



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

JOHANNA LAINE

ANTIMIKROBISTEN PLA JA PLGA -SÄHKÖKEHRÄTTYJEN NANOKUITUJEN VALMISTAMINEN

Diplomityö

Tarkastaja: professori Pertti Nousiainen

Tarkastaja ja aihe hyväksytty
Automaatio-, kone- ja materiaaliteknii-
niikan tiedekuntaneuvoston kokouk-
sessa 7. joulukuuta 2011

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Kuitu- ja tekstiilitekniikan koulutusohjelma

LAINÉ, JOHANNA: Antimikrobisten PLA ja PLGA -sähkökehrättyjen nanokuitujen valmistaminen

Diplomityö, 64 sivua, 18 liitesivua

Toukokuu 2013

Pääaine: Kuitutekniikka

Tarkastaja: professori Pertti Nousiainen

Avainsanat: Sähkökehruu, antimikrobiset lisäaineet, kitosaaninanopartikkelit, hopeananopartikkelit, rosiini, PLA, PLGA

Tulehdukset ovat erityinen huolenaihe haavojen hoidossa, kudosteknologiassa, implan-toinnissa ja leikkausten jälkeisissä paranemisprosesseissa. Useat materiaalit tarjoavat hyvän kasvualustan bakteereille, joiden aiheuttamat tulehdukset ovat haitaksi kudosten paranemiselle. Perinteisesti tulehduksia estetään ja hoidetaan oraalisella antibiootihoidolla, jossa on useita haittoja verrattuna siihen, että vaurioituneen kudoksen kanssa kontaktissa olevat materiaalit olisivat esimerkiksi antimikrobisia. Sähkökehruunetelmällä valmistettuja nanokuituja tutkitaan paljon pienen huokoskoon, suuren pinta-ala-tilavuussuhteen sekä laajojen raaka-ainemahdollisuuksien vuoksi. Nanokuituiset rakenteet soveltuvat useisiin lääketieteen sovelluksiin. Niihin voidaan sisällyttää esimerkiksi lääkeaineita kohdistettua hoitoa varten edistämään vaurioituneen kudoksen paranemista. Lääketieteen sovelluksissa käytettävät materiaalit on oltava muun muassa myrkyttömiä, ei-tulehduttavia, bioyhteensopivia ja joissain tapauksissa myös biohajoavia.

Tässä työssä käsitellään polylaktidipohjaisten nanokuitujen valmistamista sähkökehruunetelmällä erityisesti lääketieteen sovelluksia ajatellen. Työn tavoitteena oli selvittää antimikrobisten kitosaani- ja hopeananopartikkelien sekä rosiinin käyttöä PLA ja PLGA-polymeerien lisäaineena. Työssä tutustutaan aihepiiristä julkaistuun kirjallisuuteen ja artikkeleihin. Työn kokeellisessa osuudessa tutkitaan PLA ja PLGA-sähkökehruuliuosten ja -nanokuitujen valmistusta, kitosaani- ja hopeananopartikkelien valmistusta sekä niiden että rosiinin käyttöä PLA ja PLGA-polymeerien lisäaineina.

Jauhemuotoon valmistettu nanokitosaani osoittautui kirjallisuustutkimusten perusteella potentiaalisesti lisäaineeksi PLA ja PLGA-polymeereille. Työssä tutkitun kitosaanin moolimassan alentaminen ja prosessointi nanopartikkeleiksi ei kuitenkaan onnistunut useiden käytännönongelmien vuoksi. Hopeananopartikkelien valmistus kitosaanin avulla on perinteisiä menetelmiä ympäristöystävällisempi. Uudessa menetelmässä hopeananopartikkelit ovat liuosmuodossa, joka sisältää muun muassa vettä, joka ei sovi käytettäväksi biohajoavien PLA ja PLGA-polymeerien kanssa. Tämä keskeytti nanopartikkelien valmistuksen. Kirjallisuustutkimusten perusteella veden korvaaminen kaikkien komponenttien kannalta sopivaksi on kuitenkin mahdollista. Lisäksi hopeananopartikkeliliuos saattaa olla mahdollista kylmäkuivata kitosaaninanopartikkelien tapaan jauhemuotoon, jolloin sen jatkokäyttö helpottuu. Rosiini saatiin liuotettua ja yhdistettyä onnistuneesti PLA-polymeerin kanssa, mutta käytetty liuotin ei sopinut sähkökehruuprosessiin liian nopean haihtumisen vuoksi. Kuituja saatiin valmistettua riittävästi osoittamaan PLA/rosiini-nanokuitujen valmistuksen olevan kuitenkin mahdollista. Kitosaani- ja hopeananopartikkelien sekä rosiinin prosessointia ja käyttöä PLA ja PLGA-sähkökehrättyjen nanokuitujen lisäaineena on tutkittava lisää, jotta niitä voidaan suunnitella käytettäväksi lääketieteellisissä sovelluksissa.

ABSTRACT

TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Master's Degree Programme in Fibre and Textile Technology

LAINE, JOHANNA: Preparation of antimicrobial PLA and PLGA nanofibres by electrospinning method

Master of Science Thesis, 64 pages, 18 Appendix pages

May 2013

Major: Fibre technique

Examiner: Professor Pertti Nousiainen

Keywords: Electrospinning, antimicrobial substances, chitosan nanoparticles, silver nanoparticles, rosin, PLA, PLGA

Infections are a great concern in wound healing, tissue engineering, implantation and post-surgical healing processes. Several materials act as good substrates for bacteria causing infections that disturb healing of the tissue. Usually infections are prevented and treated with oral antibiotic treatment which has many disadvantages compared to treating with antimicrobial materials connected to the injured tissue. Nanofibres produced by electrospinning are studied because of their small pore size, high surface area-volume-ratio and wide material possibilities. Nanofibre structures are suitable for many medical applications. For example they can be included with drugs for targeted treatment to enhance healing of the injured tissue. Used materials in medical applications have to be non-toxic, anti-inflammatory, biocompatible and in some cases also biodegradable.

This thesis discusses the production of polylactide-based nanofibres by electrospinning method especially concerning medical applications. The aim of this thesis was to determine the use of antimicrobial chitosan nanoparticles, silver nanoparticles and rosin as additives for PLA and PLGA polymers. Thesis discusses about literature and articles published about these topics. The experimental part of this thesis studies the preparation of PLA and PLGA electrospinning solutions and nanofibres, and the preparation and use of chitosan nanoparticles, silver nanoparticles and rosin as additives for PLA and PLGA polymers.

Literary studies indicated powder form nanochitosan to be a potential additive for PLA and PLGA polymers. Many practical issues prevented the process to lower the molecular mass of the examined chitosan and to process it into nanoparticle form in the experiments in this thesis. The preparation of silver nanoparticles with use of chitosan is more environmentally friendly than traditional methods. In this novel method silver nanoparticles are in solution form including for example water which is unsuitable to be used with biodegradable PLA and PLGA polymers. This interrupted the preparation of nanosilver. Literary studies show that water can be replaced with other substances suitable to all solution components. Silver nanoparticle solution might also be possible to be freeze-dried into powder form like nanochitosan to ease and broaden further using abilities. Rosin was dissolved and combined with PLA solution successfully but used solvent was not suitable for electrospinning process because of its high evaporation rate. Enough PLA/rosin nanofibres were made to refer the possibility of further production. The processing and use of nanochitosan, nanosilver and rosin as additives in PLA and PLGA nanofibres produced by electrospinning method has to be further studied to be used in medical applications.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisessä yliopistossa Materiaalitekniikan laitoksen laboratorioissa professori Pertti Nousiaiselle.

Haluan kiittää työni tarkastajaa Pertti Nousiaista hyvistä ideoista ja neuvoista työn aiheita koskien sekä ohjaajaani Arja Puolakkaa korvaamattomasta avusta työn aikana ilmenneissä ongelmatilanteissa. Kiitos Marja Rissaselle pohdinta-avusta sekä hyvistä neuvoista. Kiitos myös kaikille Materiaalitekniikan laitoksen laboratorioissa kesällä 2012 töissä olleille laboranteille ja tutkijoille auttavasta kädestä ja tuesta hankalissa laboratoriotöissä. Taloudellisesta tuesta tahdon kiittää Tekstiili- ja vaatealuetieteiden tutkimuskeskus Finatex ry:tä.

Suuri kiitos myös kihlatulleni arvokkaasta tuesta ja neuvoista diplomityön sekä koko opiskelutaipaleen aikana.

Tampereella 15.4.2013

Johanna Laine

SISÄLLYS

1	Johdanto	1
2	Nanokuidut	3
3	Sähkökehruu	6
	3.1 Sähkökehruun menetelmä	6
	3.1.1 Sähköstatiikka	8
	3.1.2 Laitteisto ja olosuhteet	10
	3.2 Uudet nanokuitujen valmistusmenetelmät	11
4	Biohajoavat polymeerit	15
	4.1 Polymeerin valinta	15
	4.2 Polymeeriliuoksen ominaisuudet	16
	4.3 PLA-polymeeri	18
	4.4 PLGA-polymeeri	19
	4.5 Muut biohajoavat polymeerit	20
5	Antimikrobiset lisäaineet	22
	5.1 Kitosaani	22
	5.1.1 Ominaisuudet	22
	5.1.2 Kitosaaninanopartikkelit	23
	5.2 Hopea	25
	5.2.1 Ominaisuudet	25
	5.2.2 Hopeananopartikkelit	26
	5.3 Rosiini	28
	5.3.1 Ominaisuudet	28
	5.4 Antimikrobiset sovellukset	29
	5.4.1 Haavat ja niiden hoito	30
	5.4.2 Haavanhoitosovellukset	31
6	Kokeelliset menetelmät	33
	6.1 Materiaalit	33
	6.2 Menetelmät	33
	6.2.1 Laitteet	34
	6.2.2 Sähkökehruu	34
	6.3 Analysointimenetelmät	35
	6.3.1 Pyyhkäisyelektronimikroskopia, SEM	36
	6.3.2 Kuitujen karakterisointi	36
7	Tulokset ja niiden tarkastelu	37
	7.1 PLA-polymeerien sähkökehruu	37
	7.2 PLGA-polymeerin sähkökehruu	44
	7.3 Kitosaaninanopartikkelien valmistus	47
	7.4 Hopeananopartikkelien valmistus	48
	7.5 PLA 70/30-polymeerin lisäaineistus rosiinilla	49
	7.6 Yhteenvetoa tuloksista	52

8	Päätelmät	54
	Lähteet	56
	Liite 1: Sähkökehrukoheet	65
	Liite 2: Kuitujen halkaisijamittaukset	68

TERMIT, LYHENTEET JA NIIDEN MÄÄRITELMÄT

Agglomeraatti	Molekyylien tai pienikokoisten aineiden kasauma.
AKS	Alhaisen moolimassan kitosaani
Allogeeninen	Vierasperäinen, jonka geenit muistuttavat hyvin läheisesti kohteen geenityyppejä (esim. siirre).
Antibakteerinen	Bakteereja tappava tai niiden lisääntymistä estävä
Antimikrobinen	Mikro-organismeja, kuten bakteereja, sieniä ja alkueläimiä, tuhoava tai niiden kasvua ja lisääntymistä estävä.
Antimykoottinen	Sieniä tappava tai niiden lisääntymistä ehkäisevä, synonyymi antifungaalinen.
Autogeeninen	Omasta elimistöstä peräisin oleva (esim. siirre).
Bakteriosidinen	Bakteereja tappava
Bakteriostaattinen	Bakteerien kasvua ehkäisevä
DCM	Dikloorimetyleeni tai metyleenikloridi
Dermatofyytti	Silsasieni, yleisnimitys ihosienille, jotka kasvavat ihon, karvan tai kynnen sarveistuneessa kudoksessa.
DMAc	Dimetyyliasetamidi
DMF	Dimetyyliformamidi
DSC	Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (differential scanning calorimetry)
ECM	Solujen ulkoinen matriisi (extracellular matrix)
E. coli	Gramnegatiivinen kolibakteeri, <i>Escherichia coli</i> .
Ekseema	Yhteisnimi ryhmälle tulehduksellisia ihosairauksia, joilla on samankaltainen ulkonäkö.
GAG	Glykosaminoglykaani, pitkäketjuinen haarautumaton polysakkaridi (vanhempi nimitys mukopolysakkaridi).
GPC	Geelipermeaatiokromatografia eli koon perusteella tapahtuva analysointimenetelmä, jota käytetään esimerkiksi polymeerien moolimassan määrittämisessä.
HFIP	Heksafluori-isopropanoli
Immunoprofylaksi	Tauteja estävän aktiivisen (rokotteen) tai passiivisen (antiseerumin) immunisaation tuonti kehoon (immuno prophylaxis).
Inertti	Aine, joka ei reagoi, eikä aiheuta reaktioita muiden aineiden läsnäollessa (inert).
In vitro	Elävän organismin tai solun ulkopuolella, kuten koeputkessa tai lasimaljassa suoritettu tutkimus (kirjaimellisesti "lasissa").
In vivo	Elävässä organismissa tehty tutkimus.
IV	Sisäinen viskositeetti (intrinsic viscosity)
Karsinooma	Pahanlaatuinen epiteliaalisesta rakenteesta lähtenyt kasvain.
KKS	Korkean moolimassan kitosaani
Klusteri	Synonyymi sanalle agglomeraatti.

Kolloidi	Kaksifaasinen seostyyppi, jota voidaan pitää homogeenisen ja heterogeenisen seoksen välimuotona.
MCCH	Mikrokiteinen kitosaani (microcrystalline chitosan)
MRSA	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
PCL	Poly- ϵ -kaprolaktoni
P(D/L)LGA	Stereokopolymeerinen D- ja L-laktidikoglykolidi
PEG	Polyetyleeniglykolidi
PEO	Polyetylenioksidi-polymeeri
PGA	Polyglykolidi-polymeeri
PLA	Polylaktidi-polymeeri
PLDLA	Homopolymeerinen LD-polylaktidi
P(L/D)LA	Stereokopolymeerinen L- ja D-polylaktidi
P(L/DL)LA	Stereokopolymeerinen L- ja DL-polylaktidi
PLGA	Polylaktidikoglykolidi, maitohapon ja glykolihapon kopolymeeri.
P(L)LA	Homopolymeerinen L-polylaktidi
Proliferaatio	Lisääntyminen, määrän kasvu
Proteaasi	Yhteisnimi niille soluensyymeille, jotka aiheuttavat proteolyysin eli hajottavat proteiineja.
RJS	Pyörivä suihkukehruumenetelmä (rotatory jet-spinning process)
S. aureus	Grampositiivinen kokkibakteeri, <i>Staphylococcus aureus</i> .
Scaffoldi	Kuituinen substraatti tai tukimateriaali, jota voidaan käyttää kudosteknologisissa sovelluksissa, joissa kuidut on valmistettu luonnollisista, synteettisistä, bioyhteensopivista ja/tai biohajovista polymeereistä (scaffold).
SEM	Pyyhkäisyelektronimikroskopia (scanning electron microscope)
Sähkökehruu	Sähköstaattinen kuidutusmenetelmä (electrospinning)
TEM	Läpäisyelektronimikroskopia (transmission electron microscope)
TFA	Trifluorietikkahappo
TPP	Natrium-tripolyfosfaatti
VRE	Vankomysiiniresistentti enterokokki
m-%	Massaprosenttiyksikkö
P, cP	Viskositeetin mittayksikkö, Poise ja yleisempi muoto senttipoise.
T _g	Lasimuutoslämpötila.
G	Yksikkö Gauge, jota käytetään hypodermisistä neuloista kuvaamaan niiden ulkoista halkaisijaa.

1 JOHDANTO

Sähkökehruu on yksinkertainen ja kustannustehokas menetelmä nanokuitujen valmistukseen. Menetelmässä saadaan aikaan nanokokoisia kuituja polymeeriliuosuuttimen ja kuitujen keräysalustan välille muodostetun sähkökentän avulla. Sähkökehruunetelmällä on valmistettu nanokuituja sadoista eri polymeereistä useita eri käyttökohteita varten. Perinteinen neulasähkökehruunetelmä ei kuitenkaan tarpeeksi tehokas sovellettavaksi nanokuitujen tehdasvalmistukseen, sillä kuitujen tuotantomäärä rajoittuu aina käytettävien suuttimien lukumäärään menetelmässä. Tästä syystä nanokuitujen valmistus on ollut pienimuotoista ja lähinnä laboratoriotutkimustasoista. Viime vuosina on onnistuttu kehittämään erittäin tehokkaita sähkökehruutapoja, jotka hyödyntävät muun muassa vapaata nestepintaa, joka mahdollistaa spontaanien liossuihkujen käytännössä rajattoman muodostumisen. Tähän pohjautuen on kehitetty myös kaupallisia kehruulaitteistoja, joiden avulla onnistuu nanokuitujen jatkuva laajamittainen valmistaminen.

Biohajoavat ja bioyhteensopivat polymeerit sopivat erittäin hyvin biolääketieteen sovelluksiin. Synteettiset polylaktidipohjaiset polymeerit, kuten polylaktidi (PLA) ja polylaktidikoglykolidi (PLGA), ovat erittäin suosittuja tutkimuskohteita, sillä ne ovat ominaisuuksiltaan potentiaalisia käytettäväksi esimerkiksi kudiskasvatusalustoissa, haavanhoitosovelluksissa, ja yleisesti kaikissa vaurioitunutta ja puuttuvaa kudosta korvaavissa sovelluksissa. PLA ja PLGA-polymeerien ominaisuuksia voidaan muokata jo niiden valmistusvaiheessa esimerkiksi siten, että ne hajoavat fysiologisissa olosuhteissa käyttökohteessaan sopivalla nopeudella. Lisäksi sähkökehruunetelmä mahdollistaa, että kuituihin voidaan sisällyttää esimerkiksi kudosten paranemista edistäviä lääkeaineita tai muita ominaisuuksia, kuten antimikrobista aktiivisuutta aikaansaavia lisäaineita.

Kitosaania saadaan valmistettua kemiallisella käsittelyllä kitiinistä, jota saadaan muun muassa ruokateollisuuden sivutuotteena syntyvästä rapujen kuorijätteestä. Kitosaanin merkittävimpiin ominaisuuksiin kuuluvat hyvän saatavuuden lisäksi bioyhteensopivuus, luonnolliset hajoamistuotteet, bioaktiivisuus sekä antimikrobisuus. Kitosaania on tutkittu nanokuiduissa niin sanottuna normaalina kitosaanina ja nanopartikkelien tutkiminen on rajoittunut lähinnä kankaiden viimeistyskäsittelyihin. Nanokokoinen kitosaani on antimikrobisempaa normaaliin kitosaaniin verrattuna, jonka vuoksi sen käyttöä nanokuiduissa on syytä tutkia. Tässä työssä keskitytään erityisesti nanokitosaanin valmistukseen käytettäväksi PLA ja PLGA-polymeerien kanssa sähkökehrätyissä nanokuiduissa.

Hopean antimikrobinen ominaisuus on tunnettu jo pitkään. Hopeaa käytetään laajasti esimerkiksi implanteissa, proteeseissa, palovammojen hoidossa sekä useissa eri materiaaleissa estämään bakteerien leviämistä. Hopeaa on käytetty kuiduissa ja tekstiileissä

sisällytettynä kuituihin sekä lisättynä viimeistyskäsittelyissä. Nanokuiduissa hopeaa tutkitaan yleensä pelkistämällä hopeanitraattia eri menetelmillä. Tässä työssä keskitytään erityisesti hopeananopartikkelien valmistukseen perinteisiä ympäristöystävällisemmällä menetelmällä eli kitosaanin avulla käytettäväksi PLA ja PLGA-nanokuiduissa.

Rosiini on kuusi- ja mäntylajikkeiden pihkasta käsittelyllä saatava aine, jota on käytetty muun muassa kansanlääketieteen hoitomenetelmissä. Rosiinin on todettu soveltuvan esimerkiksi ihon haavojen ja tulehdustilojen hoitoon. Rosiini on osoittanut muun muassa antimikrobista aktiivisuutta useita eri bakteereja ja sieniä vastaan, ja se on lisäksi ominaisuuksiltaan biohajoavaa sekä bioyhteensopivaa. Rosiinia on tutkittu esimerkiksi mikro- ja nanopartikkelimuodossa lääkeaineiden kohdistetussa annostelussa sekä hopeanitraatin pelkistäjänä. Tässä työssä tutkitaan PLA:n ja PLGA:n lisäaineistamista rosiinilla.

Tämän työn tarkoituksena oli perehtyä PLA ja PLGA-polymerien lisäaineistukseen antimikrobiseksi kitosaanin, hopean ja rosiinin avulla. Työssä valmistettiin tutkittavista polymeereistä sähkökehruuliukuksia. Liukuksista kuidutettiin eri parametreilla optimeja etsien kuitunäytteitä, joita tutkittiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM). Työn tavoitteena oli valmistaa PLA ja PLGA-nanokuituja, jotka sisältävät edellä mainittuja lisäaineita. Työn teoriaosuudessa tutustutaan sähkökehruumenetelmään, biohajoaviin polymeereihin sekä antimikrobisiin lisäaineisiin ja näiden materiaalien käyttökohteisiin. Kokeellisessa osuudessa tutkittiin sopivia polymerien pitoisuuksia sähkökehruun onnistumista ajatellen sekä nanopartikkelien valmistusta ja lisäaineiden käyttöä tutkittavien polymerien kanssa. Tulosoosuudessa käydään läpi kaikki tutkimuksissa saavutetut tulokset, niiden analysointi sekä päätelmät jatkotutkimuksia ajatellen.

2 NANOKUIDUT

Nanokuituja voidaan valmistaa lukemattomista eri materiaaleista ja niitä voidaan käyttää useissa erilaisissa sovelluksissa. Pienen koon, pienten huokosten ja suuren pinta-alan vuoksi niitä tutkitaan erityisesti katalyyseissä, suodatinteknologiassa ja biolääketieteen sovelluksissa. Nanokuiduiksi luokitellaan alle 100 nm [1 s. 2] kuidut, mutta laajempaa kokoluokkaa, kuten 50-500 nm käytetään esimerkiksi kaupallisissa sovelluksissa [2]. Nanokuituiset rakenteet tarjoavat suuren pinta-ala-tilavuus sekä pinta-ala-massasuhteen, joka tyypillisesti vaihtelee 40-100 m²/g [3]. Ne soveltuvat hyvin esimerkiksi kudokasvatusalustoihin eli scaffoldeihin, implantteihin, suodatussovelluksiin ja lääkeaineiden annosteluun, sillä nanokuidut ja nanokuiturakenteen huokokset ovat samaa kokoa solujen, bakteerien ja jopa joidenkin virusten kanssa [4]. Nanokuiturakenteita on onnistuttu optimaalisia asetuksia etsiessä valmistamaan jopa niin pienihuokoisia, että solut eivät pystyneet siirtymään niihin, eikä lisääntymään kuiturakenteessa [5]. Nanokuituinen rakenne muistuttaa luonnollisen kudoksen solunulkoista matriisia (ECM), joka määritellään huokoskoon laajan jakauman, korkean huokoisuuden ja hyvien mekaanisten ominaisuuksien mukaan [6]. Nämä ovat tärkeimpiä kriteerejä ideaaliselle scaffoldirakenteelle [6]. Nanokuitujen väliset löyhät sidokset ovat suotuisia kudosten sisäänkasvulle ja solujen migraatiolle tukien hyvää leviämistä koko kuitukankaaseen. Lisäksi kolmiulotteinen avoin huokoinen rakenne, jolla on korkea spesifinen pinta-ala, on ihanteellinen solujen kiinnittymistä ja lisääntymistä ajatellen. [5] Nanokuiturakenteet vähentävät haavanhoidossa arpeutumista, sillä ne antavat soluille niin sanotusti paremman itsekorjautumisen kartaston [7]. Lisäksi nanokuidut antavat kokonsa vuoksi haavoille puhtaamman ympäristön ja paremman suojan bakteerien invaasiota vastaan toimimalla seulana [7].

Nanokuituja voidaan valmistaa sähkökehruun avulla (eng. *electrospinning*, synonyymi sähköstaattinen kuidutus). Yleisimmin käytössä olevassa valmistusmenetelmässä nanokuitujen valmistusta varten liuotettu polymeeri vedetään sähköisten voimien avulla kapillaarineulan läpi kuiduksi, joka kerätään johtavalle alustalle. [1 s. 15] Polymeeri valitaan lopputuotteen vaatimusten mukaan, ja polymeeriliuos voi sisältää lisäksi muitakin aineita, kuten esimerkiksi tässä työssä käsiteltäviä antimikrobisia aineita. Neulalla tapahtuvassa sähkökehruussa käytetään yhtä tai useampaa kapillaarineulaa, joiden läpi liuos vedetään kuiduksi. Alusta voi olla esimerkiksi tasainen levy, verkko tai muotti lopputuotteesta riippuen. Alustan ainoa vaatimus on, että se on johtava. Nanokuidut pyritään yleensä valmistamaan sileiksi ja jatkuviksi, mutta niissä voi esiintyä huokosia ja pisaramaisia helmiä polymeeriliuoksen tai sähkökehruun parametriongelmiin vuoksi. Nanokuitujen pinnan rakenteeseen vaikuttaa vahvasti käytetyn liuottimen haihtuvuus

[8]. Erittäin haihtuva liuotin muodostaa huokoisia kuituja esimerkiksi polylaktidia kehittäessä [8]. Kuidut voivat lisäksi olla erimuotoisia, kuten ontoja tai koaksiaalisia [9]. Nanokuituja voidaan tarkastella esimerkiksi pyyhkäisy- (SEM) ja läpäisyelektronimikroskoopeilla (TEM) [1 s. 193].

Edellä esitellyllä perinteisellä menetelmällä valmistettujen nanokuiturakenteiden muoto on enemmänkin kaksiulotteinen kuin kolmiulotteinen. [9] Muiden tunnettujen valmistustapojen, kuten vetämisen ja faasierottelun, merkittävimmät ongelmat ovat niiden huono tehokkuus ja kuitujen halkaisijoiden säätelyn puute. Sähkökehruu on yleistynyt vakiintuneeksi menetelmäksi kustannustehokkuutensa ja jatkuvien nanokuitujen valmistusmahdollisuuden vuoksi [1 s. 7]. Neulalla tapahtuva sähkökehruu ei ole kuitenkaan tarpeeksi tehokas nanokuitujen yleistymistä ajatellen. Jotta nanokuitujen valmistus siirtyisi laboratorioista tehdastasolle, valmistusmenetelmää pitää tehostaa entisestään. Tällaiseksi menetelmäksi on kehitetty niin sanottu kulhon reunalta tapahtuva sähkökehruu (eng. *bowl-edge electrospinning*) [10]. Kehruussa jännite syötetään polymeeriliuosta sisältävään metalliseen kulhoon, jonka vuoksi liuossuihkuja muodostuu kulhon reunalle useita, joista kuidut kehräytyvät ympärillä olevalle sylinterimäiselle keräysalustalle. Yksinkertainen menetelmä on jopa kymmeniä kertoja tehokkaampi ja sillä tuotetut kuidut ovat yhtä laadukkaita kuin perinteisellä neulasähkökehrulla valmistetut. [10] Lisäksi on kehitetty pyörivä suihkukehrumenetelmä (RJS, eng. *rotatory jet-spinning process*), jolla saadaan valmistettua nanokuituja pyörivän liikkeen aiheuttaman hydrostaattisen ja sentrifugaalisen paineen avulla. Valmistetut nanokuidut kertyvät kolmiulotteiseksi rakenteeksi, jonka vuoksi niiden käyttömahdollisuudet esimerkiksi kudokasvatuksessa ovat erittäin potentiaaliset ja laajat. Lisäksi tämä menetelmä ei vaadi korkeajännitelähteen käyttöä, joka laajentaa edelleen käyttömahdollisuuksia. [11]

Biohajoavuus ja bioyhteensopivuus ovat tärkeitä materiaaliominaisuuksia muun muassa luonnonsuojelun ja käyttöympäristön kannalta. [8] Biolääketieteen sovellukset ovat yleensä kosketuksissa ihmiskehoon, joka vaatii käytettäviltä materiaaleilta inerttisyttä, ei-toksisuutta ja luonnollisia hajoamistuotteita. Materiaalien olisi hyvä aiheuttamatta kudosreaktioita ja niiden kuuluisi kestää käyttökohteessaan tarvittava aika. Mahdollinen hajoaminen pitää tapahtua myös sopivalla nopeudella, jotta paraneminen tapahtuu optimaalisesti. [12 s. 3] Nanokuitujen laajempaa käyttöä biolääketieteessä on estänyt muun muassa solun tunnistussignaalien puute, joka on tärkeää solutoimintojen kehityksessä [5]. Luonnollinen ECM koostuu monimutkaisesta rakenteellisten ja säätelävien proteiinien verkostosta, joka tarjoaa paikallisia soluja tietyin ligandien solujen adheesiota ja migraatiota varten sekä moduloi solujen lisääntymistä ja toimintoja. Luonnossa esiintyviä aineita, kuten elastiinia, silkkiproteiinia, kollageenia, kitosaania, fibrinogeenia, hyaluronihappoa, dekstraania ja niiden yhdistelmiä on käytetty nanokuiduissa. Näiden luonnollisten polymeerien ja aineiden ollessa kuitujen sisällä ja pinnassa, ne ovat pystyneet tarjoamaan kestäviä solun tunnistussignaaleja polymeerin hajoamisen aikana. Vaikka nämä kuituiset scaffoldit matkivat luonnollisen ECM:n molekkulaarisia ja rakenteellisia ominaisuuksia, näitä kudosteknologian nanokuituja on raportoitu käytettävän erittäin vähän. Syy tähän saattaa olla näiden luonnollisten materiaalien

heikot mekaaniset ominaisuudet ja kolmiulotteisen rakenteen menettäminen vesikoske- tuksessa. Tähän on pystytty vaikuttamaan erilaisilla aineilla ja käsittelyillä, mutta niiden on havaittu johtavaan uusiin ongelmiin *in vivo*, kuten esimerkiksi implantin pettämi- seen. Näitä ongelmia selvitetään edelleen muun muassa erilaisia ominaisuuksia sisältä- vien synteettisten ja luonnollisten polymeerien sekoituksella keskenään, jotta saadaan yhdistettyä eri polymeerien hyötyjä. Jo alle 1 %:n lisäyksen kollageenia on raportoitu parantavan osaa solutason tapahtumista, eikä näin pienten määrien ole huomattu vaikut- taneen kuidutusprosessiin tai niiden rakenteeseen. [5]

Nanokuitujen ominaisuuksien vaikutukset kudosteknologisten scaffoldien suunnitte- lussa, kuten huokoskoko ja morfologia, huokoisuus, mekaaniset ja pinnan ominaisuudet sekä biohajoavuus tiedetään ja sopivia yhdistelmiä etsitään jatkuvasti [5]. Nanokuitujen ja nanopartikkelien terveysuhat ja -haitat ovat kuitenkin edelleen melko tuntemattomia. Lisäksi tulehdusta aiheuttavien bakteerien mahdollisia vaikutuksia nanokuitukankaiden rakenteeseen ja toimintoihin ei ole tutkittu tarpeeksi [7]. Nanokuidut ovat kooltaan ver- rattavissa asbestikuituihin, joiden terveydelliset haitat tunnetaan. Asbesti kulkeutuu ta- vallisesti hengitysilman mukana keuhkoihin pystymättä poistumaan sieltä. Asbesti aihe- uttaa altistuneelle terveydellisiä ongelmia vasta kymmenien vuosien kuluttua. Nanopar- tikkelien ja nanokuitujen kanssa on samankaltaisia huolenaiheita [13, 14]. Tutkimuksis- sa on selvitetty esimerkiksi hiirien keuhkoihin asetettujen hopeananokuitujen aiheutta- neen tulehdusta [14]. Vain alle 5 μm pitkät kuidut pystyivät poistumaan keuhkoista. Lisäksi nanoputket voivat aiheuttaa asbestin kaltaisia vaikutuksia ja johtaa esimerkiksi keuhkosyöpään, joka ilmenee usein vasta 30-40 vuoden kuluttua altistumisesta. [15]. Nanokuitujen ja nanopartikkelien käytön tutkimista eri sovelluksissa pitää jatkaa, jotta voidaan olla varmoja, että kuitujen ja partikkelien kulkeutuminen elimistössä esimerkik- si veren tai hengityksen mukana ei aiheuta epätoivottuja reaktioita. Suodatusteknologi- assa laajat tutkimukset ovat myös paikallaan asbestin kaltaisten reaktioiden vuoksi.

3 SÄHKÖKEHRUU

Sähkökehruu on periaatteeltaan yksinkertainen, kustannustehokas ja helppo tapa valmistaa nanokokoisia polymeerisiä kuituja esimerkiksi suodatinteknologian, polttokennojen ja biolääketieteen sovelluksia varten. Nanokuituiset rakenteet tarjoavat pienen kuitukoon ansiosta suuren pinta-ala-tilavuus-suhteen, joka soveltuu esimerkiksi erittäin hyvin pienten partikkelien erottamiseen, lääkeaineiden kohdistettuun ja säänneltyyn annosteluun, edistämään kudosten kasvua sekä estämään bakteerien ja virusten toimintaa kudoksissa.

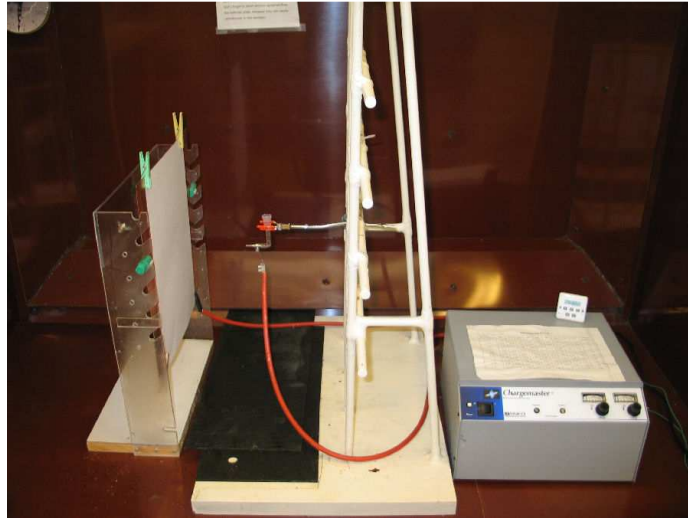
Kappaleessa 3.1 kerrotaan sähkökehruumenetelmästä yleisesti, perehdytään sähköstatiikan ilmiöihin kehruun taustalla sekä menetelmässä käytettävään laitteistoon. Kappaleessa 3.2. tutustutaan uusiin nanokuitujen valmistusmenetelmiin.

3.1 Sähkökehruumenetelmä

Nanokuituja voidaan valmistaa useilla eri tavoilla, kuten vetämällä, muottitekniikalla, faasierottelulla ja sähkökehrulla. Sähkökehruu on kustannustehokas ja käytännössä helpoin tapa valmistaa nanokokoisia polymeerisiä jatkuvia kuituja useista eri polymeereistä. [1 s. 7] Perinteinen neulalla tapahtuva sähkökehruu sopii lähinnä pienimuotoiseen valmistukseen, kuten laboratorioihin, mutta hiljattain kehitetty uusi menetelmä, kulhon reunalta tapahtuva sähkökehruu (eng. *bowl-edge electrospinning*), saattaa laajentaa sähkökehruun teollisuuden hyödynnettäväksi. [10]

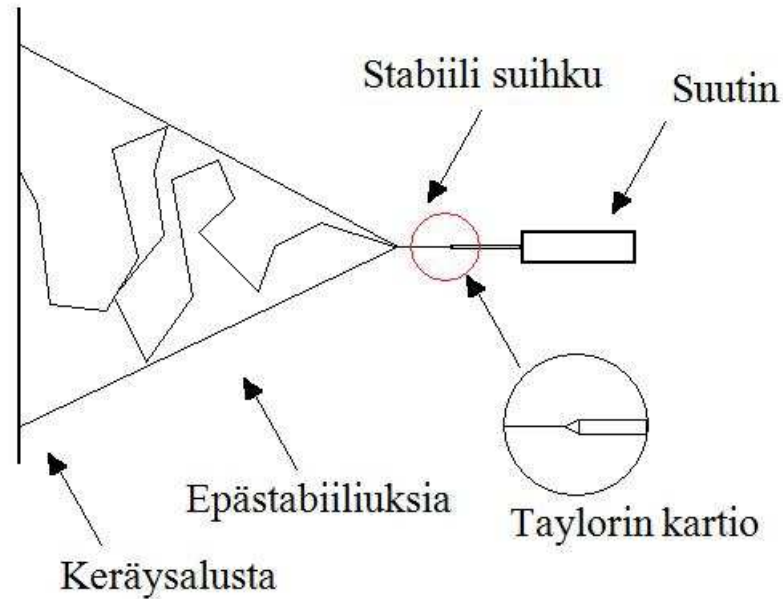
Sähkökehruu on vakiintunut nimitys suomen kielessä englannin kielen termille *electrospinning*. Nimitys juontaa siitä, että prosessissa tuotetaan kuituja kehräämällä (eng. *spinning*) polymeeriliuosta tai -sulaa sähköisiä (eng. *electro-*) voimia apuna käyttäen [1 s. 15]. Sulasähkökehruussa on useita ongelmia, kuten lämpötilan kontrollointi, sulan korkeampi viskositeetti sekä heikko johtavuus, joiden vuoksi liuosmuoto on yleisempi [16]. Periaatteessa sähkökehruu on siis vetämistä; polymeeriliuos vedetään kuituksi sähkökentän avulla. Sähkökehrulaitteisto on periaatteeltaan yksinkertainen, kuten nähdään kuvasta 1. Kuitujen valmistamiseen tarvitaan vähintään kolme komponenttia: kehrusuutin, korkeajännitelähde sekä kuitujen keräysalusta. [1 s. 15] Korkeajännitelähde kytketään kehrusuuttimeen ja keräysalustaan, jolloin suuttimen ja alustan välille muodostuu sähkökenttä, jonka voimakkuus riippuu neulan ja alustan välisestä potentiaalierosta, neulan halkaisijasta ja neula-alusta-etäisyydestä [17]. Ilmiöt, kuten sähköstatiikka, prosessin taustalla eivät ole yhtä yksinkertaisia kuin laitteisto. Liuosmuodossa olevan polymeeriliuoksen viskositeetin, käytetyn liuottimen ja muiden aineiden on oltava sopivia, jotta kehrusuuttimen neulan kärkeen muodostunut tippa pysyy neulassa ja siitä muodostuu kuitua, eikä liuos pisaroi, valu tai tuki neulaa. Kehruusuuttimia voi olla

yksi tai useita, ja liuoksen syöttöön voidaan käyttää apuna pumppua, jonka syöttönopeutta voidaan säädellä. [6]



Kuva 1. Sähkökehruulaitteisto: (vasemmalta) kuparinen keräysalusta, suutin ja neula sekä suurjännitelähde. Tampereen teknillisen yliopiston Kuitumateriaalitekniikan laboratorio.

Sähkökehruussa liuos varataan metallisen neulan kautta sähköisesti ja neulan kärkeen muodostuu tippa, jonka muoto muuttuu niin sanotuksi Taylorin kartioksi [1 s. 103-104]. Kun liuoksen pintajännite ylittyy, kartion kärjestä purkautuu liossuihku vastakkaiselektrodia eli keräysalustaa kohden. Varautunut polymeerisuihku hylkii itseään, joka aiheuttaa kuituun mutkittelevan liikkeen. Kuva 2 esittää kuidutusmenetelmän periaatetta. Liikehdinnän aikana kuitu ohenee ja liuoksen liuottimet haihtuvat lähes kokonaan. Kuitu, joka on ideaalitulanteessa yksittäinen ja jatkuva, kerääntyy lopuksi satunnaisesti keräysalustalle. Yleensä tällaista tilannetta ei kuitenkaan saavuteta, vaan on tavallisempaa, että liuos suihkuu useana kuitunauhana keräysalustalle. Keräysalusta valitaan valmistettavan sovelluksen mukaan. Sen vähimmäisvaatimuksena on johtavuus. Käytetyillä jännitteillä on vaikutusta muun muassa polymeerin kiteisyyteen, kuitujen morfologiaan, halkaisijaan ja helmien muodostumiseen, liuottimen haihtumisnopeuteen sekä muodostuvien suihkujen määrään. Jännitteen kasvattaminen esimerkiksi pienentää kuitujen halkaisijaa, nopeuttaa liuottimen höyrystymistä ja saattaa muodostaa kuituihin yleensä epätoivottuja helmiä. [1 s. 103-104] Sähkökehruussa on lisäksi otettava huomioon kehrutilan lämpötila ja ilmankosteus, liuosparametrit ja käytetyn neulan koko sekä sähkökentän vahvuuteen vaikuttavat neula-keräysalusta-etäisyys ja käytetyt jännitteet. [6]



Kuva 2. Sähkökehruun periaate.

Sähkökehruun merkittävin etu on mahdollisuus valmistaa monimutkaisia kolmiulotteisia huokoisia rakenteita, joilla on suuri pinta-ala-tilavuus-suhde [18]. Lisäksi lempeät prosessointilämpötilat mahdollistavat lämpöherkkien komponenttien, kuten lääkeaineiden, sisällyttämisen kuituihin [18]. Kappaleessa 3.2 esiteltävä RJS-menetelmä vaikuttaa lupaavalta ratkaisulta sähkökehruun haittoihin, joihin kuuluvat ympäristölle ja terveydelle haitallisten ja vaarallisten liuottimien käyttötarve sekä niiden poiston ja talteenoton kustannukset. Sähkökehruussa pyritään yleensä ensisijaisesti käyttämään liuottimia, kuten vesi, alkoholi ja aseton. Turvallisten liuottimien käyttö saattaa heikentää nanokuituverkkojen lujuutta, mutta tähän voidaan vaikuttaa esimerkiksi silloituksella [18]. Lisäksi RJS-menetelmä ei vaadi korkeajännitelähteen käyttöä, vaan sillä valmistettavat kuiturakenteet muodostuvat sentrifugaalisen paineen avulla.

3.1.1 Sähköstatiikka

Sähkökehruuprosessi saadaan aikaan, kun tehdään potentiaaliero liuoksen ja keräysalustan välille. Yleensä tähän käytetään suurjännitelähdettä, joka kytketään liuokseen sekä keräysalustaan. [1 s. 81-82] Korkean jännitteen aiheuttama sähkövoimainen alue eli sähkökenttä aikaan saa sähkökehruuprosessin, kun liuoksen sähköstaattinen voima ylittää liuoksen pintajännityksen [1 s. 103]. Sähkökentän voima voi olla joko vastakkaisten varausten vetovoima tai saman polaarisuuden varausten hylkimisvoima, ja se saadaan Coulombin laista,

$$F = \frac{q_1 q_2}{4\pi \epsilon_p d^2} \quad (1)$$

jossa q on varaus, ϵ_p varausten välisen tilan absoluuttinen permittiivisyys ja d varausten välinen etäisyys [1 s. 82-83]. Tämä laki on voimassa vain pistemäisille varauksille. Käytännössä sähkökenttää käytetään paljon laajemmin ja se määritellään alueena, jossa varaus tuntee toisten varausten voiman. Kentän suuruus annetaan sen voimakkuuden mukaan.

$$F = qE \quad (2)$$

jossa F on voima, q varaus ja E sähkökentän voimakkuus. Positiivisen varauksen voimalla on sama suunta kuin kentän voimakkuudella. Negatiivisella varauksella voima on vastakkaisuuntainen.

Varauksella q ja etäisyydellä d kentän voimakkuus saadaan kaavasta

$$E = \frac{q}{4\pi\epsilon d^2} \quad (3)$$

jossa ϵ on materiaalin permittiivisyys.

Pisteen potentiaali saadaan työstä, joka vaaditaan aikaansaamaan varaus, jolla testivaraus siirtyy äärettömän hitaasti referenssipisteestä tähän pisteeseen. Potentiaali saadaan siis kaavasta

$$\Phi = \frac{dW}{dQ} \quad (4)$$

Potentiaaliero on yhtä suuri kuin jännite kahden pisteen välisessä tilassa. Potentiaaliero saadaan kaavasta

$$U_{1,2} = \Phi_2 - \Phi_1 \quad (5)$$

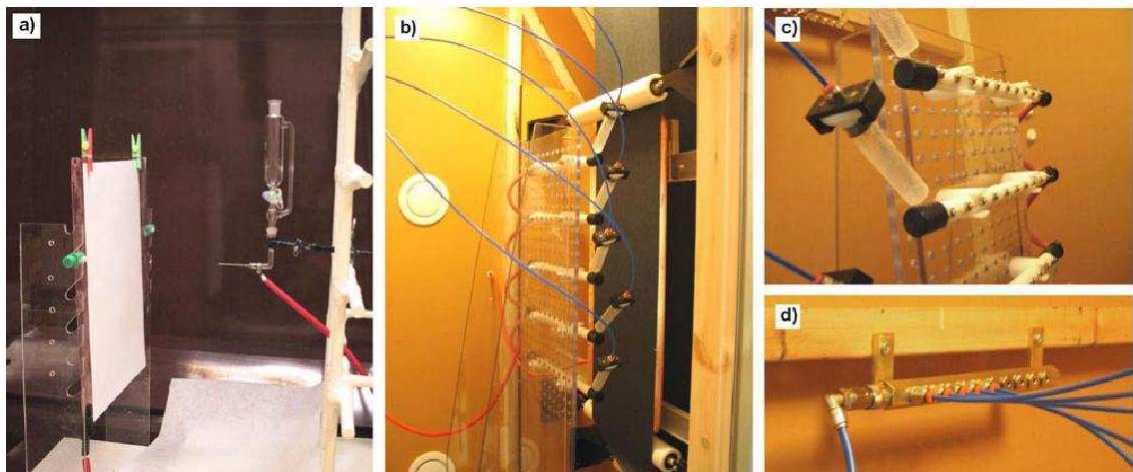
Kahden pistemäisen varauksen välistä vuorovaikutusta on helppoa kuvailla käyttäen Coulombin lakia. Mutta useampien varausten kanssa, kuten sähkökehrussa, on hyödyllistä käyttää sähkökenttää ja potentiaalia kuvaamaan niiden vuorovaikutuksia. Sähkökentän kuvailuun voidaan käyttää vektoriaalista esitystapaa, mutta yleisin tapa on käyttää kenttälinjoja. Sähkökentän suunta missä tahansa kenttälinjan pisteessä annetaan sen pisteen tangentin avulla, tosin kentän suunta osoitetaan kenttälinjoissa nuolten avulla. Kenttälinjat alkavat aina positiivista varauksista ja loppuvat negatiivisiin varauksiin. [1 s. 82-83]

Tutkimukset ovat osoittaneet, että yleensä negatiivisen ja positiivisen jännitteen ylittäessä 6 kV neulan kärjessä oleva tippa muuttuu niin sanottuun Taylorin kartiomuotoon, josta liuossuihku purkautuu. Riippuen liuoksen syöttönopeudesta, kartion

pysyminen stabiilina saattaa vaatia korkeampien jännitteiden käyttöä. Mitä korkeampi syötetty jännite on, sitä suurempi määrä varauksia aiheuttaa suihkun kiihtymisen nopeammaksi ja suurempi tilavuus liuosta vedetään neulan kärjestä. Tämä voi myös pienentää kartiota ja heikentää sen stabiiliutta. Jos liuoksen vetonopeus keräysalustalle kasvaa suuremmaksi kuin syöttönopeus, Taylorin kartio saattaa vetäytyä neulan sisään, jolloin kuidutus keskeytyy. Käytetty jännite vaikuttaa myös muodostuvien kuitujen ominaisuuksiin sekä kuitujen asettumiseen alustalle. [1 s. 103]

3.1.2 Laitteisto ja olosuhteet

Nanokuitujen valmistamiseen pienimuotoisesti laboratorio-olosuhteissa vaaditaan yksinkertainen ja vähän tilaa vievä laitteisto [17]. Peruskomponentit ovat korkeajännitelähde, metallinen keräysalusta ja kapillaarisuutin, johon viitataan usein termillä neula. Korkeajännitelähteen toinen napa kiinnitetään suuttimeen ja toinen joko keräysalustaan tai keräysalusta on maadoitettu. Suuttimia voi olla yksi, tai useampi, kuten nähdään kuvan 3 kokoonpanoista. Käytetyt jännitteet vaihtelevat esimerkiksi (+/-) 5-30 kV:n ja potentiaalierot 12-40 kV:n välillä. Keräysalustan ainoat vaatimukset ovat johtavuus ja materiaali, josta kuidut ja näytteet saadaan irrotettua valmistuksen jälkeen. Yleisin materiaali on metalli, kuten alumiini ja kupari, joka voidaan lisäksi pinnoittaa esimerkiksi paperilla kuitujen irrotuksen helpottamiseksi. Keräysalustan rakenteelle on useita vaihtoehtoja ja se valitaan yleensä valmistettavien kuitujen käyttökohteen mukaan. Alustoiksi sopivat esimerkiksi kuparinen levy, alumiininen folio, metalliverkko, sydänlöpän mallinen aihio, verisuonta matkiva tai muuna saumattoman putkimaisen kappaleen muottina toimiva metallinen lanka tai sylinteri. [17] [1 s. 135-144]



Kuva 3. Sähkökehruujärjestelyjä: a) Yksi suutin paikallaan tehtävälle näytteelle, sekä b) jatkuva toiminen viiden putken laitteisto, jossa syöttöä säädelään tasoitettavalla paineella (c ja d).

[19]

Sähkökehruulaitteisto voi olla asennettuna horisontaalisesti tai vertikaalisesti [4]. Liuossuutin syöttää liuosta laboratoriotasoisissa laitteistoissa esimerkiksi ainoastaan painovoimaa hyödyntäen, kuten sivun 7 kuvan 1 sekä kuvan 3 (a) järjestelyissä, tai suut-

timeen voidaan asentaa säädeltävä syöttöpumppu. Kehruutilassa on mieluiten oltava tasainen lämpötila ja ilmankosteus, sekä hyvä ilmanvaihto. Sähkökehruulaitteiston käyttäjän on suojauduttava asianmukaisin varustein. Lisäksi lopputulosten ja analyysien kannalta on tärkeää, että valmistetut kuidut pysyvät puhtaina sisältäen vain liuoksessa käytettyjä ainesosia. Puhdasilmatila on paras mahdollinen nanokuitujen valmistamiselle, sillä esimerkiksi huoneilman pöly ja epäpuhtaat välineet ovat usein ongelmallisia tutkimuksissa. [4]

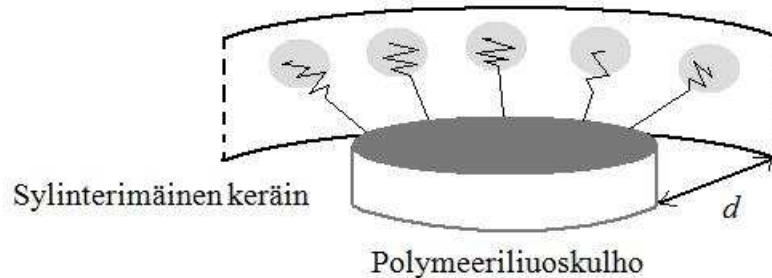
3.2 Uudet nanokuitujen valmistusmenetelmät

Kulhon reunalta tapahtuva sähkökehruu (eng. *bowl-edge electrospinning*) ja pyörivä suihkukehruumenetelmä (eng. *rotatory jet-spinning process*, RJS) ovat uusia nanokuitujen valmistusmenetelmiä. Kulhosähkökehruussa syötetään jännite polymeeriliuosta sisältävään metalliseen kulhoon ja kuidut kehräytyvät sen ympärillä olevalle maadoitetulle sylinterimäiselle keräysalustalle [10]. Perinteisessä neulasähkökehruussa liuos pakotetaan pumppauksen ja korkean jännitteen avulla kapillaarin läpi, jonka kärjen tippaan muodostuu Taylorin kartio, josta liuossuihku purkautuu edeten kohti keräysalustaa. Kulhosähkökehruulaitteiston symmetria mahdollistaa useiden Taylorin kartioiden ja liuossuihkujen muodostumisen polymeeriliuoskulhon reunalla sekä kuitujen tehokkaan järjestäytymisen symmetrisin välein ympäröivälle alustalle. Tällaista menetelmää voidaan kutsua rajattomaksi sähkökehruuksi, sillä liuossuihkujen määrää ei rajata yksittäisillä neuloilla, vaan niitä voi muodostua spontaanisti useita ilman, että käytetty laitteisto monimutkaistuu, kuten usean neulan järjestelyssä. Kulhosähkökehruussa liuoksen ominaisuudet ja sähkökentän vahvuus määrittelevät vakaiden suihkujen määrän ja syöttönopeuden sen sijaan, että niitä kontrolloisi suora mekaaninen pumppaus, niin kuin perinteisessä sähkökehruussa. [10]

Kulhosähkökehruulaitteiston samankeskinen geometria pienentää suihkujen välisiä vuorovaikutuksia, sillä vierekkäisten suihkujen etäisyys kasvaa säteittäisten etäisyyksien kasvaessa. Sähkökenttä voidaan säätää neulasähkökehruun tapaan tehokkaimpaan kuitujen tuotantonopeuteen liuossuihkua kohden, jonka vuoksi menetelmän tuottavuus voi olla jopa 40-kertaa neulasähkökehruuta suurempi samalla, kun nanokuitujen korkea laatu säilyy. Liuossuihkujen määrään, liuoksen kulumiseen ja kuitujen morfologiaan voidaan siis vaikuttaa liuosominaisuuksia, kuten konsentraatiota, viskositeettia, pintajännitystä ja johtavuutta, sekä sähkökentän vahvuutta modifioimalla. Tämä menetelmä on ensimmäinen vuoteen 2013 mennessä, jossa on pystytty hyödyntämään Taylorin kartion ja liuossuihkun muodostumisen välistä hystereesiä, jossa ensin muodostetaan korkeammalla jännitteellä kartio, jota pystytään sitten ylläpitämään alhaisemmalla jännitteellä. Tällä tavalla on saatu selvästi parannettua nanokuitujen tuotantonopeutta korkean laadun säilyessä. [10]

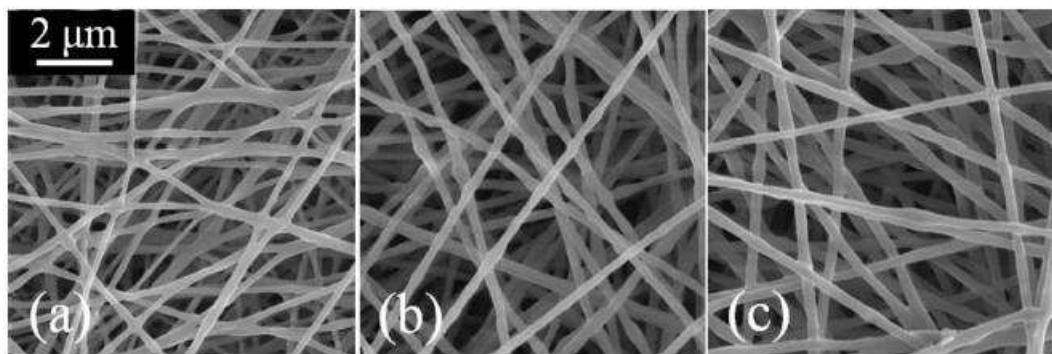
Thoppey et al. [10] tutkimuksissa laitteiston polymeeriliuoskulho on alumiinia, halkaisijaltaan 9 cm ja syvyydeltään 0,9 cm, ja se on kytketty korkeajännitteen positiiviseen ulostuloon. Kulhoa ympäröi alumiininen samankeskinen maadoitettu sylinterimäi-

nen keräysalusta, jonka halkaisija oli 39 cm ja korkeus 38 cm. Kulhon ulkopinnan ja keräysalustan välinen työtäisyys on stabiili 15 cm, mutta keräysalustaa pystytään siirtämään esimerkiksi prosessin aikana vertikaalisessa suunnassa. Keräysalusta päällystetään alumiinifoliolla, jotta kuitunäytteiden poistaminen on helpompaa. Kuva 4 esittää laitteiston periaatetta. [10]



Kuva 4. Kulhosähkökehrulaitteiston periaate (d = työtäisyys).

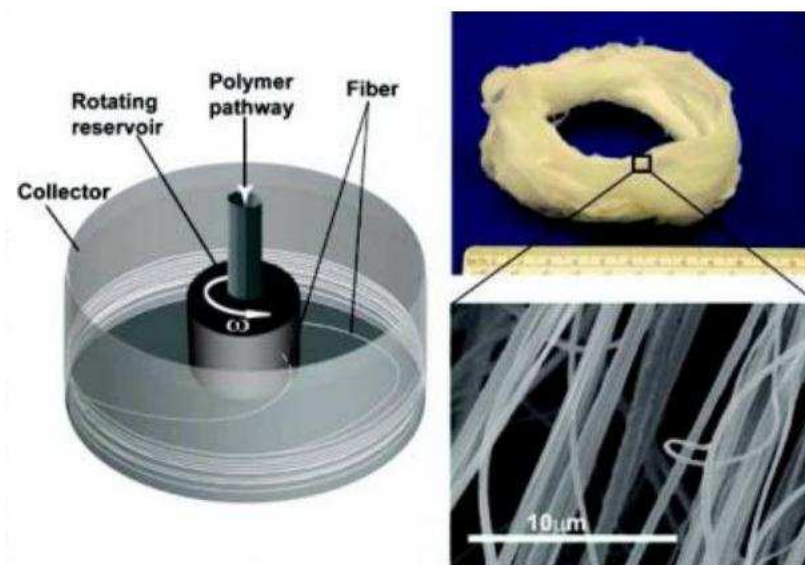
Kokeiden aluksi aloitusjännitettä ylläpidetään hetken aikaa, jolloin muodostuu mahdollisimman monta liuossuihkua mahdollisimman nopeasti, ja ne järjestäytyvät ja stabiloituvat kulhon reunoille [10]. Kun suihkujen muodostuminen vaikuttaa stabiloituneen, jännitettä alennetaan niin sanotulle työjännite-tasolle, jolla pystytään ylläpitämään stabiileja jo muodostuneita liuossuihkuja. Optimaaliset parametrit esimerkiksi polyeteenioksidi (PEO)-kuitujen valmistuksessa kulhosähkökehrulla olivat 6 m-%:n konsentraatio, 55 kV:n aloitusjännite 20 sekunnin ajan, jonka jälkeen se alennettiin manuaalisesti noin 3 sekunnin aikana stabiilille 16 kV:n työjännite-tasolle. Eri konsentraation liuoksista valmistettuja PEO-nanokuituja voidaan nähdä kuvassa 5 [10].



Kuva 5. Samankaltaisilla prosessiparametreilla eri liuoksista valmistettuja PEO –nanokuituja, joiden keskimääräinen halkaisija on noin 200 nm: a) 5 m-% PEO, b) 6 m-% PEO, ja c) 7 m-% PEO. [10]

Pyörivä suihkukehruumenetelmä ei vaadi korkeajännitteen käyttöä eli se ei ole sähkökehruta, mutta jonka vuoksi se on erinomainen haastaja perinteiselle sähkökehrulle [11]. RJS-menetelmässä liuossuihkun muodostuminen tapahtuu täysin hydrostaattisen ja sentrifugaalisen paineen avulla, joka aiheutuu liuosastian ja kulhon pyöryksestä [11]. Menetelmässä voidaan käyttää polymeeriliuosta, mutta myös polymeerisulaa, sillä val-

mistustapaa voidaan verrata hattaran valmistukseen, jossa samankaltaisen laitteen keskiössä sulatetaan sokeria pienten reikien läpi rihmaksi, joka kerääntyy astian ulommille seinille, tai joka kerätään tikkuun [11, 9]. Hattara-makeisen valmistukseen tarkoitettuja laitteita on käytetty polymeeristen kuituscaffoldien valmistuksen tutkimiseen, sillä niiden rakenne ei eroa RJS-laitemallista [9]. Tutkimuksissa käytettiin kahta menetelmää: sentrifugaalista sulakehruuta sekä liuosavusteista kehruuta. Tutkimukset osoittivat, että tällaisessa valmistusmenetelmässä sulakehruu soveltuu alhaisen lasimuutoslämpötilan (T_g) ja liuosavusteinen korkean T_g :n polymeereille. [9] RJS-laitteiston periaate nähdään kuvassa 6. Menetelmällä valmistettujen nanokuitujen halkaisijaa, asettautumista kolmiulotteiseksi rakenteeksi tai mihin vain muotoon, helmettömyyttä sekä pinnan teksturointia voidaan muokata niin kuin perinteisessä neulasähkökehruussa esimerkiksi keräysalustaa tai kehruusuutinta vaihtamalla [11]. Menetelmällä valmistettava kolmiulotteinen rakenne sekä SEM-kuvaa nanokuiduista nähdään myös kuvassa 6. Menetelmällä pystytään sähkökehruun tapaan kontrolloimaan muun muassa kuitujen järjestäytymistä ja verkon huokoisuutta. Tällaisista kolmiulotteisista nanokuiturakenteista olisi hyötyä erityisesti esimerkiksi kudosteknologisissa keinoelinscaffoldeissa sekä suodatusteknologiassa. [11]



Kuva 6. Pyörivän suihkukehruumenetelmän periaatekuva (vasemmalla): sylinterimäinen keräysalusta (collector), pyörivä polymeeriastia (rotating reservoir) ja polymeerin syöttö (polymer pathway) sekä kehräytyvä kuitu (fiber). Valmistettu nanokuiturakenne (oikealla ylhäällä), jonka halkaisija on noin 9cm, ja SEM -kuvaa kuiduista (oikealla alhaalla). [11]

Muita uusia niin sanottuja rajattomia nanokuitujen valmistusmenetelmiä ovat esimerkiksi kuilusähkökehruu (eng. *cleft electrospinning*), jossa liuosuhkut muodostuvat suorakulmaisesta kylvystä kehräytyen ylöspäin litteälle keräysalustalle; neulaton sähkökehruu (eng. *needleless electrospinning*), jossa kuidut muodostuvat nesteellä päällystetyltä pallolta; sekä kaupallinen kehruulaitteisto Nanospider [10]. Nanospider-teknologia perustuu mahdollisuuteen tuottaa nanokuituja jatkuvasti ohuesta kerroksesta nestemäistä

polymeeriä, joka on sula- tai liuosmuodossa [20]. Menetelmää voi yleisesti kutsua vapaan nestepinnan sähkökehruksi. Menetelmässä Taylorin kartiot muodostuvat vierekkäin pyörivän rullan pintaan, joka on upotettu polymeeriliuokseen. Valmistetut nanokuidut ovat halkaisijaltaan 50-300 nm. Tämän menetelmän tuottavuus on tarpeeksi korkea nanokuitujen tuotantoon teollisessa mittakaavassa. [20]

4 BIOHAJOAVAT POLYMEERIT

Biohajoavat polymeerit voivat olla täysin synteettisiä tai luonnonpolymeerejä. Kuituihin voidaan käyttää useampaa kuin yhtä polymeeriä, jolloin pyritään yhdistämään eri polymeerien hyötyjä. Lääketieteen ja kudosteknologian sovellukset vaativat käytettäviltä materiaaleilta inerttisuutta, ei-tulehduttavuutta, myrkyttömyyttä, kudosityhteensopivuutta, ja joko pitkäikäisyyttä tai sopivalla nopeudella hajoamista. Sovelluksen on kestävä koko sen käyttöajan kohteessaan. Jos se biohajoaa, hajoaminen ei saa heikentää liikaa sovelluksen mekaanisia ominaisuuksia, ja hajoamistuotteiden on oltava myrkyttömiä ja niiden on poistuttava normaaleita ihmiskehon metabolisia reittejä pitkin. Synteettisten alifaattisten polymeerien, kuten polylaktidien, käyttöä tutkitaan erilaisissa sovelluksissa niiden helpon saatavuuden, bioyhteensopivuuden sekä luontoystävällisyyden vuoksi.

Tässä kappaleessa käsitellään lähinnä biolääketieteen sovelluksia ja niissä käytettäviä polymeerejä. Kappaleessa 4.1 perehdytään polymeerin valintaan ja kappaleessa 4.2 polymeeriliuoksen ominaisuuksiin. Kappaleissa 4.3, 4.4 ja 4.5 tutustutaan yleisimpiin biohajoaviin polymeereihin.

4.1 Polymeerin valinta

Sähkökehruumenetelmällä on tutkittu satoja, ellei jopa tuhansia erilaisia polymeerejä [1 s. 44]. Polymeeri valitaan yleensä ensisijaisesti lopputuotteeseen haluttujen ominaisuuksien mukaan. Luonnonpolymeerit sopivat hyvin biolääketieteellisiin sovelluksiin kudosityhteensopivuuden, turvallisten hajoamistuotteiden sekä inerttisuuden vuoksi, mutta niiden mekaaniset ominaisuudet eivät yleensä yllä vaaditulle tasolle [12 s.3]. Luonnonpolymeerien ominaisuuksiin on hankala vaikuttaa tuhoamatta polymeeriä, jonka vuoksi synteettisten, jo valmistusvaiheessa lopputuotteen vaatimusten kannalta muokattavien, polymeerien käyttö on suositumpaa monissa sovelluksissa [12 s. 3]. Biohajoavia polymeerejä, kuten polylaktidia (PLA), polylaktidikoglykolidia (PLGA) ja polyglykolidia (PGA) käytetään laajasti pehmeän kudoksen kudosteknologiassa, mutta niiden käyttö kovassa kudosteknologiassa, kuten luissa ja rustoissa, on ollut ongelmallista mekaanisten ominaisuuksien lisäksi hajoamisen aiheuttaman kestävyuden alenemisen vuoksi [21]. Materiaalin mekaanisten ominaisuuksien muokkaus vaatimukseen sopivaksi on tärkein tekijä rakenteellisesti solujen kasvua kestävä scaffoldin suunnittelussa [21].

Polymeeristen tuotteiden ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa esimerkiksi sekoittamalla kahta tai useampaa polymeeriä, niin että saadaan kovalenttisia sidoksia sisältäviä kopolymeerejä tai polymeeriseoksia [1 s. 41]. Mekaanisia ominaisuuksia voidaan muokata lisäksi käyttämällä erilaisia nanotäyteaineita, kuten hiilinanoputkia, kerroksittaista siliikaattia ja hydroksiapatiittia [21]. Kudosteknologian sovelluksissa käytetään usein syn-

teettisistä biohajoavista polymeereistä valmistettuja materiaaleja, sillä kudosten läheisyydessä käytettävien sovellusten on oltava bioyhteensopivia, eivätkä ne saa aiheuttaa inflammaatioita tai muita epäsuotuisia reaktioita. [12 s. 3] Polymeerimateriaalin biohajoavuus on toivottua silloin, kun tarvitaan vain parantumisen ajan tukea antava sovellus, ja kun implantoitua materiaalia ei haluta poistaa, vaan sen on mahdollista korvautua kasvavalla kudoksella. Kudosteknologiassa on tutkittu laajasti alifaattisia polymeerejä, jotka ovat yksi synteettisten bioabsorboituvien polymeerien ryhmä, johon kuuluvat muun muassa PLA- ja PLGA-polymeerit, joihin tutustutaan tarkemmin kappaleissa 4.3 ja 4.4. [12 s. 3]

4.2 Polymeeriliuoksen ominaisuudet

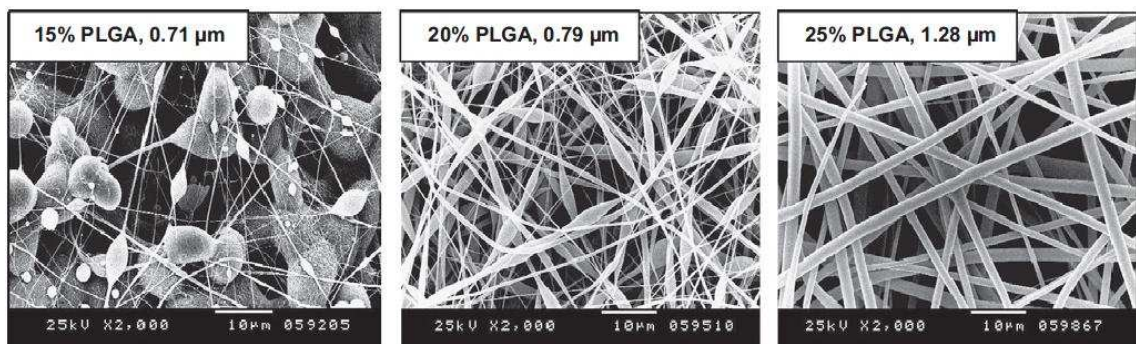
Sähkökehrussa käytettävän polymeerin on oltava liuosmuodossa. Liuotin voi olla mikä tahansa neste, joka liuottaa polymeerin täysin, ja joka soveltuu ominaisuuksiltaan sähkökehruprosessiin [1 s. 63]. Liuottimen valinnassa tärkeimpiä parametrejä ovat liuotettavan polymeerin liuotustehokkuus, haihtumisnopeus sekä lopputuotteen asettamat vaatimukset, kuten myrkyttömyys. [1 s. 63] Liuottimen korkea haihtumisnopeus yhdistettynä korkeaan lämpötilaan tai alhaiseen ilmankosteuteen saattaa parantaa liuottimen haihtumista entisestään, jolloin kuiduista muodostuu erittäin huokoisia [22]. Liian alhainen haihtumisnopeus tai polymeerikonsentraatio aiheuttaa kuitujen kerääntymisen kosteina alustalle, jolloin ne sulautuvat risteyskohdistaan toisiinsa, eikä alustalle muodostu haluttua kuituverkkoa [17]. Myös suutin-keräysalusta-etäisyydellä saadaan vaikuttua kerättyjen kuitujen kosteuteen [17].

Polymeerin kiteisyys ja moolimassa vaikuttavat sen liukenemiseen [1 s. 63]. Yleensä korkean moolimassan polymeeri on huonosti liukeneva, ja liukenee pidempään kuin alhaisen moolimassan polymeeri samalla liuottimella. Erittäin kiteinen polymeeri on myös huonosti liukeneva, sillä liuotinmolekyylien on vaikea tunkeutua polymeerin sisälle. Amorfinen polymeeri liukenee siis helpommin. Kaikille polymeereille on olemassa aineita, jotka hyydyttävät niitä liuottamisen sijaan. Näitä aineita ei saa esiintyä sähkökehrupolymeeriliuoksessa. Lisäksi esimerkiksi hydrolyysillä hajoavat polymeerit eivät siedä vettä, sillä vesi hajottaa niiden rakennetta. [1 s. 63]

Sähkökehruprosessissa polymeeriliuosta vedetään kehruneulan kärjessä olevasta tipasta kohti keräysalustaa [1 s. 63]. Liuoksen sähköiset ominaisuudet, höyrystymisnopeus, viskositeetti ja pintajännitys vaikuttavat liuoksen venymisominaisuuksiin [1 s. 80]. Liuoksen on oltava johtava, jotta sähkökehruu voi onnistua [1 s. 80]. Prosessissa käytetyn jännitteen on ylitettävä liuoksen pintajännite, jotta kuituja voi muodostua. Kun liuossuihku irtoaa polymeeritipasta ja pyrkii kohti keräysalustaa, suihku venyy, mutta liuoksen korkea pintajännitys voi aiheuttaa suihkun rikkoutumisen pisaroiksi. Tällöin keräysalustalla on kuitujen sijaan pisaroita ja prosessi on epäonnistunut. Pintajännitys voi myös aiheuttaa kuituihin pisaroita muodostaen helminauhamaisen kuiturakenteen. Yleensä sähkökehruun tavoite on kuitenkin saada aikaan sileää, tasaista ja jatkuvaa kuitua. [1 s. 63] Tasalaatuisen kuidun aikaansaamista voidaan edesauttaa lisäämällä liuok-

sen johtavuutta esimerkiksi pH-muutoksella tai pienellä suolan tai polyelektrolyytin lisäyksellä [1 s. 98]. Nämä muun muassa alentavat kehruuseen tarvittavia jännitteitä, sillä liuos varautuu paremmin. Koska hyvin varautunut liuossuihku hylkii itseään enemmän, epästabiiliudet kuitujen lentoradassa lisääntyvät, ja kuitujen asettumisalue keräysalustalla laajenee. [1 s. 98]

Kehruuliuksen viskositeetti on sähkökehruuprosessin kriittisin parametri [3]. Liuoksen viskositeetti kuvaa aineen kykyä vastustaa virtausta, johon polymeerin liuoskonsentraatiolla ja moolimassalla on suora yhteys [1 s. 69] [3]. Jos polymeerin konsentraatio liuoksessa on alhaisempi kuin ketjujen kriittinen limittymiskonsentraatio, kuituja ei muodostu, vaan liuos pisaroi keräysalustalle [3]. Kun polymeerin konsentraatiota kasvatetaan, alkaa muodostua helminauhamaisia kuituja, jotka lopulta konsentraation saavuttaessa ketjujen kietoutumisrajan, yhdenmukaistuvat sileiksi kuiduiksi [3]. Polymeerin kriittinen ketjun limittymiskonsentraatio on käänteisesti verrannollinen sisäiseen viskositeettiin [3]. Liuoksen viskositeetin ollessa liian korkea, kehruneula tukkeutuu prosessin aikana nopeasti, eikä kuituja muodostu [1 s. 69]. Yksinkertaisimmillaan viskositeettiin voidaan vaikuttaa muuttamalla polymeerin konsentraatiota liuoksessa [1 s. 91]. Sopivan viskositeetin ja polymeerikonsentraation löydyttyä kuidut yhdenmukaistuvat ja niiden halkaisija kasvaa samalla silottaen alhaisemman viskositeetin vuoksi esiintyneet helmet yhdenmukaisiksi kuituihin, kuten nähdään kuvasta 7 [7] [1 s. 92]. Tämä johtuu todennäköisesti liuoksen paremmasta kyvystä vastustaa suihkun varausten aiheuttamaa venytystä. Polymeerikonsentraation nostaminen saattaa kasvattaa biohajoamisen vastustamista esimerkiksi hydrolyysillä hajoavalla PLGA:lla [7].



Kuva 7. SEM –kuvia, joista nähdään polymeerikonsentraation vaikutus kuitujen morfologiaan ja keskimääräiseen halkaisijaan. [7]

Keräysalustalle kertyneet kuidut voivat olla erikokoisia, sillä yleensä suihkuja on useampia kuin yksi, ja suihkujen viskositeetti saattaa vaihdella [1 s. 95]. Yleensä polymeerin moolimassa on suoraan verrannollinen liuoksen viskositeettiin, polymeeriketjujen pituuteen ja ketjujen kietoutumien määrään, jotka ylläpitävät liuossuihkun muotoa ja jatkuvuutta prosessissa [1 s. 91]. Molekyyliketoutumia ei esiinny monomeerisillä polymeereillä niin, että niistä voisi valmistaa kuituja sähkökehruuprosessilla [1 s. 91]. Liuoksen viskositeetti mitataan yleensä viskometrillä [1 s. 69]. Mitattaessa on otettava huomioon muun muassa liuoksen lämpötila, joka vaikuttaa aineen viskositeettiin. Vis-

kositeetistä käytetään yleensä mittayksikköä Poise (P), joka usein ilmaistaan senttipoisena (cP). [1 s. 69]

Sähkökehruuprosessin aikana liuotin höyrystyy lähes kokonaan ennen kuin kuidut saavuttavat keräysalustan [1 s. 78]. Jos liuotinta on keräysalustalle muodostuneissa kuiduissa liikaa, kehrätyt kuidut eivät ole toisistaan erillään, vaan ne saattavat yhdistyä toisiinsa muodostaen kuitumaton sijaan yhtenäisen verkon tai jopa ohuen kalvon. Tämä aiheutuu, jos esimerkiksi liuottimen höyrystymisnopeus on liian alhainen. Kuitujen yhdistyminen ei ole toivottua, sillä se pienentää nanokuitujen vapaata pinta-alaa erittäin paljon. Yksinkertaisin ratkaisu tähän on vaihtaa käytettävä liuotin toiseen valitulle polymeerille sopivaan ja muilta ominaisuuksiltaan vastaavaan liuottimeen. [1 s. 78]

4.3 PLA-polymeeri

Polylaktidi on alifaattinen polyesteri ja se on ominaisuuksiltaan bioyhteensopivaa sekä nopeasti biohajoavaa (hajoamisaika 30-50 viikkoa [17]) ja sen hajoamistuotteet ovat samoja, joita esiintyy ihmiskehossa [23]. Polylaktidia valmistetaan uusiutuvista luonnonvaroista, kuten maissin ja viljan tärkkelyksestä sekä sokeriruo'osta [24]. Lääketieteellisten sovellusten, kuten tikkiommel-lankojen, kudosteknologisten substraattien ja lääkeaineiden kantajien lisäksi PLA:ta käytetään muun muassa elintarviketeollisuudessa pakkausmateriaaleissa, kertakäyttöasioissa ja muovipusseissa, jotka voidaan hajottaa käytön jälkeen kompostissa [23, 24]. PLA:lla on verrattain korkea lujuus ja sopiva hajoamisnopeus esimerkiksi useimpiin luustoli hasten sovelluksiin [23]. Kiteinen PLA on lujaa, mutta ei juuri kestä jännitystä [17]. Jännityksen kestoja eli joustavuutta voidaan parantaa esimerkiksi toisen polymeerin avulla [17]. PLA on hydrofobinen, mutta herkkä vedelle, sillä se hajoaa hydrolyytisesti [25]. PLA:n fysikaalisiin ja mekaanisiin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa valmistusvaiheessa muokkaamalla polymeerin sisäistä rakennetta, L/D-suhdetta, kiteisyyttä ja orientaatiota. [12 s. 5] PLA:n L ja D-stereoisomeerien suhde kuvaa polymeerin kiteisyyttä. Kun polylaktidin L-arvo on pienempi kuin 87,5 %, polymeeri on amorfinen. Biolääketieteessä käytetään yleensä semikiteisiä PLLA ja P(L/D)LA 96/4-polymeerejä sekä amorfisia PLDLA ja P(L/DL)LA 70/30 -polymeerejä. [12 s. 5]

PLA:n kiteiset ja amorfiset alueet vaikuttavat polymeerin lämpö- ja liukoisuusominaisuuksiin sekä lasimuutoslämpötilaan (T_g), johon vaikuttaa lisäksi moolimassa [12 s. 6]. Yleensä amorfinen polymeeri liukenee helpommin kuin erittäin kiteinen polymeeri ja tämä pitää paikkansa myös polylaktideilla [26 s.17]. Polylaktideja liuottavat hyvin klooratut ja fluoratut orgaaniset liuottimet. Polylaktidit liukenevat muun muassa kloroformiin, dikloorietikkahappoon, asetonitriliin, dikloorimetyleeniin (DCM), heksafluorisisopropanoliin (HFIP) ja trifluorietikkahappoon (TFA). Liuottimiksi eivät sovellu osa alkoholeista, kuten etanoli. [26 s.17].

Polylaktideja on tutkittu viime vuosina laajasti sähkökehruussa pääasiassa kudosteknologian sovelluksissa, ja ne ovat osoittautuneet yhdeksi lupaavimmista biohajoavien polymeerien ryhmäksi [26 s. 24] [8] [2]. PLA:ta on sähkökehrätty onnistuneesti niin

liuos- kuin sulamuodossa [16]. PLA:sta saadaan helposti valmistettua ohutta ja sileää helmetöntä nanokuitua [2]. Polylaktidi alkaa kuiduttua hyvin, kun liuoksen PLA-pitoisuus on noin 7-9 m-% [27]. Polylaktidin käyttöä biolääketieteen sovelluksissa tutkitaan edelleen, sillä täysin ongelmaton se ei ole. PLA:n hydrofobisuus yleensä lisääntyy nanokuitumuodossa [28, 29]. Kuitujen on lisäksi osoitettu kutistuvan fysiologisissa olosuhteissa ja niiden pinnassa on havaittu eroosiota, jotka ovat epätoivottuja ominaisuuksia erityisesti kudosteknologian sovelluksissa, joissa muotopysyvyys on tärkeää [28, 29]. Kutistumiseen on saatu vaikutettua muun muassa nanokuitujen pintakäsittelyillä ja lisäämällä kehruliuokseen hydrofiilisiä apupolymeerejä ja lisäaineita [28, 21, 29]. Esimerkiksi polyetyleeniglykolidi (PEG)-polymeerin avulla PLA:n pintaerosio on saatu muutettua bulkkierosioon, joka on toivotumpaa kudosteknologisissa sovelluksissa [29]. Apupolymeerejä käyttämällä polylaktidista on saatu lisäksi solujen kasvua ajatellen merkittävästi parempi ympäristö [29].

Joustavuus on usein toivottu ominaisuus, jota ei juuri ole esimerkiksi kiteisellä PLA:lla. Kiteinen PLA soveltuu mekaanisilta ominaisuuksiltaan parhaiten esimerkiksi luiden ja rustojen kudosteknologiaan [17]. Polylaktidi/poly- ϵ -kaprolaktoni (PLA/PCL)-yhdistelmä on osoittanut lupaavia tuloksia valtimosiirännäisissä, joiden pitää olla tarpeeksi lujia kestäämään suuria painemuutoksia, ja joiden pitää pystyä supistumaan ja työntämään verta myötävirtaan [17]. PLLA-polymeeristä valmistetut putkimaiset ja huokoiset nanokuituscaffoldit ovat osoittaneet tukevansa verisuonten sileiden lihassolujen kasvua sekä *in vitro*- että *in vivo*-kokeissa [30]. Polylaktidi ei yksinään kykene estämään bakteerien kasvua, vaan päinvastoin tarjoaa niille erinomaisen kasvuympäristön [2]. Tähän ominaisuuteen voidaan vaikuttaa esimerkiksi antimikrobisilla lisäaineilla, joita käsitellään tarkemmin kappaleessa 5. Polylaktidin ja kitosaanin sähkökehruuta on tutkittu vähän, sillä yhteisen liuottimen löytäminen oli vaikeaa [31]. TFA:n on todettu soveltuvan molemmille, ja sen avulla on saatu aikaan sileitä ja tasalaatuisia PLA/kitosaani-nanokuituja [31]. Hopean käyttöä PLA-nanokuiduissa on tutkittu paljon siten, että hopeanitraatti on pelkistetty perinteisillä menetelmillä, eikä tässä työssä esiteltävällä kitosaanimenetelmällä [32]. PLA/hopea-nanokuidut ovat osoittaneet erittäin tehokasta antibakteerista aktiivisuutta esimerkiksi *S. aureus* ja *E. coli*-bakteereja vastaan ja tehokkuuden kesto on ollut jopa 20 päivää, jonka vuoksi nanokuidut voisivat soveltua hyvin kliinisiin sovelluksiin kuten haavanhoitoon [32].

PLA-polymeerejä käytetään tällä hetkellä muun muassa ortopedisissä sovelluksissa, kuten ruuveissa, nastoissa, nauloissa ja levyissä, sekä ommel-langoissa ja lääkeluovutussysteemeissä. [33].

4.4 PLGA-polymeeri

Polylaktidikoglykolidi (PLGA)-polymeeri on polylaktidin ja polyglykolihapon kopolymeeri, joka kuuluu poly- α -hydroksihappojen ryhmään [34]. PLGA on biohajoava ja biohyteensopiva alifaattinen polyesteri. Polymeerin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa valmistuksessa esimerkiksi laktidin ja glykolidin suhteilla. Kaikki PLGA:t ovat raken-

teeltaan enemmän amorfisia kuin kiteisiä. Ne voidaan liuottaa useisiin liuottimiin, kuten tetrahydrofuraaniin, TFA:han, asetoniin, etyyliasetattiin ja kloorattuihin liuottimiin. PLGA hajoaa hydrolyysin avulla veden läsnä ollessa maito- ja glykolihapoiksi, jotka kuuluvat ihmiskehossa luonnollisesti esiintyviin aineisiin. Hajoamistuotteet poistuvat siis kehosta normaaleja metabolisia reittejä pitkin. Polymeerin hajoamisnopeuteen voidaan vaikuttaa monomeerien suhteilla siten, että mitä korkeampi glykolidiosuus, sen nopeampi hajoaminen [35]. PLGA:n hajoamiseen on yhdistetty sivutuotteiden, kuten sytotoksisten happojen muodostumista, joka saattaa olla epätoivottua soluyhteensopi- vuutta ajatellen [35, 34]. PLGA:n tutkimukset ovat osoittaneet märkäkehrätyt P(D/L)PLGA-kuidut bioyhteensopivaksi muun muassa ihmisen adiposyyttien kanssa [35]. Lisäksi kuituscaffoldit ovat pystyneet muodostamaan adipogeenistä kudosta *in vivo*. [35]

Hydrolyyttisen hajoamisen vuoksi PLGA on ominaisuuksiltaan hydrofobinen, jonka vuoksi esimerkiksi solujen on vaikea elää tämän materiaalin läheisyydessä, joka rajoittaa PLGA:n käyttöä kudosteknologiassa [21]. PLGA:ta käytetään kuitenkin erityisesti biolääketieteen sovelluksissa, kuten siirännäisissä, tikkiommel-langoissa, implanteissa ja proteeseissa sekä lääkkeiden kohdistetussa annostelussa mikro- ja nanopartikkelimuodossa [36].

PLGA:ta on tutkittu onnistuneesti sähkökehruumenetelmällä valmistettavissa nanokuiduissa esimerkiksi yhdessä kitosaanin kanssa [22]. Kitosaanin käytön on huomattu lisäävän PLGA:n hydrofiilisyyttä sekä neutralisoivan happoisia sivutuotteita, jolloin PLGA soveltuu paremmin esimerkiksi kudosteknologiaan scaffoldeihin [22, 34]. Hydrofiilisyyttä voidaan lisätä myös käyttämällä apuna hydrofiilisiä polymeerejä ja muita lisäaineita [21]. Kollageenin käyttö PLGA:n kanssa on vaikuttanut suotuisasti PLGA-scaffoldien tarjoamaan solu ympäristöön [5]. Hopean käyttöä PLGA-nanokuiduissa on tutkittu vuoteen 2013 mennessä erittäin vähän, vaikka tulokset ovat olleet lupaavia [37, 38]. Jo pieni hopeananopartikkelien konsentraatio on ollut riittävä antibakteerisen ominaisuuden aikaansaamiseen nanokuituiseen PLGA-scaffoldiin ja PLGA:n hajoaminen on ollut suotuisaa hopean aktiivisuudelle [38].

4.5 Muut biohajoavat polymeerit

Muita biolääketieteen kannalta merkittäviä polymeerejä ovat muun muassa polyglykolidit (PGA), poly-ε-kaprolaktonit (PCL), kollageeni, kitosaani, selluloosa, tärkkelys, hyaluronihappo, polyhydroksialkanoaatit (PHA), polyanhydridit (PAH) sekä polyortoesterit (POE). Muun muassa PGA ja PCL ovat alifaattisia polyestereitä, ja kuuluvat synteetisiin biohajoaviin polymeereihin [33]. PCL on halpa, hitaasti hajoava (hajoamisaika 1-2 vuotta), korkeasti elastinen ja ei-toksinen polyesteri, jota voidaan sähkökehrätä esimerkiksi asetoniin tai kloroformiin liuotettuna [17]. PCL:n käyttökohteita sen hyvien mekaanisten ominaisuuksien vuoksi ovat esimerkiksi kudosteknologian luu- ja rustosovellukset.

PGA on nopeasti hajoava, hieman kiteinen ja sillä on korkea sulamislämpötila sekä alhainen liukenevuus organismiin liuottimiin. Se sopii hyvin esimerkiksi tikkiommmelmateriaaliksi, sillä se on bioyhteesopiva ja sillä on hyvät mekaaniset ominaisuudet, kuten lujuus, venyvyys ja solmupysyvyys. PGA-polymeeriä käytetään yleensä myös seoksena tai kopolymeerinä esimerkiksi PLA:n kanssa (PLGA), sillä sen ominaisuudet harvoin riittävät yksin mihinkään sovellukseen. PCL:n sekoittaminen PGA:n kanssa muun muassa lisää kuormituksen kestävyttä ja siten laajentaa sovellusmahdollisuuksia. PCL:n käytöllä PLA:n kanssa seoksina ja kopolymeereinä on samanlaisia vaikutuksia ominaisuuksiin [17].

5 ANTIMIKROBISET LISÄAINEET

Biohajoavat kuidut, jotka eivät sisällä antimikrobisia aineita tai lääkkeitä, tarjoavat usein hyvän kasvualustan bakteereille, ja siten hidastavat kudosten paranemista [7]. Antimikrobinen ominaisuus voidaan saada kuituihin ja tekstiileihin jo valmistusvaiheessa tai vasta viimeistyskäsittelyissä. Erittäin kestävä ja tehokas menetelmä on lisätä antimikrobinen aine jo kuitukehruumassaan [39]. Antimikrobisen ominaisuuden aikaansaamista nanokuiduissa on tutkittu tällä tavalla esimerkiksi hopean ja kitosaanin avulla. Antimikrobisuus estää haavan tulehtumisen joko tappamalla haavaan päässeet bakteerit tai estämällä niiden, sekä erilaisten hiivojen ja sienten, kasvun. Rosiinia eli pihkajohdannaista on perinteisesti käytetty rasvamuodossa esimerkiksi haavojen hoidossa. Sillä on muun muassa bakteerien kasvua ehkäisevä vaikutus, jonka vuoksi rosiinin käyttöä polymeerikuitujen lisäaineena on syytä tutkia. Antimikrobisten aineiden käytön tutkiminen on tärkeää, sillä ne voisivat korvata osittain antibioottilääkityksiä, joiden haittana ovat muun muassa resistenssiongelmat. Kappaleessa 5.1 kerrotaan kitosaanista, 5.2 hopeasta ja 5.3 rosiinista yleensä, sekä niiden hyödyntämisestä nanokuituteknologiassa. Lopuksi kappaleessa 5.4 perehdytään antimikrobisten materiaalien käyttöön pääasiassa haavanhoitosovelluksissa.

5.1 Kitosaani

5.1.1 Ominaisuudet

Kitosaanituotannon raaka-ainetta kitiiniä löytyy luonnosta muun muassa äyriäisten ja hyönteisten tukirangasta sekä useimpien sienten, homeiden ja hiivojen soluseinämistä [40]. Ruokateollisuuden sivutuotteita, katkarapujen ja rapujen kuoria, hyödynnetään kitosaanin tuotannossa, sillä kitosaanin saanto niistä on erittäin hyvä muihin vaihtoehtoihin verrattuna [41]. Kitosaania valmistetaan kitiinistä kemiallisella deasetyloinnilla [42]. Kitosaani on lineaarinen polysakkaridi eli sen rakenne muistuttaa polymeeriä, joka on yksi syy sen tutkimiseen kuitusovelluksissa [43]. Lisäksi kitosaanin rakenne on erittäin samanlainen kuin selluloosalla, paitsi kitosaanin aminoryhmä on selluloosan hydroksyyliiryhmän tilalla [3]. Kitosaani on positiivinen polyelektrolyytti, joka usein vaikeuttaa sen prosessointia. Kitosaanissa muodostuu usein sisäisiä vetysidoksia, jotka aiheuttavat kitosaaniketjujen agglomeroitumista, joka vaikeuttaa kuidutusta. Tähän ominaisuuteen on pystytty vaikuttamaan esimerkiksi käyttämällä ureaa lisäaineena kuidutusliuoksessa [3].

Kitosaania on kuidutettu sähkökehruulla onnistuneesti, mutta sen heikot mekaaniset ominaisuudet eivät ole yksinään riittäviä esimerkiksi kudosteknologisia sovelluksia aja-

tellen [22]. Tämän vuoksi kitosaanista valmistetaan yleensä komposiittikuituja apupolymeerien avustuksella [22]. Optimaalinen kitosaanin ja apupolymeerin massasuhte kuidoissa on usein 50:50 tai siten, että kitosaanin osuus on maksimissaan 50 % kuiduista [23, 3, 22]. Tällä konsentraatiolla on myös todettu hyvä antimikrobinen tehokkuus [23]. Kitosaani liukenee esimerkiksi heikkoihin vesipohjaisiin happoihin, kuten laimeaan etikkahappoon ja suolahappoon [3]. Kitosaanin sähkökehruuta rajoittaa sen huono liukenevuus useimpiin orgaanisiin happoihin. Kitosaania on kuitenkin onnistuttu liuottamaan sähkökehruuta varten muun muassa TFA:han. Liuoksesta valmistetut kuidut liukenivat helposti vesipohjaiseen liuokseen, joten kuidut täytyi ristosilloittaa, jotta niiden rakenne säilyi ehjänä [3].

Kitosaanin merkittävimmät ominaisuudet ovat sen saatavuus, bioyhteensopivuus, myrkyttömyys, metalli-ionien sitomiskyky, luonnolliset hajoamistuotteet, bioaktiivisuus (muistuttaa kemiallisesti glykosaminoglykaania, GAG), antimikrobisuus ja bioadheisivuus [44, 22]. Kitosaanin on todettu muun muassa estävän grampositiivisen *S. aureuksen* kiinnittymistä nanokuituihin ja ehkäisevän sen, sekä gramnegatiivisen *E. colin* kasvua [23]. Kitosaania käytetään useissa erilaisissa sovelluksissa, kuten estämään raskasmetallien ja radioaktiivisten isotooppien vettä saastuttavaa vaikutusta, eristävissä membraaneissa, lääketieteessä, luiden ja rustojen kudosteknologiassa, bioteknologiassa sekä kosmetiikka- ja elintarviketeollisuudessa [45, 35]. Korkean moolimassan kitosaani soveltuu hyvin biohajoaviin kudosteknologian sovelluksiin, sillä sen hajoaminen on hitaampaa, joten se pysyy bioaktiivisena pidempään alhaisen moolimassan kitosaaniin verrattuna [22].

Kitosaania on tutkittu paljon nanokuidoissa ja sähkökehruussa. Joidenkin polymeerien, kuten PLGA:n kanssa kuidutettuna, polykationisen kitosaanin konsentraation nostaminen on tehnyt kuitujen pinnasta prosessissa varautuneemman, joka aiheuttaa vahvempaa venytystä liuossuihkuun, ja sitä kautta ohuempia kuituja [22]. Kitosaanirakenteen amiiniryhmät saattavat myös toimia esimerkiksi PLGA:n happoisten sivutuotteiden neutralisoina, joka olisi hyödyksi kudosteknologisissa sovelluksissa [34]. Kitosaaninanopartikkeleja ei kuitenkaan ole tutkittu sähkökehruussa eikä polymeeriliuoksissa vuoteen 2013 mennessä, vaan niiden käyttöä on tutkittu esimerkiksi kankaiden viimeistelykäsittelyissä [46, 47, 45, 48, 3]. Nanopartikkelien ominaisuudet ovat ainutlaatuisia ja niistä voisi olla hyötyä erityisesti haavanhoitosovelluksissa, implanttimateriaaleissa ja scaffoldeissa.

5.1.2 Kitosaaninanopartikkelit

Kitosaanista voidaan valmistaa nanokokoisia partikkeleja, joiden antimikrobisuus on osoittautunut tehokkaammaksi kuin kitosaanin yleensä [46, 45, 48]. Nanokitosaania käytetään paljon esimerkiksi kankaiden antimikrobisissa viimeistelykäsittelyissä, keinolinten geenin siirron kontrolloidussa lääkeannostelussa sekä immunopropyfaksissa. Kitosaanin on osoitettu esimerkiksi parantavan insuliinin imeytymistä ruoansulatuksesta elimistöön [48]. Nanopartikkelien suurempi pintajännitystiheys normaalikokoiseen kitosaaniin verrattuna mahdollistaa myös tehokkaamman vuorovaikutussuhteen bakteerien

kanssa estäen niiden kasvun. Kitosaaninanopartikkelien ja korkeamman moolimassan kitosaanin (KKS) antimikrobisen tehokkuuden ero on ollut joissain tutkimuksissa merkittävä [48]. Tekstiileissä käytetyn nanokitosaanin on osoitettu parantavan tekstiilin pestävyyttä, värjäytyvyysominaisuuksia ja kestävyyttä sekä antavan antimikrobisia ominaisuuksia [46, 45, 48, 49]. Kitosaaninanopartikkeleja voidaan valmistaa useilla eri tavoilla. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kitosaanin moolimassalla on lineaarinen vaikutus valmistettävien partikkelien halkaisijaan ja zetapotentiaaliin. [45]

Kitosaanin moolimassaa voidaan alentaa vetyperoksidikäsitelyllä [45, 50, 51, 52]. Vetyperoksidin on todettu pienentävän kitosaaia rikkomalla sen ketjuja [49]. Ensin KKS liuotetaan huoneenlämmössä esimerkiksi heikkoon suolahappoon (0,1 M), joka soveltuu paremmin käytettäväksi vetyperoksidin kanssa, sillä etikkahapon käytöstä on raportoitu syttymis- ja räjähdystapauksia [45, 50, 51, 53, 54]. Riittävän sekoituksen jälkeen liuokseen lisätään vetyperoksidia, kunnes vetyperoksidin konsentraatio liuoksessa on esimerkiksi 0,5-15 %, josta saadaan viittausnimet taulukon 1 näytteille: C5, C7.5, C10, C12.5 ja C15. Valittu konsentraatio riippuu siis käytetyn kitosaanin moolimassasta sekä tavoiteltavasta moolimassasta. Huang et al. [50] valmistivat viisi erilaista alhaisen moolimassan kitosaaia (AKS) edellä esiteltyyn tapaan, ja kokeissa aikaansaatuja moolimassoja voi tarkastella taulukosta 1.

Taulukko 1. AKS:n moolimassat ja viskositeetit. K.a.=keskiarvo, s.p.= standardi poikkeama. [50]

NÄYTE	H ₂ O ₂ (ml)	Moolimassa (M _v)		Viskositeetti (ml/g)	
		k.a.	s.p.	k.a.	s.p.
Kitosaani	0	240500	12550	293,47	35,22
C5	5	77210	5200	64,63	9,58
C7.5	7,5	40100	3505	34,94	4,86
C10	10	15090	2020	14,08	3,52
C12.5	12,5	8720	685	8,46	2,24
C15	15	3650	320	7,76	2,13

Vetyperoksidilisäyksen jälkeen liuosta lämmitetään 50 °C-asteeseen [45, 50, 51]. Liuosta sekoitetaan ja lämpöä ylläpidetään 2 h ajan, jonka jälkeen reaktio pysäytetään viilentämällä liuosastia nopeasti. Viilentynyt liuos suodatetaan vakuumin avulla. Suodattimeen jäävä saostuma neutralisoidaan tislattulla vedellä, suodatin kuivataan ja punnitaan. Suodatettuun liuokseen lisätään etanolia ja liuos jätetään saostumaan 24 h ajaksi. Etanoliliuos suodatetaan jälleen vakuumin avulla, ja suodatin kuivataan sekä punnitaan. Suodattimien on oltava sellaisia, joista AKS saadaan kuivattuna irti käyttöä varten [45, 50, 51]. Kitosaanien moolimassat voidaan mitata esimerkiksi geelipermeaatiokromatografilla (GPC) [51].

AKS:sta valmistetaan nanopartikkeleja esimerkiksi liuottamalla valmistettu kitosaanijauhe heikkoon etikkahappoon [46, 45, 48]. Samalla valmistetaan toinen samankokoinen liuos, jota varten liuotetaan natrium-tripolyfosfaattia (TPP) veteen. AKS:n ja TPP:n

konsentraatiot vaikuttavat muodostuvien partikkelien kokoon ja zetapotentiaaliin [45]. Liuokset yhdistetään varoen, jonka jälkeen liuos sentrifugoidaan. Nanokitosaanialkaa muodostua heti TPP-lisäyksen jälkeen. Sentrifugoitua saostumaa pakastekuivataan 24 h, joka viimeistelee nanokokoisten partikkelien muodostumisen. Lopullinen tuote on siis jauhemuodossa. [46, 45, 48]

Kitosaaninanopartikkeleja on käytetty laimeaan etikkahappoon liuotettuna villakankaille, jotta kankaista saadaan antimikrobisia sekä paremmat värjäytyvyyttä ja kutistumista kestävät ominaisuudet [46, 45]. Lisäksi kitosaaninanopartikkeleja on valmistettu, jotta voitiin tutkia niiden antibakteerista aktiivisuutta eri mikro-organismeja vastaan *in vitro*-tutkimuksissa [48]. Yang et al. [45] tulokset osoittivat, että nanopartikkelien muodostuminen riippui suurelta osin vapaiden aminoryhmien konsentraatiosta, joka kasvatti partikkelien pinnan varausta ja zetapotentiaalia, ja vahvasti sähköstaattisia vuorovaikutuksia kitosaanin ja TPP:n välillä pienentäen partikkelikokoa. TPP todennäköisesti parantaa kitosaanin adsorptiota, joka vähentää villakankaan kutistumista ja parantaa sen antibakteerisuutta. Nanokitosaanilla käsiteltyjen villakankaiden antibakteerisuus säilyi myös 20 pesukerran jälkeen lähes yhtä hyvänä, sillä kitosaaninanopartikkelit ovat pieniä ja niiden osmoosi korkea, joten niiden pois peseytyminen on hankalaa. [45]

Kitosaaninanopartikkeleja ei ole raportoitu tutkittaneen polymeeriliuoksissa, eikä sähkökehrussa vuoteen 2013 mennessä. Kitosaaninanopartikkelien käytöstä voisi olla hyötyä nanokuituisissa sovelluksissa edellä mainittujen tutkimustulosten perusteella. Kiinnostavia tutkimuskohteita ovat yksinkertainen valmistusmenetelmä, kitosaaninanopartikkelien käyttäytyminen uudelleen liuotettaessa kehruliuosta varten, nanopartikkelien antimikrobinen aktiivisuus ja sijoittuminen nanokuiduissa sekä kitosaaninanopartikkelien soveltuvuus esimerkiksi PLA ja PLGA-polymeerien kanssa.

5.2 Hopea

5.2.1 Ominaisuudet

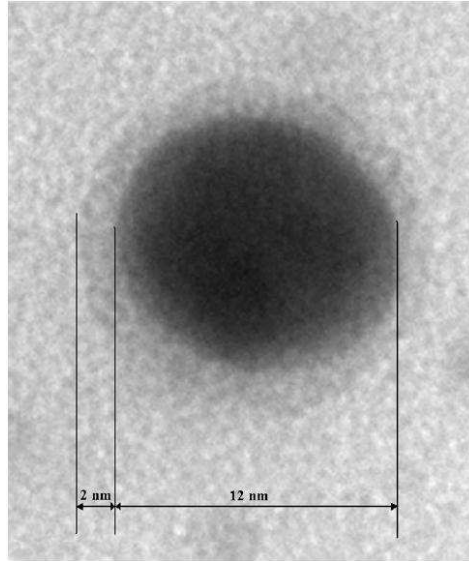
Hopean on jo pitkään tiedetty olevan antimikrobinen. Sitä on käytetty muun muassa palovammojen hoidossa, implanteissa, proteeseissa ja useiden muiden käyttökohteiden materiaaleissa estämään tartuntoja ja bakteerien leviämistä sekä kasvua [55, 33]. Hopean on osoittanut antimikrobista aktiivisuutta grampositiivisia ja gramnegatiivisia bakteereja, erilaisia home- ja hiivasieniä, tiettyjä viruksia ja antibioottiresistenttejä kantoja vastaan [55, 33]. Toisin kuin antibiootit, hopea kestää gammasteriloinnin, eikä sille voi kehittyä resistenssiä [33]. Hopeaa voidaan käyttää kuiduissa ja tekstiileissä joko kuituihin lisättynä tai se voidaan lisätä viimeistelykäsittelyissä. Hopealla viimeistellyn tekstiilin antimikrobista tehokkuutta ja hopean pesunkestävyyttä on saatu merkittävästi parannettua esimerkiksi kankaan laser-käsittelyllä, jota käytetään muun muassa puuvillaisten denim-kankaiden värin haalistuksessa [56]. Lääketieteellisissä sovelluksissa käytetyn hopean määrälle pyritään löytämään optimaalinen minimi, jolla saadaan aikaan riittävä antimikrobisuus, sillä hopean on todettu olevan myrkyllinen tietyillä konsentraatioilla

[55]. Hopean antimikrobisuuden on todettu olevan sitä tehokkaampaa mitä pienempiä partikkelit ovat [55].

Nanokuiduissa hopean käyttöä on tutkittu paljon pelkistämällä hopeanitraattia (AgNO_3) useilla eri menetelmillä [55, 57, 58, 59]. Hopeananopartikkelit voidaan valmistaa etukäteen ennen kuidutusprosessia, mutta tällä tavalla valmistettujen nanopartikkelien on todettu vaikeuttavan kuidutusprosessia kasautumalla agglomeraateiksi [57, 58, 59]. Nanopartikkelit kannattaa siis valmistaa pelkistämällä hopea prosessin aikana, jotta saadaan mahdollisimman homogeeninen lopputulos [59]. Tässä työssä tutkitaan hopeananopartikkelien valmistusta käyttämällä pelkistimenä kitosaania, joka on melko uusi menetelmä. Yleensä hopeanitraatin pelkistykseen käytetään erittäin toksisia kemikaaleja, jotka tuottavat ongelmia biologisissa sovelluksissa ja kuormittavat luontoa [60, 61]. Ympäristön suojelun ja paremman bioyhteensopivuuden vuoksi on alettu tutkia erilaisia mahdollisimman luonnollisia, ei-toksisia ja biohajoavia aineita, jotka voisivat sekä stabiloida että pelkistää hopeananopartikkelit [60, 61]. Tällaisiksi on tähän mennessä osoittautunut kitosaanin lisäksi muun muassa vesi ja polysakkaridit, β -D-glukoosi-tärkkelys sekä rosiini [60, 61, 62, 63].

5.2.2 Hopeananopartikkelit

Hopeananopartikkeleja on tutkittu paljon nanokuiduissa, sillä niillä on muun muassa erinomaiset optiset, sähköiset, katalyyttiset ja antimikrobiset ominaisuudet [59]. Hopeananopartikkeleiden valmistusta kitosaaniavusteisesti on tutkittu vasta vähän. Kitosaani sopii hopeananopartikkelien muodostamiseen, sillä se toimii sekä pelkistävänä että stabiloivana eli partikkelien pintaa passivoivana tekijänä, joten muita apuaineita ei tarvita. Tutkimuksissa on käytetty kitosaania oligomeerimuodossa ($M_w < 1000$ [64]), mutta myös niin sanottuna normaalina kitosaanina ($M_w = 400000$ [62]). Molemmilla moolimassoilla on aikaansaatu tasalaatuisia hopeananopartikkeleja [64, 62]. Kitosaanin pelkistävä ominaisuus riippuu sen liuoskonsentraatiosta sekä liuoksen reaktiolämpötilasta [62]. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kitosaani ei kulu reaktion aikana, vaan se ympäröi muodostuneet hopeananopartikkelit ja siten vaikuttaa myös lopputuotteen antimikrobisuuteen, kuten nähdään kuvassa 8 [62]. Tämän vuoksi saattaa olla hyödyllistä käyttää alhaisen moolimassan kitosaania, joka on todettu antimikrobiselta aktiivisuudeltaan tehokkaammaksi kuin korkeamman moolimassan kitosaani [45, 48].



Kuva 8. Hopeananopartikkeli, jossa 12 nm hopeaydin ja 2 nm kitosaanikuori. [62]

Hopeananopartikkeleja valmistetaan kitosaaniavusteisesti liuottamalla kitosaani laimeaan etikkahappoon ja sekoittamalla liuos 0,1 M hopeanitraattiliuokseen [64, 62]. Kitosaanin ja hopeanitraatin konsentraatioita on optimoitu muun muassa pyrkien minimoimaan partikkelien aggregoitumista ja faasierottumista sekä löytämään sopiva partikkelikoko, joka on mahdollisimman antibakteerinen [62]. Kitosaani/hopeanitraatti-liuosta lämmitetään noin 80 °C-asteeseen ja lämpöä ylläpidetään 0,5-6 h. Alhaisemmissa lämpötiloissa kitosaani on heikko pelkistäjä, jolloin reaktio ei ole yhtä tehokas [62]. Korkeampi lämpötila olisi parempi pelkistyskinetiikalle, mutta tällöin kitosaani saattaa hajota sen lisäksi, että agglomeraatteja on todettu muodostuvan enemmän [62].

Kitosaaniavusteisesti valmistetut hopeananopartikkelit ovat kokoa 10-80 nm, riippuen reaktioajasta, -lämpötilasta sekä kitosaanin konsentraatiosta [64, 62]. Hopeananopartikkelien muodostumisen voi huomata liuoksen muuttuessa hiljalleen kellertäväksi. Jotta kuitenkin saadaan selvitettyä optimaalinen reaktioaika ja raaka-aineiden konsentraatiot, nanopartikkelien muodostumista seurataan yleensä prosessin aikana spektrofotometrillä. Nanopartikkelit muodostuvat reaktiossa, siten että Ag^+ -ionien pelkistyminen johtaa ensin hopea-atomien (Ag_0) muodostumiseen, joita stabiloi liuoksen kitosaani [62]. Tätä seuraa hopea-atomien agglomeroituminen klustereiksi, joka johtaa kolloidisten Ag – partikkelien muodostumiseen. Kun ytimet kasvavat muutamaa atomia isommiksi, kitosaanimolekyylit alentavat niiden pintaenergiaa. Lopulta ydinten kasvaessa kriittiseen kokoon, pintaenergia atomien moolia kohden alkaa laskea, joka merkitsee ydintymisvaiheen loppumista. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kitosaanin korkea konsentraatio yhdistettynä alhaiseen lämpötilaan saa aikaan alhaisen pelkistymisnopeuden, mutta erittäin pienen partikkelikoon. Kitosaanin alhainen konsentraatio ja korkea lämpötila voivat aiheuttaa erittäin korkean pelkistymisnopeuden ja paljon nanopartikkelien agglomeroitumista [62].

Hopeananopartikkelien maksimiaallonpituus (λ_{max}) on noin 400 nm. [62] Kun liuoksessa tapahtuvaa reaktiota seurataan spektrofotometrillä, absorbanssi/aallonpituus-

käyrän muoto muuttuu symmetriseksi ja melko kapeaksi tuolla aallonpituusalueella, joka merkitsee hopeananopartikkelien olevan liuoksessa sillä hetkellä hajaantuneina ja muodoltaan pyöreitä. Jos spektra on asymmetrinen laajentuen pitkiä aallonpituuksia kohden, se merkitsee hopean agglomeroitumista. [62] Nanopartikkelien muoto saattaa vaikuttaa niiden antimikrobiseen tehokkuuteen [55]. Esimerkiksi kolmikulmaiset partikkelit olivat tehokkaampia *E. colia* vastaan kuin sauvamaiset tai pyöreät nanopartikkelit [55, 61]. Kitosaanin avulla valmistetut hopeananopartikkelit ovat prosessin loputtua liuosmuodossa jauheen sijaan, mutta vuoteen 2013 mennessä julkaistut tutkimusraportit eivät osoittaneet minkäänlaista estettä liuoksen kuivaamiselle jauhemuotoon, joka laajentaisi tällä menetelmällä valmistettujen partikkelien jatkokäyttömahdollisuuksia.

Hopeananopartikkelien valmistamista kitosaaniavusteisesti on tutkittu lähinnä menetelmän kannalta, ja valmistettuja nanopartikkeleja on käytetty vuoteen 2013 mennessä vain antimikrobista aktiivisuutta ja muita ominaisuuksia analysoiviin kokeisiin. Kitosaaniavusteinen menetelmä on luonnon ja bioteknologian käyttökohteiden kannalta erittäin suotuisa, jonka vuoksi tällä tavalla valmistettujen hopeananopartikkelien käyttöä kannattaisi tutkia myös nanokuiduissa. Kiinnostavia tutkimusaiheita ovat muun muassa edellä läpikäydyltä menetelmällä valmistettujen hopeananopartikkelien antimikrobinen aktiivisuus ja sijoittuminen nanokuiduissa, liuoksen kuivattaminen jauheeksi sekä liuoksen/jauheen käyttö PLA ja PLGA-polymeerien kanssa.

5.3 Rosiini

5.3.1 Ominaisuudet

Rosiini on kuusi- ja mäntypuulajikkeista saatavan pihkan kiinteä muoto, joka saadaan aikaan kuumentamalla pihkaa terpeenin höyryttämiseksi [65, 66, 67]. Pääosin se sisältää erilaisia pihka-happoja, joista suurimman osan (90 %) muodostaa abieettinen happo [65, 66]. Rosiinia käytetään muun muassa kosmetiikassa, purukumissa, maaleissa, laakoissa, tulostinmusteissa, paperi- ja puutuotteissa sen kalvonmuodostusominaisuuden vuoksi [65]. Rosiinia ei ole raportoitu tutkittaneen nanokuiduissa vuoteen 2013 mennessä. Kirjallisuustutkimuksista saatiin selvitettyä useita hyödyllisiä tietoja sähkökehruta ajatellen.

Kuusen pihkaa on käytetty satojen vuosien ajan kansanlääkintämenetelmänä erilaisiin ihon pinnallisiin vammoihin erityisesti Suomen Lapissa [68]. Aiheesta on tehty viime vuosikymmeninä useita tieteellisiä tutkimuksia, joiden tulokset ovat osoittaneet pihkajohdannaistuotteiden parantavan hyvin esimerkiksi ihon tulehdustiloja [69]. Rosiinilla on antimikrobisia ja erityisesti iho- ja kynsisienten kasvua estäviä ominaisuuksia [69]. Sen on todettu esimerkiksi estävän *Trychiphyton*-lajin dermatofyyttisten rihmasienten, grampositiivisten ja joidenkin gramnegatiivisten bakteerien (esimerkiksi *Proteus Vulgaris*) kasvun ja olevan antimikrobinen useita stafylokokkeja, mukaan lukien metisilliiniresistentti *S. aureusta* (MRSA), sekä vankomysiiniresistenttiä enterokokkia (VRE) vastaan [69, 70]. Osa kokeista on kuitenkin osoittanut rosiinin antimikrobi-

sen tehokkuuden olevan enemmän bakteriostaattinen kuin bakteriosidinen [69]. Rosiini saattaa myös avustaa haavan paranemisprosessissa mukana olevien aineiden migraatiota haava-alueelle ja siten indusoida solujen ja kudosten regeneraatiota [69, 71]. Pihkan antimikrobiset ominaisuudet saattavat liittyä sen sisältämien terpeenien tunnettuun solukalvoja heikentävään, läpäisevyyttä lisäävään ominaisuuteen [72]. Pihkan tehtävä puussa on suojata sitä mikrobisilta infektioilta, jotka voivat johtaa puun lahoamiseen [72]. Perinteisillä pihkavoiteilla on parannettu vaikeita makuuhaavoja ja kirurgisia haavoja jopa paremmin ja tehokkaammin kuin yleensä tällaisten haavojen hoidossa käytettävillä lääkeaineilla [69, 71, 72]. Markkinoilta löytyy useita kaupallisia tuotteita, kuten rasvapohjaisia pihkasalvoja ihon haavojen ja tulehdustilojen hoitoon sekä pihkalakkaa kynsisienien hoitoon. Näissä tuotteissa pihkan pitoisuus on 10-30 %, jolla on saavutettu optimaalinen antimikrobinen ja antimykoottinen tehokkuus. Pihkavoiteiden käytöllä ei ole havaittu olevan varsinaisia haittavaikutuksia, paitsi paikallista ekseemaa hartsiallergiaa sairastavilla [72].

Rosiinijohdannaiset, kuten rosiiniesterit ja abieettisen hapon johdannaiset kuuluvat polymeeriin biomateriaaleihin ja niitä on tutkittu laajasti myös farmaseuttisissa sovelluksissa pinnoitus ja mikrokapselimateriaaleissa [66]. Rosiini voidaan liuottaa esimerkiksi etanoliin, dimetyyliformamidiin (DMF), dimetyyliasetamidiin (DMAc), dikloorimetaaniin, eetteriin, bentseeniin ja kloroformiin [73, 74, 65, 75, 66, 67]. Rosiiniglyserolierit ovat biohajoavia sekä *in vitro* että *in vivo* [65]. Näistä rosiinijohdannaisista valmistettut kalvot eivät aiheuttaneet normaalista implantoinnista aiheutuvaa inflammaatiota laajempia tulehduksia eivätkä kudosteknoosia. Rosiinijohdannaisien todettiin myös saavan aikaan intensiivisempää kudosten proliferaatiota esimerkiksi PLGA-polymeeriin verrattuna. Rosiinikalvot hajasivat säilyttäen rakenteensa sopivalla nopeudella kudosteknologisia sovelluksia ajatellen. Kalvojen bioyhteensopivuus vaikutti samanlaiselta kuin hydrofobisilla polymeereillä, jonka selittää rosiinien heikko liukenevuus veteen, mutta kudostoleranssi oli silti kohtuullisen hyvä [65].

Rosiinista valmistettuja mikro- ja nanopartikkeleja on tutkittu lääkeaineiden kohdistetussa annostelussa [73]. Tutkimukset osoittivat, että rosiini pystyy hajoamisensa vuoksi kontrolloimaan hyvin esimerkiksi hydrokortisonin vapautumista partikkeleista. [73] Hopeananopartikkelien valmistusta rosiiniavusteisesti on tutkittu vähän, mutta hyvin tuloksin [63]. Rosiinin abieettinen happo toimii kitosaanin tavoin hopeanitraatin pelkistäjänä ja estää lisäksi agglomeraattien muodostumista. Rosiinin avulla on saatu valmistettua yhdenkokoisia ja pyöreitä hopeananopartikkeleja reaktio-olosuhteita kontrolloimalla [63].

5.4 Antimikrobiset sovellukset

Bakteerien kasvua ehkäisevä ja bakteereja tappava antimikrobinen ominaisuus on hyödyllinen erityisesti lääketieteellisissä sovelluksissa. Tällaisia ovat kudosteknologiset scaffoldit, implantit, haavanhoitosovellukset ja lääkeaineiden kohdistetun ja kontrolloidun luovutuksen materiaalit. Lisäksi antimikrobisuus on hyödyksi materiaaleissa,

joiden välityksellä bakteerien aiheuttamat tartunnat usein leviävät ihmisten keskuudessa. Näihin kuuluvat esimerkiksi julkisten tilojen pinnat, joihin kosketaan usein paljain käsin, kuten ovenkahvat, valokatkaisijat, puhelimet ja muut elektroniset laitteet, julkisten kulkuvälineiden sisätilat, sekä sairaaloissa edellä mainittujen lisäksi sairaalatekstiilit. Tässä kappaleessa keskitytään tarkemmin haavanhoitoon ja kudosteknologiassa sekä haavanhoidossa käytettäviin sovelluksiin.

5.4.1 Haavat ja niiden hoito

Haavan paraneminen on monivaiheinen prosessi, johon liittyy useita muuttujia. [76] Vaikka optimaalisesta hoidosta voidaan olla yhtä mieltä, vaikuttavien tekijöiden osuutta on edelleen määrittämättä, kuten potilaan terveys, psykologinen status ja ravitsemuksellinen status (solutasolla), kasvutekijöiden rooli sekä bakteeriproteaasin kontrollointi.

Haavat voidaan jakaa kolmeen ryhmään: akuutit, palo- ja krooniset haavat. Akuutit haavat aiheutuvat leikkauksista tai vammautumisesta, ja ne yleensä vaativat rajoitettua paikallista hoitoa. Palovammat luokitellaan lisäksi kolmeen alaryhmään vammojen vakavuuden perusteella. Krooniset haavat paranevat usein pisimpään, sillä niitä syntyy yleensä huonon terveyden, paikallisen paineen, diabeteksen, karsinooman, heikon verenkierron, huonon ravitsemuksellisen tilan, immuunipuutosten, tulehdusten tai korkean iän vuoksi.

Akuutit haavat ja palovammat paranevat yleensä normaaliin kolmivaiheiseen tapaan: tulehdus-, proliferaatio- ja maturaatiovaihe. Kehossa on kaikki tarvittavat aineet tällaisten haavojen parantamiseen ja lääketieteen tehtäväksi jää tulehdusten estäminen, verenvuodon tyrehdys erityisesti suurissa tai syvissä haavoissa, vammautuneiden alueiden korvaus terveellä ja ehjällä siirteellä (esimerkiksi auto- tai allogeeninen siirre, tai synteettinen iho), paranemisen nopeuttaminen sekä lopputuloksen (yleensä arven) parantaminen. Arpia voidaan paranemisen lopuksi myös korjata kosmeettisesti plastiikkakirurgian avulla. Kroonisten haavojen syntyessä edellä esitelty normaali tapahtumaketju on häiriintynyt. Usein kroonisten haavojen taustalla on potilaan huono terveydentila, jonka vuoksi kyseiset haavat on luokiteltu tilan aiheuttaneen sairauden mukaan. Näitä ovat suonikkaat haavat, diabeettiset- ja valtimohaavaumat sekä painehaavat. Erityisen ongelmallisia ovat pitkään vuodehoidossa olevilla potilailla, kuten vanhuksilla, esiintyvät painehaavat. Nämä haavaumat voivat olla erittäin suuria ja niiden hoito on hankalaa ja erittäin epämurkavaa potilaalle varsinkin, jos vuodehoitoa täytyy jatkaa.

On tunnistettu useita eri tekijöitä, jotka vaikuttavat haavojen epätäydelliseen paranemisprosessiin. Tällaisia ovat esimerkiksi riittämätön kudoksen hapensaanti, potilaan ikä, huono ravitsemus, infektiot, ihoon kohdistuva paine, psykologinen stressi ja sairaudet. Vammautunut kudos täytyisi pitää kosteana, mutta poistaa liika erite, suojassa lisävammoilta ja bakteerisilta infektioilta, lämpimänä ja sopivan happirikkaana. Haavoja voidaan sitoa useilla eri tavoilla haavan luonteen, vakavuuden, sijainnin ja vaatiman hoidon mukaan. [76]

5.4.2 Haavanhoitosovellukset

Vuonna 2011 haavanhoidossa käytössä olleissa scaffoldeissa oli useita haittoja, kuten kallis hinta (noin 7-14 euroa/cm²), säilytysympäristön vaatimukset (sopiva ja kontrolloitu lämpötila sekä ilmasto) sekä niiden käyttöympäristön vaatimukset, kuten leikkaussali ja laaja-alaisen antibiootihoidon tarve [77]. Tuotteiden käytön yleistämiseksi näitä ominaisuuksia on muokattava parempaan suuntaan. Esimerkiksi scaffoldien implantointitapa vaikuttaa uusien tuotteiden käytön yleistymiseen, sillä niitä operoivat kirurgit päättävät viime kädessä niiden käyttöön otosta. Jos implantointi on tehty vaikeaksi, uusia tuotteita ei oteta mielellään käyttöön. Yritykset suunnittelevat uusia tuotteita tämän vuoksi yleensä yhteistyössä kirurgien kanssa.

Haavan paranemista täytyy pystyä seuraamaan, johon ihanteellisinta olisivat läpinäkyvät sidokset. Näin haavan infektoituminen saadaan minimoitua, kun siihen koskeminen vähenee. Haavaan kontaktissa olevien materiaalin on oltava steriilejä eli käytettävien materiaalien on kestettävä tarvittavat käsittelyt. Yleisimmät tällä hetkellä käytettävät sidosmateriaalit ovat pohjaltaan valkaistua puuvillaa tai puuvilla/viskoosisekoitetta, jossa on lisäksi parafiiniä estämässä kiinnittymistä [78]. Haavaa saastuttavien bakteerien kasvua voidaan estää oraalilla antibiootihoidoilla, mutta paikalliseen hoitoon voisi soveltua paremmin erilaiset antimikrobiset aineet, kuten esimerkiksi edellä esitellyt kitosaani, hopea tai rosiini, jotta saadaan vähennettyä lääkkeitä usein aiheuttavia sivuoireita sekä resistenttien kehittymistä. Näiden aineiden on tutkittu ehkäisevän tai tappavan kaikkia yleisimpiä haavojen bakteereja, kuten *E. coli*, *S. aureus* ja jopa MRSA [55, 23, 33, 69, 70, 79].

Antimikrobiset aineet, biohajoavat polymeerit, nanokuituiset rakenteet ja nanopartikkelit vaikuttavat ominaisuuksiltaan erittäin lupaavilta haavanhoitosovelluksia ajatellen. Optimaalisin haavasidos olisi sellainen, jota ei tarvitsisi poistaa, vaan se absorboituisi kehoon ja korvautuisi kasvavalla kudoksella [78]. Sidos voisi sisältää kaikki haavan paranemiseen tarvittavat lääkeaineet, ja niiden annostelu voisi tapahtua kontrolloidusti sopivaksi säädetyllä hajoamisnopeudella, eikä haavaan tarvitsisi juuri koskea paranemisen aikana. Sidoksen rakenne voitaisiin myös suunnitella sopivasti kosteutta ja ilmaa läpäiseväksi pitämään bakteerit loitolla, mutta samalla haavan kosteana [78].

Haavanhoitoon tarkoitetuissa biomateriaaleissa nanokuitukankaiden on väliaikaisesti korvattava alkuperäinen vaurion vuoksi puuttuva ECM ja ne tarjoavat potentiaalisen tavan kontrolloidulle lääkeannostelulle [7]. Nanokuiturakenteet muistuttavat luonnollista ECM:ää kuituisen ja erittäin huokoisen rakenteensa sekä kokoluokkansa vuoksi [7]. Lisäksi nanokuidut on mahdollista valmistaa myös kemialliselta koostumukseltaan ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan luonnollista ECM:ää matkivaksi [21]. Näistä syistä nanokuidut tukevat haavojen verenvuodon tyrehtymistä ja edesauttavat kudosten korjaantumista helpottaen solujen kiinnittymistä ja proliferaatiota [7]. Nanokuidut ovat osoittaneet vähentävän haavan arpeutumista ohjaamalla soluja paremmin itsensä korjaamiseen. Lisäksi nanokuitukankaat tukevat haavan puhtautta rajoittamalla bakteerien tunkeutumista haavaan toimien eräänlaisena siivilänä. Nanokuitujen suuri pinta-ala tarjoaa te-

hokkaan lääkkeiden vapautumiskyvyn. Tähän tapahtumaan voidaan vaikuttaa kontrolloimalla nanokuitumembraanin ominaisuuksia, funktionalisoimalla kuituihin tai niiden pintaan lisättyjä lääkettä sisältäviä nanopartikkeleja sekä polymeroimalla pintaa kemiallisesti. [7]

Useat tutkimukset liittyen nanokuituisiin haavanhoitomateriaaleihin keskittyvät yleensä vain niiden rakenteen ja antimikrobisten toimintojen merkitykseen tehokkaassa haavanhoidossa [7]. Tulehdusten kontrollointi ja kudosten korjaantuminen sisältää kuitenkin välttämättömiä kuitukankaan dynaamisia interaktioita haavan ympäristössä, johon myös bakteerit kuuluvat. Bakteerien kiinnittyminen ja kasvu nanokuiduissa saattaa vaikuttaa nanokuitujen rakenteeseen sekä toimintoihin haavassa. Nanokuitujen ja haavan bakteerien interaktioita on siis syytä tutkia samalla, kun uusia sovelluksia kehitetään. Bakteerien läsnä ollessa esimerkiksi antibioottia sisältäneiden PLGA-nanokuitujen hajoaminen nopeutui samalla, kun lääkkeen vapautumisnopeus kiihtyi ja ympäristön pH aleni. Tämä johti bakteerien muodostaman biofilmin pienenemiseen, mutta samalla myös rakenteen ennen aikaiseen hajoamiseen. Tällainen tapahtuma saattaa olla suotuista erityisesti lievemmissä haavoissa, mutta vakavammat ja pidempään tukea ja täyttöä vaativat haavat eivät välttämättä ehdi parantumaan riittävästi, ja riski uudelleen infektoitumiselle on suuri. [7]

Implanttien ja scaffoldien sisältämät antibiootit ja antimikrobiset aineet ovat hyödyllisiä leikkausalueen paranemista ajatellen [33]. Yleensä leikkauksesta aiheutuvia infektioita hoidetaan oraalilla laaja-alaisella antibiootihoidolla, mutta sen lisäksi, että antibiooteista aiheutuu usein haitallisia sivuoireita ja resistenttiyttä, lääkehoito ei aina riitä. Kehoon asetettu vierasesine aiheuttaa useita reaktioita elimistössä, kuten eräänlaisen shokkitilan immuunipuolustusjärjestelmään, jonka aikana immuunipuolustus ei välttämättä kykene toimimaan tehokkaasti niin kauan, kun implantti on läsnä. Usein materiaalin pinta tarjoaa lisäksi hyvän alustan bakteerien kiinnittymiselle ja kasvamiselle. Täydellistä paranemista edistäisi materiaali, jolla bakteerit eivät selviä, johon ei tarvitse koskea, ja josta voisi lisäksi erittyä paranemista edistäviä lääkeaineita haavoittuneelle kudosalueelle. Biohajoavat lääkeaineita sisältävät nanokuiturakenteet ovat erittäin potentiaalisia tähän tehtävään. [33]

6 KOKEELLISET MENETELMÄT

Työn kokeellisessa osuudessa käytiin läpi työssä esiteltyjen PLA- ja PLGA-polymerien prosessoiteja ja lisääineistusmahdollisuuksia. Kokeissa tutkittiin polymerien liukenemista ja kuiduttamista sähkökehrumenetelmällä. Lisäksi selvitettiin antimikrobisten lisääineiden käyttöä kehrättävissä polymeeriliuoksissa. Liuoksista valmistettuja näytteitä analysoitiin pääasiassa pyyhkäisyelektronimikroskoopilla.

Kappaleessa 6.1 käsitellään tutkimuksessa käytettyjä materiaaleja. Kappaleessa 6.2 kerrotaan sähkökehruussa käytetystä laitteistosta ja menetelmistä. Lopuksi kappaleessa 6.3 käsitellään valmistettujen näytteiden analysointimenetelmien pääperiaatteita.

6.1 Materiaalit

Tutkittaviksi polymeereiksi valittiin Tampereen teknillisen yliopiston laitoksilta saadut polymeerit P(L/D)LA (L/D-suhde 50/50, $M_w=235\,500$), P(L/DL)LA (L/DL-suhde 70/30, $M_w=180\,000$) ja PLGA (L/G-suhde 80/20, $IV=5,72$ dl/g). PLA-polymerit olivat olleet säilytyksessä eksikaattorikaapissa ja PLGA pakastimessa. PLGA-polymeri oli tilattu vuonna 2000 ja sen valmistajan takaama kelpoisuus on 5 vuotta, mutta se hyväksyttiin näihin kokeisiin tutkittavaksi. Laitokselta saatiin myös tutkittu rosiinihartsi sekä kitosaanikokeissa käytetty jauhemainen kitosaani, jossa oli merkintä MCCH, joka viittaa mikrokiteiseen kitosaaniin. Kitosaanin moolimassa oletettiin hyvin korkeaksi. Muita tarkempia tietoja ei ole saatavilla.

Lisäksi käytettiin trifluorietikkahappoa (TFA, $C_2HF_3O_2$, 99 %), dikloorimetaania (DCM, CH_2Cl_2), suolahappoa (HCl), vetyperoksidia (H_2O_2 , 30 %), etanolia (C_2H_5OH , Ba-laatu), jääetikasta laimentamalla valmistettua etikkahappoa (CH_3COOH , 2 m-%) sekä deionisoitua vettä.

Kolme kuitunäytettä kehrättiin pahvista leikatuille kehyksille, jotka asetettiin leivinpaperin päälle. Muissa kuitunäytteissä käytettiin alustana tavallista punaista tulostuspaperia. Nämä materiaalit kiinnitettiin kupariselle keräysalustalle. Kaikki pahvikehysnäytteet valmistettiin, jotta olisi voitu tehdä sisäinen viskositeetti- (eng. *intrinsic viscosity*, IV) ja differentiaalinen pyyhkäisykalorimetritutkimukset (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC), jotka kuitenkin peruuntuivat aikataulullisista syistä.

6.2 Menetelmät

Tässä kappaleessa käydään läpi liuosten ja nanokuitunäytteiden valmistuksessa käytetyt laitteistot, menetelmät sekä merkitsevät prosessiparametrit.

6.2.1 Laitteet

Liuosten valmistus ja sähkökehruu suoritettiin Tampereen teknillisen yliopiston Materiaalitekniikan laboratorioissa. Liuoksia sekoitettiin magneettisekoittimella (Yellow Line MST Basic C). Kehruussa käytettiin suurjännitelähteenä bipolaarista Simco Chargemasteria, joka maadoitettiin pistorasiaan sekä kiinnitettiin kupariseen keräysalustalevyyn ja suuttimeen, jossa metallinen kanta ja neula. Keräysalustalle asetettiin paperia helpottamaan kuitunäytteiden irrotusta. SEM-näytteet päällystettiin ohuella kultakerroksella. SEM-kuvat otettiin Jeol JSM-T100 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan)-mikroskoopilla ja kuitujen halkaisijat määritettiin kuvista Image Tool 3.0-ohjelmalla.

6.2.2 Sähkökehruu

Polymeeri liuotettiin ensin sopivaan liuottimeen sähkökehruuta varten. Kaikkia polymeeriliuoksia sekoitettiin magneettisekoittimella, jonka sekoitusnopeutta säädeltiin viskositeetin muuttumisen mukaan. Polymeeriä lisättiin vähitellen aina edellisen lisäyksen liuetta. Kun polymeeri oli lisätty, astia peitettiin tiiviisti parafilmillä tai foliolla ja jätettiin vetokaappiin magneettisekoitukseen noin 24 h ajaksi. Liuoksia säilytettiin jääkaapissa, ja ennen kokeita niiden annettiin lämmetä huoneenlämmössä sekoituksessa. Sähkökehruuprosessissa suuttimeen kiinnitettiin jännitelähteen positiivinen ja keräysalustaan negatiivinen ulostulo. Kokeiden potentiaalierot vaihtelivat 20-40 kV:n välillä, neulan ja keräysalustan etäisyydet 10-20 cm:n välillä, ja käytetyt neulat olivat kokoa 14, 16 tai 18G ja pituudeltaan 25-30 mm. Kokeellisessa osuudessa tehtiin yhteensä 8 koesarjaa eri kehruparametreilla. Tarkemmat tiedot kaikista koesarjoista löytyvät liitteestä 1. Liitteen taulukoissa on kaikkien näytteiden tiedot, kuten käytetyt liuokset, neulat, neula-keräysalusta-etäisyydet (mm), neulan ja keräysalustalevyn jännitteet (kV) sekä sähkökentän voimakkuudet (kV/cm).

PLA 50/50-polymeeri liuotettiin TFA:han. Liuoksen 1 tiedot ovat taulukossa 2. Liuoksen 1 sähkökehruu ei sujunut hyvin ja syyksi epäiltiin alhaista viskositeettia. Tämän vuoksi liuosta muokattiin lisäten polymeerigranuloita. Liuosta 2 kuidutettiin jälleen aseptuksia vaihdellen ja kaikista valmistetuista näytteistä otettiin niiden kuivuttua SEM-näytteet.

Taulukko 2. Valmistetut liuokset, valmistuspäivät, sähkökehruupäivät, ja polymeerin sekä mahdollisen lisäaineen m-% liuoksessa.

#	Liuos	Pvm	ESpin	Polymeeri m-%	Lisäaine m-%
1	10 % PLA 50/50 / TFA	13.6.2012	14.6.2012	10	-
2	13 % PLA 50/50 / TFA	19.6.2012	20.6.2012	13	-
3	8 % PLA 70/30 / TFA	23.8.2012	24.8.2012 ja 5.9.2012	8	-
4	9 % PLA 70/30 / TFA	10.9.2012	11.9.2012	9	-
5	12 % PLGA 80/20 / TFA	27.6.2012	3.7.2012	12	-
6	13 % PLGA 80/20 / TFA	10.9.2012	14.9.2012	13	-
7	9 % PLA 70/30 / DCM	17.9.2012	27.9.2012	9	-
8	4 % ROSIINI / DCM	17.9.2012	-	-	4
9	95/5 PLA 70/30 / ROSIINI	24.9.2012	27.9.2012	6,5	0,9

PLGA ja PLA 70/30-polymeerit liuotettiin myös TFA:han (liuokset 5 ja 3). Liuosta 3 ei ehditty tutkia tarpeeksi, joten tehtiin vielä uusi PLA 70/30/TFA-liuos 4. Kun liuoksille 4 ja 5 saatiin säädettyä sopivat kehruuasetukset, niistä valmistettiin kuitukangasnäytteet leivinpaperille kiinnitetyille pahvikehyksille. Sähkökehruuprosessin annettiin olla käynnissä, kunnes pahvikehykset olivat täyttyneet mahdollisimman tasaisesti (noin 1-3 h).

Rosiini liuotettiin DCM:ään samalla tavalla kuin polymeerit. Liuoksen 8 annettiin sekoittua magneettisekoittimessa folion alla noin vuorokausi. Samalla tehtiin uusi PLA 70/30 –liuos 7 DCM:ään. Viimeisenä liuoksena valmistettiin PLA 70/30/rosiini-liuos painosuhteella 95/5 liuoksia 7 ja 8 yhdistämällä. Liuosta 9 sekoitettiin 2 h, jonka jälkeen sitä koetettiin kehrätä paksulla neulalla kehruuasetuksia vaihdellen. Näytteiden kuivuttua niistä otettiin SEM-näytteet tarkempaa analysointia varten.

Näiden liuosten lisäksi liuotettiin kitosaania laimeaan suolahappoon, kokeiltiin kitosaanin moolimassan alentamista vetyperoksidikäsitelyllä ja valmistettiin hopeanitraattiliuos hopeananopartikkeleja varten. Nämä kokeet eivät sujuneet oletusten mukaisesti, joten ne keskeytettiin. Näitä käsitellään tarkemmin kappaleessa 7.

6.3 Analysointimenetelmät

Valmistettujen kuitukankaiden laatua ja keräysalustojen peittymistä arvioitiin niin sanotusti paljaalla silmällä. Näytteistä otettiin vaihteleva määrä kuvia pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM), joista pystyttiin analysoimaan kuitujen tasaisuutta, epämuodostumia sekä asettumista alustalle. Näiden kuvien perusteella arvioitiin kuitujen ja pisaroiden keskimääräisiä halkaisijoita UTHSCSA Image Tool 3.00 -ohjelmalla. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi analysointimenetelmien pääperiaatteita.

6.3.1 Pyyhkäiselektronimikroskopia, SEM

Pyyhkäiselektronimikroskoopilla voidaan karakterisoida sähkökehrättyjen polymeeristen nanokuitujen ja kuitukankaiden morfologiaa. Laitteessa elektronisuihkua kiihdytetään pitämällä volframifilamenttia suuressa negatiivisessa 1-50 kV:n potentiaalissa samalla, kun tutkittava näyte on maadoitettu. Kun elektronisuihku törmää materiaalin pintaan, siitä heijastuu ja irtoaa muun muassa elektroneja, jotka kaapataan tunnustimella, ja joista muodostetaan kuva laitteen näyttöruudulle. Tutkittavat näytteet kiinnitetään kuparinappiin hiiliteipillä, ja ne päällystetään johtavalla kultakerroksella, jotta näytteet eivät varaudu mikroskopoinnissa.

Kultaus tehtiin jokaiselle näytteelle kolmessa syklistä siten, että syklin pituus oli aina 50 s, ensimmäisen syklin virta 10 mA ja viimeisten 20 mA. Sykliä välissä pidettiin noin minuutti taukoa. Kullattujen näytteiden kuituja tarkasteltiin SEM-pyyhkäiselektronimikroskoopilla (Jeol JSM-T100, Jeol Ltd., Tokyo, Japan). Kuvia otettiin muutama jokaisesta valmistetusta SEM-näytteestä satunnaisesti valituista kohdista 750-5000x suurennoksilla.

6.3.2 Kuitujen karakterisointi

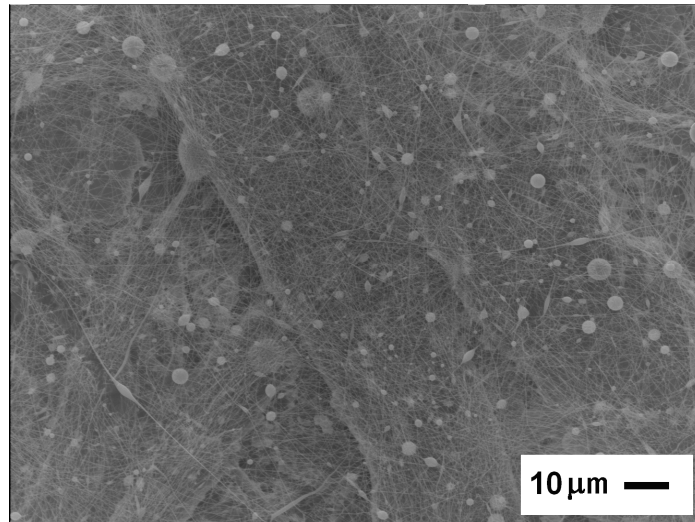
Kuitujen halkaisijat mitattiin näytteistä otetuista SEM-kuvista. Hyvän laatuista suurennoksista pyrittiin mittaamaan 30 eri satunnaisesti valittua kuitua ja mahdollisesti esiintyviä pisaroita UTHSCSA ImageTool 3.00 -ohjelman avulla. Tuloksista muodostettiin pylväskaavioita liitteeseen 2, joista voidaan analysoida muun muassa kuitujen laatua, eri kokojen esiintyminen näytteessä sekä keskimääräiset halkaisijat.

7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tässä kappaleessa käsitellään ensiksi polymeerien sähkökehruusta saatuja tuloksia ja sen jälkeen perehdytään antimikrobisten lisäaineiden prosessointeihin. Sähkökehruumenetelmän tuloksia käydään läpi polymeerien liuotuskokeita, kehuutapahtumaa ja SEM-kuvia analysoiden. Tuloksissa keskitytään myös prosessoinnin ongelmiin ja mahdollisiin ratkaisuihin PLA- ja PLGA-polymeerien ja antimikrobisten lisäaineiden jatkotutkimuksia ajatellen. Näytteiden tarkemmat sähkökehruutiedot ovat liitteessä 1 ja kuitunäyteistä kaikki satunnaisesti mitatut kuitujen halkaisijat liitteessä 2.

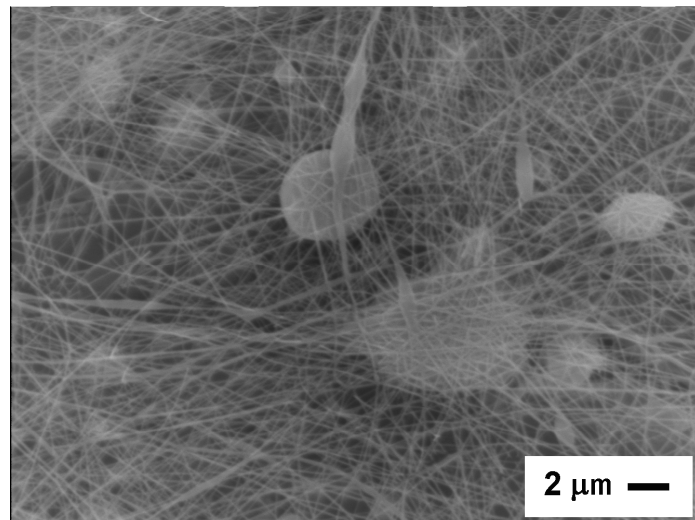
7.1 PLA-polymeerien sähkökehruu

PLA 50/50-polymeeri liukeni trifluorietikkahappoon hyvin. Polymeeriliuosten viskositeetti pysyi alhaisena, joka vaikeutti kehuuprosessia, vaikka polymeerin osuutta liuoksessa kasvatettiin noin 10 m-%:sta (liuos 1) 13 m-%:in (liuos 2). Liuokset eivät pysyneet säilytyksessä ennallaan, vaan niiden viskositeetti aleni nopeasti viitaten todennäköisesti polymeerin jatkuvaan hajoamisprosessiin liuoksessa. PLA 50/50-liuosten kuidutus oli hankalaa, sillä liuos ei muodostanut pysyvää tippaa neulan kärkeen ja liuokset pisaroivat paljon keräysalustalle kuidutuksessa. Liuoksesta 1 saatiin valmistettua kuituja eri asetuksilla, jotka löytyvät liitteestä 1 taulukosta 1, ja näytteistä otettiin SEM-näytteet kuivumisen jälkeen. Kuvasta 9 voidaan nähdä valmistettujen kuitujen yleiskuvaa sekä erilaisten helmien ja katkeamien esiintyminen kuiduissa. Helmet ovat suurimmilta osin aivan pyöreitä, mutta osa helmistä on sulautumassa kuituun, jonka vuoksi polymeerilisäyksen ajateltiin auttavan asiaa. Suurin osa pisaroista oli kokoa 500-1500 nm kuvan 9 näytteessä, kuten nähdään liitteessä 2 kuvassa 1. Etäisyyden ja potentiaalieron nostaminen (sähkökentän voimistuminen) kasvatti pisaroiden kokojakaumaa, kuten huomataan verrattaessa liitteen 2 kuvia 1 ja 2.

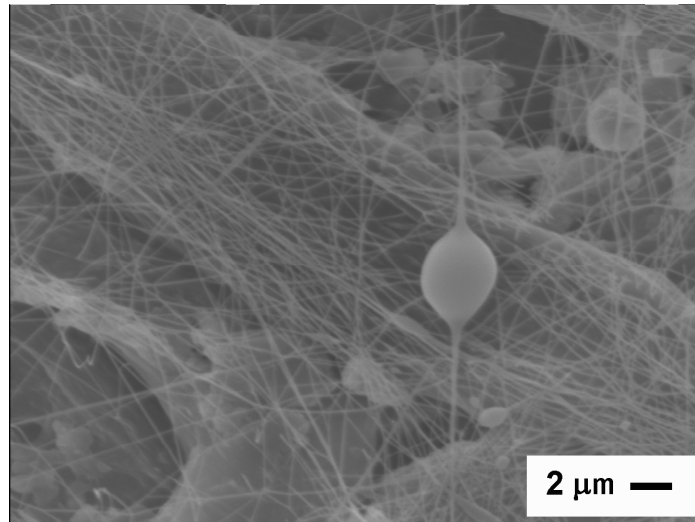


Kuva 9. SEM-kuva PLA 50/50 10 m-% nanokuiduista (liuos 1) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys ja 20 kV potentiaaliero. 750x.

Kuvassa 10 on huomattavissa kuitujen paksuuserojen vaihtelu, suuret pisarat ja katkeamien esiintyminen. Vaikka kuidut vaikuttivat kerääntyvän useassa näytteessä kosteina alustalle, kuvasta 11 voidaan katkeamien lisäksi havaita, että kuidut eivät ole sulautuneet toisiinsa risteyskohdissa.

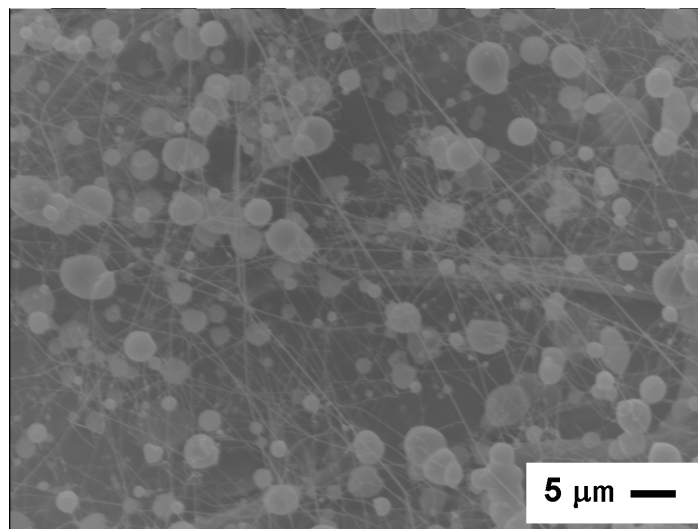


Kuva 10. SEM-kuva PLA 50/50 10 m-% nanokuiduista (liuos 1) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 3500x.



Kuva 11. SEM-kuva PLA 50/50 10 m-% nanokuiduista (liuos 1) asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 3500x.

Liuos 2 valmistettiin liuosta 1 muokkaamalla, joka todennäköisesti vaikutti lopputulokseen. Polymeeripitoisuuden kasvattaminen 13 m-%:in ei auttanut kadottamaan helmiä, vaan niiden määrä kasvoi, kuten nähdään kuvia 9 ja 12 vertaamalla. Koesarjassa 2 valmistettiin muutama näyte SEM-tutkimuksia varten eri kehruuasetuksilla, jotka on lueteltu liitteeseen 1 taulukkoon 2. Liuoksen 2 pitoisuus ei todennäköisesti ollut enää kehruvaiheessa laskettu 13 m-%, sillä liuosta 1 oltiin säilytetty jääkaapissa muutaman päivän ajan ennen muokkausta. Tässä vaiheessa kokeita ei vielä tiedetty, että polymeeri jatkaa hajoamistaan liuoksessa ja käytännössä tuhoutuu, jos sitä ei tutkita heti.

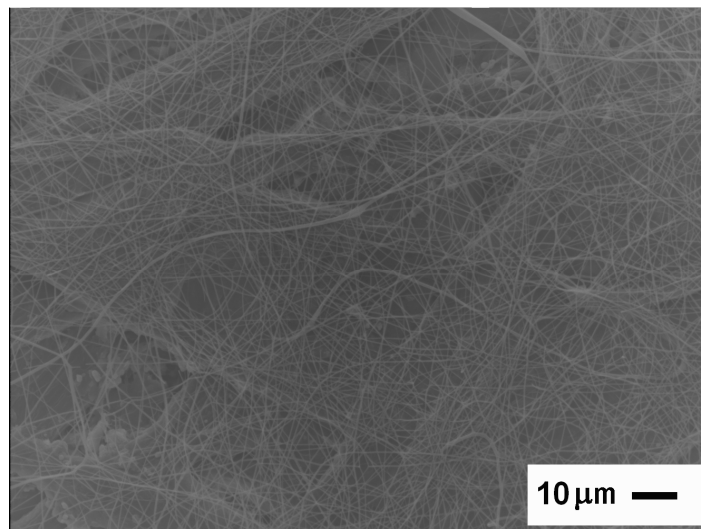


Kuva 12. SEM-kuva PLA 50/50 13 m-% nanokuiduista (liuos 2) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys ja 20 kV potentiaaliero. 1500x. Pisarat olivat kokoa 1-5 μm (liite 2 kuva 3).

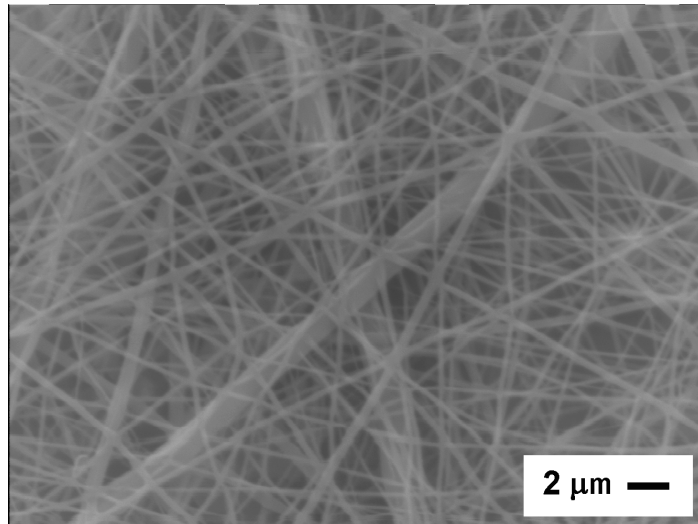
PLA 50/50 pääteltiin SEM-kuvien ja sähkökehruukokeiden perusteella liian amorfi-seksi polymeeriksi sähkökehruuta ajatellen, jonka vuoksi tutkimuksissa siirryttiin PLA

70/30-polymeeriin. Voidaan todeta, että PLA 50/50 tarvitsee todennäköisesti vähintään apupolymeerin, jotta siitä saadaan valmistettua tasalaatuista kuitua.

PLA 70/30-polymeerin liuotus TFA:han onnistui myös hyvin. Liuoksen 3 polymeeripitoisuudeksi säädettiin noin 8 m-%. Heti seuraavana päivänä tehdyissä kuidutuskokeissa esiintyi yleisiä prosessointiongelmia: liuos pisaroi keräysalustalle, tipan muodostuminen neulan kärkeen oli hankalaa ja kuituja muodostui erittäin hitaasti. 16G25-neulan vaihtaminen pidempään 16G30-neulaan sai kuitujen muodostumisesta sujuvampaa ja vähensi pisarointia. Eri asetuksia kokeilemalla valmistettiin muutamia kuitunäytteitä SEM-analysointia varten (liite 1 taulukko 3). Kaikki näytteet olivat yleisesti kuvan 13 kaltaisia. PLA 70/30-kuiduissa ei esiintynyt helmiä samaan tapaan kuin PLA 50/50-kuiduissa. PLA 70/30-kuitujen SEM -näytteistä oli havaittavissa vain yksittäisiä, kuvassa 13 näkyviä, paksuun kuituun sulautumassa olevia helmiä. Kuitujen paksuuseroissa oli vaihtelua, kuten havaitaan selvästi kuvan 14 näytteestä sekä liitteen 2 kuvasta 9. Näytteen pienin mitattu kuitu oli 150 nm, suurin 1520 nm, mutta keskimäärin kuidut olivat kokoa 200-300 nm. Vaikka kuvien 13 ja 14 näytteiden valmistuksessa käytetyt neulat ja kehruusetukset olivat aivan erilaisia, sillä ei ollut vaikutusta kuitujen kokoon, sillä myös kuvan 13 kuidut olivat keskimäärin kokoa 200-300 nm (liite 2 kuva 4). Sama toistui kaikissa tämän koesarjan tutkimuksissa.

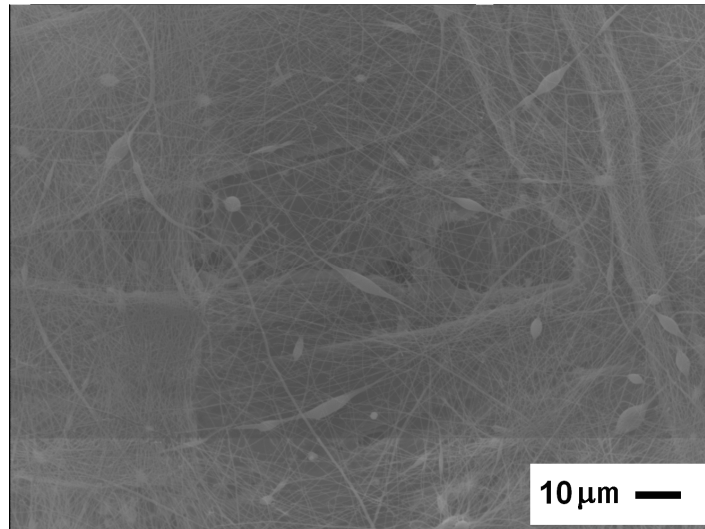


Kuva 13. SEM-kuva PLA 70/30 8 m-% nanokuiduista (liuos 3) asetuksilla 16G25 neula, 10 cm etäisyys, 30 kV potentiaaliero, sähkökentän voimakkuus 3 kV/cm. 750x.

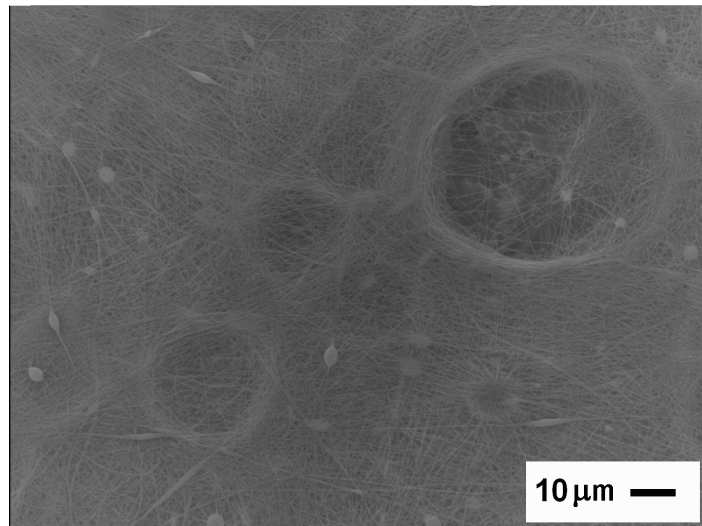


Kuva 14. SEM-kuva PLA 70/30 8 m-% nanokuiduista (liuos 3) asetuksilla 16G30 neula, 15 cm etäisyys, 20 kV potentiaaliero, sähkökentän voimakkuus 1,33 kV/cm. 3500x.

Liuksesta 3 tehtiin uusintakokeet noin kahden viikon kuluttua. Liuoksen viskositeetti oli selvästi alentunut todennäköisesti polymeerin hajoamisen vuoksi. Liuosta kuitutettiin aikaisempaa ohuemmalla kapillaarineulalla kokoa 18G25. Jokaisessa näytteessä havaittiin pieniä pisaroita. Optimaalisia asetuksia haettiin muutamalla kuitutuskokeella (liite 1 taulukko 4), jonka jälkeen valmistettiin kuitukangasnäyte leivinpaperille kiinnitetylle pahvikehykselle. Sähkökehruun annettiin olla jatkuvassa käynnissä noin kolme tuntia, jonka aikana kehikkoa siirrettiin horisontaalisesti ja vertikaalisesti sen mukaan, mihin kuituja näytti muodostuvan, jotta saataisiin aikaan mahdollisimman tasainen näyte. Kaikista näytteistä otettiin SEM-näytteet. Pahvikehyksen SEM-näyte otettiin kehyksen ulkopuolelta. Kangasnäyte irtosi leivinpaperista erittäin helposti, eikä rikkoutunut irrotuksessa. Vertaamalla kuvia 15 ja 16 kuviin 13 ja 14 voidaan selvästi havaita helmien määrän huomattava lisääntyminen, joka johtui todennäköisesti polymeerin hajoamisesta liuksessa. Kuvan 15 näytteen kuidut olivat keskimäärin kokoa 240-360 nm ja helmet vaihtelivat pääosin välillä 1-3 μm, kuten nähdään liitteessä 2 kuvissa 10 ja 11. Liuosten silminnähtävä pisarointi aiheutti lisäksi kuvan 16 kaltaisia kraatterimaisia epämuodostumia kuitukankaaseen.

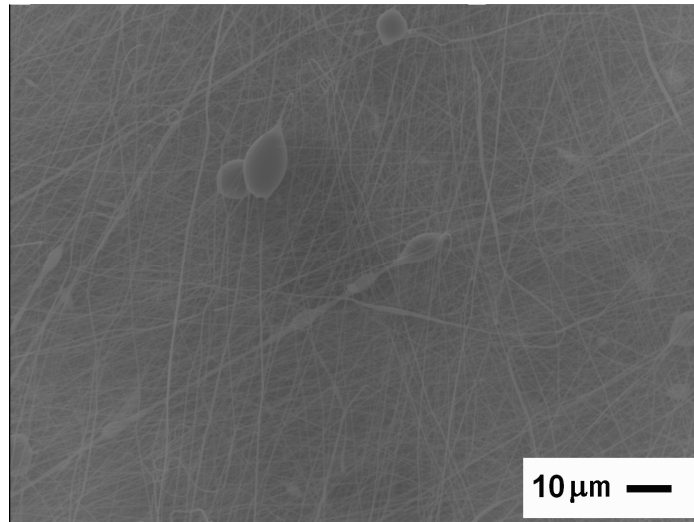


Kuva 15. SEM-kuva PLA 70/30 8 m-% nanokuiduista (liuos 3) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys ja 20 kV potentiaaliero. 750x.



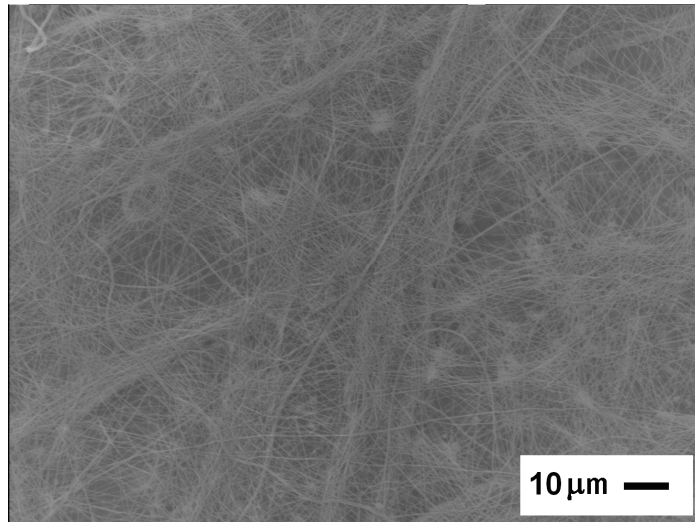
Kuva 16. SEM-kuva PLA 70/30 8 m-% nanokuiduista (liuos 3) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.

PLA 70/30-pahvikehykseen valmistetussa kangasnäytteessä esiintyi myös helmiä, kuitukatkeamia ja epätasaisuuksia, kuten nähdään kuvassa 17. Lisäksi kuvasta voidaan havaita kuitujen asettumista samansuuntaisesti samoilla kuitukerroksilla. Pahvikehyksen kuidut olivat paksuudeltaan keskimäärin 240-440 nm ja helmet 1-5 μm (liite 2 kuvat 13 ja 14).

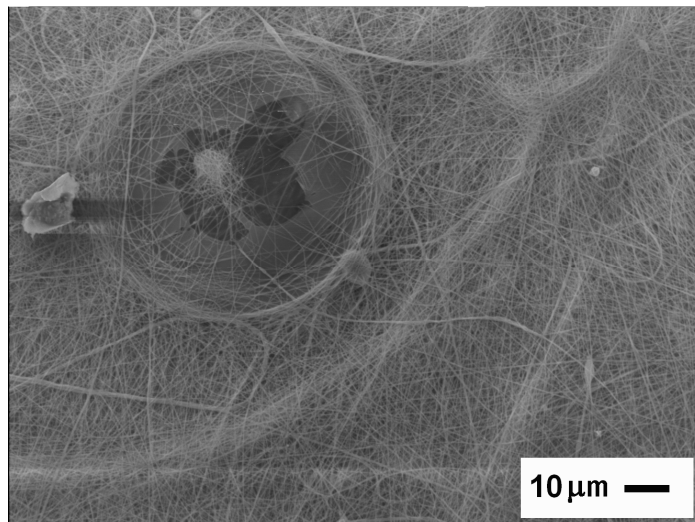


Kuva 17. SEM-kuva PLA 70/30 8 m-% pahvikehysnäytteen nanokuiduista (liuos 3) asetuksilla 18G25 neula, 10 cm etäisyys, 30 kV potentiaaliero ja kuidutusaika 3 h. 750x.

Koska liuos 3 todettiin lopulta ominaisuuksiltaan muuttuneeksi todennäköisesti polymeerin säilytyksessä jatkuneen hajoamisen vuoksi, valmistettiin uusi liuos, jotta saatiin valmistettua uusi pahvikehysnäyte tuoreesta liuoksesta. Liuoksen 4 PLA 70/30-polymeeripitoisuudeksi säädettiin noin 9 m-%. Liuoksen 4 pullotuksessa liuos saastui korkkivian vuoksi, joka aiheutti muun muassa liuoksen värjäytymistä ja normaaliin liuokseen verrattuna nopeampaa viskositeetin alenemista. Liuosta testattiin silti sähkökehruulla nopeasti saastumisen jälkeen, ja siitä saatiin lopulta valmistettua myös pahvikehysnäyte ohuella 18G25-neulalla. Kaikki koesarjassa tutkitut kehruuasetukset löytyvät liitteestä 1 taulukosta 5. Kuitujen muodostuminen oli hidasta, sillä liuoksen ohentamisen vuoksi oli käytettävä erittäin ohutta neulaa. Kuidutusta tehtiin kehikolle noin tunti ja kaikista valmistetuista näytteistä otettiin SEM-näytteet. Pahvikehymisen asetuksilla valmistetun rinnakkaisnäytteessä kuvassa 18 nähdään kuitujen paksuusvaihtelu ja niiden alustalle asettumisen epätasaisuus. Pahvikehysnäytteessä kuidut olivat melko samankaltaisia, mutta niissä esiintyi lisäksi paljon pisaroinnista aiheutuneita kraattereita, kuten nähdään kuvassa 19. Pahvikehymisen valmistuksen aikana liuoksen viskositeetti todennäköisesti aleni liuoksen epäpuhtauksien vuoksi, joka lisäsi pisarointia ja kuitujen paksuseroja. Pahvikehymisen asetuksilla valmistetun rinnakkaisnäytteen kuitujen koko oli keskimäärin 150-220 nm (liite 2 kuva 15).



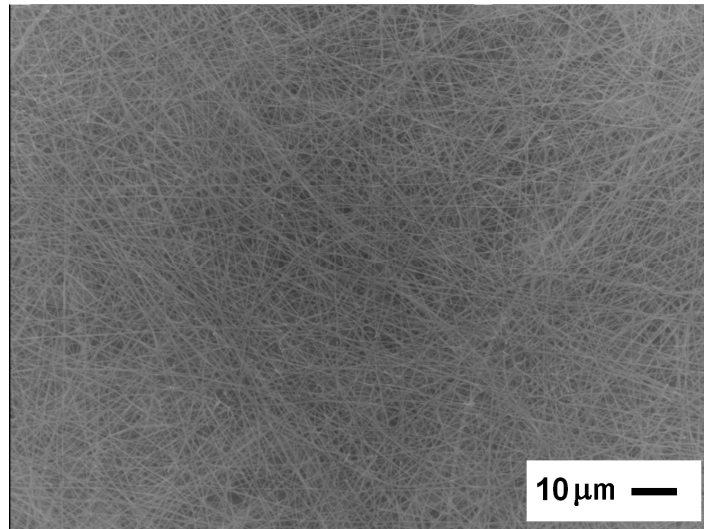
Kuva 18. SEM-kuva PLA 70/30 9 m-% nanokuiduista (liuos 4) asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.



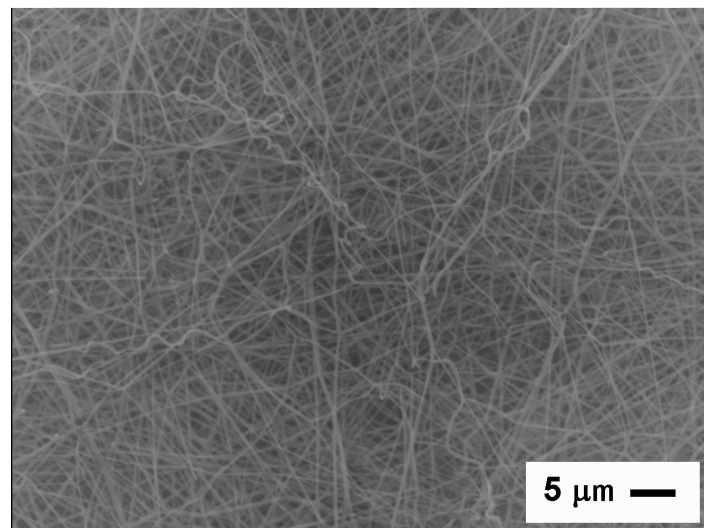
Kuva 19. SEM-kuva PLA 70/30 9 m-% pahvikehysnäytteen (liuos 4) nanokuiduista asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.

7.2 PLGA-polymeerin sähkökehruu

PLGA 80/20-polymeeri liuotettiin onnistuneesti TFA:han noin 12 m-%:n pitoisuudella. Liuoksesta 5 tehtiin muutama kuidutuskoee eri asetuksilla (liite 1 taulukko 6), jonka jälkeen kuitujen laatua tutkittiin SEMillä. Kuidut olivat laadultaan hyviä. Ne olivat täysin helmettämiä, mutta niissä esiintyi tasaisesti katkeamia, kuten nähdään kuvassa 20. Kuiduissa ei esiintynyt juuri paksuuseroja. Näytteissä oli havaittavissa myös epätasaista, hieman kihartunutta ja paksua kuitua, kuten nähdään kuvassa 21. Kuvien 20 ja 21 näytteen kuidut olivat keskimäärin kooltaan 200-400 nm, kuten muutkin koesarjan näytteet, niin kuin voidaan tarkistella liitteen 2 kuvista 16-18.



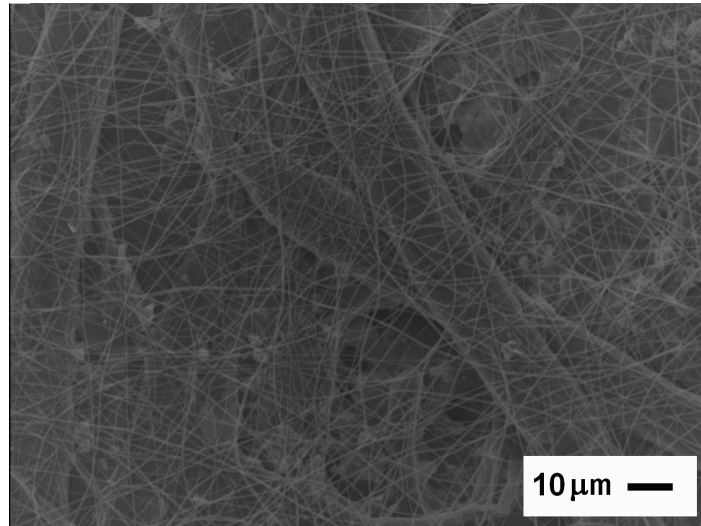
Kuva 20. SEM-kuva PLGA 12 m-% nanokuiduista (liuos 5) asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 20 kV potentiaaliero. 750x.



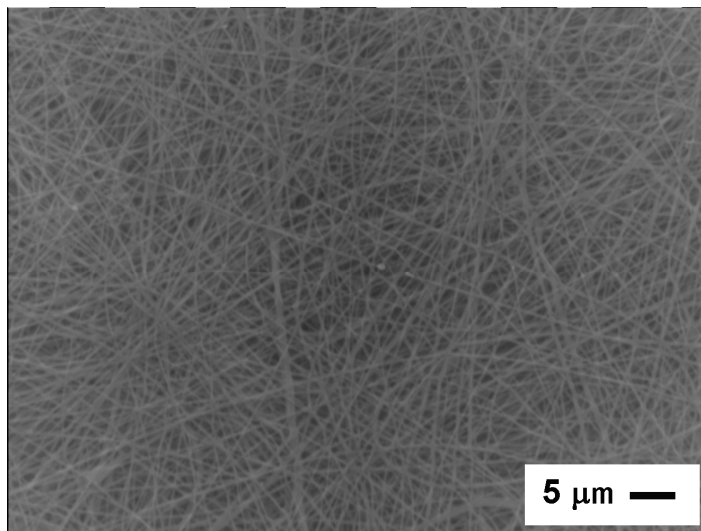
Kuva 21. SEM-kuva PLGA 12 m-% nanokuiduista (liuos 5) eri kohdasta kuvan 20 asetuksilla. 1500x.

PLGA:sta tehtiin myöhemmin uusi liuos noin 13 m-%:n polymeeripitoisuudella, sillä tämäkään polymeeri ei säilynyt liuotettuna tarpeeksi pitkään käyttökelpoisena. Liuoksesta 6 valmistettiin tavallisten kuitunäytteiden lisäksi pahvikehysnäyte, jota kuidutettiin noin puolitoista tuntia, ja kaikista näytteistä otettiin jälleen SEM-näytteet. PLGA:n kuidutus sujui ongelmitta. Kehruututkimusten tarkemmat tiedot ovat liitteessä 1 taulukossa 7. Tasaisesti keräysalustalle ympyrän muotoon kertynyttä tasalaatuista kuitua saatiin kuvan 22 kuitujen asetuksilla, joilla valmistettiin myös pahvikehysnäyte. Pahvikehysnäytteen kuidut eivät juuri eronneet rinnakkaisnäytteestä, kuten nähdään kuvia 22 ja 23 vertaamalla lukuun ottamatta pahvinäytteessä tasaisesti esiintyviä kuitukatkeamia. Pahvikehysnäytteen kuiduista löytyi lisäksi alueita, joilla kuidut olivat kihartuneet, kuten kuvassa 24. Pahvikehysnäytteen kuidut olivat keskimäärin kokoa 200-500 nm (liite 2 kuva 24). 16G30-neulalla, 10 cm etäisyydellä sekä 30 ja 40 kV:n potentiaalieroilla saatiin aikaan

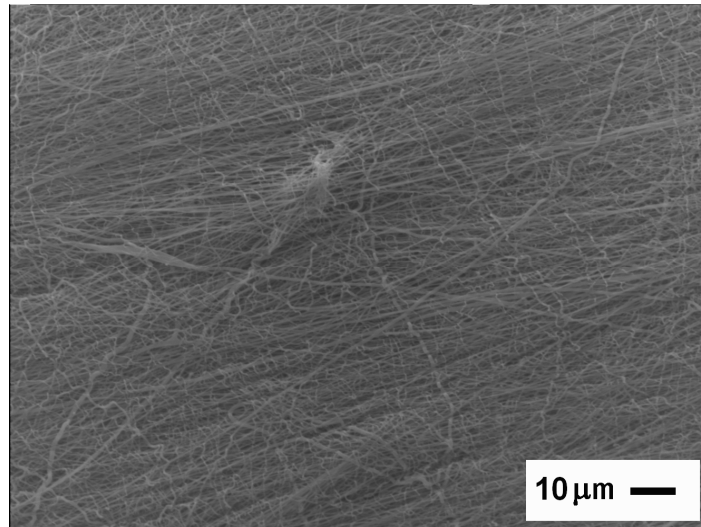
kuitunäytteitä, joiden kuidut olivat pääosin kokoa 150-250 nm (liite 2 kuvat 19 ja 20), mutta näissä näytteissä esiintyi myös muutamia pisaroita, erittäin paksuja kuituja sekä muita epämuodostumia. Lisäksi kuidutusprosessin aikana muodostui silminnähtäviä roiskeita, jonka vuoksi vaihdettiin ohuempaan 18G25-neulaan, jolla etsittiin sopivat parametrit tasalaatuisempia näytteitä varten.



Kuva 22. SEM-kuva PLGA 13 m-% nanokuiduista (liuos 6) asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.



Kuva 23. SEM-kuva PLGA 13 m-% pahvikehysnäytteen (liuos 6) nanokuiduista asetuksilla 18G25 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 1500x.



Kuva 24. SEM-kuva PLGA 13 m-% pahvikehysnäytteen (liuos 6) nanokuiduista asetuksilla 18G25 neula, 15cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.

7.3 Kitosaaninanopartikkelien valmistus

Kitosaaninanopartikkelien valmistus aloitettiin alentamalla kitosaanin moolimassaa vetyperoksidin avulla. Valittu kitosaani oli erittäin hienojakoista jauhetta, joka teki sen käsittelystä hankalaa. Sen moolimassa oletettiin hyvin korkeaksi. Kitosaania liuotettiin noin 4 g (kuivapaino) 200 ml:an 0,1 M suolahappoa (HCl). Liuosta sekoitettiin magneettisekoittimessa vuorokausi homogeenisuuden varmistamiseksi. Seuraavana päivänä liuosta otettiin puolet, johon lisättiin vetyperoksidia 5 %:n konsentraationa. Liuoksen sekoitusta jatkettiin ja seosta lämmitettiin 50 °C-asteeseen. Lämpöä ylläpidettiin 2 h, jonka jälkeen astia viilennettiin jääkylvyssä, jotta reaktio saatiin hidastumaan. Viilentynyt liuos suodatettiin vakuumlaitteistolla paperisen suodattimen läpi. Lopuksi suodatinpaperi neutralisoitiin tislattulla vedellä. Paperia kuivatettiin uunissa 50 °C-asteessa kolme vuorokautta, jonka jälkeen se siirrettiin viilenemään eksikaattoriin ja punnittiin. Kaikki suodattimesta läpimennyt neste siirrettiin dekantterilasiin heti suodatuksen jälkeen ja siihen lisättiin noin 100 ml etanolia. Seos jätettiin saostumaan 24 h ajaksi, jonka jälkeen se jälleen suodatettiin samalla välineistöllä uuden suodatinpaperin läpi. Seoksen pinnalle oli muodostunut kalvon näköinen vaalea kerros, johon ei koskettu ennen suodattamista. Tämä kerros hajosi hieman suodattaessa, mutta jäi osittain tukkiamaan suodatinta. Tällä kertaa suodatinta ei huuhdeltu, vaan se siirrettiin suoraan uuniin kuivumaan kolmeksi vuorokautta. Punnitukset osoittivat, että suodatinpapereiden paino oli kasvanut vain hieman (gramman tuhannesosa-luokkaa), mutta niissä oli havaittavissa myös epäpuhtauksia, kuten huonepölyä ja vanhoista työvälineistä suodatuksessa irronnutta muovia. Suodatinpaperit eivät todennäköisesti kiinnittyneet kostuessaan tarpeeksi hyvin käytettyyn posliiniseen suodattimeen, jossa oli isommat reiät. Kummastakaan suodattimesta ei saanut irrotettua mitään millään välineillä erillistä punnitusta varten. Moolimassan alentamiskokeet päättyivät tähän, sillä tiedot kitosaanista olivat liian puutteellisia, eikä kokeisiin sopivampia välineitä, kuten suodattimia, ollut saatavilla.

Alhaisen moolimassan kitosaania oli tarkoitus käyttää kitosaaninanopartikkelien valmistukseen. Nanopartikkeleja on valmistettu myös korkean moolimassan kitosaanista, mutta sitä ei kokeiltu näissä tutkimuksissa, koska käytettävästä kitosaanista ei ollut saatavilla mitään tietoja ja tarvittavan kylmäkuivauksen järjestäminen oli hankalaa [48]. Lisäksi kokeissa avustavilla tutkijoilla oli kokemusta kitosaaninanopartikkelien valmistamisen ongelmista, kuten nanopartikkelien huuhtoutumisesta huuhteluveden mukana viemäriin niin kuin tapahtui moolimassan alentamiskokeissa. Näiden ongelmien vuoksi kitosaanin tutkiminen lopetettiin tähän. Kitosaaninanopartikkelien valmistus polylaktidien lisäaineistamista varten on kuitenkin erittäin mahdollista, koska esimerkiksi valmiit partikkelit ovat jauhemuodossa, eikä niitä jätetä liuosmuotoon, joka sisältäisi muun muassa polylaktidille sopimatonta vettä. Tällöin tutkimusten selvittäväksi jää muun muassa polylaktidille ja kitosaaninanopartikkeleille sopivan liuottimen löytäminen (kuten TFA), kitosaanin uudelleen liuottamisen vaikutus nanopartikkelien kokoon ja olomuotoon sekä nanopartikkelien asettautuminen valmistetuissa nanokuiduissa. Kirjallisuustutkimusten perusteella kitosaaninanopartikkelien käytölle polylaktidien kanssa ei ole esteitä, joten niiden tutkimista kannattaa jatkaa.

7.4 Hopeananopartikkelien valmistus

Hopeananopartikkelien valmistusta tutkittiin kitosaanimenetelmällä. Kokeet aloitettiin kitosaaniliuoksen valmistuksesta. Liuoksen kitosaanipitoisuudeksi pyrittiin saamaan 0,33 mg/l, jota tavoiteltiin liuottamalla aluksi 0,033 g kitosaania 100 ml 2 m-% etikkahappoa. Laimennussierros otettiin aina keskeltä liuosta ja siirrettiin 2 m-% etikkahappoon, kun liuosta oltiin sekoitettu magneettisekoittimella vähintään puoli tuntia. Näin jatkettiin, kunnes saatiin tavoiteltu pitoisuus. Tämän jälkeen valmistettiin hopeanitraatti (AgNO_3)-jauheesta veteen liuottamalla 25 ml:n 0,1 M liuos. Hopeananopartikkelien valmistuksen lopputuote on liuos, toisin kuin kitosaaninanopartikkeleilla, jotka ovat kylmäkuivauksen jälkeen jauhemuodossa. Kokeiden alkuvaiheessa selvisi, että liuoksen sisältämä vesi ei sovi yhteen tutkittavien hydrolyysillä hajoavien polylaktidipohjaisten polymeerien kanssa, joten laboratoriokokeet keskeytyivät. Kirjallisuustutkimuksissa saatiin selville, että hopeanitraattijauhe voidaan liuottaa myös asetoniin, joka liuottaa myös PLA:n. Veden lisäksi etikkahappo on myös epäsopeva polylaktidille, joten kitosaani pitää liuottaa esimerkiksi TFA:han. Koska kokeisiin käytettävä aika sekä TFA:n määrä olivat hyvin rajallisia, ja TFA:ta olisi kulunut laimennuskokeisiin erittäin paljon, hopeananopartikkelien valmistus päätettiin keskeyttää.

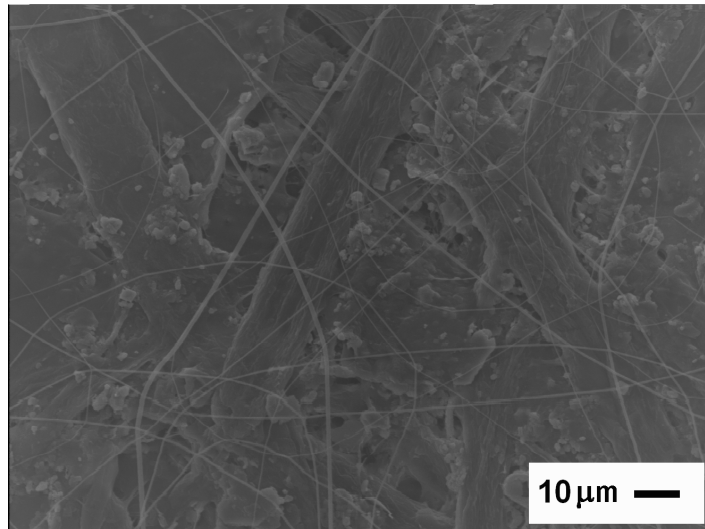
Kirjallisuustutkimusten perusteella hopeananopartikkelien valmistusta kitosaaniavusteisesti käytettäväksi PLA:n ja PLGA:n lisäaineena sähkökehrussa voidaan jatkaa esimerkiksi liuottamalla hopeanitraatti asetoniin, kitosaani TFA:han tai TFA/DCM 70/30-seokseen ja yhdistämällä liuokset. Tämän jälkeen liuosta kuumennetaan höyrystymisen estävässä maljassa mieluiten noin 80 °C-asteeseen riippuen käytettyjen liuottimien asettamista rajoista, ja lämpöä ylläpidetään puolesta tunnista kuuteen tuntiin, kunnes päästään tavoiteltuun partikkelien kokoluokkaan. Kitosaani toimii pelkistäjänä myös

alemmissa lämpötiloissa, jo 30 °C-asteessa, joten alhaisempikin lämpötila riittää. Hopeananopartikkelien mahdollista muodostumista voidaan seurata spektrofotometrillä ja reaktio voidaan todeta myös liuoksen kellertymisestä. Jos asetoni ei sovi samaan liuokseen kitosaanin kanssa, hopeananopartikkelien valmistus kitosaaniavusteisesti polyaktidiliuoksia varten ei todennäköisesti onnistu.

7.5 PLA 70/30-polymerin lisäaineistus rosiinilla

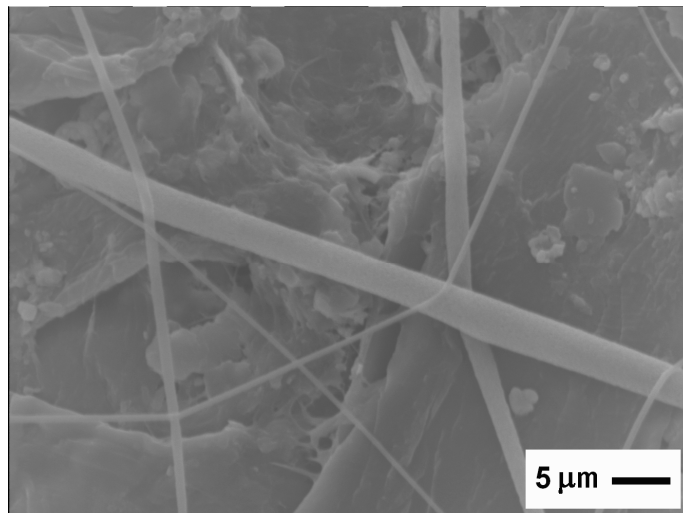
PLA 70/30 liuotettiin dikloorimetaaniin. Liuoksen 7 sekoitusastiaa ei voitu peittää parafilmillä, sillä liuotinhöyryt sulattivat sen, joten apuna käytettiin kellolasia ja foliota. DCM on herkästi haihtuvaa, joten liuoksen siirrossa astioiden väleillä liuoksen viskositeetti kasvoi nopeasti. Tämä vaikeutti kuidutusta tehden siitä lähes mahdotonta käytetyllä laitteistolla. Kaikki tutkitut kehruuasetukset löytyvät liitteestä 1 taulukosta 8. Laitteiston avoimen suuttimen päälle laitettiin foliota tai kellolasi ehkäisemään höyrystymistä. Kun liuostippa saatiin muodostumaan neulan kärkeen, DCM haihtui niin nopeasti, että tippa kuivui ennen kuin jännite saatiin kytkettyä päälle.

Rosiini liuotettiin myös DCM:ään ja liuoksen 8 pitoisuudeksi valittiin noin 4 m-%. Rosiinihelmet liukenivat erittäin hyvin ja nopeasti PLA:han verrattuna, ja rosiini ei kasvattanut liuoksen viskositeettia polymeerien tapaan. Tästä syystä päätettiin kokeilla PLA/rosiini-yhdistelmäliuosta 9 painosuhteella 95/5, jos rosiiniliuos alentaisi hieman PLA/DCM-liuoksen viskositeettia. Yhdistäminen auttoi hetkeksi, mutta DCM:n haihtumisnopeus oli kuitenkin edelleen liian korkea yksinkertaiselle sähkökehruulaitteistolle. Paksulla 14G20-neulalla, 15 cm:n etäisyydellä ja 30 kV:n potentiaalierolla saatiin lopulta muodostettua paperilla päällystetylle keräysalustalle kuitua, joka erottui alustasta riittävästi SEM-näytteen ottoa varten (liite 1 taulukko 8). SEM-tutkimukset osoittivat, että kuituja oli todella muodostunut, vaikka saanti oli äärettömän vähäistä DCM:n haihtumisen vuoksi. Näytteen kuitujen paksuus oli keskimäärin 200-650 nm, kuten näkyy liitteessä 2 kuvassa 25. SEM-kuvassa 25 näkyy liuoksesta 9 valmistetun näytteen yleisvaikutelma. Kuituja saatiin muodostettua vähän, mutta tarpeeksi osoittamaan PLA/rosiini-kuitujen valmistuksen mahdollisuuden. Kuitujen paksuus vaihteli siten, että näytteestä löytyi myös yli 1 µm:n kuituja, mutta kuidut pysyivät pääosin mainitulla alueella. Ne eivät myöskään sulautuneet toisiinsa risteyskohdissa, eikä helmiä tai muita epämuodostumia esiintynyt yhtään prosessointiongelmista huolimatta.



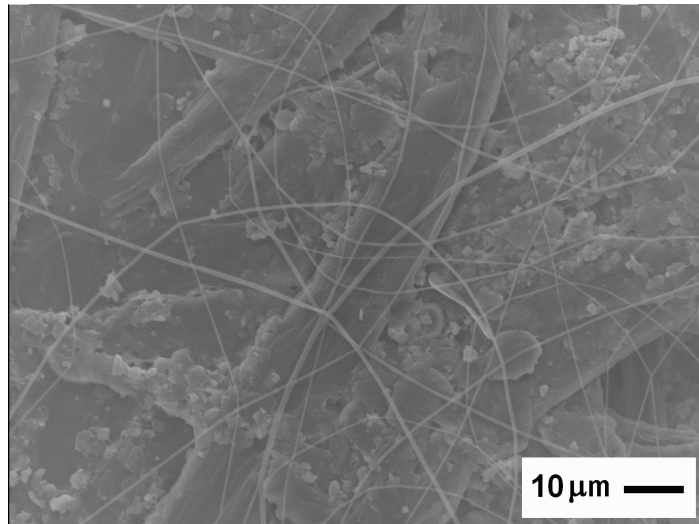
Kuva 25. SEM-kuva PLA 70/30/rosiini 95/5 nanokuiduista (liuos 9) asetuksilla 14G20 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 750x.

Kuitujen pinnat olivat huokoisia. Kuitujen risteyskohtien aiheuttama kulma kuidun kulussa viittaisi jonkin asteiseen kiinnittymiseen, kuten nähdään kuvassa 26.

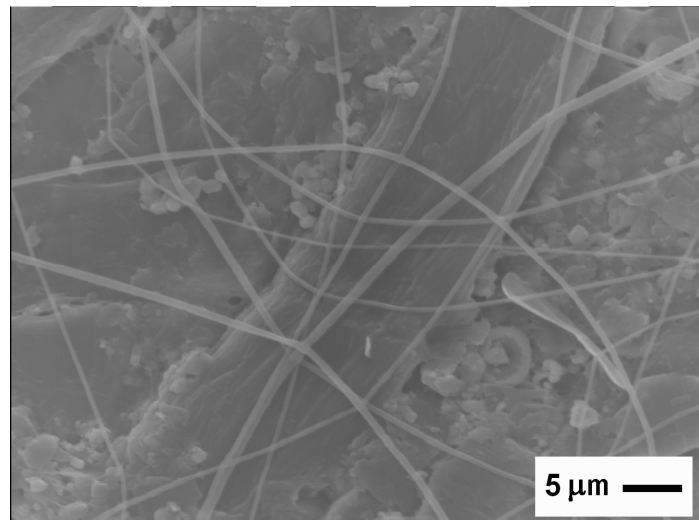


Kuva 26. SEM-kuva PLA 70/30/rosiini 95/5 nanokuiduista (liuos 9) asetuksilla 14G20 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 2000x.

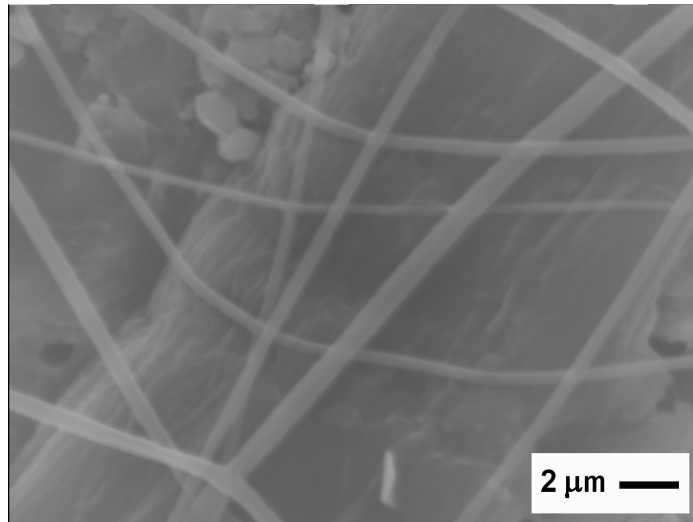
Lisäksi kuvista 27-29 voidaan todeta, että rosiini ei ole jättänyt ainakaan pyyhkäisy-elektronimikroskoopilla nähtävää jälkeä kuituihin. On siis oletettavaa, että rosiini on asettunut kuitujen sisälle pinnan sijaan.



Kuva 27. SEM-kuva PLA 70/30/rosiini 95/5 nanokuiduista (liuos 9) asetuksilla 14G20, 15 cm etäisyys ja 30 kV:n potentiaaliero. 1000x.



Kuva 28. SEM-kuva PLA 70/30/rosiini 95/5 nanokuiduista (liuos 9) asetuksilla 14G20 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 2000x.



Kuva 29. SEM-kuva PLA 70/30/roosiini 95/5 nanokuiduista (liuos 9) asetuksilla 14G20 neula, 15 cm etäisyys ja 30 kV potentiaaliero. 5000x.

Rosiinin tutkimista käytettäväksi esimerkiksi PLA:n ja PLGA:n lisäaineena sähkökehruussa kannattaa jatkaa. Polymeeriliuoksen sähkökehruuta olisi todennäköisesti auttanut TFA/DCM-yhdistelmän käyttö esimerkiksi liuottimien painosuhteella 70/30, olettaen että tällä yhdistelmällä pystyy liuottamaan rosiinin. Rosiini liukenee hyvin myös etanoliin, joka kannattaa valita liuottimeksi, jos valittu polymeeri liukenee siihen myös. Rosiini voidaan liuottaa myös DCM:ään ja polylaktidi TFA:han, ja liuosten yhdistämisen jälkeen DCM:n haihtumisnopeus olisi todennäköisesti kompensoitunut, ja liuoksen sähkökehruu olisi onnistunut. Näillä tavoilla kuituja olisi voitu saada aikaan tehokkaammin ja ne olisivat olleet todennäköisesti myös ohuempia.

7.6 Yhteenvetoa tuloksista

Kokeelliseen osuuteen tarvittavien aineiden määrät arvioitiin suunnitteluvaiheessa väärin, joka rajoitti tutkimuksia. Kokeet olivat laajat ja aikaa oli rajallisesti, joten suurempien ongelmien ilmetessä tutkimuksia oli keskeyttävä. Hankalin ratkaistava ongelma polylaktidien lisäaineistuksessa oli veden korvaaminen. PLA ja PLGA ovat hydrofobisia, eivätkä siedä vettä, sillä ne hajoavat hydrolyysillä, joten veden läsnäolo liuoksissa hyytelöi ja geelii polymeerit. Vesi on osana useissa tutkimuksissa esimerkiksi kitosaanin liuottamisessa sekä kitosaani- ja hopeananopartikkelien valmistuksessa. Kirjallisuustutkimusten ja tehtyjen kokeiden perusteella PLA:n ja PLGA:n jatkotutkimuksissa voidaan esimerkiksi liuottaa kitosaani (normaali ja nanopartikkelit) TFA:han, jota voidaan käyttää myös polymeerien liuotukseen. Lisäksi kitosaanin avulla valmistettavissa hopeananopartikkeleissa kannattaa tutkia asetonin käyttöä veden tilalla, ja polylaktidien rosiini-lisäaineistuksessa kannattaa liuottaa rosiini DCM:ään ja polylaktidi TFA:han, jolloin DCM:n haihtumisnopeuden vaikutus kehuuprosessiin oletettavasti pienentyy. Näillä tavoilla polylaktidien lisäaineistuksen ja sähkökehruun pitäisi onnistua hyvin, joten tutkimuksia kannattaa ehdottomasti jatkaa.

Sähkökehruasetusten vaihtelu ei SEM-kuvien perusteella juuri vaikuttanut kuitujen morfologiaan, sillä samasta liuksesta eri asetuksin valmistettujen näytteiden kuidut muistuttivat paljon toisiaan. Asetusten vaihtaminen vaikutti lähinnä kuitujen asettumiseen keräysalustalle esimerkiksi laajentaen tai tiivistäen kuiduttumisaluetta, muuttaen sen muotoa epätasaiseksi (esimerkiksi ympyrän sijaan rengas), vähentävän tai lisäävän pisarointia, ja lisäävän liuossuihkun epästabiiliuksia.

Sähkökehruoliuosten pitäminen stabiileina on yleisesti ottaen erittäin hankalaa. Käytettävät liuottimet ovat yleensä herkkiä haihtumaan ja polymeerimäärät ovat vähäisiä, joten liuosten konsentraatiot ovat yleensä vain suuntaa antavia. Kaikki lasketut konsentraatiot esimerkiksi TFA:n ja DCM:n tapauksissa pitävät paikkansa, kunnes säilytys- tai sekoitusastia avataan. Tämän jälkeen sähkökehruuprosessissa liuotinta pääsee haihtumaan jatkuvasti, joten konsentraatio muuttuu edelleen. Haihtumismäärät joillain liuottimilla, kuten DCM:llä, ovat suuria, kun otetaan huomioon prosessissa kuluvat ainemäärät tilavuutena. Neulasähkökehruussa käytettävän suuttimen tilavuus esimerkiksi näissä kokeissa oli 1-3 ml, joten liuoksen polymeeripitoisuus saattaa vaihdella jopa muutamia massaprosentteja ennen kuitujen muodostumista. Lisäksi liuosten valmistaminen pienissä muutaman millilitran erissä on mahdotonta, joten aineita menee tutkimuksissa melko paljon jätteeksi. Kokeissa käytettyjen aineiden korkeiden hintojen ja pitkien toimitusaikojen vuoksi niiden käyttöä suunniteltiin tarkasti. Lisäksi kirjallisuustutkimukset olivat aikaa vieviä, joten tehtäviä kokeita jouduttiin rajoittamaan laboratorioissa toimimisesta kirjallisuustutkimusten tasolle.

8 PÄÄTELMÄT

Tässä työssä tutkittiin PLA ja PLGA-polymeerien sähkökehruuta ja lisäaineistusta kitosaaninanopartikkeilla, hopeananopartikkeilla sekä rosiinilla. P(L/DL)LA 70/30 ja PLGA 80/20-polymeerit liukenevat muun muassa trifluorietikkahappoon (TFA) ja dikloorimetaniin (DCM), ja soveltuvat hyvin sähkökehruun menetelmään. Sähkökehruukokeet osoittivat muun muassa, että erittäin amorfinen P(L/D)LA 50/50 tarvitsee todennäköisesti apupolymeerin, jotta siitä saadaan mahdollisesti aikaan tasalaatuista helmentöntä kuitua. P(L/DL)LA 70/30 kuiduttui jo 8 m-%:n pitoisuuksilla, jolla saatiin aikaan melko tasalaatuisia 200-300 nm kuituja. PLGA 80/20 kuiduttui 12 m-%:n pitoisuuksilla, josta valmistetut kuidut olivat kokoluokkaa 200-400 nm. Sähkökehruparametrien, kuten käytettyjen jännitteiden ja neula-keräysalusta-etäisyyden vaihtelut eivät juuri vaikuttaneet kuitujen morfologiaan, vaan lähinnä liuoksen pisarointiin ja kuitujen asettumiseen keräysalustalle.

Kitosaaninanopartikkelien valmistus natrium-tripolyfosfaatin avulla on menetelmänä melko uusi, eikä sillä valmistettuja nanopartikkeleja ole käytetty nanokuiduissa. Kirjallisuustutkimusten perusteella menetelmällä valmistettujen nanopartikkelien käyttö polylaktidien lisäaineena on erittäin potentiaalista, mutta tässä työssä tehdyissä kokeissa se ei onnistunut, sillä muun muassa käytetystä kitosaanista ei ollut saatavilla riittävästi tietoja, kuten moolimassaa. Lisäksi käytetty vakuumisuodatusjärjestelmä ei toiminut, vaan kitosaani pääsi suodattimen ohi huuhteluveden mukana viemäriin, ja käytetyistä suodattimista ei saatu irti kitosaa jatkotutkimuksia varten. Lisäksi kokeisiin varattu aika ja materiaalit olivat rajallisia, ja aihealue laaja, joiden vuoksi laboratoriotutkimuksia jouduttiin rajoittamaan kirjallisuustutkimusten tasolle.

Hopeananopartikkelien valmistus kitosaaniavusteisesti on myös uusi ja vähän tutkittu menetelmä, eikä niitä ole vielä käytetty nanokuiduissa. Menetelmässä käytetään yleensä hopeanitraatin liuotukseen vettä ja kitosaanin liuotukseen laimeata happoa, jossa on myös vettä, ja vesi ei sovellu polylaktidipolymeereille. Kirjallisuustutkimusten perusteella voidaan todennäköisesti korvata vesi asetonilla, liuottaa kitosaani TFA:han tai kylmäkuivata valmistettu hopeananopartikkeliliuos jauhemuotoon. Hopeananopartikkelien valmistuskokeet keskeytyivät, sillä edellä mainitun ongelman selvittämiseen ja ratkaisujen tutkimiseen ei ollut riittävästi aikaa.

Rosiinia on perinteisesti käytetty kansanlääketieteessä ihosairauksien hoitoon, ja sillä on todettu olevan muun muassa antimikrobisia ominaisuuksia. Rosiinia on tutkittu esimerkiksi lääkkeiden annosteluun tarkoitetuissa nanopartikkeleissa, mutta ei kuitenkaan nanokuiduissa. Sähkökehruukokeet osoittivat, että PLA/rosiini-nanokuitujen sähkökehruu on mahdollista. Kokeissa valmistettiin erittäin pieni määrä P(L/DL)LA

70/30/rosiini-kuituja painosuhteella 95/5, ja ne olivat kokoluokkaa 200-650 nm. Liuottimena käytettiin DCM:ää, jonka korkea haihtumisnopeus hankaloitti sähkökehruuprosessia. Tästä syystä kuituja saatiin aikaan vain riittävästi SEM-näytteen ottoa varten, josta pystyttiin toteamaan PLA/rosiini-kuitujen valmistuksen mahdollisuus. Mahdollisissa jatkotutkimuksissa kannattaa liuottaa rosiini etanoliin, jos se soveltuu tutkittavalle polymeerille, tai polylaktidien tapauksessa DCM:ään, ja polylaktidi TFA:han, jolloin DCM:n haihtumisnopeuden pitäisi kompensoitua niin, että sähkökehruu onnistuu.

Työssä tehdyt kirjallisuustutkimukset ja sähkökehruukokeet osoittivat, että polylaktidien lisääaineistus antimikrobisella kitosaanilla, hopealla ja rosiinilla, ja sähkökehruu nanokuiduiksi on mahdollista. Kitosaani, hopea ja rosiini ovat erittäin potentiaalisia lisääaineita käytettäväksi kudosteknologisissa scaffoldeissa ja haavanhoitotuotteissa korvaamaan ja vähentämään perinteisten lääkehoitojen, kuten oraalisen antibiootin, käyttöä. Sähkökehruumenetelmä on erittäin kustannustehokas, ja uudet nanokuitujen valmistustavat, kuten kulhon reunalta tapahtuvaa sähkökehruu (eng. *bowl-edge electrospinning*) ja niin sanottu vapaan nestepinnan sähkökehruumenetelmä ovat tuottavia menetelmiä, joilla nanokuitujen käyttö saadaan yleistymään. Antimikrobisten lisääaineiden etuja ovat muun muassa vaurioituneelle alueelle kohdistunut hoito, sivuoireettomuus ja se, että niille ei voi kehittyä resistenssiä. Nämä yhdistettynä sähkökehruun alhaisiin tuotantokustannuksiin, osoittavat, että antimikrobiset nanokuidut olisivat hyvä ratkaisu erityisesti esimerkiksi tulehdusten kontrollointiin sekä antibioottien liialliseen ja turhaan käyttöön kehitysmaissa, joissa nykyajan vakavimmat resistentit mikrobikannat kehittyvät. Kitosaanin, hopean ja rosiinin on todettu toimivan tehokkaasti esimerkiksi yleisimpiä iholla esiintyviä gramnegatiivisia ja grampositiivisia bakteereja, joitain viruksia, sieniä ja jopa MRSA:ta ja VRE:tä vastaan. Työn aiheista tehdyt jatkotutkimukset ovat aiheellisia, sillä kitosaani alentaa polylaktidien hydrofobisuutta tehden niistä parempia scaffoldimateriaaleja, hopeanitraatin pelkistys niin sanotulla vihreällä metodilla on luontoystävällisempi kuin perinteiset menetelmät, ja rosiinia on jo käytetty biolääketieteen tutkimuksissa onnistuneesti. Mahdollisten jatkotutkimusten selvitettäväksi jää muun muassa optimaalinen liuottimien suhde sähkökehruun kannalta lisääaine/polylaktidi-liuoksessa, lisääaineen asettuminen kuiduissa, optimaalinen polymeeri/lisääaine-suhde antimikrobisuuden kannalta sekä lisääaineen antimikrobinen aktiivisuus nanokuiduissa.

LÄHTEET

- [1] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., Ma Z. An introduction to electrospinning of nanofibers. Singapore 2005, World Scientific. 382 p.
- [2] Kim, E. S., Kim, S. H., Lee, C. H. Electrospinning of polylactide fibers containing silver nanoparticles. *Macromolecular Research* 18(2010)3, pp. 215-221.
- [3] Desai, K., Kit, K., Li, J., Zivanovic, S. Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. *Biomacromolecules* (2008)9, pp. 1000-1006.
- [4] Greiner, A., Wendorff, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition* (2007)46, pp. 5670-5703.
- [5] Yang, Y., Zhu, X., Cui, W., Li, X., Jin, Y. Electrospun composite mats of poly[(D,L-lactide)-co-glycolide] and collagen with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. *Macromolecular Materials and Engineering* (2009)294, pp. 611-619.
- [6] Li, W.-J., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tuan, R. S., Ko, F. K. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 60(2002)4, pp. 613-621.
- [7] Said, S. S., Aloufy, A. K., El-Halfawy, O. M., Boraei, N. A., El-Khordagui, L. K. Antimicrobial PLGA ultrafine fibers: Interaction with wound bacteria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79(2009), pp. 108-118.
- [8] Yang, T., Wu, D., Lu, L., Zhou, W., Zhang, M. Electrospinning of polylactide and its composites with carbon nanotubes. *Polymer Composites* (2011), pp. 1280-1288.
- [9] Wang, L., Shi, J., Liu, L., Secret, E., Chen, Y. Fabrication of polymer fiber scaffolds by centrifugal spinning for cell culture studies. *Microelectronic Engineering* 88(2011), pp. 1718-1721.
- [10] Thoppey, N. M., Gorga, R. E., Bochinski, J. R., Clarke, L. I. Effect of solution parameters on spontaneous jet formation and throughput in edge electrospinning from fluid-filled bowl. *Macromolecules* (2012)45, pp. 6527-6537.

- [11] Inspired by a cotton candy machine, engineers put a new spin on creating tiny nanofibers [WWW]. e! Science News. May 25 2010. [referred Jan 24 2013]. Available:
<http://esciencenews.com/articles/2010/05/25/inspired.a.cotton.candy.machine.engineers.put.a.new.spin.creating.tiny.nanofibers>
- [12] Ellä, V. Effects of processing parameters on P(L/D)LA 96/4 fibers and fibrous products for medical applications. Doctoral dissertation. Tampere 2012. Tampere University of Technology, Faculty of Science and Environmental Engineering, Department of Biomedical Engineering. Publication 1039. 160 p.
- [13] Kuhn, D. R. Asbestos: A Threat to Nanotechnology? [WWW]. November 9 2012. [referred Jan 23 2013]. Available:
<http://www.personal.psu.edu/afr3/blogs/siowfa12/2012/11/asbestos-a-threat-to-nanotechnology.html>
- [14] Nanofibers 'may pose health risk' [WWW]. BBC News Health. August 24 2012. [referred Jan 24 2013]. Available: <http://www.bbc.co.uk/news/health-19355196>
- [15] Carbon Nanotubes That Look Like Asbestos, Behave Like Asbestos [WWW]. The Project on Emerging Nanotechnologies. May 19 2008. [referred Jan 24 2013]. Available: <http://www.nanotechproject.org/news/archive/mwcnt/>
- [16] Zhou, H., Kim, K.-W., Giannelis, E., Joo, Y. L. Nanofibers from Polylactic Acid Nanocomposites: Effect of Nanoclays on Molecular Structures. In: Reneker, D. H., Fong, H. ACS Symposium Series 918, Polymeric Nanofibers. Washington DC 2005, ACS American Chemical Society. pp. 217-230.
- [17] Boland, E. D., Pawlowski, K. J., Barnes, C. P., Simpson, D. G., Wnek, G. E., Bowlin, G. L. Electrospinning of Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering Scaffolds. In: Reneker, D. H., Fong, H. ACS Symposium Series 918, Polymeric Nanofibers. Washington DC 2005, ACS American Chemical Society. pp. 188-204.
- [18] Schreuder-Gibson, H. L., Gibson, P. Applications of Electrospun Nanofibers in Current and Future Materials. In: Reneker, D. H., Fong, H. ACS Symposium Series 918, Polymeric Nanofibers. Washington DC 2005, ACS American Chemical Society. pp. 121-136.

- [19] Heikkilä, P. Nanostructured Fibre Composites, and Materials for Air Filtration. Doctoral dissertation. Tampere 2008. Tampere University of Technology, Faculty of Automation, Mechanical and Materials Engineering, Department of Materials Science. Publication 749. 104 p.
- [20] El-Newehy, M. H., Al-Deyab, S. S., Kenawy, E.-R., Abdel-Megeed, A. Nanospider technology for the production of Nylon-6 nanofibers for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials* (2011), 8 p.
- [21] Samani, F., Kokabi, M., Soleimani, M., Valojerdi, M. R. Fabrication and characterization of electrospun fibrous nanocomposite scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide)/poly(vinyl alcohol) blends. *Polymer International* (2010)59, pp. 901-909.
- [22] Meng, Z. X., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y. F. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Materials Chemistry and Physics* 125(2011), pp. 606-611.
- [23] Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N., Rashkov, I. Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromolecular Biosciences* (2009)9, pp. 102-111.
- [24] Royer, K. Wear Your Corn Crop [WWW]. *Corn & Soybean Digest*. November 1 2006. [referred Oct 18 2011]. Available: <http://cornandsoybeandigest.com/wear-your-corn-crop>
- [25] Ellä, V., Gomes, M. E., Reis, R. L., Törmälä, P., Kellomäki, M. Studies of P(L/D)LA 96/4 non-woven scaffolds and fibres; properties, wettability and cell spreading before and after intrusive treatment methods. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2007)18, pp. 1253-1261.
- [26] Rissanen, M. Wet Spinning of Polylactide Stereo Copolymer Multifilaments. Doctoral dissertation. Tampere 2010. Tampere University of Technology, Faculty of Automation, Mechanical and Materials Engineering, Department of Materials Science. Publication 887. 84 p.
- [27] Kenawy, E.-R., Bowlin, G. L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D. G., Sanders, E. H., Wnek, G. E. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid) and a blend. *Journal of Controlled Release* 81(2002), pp. 57-64.

- [28] Xie, Z., Buschle-Diller, G., DeInnocentes, P., Bird, R. C. Electrospun poly(D,L)-lactide nonwoven mats for biomedical application: Surface area shrinkage and surface entrapment. *Journal of Applied Polymer Science* 122(2011), pp. 1219-1225.
- [29] Cui, W., Zhu, X., Yang, Y., Li, X., Jin, Y. Evaluation of electrospun fibrous scaffolds of poly(DL-lactide) and poly(ethylene glycol) for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 29(2009), pp. 1869-1876.
- [30] Hu, J., Sun, X., Ma, H., Xie, C., Chen, Y. E., Ma, P. X. Porous nanofibrous PLLA scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 31(2010), pp. 7971-7977.
- [31] Xu, J., Zhang, J., Gao, W., Liang, H., Wang, H., Li, J. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. *Materials Letters* 63(2009), pp. 658-660.
- [32] Xu, X., Yang, Q., Wang, Y., Yu, H., Chen, X., Jing, X. Biodegradable electrospun poly(L-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles. *European Polymer Journal* 42(2006), pp. 2081-2087.
- [33] Tamminen, S. Polylaktidi (96L/4D) -verkon kudosityhteensopivuus rotan subkutiksessa. Pro Gradu-tutkielma. Tampere 2008. Tampereen yliopisto, Lääketieteellisen teknologian instituutti. 49 s.
- [34] Shim, I. K., Lee, S. Y., Park, Y. J., Lee, M. C., Lee, S. H., Lee, J. Y., Lee, S. J. Homogeneous chitosan-PLGA composite fibrous scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research* 84 A(2008)1, pp. 247-255.
- [35] Morgan, S. M., Ainsworth, B. J., Kanczler, J. M., Babister, J. C., Chaudhuri, J. B., Oreffo, R. O. C. Formation of a human-derived fat tissue layer in P(D,L)LGA hollow fibre scaffolds for adipocyte tissue engineering. *Biomaterials* 30(2009), pp. 1910-1917.
- [36] PLGA [WWW]. Wikipedia. [referred Nov 29 2012]. Available: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=493480840>
- [37] Xu, X., Yang, Q., Bai, J., Lu, T., Li, Y., Jing, X. Fabrication of biodegradable electrospun poly(L-lactide-co-glycolide) fibers with antimicrobial nanosilver particles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8(2008)10, pp. 5066-5070. *Abstract only.*

- [38] Xing, Z.-C., Chae, W.-P., Huh, M.-W., Park, L.-S., Park, S.-Y., Kwak, G., Yoon, K.-B., Kang, I.-K. In vitro anti-bacterial and cytotoxic properties of silver-containing poly(L-lactide-co-glycolide) nanofibrous scaffolds. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11(2011)1, pp. 61-65. *Abstract only*.
- [39] Bender, W., Stutte, P. Antimicrobials for Synthetic Fibers. In: Edwards, J. V., Vigo, T. L. ACS Symposium Series 792, Bioactive Fibers and Polymers. Washinton DC 2001, ACS American Chemical Society. pp. 218-242.
- [40] Jeuniaux, C., Voss-Foucart, M.-F., Pouliceck, M., Bussers, J.-C. Sources of chitin, estimated from new data on chitin biomass and production. In: Skjåk-Braek, G., Anthonsen T., Sandford, P. Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Norway 1988, Elsevier Science Publishers Ltd. pp. 3-12.
- [41] Hirano, S. Production and application of chitin and chitosan in Japan. In: Skjåk-Braek, G., Anthonsen T., Sandford, P. Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Norway 1988, Elsevier Science Publishers Ltd. pp. 37-44.
- [42] Di, Y., Long, G., Zhang, H., Li, Q. Preparation and properties of viscose rayon/O-carboxymethyl chitosan antibacterial fibers. *Journal of Engineered Fibers And Fabrics* 6(2011)3, pp. 39-43.
- [43] Ohkawa, K., Minato, K.-I., Kumagai, G., Hayashi, S., Yamamoto, H. Chitosan Nanofiber. *Biomacromolecules* (2006)7, pp. 3291-3294.
- [44] Sandford, P. A. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjåk-Braek, G., Anthonsen T., Sandford, P. Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Norway 1988, Elsevier Science Publishers Ltd. pp. 51-70.
- [45] Yang, H.-C., Wang, W.-H., Huang, K.-S., Hon, M.-H. Preparation and application of nanochitosan to finishing the treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydrate Polymers* 79(2010), pp. 176-179.
- [46] Hanafi, M., Khatibzadeh, M., Khosravi, A., Gharanjig, K. Dyeing and antimicrobial properties of nano chitosan treated wool fabric using natural dye. *Proceedings of ATC-11* (2011), pp. 464-467.

- [47] Giri Dev, V. R., Venugopal, J., Sudha, S., Deepika, G., Ramakrishna, S. Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye. *Carbohydrate Polymers* 75(2009), pp. 646-650.
- [48] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339(2004), pp. 2693-2700.
- [49] Hanafi, M., Khatibzadeh, M., Khosravi, A., Gharanjig, K., Fakhari, J., Amiri, S. Finishing wool fabric with nanochitosan as an antibacterial material and using weld for its dyeing. 12th World Textile Conference AUTEX, Zadar, Croatia, June 13-15 2012.
- [50] Huang, K.-S., Wu, W.-J., Chen, J.-B., Lian, H.-S. Application of low-molecular-weight chitosan in durable press finishing. *Carbohydrate Polymers* 73(2008), pp. 254-260.
- [51] Chang, K. L. B., Tai, M.-C., Cheng, F.-H. Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001)49, pp. 4845-4851.
- [52] Kabalnova, N. N., Murinov, K. Y., Mullagaliev, I. R., Krasnogorskaya, N. N., Shereshovets, V. V., Monakov, Y. B., Zaikov, G. E. Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Polymer Science* 81(2001), pp. 875-881.
- [53] Vetyperoksidi 30% stabiloitu. Käyttöturvallisuustiedote, päiväys: 24.1.2011. Tamro Oyj/Kilotavarat. 6 s.
- [54] Hydrogen peroxide [WWW]. Wikipedia. [referred Feb 15 2012]. Available: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=477073962>
- [55] Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo-Filho, A. C., Camargo, E., R. de, Barbosa, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34(2009), pp. 103-110.
- [56] Nourbakhsh, S., Ashjarian, A. Durability of silver nanoparticles on laser treated cotton fabric. 12th World Textile Conference AUTEX, Zadar, Croatia, June 13-15 2012.

- [57] Wang, Y., Li, Y., Yang, S., Zhang, G., An, D., Wang, C., Yang, Q., Chen, X., Jing, X., Wei, Y. A convenient route to polyvinyl pyrrolidone/silver nanocomposite by electrospinning. *Nanotechnology* 17(2006), pp. 3304-3307.
- [58] Jin, M., Zhang, X., Nishimoto, S., Liu, Z., Tryk, D. A., Murakami, T., Fujishima, A. Large-scale fabrication of Ag nanoparticles in PVP nanofibres and net-like silver nanofibre films. *Nanotechnology* 18(2007), pp. 1-7.
- [59] Zhang, Q., Wu, D., Qi, S., Wu, Z., Yang, X., Jin, R. Preparation of ultra-fine polyimide fibers containing silver nanoparticles via in situ technique. *Materials Letters* 61(2007), pp. 4027-4030.
- [60] Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S. L. Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of American Chemical Society* (2003)125, pp. 13940-13941.
- [61] Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145(2009), pp. 83-96.
- [62] Tran, H. V., Tran, L. D., Ba, C. T., Vu, H. D., Nguyen, T. N., Phan, D. G., Nguyen, P. X. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 360(2010), pp. 32-40.
- [63] Gao, S.-F., Su, X.-D., Li, Y., Yuan, H.-Y. Study on preparation ball silver nanoparticles using nature rosin. *Chemical Research and Application* (2008)7. *Abstract only*.
- [64] Kang, Y. O., Park, W. H. Synthesis of chitosan oligomer-stabilized silver nanoparticles by green method. *Proceedings of ATC-11* (2011).
- [65] Fulzele, S. V., Satturwar, P. M., Dorle, A. K. Study of the biodegradation and in vivo biocompatibility of novel biomaterials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20(2003), pp. 53-61.
- [66] Mandaogade, P. M., Satturwar, P. M., Fulzele, S. V., Gogte, B. B., Dorle, A. K. Rosin derivatives: novel film forming materials for controlled drug delivery. *Reactive & Functional Polymers* 50(2002), pp. 233-242.
- [67] Rosin [WWW]. Wikipedia. [referred Oct 25 2011]. Available: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Rosin&oldid=457339404>

- [68] Lohi, J., Sipponen, A., Jokinen, J., Vanha, K. Kuusen pihkasta valmistetun voiteen käyttö haavojen hoidossa – kansanperinteestä lääketieteeseen. *Haava* (2006)3, s. 10-13.
- [69] Sipponen, A., Rautio, M., Jokinen, J. J., Laakso, T., Saranpää, P., Lohi, J. Resin-Salve from Norway Spruce - A Potential Method to Treat Infected Chronic Skin Ulcers? *Drug Metabolism Letters* (2007)1, pp. 143-145.
- [70] Rautio, M., Laitinen, K., Sipponen, A., Jokinen, J. J., Lohi, J., Koukila-Kähkölä, P., Sipponen, P. Kuusen pihkasalavalla on antimykoottinen vaikutus kynsisilsan aiheuttajasieniä vastaan. European Wound Management Association EWMA, Helsinki 20.-22.5.2009. Mikrobiologian yksikkö, HUSLAB, Mikrobiologian laboratorio; Kansanterveystieteen laitos, Helsingin yliopisto; Repolar Oy. 1 s. *Posteri*.
- [71] The British Association of Dermatologists. Resin from spruce tree can help skin disease [WWW]. [referred Feb 27 2012]. Available: <http://www.bad.org.uk/site/1289/default.aspx#resin>
- [72] Lohi, J., Jokinen, J. J., Sipponen, A., Mäki-Paakkanen, J., Peltola, R., Rautio, M., Laakso, T., Saranpää, P., Papp, A., Sipponen, P. Kuusenpihkavoiteen vaikutukset haavan paranemisessa. *Duodecim* (2008)124, pp. 1364-1369.
- [73] Lee, C.-M., Lim, S., Kim, G.-Y., Kim, D.-W., Haeng, J., Lee, R., Lee, K.-Y. Rosin nanoparticles as a drug delivery carrier for the controlled release of hydrocortisone. *Biotechnology Letters* (2005)27, pp. 1487-1490.
- [74] Fulzele, S. V., Satturwar, P. M., Dorle, A. K. Polymerized rosin: novel film forming polymer for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 249(2002), pp. 175-184.
- [75] Lee, C.-M., Lim, S., Kim, G.-Y., Kim, D., Kim, D.-W., Lee, H.-C., Lee, K.-Y. Rosin microparticles as drug carriers: Influence of various solvents on the formation of particles and sustained-release of indomethacin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9(2004)6, pp. 476-481.
- [76] Hansen, G. P. Understanding Dressing Composition: A Biomaterial Point of View. In: Edwards, J. V., Vigo, T. L. ACS Symposium Series 792, Bioactive Fibers and Polymers. Washinton DC 2001, ACS American Chemical Society. pp. 50-63.

- [77] WO 2011/056154 A1. Substrate of polymeric material and method of carrying out thereof. Gualandi, C., Focarete, M. L., Zucchelli, A., Iabichella, M. L. PCT/SM2009/000009. 3.11.2009 (12.5.2011). 12 p.
- [78] London Brown, A., Tonelli, A. E., Hudson, S. M., Gupta, B. S. A Hybrid Bioabsorbable Wound Dressing. ACS Symposium Series 792, Bioactive Fibers and Polymers. Washinton DC 2001, ACS American Chemical Society. pp. 90-114.
- [79] Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. Internal Journal of Food Microbiology 95(2004), pp. 147-155.

LIITE 1: SÄHKÖKEHRUUKOKEET

Taulukko 1. Koesarja 1, 14.6.2012, 10 m-% PLA 50/50-liuos.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120614-01	#1	18G25	100	10	-10	2,00
120614-02	#1	18G25	100	15	-15	3,00
120614-03	#1	18G25	100	20	-20	4,00
120614-04	#1	18G25	100	10	-10	2,00
120614-05	#1	18G25	150	15	-15	2,00
120614-06	#1	18G25	150	20	-20	2,67

Taulukko 2. Koesarja 2, 20.6.2012, 13 m-% PLA 50/50-liuos.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120620-01	#2	18G25	100	10	-10	2,00
120620-02	#2	18G25	100	15	-15	3,00
120620-03	#2	18G25	150	15	-15	2,00
120620-04	#2	18G25	150	20	-20	2,67

Taulukko 3. Koesarja 3, 24.8.2012, 8 m-% PLA 70/30-liuos.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120824-01	#3	16G25	100	10	-10	2,00
120824-02	#3	16G25	100	15	-15	3,00
120824-03	#3	16G25	150	10	-10	1,33
120824-04	#3	16G25	150	15	-15	2,00
120824-05	#3	16G30	100	10	-10	2,00
120824-06	#3	16G30	100	15	-15	3,00
120824-07	#3	16G30	150	10	-10	1,33

Taulukko 4. Koesarja 4, 5.9.2012, 8 m-% PLA 70/30-liuos.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120905-01	#3	16G30	100	10	-10	2,00
120905-02	#3	18G25	100	10	-10	2,00
120905-03	#3	18G25	100	15	-15	3,00
120905-04	#3	18G25	100	15	-15	3,00
KN1	#3	18G25	100	15	-15	3,00

Taulukko 5. Koesarja 5, 11.9.2012, 9 m-% PLA 70/30-liuos.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120911-01	#4	18G25	100	10	-10	2,00
120911-02	#4	18G25	100	15	-15	3,00
120911-03	#4	18G25	150	15	-15	2,00
120911-04	#4	18G25	150	20	-20	2,67
120911-05	#4	18G25	100	15	-15	3,00
120911-06	#4	16G30	100	10	-10	2,00
120911-07	#4	16G30	100	15	-15	3,00
120911-08	#4	18G25	150	15	-15	2,00
KN3	#4	18G25	150	15	-15	2,00

Taulukko 6. Koesarja 6, 3.7.2012, 12 m-% PLGA 80/20-liuos.

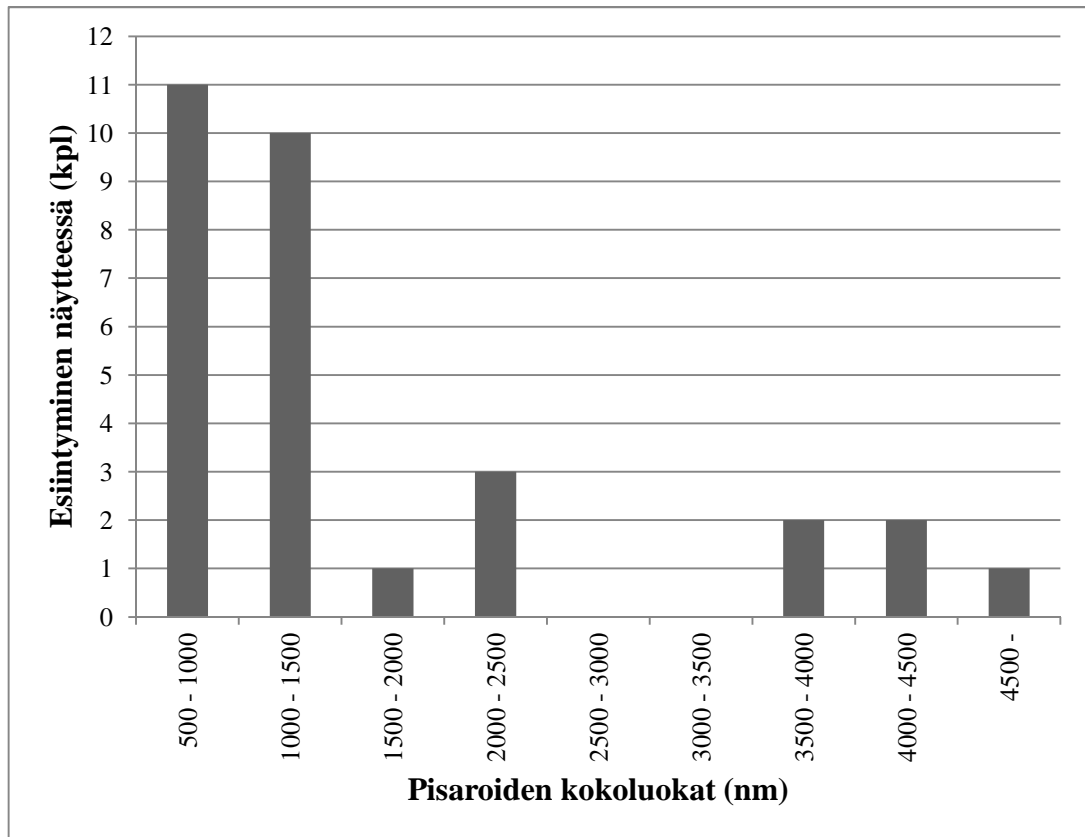
Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120703-01	#5	16G25	100	10	-10	2,00
120703-02	#5	16G25	100	15	-15	3,00
120703-03	#5	18G25	100	10	-10	2,00
120703-04	#5	18G25	100	15	-15	3,00
120703-05	#5	18G25	150	10	-10	1,33
120703-06	#5	18G25	150	15	-15	2,00
120703-07	#5	18G25	150	20	-20	2,67
120703-08	#5	18G25	150	20	-20	2,67

Taulukko 7. Koesarja 7, 14.9.2012, 13 m-% PLGA 80/20-liuos.

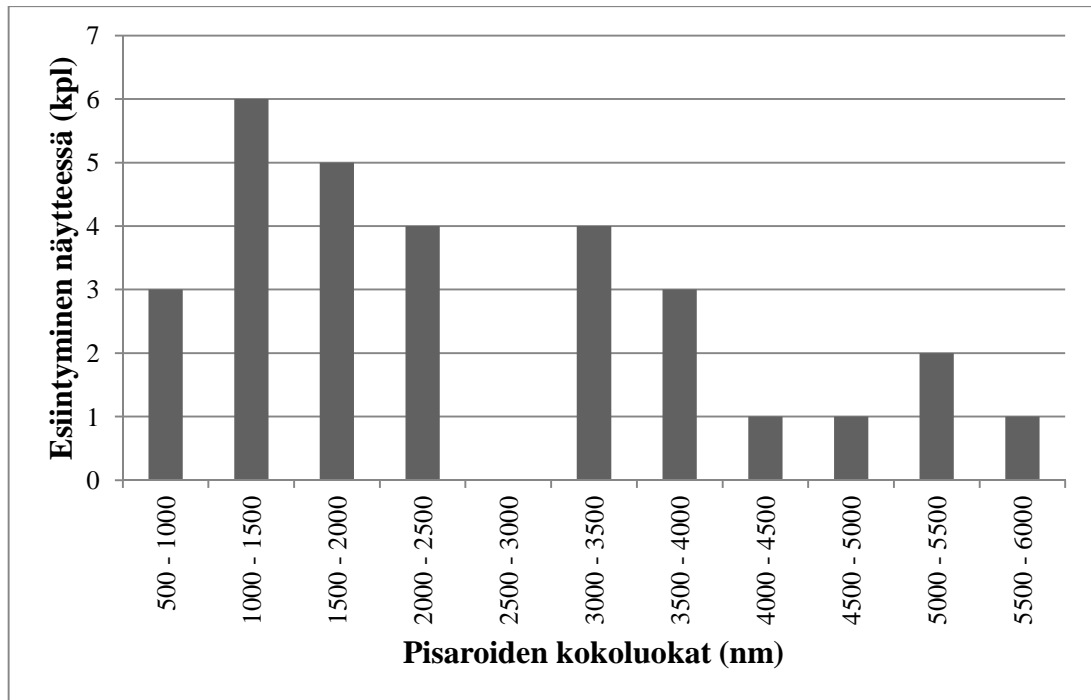
Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120914-01	#6	16G25	100	10	-10	2,00
120914-02	#6	16G30	100	15	-15	3,00
120914-03	#6	16G30	100	20	-20	4,00
120914-04	#6	16G30	150	15	-15	2,00
120914-05	#6	18G25	150	15	-15	2,00
120914-06	#6	18G25	150	20	-20	2,67
KN2	#6	18G25	150	15	-15	2,00

Taulukko 8. Koesarja 8, 27.9.2012, 9 m-% PLA 70/30- ja 95/5 PLA 70/30/rosiini-liuokset.

Näyte	Liuos	Neula	Etäisyys mm	U neula kV	U levy kV	kV/cm
120927-01	#7	16G25	150	15	-15	2,00
120927-02	#7	14G10	150	15	-15	2,00
120927-03	#7	14G30	150	15	-15	2,00
120927-04	#7	14G30	150	20	-20	2,67
120927-05	#7	16G45	100	15	-15	3,00
120927-06	#9	14G20	150	15	-15	2,00
120927-07	#9	16G30	100	10	-10	2,00
120927-08	#9	16G30	100	15	-15	3,00
120927-09	#9	16G10	150	10	-10	1,33

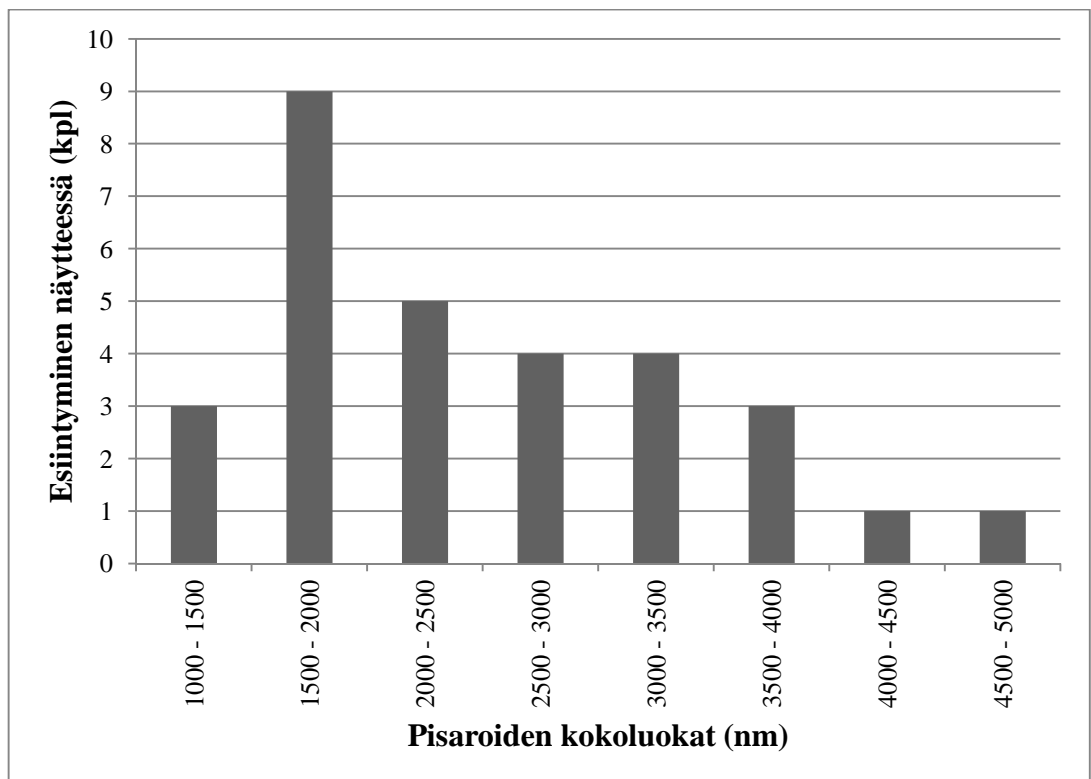
LIITE 2: KUITUJEN HALKAISIJAMITTAUKSET**Koesarja 1**

Kuva 1. PLA 50/50 120614-01-näytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 1500x-suurennos. Pienin mitattu 540 nm ja suurin 5,85 μm .



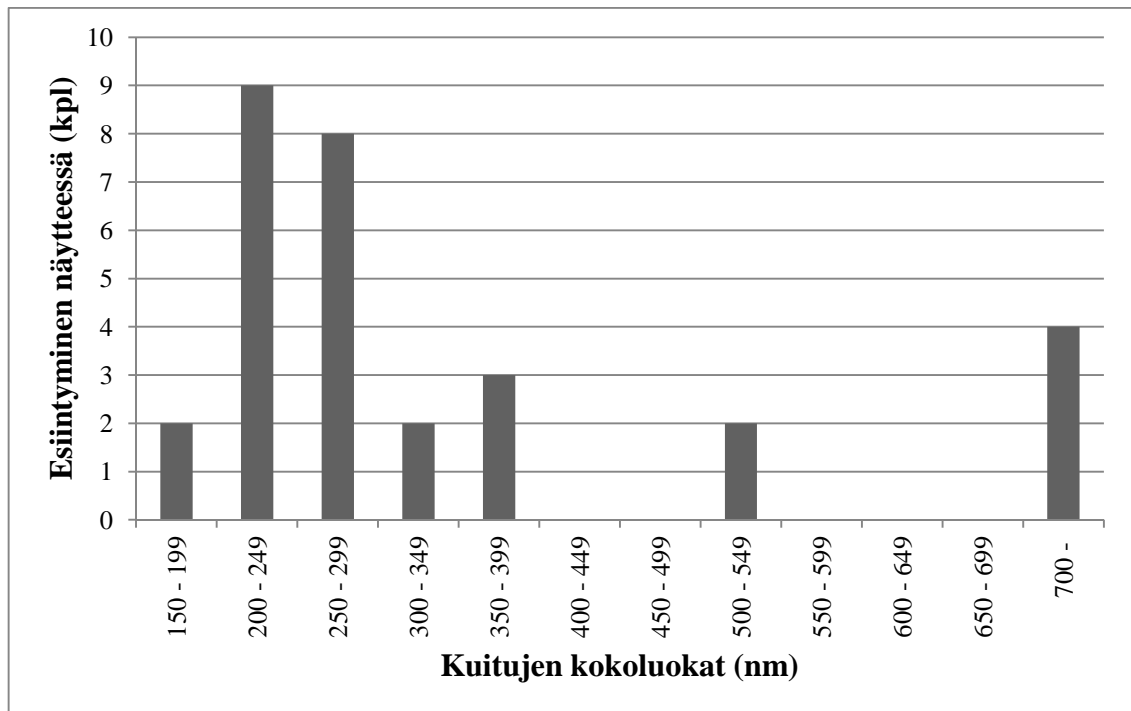
Kuva 2. PLA 50/50 120614-06-näytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 1500x-suurennos. Pienin mitattu 720 nm ja suurin 5,74 μm .

Koesarja 2

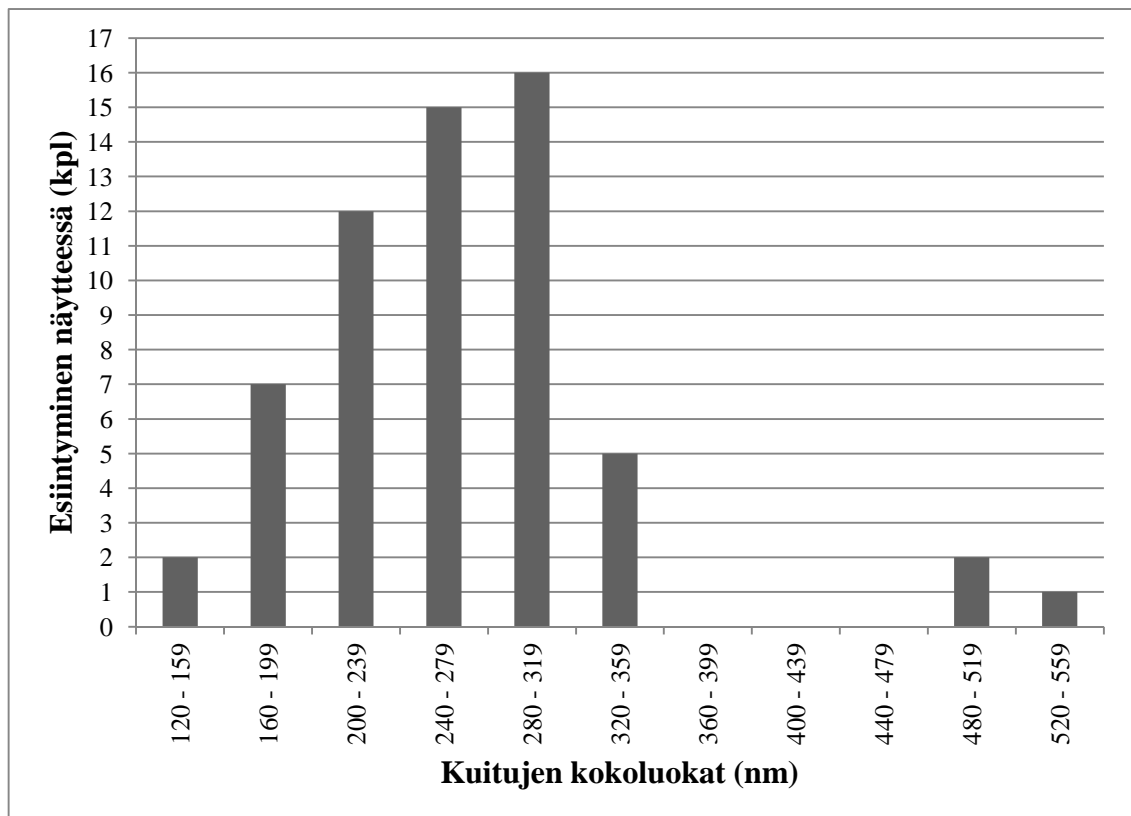


Kuva 3. PLA 50/50 120620-01-näytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 1500x-suurennos. Pienin mitattu 1,02 μm ja suurin 4,67 μm .

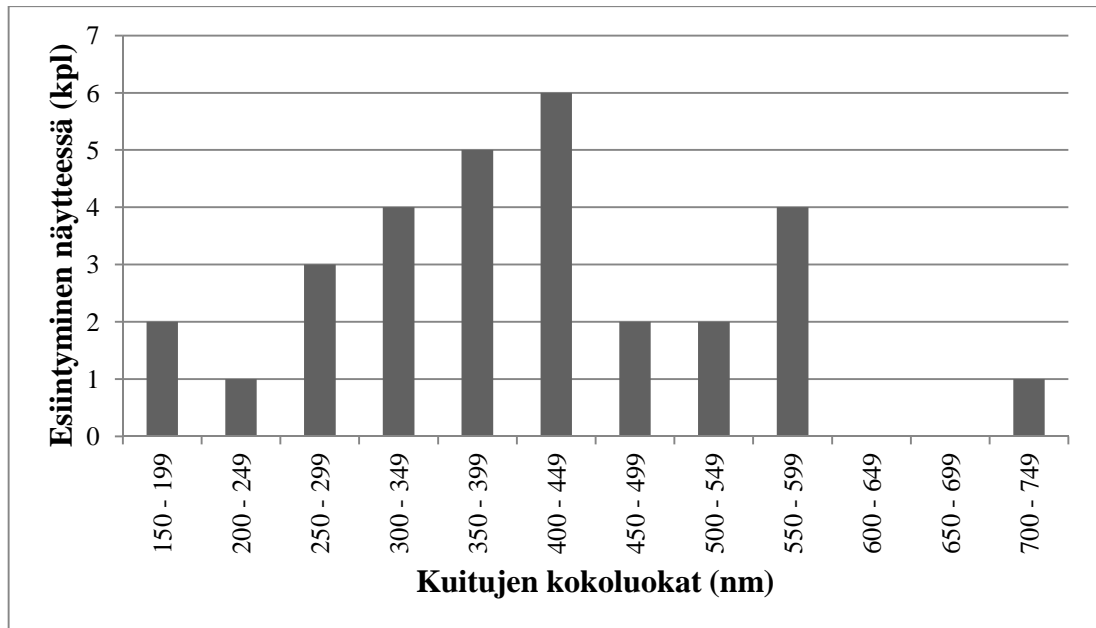
Koesarja 3



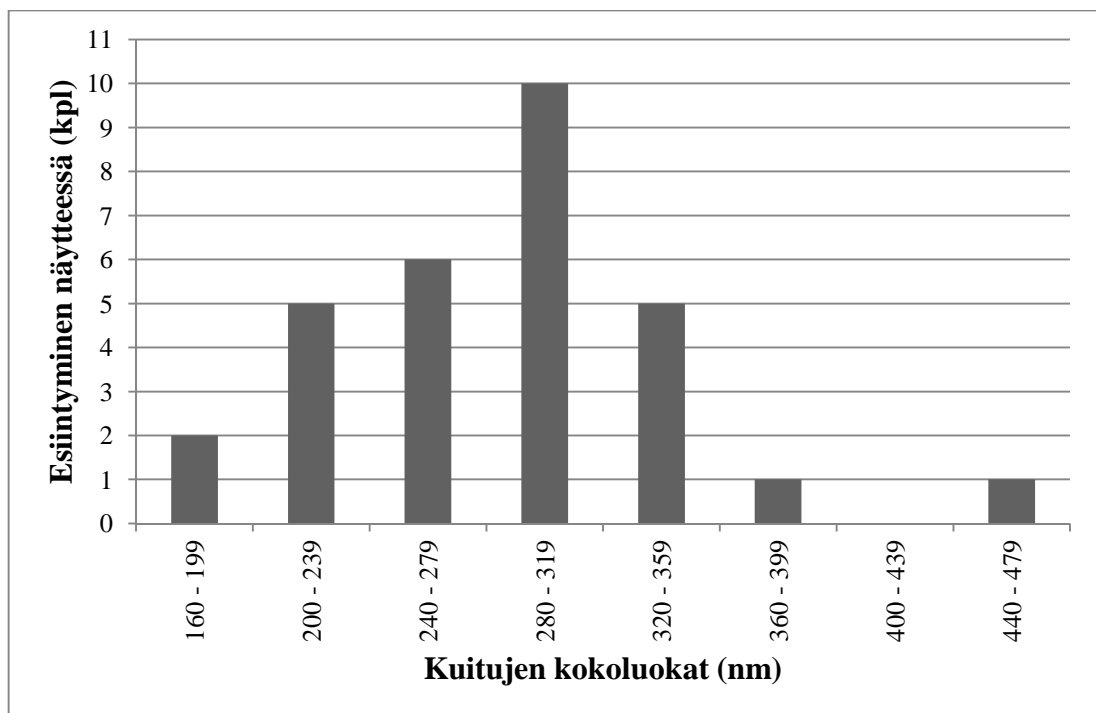
Kuva 4. PLA 70/30 120824-02-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 160 nm ja suurin 1,3 μm .



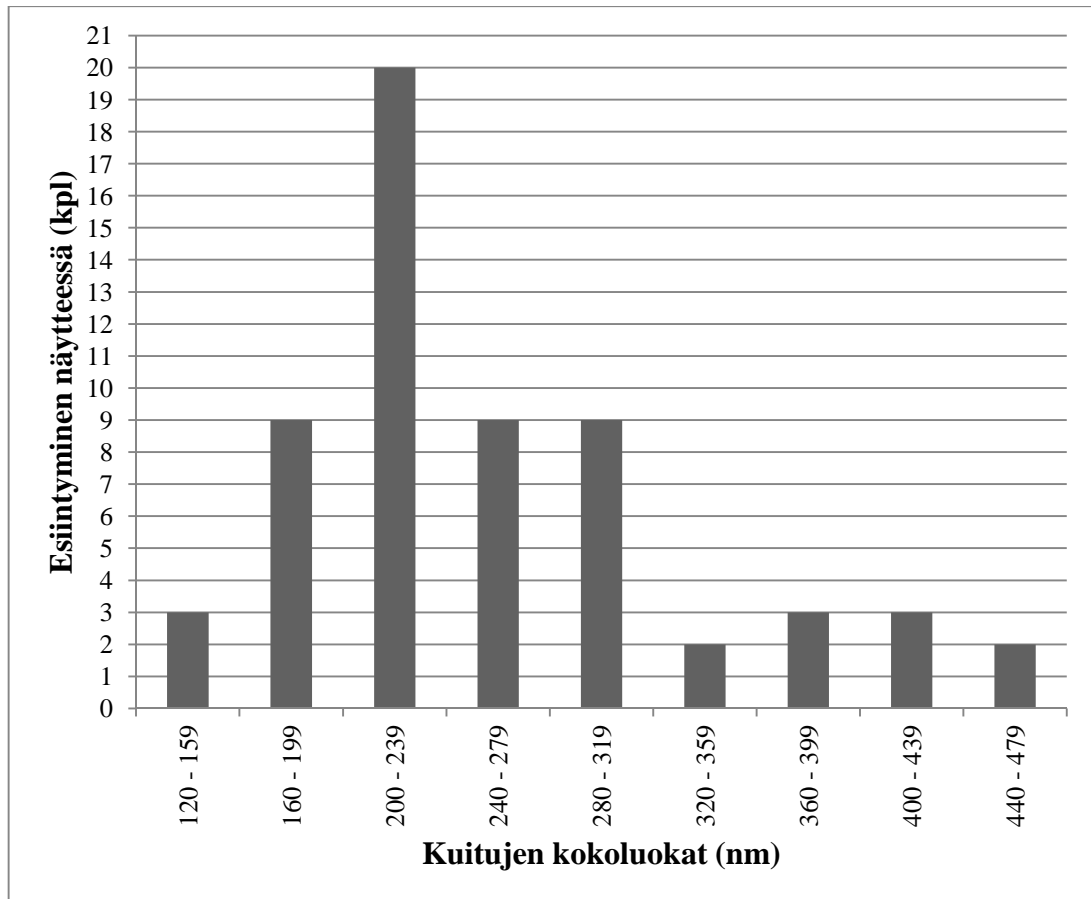
Kuva 5. PLA 70/30 120824-03-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 60 kpl. 3500x ja 5000x-suurennot. Pienin mitattu 140 nm ja suurin 530 nm.



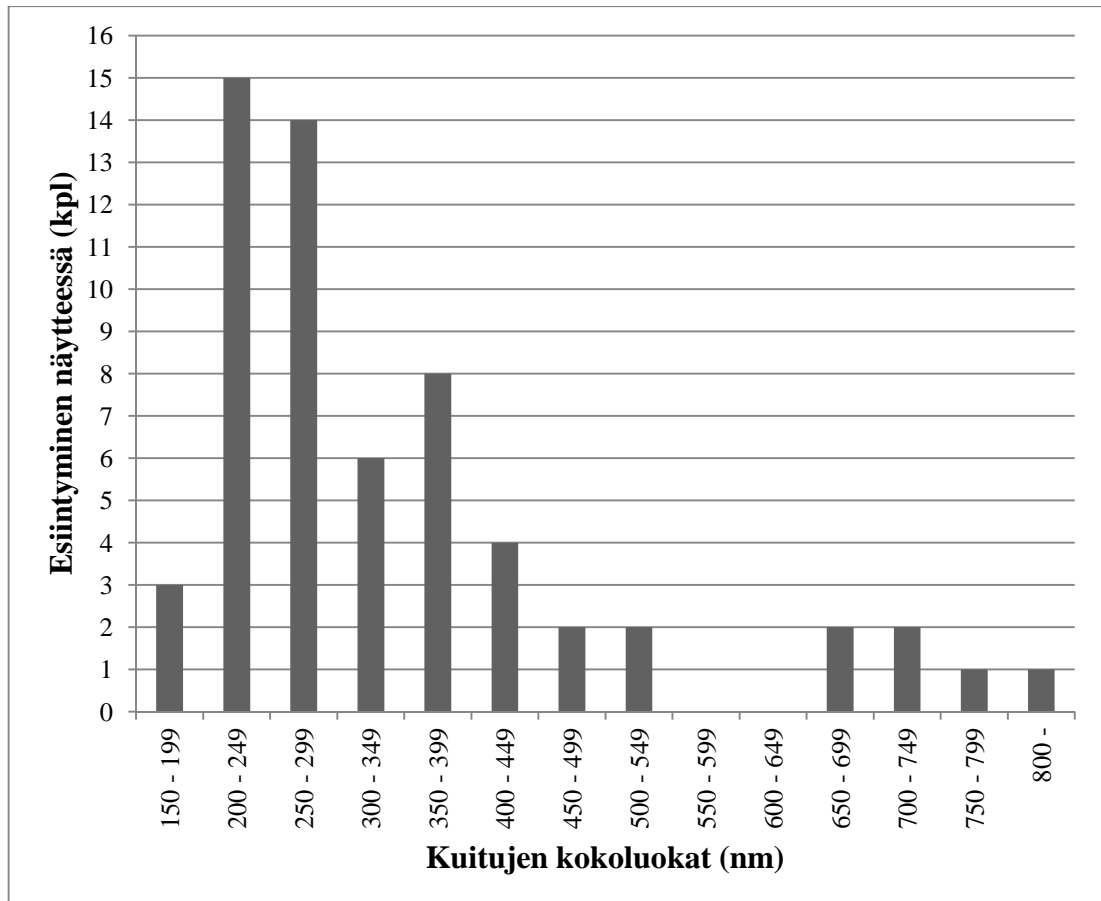
Kuva 6. PLA 70/30 120824-04-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 1500x-suurennos. Pienin mitattu 190 nm ja suurin 710 nm.



Kuva 7. PLA 70/30 120824-05-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 190 nm ja suurin 710 nm.

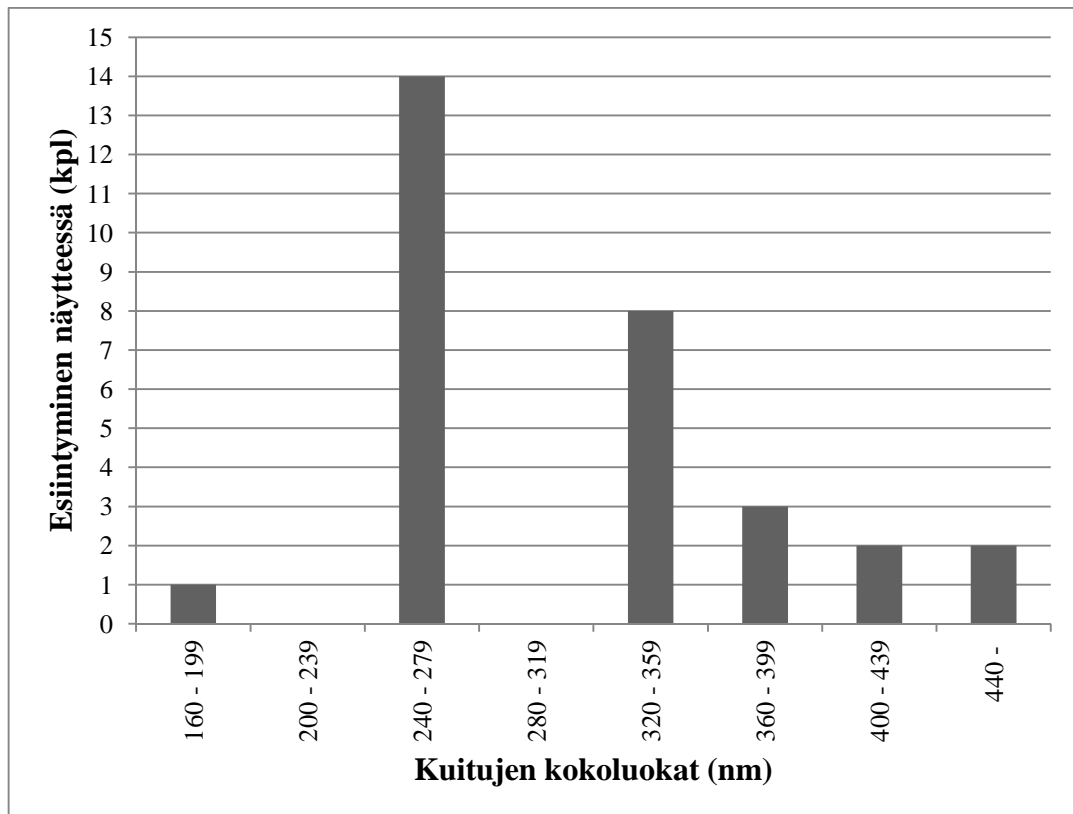


Kuva 8. PLA 70/30 120824-06-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 60 kpl. 3500x-suurennot. Pienin mitattu 130 nm ja suurin 460 nm.

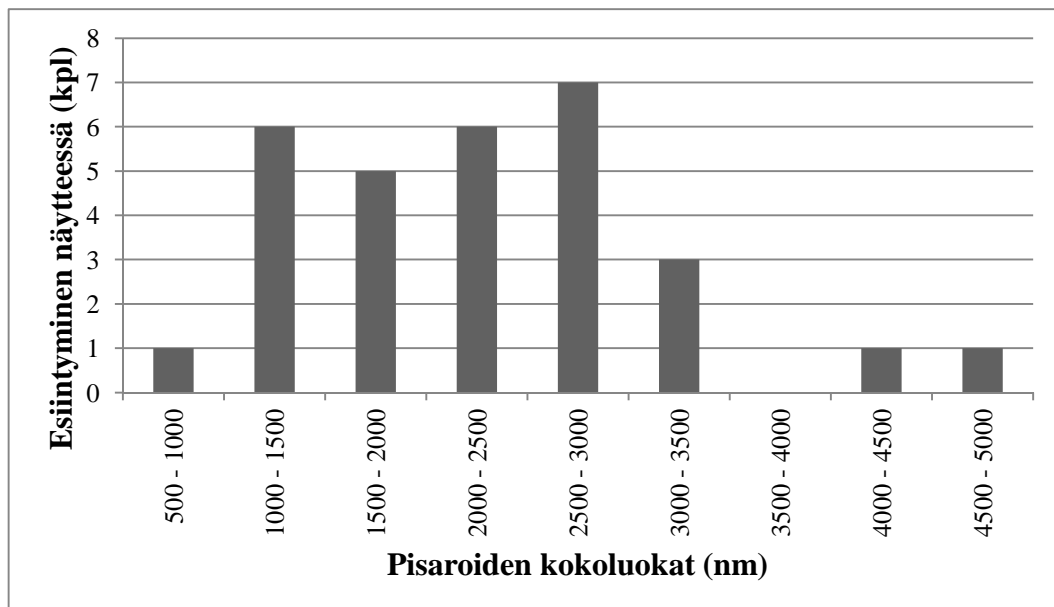


Kuva 9. PLA 70/30 120824-07-näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 60 kpl. 1500x ja 3500x-suurennot. Pienin mitattu 150 nm ja suurin 1,52 μm .

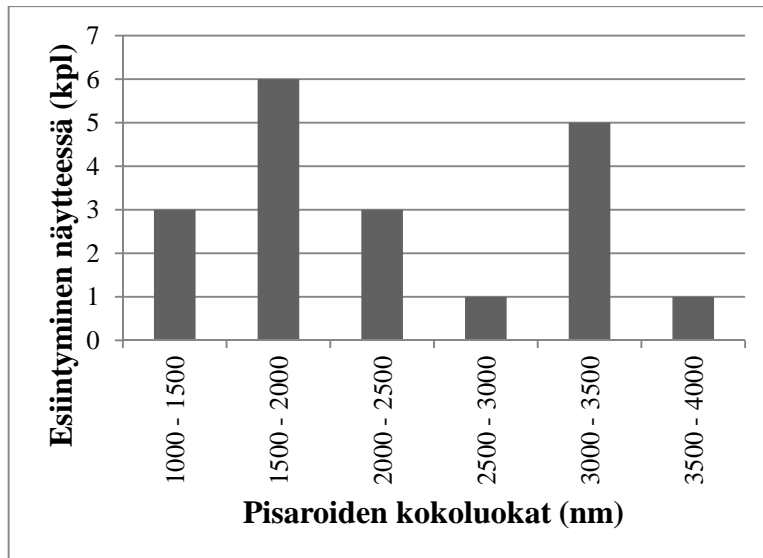
Koesarja 4



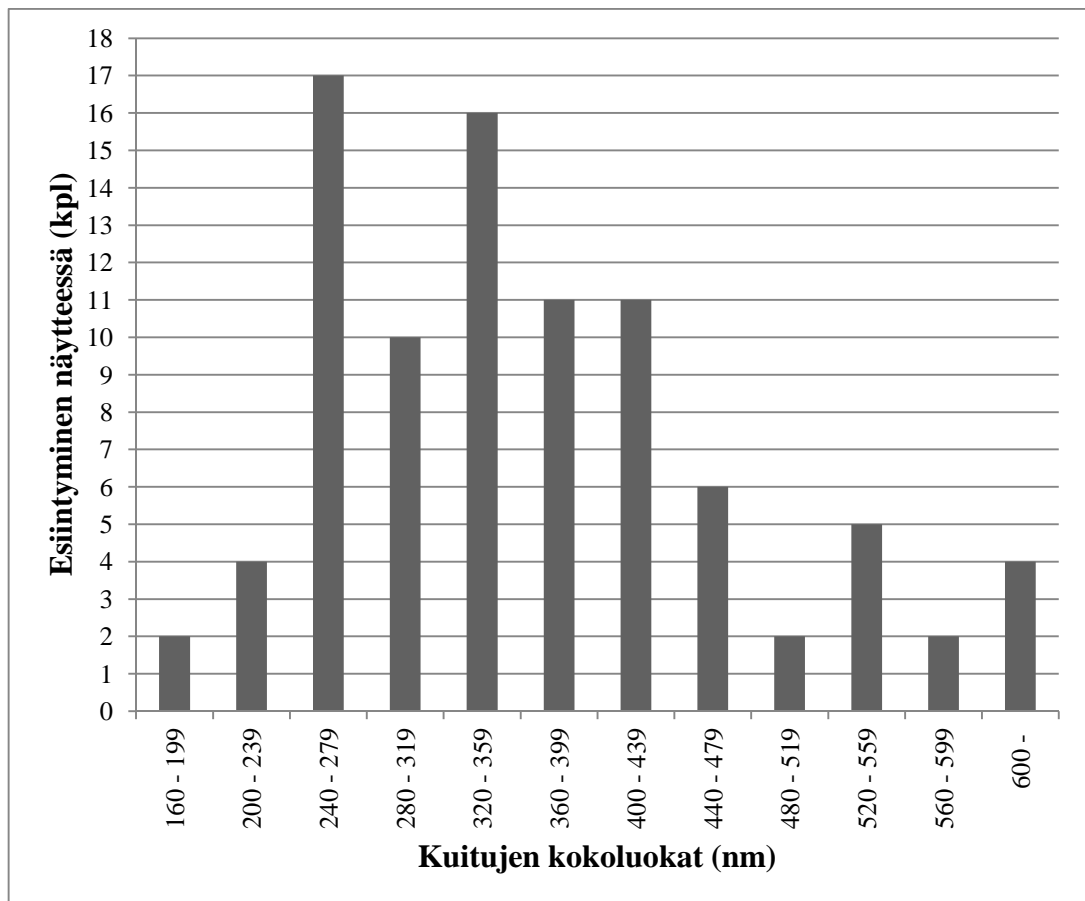
Kuva 10. PLA 70/30 120905-02 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 750x-suurennos. Pienin mitattu 170 nm ja suurin 850 nm.



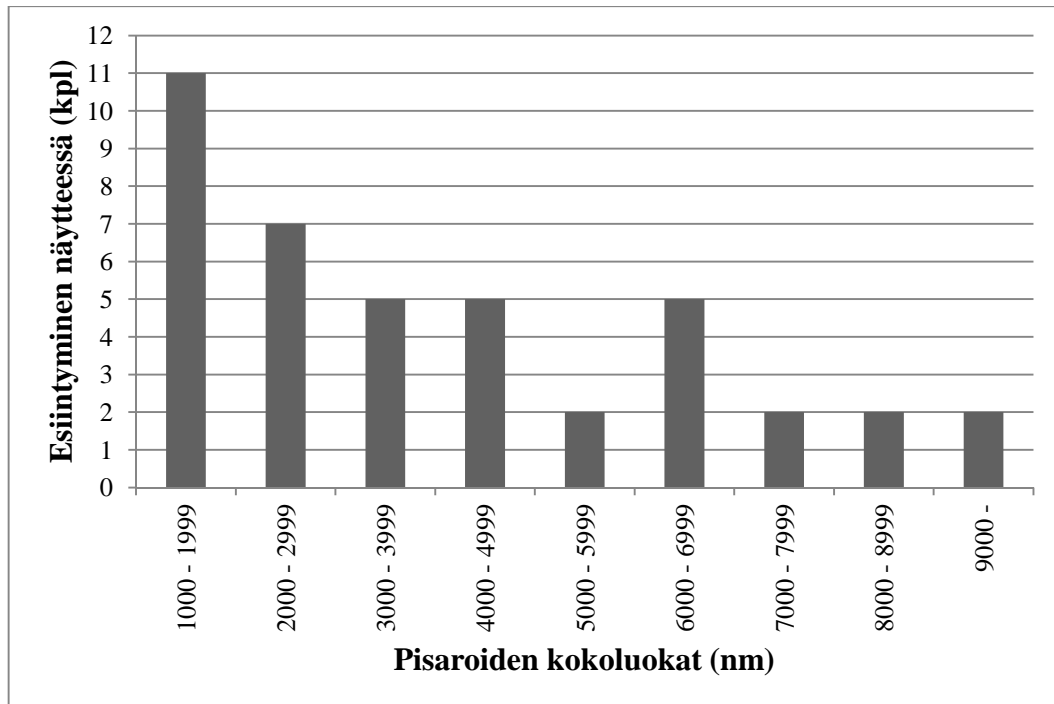
Kuva 11. PLA 70/30 120905-02 näytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 750x-suurennos. Pienin mitattu 0,97 μm ja suurin 4,99 μm .



Kuva 12. PLA 70/30 120905-04-näytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 19 kpl. 1500x-suurennos. Pienin mitattu 1,01 μm ja suurin 3,81 μm .

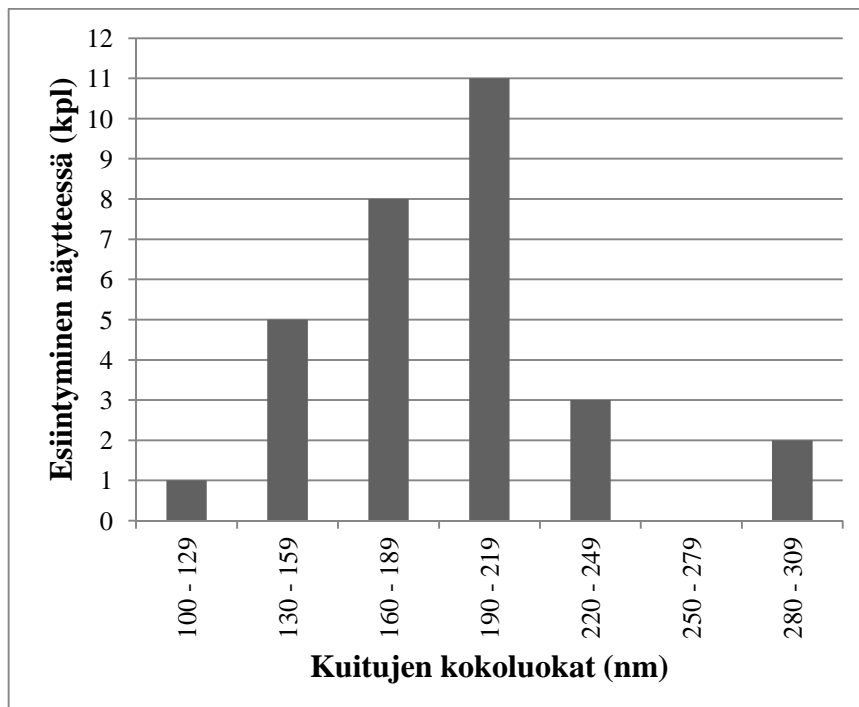


Kuva 13. PLA 70/30 KN1-pahvikehysnäytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 90 kpl. 750x ja 1500x-suurennot. Pienin mitattu 170 nm ja suurin 840 nm.



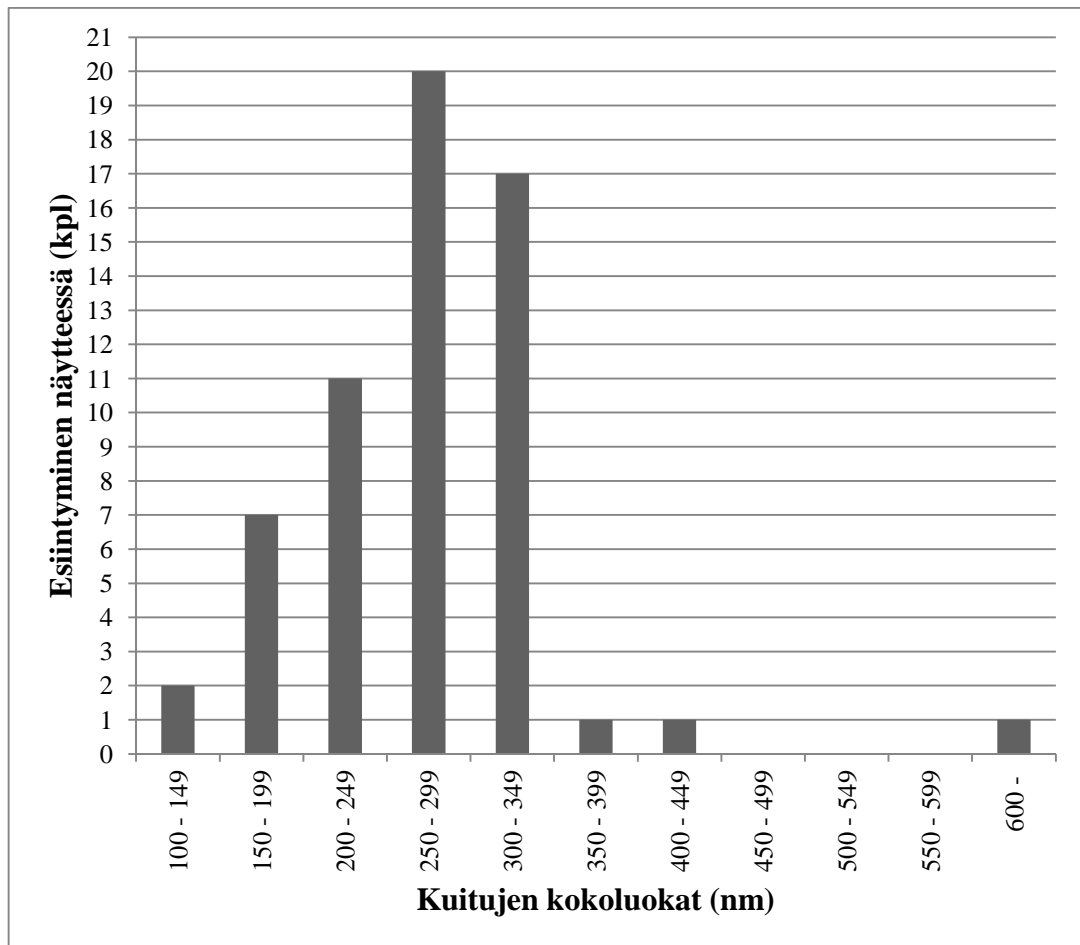
Kuva 14. PLA 70/30 KN1-pahvikehysnäytteen pisarat, satunnaisia mittauksia 41 kpl. 750x ja 1500x-suurennot. Pienin mitattu 1,25 μm ja suurin 10,28 μm .

Koesarja 5

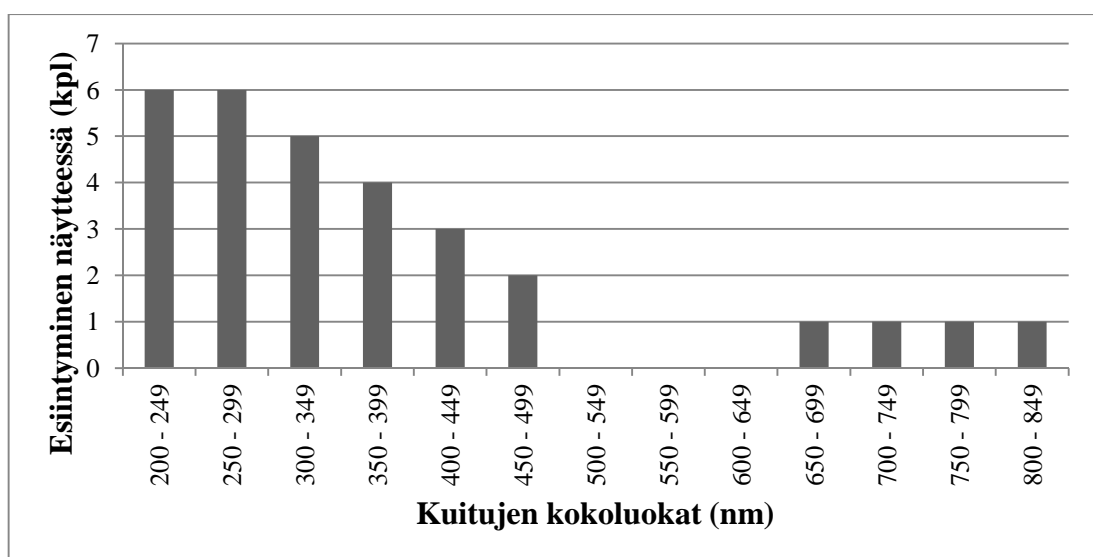


Kuva 15. PLA 70/30 120911-08 näytteen kuidut (KN3-pahvikehysnäytteen rinnakkaisnäyte), satunnaisia mittauksia 30 kpl. 750x-suurennot. Pienin mitattu 1170 nm ja suurin 290 nm.

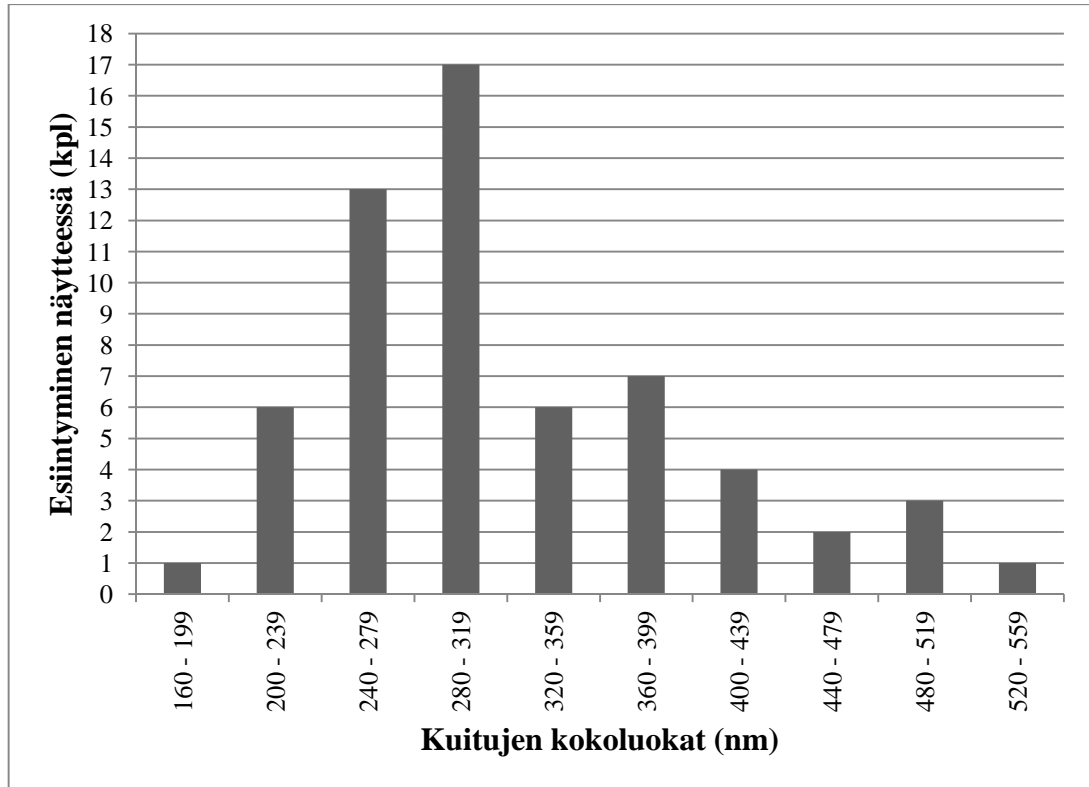
Koesarja 6



Kuva 16. PLGA 80/20 120703-03 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 60 kpl. 3500x ja 5000x-suurennot. Pienin mitattu 130 nm ja suurin 850 nm.

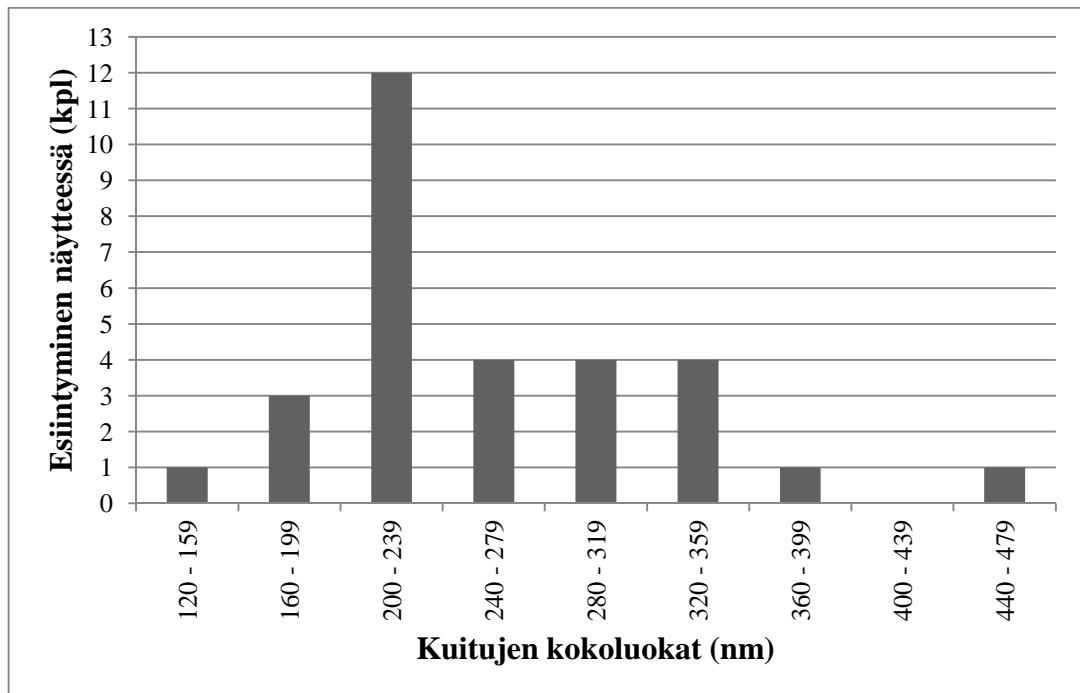


Kuva 17. PLGA 80/20 120703-05(a) näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennot. Pienin mitattu 200 nm ja suurin 800 nm.

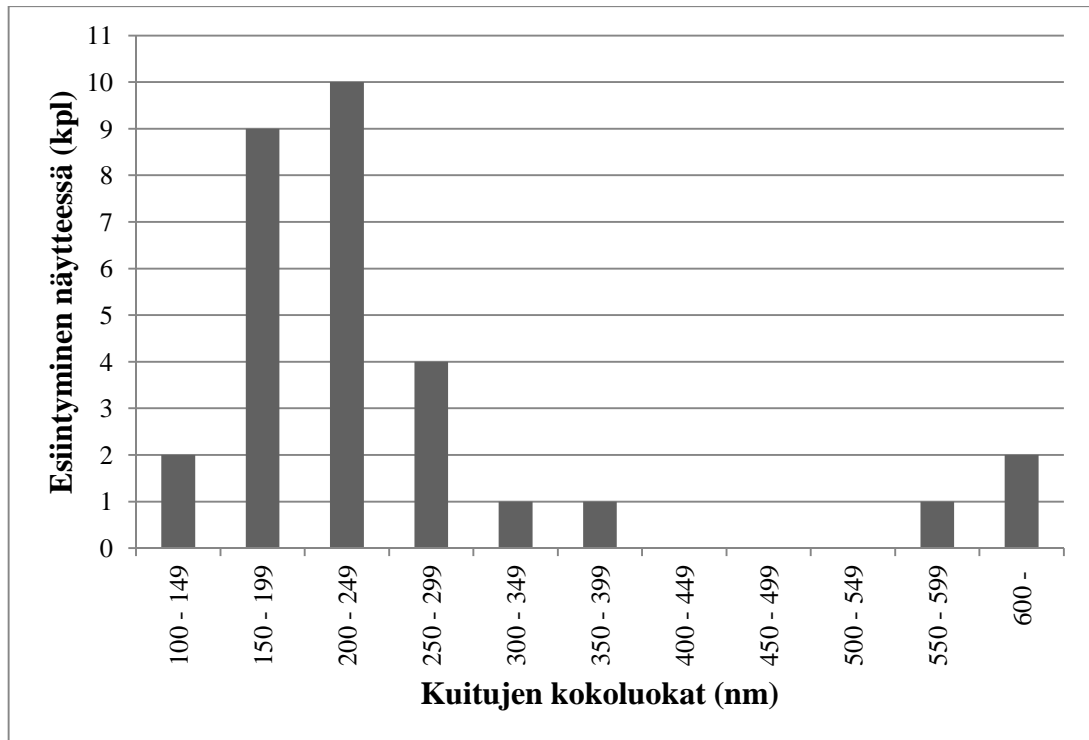


Kuva 18. PLGA 80/20 120703-05(b) näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 60 kpl. 3500x-suurennot. Pienin mitattu 190 nm ja suurin 540 nm. (a) ja (b) ovat saman kuitunäytteen 2 eri SEM-näytettä.

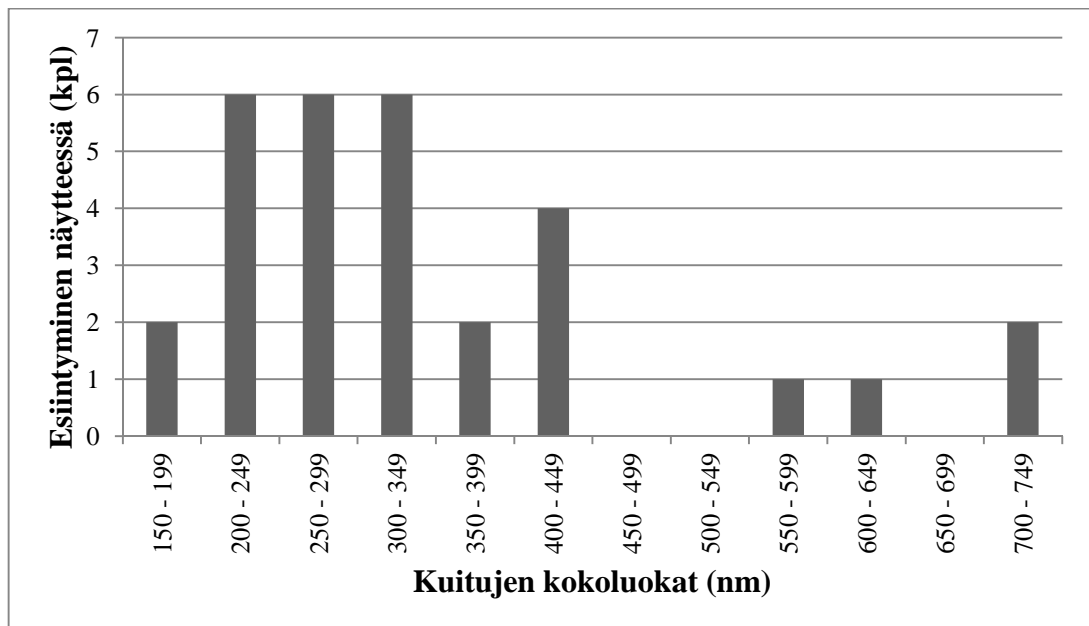
Koesarja 7



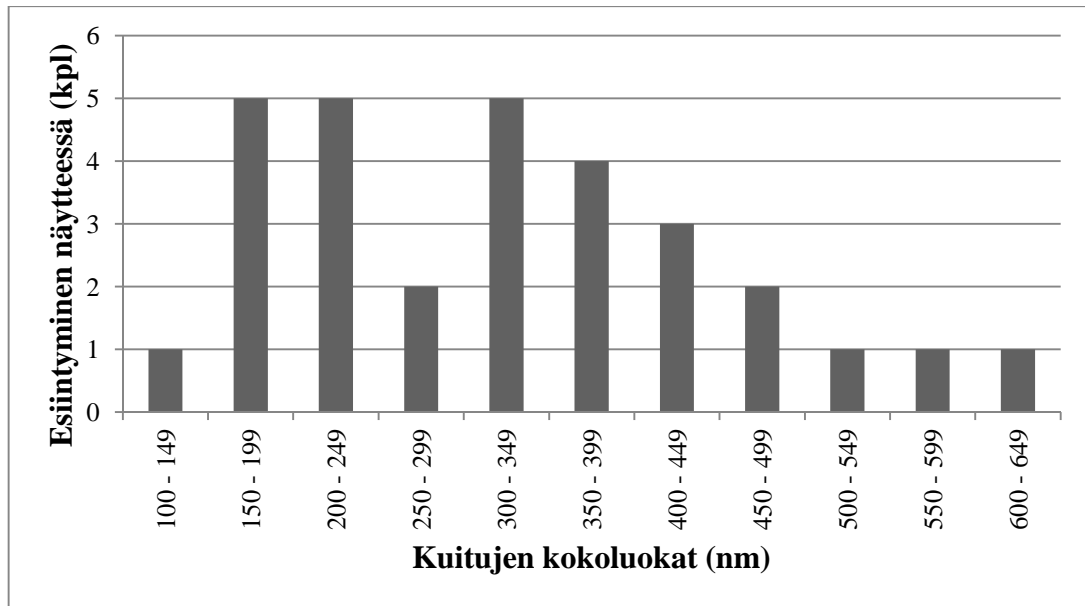
Kuva 19. PLGA 80/20 120914-02 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennot. Pienin mitattu 130 nm ja suurin 440 nm.



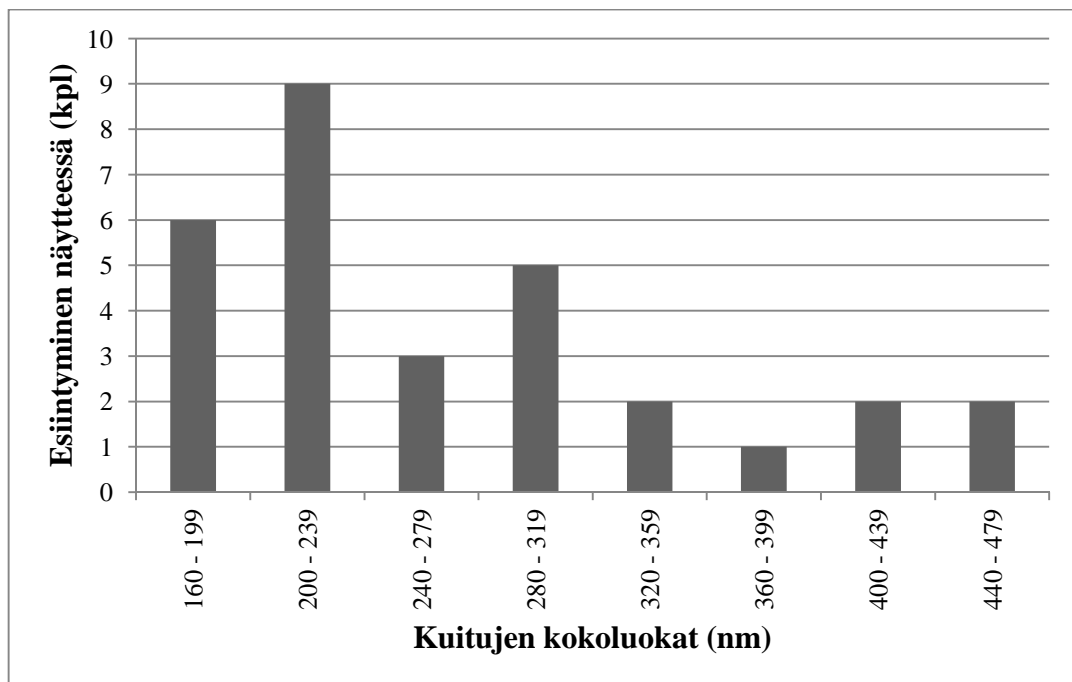
Kuva 20. PLGA 80/20 120914-03 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 120 nm ja suurin 750 nm.



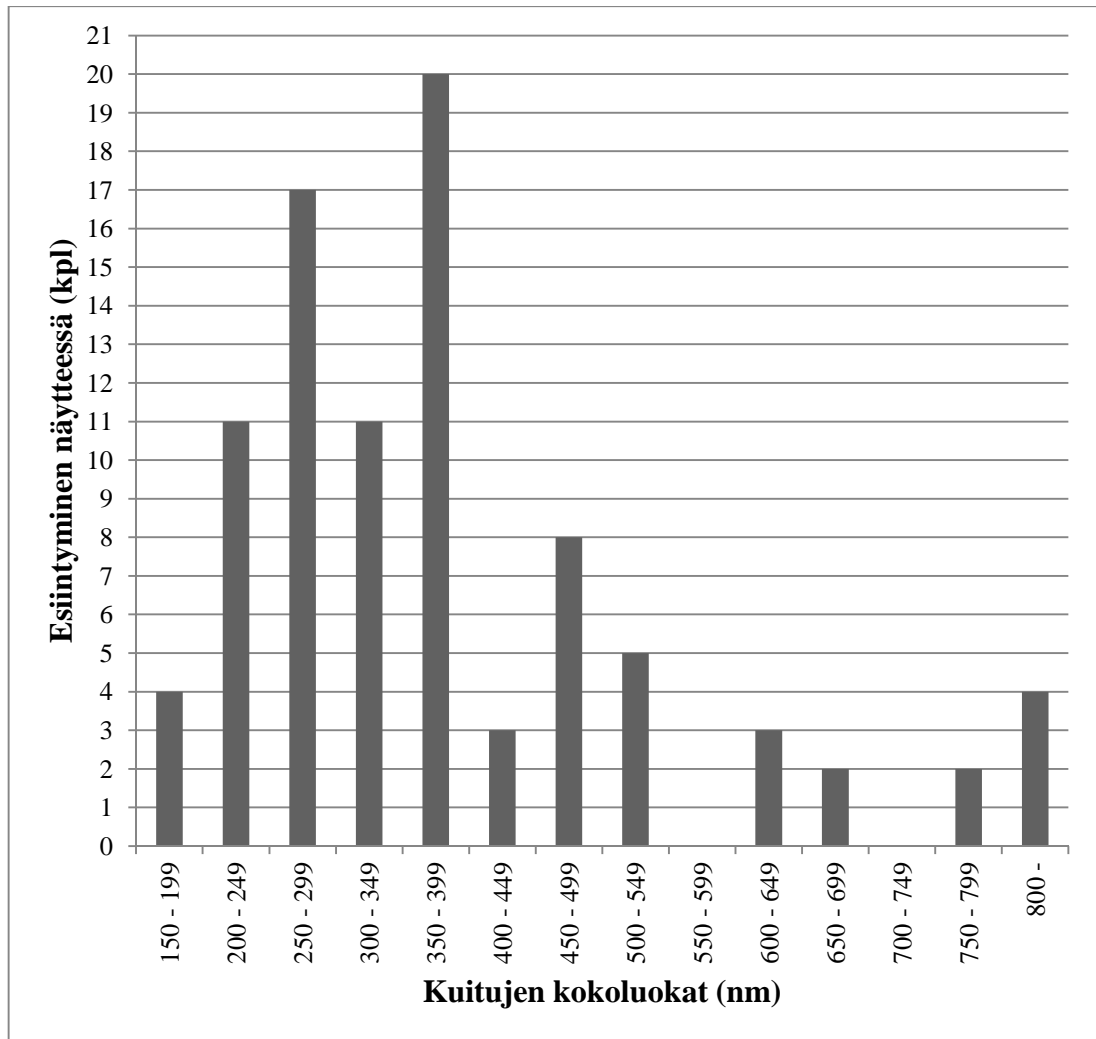
Kuva 21. PLGA 80/20 120914-04 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 180 nm ja suurin 740 nm.



Kuva 22. PLGA 80/20 120914-05 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 130 nm ja suurin 620 nm.

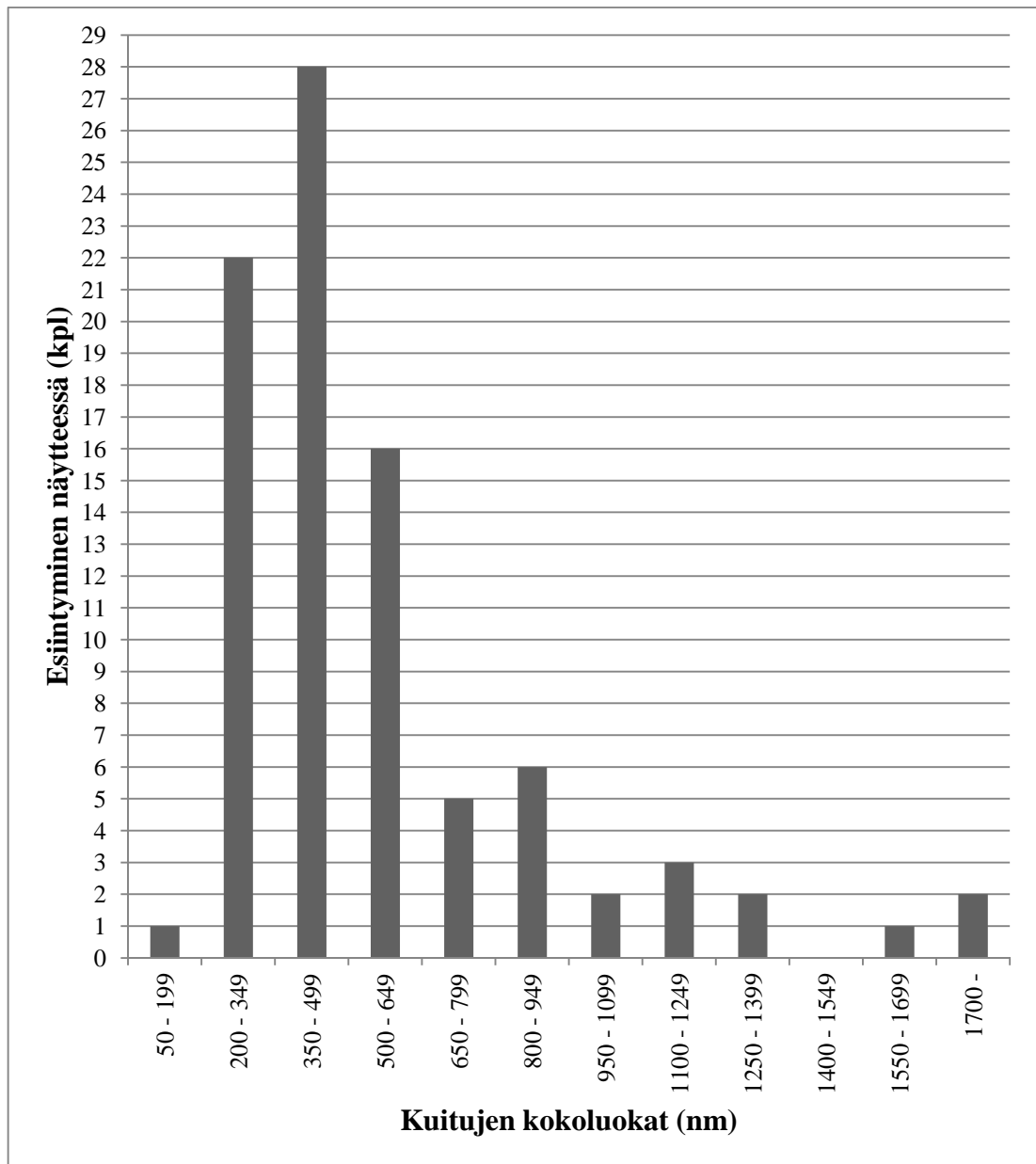


Kuva 23. PLGA 80/20 120914-06 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 30 kpl. 3500x-suurennos. Pienin mitattu 160 nm ja suurin 450 nm.



Kuva 24. PLGA 80/20 KN2-pahvikehysnäytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 90 kpl. 1500x-suurennot. Pienin mitattu 170 nm ja suurin 880 nm.

Koesarja 8



Kuva 25. 95/5 PLA 70/30/rosiini 120905-06 näytteen kuidut, satunnaisia mittauksia 88 kpl. 750x, 1000x, 1500x ja 2000x-suurennot. Pienin mitattu 190 nm ja suurin 3,3 μm .