



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Jari Stenman

3D-biotulostus Body-on-Chip-teknologian mahdollistajana

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan tutkinto-ohjelma

Insinööriyö

27.5.2021

Tekijä Otsikko	Jari Stenman 3D-biotulostus Body-on-Chip-tekniologian mahdollistajana
Sivumäärä Aika	52 sivua 27.5.2021
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	lehtori Carola Fortelius koulutussuunnittelija Anna Hynninen
<p>Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan yleisimpiä 3D-biotulostus-menetelmiä ja biomusteiden tärkeää roolia biotulostuksessa sekä Body-on-Chip-monikudosmallinnusta. Tavoitteena on selvittää, millaisia mahdollisuuksia ja uusia tutkimusasetelmia nämä teknologiat tuovat lääketieteeseen, tutkimukseen ja lääketestaukseen ja mitä etua näistä menetelmistä on verrattuna perinteiseen 2D-soluviljelyyn.</p> <p>Kirjallisuuskatsauksessa tarkasteltiin, kuinka mallintamalla kudosta mahdollisimman tarkasti 3D-ympäristössä jäljitellään solujen luontaista ympäristöä ihmiselimistössä. Selvityksessä tuli esille, kuinka solubiologisia lähtökohtia on voitu huomioida uudella tavalla soluviljelyssä ja myös biomusteissa.</p> <p>Biomateriaalien kehitystyö on ollut oleellinen osa 3D-biotulostusteknologiaa, ja biomusteet ovatkin avainasemassa onnistuneessa biotulostuksessa. Niiden tulee toimia tulostustapahtumassa ja kyetä muodostamaan ja säilyttämään kudoksen rakenne sekä tarjota oikeanlainen elinympäristö ja tuki solujen tehtäville muun muassa kasvamiseen, lisääntymiseen ja liikkumiseen. Body-on-Chip-menetelmällä taas saadaan simuloitua ja mallinnettua eri kudosten ja elinten toimintaa, kun ne ovat toisiinsa yhteen liitettynä mikrofluidistiikan keinoin, kuten ihmiskehossakin kokonaisuutena. Käytännön esimerkkien ja toteutettujen uudentyyppisten tutkimusasetelmien tarkastelun kautta valotetaan näiden menetelmien käytännön hyötyjä ja tarpeellisuutta. Käy myös ilmi, kuinka on toteutettu tutkimuksia, jotka eivät olisi olleet mahdollisia perinteisellä 2D-soluviljelyllä ja ilman monikudosmallinnusta.</p> <p>Esimerkiksi lääketestauksessa on selvinnyt haittavaikutuksia, joiden toteamisessa monikudosmallinnuksella on ollut keskeinen rooli. Ilman sitä jotkin haittavaikutukset saataisivat jäädä huomaamatta ja ne tulisivat esille mahdollisesti vasta potilaskäytössä. Tämä tuo esille näiden menetelmien tärkeyden myös tulevaisuudessa, ja niiden käyttö lisääntyneekin jatkossa.</p>	
Avainsanat	3D-biotulostus, biomusteet, Body-on-Chip

Author Title Number of Pages Date	Jari Stenman 3D-bioprinting as an enabler to the Body-on-Chip-method 52 pages 27 May 2021
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Senior Lecturer, Carola Fortelius Programme Coordinator, Anna Hynninen
<p>The literature review, 3D-bioprinting as an enabler to the Body-on-Chip-method, studies the most common 3D-bioprinting methods and the important role of the bioinks in the bioprinting, together with the Body-on-Chip-multi-tissue modeling. The aim is to clarify what kind of possibilities and novel research designs these technologies bring to medicine, research and drug testing, and what advantages these methods have in comparison to the traditional 2D-cell culturing.</p> <p>The literature review studies how by modeling the tissues as accurately as possible in the 3D-environment simulates the natural environment of the cells in the human body. And how it has been possible to take into account the cell biological starting points in a new way in the cell culturing, and also in the bioinks.</p> <p>The development of biomaterials has been an essential part of the 3D-bioprinting technology, and the bioinks play a key role in the successful bioprinting. They have to function in the bioprinting process and be able to form and maintain the structure of the tissue, and also to provide the right kind of a habitat for cell functions for growing, proliferation and movement, among other things. Whereas the Body-on-Chip-method can simulate and model different tissues and organs in function, when they are interconnected by microfluidistic means, like in the human body as a whole. By examining practical examples and implemented new type of research designs the practical benefits and necessity of these methods are illustrated. And it is shown how studies, that would not have been possible with traditional 2D-cellculturing and without multi tissue-modeling, have been conducted.</p> <p>For example, drug testing has revealed side effects, which the multi-tissue modeling had a key role in discovering. Without it, some of the side effects could go unnoticed and may not be revealed until in the patient use. This also indicates the importance of these methods, and their usage is likely to increase in the future.</p>	
Keywords	3D-bioprinting, bioinks, Body-on-Chip

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Yleisimmät 3D-biotulostusmenetelmät	3
2.1	Biotulostuksen resoluutio	5
2.2	Pisarasuihku	7
2.3	Pursotus	8
2.4	Laser	8
2.5	Stereolitografia	9
3	Johdatus Organ-on-Chip- ja Body-on-Chip-menetelmiin	11
4	3D-biotulostuksen taustaa	14
4.1	Biokonvergenssi	14
4.2	3D-biotulostus – osa Additive Manufacturing -teknologiaa	15
4.3	3D-solukasvatuksen etuja	15
5	Kuvantamismenetelmät ja mallinnus	17
6	Biotulostusprosessi	18
6.1	Biotulostusprosessin vaiheet	18
6.2	Esimerkkejä ihokudoksen biotulostusprosessista	20
6.3	Biomusteen valmistusprosessi	22
7	Biomusteet ja solut	23
7.1	Biomusteen leikkausohenevuus	24
7.2	Biomusteiden luokittelu	26
7.3	Biomusteiden solubiologiset lähtökohdat	26
7.4	Biomustemateriaalit ja itsekorjautuva hydrogeeli biomusteena	28
8	Organoidit ja Body-on-Chip-menetelmä	32
8.1	Organ-on-Chip-esimerkkitutkimus	36
8.2	Body-on-Chip-esimerkkitutkimus	37

9 Yhteenveto ja johtopäätökset

41

Lähteet

43

Lyhenteet

AM	Additive Manufacturing (lisäävä valmistus)
CAL	Computed Axial Lithography (laskennallinen aksiaalinen litografia)
CFD	Computational Fluid Dynamics (numeerinen virtausdynamiikka)
dECM	decellularized Extracellular Matrix (soluista puhdistettu soluväliaine)
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine (lääketieteellisten kuvien tiedonsiirtostandardi)
DLP	Digital Light Processing (videoprojektori-mikropeilauslaitteisto)
GelMa	Gelatin Methacryloyl (gelatiinipohjainen metakryloyyli substituenttiryhmiä sisältävä hydrogeeli)
LAB	Laseravusteinen biotulostus
OPT	Optinen projektiotomografia
SLA	Stereolithography (stereolitografia)

1 Johdanto

3D-biotulostus on biomateriaalien tulostamista 3D-muotoon, ja tällaista tulostettavaa biomateriaalia, jota biotulostin käyttää, kutsutaan biomusteeksi. Tällaisessa tulosteessa on yleensä myös soluja seassa mukana, tai joissain sovelluksissa solut lisätään valmiiseen tulosteeseen vasta itse tulostamisen jälkeen. Epäsuoravalmistus-tekniikoiksi sanotaan menetelmiä, joilla voidaan tulostaa vain tukirakenteita, mutta ei soluja, ja niitä ei varsinaisesti käsitellä tässä työssä. (1, s. 219.)

Biotulostus on lupaava ja viime vuosina nopeasti yleistynyt teknologia, ja sen tuomia laajoja mahdollisuuksia käytetään hyväksi mm. lääketieteessä. Tästä esimerkkinä on organoidit, jotka ovat ihmiselimestön elinten toimintaa jäljitteleviä kudoksille, joita voidaan 3D-biotulostaa alkuperäisten kudosten toimintaa ja rakennetta mahdollisimman tarkasti jäljitellen. Näitä elimiä jäljitteleviä kudoksia voidaan viljellä erityisillä mikrofluidistiikka sisältävillä alustoilla, jota kutsutaan Organ-on-Chip-teknologiaksi. (2.)

Lupaava teknologia on myös Body-on-Chip-monikudosmallinnus, jossa yhdistetään useampia erilaisia organoideja toisiinsa mikrofluidistiikalla kokonaisuudeksi, joka jäljittelee näiden kudosten toimintaa ihmiskehossa. Tällaista järjestelmää voidaan stimuloida ja seurata aiheutuneita vasteita näiden organoidien muodostamassa kokonaisuudessa. Tällaisesta monikudosmallinnuksen monitoroinnista on etua esimerkiksi lääketestauksessa, jossa saadaan seurattua elimistön vasteita lääkeaineille, jäljitellen paremmin ihmiselimestön toimintaa, ja huomattavasti paremmin verrattuna perinteisiin 2D-soluviljelymalleihin nähden. Myös Suomessa kehitetään Body-on-Chip-menetelmiä, esimerkiksi Tampereen yliopistolla on perustettu Monikudosmallintamisen huippuyksikkö. (3.)

Tässä kaikessa on tärkeänä osana myös biomusteiden ja niiden materiaalien kehitys. Monisoluisissa eliöissä solut kasvavat ja liikkuvat luonnostaan kolmiulotteisessa ympäristössä, ja tällaiseen ympäristöön pyritään myös 3D-solukasvatuksessa, jolloin soluilla on luontaisempi ympäristö kuin perinteisessä 2D-solukasvatuksessa. 3D-biotulostus on tuonut tähän solujen 3D-kasvu-ympäristöön lupaavia mahdollisuuksia mm. kudosteknologian ja regeneratiivisen lääketieteen alalle. (4.)

Biotulostus on lupaava teknologia myös jopa elinten valmistamiseksi, joka on tämän teknologian yhtenä tavoitteena. Siitä toivotaan helpotusta elinsiirteiden pulaan, sillä elinsiirteistä on Suomessakin jatkuva vajaus. Suomessa noin 500 henkilöä odottaa jatkuvasti elinsiirrettä. Esimerkiksi vuonna 2020 tehtiin Suomessa elinsiirtoja kahden isoimman elinsiirreryhmän osalta seuraavasti (5):

- munuainen: 263, joista 31 elävältä luovuttajalta
- maksa: 75.

Elinsiirrepulan haasteeseen vastaaminen 3D-biotulostamalla, käyttämällä esimerkiksi potilaiden omia kantasoluja, on suuren tarpeen vuoksi ymmärrettävä tavoite potilaalle sopivien siirteiden saatavuuden näkökulmasta, vaikka tähän onkin vielä matkaa (1, s. 217).

3D-biotulostuksella voidaan valmistaa yksinkertaisimmillaan myös esimerkiksi dropletteja, jotka ovat pisaramaisia tulosteita, jossa tulostetaan pieni annos biomustetta esimerkiksi tutkimuskäyttöön, ja ovat edullisia valmistaa biotulostamalla, tai esimerkiksi sferoideja, jotka ovat sferoidin mallisia soluagregaatteja. Biomusteessa voi olla pelkästään soluja, tai soluja hydrogeelissä, jollaisiin biomusteisiin tässä katsauksessa pääasiassa keskitytään. Automatisaatiosta voi syntyä myös materiaalisäästöä. Myös toistettavuus on tällä menetelmällä hyvä, mikä on tutkimuksen kannalta tärkeä piirre. Biotulostamalla voidaan automatisoidusti myöhemmin uusia koe täsmällisesti, ja kudostulosteita voidaan tehdä helposti useita kappaleita ja pitkiä sarjoja koeasetelmia varten. 3D-biotulostuksen hyödyt tulevat kuitenkin esille, kun luodaan monimutkaisempia rakenteita. (6.)

Mallinnettava 3D-rakenne voi olla hyvinkin kompleksinen, mutta yksinkertaisempia rakenteita pystytään jo valmistamaan. Esimerkiksi Tampereen yliopistolla on biotulostettu sarveiskalvoa vastaava rakenne, kun 3D-biotulostimella saatiin tulostettua pintakudosepiteelin ja keskiosan stroomasolukko kantasoluteknologian avulla. Tällaiset edistysaskeleet tuovat esille 3D-biotulostuksen lupaavia mahdollisuuksia. Myös esimerkiksi ihokudoksen biotulostuksella on edistetty ihon vaurioalueen paranemista. Tutkimuksessa taas on saavutettu sellaisia tuloksia, jotka eivät olisi ilman biotulostusta ja Body-on-Chip-monikudosmallinnusteknologiaa olleet mahdollisia, esimerkiksi paljastettu lääkeaineiden haittavaikutuksia. Solu- ja kudosomallemalla tulostamalla voidaan pyrkiä myös vähentämään esimerkiksi eläinmallien käyttöä kosmetiikkateollisuuden testauksissa. Esimerkiksi

EU:ssa on kielletty kosmetiikkateollisuuden eläinkokeet kokonaan, ja uudet mallit korvaamaan eläinkokeita ovat tervetulleita. (3; 7; 8.)

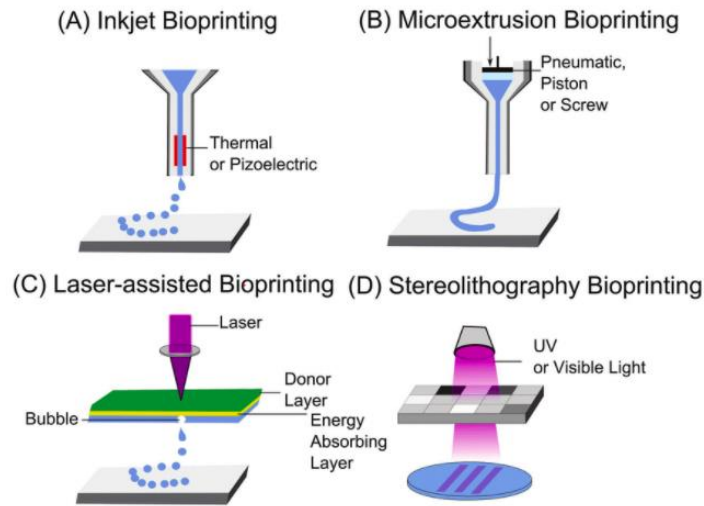
Tässä katsauksessa luodaan silmäys yleisimpiin 3D-biotulostusmenetelmiin, biomustei-
siin sekä tämän teknologian tuomiin mahdollisuuksiin Body-on-Chip-monikudosmallinta-
misen näkökulmasta.

2 Yleisimmät 3D-biotulostusmenetelmät

3D-biotulostuksessa käytetään useita erilaisia menetelmiä, ja tässä katsauksessa on tarkasteltu lähinnä niistä yleisimpiä, joihin kuuluvat pursotus eli ekstruusio, pisarasuihku, laser ja stereolitografiamenetelmät, joista periaatekuvat näkyvät kuvassa 1. Nimityskäytäntö biotulostusteknologiassa on kirjavaa, ja tässä työssä käytetään yleisimpiä termejä. (1, s. 219, 220; 6.)

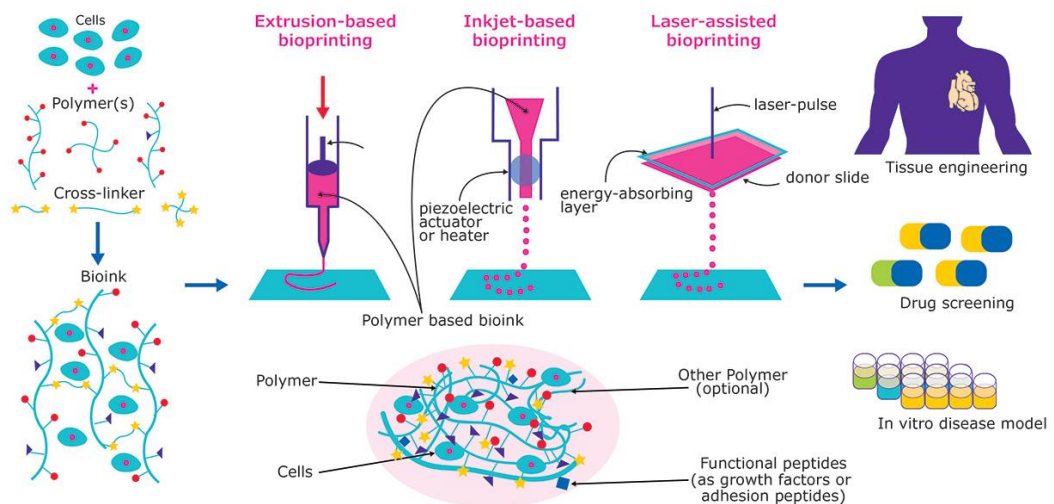
Tulostimen valintaan vaikuttaa monta tekijää, esimerkiksi kuinka suurta resoluutiota tarvitaan, millainen rakenne pitäisi saada aikaiseksi, millaisia määriä kudosta tai tulostuskohteita pitäisi pystyä tulostamaan, mitä materiaalia tulostetaan ja tulostimen hintaluokka jne. Tällöin täytyy tuntea myös se, millaisia asioita ja millä tekniikalla niitä voidaan erilaisilla biotulostimilla tulostaa. (6.)

Kuvasta 1 nähdään, että pisarasuihkumenetelmässä (A) biomuste tulostetaan pisaroina. Ekstruusio- eli pursotusmenetelmässä (B) biomuste tulostetaan jatkuvalla syötteellä. Laseravusteisessa menetelmässä (C) laserilla irrotetaan pisaroina biomuste apumateriaalikerroksesta tulosteeseen. Stereolitografisessa menetelmässä (D) biomuste ristosilloitetaan suoraan paikalleen kerroksittain valon avulla. (9, s. 8.)



Kuva 1. Peruseriaatteet pisarasuihku-, pursotus-, laser- ja stereolitografisille 3D-biotulostusmenetelmille (9).

Myös kuvassa 2 on esitetty ekstruusio, pisarasuihku ja laseravusteisen menetelmän peruseriaatteet. Lisäksi siinä on vasemmassa reunassa periaatekuva biomusteen rakenteesta ja sen muodostumisesta halutuista soluista sekä polymeereistä ja ristosilloitusmateriaaleista, joista yhdessä muodostuu käyttövalmis biomuste. Ristosilloitusominaisuuksia voi olla biomusteessa useita, esimerkiksi lämpötilan ja valon vaikutuksesta tapahtuvia, ja nämä ovat tärkeä osa biomusteen toimivuutta. (10.)



Kuva 2. Biomusteen muodostaminen ristosidostamalla, yleisimpiä biotulostusmenetelmiä, ristosilloitetun biotulosteen kaavakuva sekä erilaisia biotulostuksen käyttötarkoituksia (10).

Kuten kuvassa 2, erilaiset polymeerit yhdistyvät ristosilloituksessa ja muodostavat soluille sopivan 3D-elinympäristön ja vaikuttavat tulostustapahtumaan. Tämä on tärkeä reaktio biotulostuksessa ja biomusteissa solujen kannalta. Biomusteen suunnittelussa tulee huomioida, että solun tulee kasvaa luonnollisessa ympäristössään ja myös soluvälialueen ominaisuudet, ja tulostusominaisuudet tulee pystyä käytännönläheisesti ja tarkoituksenmukaisesti yhdistämään toisiinsa. (10.)

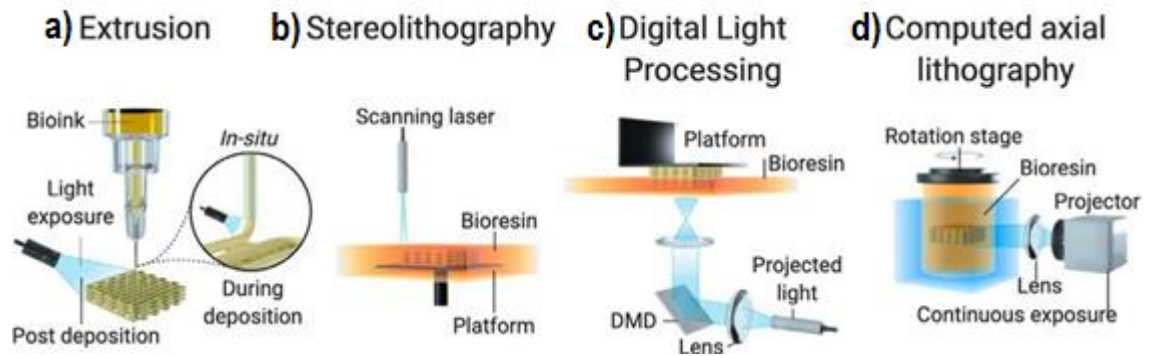
2.1 Biotulostuksen resoluutio

Onnistuneen kudosta jäljittelevän biotulosteen edellytys on se, että sen arkkitehtuuri ja ominaisuudet ja anatomia saadaan mahdollisimman samankaltaiseksi kuin itse tulosteen mallina oleva kudos. Tähän vaikuttaa mm. tulosteen resoluutio. 3D-biotulostusta tehtäessä tulosteessa käytetyn biomusteen osalta sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikuttavat tulosteen resoluutioon. Myös biotulostuslaitosten tekniset ominaisuudet vaikuttavat resoluutioon. (4; 6; 11, s. 1, 13, 16; 12, s. 5, 7, 15.)

Pisarasuihkutulostuksessa kulloisenkin tulostuspään halkaisija ja sen tulostuspinnan kohtaamiskulma määrittää osaltaan itse tulostimen avulla saavutettavaa resoluutiota. Ekstruusiotulostuksessa taas tulostuspään nopeus ja biomusteen viskositeetin nonlinearisuus määrittää resoluutiota. (11, s. 13, 16; 12, s. 15.)

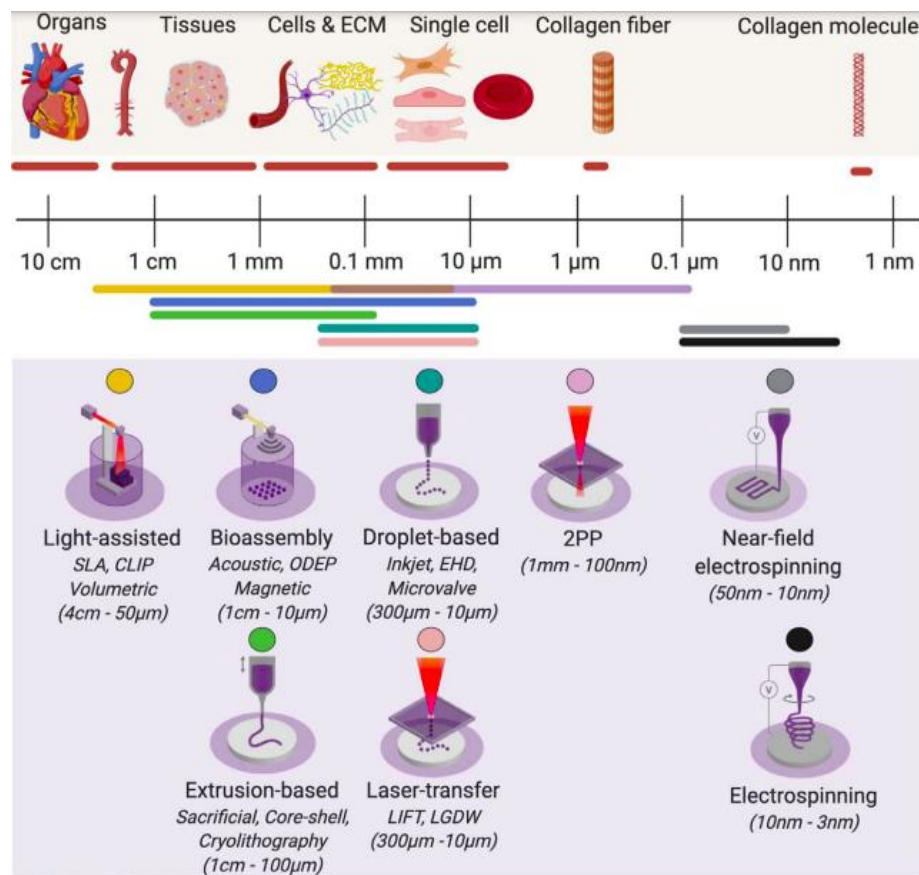
Kun biomusteeseen tehdään valoavusteisesti ristosidoksia, kuten laseravusteisessa biotulostuksessa ja stereolitografiamenetelmissä, niin tällöin näiden ristosidosten ja valon ominaisuudet määrittävät tulostimella saavutettavaa resoluutiota. On kehitetty myös menetelmiä, joissa perinteisen valokäsittelyn sijaan onkin lähellä infrapuna-aluetta kaksi fotonia, jotka aktivoituvat, kun useimmat valoon perustuvat teknologiat perustuvat yhden fotonin absorptioon. Etuna on se, että polymerisaatio voi tapahtua hyvin pienessä tilavuudessa saaden aikaan hyvin korkean resoluution mikrometri- tai nanometriluokassa. (11, s. 13, 16; 12, s. 7, 8.)

Esimerkkejä eri tulostimilla tehtävästä valoavusteisesta ristosidostuksesta on kuvassa 3. Itse tulostustarkkuuden lisäksi voidaan tulostettaessa käyttää hyväksi myös solujen itseorganisointiominaisuutta, jolla voidaan kompensoida tulostusresoluutiota (11, s. 5).



Kuva 3. Erilaisia valoa ristikäsittelyssä hyödyntäviä biotulostusmenetelmiä. Esimerkit a) pur-sotus- ja b) stereolitografiamenetelmistä sekä c) projektiota hyödyntävästä stereolito-grafiasta, jossa kerrokset luodaan mikropiiliheijastetun kuvan avulla ja d) projektiota hyödyntävästä stereolitografiasta, jossa koko kappale luodaan kerralla biomusteen kes-kelle. (13, s. 3.)

Biotulostustekniikoiden välillä on suuria eroja, ja se vaikuttaa muiden ominaisuuksien lisäksi myös tulostustekniikan tarkkuuteen. Kuvassa 4 on mainittuna joidenkin tulostus-tekniikoiden resoluutioita ja verrattu niitä mittakaavassa kudoksiin (13, s. 2).



Kuva 4. Joidenkin biotulostustekniikoiden resoluutioita, mittakaavassa verrattuna kudoksiin (13, s. 2).

Kuvan 4 mukaan yleisimmät 3D-biotulostusmenetelmät pääsevät seuraaviin tarkkuuksiin: pursotus eli ekstruusio: 1 cm – 100 μm; pisarasuihku: 300 μm – 10 μm; stereolitografia (SLA): 4 cm – 50 μm. Lasermenetelmälle on resoluutioksi mainittu kirjallisuudessa 300 μm – 10 μm. (13, s. 2.) Seuraavaksi käsitellään näitä yleisimpiä biotulostustapoja.

2.2 Pisarasuihku

Pisarasuihku biotulostusmenetelmästä käytetään myös mm. nimityksiä droplet, inkjet ja mustesuihku biotulostus ja esimerkkejä pisarasuihuketekniikasta on kuvissa 1 ja 2. Termisessä menetelmässä biotulostimen suutinkärki lämmitetään ja tulostetaan ilmanpaineella biomuste kerroksittain pulssien synnyttäessä mustepisaroihin. Lämpötilalla vaikuttaa myös biomusteen tulostusominaisuuksiin, koska biomusteen tulee toimia halutusti tulostimessa ja tulostuksen jälkeen säilyttää muotonsa. Esimerkiksi hydrogeelien

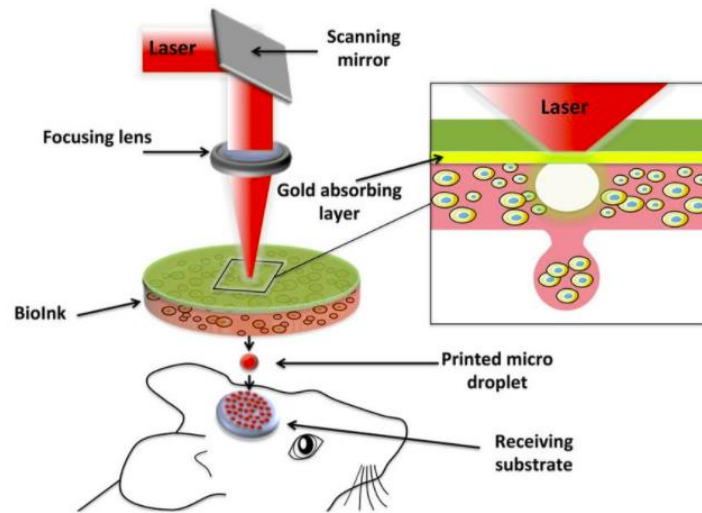
tapauksessa biomusteen tulee hyytyä nopeasti tulostuksen jälkeen biomusteen kuljettua suuttimesta. Tähän vaikutetaan useilla biomusteen ominaisuuksilla ja biomateriaalin ris-tisidoksilla. Pietsosähköisessä versiossa pintojen varauseroa käytetään pisaroiden muo-dostuksessa (kuvat 1 ja 2). Pisaroiden tilavuus on mainittu yhtenä näitä menetelmiä ra-joittavana tekijänä. (1, s. 219 – 220; 11, s. 5; 12, s. 2 – 5.)

2.3 Pursotus

Pursotusbiotulostusmenetelmästä käytetään myös mm. nimityksiä extrusion tai painetu-lostus. Esimerkkejä ekstruusiomenetelmästä on kuvissa 1 ja 2. Verrattuna pisarasuih-kuun tässäkin menetelmässä käytetään painetta, esimerkiksi paineilmaa tai ruuvipuris-tinta, mutta materiaali tulee tasaisena virtana alustalle ja muodostaa rakenteen kerrok-sittain. Biomusteen tulee olla tarpeeksi nestemäistä, jotta se voidaan puristaa ahtaasta suuttimesta lävitse. Tämä täytyy tapahtua niin, että solut kestävät prosessin. Sekä pur-sotuksessa että pisarasuihkumenetelmässä, mikäli solut ovat mukana tulostusmateriaa-lissa, lämpötilan ja paineen vaikutus solujen elinkelpoisuuteen täytyy ottaa huomioon. (1, s. 220; 11, s. 8; 12, s. 5.)

2.4 Laser

Laserbiotulostusmenetelmää sanotaan myös mm. laseravusteiseksi biotulostukseksi (LAB). Lasermenetelmässä laserin energialla höyrystetään tulostenauhalla materiaali kohdepinnalle, kuten kuvassa 5 sekä kuvissa 1 ja 2. (1, s. 220.)



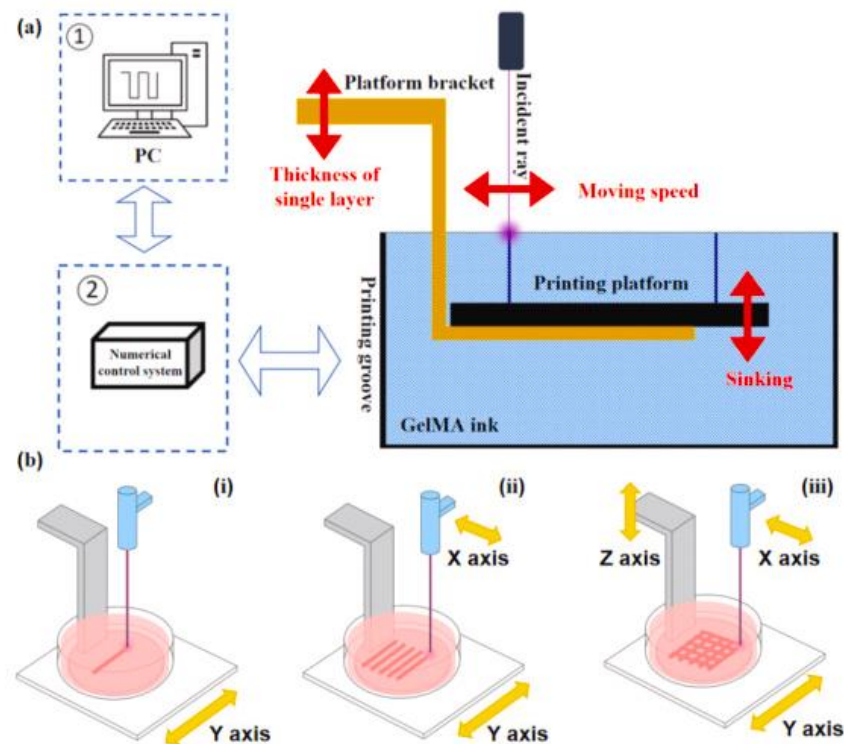
Kuva 5. Laserbiotulostusmenetelmän periaate. Laserin avulla irrotetaan biomuste alustalleen erityisesti siihen suunnitellulta nauhalta. Laserilla synnytetään höyrystymiskupla, jonka romahdus aiheuttaa purskeen, jonka johdosta biomuste siirtyy nauhalta kohdealustalleen. (14, s. 2.)

Laser biotulostusmenetelmässä solut tiputetaan lasersäteen avulla tarkoitusta varten tehdyltä tulostenauhalla alustalleen. Nauha on valmistettu läpinäkyvästä lasista, ohuesta metallikerroksesta ja biomusteesta, joka irtoaa laserin vaikutuksesta. Toimintaperiaate muistuttaa kavitaatioilmiössä muodostuvaa kuplaa, joka muodostuu biomustefilmiin, jonka laajenemis- ja romahdusilmiö synnyttää purskeen. Se irrottaa biomusteen alustaltaan mikrodroplettina kohdealustalleen. (1, s. 220; 11, s. 11; 14, s. 2.)

2.5 Stereolitografia

Biotulostuksen stereolitografiamenetelmästä (SLA) on erilaisia muunnoksia. Perinteisesti biomuste tai biomusteet ovat altaassa tai astiassa. Tulostusalusta on upotettuna biomusteeseen, jossa esimerkiksi joko UV:n tai näkyvän valon avulla valikoivasti ristisidostetaan biomustetta halutulle pinnalle kohdennetusti kerros kerrokselta. Näin muodostetaan kerroksittain 3D-rakennetta nestemäisestä biomusteesta kiinteään muotoon, haluttuun kohtaan tulostettavaa kappaletta. Alustaa siirretään sitä mukaa tulosteineen alaspäin, jos kyse on perinteisestä SLA:sta, tulosteen samalla valmistuessa biomusteen ympäröimänä, kuten kuvassa 6 (myös kuvat 1D ja 3b). Tämä säteilytys voidaan suorittaa joko koko pinnan alueelle kuten esimerkiksi kuvassa 3c tehdään DLP-tekniikalla (Digital Light Processing), tai valoa voidaan käyttää kohdennetusti ja ristisidostaa pienemmälle

alueelle biomustetta, kuten kuvan 6 point-by-point-menetelmässä ja kuvassa 3b. (11, s. 11; 13, s. 3; 15.)



Kuva 6. Pintakohtainen tai point-by-point-valokovetus. Tietokoneohjauksella toteutettu stereolitografinen biotulostusmenetelmä, jossa x-y-z-akselilla ristisidostetaan pisteittäin biomustetta. (15.)

Kuvasta 6 käy ilmi, kuinka esimerkiksi GelMa-biomustetta (Gelatin Methacryloyl) sisältävässä astiassa valon paikkaa kohdistamalla voidaan ristisidostaa ja lisätä materiaalia tarkasti alustalleen haluttuun kohtaan tulostetta, ja näin muodostaa haluttu kappale. (15.)

Stereolitografia voidaan tehdä myös läpinäkyvän astiamateriaalin läpi alapuolelta. Valon lähteenä voidaan käyttää myös projektoria, jolloin puhutaan DLP-tekniikasta, ja siinä saadaan myös alhaaltapäin läpinäkyvän materiaalin läpi valo projisoitua kerrallaan kokonaiselle pinnalle. Etuna tässä on se, että saadaan valmistettua nopeammin kokonainen taso kerralla, kuten kuvassa 3c. (11, s. 11, 12.)

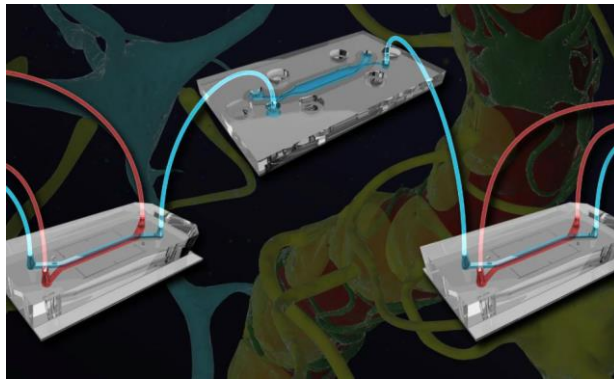
Perinteisesti stereolitografian huonona puolena on pidetty sitä, että siinä sekoittuu liian helposti keskenään tulostettavat materiaalit vaihdettaessa tulostuksen aikana

käytettävää biomustetta, mutta myös tätä menetelmää on monin tavoin kehitetty, ja erilaisilla teknisillä ratkaisuilla on päästy tarkempaan lopputulokseen. Tarkkuuden osalta SLA:n resoluutiota määrittää lähinnä itse optisen lähteen ominaisuudet. (16; 12, s. 7.)

Yksi projektioon perustuva sovellus on myös kuvassa 3 esitetty menetelmä c, välitön 3D-biotulostus. Siinä menetelmä on hieman vastaava, mutta käänteisesti kuin CT-skannauksessa. Menetelmä tuo myös erilaisia mahdollisuuksia biotulosteen valmistukseen. Kappale valmistuu valon vaikutuksesta suoraan biomusteen sisälle kokonaan kerralla ilman alustaa läpinäkyvässä astiassa. Astiaa pyöritetään tasaisesti projektorin edessä, ja projisoitu kuva ristikidostuu samanaikaisesti astian sisälle. Vaikka astia on täynnä biomustetta, prosessi onnistuu. Se johtuu siitä, että materiaalista, jonka läpi valo kulkee, kuluu ensin happi pois. Jälkikäteen ylijäänyt materiaali voidaan hapettaa uudelleen ja se voidaan käyttää uudestaan. Puolestaan siinä materiaalissa, jossa polymerisoituminen ja valoreaktio tapahtuu, happi kuluu ensin kokonaan loppuun ja vasta sitten tapahtuu reaktio ja ristikidostus. (11, s. 12; 12, s. 9.)

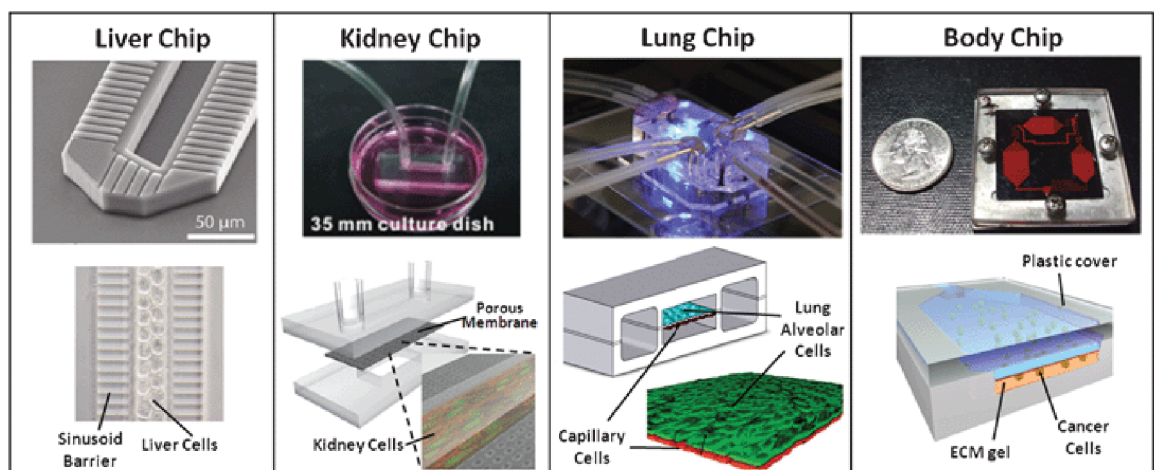
3 Johdatus Organ-on-Chip- ja Body-on-Chip-menetelmiin

Biotulostamalla voidaan valmistaa organoideja eli ihmiselinten toimintaa mahdollisimman luonnollisessa 3D-kasvuympäristössä jäljentäviä kudosomelejä. Tällaisia elinmalleja voidaan sijoittaa omille erityisille mikrofluidistisille alustoilleen, joissa organoidille on järjestetty kasvatusmediumin kierrätys vastaamaan kudoksen verenkiertoa, jolloin niistä muodostuu Organ-on-Chip-tyyppisiä elinmalleja, kuten kuvassa 8. Siinä tutkimusasetelmana on, kuinka aivot ja niiden verenkierto vaikuttavat toisiinsa, esimerkiksi aivoverenkierto ja aivoveriesteen läpäisevyyden tutkimuksissa. (17.)



Kuva 7. Organoideja yhdistettynä toisiinsa kasvatusmediumin kierrätyksellä. Keskimäinen siru on aivosiru ja reunimmaisat sirut aivo-veriestesiruja. Tässä Organ-on-Chip-koejärjestely auttaa tutkimaan, kuinka aivot ja niiden verenkierto vaikuttavat toisiinsa, esimerkiksi aivoverenkiertotutkimuksissa ja aivoveriesteen läpäisevyyden tutkimuksissa. (17.)

Näitä organoidialustoja voidaan valmistaa monenlaisilla tekniikoilla eri solutyyppejä varten ja erilaisiin tarkoituksiin. Kuvassa 8 on esimerkkejä yksittäisistä maksa-, munuais- ja keuhko-organoideista sekä oikealla Body-on-Chip-koejärjestely. (18.)

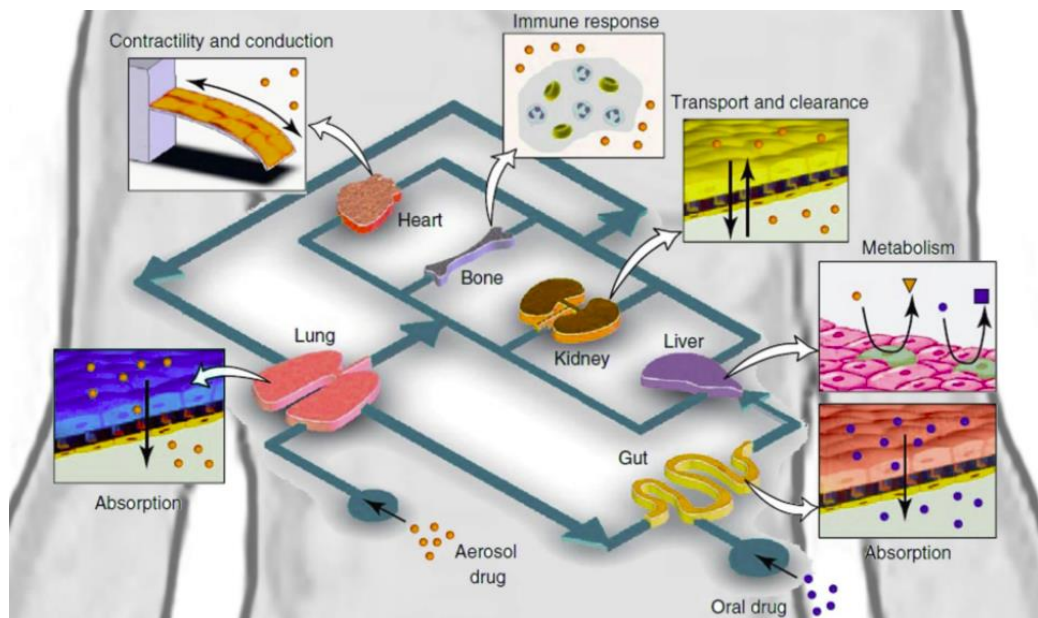


Kuva 8. Kuvia erilaisista Organ-on-Chip-mikrofluidistisista alustoista, joilla jäljitellään soluviljelyssä luontaisen kaltaista ympäristöä. Alempana on kaavakuvat toimintaperiaatteesta sekä yllä valokuvat käytännön toteutuksista. Kuvat ovat maksa-, munuais-, ja keuhkoelinmalleista sekä Body-on-Chip-yksiköstä, jossa kolikko havainnollistaa kokoluokkaa. (18.)

Organ-on-Chip-menetelmään pohjautuen on voitu kehittää myös Body-on-Chip-menetelmiä, jollainen on esitetty kuvassa 9. Siinä on jäljitelty ihmiselimistön toimintaa yhdistämällä useampia tällaisia organoideja liittämällä niiden kasvatusmediumin kierrätys toisiinsa. Näin jäljitellään elimistön rakennetta, jossa elimet ovat kytköksissä toisiinsa. Tällä

on korvaamaton merkitys esimerkiksi sairauksien mallintamisessa, tutkimuskäytössä ja lääketestauksessa, ja saavutetaan useita etuja verrattuna perinteisiin menetelmiin. (18; 19.)

Yksi lääketieteen ongelma on ollut myös se, että jotkin lääkkeet ovat kliinisten kokeiden jälkeen olleet käytössä pitkään, ennen kuin niiden haittavaikutuksia on huomattu. Haittavaikutukset tulisi havaita heti, ennen kuin lääkkeet ovat olleet jo käytössä potilailla. Lääketestauksen osalta on kova tarve paremmalle lääketestaukselle, ja tähän tarpeeseen vastaavat esimerkiksi Organ-on-Chip- (kuvat 7 ja 8) sekä Body-on-Chip-järjestelmät (kuva 9), joilla voidaan simuloida esimerkiksi lääkeaineen vaikutuksia. Tässä teknologiassa 3D-biotulostuksella voidaan valmistaa kudoksia ja organoideja. (17; 18; 19.)



Kuva 9. Periaatekuva eri organoidien yhdistämisestä Body-on-Chip-koeasetelmaksi. Body-on-Chip-järjestelmän kaavakuva, jossa on yhdistetty eri elinmalleja toisiinsa ja simuloidaan lääkkeenantoa suun ja keuhkojen kautta, ja sen aiheuttamia vasteita elimistössä ja sen eri osissa. Absorption jälkeen lääkeaineet vaikuttavat mikrofluidistisen kierron kautta esimerkiksi maksan metaboliaan. Ne voivat vaikuttaa myös kardioperäisiin lihassoluihin ja immuunivasteeseen sekä munuaisten toimintaan ja eritykseen. (20.)

3D-biotulostus on myös helposti skaalautuva menetelmä, jota voidaan käyttää kudosteknologian massatuotannossa, ja se on luotettava ja toistettava. Nämä ovat tärkeitä ominaisuuksia esimerkiksi tutkimuksen kannalta. Sillä saadaan tehtyä farmakologisia ja

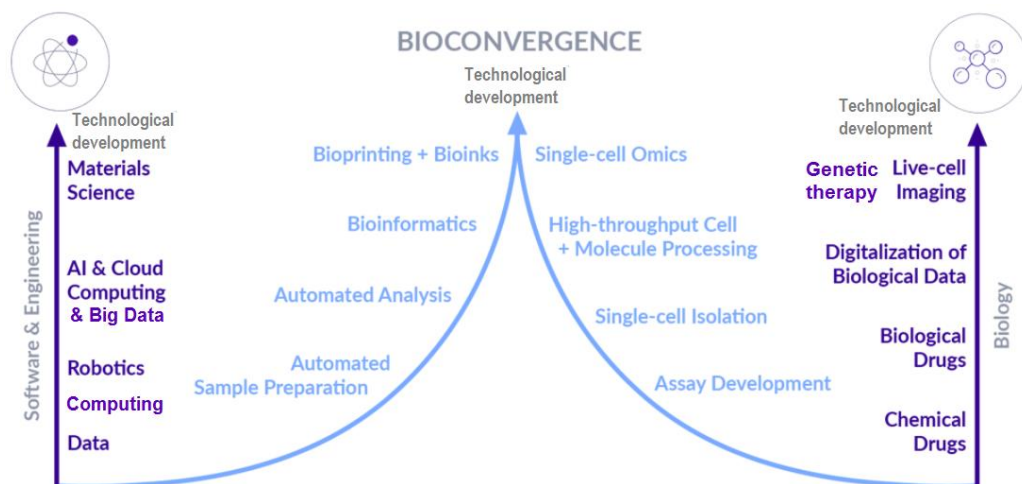
toksikologisia määrittämiä paremmalla suorituskyvyllä ja teholla. 3D-biotulostuksella on myös lupaavia mahdollisuuksia siihen, että voitaisiin jatkossa korvata trauman tai sairauden tuhoamaa kudosta. (6; 19; 21.)

Organ-on-Chip- ja Body-on-Chip-tekniikkaa on käsitelty tarkemmin luvussa 8.

4 3D-biotulostuksen taustaa

4.1 Biokonvergenssi

Laajemmassa kontekstissa 3D-biotulostus on biokonvergenssin tulos. Se on vaatinut taustalleen ja toteutuakseen useiden eri alojen nopean kehityksen ja esimerkiksi laajoja lääketieteen ja teknologian kehitysharppauksia. Lisäksi se on vaatinut eri alojen tiedon, taidon ja osaamisen lähentymisen toisiinsa ja yhteistyön, eli biokonvergenssin. Biokonvergenssissa edistyskellinen tietotaito yhdistyy eri tieteenalojen yhteistyössä, biotieteiden, lääketieteen ja insinööritieteiden alalla. Ilman biokonvergenssia, ja esimerkiksi 3D-kuvantamista ja mallinnusta, ei biotulostaminenkaan olisi mahdollista. Kuvasta 10 selviää, minkälaisia edistysaskeleita on tapahtunut biokonvergenssissa. (22.)



Kuva 10. Biokonvergenssin kehitysaskeleita. Biotulostus ja siinä käytettävät biomusteet ovat nykypäivänä mahdollisia pitkän tutkimus- ja kehitystyön ansiosta, jota on tapahtunut useilla eri aloilla, esimerkiksi lääketieteellisen kuvantamisen, genetiikan jne. osalta. Nämä alat ovat yhteistyössä synnyttäneet uutta tietoa ja teknologiaa, joka on tarvittu, jotta biotulostus on mahdollista. (22.)

Esimerkiksi ilman biokonvergenssia, kuten genetiikan ja kantasolujen tuntemuksen osalta tapahtuneita läpimurtoja, ei voitaisi käyttää ihmisen omia kantasoluja potilaalle sopivien kudosten biotulostamisessa. Myöskään ilman pitkää solubiologian ja biokemian alojen kehitystä biotulostukseen ei olisi tarvittavia perustietoja, eikä myöskään nykyisenkaltaisia biomusteita voitaisi valmistaa jne. (kuva 10). (22.)

4.2 3D-biotulostus – osa Additive Manufacturing -teknologiaa

3D-tulostus on osa AM-teknologiaa (Additive Manufacturing), jossa perinteisen materiaalin poistamisen, esimerkiksi jyrsintä ja sorvaus, vastakohtana materiaalia lisätään. Tässä on ilmeisiä etuja, esimerkiksi materiaalin säästön jne. kannalta. 3D-biotulostus on taas 3D-tulostuksen biomateriaaleja hyödyntävä osa-alue. Esimerkiksi ekstruusioon (kuvat 1 ja 2) perustuvassa biotulostuksessa materiaalia tulostetaan lisää jatkuvalla syötteellä kerros kerrokselta kasvattaen rakennetta. (1, s. 217.)

Biotulostamalla on mahdollista valmistaa monimutkaisia biologisia komposiittirakenteita, yhdistäen eri soluja, biomolekyylejä ja biomateriaaleja, muodostaen esimerkiksi haluttuja kudoksia. Tämä voidaan tehdä useilla eri tekniikoilla, ja biotulostimiin on myös saatavilla erilaisiin käyttötarkoituksiin valmistettuja erilaisia tulostuspäitä, kuten pneumaattisia-, mustesuihku- ja lämpötilakontroloituja tulostuspäitä, ja useampia eri biomusteita voidaan eri tulostuspäillä tulostaa automatisoidusti samaan kohteeseen. (6; 21.)

4.3 3D-solukasvatuksen etuja

3D-solukasvatuksessa, oli se saavutettu millä menetelmällä tahansa, on huomattavia etuja 2D-viljelyyn nähden. Koska elinympäristö on soluille luontaisempi, myös solun piirteet verrattuna 2D-kasvatukseen ovat erilaisia. Taulukossa 1 on verrattuna 2D- ja 3D-solukasvatuksen eroja solujen ympäristön näkökulmasta. (4.)

Taulukko 1. 2D- ja 3D-kasvatettujen solujen ja niiden piirteiden vertailu toisiinsa (4).

Solun piirteet	2D	3D
Morfologia	Litteitä, venyneitä soluja 1-kerroksena	Luonnollinen muoto solusferoidina/aggregaattina
Jakaantuminen	Usein nopeampaa kuin <i>in vivo</i>	Nopeus riippuu solutyypistä ja/tai 3D-soluviljelyastelmasta
Altistuminen mediumille/lääkkeille	Kaikki solut altistuvat samalla tavoin mediumille ja siinä oleville kasvutekijöille/lääkkeille	Ravinteet ja kasvutekijät eivät pääse tunkeutumaan soluaggregaattien ytimeen
Solusyklin vaihe	Sama altistus johtaa samanlaiseen solusykliin	Sferoidit sisältävät jakautuvia, lepovaiheessa olevia, hypoksisia ja nekroottisia soluja
Geeni/proteiiniexpressio	Usein erilainen geeni/proteiiniexpressio verrattuna <i>in vivo</i> -tilanteeseen	Usein samanlainen geeni/proteiiniexpressio kuin oikeissa kudoksissa <i>in vivo</i>
Lääkeherkkyys	Hoito usein tappaa solut ja lääkkeet vaikuttavat hyvin tehokkailta	Solut enemmän resistenttejä hoidoille kuin 2D, joten parempia ennustajia lääkevasteesta <i>in vivo</i>

Kuten taulukosta 1 havaitaan, kasvatustavan valinnalla on merkittäviä vaikutuksia soluihin. 3D-kasvatuksessa solujen morfologia on luonnollisempi 2D-kasvatukseen verrattuna, ja niiden geenien ja proteiinien ilmentymä on lähempänä luontaista ilmentymää. Myös niiden reagointi lääkeaineisiin vastaa enemmän vastetta, joka niillä on myös luontaisessa ympäristössään. Solun vuorovaikutus ympäristöönsä, soluväliaineeseen ja toisiin soluihin on lähempänä luontaista tilannetta. (4.)

Lääketestauksen kannalta 2D-viljelmissä solujen fenotyyppiset ominaisuudet eivät pääse esille samalla tavalla kuin luonnollisessa 3D-ympäristössä. Ne eivät myöskään koeasetelmissä vastaa mikroympäristöltään luontaista kudosta pinnanmuodostukseltaan, jäykkyydeltään, eikä myöskään lääkeaineiden diffuusiokinetiikka toimi kuten *in vivo*. (19.)

3D-solukasvatuksella ja biotulostuksella on siis monia etuja, mutta alkuperäinen jäljiteltävä kudos täytyy kuitenkin ensin 3D-kuvata ja 3D-mallintaa.

5 Kuvantamismenetelmät ja mallinnus

3D-biotulostin vaatii digitaalisen mallin kappaleesta, joka halutaan valmistaa. Ensin tehdään 3D-kuvantaminen halutusta kohteesta ja tästä tehdään 3D-mallinnus tulostimelle, jos ei käytetä valmista tai suunniteltua mallia. Yleinen 3D-kuvantamismenetelmissä käytettävä tekniikka on ottaa useita 2D-viipale poikkileikkauskuvia kohteesta. Näistä yhdistelemällä kappaleesta muodostuu 3D-kuva. Itse 3D-biotulostus tapahtuu kerroksittain. Syntynyt 3D-kuva jaetaan jälleen poikkileikkauskuviksi ja tällaiset leikkeet jaetaan tarkoitukseen sopivan paksuisina kerroksittain biotulostimelle kerros kerrokselta tulostettavaksi. (23 s. 11; 24 s. 21.)

Peruseriaatteena erilaisten 3D-kuvantamismenetelmien pohjalla olevissa fysiikan ilmiöissä, vaikkapa ultraäänen, magneettikentän tai sähkömagneettisen säteilyn käytössä, niiden läpäisemästä kudoksesta mallinnetaan niiden vasteita. Esimerkiksi energia-aalloista tämä tehdään joko suoraan, tai niiden heijasteista, sironnasta tai abroptiosta. Tällaisella tekniikalla lääketieteessä yleisesti käytössä olevilla vakiintuneilla kuvantamismenetelmillä, kuten CT ja MRI, saadaan luotua 3D-kuvia ja näistä voidaan luoda malleja kudoksesta ja sen rakenteesta 3D-biotulostusta varten. (23 s. 11; 24 s. 21.)

CT (Computed Tomography) on tietokonekerroskuvausmenetelmä, jossa käytetään samantapaista menetelmää kuin röntgenissä. CT:ssä röntgensäteitä käytetään poikkileikkauskuvien ottamiseksi ja kohteen ympäri kerätään tietoa säteilyn vaimenemisesta kudoksissa, ja tästä tiedosta muodostetaan 3D-kuva kohteesta. (23 s. 11; 24 s. 21.)

MRI:n (Magnetic Resonance Imaging) etuna puolestaan on esimerkiksi se, että magneettikuvauksessa ei tarvita radioaktiivisia säteilyä eikä radioaktiivisia merkkiaineita, ja pehmytkudoksista saadaan hyvällä kontrastilla olevia kuvia. Tarvittaessa käytettävät MRI-merkkiaineet voivat olla esimerkiksi ferromagneettisia. MRI perustuu vetyatomien elektronien spinien vaihtumiseen magneettikentässä, jolloin niiden lähettämää radiotaajuista signaalia vastaanotetaan 3D-kuvan luomiseksi. Magneettikentän vaihtuessa signaalin vaihe- ja taajuusjakaumaa voidaan lukea ilmaisimilla ja tulkita vety-ydinten sijainti, ja muodostaa kuva tämän perusteella. (23 s. 11; 24 s. 21.)

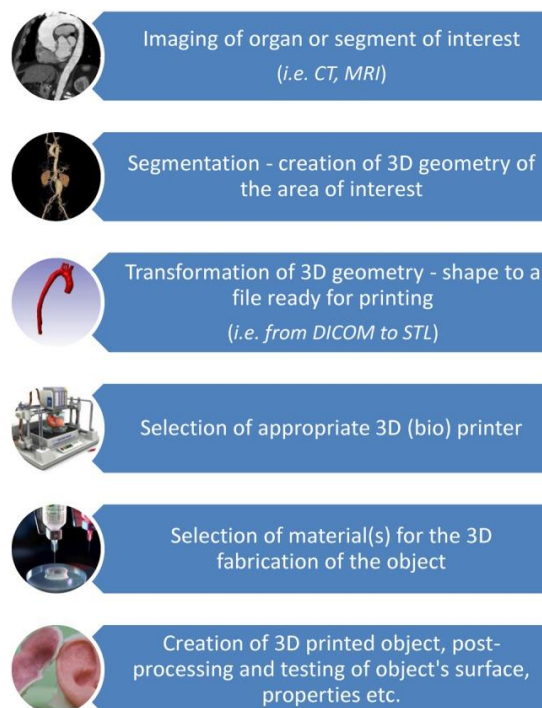
Nämä lääketieteessä käytetyt kuvantamistavat, esimerkiksi CT, MRI ja PET (Positron Emission Tomography) tuottavat 3D-kuvia kaikista kehon rakenteista, joita voidaan

haluta mallintaa 3D-biotulostuksessa (24, s. 21). Saadusta pistepilvidatasta rekonstruoidaan kuvatun rakenteen malli. Tämä voidaan tehdä joko suoraan, tai muokata sitä 3D-ohjelmistolla. Tämän jälkeen malli biotulostetaan. (1, s. 218.)

6 Biotulostusprosessi

6.1 Biotulostusprosessin vaiheet

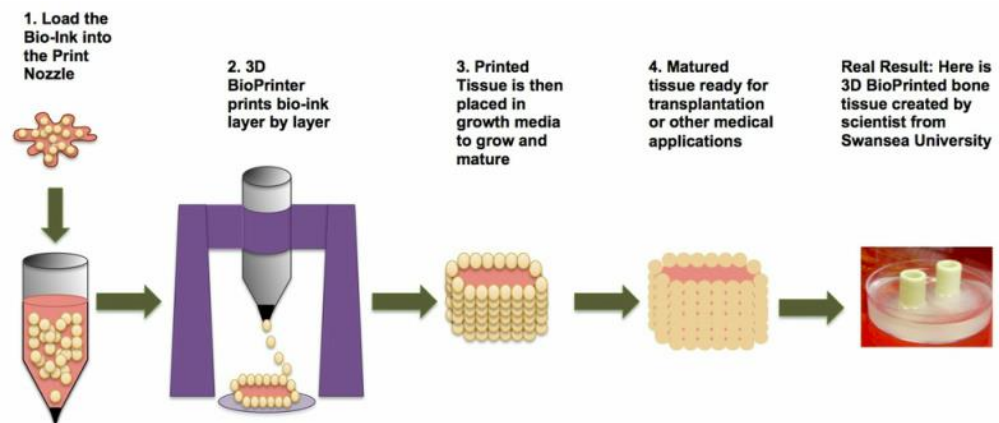
Biotulostusprosessi voidaan jakaa useilla erilaisilla perusteilla monin tavoin erilaisiin vaiheisiin. Yleisesti biotulostus jaetaan kolmeen vaiheeseen, eli esibiotulostukseen, johon kuuluu mm. mallinnus, ja biotulostukseen, jossa tapahtuu varsinainen tulostus sekä jälkibiotulostukseen, joka on tärkeää rakenteen ja solujen selviytymisen kannalta. Yksi tapa on jakaa nämä vaiheet esimerkiksi kuvan 11 mukaan kuuteen eri vaiheeseen.



Kuva 11. Biotulostusprosessin vaiheet: kuvantaminen, segmentointi, biotulostus tiedoston luonti, biotulostimen valinta, biomusteen valinta, varsinainen biotulostus ja tulosteen jälkikäsitelyt ja testaukset (25).

Kuvan 11 mukaisesti 3D-biotulostukseen kuuluvia työvaiheita voidaan yksinkertaistettuna määrittellä esimerkiksi seuraavasti. 3D-kuvannetaan haluttu biotulostuskohde, tai sen haluttu osa, joka halutaan tulostaa. Kuvantaminen voidaan tehdä käyttämällä esimerkiksi CT- tai MRI-kuvantamista, joista saadaan yleensä DICOM-formaatin kuvia. Kohteesta luodaan tulostettava tiedosto esimerkiksi 3D-CAD STL -formaattiin, jota mahdollisesti vielä muokataan, josta lopuksi tehdään halutun paksuisia 2D-poikkileikkauskuvia tulostimelle, ja valitaan tulostukseen sopiva 3D-biotulostin. Tulostusta varten on valittu kudoksen tai kohteen mukaan mallissa käytettävät solut sekä malliin, tulostukseen ja soluille sopiva biomuste. Kohde tulostetaan ja tulosteelle tehdään mahdolliset jälkikäsittelyt ja tarkastetaan tuloste ja sen ominaisuudet. (25.)

Biotulostusprosessissa itse biotulostustapahtuma voidaan jakaa myös neljään vaiheeseen, kuten kuvassa 12:

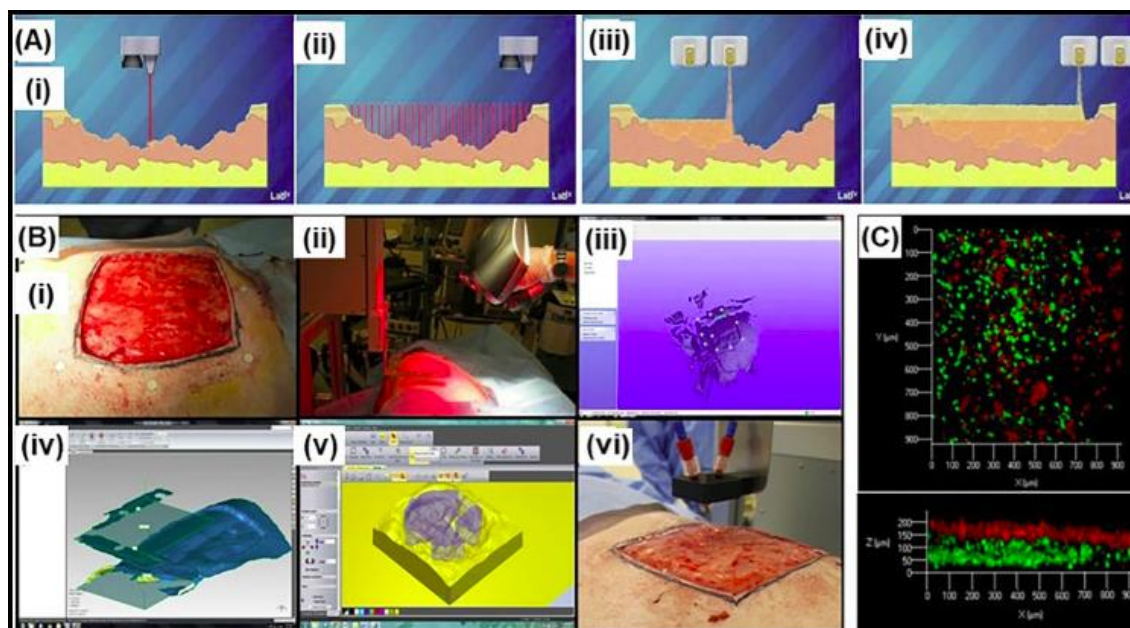


Kuva 12. Biotulostuksen tulostusvaiheet. Tulostimen valmistaminen tulostustapahtumaan biomusteella, itse 3D-biotulostustapahtuma ja valmis biotuloste pidetään sille soveltuvassa ympäristössä, jossa solut voivat lisääntyä ja kasvaa. (26.)

Itse biotulostusvaiheessa, kuten kuvassa 12, valmistettu biomuste siirretään biotulostimeen, ja materiaali tulostetaan esimerkiksi ekstruusiotulostimella kerroksittain. Valmis biotuloste pidetään kasvatusmediumissa, kunnes se on valmis käyttötarkoitukseensa. (26.)

6.2 Esimerkkejä ihokudoksen biotulostusprosessista

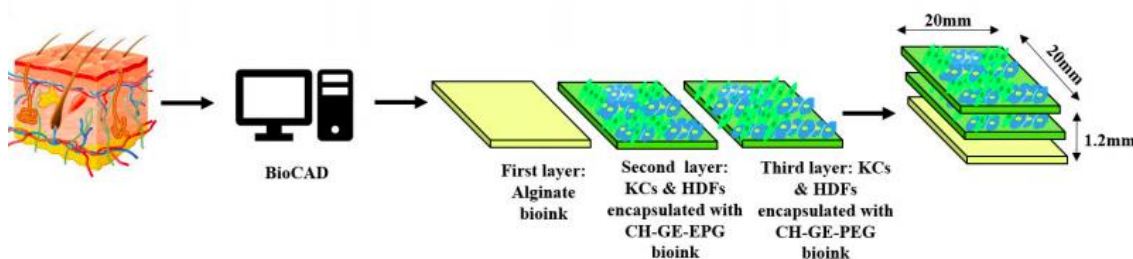
Biotulostus voidaan tehdä myös suoraan potilaaseen. Esimerkiksi palovamman, tai muun trauman vuoksi, suurehkon ihoalueen menettänyt potilas kävisi kuvan 13 mukaisesti ihokudoksen biotulostusprosessissa läpi nämä samat 3D-biotulostuksen perusvaiheet. Kohdan A osissa i – iv ensin skannataan vaurioitunut alue, suunnitellaan siihen uutta kudosta ja lopuksi tulostetaan ihokudos kerroksittain omilla biomusteillaan. (6.)



Kuva 13. Biotulostusprosessi vaurioituneen ihoalueen korvaamiseksi 3D-biotulostetulla ihokudoksella. Kuvan (A) kaavakuva kohdissa (i) – (iv) skannataan ja suunnitellaan vaurioalueen korjaus ja tulostetaan kerroksittain tuhoutuneita ihoalueita vastaava kudosa, dermaaliset fibroblastit (iii) ja epidermaaliset keratinosyytit (iv). Kuvassa (B) kohdassa (i) merkataan vaurioalue ja skannataan se (ii) ja kohdissa (iii) – (v) saadaan, muunnetaan ja käsitellään dataa ja viedään se biotulostimelle, joka tulostaa (vi) ihokudoksen. Kuvassa (C) on konfokaalimikroskopian tuottama kuva, jonka perusteella näkyy vihreällä biotulostetut dermaaliset fibroblastit ja punaisella epidermaaliset keratinosyytit. (6.)

Kuvan 13 mukaisella menetelmällä on onnistuttu korvaamaan trauman tuhoamaa ihokudosta. Ensin kuvannetaan ihon vaurioalue ja suunnitellaan siihen tulostettava rakenne. Sitten biotulostetaan sille ihon dermaalisia fibroblasteja ja epidermaalisia keratinosyyttejä, jotka ovat fibriini ja kollageeni hydrogeelissä. Näin onnistuttiin nopeuttamaan haavan sulkeutumista ja vaurioituneen ihon uudistumista. (6.)

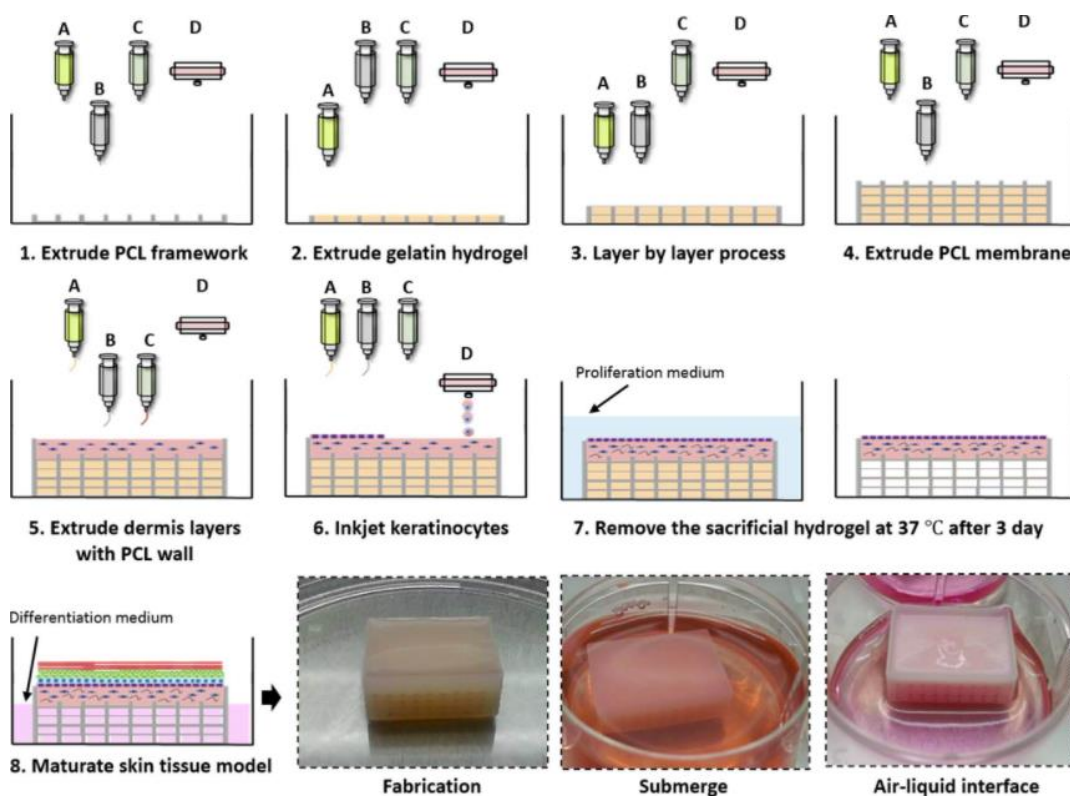
Laboratoriossa valmistettava ihokudos on hyvä esimerkki kerroksittain tehtävästä kudoksen biotulostuksesta, kuten kuvassa 14.



Kuva 14. Ihokudoksen mallinnus ja luonti kerroksittain biotulostamalla, kaavakuva. Ihokudos mallinnetaan, ja muutetaan biotulostimelle sopivaan muotoon. Ihokudos tulostetaan kerroksittain, ensin alginaattikerros ja sitten dermaaliset fibroblastit ja epidermaaliset keratinosyytit sopivine biomusteineen. (27.)

Kuvassa 14 on esitetty, kuinka ihon kerrokset on 3D-ekstruusiotulostettu 20–40 kPa:n paineella kolmessa osassa niille sopivilla biomusteilla, jotka tukevat ihon fibroblastisolujen ja keratinosyyttien kasvua. Näistä ensimmäisessä kerroksessa käytetty alginaattipohjaista biomustetta ja toisessa ja kolmannessa kerroksessa sitosaania (chitosan CH) ja genepiiniä (genepin GE). Solujen eloonjäämisaste oli 93 % huolimatta ristiksidostamisesta, tulostuksen aiheuttamasta stressistä ja altistamisesta fysiologisille olosuhteille seitsemän päivän ajaksi. Tämänkaltaisia ihomalleja voidaan käyttää esimerkiksi eläinkokeiden tilalla tuotetestauksessa, ja esimerkiksi kosmetiikkateollisuudella on tällaiselle käyttöä. Esimerkiksi iho-, ja rustokudoksia on pystytty jo tuloksellisesti siirtämään ihmiseen. (27.)

Laboratoriossa kasvatettua ihokudosta voidaan tulostaa myös esimerkiksi kuvan 15 osoittamalla tavalla neljällä eri tulostuspäällä automatisoidusti kerroksittain. Tulostinpäällä B tulostetaan termoplastista PCL (polycaprolactone) -tukipolymeeriä ja A tulostaa hydrogeeliä, ja näitä tulostetaan ekstruusiolla kerroksittain. Sitten tulostinpää C tulostaa dermaalisen kerroksen myös pursotuksella ja samalla tulostetaan väliseinämää sekä lopuksi pisarasuihkutulostuksella D tulostaa pintaan keratinosyytit. Solujen annetaan lisääntyä ja kolmen päivän kuluttua poistetaan uhrattava materiaali ja annetaan rakenteen valmistua mediumissa. Tässä tulostettu materiaali altistetaan osittain ilmalle, kuten kuvan 15 viimeisestä kaavakuvasta ja oikeanpuolimmaisesta valokuvasta ilmenee, jolloin ihokudos saa ilmalle altistuessaan lopulliset ominaisuutensa. (21.)



*The lower two heads ("A and B" or "B and C") are the heads that were used in alternating fashion.

Kuva 15. Ihokudoksen biotulostamisen vaiheet. Neljällä tulostuspäällä tulostetaan eri materiaaleja, tukipolymeeriä, hydrogeeliä sekä dermaalinen ihokerros että epidermaaliset keratinosyytit. Tukimateriaali poistetaan ja keinoihon annetaan altistua ilmalle, jolloin se saa lopulliset ihoa muistuttavat ominaisuutensa. (21.)

6.3 Biomusteen valmistusprosessi

Biomusteeseen tarvitaan soluille sopiva tukimateriaali, jossa on huomioituna halutun solu- ja kudostyyppien ominaisuudet ja tarpeet ja johon voi olla lisättynä tarvittavia molekyylejä esimerkiksi ko. soluväliaineesta. Nämä suunnitellaan tulostettavan kohdekudostyyppin mukaan. Biomusteeseen lisätään yleensä myös solut ennen tulostusta. (19.)

Mikäli biotulostamalla on tarkoitus tehdä esimerkiksi regeneratiivisen lääketieteen sovelluksia, niin nykyinen kehitys kantasoluteknologiassa mahdollistaa potilaalta otetuista ja hänen omista soluistaan tehdyt materiaalit ja biomusteet. Näin pystytään tuottamaan ihmiskudosta, joka on peräisin potilaalta itseltään. Kantasolut voidaan jakaa toti-, pluri- ja multipotentteihin kantasoluihin. Kantasoluja voidaan nykyään valmistaa myös muuttamalla muita soluja takaisin kantasolumuotoon. Esimerkiksi induoituja pluripotentteja

kantasoluja voidaan valmistaa transkriptiotekijöitä käyttämällä. Näitä soluja ja niiden kehitystä voidaan taas ohjata mm. erilaisten kasvutekijöiden avulla halutunlaisiksi solutyypeiksi. Näitä puolestaan voidaan käyttää edelleen biomusteen valmistukseen. Soluja kasvatetaan ja yhdistetään esimerkiksi hydrogeeliin, joita voi olla esimerkiksi alginaatti tai matrigeeli. Yhdistäminen voidaan myös tehdä muuhun haluttuun biomateriaaliin, jota käytetään biomusteenä. (28, s. 8, 11, 13.)

Seuraavaksi tarkastellaan tarkemmin biomusteita, sekä biomusteita solujen elinympäristön näkökulmasta.

7 Biomusteet ja solut

Biomusteet ovat välttämätön osa onnistuneen 3D-biotulostuksen kannalta. Biomusteissa käytettyjä materiaaleja kutsutaan biomateriaaleiksi, ja niiltä vaaditaan monia ominaisuuksia sekä solujen kannalta että itse biotulostustapahtuman osalta. Myös niiden reologiset ominaisuudet ovat tärkeitä itse tulostuksen kannalta ja tulostuksen jälkeen, jotta materiaali pysyy muodossaan. Viskositeetti vaikuttaa tulostusominaisuuksien lisäksi soluelävyyteen, jos joudutaan kompensoimaan juoksevuuutta esimerkiksi paineen lisäämisellä. (29.)

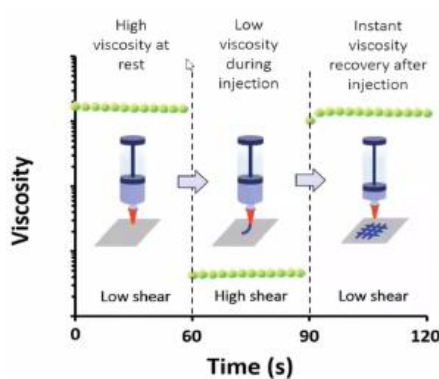
Biomusteissa on tärkeää, että solujen elinkyky säilyy ja niiden tulee pystyä liikkumaan ja jakaantumaan kuten luonnollisessa ympäristössä. Solujen virtauksen- ja paineenkestokyky tulee huomioida. Tulostettavan materiaalin täytyy perinteisessä ekstruusio-3D-biotulostuksessa olla riittävän juoksevaa, jotta se voidaan puristaa ulos erityyppisistä suuttimista. Materiaalin tulostuvuutta voidaan edesauttaa esimerkiksi lämpötilan muutoksilla, jolloin tulostettaessa materiaali voi olla juoksevampaa. Materiaali voi olla myös juoksevampaa ennen tulostamista, ja tulostamisen yhteydessä tapahtuva valon avulla ristisidostaminen taas auttaa materiaalia säilyttämään muotonsa tulostamisen jälkeen. Tällaisilla eri keinoilla voidaan vaikuttaa myös siihen, että esimerkiksi ekstruusioon perustuvassa biotulostuksessa materiaali saadaan järkevällä paineella tulostettua, ja samalla soluihin tulostuksesta kohdistuva stressi pidetään mahdollisimman vähäisenä. (29.)

Tulostaminen voidaan tehdä myös tukimateriaalilla täytetyssä altaassa, jossa tulostaminen tapahtuu erityisen tukimateriaalin sisälle, joka tukee ja kannattelee valmistuvaa tulostetta. Tällöin tulostettavan biomusteen ominaisuudet tulostusvaiheessa voivat olla erilaiset, kuin suoraan alustalle tulostettaessa. Valolla voidaan itse biomusteen lisäksi ristisidostaa myös tällaista tulostuksen aikana käytettävää kannakemateriaalia, jonka sisälle itse tuloste tehdään. Esimerkiksi ekstruusiutulostuksessa tällainen kannatemateriaali voidaan lopuksi poistaa tulostuksen jälkeen ja itse tuloste saadaan kuorittua esiin kannakemateriaalin sisältä. (30.)

Ristisidosten muodostamisessa valolla tulosteen rakenteeseen on biotulostusmenetelmissä myös tärkeä osa, esimerkiksi biomusteen tarkan hallittavuuden kannalta. Valolla voidaan ristisidostaa tukirakenne välittömästi tulostuksen yhteydessä. Tällöin solut eivät painovoiman vuoksi ehdi myöskään painua pohjalle tulostetussa rakenteessa ja tulostettu materiaali säilyttää sille tarkoitetun rakenteen. (29.)

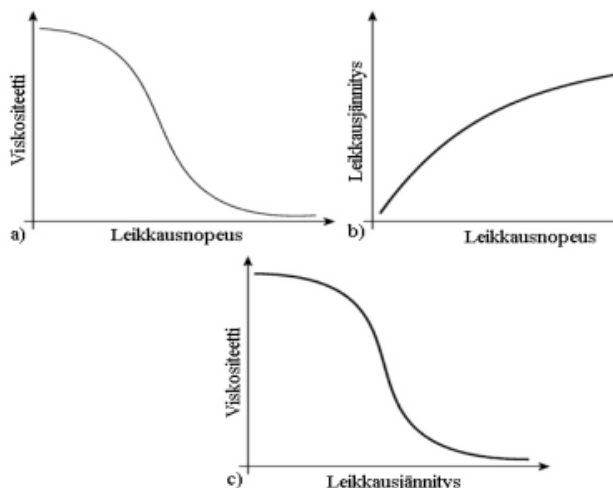
7.1 Biomusteen leikkausohenevuus

Yksi nestemäisten materiaalien ominaisuus, jota voidaan hyödyntää biomusteiden suunnittelussa, ja käyttää hyväksi sekä biomustemateriaalien tulostuksessa että soluihin kohdistuvan stressin vähentämiseen mm. ekstruusiopohjaisessa biotulostuksessa, on leikkausohenevuus (Shear-Thinning). Kuvassa 16 on esitetty leikkausohenevuuden peruseriaate. (31.)



Kuva 16. Viskositeetin muutos leikkausohenevalla materiaalilla injektoidaessa. Alussa levossa ollessa viskositeetti on korkea, mutta viskositeetti laskee tulostettaessa ja palautuu jälleen korkeaksi tulostuksen jälkeen. (31.)

Kuvassa 16 alkutilanteessa nesteen viskositeetti on korkea, kun biomusteeseen ei kohdistu leikkausvoimia. Viskositeetti laskee tulostettaessa, kun nämä voimat vaikuttavat materiaaliin. Tulosteen valmistuttua viskositeetti palautuu, ja tuloste säilyttää muotonsa. (32, s. 1-3.)



Kuva 17. Leikkausohenevan polymeeriliuoksen a) viskositeetti leikkausnopeuden funktiona, b) leikkausjännitys leikkausnopeuden funktiona, c) viskositeetti leikkausjännityksen funktiona. (32, s. 3.)

Kuvassa 17 on esitetty tällaisen ei-newtonilaisen, pseudoplastisen fluidin leikkausjännityksen suhde viskositeettiin ja se, kuinka leikkausnopeus vaikuttaa viskositeettiin ja leikkausjännitykseen. Kuvasta kohdassa a ilmenee, että leikkausnopeutta lisättäessä fluidin viskositeetti laskee. Materiaalissa kohdan b mukaisesti leikkausnopeuden noustessa myös leikkausjännitys lisääntyy. Kun leikkausjännitys kasvaa, kuten kohdassa c, niin leikkausohenevan materiaalin viskositeetti pienenee. Eli fluidia käsiteltäessä sen viskositeetti laskee, ja tästä on hyötyä biotulostuksen kannalta, koska tämä ominaisuus helpottaa tulostamista. Samalla soluihin kohdistuu vähemmän rasitusta tulostettaessa, millä on suotuisa vaikutus soluelävyyteen. (32, s. 1-3.)

7.2 Biomusteiden luokittelu

Biomusteita voidaan luokitella eri perustein. Ne voidaan jakaa esimerkiksi kovakudosten ja pehmytkudosten tulostamisessa käytettyihin biomusteisiin, synteettisiin ja biologisiin, tukirakenteellisiin ja tukirakenteettomiin, tai biohajoaviin ja biohajoamattomiin biomusteisiin. Biomusteissa voidaan käyttää sekä synteettisiä että luontaisia ja luontaisenkaltaisia biomateriaaleja. Synteettisesti valmistetut materiaalit monesti tulostetaan ensin, ja solut yhdistetään materiaalille vasta tulostuksen jälkeen. Tukirakenteellisissa biomusteissa solut ovat monesti esimerkiksi hydrogeelissä. Myös materiaalien kimmomoduulien tulisi vastata luontaista kudosta. (1, s. 221, 222; 33.)

Jos käytetään valmiita, desellularisoituja materiaaleja, niissä saattaa olla antigeenisia ominaisuuksia, jotka aiheuttavat immuunivasteen. Ne myös hajoavat rakenteeltaan nopeammin. Biomusteiden materiaaliksi voidaan tuottaa synteettisiä aineita, tai tuottaa materiaalia esimerkiksi kasvattamalla soluväliaineita, tai käyttää muita kuin eläinperäisiä materiaaleja. Tällaisilla ei-eläinperäisillä biomateriaaleilla vältetään muun muassa se, että materiaalissa olisi antigeenisia ominaisuuksia. Esimerkki tällaisesta materiaalista ja suomalaisesta kehitystyöstä on hydrogeeli, joka perustuu kokonaan selluloosaan. Tällainen on Suomessa UPM:n yhteistyössä yliopistojen kanssa kehittämä nanofibrillaarinen selluloosa, johon voi suoraan lisätä solut, kasvutekijät ja adheesioproteiinit. Tällaisessa biomusteessa on viljelty UPM:n mukaan yli 150:tä eri solutyyppiä. Aina materiaalia ei pystytä tulostamaan, jos se on esimerkiksi liian pehmeää eikä säilytä muotoaan, jolloin materiaalia pitää kehittää. Voidaan joutua tekemään myös kompromisseja esimerkiksi biomusteen tukimateriaalin ominaisuuksissa, ja huomioimaan, että tukirakenne ei ole solujen kasvun tiellä. (29; 33; 34.)

7.3 Biomusteiden solubiologiset lähtökohdat

Ihmiskehossa on varovaisten arvioiden mukaan yli 200 erilaista solutyyppiä. Kaikilla on oma tehtävänsä, ja ne muodostavat yhdessä monimutkaisia kudoksia. Tämä monimuotoisuus aiheuttaa omat haasteensa biotulostukselle, kun pyritään jäljittelemään eri kudoksia. Rakenteeseen tulisi pystyä tulostamaan tarkasti useita erilaisia solutyyppejä ja alkuperäiskudoksen rakenne tulisi pystyä toisintamaan. (33; 35.)

Kuvasta 18 käy ilmi joitain esimerkkejä solun ja soluväliaineen yhteyksistä. Solubiologiset seikat tulee huomioida biomusteita suunniteltaessa ja luontaisen kaltaista toimintaympäristöä valmistettaessa. Muun muassa solun kiinnikekohdat välitilan matriksiin, joihin solu voi tarttua, ja solun liikkuminen, kasvuympäristö ja siinä erilaistuminen tulee huomioida. (28, s. 6-8.)

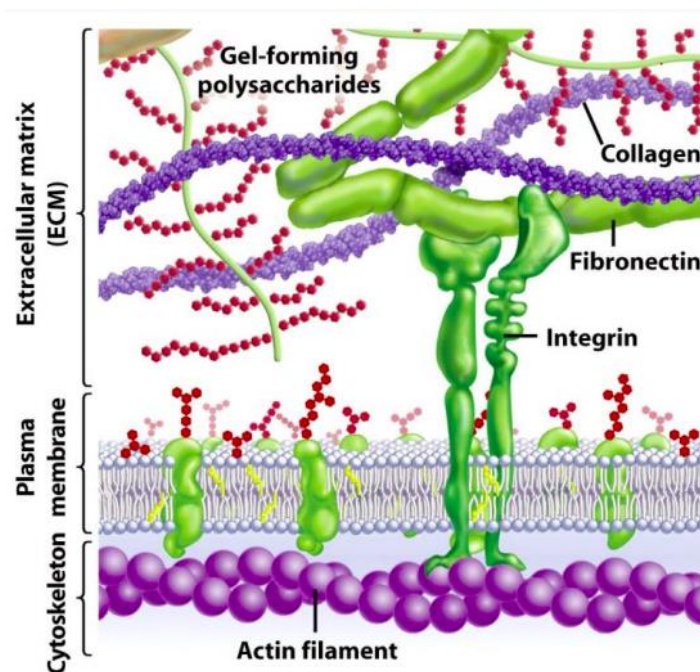


Figure 8-4 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Kuva 18. Periaatekuva solun liittymisestä soluväliaineeseen. Soluväliaine sisältää esimerkiksi rakenneproteiini kollageenia ja fibronectiiniä. Näihin solun oma integriini, joka on liittyneenä solun aktiinifilamenttiin, voi kiinnittyä solukalvonsa lävitse. (28 s. 6.)

Kuvassa 18 on esitetty rajoitetun yksinkertaistetusti muutamia piirteitä solun toimintaympäristöstä. Siinä on kuvattu esimerkiksi solun tukirangasta lähtevä ja solukalvon läpikulkeva integriini ja sen luontainen liittyminen soluväliaineeseen. Soluväliaineessa on muun muassa kollageenia ja fibronectiiniä, joihin solu voi liittyä integriinillä. Esimerkiksi tämä solun kiinnittyminen soluväliaineeseen on huomioitava, jotta solu pystyy biomusteessaakin tarttumaan ympäristöönsä, ja solujen kompleksiset vuorovaikutukset 3D-rakenteessa suhteessa soluväliaineeseen saadaan aikaiseksi. Esimerkiksi solubiologisesta perustutkimuksesta tunnettujen fibronectiinien, laminiinien, kollageenien, hyaluronaanien, proteoglykaanien, glykosaminoglykaanien, elastinomeerien jne. tehtävät ja ominaisuudet on

tunnettava ja otettava huomioon. Biomusteen on oltava kulloiseenkin tilanteeseen ja käyttötarkoitukseen tarkoituksenmukainen ja sopiva, ja sen ominaisuudet ja tehtävät tukea solua sen uudessa elinympäristössä tulee toteutua. Esimerkiksi organoidien biotulostuksessa onkin haasteena saada tämä alkuperäiskudoksen kompleksinen rakenne ja monipuolinen solukanta jäljennettyä elinmalliin, kun kudosten toiminnallisuus tulisi saada vastaamaan luontaista kudosta mahdollisimman tarkasti. (4; 28, s. 6 – 7.)

7.4 Biomustemateriaalit ja itsekorjautuva hydrogeeli biomusteena

Biomusteiden pohjaksi on kehitetty käytettäväksi paljon erilaisia biomateriaaleja, joilla on omat etunsa ja haittansa. Esimerkiksi luonnolliset polymeerit hajoavat helposti, mutta toisaalta ne ovat solujen kannalta hyviä materiaaleja ja bioaktiivisia ja tukevat solujen kasvua. Synteettiset polymeerit taas ovat inerttejä, mutta vahvoja materiaaleja. Taulukossa 2 on lueteltu yleisimpiä biomusteissa käytettäviä materiaaleja ja kuvattu niiden etuja ja haittoja. (10.)

Kuten taulukosta 2 havaitaan, niin biomustekäytössä on esimerkiksi soluista puhdistettua soluväliainetta, joka on suoraan luonnollinen ja hyvä kasvu ympäristö soluille ja sitä voidaan tehdä kudokohtaisesti, ja soluelävyys on korkea. Toisaalta sen alkuperäinen rakenne menetetään, ja kasvu ympäristö ei ole toistettavuuden kannalta aina täysin samanlainen, mikä on tutkimuksen näkökannalta huono asia. Myös alginaatti on hyvin yleinen biomustemateriaali. (10.)

Taulukko 2. Yleisimpiä biomustemateriaaleja ja niiden etuja ja haittoja (10).

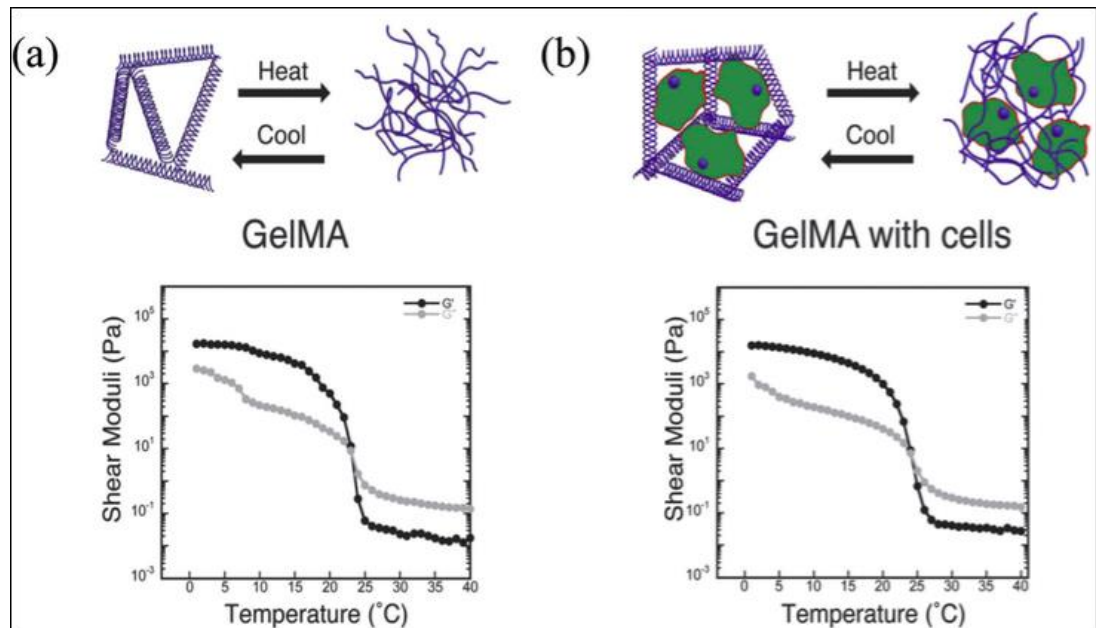
Bioink Material	Overview	Advantage	Disadvantage
Agarose	Polysaccharide extracted from seaweed	Non-toxic crosslinking High stability	Not degradable; Poor cell adhesion
Alginate	Naturally-derived biopolymer from brown algae	Mild crosslinking conditions (Ca ²⁺) Rapid gelation High biocompatibility	Slow degradation kinetics; Poor cell adhesion
Chitosan	Polysaccharide obtained from the outer skeleton of shellfish (e.g. shrimp). Non-animal derived chitosan can be obtained from fungal fermentation.	High biocompatibility Antibacterial properties	Slow gelation rate
Collagen	Primary structural protein found in skin and other connective tissues	High biological relevance	Acid-soluble
Decellularized ECM	Isolated extracellular matrix of a tissue from inhabiting native cells	High biological relevance Tissue-specific High cell survival	Undefined and inconsistent; Loss of native ECM organization; Low stability
Fibrin/Fibrinogen	Insoluble protein formed during blood clotting	High biological relevance Rapid gelation	Limited printability
Gelatin	Protein substance derived from partial hydrolysis of collagen	High biocompatibility High water solubility Thermally reversible gelation	Poor shape fidelity; Limited rigidity
Graphene	Carbon-based material that can be viewed as a one atom thick sheet of graphite	Flexible Electrically-conductive	Low biological relevance
Hyaluronic Acid (HA)	Non-sulfated glycosaminoglycan distributed widely throughout connective, epithelial, and neural tissues.	Fast gelation Promotes cell proliferation	Poor stability
Hydroxyapatite	Naturally-occurring mineral form of calcium apatite found in teeth and bones	High strength and rigidity	Low printability; Limited tissue specificity
PCL/PLA/PLGA	Biodegradable, thermoplastic polymers and/or copolymers	High strength and rigidity	Low cell adhesion and proliferation
Pluronic® F127	Poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) block copolymer	Printable at room temperatures Shear thinning material	Not suitable for long-term cell culture

Esimerkiksi taulukossa 2 mainituista materiaaleista hyaluronihappo on materiaalina nopea gelatinoitumaan, ja tukee solujen nopeaa lisääntymistä, mutta on epävakaata (10).

Taulukossa 2 mainittua gelatiinia käytetään paljon biomusteissa ja sitä saadaan valmistettua osittaisella hydrolyysillä kollageenista. Se on hyvin bioyhteensopivaa ja hyvin vesiliukoista. Sitä käytetään mm. hydrogeelien valmistuksessa, jossa korkea vesipitoisuus edistää solujen elinkelpoisuutta, ja hydrogeelit voivatkin imeä vettä moninkertaisesti oman massansa verran. Gelatiini on kollageeniin verrattuna myös antigeenistä. Gelatiinista valmistetaan muun muassa GelMa-pohjaisia hydrogeelejä. GelMa sisältää peptidimotiiveja, jotka mahdollistavat solujen lisääntymisen ja liikkumisen rakenteessa. Kuten taulukosta 2 ilmenee, gelatiini on lämpötilariippuvaisesti reversiibelisti gelatinoituva.

Tämä palautuminen on hyödyllinen ominaisuus biotulostuksen kannalta, kun tulostettaessa lämmitettynä materiaalin tulostusominaisuudet paranevat. Jälleen jäähtyessään GelMa muodostaa taas vahvan geelin. (10; 29.)

Kuvasta 19 selviää GelMan gelatinoitumisen käytös lämpötilariippuvaisena. Siinä on kuvattuna GelMan liukukertoimen eli liukumoduulin suhde lämpötilaan (a) puhtaalla GelMalla sekä kun (b) mukana on soluja. (29.)



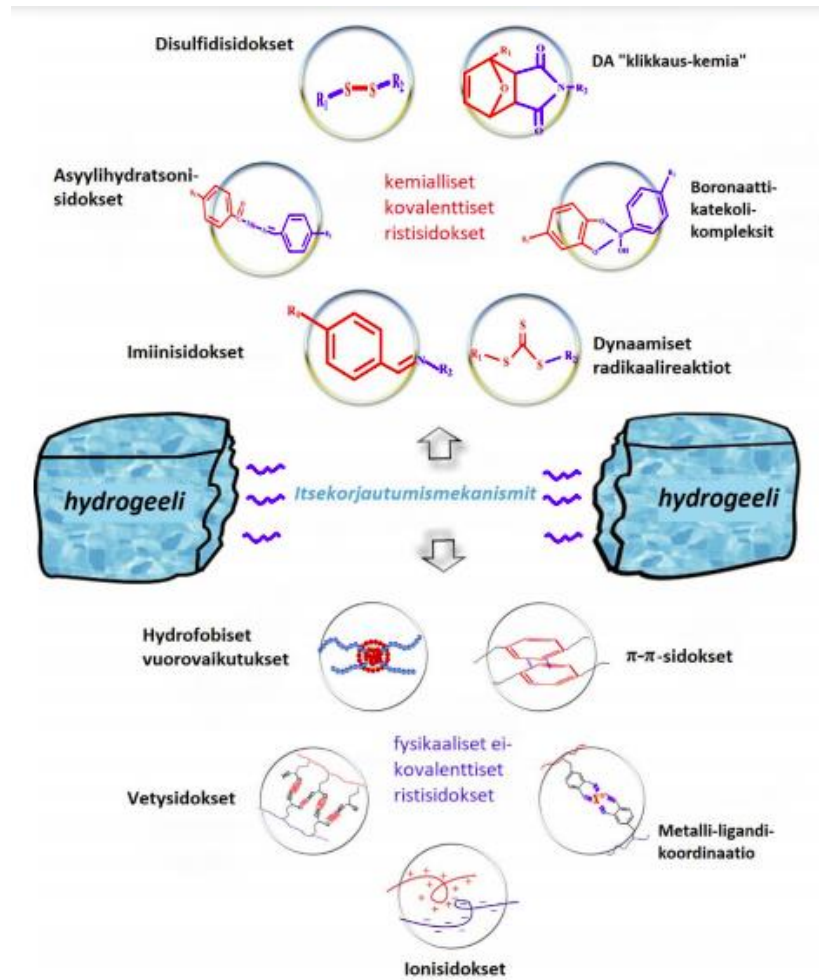
Kuva 19. GelMan gelatoinen lämpötilan funktiona. G' = leikkaus joustavuus ja G'' = häviö moduuli. Kohdassa a) mittaus on suoritettu ilman soluja ja b) kohdassa soluina ovat fibroblastit. (29.)

Biotulostuksen kannalta on saavutettu myös hyödyllinen ominaisuus lisäämällä metakryloyyli-substituenttiryhmiä gelatiiniin, jolloin gelatiinista on saatu valon avulla ristisidostettavaa. Tällöin biotulostuksessa voidaan valolla määrittää tarkasti, missä vaiheessa itse tulostusprosessia halutaan, että materiaaliin muodostuu valon vaikutuksesta ristisidoksia. (29.)

Itse biomateriaalivalinta vaikuttaa hydrogeelin ominaisuuksiin, mutta myös sillä on suuri merkitys, kuinka hydrogeeli on ristisilloitettu. Ristisidoksia voi olla sekä palautuvia että palautumattomia. Nämä voivat olla esimerkiksi lämpötilariippuvaisia, tai niitä voidaan muodostaa valoreaktioilla. (29; 36, s. 5, 18.)

Itsekorjautuvat hydrogeelit antavat soluille ja 3D-biotulostukselle hyvän pohjan, kun ne mukautuvat mekaanisessa tulostuksessa tapahtuviin muutoksiin. Kun materiaalia tulos-tetaan, tapahtuu dynaamisia muutoksia, joiden aikana purkautuu ja muodostuu sidoksia. Tällaisia palautuvia ristisidoksia nähdään kuvasta 20, ja ne ovat hydrogeelien toimivuu-den kannalta olennaisia. Myös useamman eri sidostavan yhdistämisellä voidaan paran-taa biomusteen ominaisuuksia. (29; 36, s. 6, 13.)

Itsekorjautuvan hydrogeelin itsekorjausmekanismit voidaan jakaa kahteen osaan kuten kuvassa 20, kemiallisiin kovalenttisiin ristisidoksiin ja fysikaalisiin ei-kovalenttisiin risti-sidoksiin. Kemiallisiin kovalenttisiin ristisidoksiin lukeutuvat muun muassa disulfididok-set ja imiinisidokset. Esimerkiksi dynaamisia kovalenttisiä imiinisidoksia on käytetty na-nokomposiittibiomusteessa palautuvina sidoksina, nanopartikkelien ja polysakkaridien välissä. Ne lisäsivät mekaanista vakautta verrattuna ioniristisilloitukseen. Fysikaalisiin ei-kovalenttisiin ristisidoksiin puolestaan lukeutuvat muun muassa π - π -sidokset, vetysidok-set, hydrofobiset vuorovaikutukset ja ionisidokset. Hydrogeelien itsekorjautuvuus lisää soluelävyyttä. (36, s. 7 – 12; 29.)



Kuva 20. Itsekorjautumismekanismeja hydrogeelissä. Hydrogeelien korjausmekanismit tapahtuvat kahdella eri ristidoksin muodostumismekanismilla, joko kemiallisilla kovalenttisilla tai fysikaalisilla ei-kovalenttisilla ristidoksilla. (36, s. 9.)

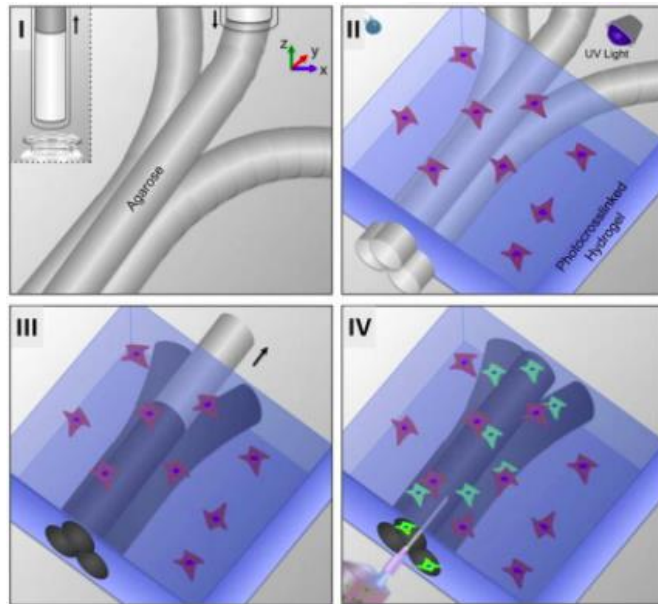
8 Organoidit ja Body-on-Chip-menetelmä

Ihmiselimiä jäljitteleviä organoideja voidaan valmistaa biotulostamalla. Organoidi voi olla erityisellä mikrofluidistisella alustalla, joka on voitu myös esimerkiksi tulostaa. Tällaisia Organ-on-Chip-alustoja voidaan suunnitella ja valmistaa erilaisia erilaisiin käyttötarkoituksiin eri solutyypeille. Näin niillä voidaan ottaa eri solutyypin erityistarpeet huomioon. Esimerkkejä tällaisten alustojen suunnittelusta ja rakenteesta on kuvassa 8. Lisäksi haluttaessa pystytään reaaliaikaisesti muuttamaan ja monitoroimaan virtaavan nesteen ravinnepitoisuuksia, pH:ta, kasvatusmediumia jne. Myös nestevirtaukset ja sen soluihin

kohdistama mekaaninen stimulointi, paine, virtaus sekä nesteen viskositeetti, vaikuttavat soluihin toisin kuin 2D-soluviljelyssä. (2.)

Biotulostus tuo myös uudenlaisia haasteita, esimerkiksi solujen aineenvaihdunnan tehokkaan takaamisen osalta. Tulostetun kappaleen kokoluokan kasvaessa myös solut tulostetun kudoksen sisällä keskiosissa tarvitsevat ravinteet, hapen ja kuona-aineen poiston jne. toimiakseen normaalisti. Diffuusiolla näiden varastoitumista tapahtuu vain noin muutaman sadan mikronin paksuudelta. (1, s. 219.)

Tähän haasteeseen on vastattu biotulostamalla normaalikudoksen verisuonitusta vastaava ja verenkiertoa jäljittelevä kanavointi mukaan sisälle tulostettavaan kudokseen, kuten kuvassa 21. Tämän vaskulaarimallin toteuttamiseksi voidaan käyttää erilaisia tulostusmenetelmiä. Kappaleen sisään voidaan esimerkiksi tulostaa rakenteen sekaan myöhemmin poistettava erityinen tähän tarkoitukseen suunniteltu biomuste (sacrificial ink). Se voi olla esimerkiksi agarosipohjainen, ja se tulostetaan kanaviston paikalle, joka on tarkoitus valmistaa. Sen poisto voidaan tehdä jälkikäteen esimerkiksi liuottimella. Voidaan käyttää myös materiaalia, joka muuttuu nesteeksi toisessa lämpötilassa, ja se voidaan poistaa lämpötilaa vaihdettaessa, jättäen jäljelle kanavan. Tällaisia uhrattavia materiaaleja, jotka voidaan esimerkiksi huuhtoa pois valmiista tulosteesta ja kudoksesta, voidaan käyttää kanaviston luontiin. Jäljelle jää onkalo, joka voi jäljitellä ja vastata esimerkiksi 3D-mallinnetun kudoksen verisuonitusta. Sitä voidaan käyttää kasvatusmediumin kierrätykseen pumpulla, ja ravinneliuos takaa keskiosan solujen hapen, ravinteiden jne. saannin ja soluelävyyden. Tämä onkalo voidaan myös halutessa pinnoittaa ajaen sen läpi perfuusiolla verisuonen seinämän endoteelisoluja. Ne voivat käyttää sitä kasvualustanaan ja vastata kudoksmallin verisuoniston endoteelisolukon verhoamaa sisäkalvoa. (6; 37, s. 2202 – 2203; 36, s. 17; 28, s. 33 – 34.)

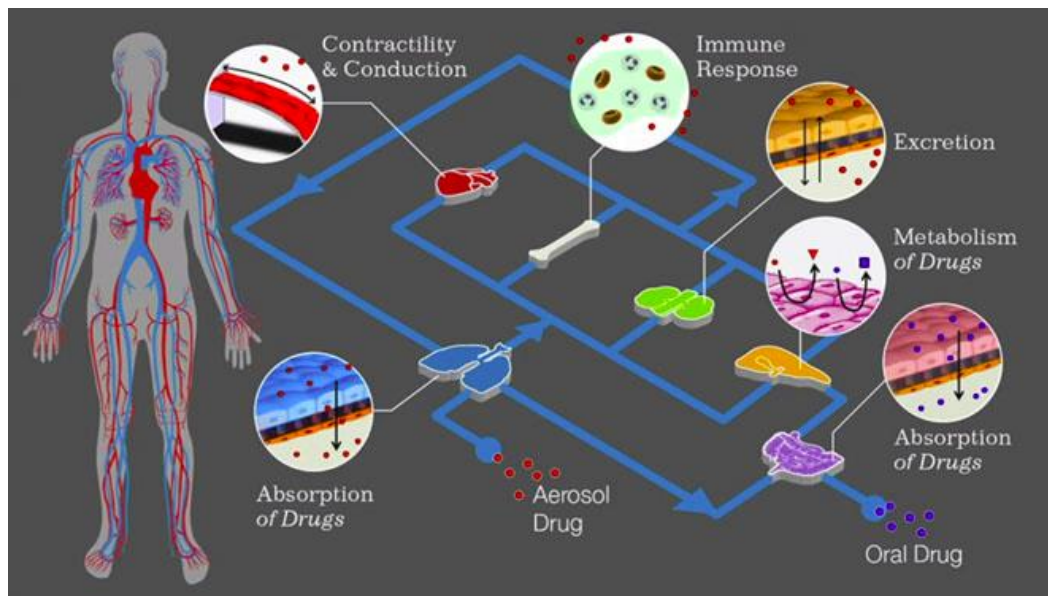


Kuva 21. Yksi tapa kanaviston luomiseksi biotulosteeseen. Kohta 1: tulostetaan halutut kanavat, esimerkiksi agarosipohjaisesti. Kohta 2: valetaan biomuste, esimerkiksi hydrogeeli, joka voidaan ristisidostaa esimerkiksi valolla. Kohta 3: poistetaan alussa tulostettu tukirakenne, jolloin varsinaiseen biotulosterakenteeseen jää kanavisto. Kohta 4: kanavisto voidaan halutessa pinnoittaa perfuusiolla esimerkiksi verisuonten endoteelisoluilla. (37, s. 2203.)

Tällainen Organ-on-Chip-tekniikan elinmalli vastaa paremmin alkuperäistä kudosta, kuin perinteiset soluviljelmät. Se mahdollistaa myös monimutkaisia koejärjestelyitä ja mallin fysiologisten vasteiden seurannan reaaliaikaisesti esimerkiksi erilaisilla sensoreilla ja kuvantamisella, kudoksen mallintaessa alkuperäisen kudoksen toimintaa ja mekanismeja. Organoidia on mahdollista lisäksi samalla stimuloida, esimerkiksi lääkeaineilla mikrofluidistiikan avulla. Näin kudoksessa saadaan aikaiseksi vasteita, joita voidaan reaaliaikaisesti monitoroida. Näitä elinmalleja voidaan käyttää tutkimuksessa ja lääketestauksessa ja esimerkiksi toksikologisissa testauksissa jne. Tämä voidaan tehdä tavalla, joka ei onnistu perinteisellä 2D-soluviljelyllä. Tällaisilla organoideilla ja kudosmalleilla voidaan saavuttaa tarkemmat tulokset kudoksen lääkevasteiden ja lääkeaineen toksisuuden osalta, kuin perinteisessä 2D-soluviljelyssä. (2; 19.)

Yhdistelemällä useampia tällaisia organoideja toisiinsa monikudosmalleiksi päästään mallintamaan vielä paremmin ihmiskehon toimintaa. Tämä ihmiskehon mallintaminen voidaan tehdä Body-on-Chip-tekniikalla, jossa useampia organoideja on fluidikiertonsa

avulla liitetty yhteen kokonaisuudeksi, kuten kuvassa 22. Mikrofluidistiikalla ravinteet, mahdolliset lääkeaineet, aineenvaihduntatuotteet jne. kulkeutuvat kaikille eri organoideille, vastaten lähemmin dynaamista tilannetta, joka vallitsee ihmiskehossa. Mikrofluidistiikan ja analytiikan avulla tällaisella monikudosmallinnuksella voidaan tehdä myös merkittävästi enemmän erilaisia kokeita, kuin perinteisessä soluviljelyssä. Esimerkiksi metaboliittien ja erilaisten markkereiden liikkumista voidaan seurata. Lääketieteellisessä tutkimuskentässä yleisesti paljon tehtävässä syöpätutkimuksessa voidaan mallintaa myös syöpäkudosta, sen leviämistä ja vaikutusta ympäristöönsä verenkierron avulla. (18.)



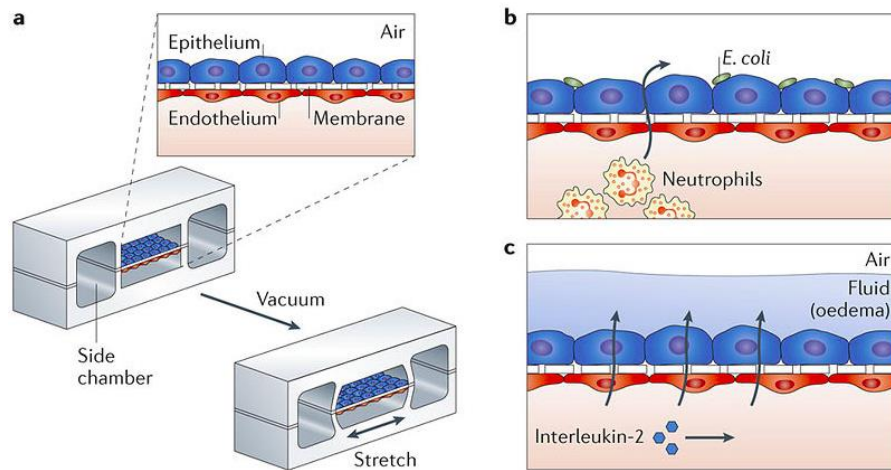
Kuva 22. Body-on-Chip-järjestelmän kaavakuva, jossa on yhdistetty eri elinmalleja toisiinsa. Lääkkeenantoa simuloidaan suun ja keuhkojen kautta, ja sen aiheuttamia vasteita tarkkaillaan organoideissa jotka simuloivat elimistöä ja sen eri osia. Absorbtion jälkeen lääkeaineet vaikuttavat mikrofluidistisen kierron kautta esimerkiksi maksan metaboliaan. Ne voivat vaikuttaa myös kardioperäisiin lihassoluihin ja immuunivasteeseen, sekä munuaisten toimintaan ja eritykseen. (18.)

Kuvassa 22 on esitettyä tällaisen Body-on-Chip-menetelmän toimintaperiaate. Periaatekuvassa eri elimiä simuloivat kasvatusalustoilla olevat organoidit reagoivat kasvatetun kudoksen ominaisuuksien mukaan lääkeaineeseen. Kuvassa tarkastellaan suun tai keuhkojen kautta annettua lääkeainetta, ja koeasetelmaan mukaan valittujen elimistön elinten vastetta lääkeaineeseen. Ruoansulatuskanavan kautta annettu lääke absorboituu elimistöön, ja tämän jälkeen voidaan mallintaa sen metaboliaa esimerkiksi maksan organoidimallilla. Tämän lisäksi voidaan seurata esimerkiksi immuunivastetta, ja

esimerkiksi sydänlihaksen toimintaa sekä lääkaineen erittymistä elimistöstä munuaisissa. Tässä periaatteellisessa kaavakuvamallissa voidaan samanaikaisesti seurata myös hengityksen kautta annettavaa lääkitystä. Tämä kaikki tapahtuu in vitro -tyyppisesti, mutta ollaan lähempänä in vivo -koeasetelmaa. Samalla pystytään tarkkailemaan useita vasteita, esimerkiksi fluoresenssimikroskopiolla ja erilaisilla reaaliaikaisilla testeillä ja seurannoilla. Organoideja voidaan siis stimuloida ja samalla kontrolloida useita eri muuttujia koeasetelmassa samanaikaisesti, seuraten lisäksi aiheutuneita vaikutuksia. (18.)

8.1 Organ-on-Chip-esimerkkitutkimus

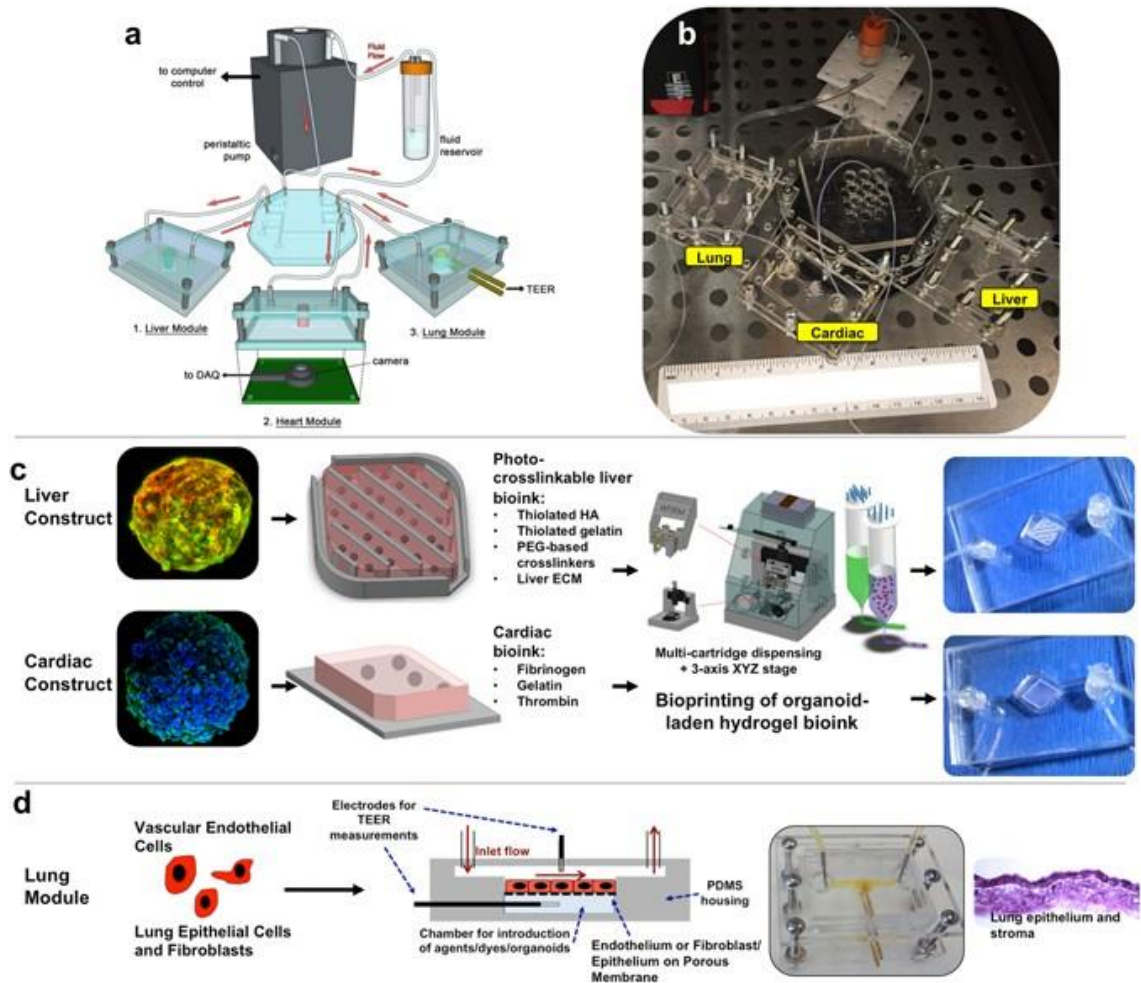
Organoideja voidaan tehdä hyvin monenlaisia eri tarkoituksiin. Esimerkiksi keuhko-organoidilla, jossa hyödynnetään joustavaa huokoista kalvoa, voidaan jäljitellä hengityksen rytmiiikkaa. Siinä on molemmin puolin viljeltynä soluja, ja mikrofluidistiikkaa yhdistettynä kaasunvaihtoon. Toisella puolella kalvoa jäljitellään keuhkojen ilmatilaa ja toisella puolella alveoli kapillaarien verenkiertoa. Hengityksen rytmiiikka, joka jää puuttumaan perinteisistä soluviljelyistä, vaikuttaa kineettisiin ominaisuuksiin kokeissa. Tällaisella mallilla tutkittiin mm. interleukiini-2-syöpälääkettä ja sen huomattiin vaikuttavan keuhkopöhön syntyyn. Tämän koejärjestelyn keuhkoja jäljittelevillä mekaanisilla ominaisuuksilla huomattiin olevan suuri merkitys nesteen kertymiseen kuten kuvan 23 kohdassa c. Suurilla interleukiini-2-annoksilla seurasi verisuonivuoto aiheuttaen keuhkopöhön, jonka muodostumisessa koejärjestelyn mekaanisilla voimilla oli huomattava merkitys. (18.)



Kuva 23. Keuhko-organoidi, jossa on kalvolla soluja molemmin puolin. Sen toisella puolella jäljitellään keuhkojen ilmatilaa ja toisella verenkiertoa, ja mallilla voidaan jäljitellä keuhkojen hengitysrytmiikkaa. Kohdassa c on kuvattu, kuinka interleukiini-2 aiheutti keuhkopöhön, jossa organoidin mekaanisella toiminnalla oli merkittävä rooli nesteen siirtymisessä. (18.)

8.2 Body-on-Chip-esimerkkitutkimus

Esimerkkinä siitä minkälaisia hyötyjä 3D-biotulostamalla valmistettuja organoideja ja niiden pohjalta rakennetulla Body-on-Chip-menetelmää käyttämällä voi saada, on kuvan 24 syöpälääketutkimus. Siinä kolme eri organoidia, keuhko-, maksa- ja sydänorganoidit, oli biotulostettu ja integroitu fluidikierrolla monikudosmalleiksi. (19.)



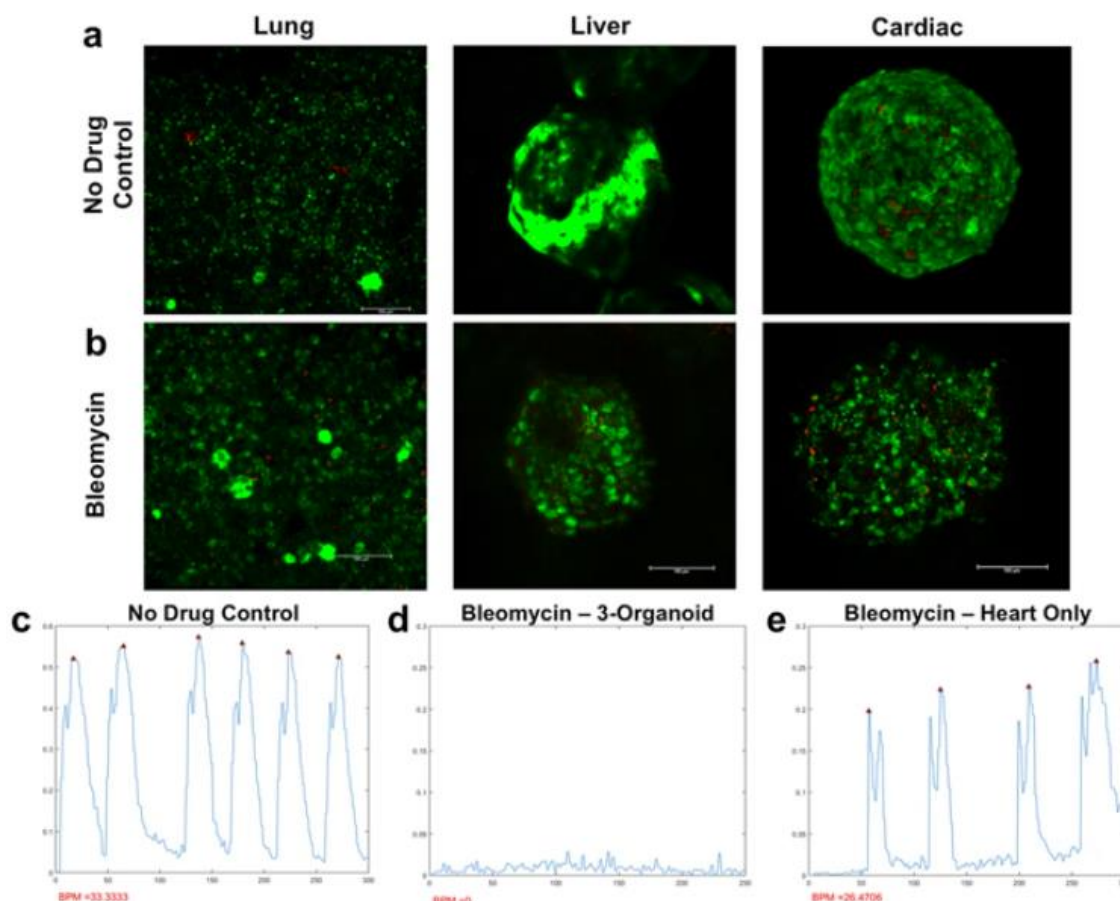
Kuva 24. Kolmen organoidin koejärjestely, jolla testattiin muun muassa bleomysiinin haittavaikutuksia keuhkoille. Kohdassa a ja b on yhdistetty toisiinsa 3D-biotulostetut keuhko-, sydän-, ja maksaorganoidit. Vasemmalla on kaavakuva ja oikealla valokuva koejärjestelystä. Kuvan kohdassa c on kuvat maksa- ja sydänorganoideista ja kaavakuvat alustoista sekä niiden valmistus materiaaleineen ja valokuvat valmiista Organ-on-Chip-malleista. Kohdassa d on kuvattuna keuhko-organoidin sisältämät solut, kaavakuva ja valokuva alustasta sekä kuva kudoksesta. (19.)

Tutkimuksessa seurattiin ja tutkittiin mm. syöpälääke bleomysiinin haittavaikutuksia keuhkoille. Sen tiedetään olevan niille toksinen ja sen on todettu monissa muissakin kokeissa aiheuttavan tulehdusta ja keuhkofibroosia, jossa keuhkokudos arpeutuu. Maksa- ja sydänorganoidien odotettiin pysyvän vahingoittumattomina. Kokeissa saatiin kuitenkin havainto, joka voitiin saavuttaa ainoastaan tällaista monikudosmallia hyödyntävää koejärjestelyä käyttäen. (19.)

Bleomysiinin ei aikaisemmin tiedetty aiheuttavan kardiotoksisuutta. Keuhko-organoidi alkoi kuitenkin bleomysiinille altistuttuaan erittää tulehduskellista interleukiini-1 β :aa. Tämä

puolestaan on kardiotoksista, ja vaikutti haitallisesti sydänorganoidiin. Tätä vaikutusta ei olisi havaittu, mikäli olisi testattu bleomysiinin vaikutusta ainoastaan esimerkiksi erikseen vain keuhko- ja sydänorganoidiin. Keuhko-organoidin interleukiinin tuotanto olisi voinut jäädä huomaamatta ja silloin sen vaikutus sydänorganoidiin olisi siis jäänyt havaitsematta. (19.)

Kuvassa 25 on kuvattuna bleomysiinikokeen koeasetelman tuloksia, ja kolmen eri koeasetelman kardioperäisten organoidien syke kokeen yhdeksäntenä päivänä. Kuvan kohdista a ja b huomataan, että kuolleita soluja on suhteellisen vähän. Sydänorganoidin rakenne on hieman hajaantunut, kun se on altistunut bleomysiinille. Siten se on samalla altistunut keuhko-organoidin tulehdustilan kautta myös kardiotoksiselle interleukiini-1 β :lle. Kohdissa c, d ja e on tarkasteltu kardio-organoidin sykkeen toimintaa. Kohdassa c syke on kardioperäisessä organoidissa kontrollikokeessa ilman bleomysiiniä normaali. Kohdassa d koeasetelma on sama kuin kontrolli c, mutta organoidit on altistettu bleomysiinille. Kardioperäisten organoidien syke on siinä lakannut kokonaan. Kohdassa e on altistettu pelkkä sydänorganoidi bleomysiinille, ja syke säilyi normaalina. Tämä viittaa siihen, että toksisuuden lähde on koeasetelman muissa organoideissa. Tutkimuksessa keuhko-organoidin havaittiinkin tuottavan kardiosytotoksiseksi tiedettyä interleukiini-1 β :aa. (19.)



Kuva 25. Bleomysiini-syöpälääkkeen vaikutus 3D-tulostettuihin keuhko-, maksa-, ja sydänorganoideihin Body-on-Chip-koejärjestelyssä. Kohdissa a ja b on kuvattuna organoidit kontrollissa ja bleomysiinin vaikutuksessa. Kuvan kohdassa c – e on esitettyä sydänorganoidin syke. Kohdan c kontrollissa syke on normaali ja kohdan e bleomysiinin kardioalvistuksessa näkyy, että lääkeaine ei itsessään lopettanut kardiosolujen sykettä. Kohdassa d sen sijaan näkyy, että sydänorganoidin syke on lakannut kokonaan bleomysiinin saadessa keuhko-organoidin tuottamaan tulehduksellista interleukiini-1 β :aa, joka on kardiotoksinen ja jolle sydänorganoidi altistui mikrofluidistiikan kautta kokeen monielinmallinnuksen aikana. (19.)

Tässä esimerkissä on huomionarvoista se, että kardiosytotoksiseksi tiedetyn interleukiini-1 β :n löytöä ei olisi välttämättä tehty ilman monikudosmallinnettua mikrofluidistiikalla integroitua organoidien yhdistelmää, jossa jäljitellään elinten luontaista tilaa ja elinten yhteistoimintaa ihmiskehossa Body-on-Chip-tekniikalla (19).

9 Yhteenveto ja johtopäätökset

Biokonvergenssin ansiosta on saatu aikaan 3D-biotulostusteknologiaa ja erilaisia biomusteita biotulostuskäyttöön. Tämä on ollut mahdollista eri tieteenhaarojen, tutkimusalojen ja insinööritieteiden yhteistyön ansiosta. Vaikka siihen on matkaa, että saataisiin esimerkiksi elinsiirteitä tulostettua, niin edistysaskeleita on otettu ja 3D-biotulostamalla on mm. pystytty esimerkiksi nopeuttamaan vaurioituneen ihokudoksen paranemista. Suomessa on saatu läpimurto esimerkiksi sarveiskalvon tulostuksessa.

3D-biotulostusteknologioita on kehitetty monia eri tarpeisiin, ja niillä voidaan toteuttaa erityyppisiä kudostulosteita, ja niillä on saavutettu mahdollisuus tulostaa onnistuneesti luontaisia kasvuympäristöjä soluille. 3D-kasvuympäristöön siirtymällä on ollut selkeä etu perinteiseen 2D-soluviljelyyn verrattuna, ja sillä voidaan saavuttaa tuloksia, joita ei 2D-ympäristössä saataisi. Biotulostus on osoittautunut lupaavaksi teknologiaksi, kun on saatu aikaiseksi elinmalleja ja kudoksia, joita ei aikaisemmin ole pystytty valmistamaan. Tämä saadaan biotulostusteknologialla tehtyä myös tutkimuksen kannalta tärkeällä toistettavuudella.

Biomusteiden kehityksellä ja niiden pohjana olevilla uusilla biomateriaaleilla on ollut tässä teknologian kehityksessä myös erityisen tärkeä rooli. Biomusteita on paljon erilaisia eri biomateriaaleista, ja niillä voidaan huomioida erityyppisten kudosten tarpeet ja solujen luontainen elinympäristö. Mitä monipuolisemmin ja tarkemmin pystytään tulevaisuudessa jäljentämään elävän kudoksen ominaisuuksia 3D-biotulostamalla, sitä paremmin saadaan jäljennettyä kudoksen funktionaalisuus.

Biotulostusteknologiaa on voitu hyödyntää myös esimerkiksi ihmiskehon elinten mallintamisessa organoidien ja Organ-on-Chip-teknologian kehityksessä, ja näillä organoideilla on voitu tehdä uudenlaista tutkimusta. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa ihmiskehon fysiologiaa jäljittelevällä mekaanisella keuhko-organoidimallin toiminnalla oli merkittävä osuus keuhkopöhhön johtaneiden mekanismien mallintamisessa ja lääkeaineen mekanismien selvityksessä. Tässä oli merkittävä rooli itse Organ-on-Chip-teknologialla, joka mahdollisti toteutettavan koeasetelman.

Organ-on-Chip-teknologia mahdollistaa myös Body-on-Chip-teknologian käyttämisen, jolla on voitu saada aikaiseksi esimerkiksi tutkimuksia, joita ei olisi voinut tehdä

perinteisellä soluviljelyllä. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa tällaisella monikudosmallinnuksella saatiin selvitettyä kolmen eri kudoksen integroidussa koeasetelmassa yhden näistä organoideista tuottavan vasteena lääkeaineeseen toiselle organoidille toksista aineenvaihduntatuotetta. Tällaisen tuloksen saaminen edellytti monikudosmallintamista, eikä olisi ollut havaittavissa yksittäisten kudosten tutkimuksella. Tämän tutkimuksen mahdollisti Body-on-Chip-monikudosmallinnus, johon taas tarvittiin mm. 3D-biotulostusta ja Organ-on-Chip-teknologiaa.

Tässä katsauksessa käsiteltyjen, ja muiden vastaavien tutkimusesimerkkien valossa voidaan sanoa, että uudenlaisten 3D-biotulostuksen osaltaan mahdollistamien lähestymistapojen käytöstä esimerkiksi tutkimuksessa on ollut hyötyä. 3D-biotulostusteknologia on ollutkin osaltaan mahdollistamassa Body-on-Chip-teknologian kehittämisen ja käyttämisen, ja siitä on etua, kun päästään mallintamaan esimerkiksi ihmiselimistön luontaisia vasteita eri lääkeaineille. 3D-biotulostus on siis jo lunastanut paikkansa teknologiana, esimerkiksi tutkimuskentässä.

Tuomiensa etujen ja monipuolisten koeasetelmien suunnittelun mahdollistamisen vuoksi monikudosmallinnus tulee jatkossa edelleen todennäköisesti lisääntymään. Näin voidaan sulkea jatkossa pois mielekkäällä tavalla esimerkiksi erilaisten lääkeaineiden aiheuttamia haittavaikutuksia, ennen kuin lääkkeet pääsevät käyttöön potilaille. Tämä on etu lääkeainetestauksessa ja lisää kiinnostusta tämän teknologian käyttöön. 3D-biotulostusteknologian yleistymiselle on siis perusteita, ja voi olettaa, että tämä suuntaus edelleen jatkuu.

Jatkotutkimusaiheita voisi ollakin esimerkiksi kattavan katsauksen tekeminen tulevaisuuden tutkimuksen kannalta mielenkiintoiseen Body-on-Chip-teknologiaan, tai laajempi katsaus biomusteista, jotka ovat tämän teknologian ytimessä.

Lähteet

- 1 Kakko, Eija; Mäkinen, Erkki. 2016. Katsaus lääketieteelliseen 3D-tulostamiseen. Verkkoaineisto. Katsaus. Tampereen yliopisto. <<https://journal.fi/finjehew/article/view/60198>> Luettu 2.5.2021.
- 2 Organ-on-a-chip - Dan Nguyen. Verkkoaineisto. OpenWetWare. <https://openwetware.org/wiki/Organ-on-a-chip_-_Dan_Nguyen> Luettu 2.5.2021.
- 3 Centre of Excellence in Body on-Chip Research. Verkkoaineisto. Tampereen yliopisto. <<https://research.tuni.fi/coeboc/about/>> Luettu 2.5.2021.
- 4 Sainio, Annele. 2019. Soluviljelyn uudet ulottuvuudet. Verkkoaineisto. Biotekniikan koulutuspäivä, Biolääketieteen laitos, Turun yliopisto. <https://laboratorioalanliitto.fi/wp-content/uploads/2019/10/Solujen-uudet-ulottuvuudet_Sainio_Osa-1.pdf> Luettu 30.4.2021.
- 5 Elinluovutus lukuina. 2020. Verkkoaineisto. Terveyskylä. <<https://www.terveyskyla.fi/elinsiirtotalo/elinluovutus/elinsiirtotoiminta-suomessa/elinluovutus-lukuina>> Luettu 2.5.2021.
- 6 Ji, Shen; Guvendiren Murat. 2021. Complex 3D bioprinting methods. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7954578/>> Luettu 30.4.2021.
- 7 Maailmanlaajuinen kielto kosmetiikan eläinkokeille. 2018. Verkkoaineisto. Euroopan parlamentti. <<https://www.europarl.europa.eu/news/fi/headlines/society/20180216STO98005/maailmanlaajuinen-kielto-kosmetiikan-elainkokeille>> Luettu 2.5.2021.
- 8 3D-tulostettu sarveiskalvo oli läpimurto. 2019. Verkkoaineisto. Tampereen yliopisto. <<https://www.tuni.fi/fi/ajankohtaista/3d-tulostettu-sarveiskalvo-oli-lapimurto>> Luettu 2.5.2021.
- 9 Foyt, Daniel A. Norman, Michael; Yu Tracy; Gentleman Eileen. 2018. Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. Verkkoaineisto. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/322367114_Exploiting_Advanced_Hydrogel_Technologies_to_Address_Key_Challenges_in_Regenerative_Medicine> Luettu 30.4.2021.
- 10 3D Bioprinting: Bioink Selection Guide. Verkkoaineisto. Sigma-Aldrich. <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/material-science/3d-bioprinting-bioinks.html>>. Luettu 30.4.2021.

- 11 Miri, Amir K; Mirzaee, Iman; Hassan Shabir; Oskui, Shirin Mesbah; Nieto, Daniel; Khademhosseini, Ali; Zhang, Yu Shrike. 2019. Effective bioprinting resolution in tissue model fabrication. Verkkoaineisto. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/333049732_Effective_bioprinting_resolution_in_tissue_model_fabrication> Luettu 2.5.2021.
- 12 Adhikari, Jaideep; Roy, Avinava; Das Anindya; Ghosh, Manojit; Thomas, Sabu; Sinha, Arijit; Kim, Jinku; Saha, Prosenjit. 2020. Effects of Processing Parameters of 3D Bioprinting on the Cellular Activity of Bioinks. Verkkoaineisto. Wiley Online Library. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mabi.202000179>> Luettu 2.5.2021
- 13 Harley, William; Yoshie, Haruka; Gentile Carmine. 2021. Three-Dimensional Bioprinting for Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Down Under: 2020 Australian Workshop Summary. Verkkoaineisto. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/350200568_Three-Dimensional_Bioprinting_for_Tissue_Engineering_and_Regenerative_Medicine_in_Down_Under_2020_Australian_Workshop_Summary> Luettu 30.4.2021.
- 14 Keriquel, Virginie; Oliveira, Hugo; Rémy, Murielle; Ziane, Sophia; Delmond, Samantha; Rosseau, Benoît; Rey, Sylvie; Catros, Sylvain; Amedee, Joelle; Guillemot, Fabien; Fricain, Jean Christophe. 2017. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. Verkkoaineisto. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/316860833_In_situ_printing_of_mesenchymal_stromal_cells_by_laser-assisted_bioprinting_for_in_vivo_bone_regeneration_applications> Luettu 2.5.2021.
- 15 Zhangac, Peng; Wang, Haoxuan; Wang, Peng; Zheng, Yating; Liu, Linxiang; Hu, Jun; Liu, Yande; Gao, Qing; He, Yong. 2021. Lightweight 3D bioprinting with point by point photocuring. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X20302747>> Luettu 2.5.2021
- 16 Grigoryan Bagrat; Sazer, Daniel W.; Avila Amanda; Albritton, Jacob L.; Padhye, Aparna; Ta, Anderson H.; Greenfield, Don L.; Miller, Gibbons & Jordan. 2021. Development, characterization, and applications of multi-material stereolithography. Verkkoaineisto. Springer Nature. <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-82102-w>> Luettu 2.5.2021.
- 17 Human Organs-on-Chips. Verkkoaineisto. Wyss Institute. <<https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>> Luettu 30.4.2021.
- 18 Body on a Chip. 2021. Verkkoaineisto. OpenWetWare, BioBricks Foundation. <https://openwetware.org/wiki/Body_on_a_Chip#Body-on-a-chip_.28integration_of_multiple_organ-on-a-chips.29_Advantages> Luettu 30.4.2021.
- 19 Skardal, Aleksander; Murphy, Sean V.; Devarasetty, Mahesh; Mead, Ivy; Kang, Hyun-Wook; Seol, Young-Joon; Zhang, Yu Shrike; Shin, Su-Ryon; Zhao, Liang;

- Aleman, Julio; Hall, Adam R.; Shupe, Thomas D.; Kleensang, Andre; Dokmeci, Mehmet R.; Lee, Sang Jin; Jackson, John D.; Yoo, James J.; Hartung, Thomas; Khademhosseini, Ali; Soker, Shay; Bishop, Colin E.; Atala, Anthony. 2017. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. Verkkoaineisto. Scientific Reports. <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-08879-x>> Luettu 2.5.2021
- 20 Metzger, Marjorie. 2021. Recent research breakthroughs in lung-on-chip technology. Verkkoaineisto. Elve Flow. <https://www.elveflow.com/wp-content/uploads/2017/08/Lung-on-chip_Conceptual-schema-of-a-human-on-chip-integrating-different-organs-on-chip.jpg> Luettu 30.4.2021.
- 21 Jackson, Beau. 2017. Postech university develops 3D bioprinting technique that grows human skin in just 2 weeks. Verkkójulkaisu. 3D Printing Industry. <<https://3dprintingindustry.com/news/postech-university-develops-3d-bioprinting-technique-grows-human-skin-just-2-weeks-115372/>> Luettu 31.4.2021.
- 22 Bio-Convergence The Future of Medicine. Innovation report. 2019. Verkkoaineisto. Israel Innovation Authority. <<https://innovationisrael.org.il/en/reportchapter/bio-convergence>> Luettu 30.4.2021.
- 23 Kaipala Jukka. 2015. 3D-tulostettavan mallin tuottaminen hiiren munuaisen tomografiakuvista. Verkkoaineisto. Kandidaatintyö. Oulun yliopisto. <<http://julkaitika.oulu.fi/files/nbnfioulu-201509152004.pdf>> Luettu 30.4.2021.
- 24 Hyvönen, Tuuli. Lääketieteellinen pikavalmistus ja sen yhteistyöverkostot Suomessa. 2017. Verkkoaineisto. Opinnäytetyö. Oulun ammattikorkeakoulu. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/132484/hyvonen_tuuli.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Luettu 3.5.2021.
- 25 Papaioannou, Theodore G.; Manolesou, Danae; Dimakakos, Evangelos; Tsoucalas, Gregory; Vavuranakis, Manolis; Tousoulis, Dimitrios. 2019. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6533576/>> Luettu 30.4.2021.
- 26 The Basic Steps to 3D BioPrint a Tissue. Verkkoaineisto. 3D BioPrinting: The Future of Tissue Engineering. <<https://3dbioprinting.weebly.com/how-it-works.html>> Luettu 30.4.2021.
- 27 Hafezi, Forough; Shorter, Susan; Tabriz, Atabak Ghanizadeh; Hurt, Andrew; Elmes, Victoria; Boateng, Joshua; Douroumis, Dennis. 2020. Bioprinting and Preliminary Testing of Highly Reproducible Novel Bioink for Potential Skin Regeneration. Verkkoaineisto. MDPI. <<https://www.mdpi.com/1999-4923/12/6/550/html>> Luettu 30.4.2021.

- 28 Rönkkö, Henri. 2018. Regeneratiivinen lääketiede. Tutkielma. Verkkoaineisto. Itä-Suomen yliopisto. <https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/18959/urn_nbn_fi_uef-20180031.pdf> Luettu 31.4.2021
- 29 Gungor-Ozkerim, P Selcan; Inci, Ilyas; Zhang, Yu Shrike; Khademhosseini, Ali; Dokmeci, Mehmet Renzi. 2018. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6439477/>> Luettu 1.5.2021
- 30 Zhaoa, Jingzhou; Hussaina, Mubashir; Wanga Maonan; Li, Zhiyang; He, Nongyue. 2020. Embedded 3D Printing of Multi-Internal Surfaces of Hydrogels. Artikkel. Additive Manufacturing.
- 31 Hooric, Jasper Van. 2021. From Polymer Research to Bio-ink Industry. Esitelmä. 3D BioPrinting Conference 2021.
- 32 Polyvinyylialkoholin molekyyli­massan määrittäminen viskositeetista. 2010. Oppimateriaali, työohje. Verkkoaineisto. Jyväskylän yliopisto. <<https://koppa.jyu.fi/avoimet/kemia/kems448/suomeksi/ohjeet/liuokset/viskositeetti>> Luettu 31.4.2021.
- 33 Theus, Andrea S; Ning, Liqun; Hwang Boeun; Gil, Carmen; Chen Shuai; Wombwell, Allison; Mehta, Riya; Serpooshan, Vahid. Bioprintability: Physiomechanical and Biological Requirements of Materials for 3D Bioprinting Processes. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599870/>> Luettu 31.4.2021.
- 34 GrowInk™ Bioinks for 3D printing. Verkkoaineisto. UPM Biomedicals. <<https://www.upmbiomedicals.com/for-life-science/growink/>> Luettu 31.4.2021.
- 35 Baxter, Rachel. Types of cells in the human body. 2020. Verkkoaineisto. Kenhub. <<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/types-of-cells-in-the-human-body>> Luettu 3.5.2021.
- 36 Peltokangas, Mimosa. 2020. Itsekorjautuvat hydrogeelit ja niiden 3D-tulostus. Kandidaatintyö. Verkkoaineisto. Tampereen yliopisto. <<https://trepo.tuni.fi/bitstream/handle/10024/120591/PeltokangasMimosa.pdf?sequence=2>> Luettu 1.5.2021
- 37 Bertassoni Luiz Eduardo. Cecconi Martina. Manoharan Vijayan. & al. 2014. Bertassoni Lab Chip 2014. Verkkoaineisto. ResearchGate. < https://www.researchgate.net/publication/265907713_Bertassoni_Lab_Chip_2014> Luettu 30.4.2021.