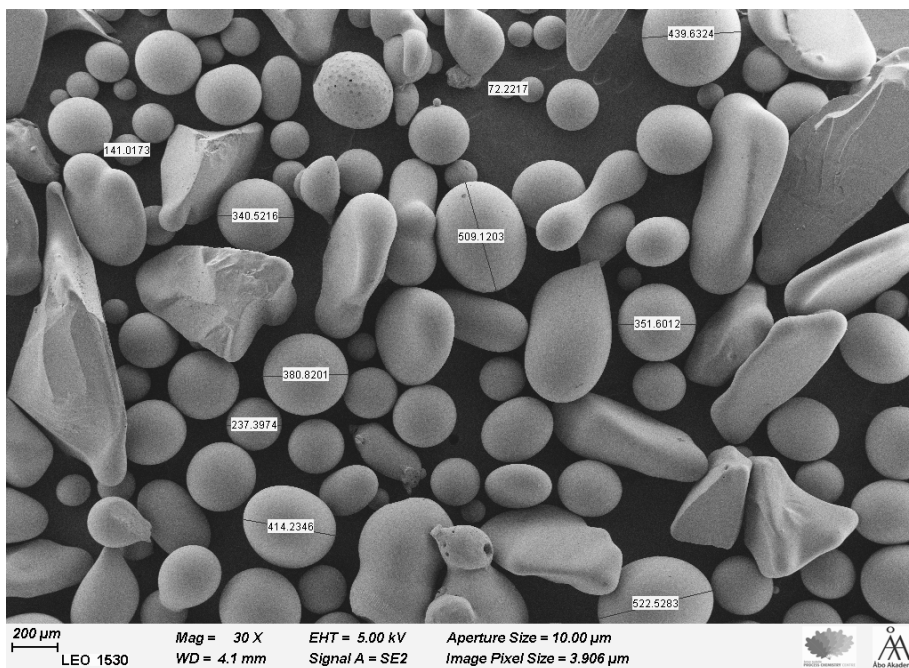
Kuva 10. SEM-kuvia lasigranuloista. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskiriivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

Lasisfääreissä oli havaittavissa paljon kiteitä, jotka olivat myös kooltaan suurempia kuin muissa näytteissä (Kuva 11). Lasisfäärinäyte oli kuitenkin näytteistä ainoa, jonka asianmukaisesta säilytyksestä ei ollut varmuutta, vaan se on saattanut jossain kohtaa altistua kosteudelle, mahdollisesti jo valmistusvaiheessa.

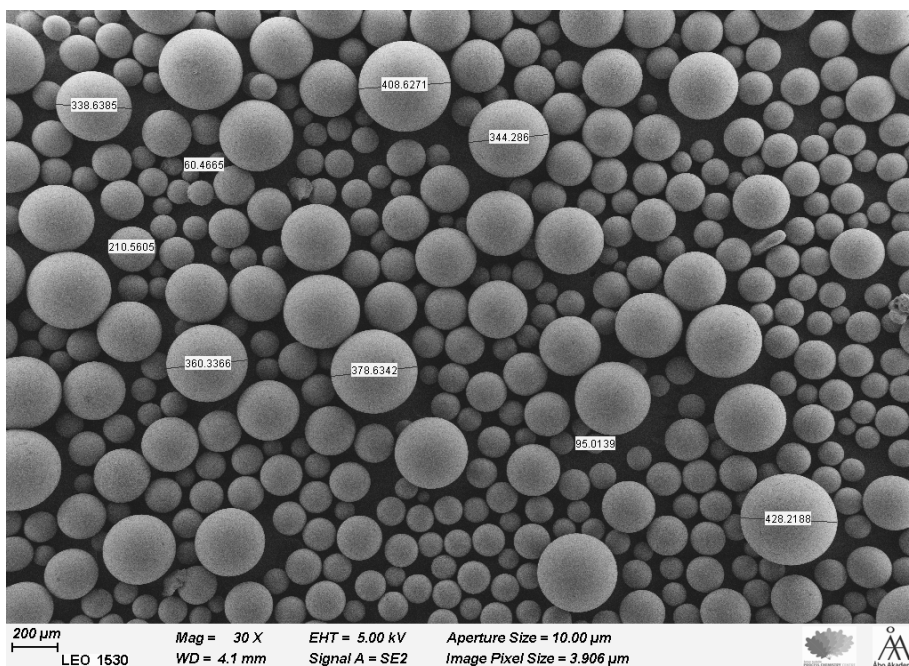


Kuva 11. SEM-kuvia lasisfääreistä. Yläriivi: 1000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta. Keskiriivi: 10 000x-suurennos suurempien partikkelien pinnasta, alarivi: 1000x-suurennos pienemmistä partikkeleista.

SEM-kuvista havaittiin myös kokoeroja testiajonäytteiden ja lasisfäärivertailunäytteen välillä (Kuva 12 ja Kuva 13). Lasisfääreistä suuri osa oli alle 350 µm, testiajojen näytteissä partikkelien halkaisija vaihteli suuresti isoimpien ollen yli 500 µm. Näitä, halkaisijaltaan yli 500 µm kokoisia partikkeleita oli sekä pyöristyneitä että pyöristymättömiä.



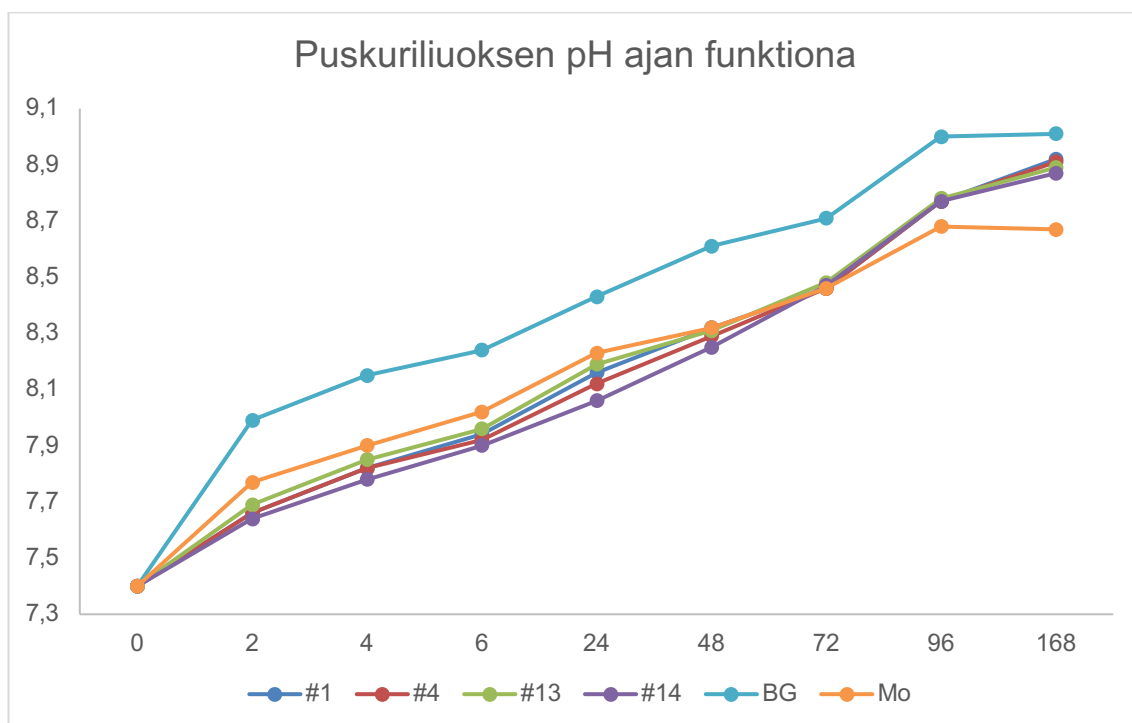
Kuva 12. SEM-kuva mitoilla testiajosta 4.



Kuva 13. SEM-kuva mitoilla vertailuna olleista lasisfääreistä.

4.3 Puskuriliuoksen pH-arvon määrittäminen

Puskuriliuoksen pH:ssa todettiin kunkin näytteen kohdalla oletettu jyrkkä nousu ensimmäisen kahden tunnin aikana (Kuvio 11). Kumpikin vertailunäyte (BG ja Mo) vaikutti saavuttavan maksimaalisen pH-arvonsa 96 tunnin kohdalla, mutta testiajojen näytteiden pH jatkoi nousua vielä tämän ajan jälkeen. Korkeimman pH-arvon saavutti vertailunäytteenä ollut lasigranula, kuten teorian perusteella oletettiin. Epäsäännölliset partikkelit vaikuttavat enemmän puskuriliuokset pH-arvoon, koska niiden pinta-ala on suurempi. Tästä syystä oli myös oletettua, että testiajojen näytteiden pH-arvot osuvat vertailunäytteiden väliin, sillä niiden joukossa on sekä lasisfäärejä että epäsäännöllisiä partikkeleita.



Kuvio 11. Näytteiden puskuriliuosten pH ajan funktiona.

5 Pohdinta

Tämän opinnäytetyön aikana lopullista tavoitetta ei saavutettu. Pienimpiä, halkaisijaltaan alle 300 µm kokoisten lasigranuloita, saatiin pyörästettyä lähes sataprosenttisesti, mutta lähemmäs ja yli 500 µm halkaisijaltaan olevia lasigranuloita jäi pyöristymättä tavoiteltua enemmän. Vertailunäytteenä olleiden lasisfäärien joukossa oli ainoastaan yksi satunnainen epäsäännöllinen partikkeli, mutta lasisfäärit olivat myös pääsääntöisesti kooltaan pienempiä kuin testiajoissa saadut lasisfäärit.

Tulosten valossa on selvää, että prosessista löytyy vielä monta jatkokehittämistä vaativaa kohtaa ennen kuin se voidaan siirtää tuotantoon. Testiajojen välillä putki oli joka kerta puhdistettava harjalla, koska putkeen jääneet partikkelit lisäsivät myös seuraavissa ajoissa putkeen tarraavien partikkelien määrää. Tämä oli työlästä ja hidasta, etenkin kun putken piti antaa jäähtyä riittävästi, ennen kuin siihen koski harjalla, jotta harjakset eivät sulaneet. Harjaksia päätyi myös näytteisiin, mikä on tuoteturvallisuusriski, kun kyseessä on lääkinnällinen laite.

Testiajot suoritettiin niin suurella virtausnopeudella, kuin paineilmalle oli mahdollista. Paineilma toimi siis ikään kuin rajoittavana tekijänä testeissä, jolloin asetyleenin virtausta piti laskea optimaalisen suhteen aikaansaamiseksi. Sillä virtausnopeuksien suhteella, jolla teorian mukaan saadaan aikaiseksi kuumiin liekkiä ja sitä kautta eniten sfäärejä, saatiin lopputulokseksi paljon aggregoituneita partikkeleita. Lisäksi putkeen oli jäänyt hukkaan suhteessa paljon partikkeleita. Kysymykseksi jäikin, olisiko suuremmalla virtauksella jäänyt vähemmän partikkeleita putkeen.

Testien ulkopuolelle jäi myös pitkäkestoisemmat ajot, joita tuotannon puolella pitäisi pystyä toteuttamaan prosessin kannattavuuden takaamiseksi. Testiajojen pituuden määrittä hiilidioksiditason nousu lähelle 1000 ppm, kun liekkiä oli pidetty käynnissä kolme minuuttia. Tämän opinnäytetyön toteutuksen aikana kaikki laitteeseen liittyvät osat ja säätimet olivat samassa tilassa, mutta jatkossa voisi järjestää niin, että henkilö ohjaa laitetta toisaalta, jolloin hiilidioksiditaso ei rajoita

ajon pituutta. Vaihtoehtoisesti tilan ilmastointia voisi tehostaa siten, jolloin hiilidioksiditaso ei nousisi yli riskirajan.

Menetelmän toistettavuuden takaamiseksi syöttökohta pitäisi saada paremmin vakioitua. Syöttölaitetta joutui välillä siirtämään, joten syöttökohdissa saattoi olla millimetrien ero, mikä asetyleeniliekissä voi olla merkittävä.

Jatkossa olisi myös aiheellista selvittää jokin keino, jolla saisi eroteltua lasigranulan ja lasisfäärin. Tämän tutkimuksen perusteella vaikuttaa todennäköiseltä, että satunnaisia pyöritysmättömiä partikkeleita päätyy keräysastiaan parhaimmillakin asetuksilla. Varmuutta ei ole myöskään kaupallisten lasisfäärien suhteen, onko niiden valmistuksessa käytetty jonkinlaista seulontamenetelmää.

Lopuksi yhteenvetona voidaan todeta, että tämän työn myötä pyöritysmenetelmän kehittäminen edistyi, mutta jatkossa vaaditaan vielä paljon tutkimus- ja kehitystyötä, ennen kuin menetelmä on valmis otettavaksi käyttöön tuotannon puolella.

Lähteet

Arstila, H. 2008. Crystallization Characteristics of Bioactive Glasses. Åbo Akademi, Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Saatavilla pdf:nä <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/44023/ArstilaHanna.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Barros, E. C., Sene, F. F. & Martinelli, J. R. Study of the spheronization process of glass particles for internal selective radiotherapy application. Eighth International Latin American Conference on Powder Technology, November 06 to 09. Brazil.

BonAlive Biomaterials Ltd. 2021. Verkkosivut. Viitattu 23.8.2022. <https://www.bonalive.com/en/>

Bortot, M. B., Prastalo, S. & Prado, M. 2012. Production and Characterization of Glass Microspheres for Hepatic Cancer Treatment. Procedia Materials Science 1.

Brauer, D.S. & Möncke, D. 2017. Introduction to the Structure of Silicate, Phosphate and Borate Glasses. RSC Smart Materials No 23. The Royal Society of Chemistry.

Duodecim Terveyskirjasto. 2016a. Lääketieteen sanasto. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 24.8.2022 <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt00040>

Duodecim Terveyskirjasto. 2016b. Lääketieteen sanasto. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 24.8.2022 <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt00225/>

Edvardsson, M. 2018. What is a Biomaterial? Viitattu 23.8.2022. <https://www.biolinscientific.com/blog/what-is-a-biomaterial>

Fagerlund, S. & Hupa, L. 2017. Melt-derived Bioactive Silicate Glasses. RSC Smart Materials No 23. The Royal Society of Chemistry.

Helmenstine, A. M. 2019. How to Make Tris Buffer Solution for Medical or Lab Use. ThoughtCo. Viitattu 24.8.2022 <https://www.thoughtco.com/how-to-make-tris-buffer-solution-603668>

Hossain, K. M. Z., Patel, U. & Ahmed, I. 2014. Development of microspheres for biomedical applications: a review. University of Nottingham.

Hupa, L. & Karlsson, K. H. 2017. Tailoring of Bioactive Glasses. RSC Smart Materials No 23. The Royal Society of Chemistry.

Lukin, L. 2022. Liekkipyöröstysmenetelmän kehitys bioaktiiviselle S53P4-lasille. Turun yliopisto.

Kaur, G. 2017. Bioactive glasses, potential biomaterials for future therapy. Patiala: Thapar University.

Kaya, M. ym. 2021. Sponge-derived natural bioactive glass microspheres with self-assembled surface channel arrays opening into a hollow core for bone tissue and controlled drug release applications. Chemical Engineer Journal, Volume 407, Marc 2021.

Lee, M. ym. 2017. A Comparative Study of Production of Glass Microspheres by using Thermal Process. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 205 012022.

Massera, J., Fagerlund, S., Hupa, L. & Hupa, M. 2011. Crystallization Mechanism of the Bioactive Glasses, 45S5 and S53P4. Åbo Akademi University.

Merkku, K. 2014. Rasvakudosperäiset kantasolut ja kasvutekijät kallon alueen luukudospuutosten hoidossa. Oulun yliopisto. Viitattu 24.8.2022. Saatavilla pdf-muodossa <http://jultika.oulu.fi/files/nbnfioulu-201405131378.pdf>

Oy Linde Gas Ab. Asetyleeni. Paras polttokaasuratkaisu. Viitattu 13.9.2022. Saatavilla pdf-muodossa https://www.linde-gas.fi/fi/images/Linde_Acetylene_Brochure_FI_tcm634-120437.pdf

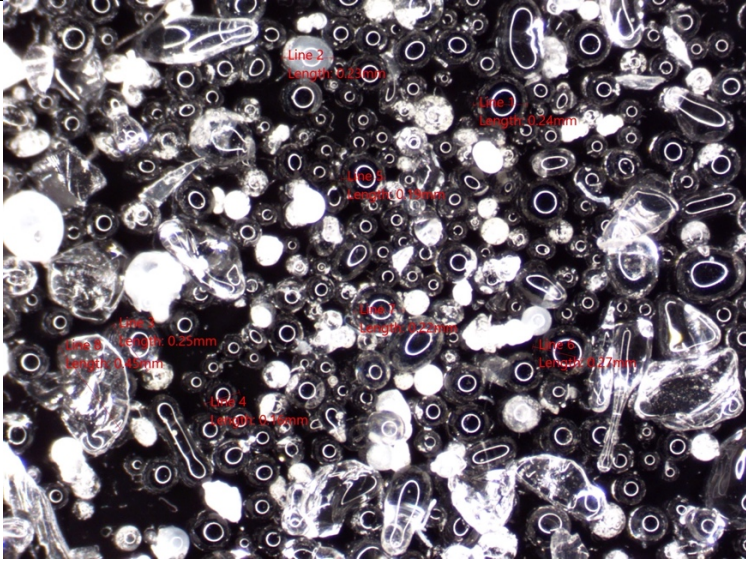
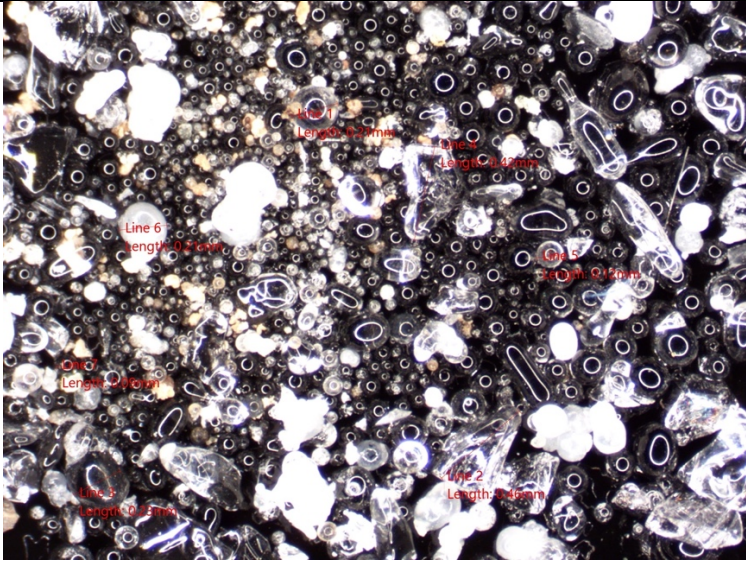
Swapp, S. 2017. Scanning Electron Microscope. University of Wyoming. Viitattu 24.8.2022 https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html

Tarnanen K. ym. 2015. Vakaa sepelvaltimotauti (stabiili angina pectoris). Käyvän hoidon potilasversiot. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 27.8.2022 <https://www.terveyskirjasto.fi/khp00111>

University of Cambridge. 2022. Looking at materials up close – The scanning electron microscope (SEM). Department of Materials Science and Metallurgy. Viitattu 13.9.2022 <https://www.rruc.msm.cam.ac.uk/outreach/articles/the-scanning-electron-microscope>

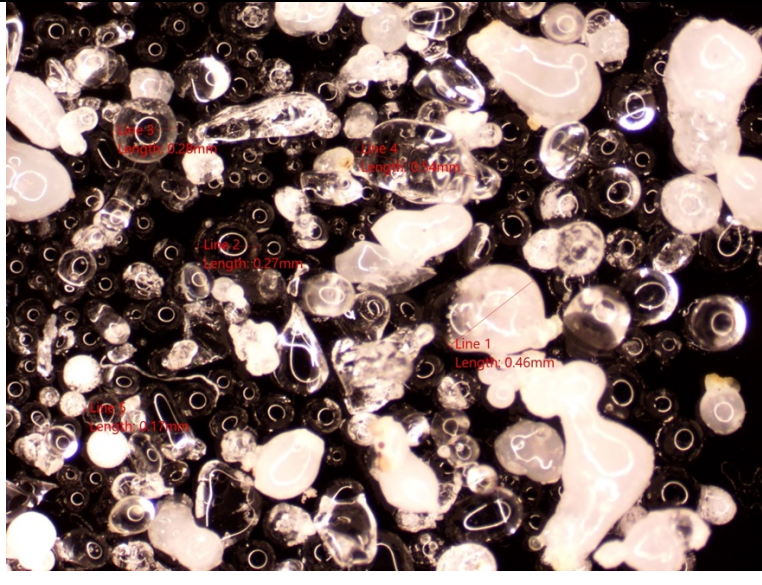
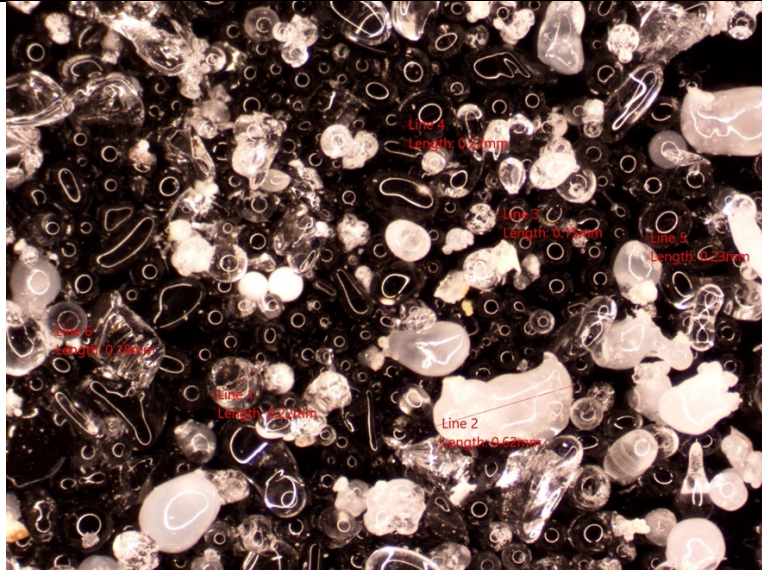
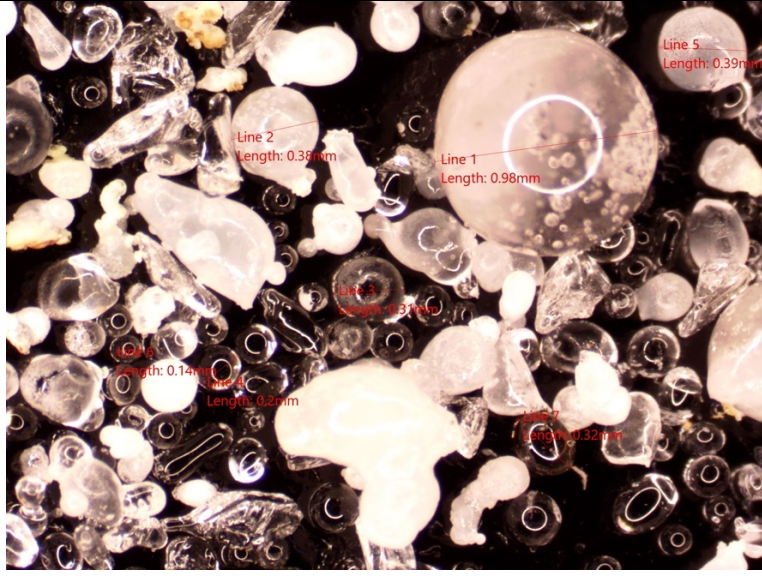
Wypych. 2018. Osteoinductive and other bone tissue engineering fillers. Functional Fillers. Viitattu 24.8.2022 <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/osteoconduction>

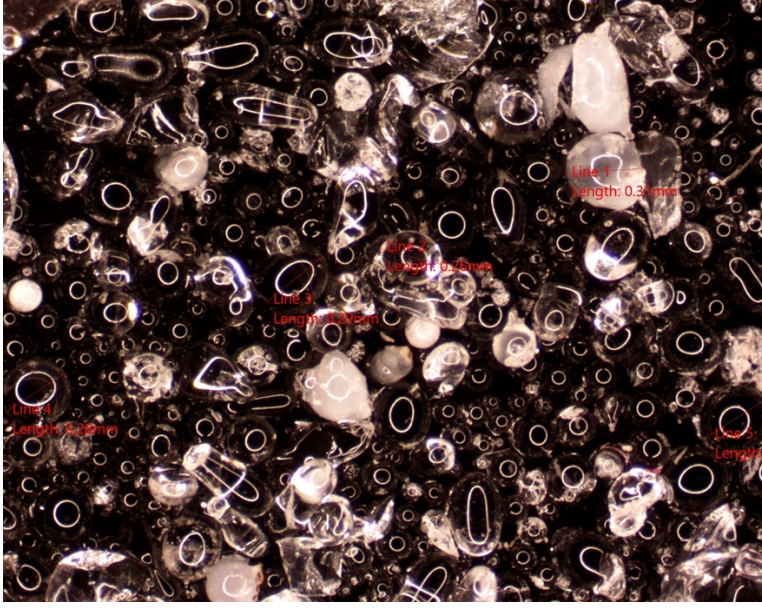
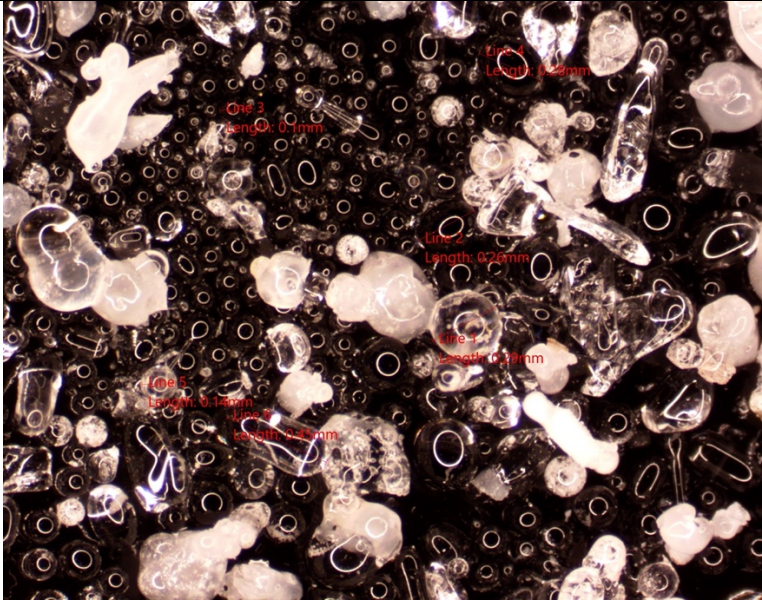
Mikroskooppikuvat ja havainnot

id	Mikroskooppikuva	Havainnot
#1		<p>Suurin osa pyörityneitä, muutamia pillerimäisiä partikkeleita joukossa</p>
#2		<p>Suurin osa pyörityneitä, mutta kokoluokalta pieniä. Pillerimäisiä ja aggregoituneita joukossa.</p>

<p>#3</p>		<p>Suhteellisen paljon pyöristymättömiä</p>
<p>#4</p>		<p>Isoimmat partikkelit pyöristymättömiä</p>
<p>#5</p>		<p>Isoimmat partikkelit pyöristymättömiä. Pillerimäisiä partikkeleita joukossa.</p>

<p>#6</p>		<p>Isoimmat partikkelit pyöritysmättömiä. Ei aggregaatiota.</p>
<p>#7</p>		
<p>#8</p>		

#9	 <p>Line 3 Length: 0.28mm</p> <p>Line 4 Length: 0.24mm</p> <p>Line 2 Length: 0.27mm</p> <p>Line 1 Length: 0.46mm</p> <p>Line 5 Length: 0.17mm</p>	
#10	 <p>Line 4 Length: 0.23mm</p> <p>Line 5 Length: 0.25mm</p> <p>Line 6 Length: 0.28mm</p> <p>Line 7 Length: 0.23mm</p> <p>Line 1 Length: 0.21mm</p> <p>Line 2 Length: 0.62mm</p>	
13	 <p>Line 5 Length: 0.39mm</p> <p>Line 2 Length: 0.38mm</p> <p>Line 1 Length: 0.98mm</p> <p>Line 3 Length: 0.37mm</p> <p>Line 6 Length: 0.14mm</p> <p>Line 4 Length: 0.27mm</p> <p>Line 7 Length: 0.32mm</p>	

14		
15		Pillerimäisiä ja aggregoituneita partikkeleita, mahdollisesti ki-teytymistä

