



Joel Jaakkola

# 3D-biotulostus kudosteknologian menetelmänä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Tieto- ja viestintätekniikka

Insinöörityö

6.3.2024

# Tiivistelmä

Tekijä: Joel Jaakkola  
Otsikko: 3D-biotulostus kudosteknologian menetelmänä  
Sivumäärä: 50 sivua + 2 liitettä  
Aika: 6.3.2024

Tutkinto: Insinööri (AMK)  
Tutkinto-ohjelma: Tieto- ja viestintätekniikan insinööri (AMK)  
Ammatillinen pääaine: Hyvinvointi- ja terveysteknologia  
Ohjaajat: Lehtori Juha Havukumpu

---

Tämän insinööriyön tavoitteena oli luoda yleiskatsaus 3D-biotulostukseen kudosteknologian menetelmänä. Työ jakautuu kahteen osaan. Taustaosiossa esitellään biotulostuksen peruseräitä sekä tulostuksessa käytettäviä tekniikoita ja materiaaleja. Jälkimmäinen osa on narratiivinen kirjallisuuskatsaus, jossa kartoitetaan biotulostuksen kudosteknologisia sovelluksia sekä ongelmia, jotka hidastavat menetelmän kehitystä.

3D-biotulostuksen sovelluksia esitellään kolmen erilaisen kudostyyppin kautta. Kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan ihon, luun ja sydämen kudosten biotulostuksessa käytettäviä menetelmiä, materiaaleja ja tulostuksen kudoskohtaisia erityispiirteitä. Esiin nostetaan myös 3D-biotulostuksen kehityksen kannalta merkittäviä yksittäisiä tutkimuksia. Ongelmien tai haasteiden osalta katsauksessa käsitellään niin ikään kolme keskeistä teemaa: verisuoniston rakentamista, biomusteiden kehittämistä sekä solujen tuotantoa.

Kirjallisuuskatsauksen aineiston perusteella 3D-biotulostuksesta piiryy kuva vaativana ja monitieteisenä valmistusmenetelmänä. Eri kudostyyppien tulostustekniikat ja biomusteiden materiaalit eroavat toisistaan merkittävästi, mutta kudosten välillä on myös paljon yhdistäviä tekijöitä. Lähes kaikkien kudosten 3D-biotulostuksessa toimivan verenkiertojärjestelmän muodostuminen on ratkaisevan tärkeää. Verisuonten tulostuksessa on otettu edistysaskelia, mutta hierarkkisen suoniston rakentaminen on edelleen ongelma. Biotulostuksen kehittyminen potilashoidossa käytettäväksi menetelmäksi edellyttää myös solutuotannon tehostamista sekä biomusteissa käytettävien solujen laadun ja turvallisuuden parantamista.

Avainsanat: 3D-biotulostus, kudosteknologia

## Abstract

Author: Joel Jaakkola  
Title: Three-dimensional Bioprinting as Method of Tissue Engineering  
Number of Pages: 50 pages + 2 appendices  
Date: 6<sup>th</sup> March 2024

Degree: Bachelor of Engineering  
Degree Programme: Information and Communications Technology  
Professional Major: Health Technology  
Supervisor: Juha Havukumpu, Senior Lecturer

This bachelor's thesis illustrates the current landscape of three-dimensional bioprinting and its utilization in the field of tissue engineering. The paper is structured into two sections: the background chapters outline the basic principles of 3D bioprinting and explore commonly used printing techniques and materials. The second part is a narrative literature review that focuses on applications of bioprinting in tissue engineering and obstacles hindering its development into a clinically usable biofabrication method.

Applications of 3D bioprinting are examined through three distinct tissue types. Skin, bone, and cardiac tissue serve as examples showcasing different bioprinting techniques, materials, and tissue-specific characteristics. Significant individual studies are introduced to demonstrate advancement made in bioprinting. As for the challenges and obstacles, the review again delves into three subjects: vascularization of 3D bioprinted tissues, bioink development, and cell sourcing.

Based on the literature review, 3D bioprinting unfolds as a technically advanced method, requiring expertise in medical sciences as well as materials and printing technology. Bioprinting methods vary significantly among tissue types, but there are also many common factors between different tissues. Proper vascularization is a necessity for nearly all 3D bioprinted tissues. While significant progress has been made in printing blood vessels, fabrication of a functional and hierarchical vascular system is still a major obstacle. Further advancement of 3D bioprinting as a clinically relevant method in tissue engineering also requires scaling up cell production as well as ensuring the quality and safety of cells used in bioinks.

Keywords: 3D bioprinting, tissue engineering

# Sisällys

1	Johdanto	1
2	3D-biotulostus	2
2.1	Tulostusprosessi	3
2.2	Tulostustekniikat	4
2.3	Biomusteet	9
3	Kirjallisuuskatsaus	12
3.1	Narratiivinen kirjallisuuskatsaus	13
3.2	Tavoitteet ja tutkimuskysymykset	13
3.3	Tiedonhaun vaiheet	14
3.4	Aiheiden kartoittaminen	16
3.5	Lähdemateriaalin valinta	19
3.6	Aineiston analysointi	19
4	Tulokset	20
4.1	Kudosteknologian sovellukset	21
4.1.1	Iho	21
4.1.2	Luu	24
4.1.3	Sydämen kudokset	27
4.2	3D-biotulostuksen haasteet	31
4.2.1	Verisuoniston rakentaminen	31
4.2.2	Biomusteiden kehittäminen	34
4.2.3	Solujen tuotanto	37
5	Yhteenveto	39
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1: Kirjallisuuskatsauksen ensimmäisen vaiheen aineisto	
	Liite 2: Kirjallisuuskatsauksen toisen vaiheen aineisto	

## Lyhenteet ja käsitteet

Angiogeneesi:

Verisuoniston uudismuodostuminen.

Allograafi: Toiselta ihmiseltä saatu kudossiirre.

Autograafi: Potilaan omasta elimistöstä saatu kudossiirre.

Autologinen:

Potilaan omasta elimistöstä saatu siirre, solu tms.

CAD: *Computer aided design*. Tietokoneavusteinen suunnittelu.

CIJ: *Continuous inkjet*. Tulostustekniikka, jossa muste tulostetaan yhtenäisenä pisaravirtana.

DECM: *Decellularized extracellular matrix*. Soluista puhdistettu soluväliaine.

DOD: *Drop-on-demand*. Tulostustekniikka, jossa muste annostellaan hallitusti yksittäisinä pisaroina.

FRESH: *Freeform reversible embedding of suspended hydrogels*. Biotulostusmenetelmä, jossa suunnittelumallin mukaiset rakenteet pursotetaan väliaikaiseen geelimäiseen tukimateriaaliin.

Hydrogeeli: Polymeeri, jolla on kyky imeä rakenteeseensa runsaasti vettä.

In vitro: Lat. "lasissa". Elävän elimistön ulkopuolella tapahtuva tutkimus tms.

In vivo: Lat. "elävissä". Elävissä elimistössä tapahtuva tutkimus tms.

- IPSC: *Induced pluripotent stem cell*. Pluripotentiksi ohjelmoitu kantasolu.
- MSC: *Mesenchymal stem cell*. Mesenkymaalinen kantasolu, joka kykenee erilaistumaan moneksi eri solutyypiksi.
- SWIFT: *Sacrificial writing into functional tissues*. Biotulostusmenetelmä, jossa soluaggregaatteja sisältävään biomusteeseen tulostetaan rakenteita väliaikaisen uhrimusteen avulla.
- Vaskularisaatio:  
Verenkiertojärjestelmän muodostuminen kudokseen.
- VEGF: *Vascular endothelial growth factor*. Verisuonten muodostumista edistävä biologinen kasvutekijä.
- Viabiliteetti: Solujen elinkykyisyys. Ilmaistaan usein näytteen elävien solujen prosenttiosuutena.

# 1 Johdanto

3D-biotulostus on useita tieteenaloja yhdistävä nopeasti kehittyvä teknologia, jonka avulla soluista ja erilaisista biomateriaaleista voidaan rakentaa toiminnallisia kudoksia. Sairauksien ja vammojen vahingoittamien elimien ja kudosten korvaamisen lisäksi menetelmällä uskotaan olevan mullistava vaikutus esimerkiksi syöpätutkimuksen ja yksilöllistetyn lääkehoidon kehitykseen. Tässä insinööri-työssä biotulostusta tarkastellaan kuitenkin yksinomaan kudosteknologian näkökulmasta.

Kudos- ja elinsiirteet saadaan perinteisesti joko potilaalta itseltään (*autograftit*) tai luovuttajalta (*allograftit*). Mahdollisuudet potilaan omien kudosten käyttämiseen elinsiirroissa ovat luonnollisesti rajalliset. Myös elinluovutuksella on haitta- puolensa, kuten vastaanottajan elimistön immunologiset reaktiot, joita ehkäistään useimmiten elinikäisellä lääkehoidolla. Luovutetuista elimistä on myös pakottava pula. Suomessa elinluovutusjonoissa on jatkuvasti noin 500 potilasta, joista 5–10 % menehtyy, koska sopivaa siirrännäistä ei saada ajoissa [1]. Väestön ikääntymisen myötä lisääntyvät sairaudet kasvattavat kudossiirteiden tarvetta entisestään.

3D-biotulostettujen elinten käyttöön potilashoidossa on vielä matkaa, mutta tavoitetta kohti on jo edetty suurin harppauksin. Esimerkiksi vuonna 2019 Tampereen yliopiston tutkimusryhmä onnistui tulostamaan sarveiskalvon pintakudosepiteeliä ja stroomasolukkoa muistuttavaa kudosta [2]. Merkittäviä edistysaskeleita on otettu myös mm. ihon, sydänlihaksen ja ruston 3D-biotulostuksessa.

Tämän insinööri-työn tavoitteena on muodostaa ajankohtainen yleiskuva 3D-biotulostuksesta kudosteknologian menetelmänä. Työssä kartoitetaan biotulostuksen keskeisimpiä tutkimuskohteita ja tarkastellaan menetelmän kehittämisessä kohdattuja haasteita. Tieteellisenä metodina käytetään narratiivista kirjallisuuskatsausta, joka mahdollistaa aiheen tutkimisen laajasta näkökulmasta, monentyyppistä aineistoa hyödyntäen. Työn taustaosiossa esitellään myös 3D-

biotulostuksen biologisia perusteita, yleisimpiä tulostustekniikoita ja tulostuksessa käytettäviä materiaaleja.

## 2 3D-biotulostus

Kudosteknologian tavoitteena on rakentaa vaurioituneille kudoksille ja elimille biologisia korvaajia, jotka voivat palauttaa, ylläpitää tai parantaa kudosten toiminnallisia tehtäviä [3]. Tieteenalan keskiössä ovat erilaiset biomateriaalit, jotka muodostavat solujen ja biologisesti aktiivisten molekyylien toimintaa edistäviä tukirakenteita [4]. 3D-biotulostus on kudosteknologian uusimpia ja nopeimmin kehittyviä menetelmiä. Sen avulla soluista ja biomateriaaleista voidaan tulostaa monimutkaisia kolmiulotteisia kudostyrakenteita, jotka jäljittelevät tarkasti luonnollisten kudosten ja elinten toimintaa ja rakennetta. [3.]

Murphyn ja Atalan [5] mukaan 3D-biotulostus nojaa kolmeen lähestymistapaan: 1) biomimetikkaan, 2) kudosten autonomiseen itsejärjestymiseen ja 3) suurempien kokonaisuuksien rakennuspalikoina toimiviin minikudoksiin. Toiminnallisten elinten ja kudosten biotulostus ja transplantointi voi edellyttää kaikkien kolmen lähestymistavan yhdistämistä [5].

Biomimeettinen suunnittelu jäljittelee luonnossa esiintyviä muotoja, prosesseja, mekanismeja ja ympäristöjä. 3D-biotulostuksessa sitä sovelletaan jäljentämällä mahdollisimman tarkasti luonnollisten kudosten rakenteita ja toimintoja. Lähestymistapa edellyttää yksityiskohtaista tietoa kudosten mikroympäristöstä: soluista, soluväliaineesta ja niihin vaikuttavista biologisista tekijöistä. Biomimeettinen suunnittelu on haastavaa, sillä yksinkertaisimpienkin kudostyyppien fysiologiset toimintamekanismit ovat erittäin monimutkaisia. [5; 6.]

Autonominen itsejärjestyminen hyödyntää kudosten luonnollista kehitymisprosessia. Itsejärjestymisen ytimessä ovat solut ja niiden toiminta. Solut muodostavat kehittyvän kudoksen rakenteen, tuottavat soluväliaineen komponentit ja osallistuvat kemialliseen viestintään, joka on solujen jakautumisen ja erilaistumisen kannalta olennaista. Toisin kuin biomimeettisessä lähestymistavassa,



autonomista itsejärjestymistä hyödynnettäessä kudoksen kaikkia kehitysvaiheita ei pyritä ohjaamaan ulkopuolelta. Sen sijaan tavoitteena on rakentaa ympäristö, jossa solut ja kudoksen muut komponentit voivat itse järjestäytyä toiminnalliseksi kudokseksi. [5; 6.]

Kudosten ja elinten voidaan ajatella koostuvan pienemmistä toiminnallisista yksiköistä eli mini- tai mikrokudoksista. Biotulostettuja minikudoksia voidaan koota suuremmiksi kokonaisuuksiksi kontrolloidusti tai hyödyntää solujen kykyä autonomiseen itsejärjestymiseen. Esimerkkinä minikudoksesta voidaan mainita verisuonten endoteelisoluista ja sileistä lihassoluista koostuvat biotulostettavat aggregaatit eli solukimput, joita voidaan käyttää suoniston rakentamiseen [7]. Tulostettuja minikudoksia käytetään usein myös sairauksien mallintamiseen ja lääketutkimukseen. [5; 6.]

## 2.1 Tulostusprosessi

3D-biotulostusprosessi voidaan jakaa tulostusta edeltävään vaiheeseen, tulostusvaiheeseen ja tulostuksen jälkeiseen vaiheeseen [8].

Biotulostusta edeltävässä suunnitteluvaiheessa kudoksesta kuvannetaan tulostettavaa 3D-mallinnosta varten. Kuvantamismodaliteetin valintaan vaikuttavat muun muassa kudostyyppi ja mallinnoksen edellyttämä resoluutio. Yleisesti käytettyjä modaliteetteja ovat tietokonetomografia, magneettikuvaus ja ultraäänikuvaus. [9.] Kuvantamisen jälkeen lääketieteelliset kuvat siirretään 3D-suunnitteluohjelmistoon, jossa ne muokataan ja muunnetaan biotulostettavaksi kudokseksi [10].

Tulostusta edeltävässä vaiheessa valmistellaan myös soluista ja muista biomateriaaleista koostuva biomuste. Muste suunnitellaan tulostettavan kudostyyppin, käytettävien solujen ja tulostustekniikan mukaan, ja sen valmistuksessa huomioidaan materiaalien mekaaniset, biologiset ja kemialliset ominaisuudet [11]. Biomusteita ja niissä käytettäviä materiaaleja käsitellään tarkemmin luvuissa 2.3 ja 4.2.2.

Tulostusvaiheessa 3D-mallinnoksen mukainen kudusrakenne tulostetaan tarkoitukseen sopivalla tulostustekniikalla. Tekniikan valintaan vaikuttavat esimerkiksi biomusteen mekaaniset ominaisuudet, tulostettava kudostyyppi ja musteen solutiheys [8]. Prosessia hallitaan erityisellä tulostusohjelmistolla, jossa biomusteen annostelupaine, lämpötila, tulostusnopeus ja muut keskeiset parametrit hienosäädetään tulostettavuuden ja solujen viabiliteetin eli elinkykyisyyden kannalta optimaaliseksi. Monet laitevalmistajat ovat kehittäneet omat ohjelmistonsa, joilla voidaan sekä luoda tulostettavat kudosmallit että kontrolloida itse tulostusta. [12.] Erilaisia tulostustekniikoita esitellään luvussa 2.2.

Biotulostettava kudusrakenne on yleensä kovetettava tulostuksen yhteydessä. Se voidaan tehdä silloittamalla (engl. *cross-linking*) biomusteen polymeerirakenteen molekyylit. Silloittaminen voi tapahtua termisesti eli lämpötilaa säätelemällä, kemiallisesti hyödyntäen erilaisia silloiteaineita tai fysikaalisesti esimerkiksi ultraviolettivalon avulla. Biomusteen solut ja materiaalit sekä tulostettavan kudostyyppin mekaaniset ominaisuudet määrittelevät kulloinkin käytettävän silloitusmenetelmän. [13.]

Tulostuksen jälkeen kudokset saatetaan toiminnallisiksi ja rakenteellisesti eheiksi in vitro -menetelmin. Se voi tarkoittaa esimerkiksi kantasolujen erilaistamista biokemiallisesti tai kudusrakenteen vahvistamista mekaanisen rasituksen avulla. Tässä "kypsytysvaiheessa" keskeinen rooli on perfuusiolla eli nesteen läpivirtauksella, joka kuljettaa tulostettujen kudosten soluihin happea ja muita tarvittavia aineita. Kudosrakenteita kypsytetään usein bioreaktoreissa, jotka tukevat kudosten kehittymistä sekä mahdollisesti jäljittelevät niiden kohdeympäristön olosuhteita. [8.]

## 2.2 Tulostustekniikat

Hull kehitti 1980-luvun puolessavälissä ensimmäisen kolmiulotteisen tulostusmenetelmän, jossa nestemäistä fotopolymeeria kovetettiin kerroksittain ultraviolettivalon avulla [14]. Hullin stereolitografiaksi nimeämää tekniikkaa hyödynnetään edelleen sekä tavanomaisessa 3D-tulostuksessa että 3D-biotulostuksessa.

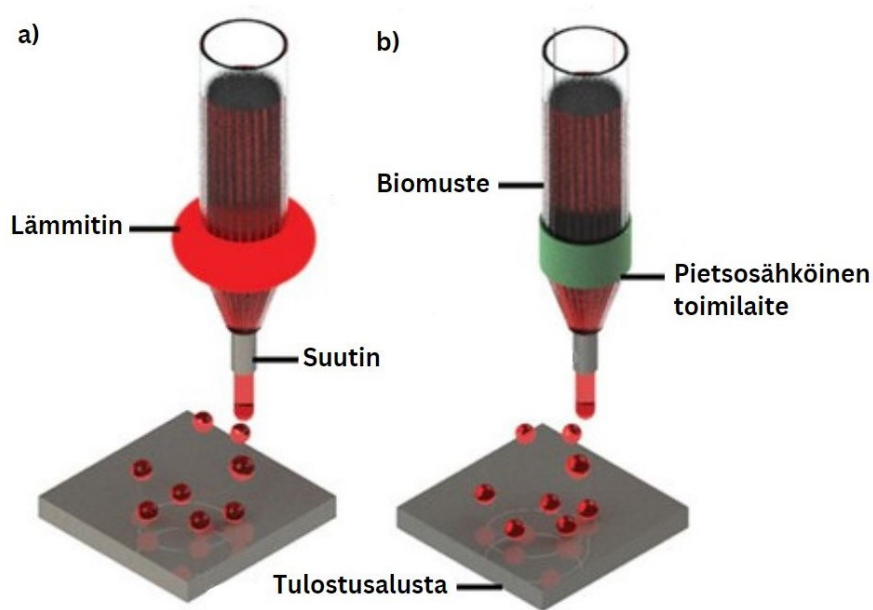
Vuonna 2003 Wilson ja Boland kehittivät huomattavasti yksinkertaisemman biotulostusmenetelmän, jossa soluja ja proteiineja tulostettiin tavallisella kuluttajille suunnatulla – joskin tarkoitukseen muokatulla – HP-mustesuihketulostimella [15].

Nykyiset 3D-biotulostustekniikat voidaan jakaa kolmeen luokkaan: mustesuihketulostukseen, pursotustulostukseen ja laseravusteiseen tulostukseen. Ne eroavat toisistaan muun muassa tulostusresoluution, nopeuden, kustannusten ja käytettävissä olevien biomusteiden osalta. Tulostustekniikan valintaan vaikuttavat monet tekijät, kuten tulostettava kudostyyppi, tulosteen rakenteen monimutkaisuus sekä biomusteen ominaisuudet. [8.] Eri tulostustekniikat esitellään lyhyesti seuraavissa kappaleissa.

### Mustesuihketulostus

3D-mustesuihketulostuksen toimintaperiaate on pääpiirteittäin sama kuin perinteisessä 2D-mustesuihketulostuksessa, jossa mustepisarat tulostetaan paperille digitaalisen mallin mukaisesti. Biotulostuksessa musteena toimii soluja sisältävä biomuste tai muu biomateriaali ja paperina tulostusalusta, joka usein on liikuteltävissä x-, y- ja z-akseleilla. Mustesuihketulostuksessa käytetään joko DOD (engl. *drop-on-demand*) -tekniikkaa, jossa biomuste annostellaan suuttimesta kontrolloidusti yksittäisinä pisaroina, tai CIJ (engl. *continuous inkjet*) -tekniikkaa, jossa pisarat muodostavat yhtenäisen mustevirran. [10; 16.]

Tulostuspäät toimivat yleensä lämpöenergiaan tai pietsosähköiseen ilmiöön perustuvilla toimilaitteilla. Mustesuihketulostuksen toimintaperiaatteita havainnollistetaan kuvassa 1.



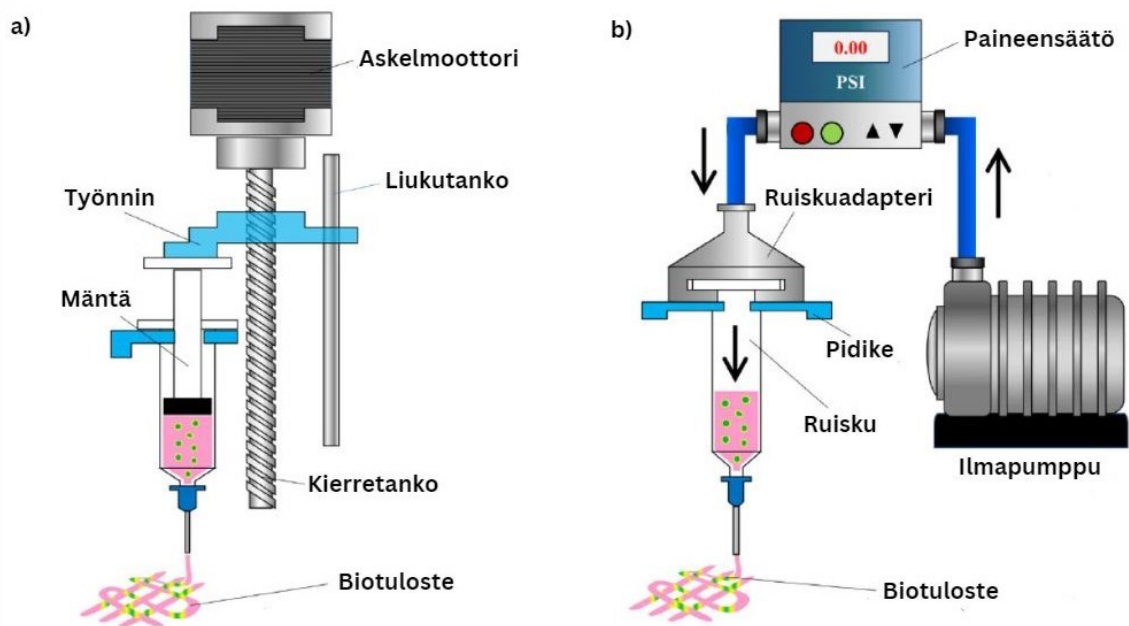
Kuva 1. a) Lämpöenergiaan perustuva ja b) pietsosähköiseen ilmiöön perustuva mustesuihkutulostustekniikka [mukaillen 16].

Lämpöenergiaan perustuvassa tekniikassa pisara tulostetaan aiheuttamalla mustesäiliöön sähkövirtapulssi, jonka tuottama lämpö höyrystää mustetta muodostaen säiliöön kuplan. Pulssin päätyttyä kupla hajoaa tai kasvaa, jolloin mustepisara työntyy ulos suuttimesta. Pietsosähköisessä tekniikassa sähköinen jännite saa tulostuspäässä sijaitsevat pietsokiteet muuttamaan muotoaan, jolloin syntyy paineaalto, joka työntää pisaran suuttimesta. [17.]

Mustesuihkutulostuksessa solujen tulostussijaintia voidaan kontrolloida tarkasti, ja tekniikka on verrattain soluystävällinen [10]. Useita tulostuspäitä käytettäessä tulostus on myös nopeaa ja useita solutyyppejä ja biomateriaaleja voidaan tulostaa samanaikaisesti [17]. Toisaalta tekniikka ei sovellu käytettäväksi, kun biomusteen viskositeetti tai solutiheys on korkea. Tulostetuista kudoksista saattaa siksi puuttua tarvittava rakenteellinen kestävyys, mikä kaventaa mustesuihkutulostuksen hyödyntämismahdollisuuksia kudosteknologian menetelmänä. [10.]

Pursotustekniikka

Pursotustekniikka on 3D-biotulostustekniikoista yleisin. Pursotukseen perustuvissa järjestelmissä biomuste tulostetaan pisaroiden sijaan jatkuvana lieriömäisenä nauhana. Kudosteknologian sovelluksissa pursottava voima tuotetaan yleensä pneumaattisesti tai mekaanisesti. [17.] Kuvassa 2 havainnollistetaan yksinkertaistetusti molempien mekanismien keskeisiä komponentteja.



Kuva 2. a) Mekaaninen pursotustekniikka ja b) pneumaattinen pursotustekniikka [mukaillen 18].

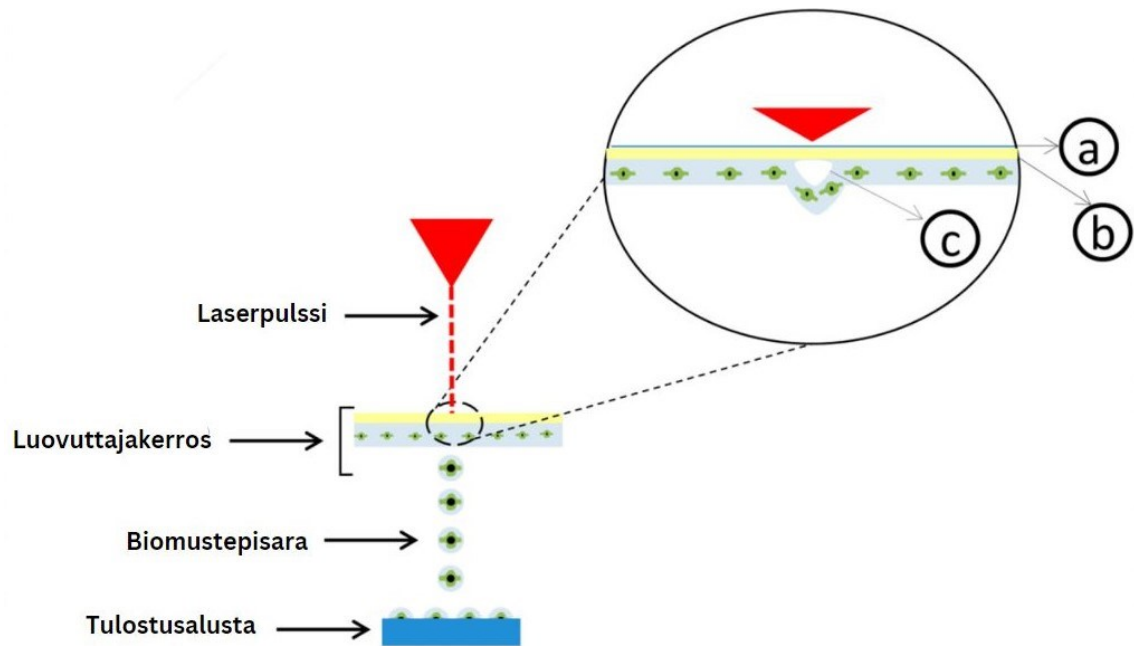
Mekaanisen pursotustulostuksen toimintaperiaate perustuu yleensä askelmoottoriin, joka kiertää lineaarisen toimilaitteen ruuvia tai kiertotankoa. Kiertoliike työntää toimilaitteen mäntää, joka pursottaa biomustetta halutulla voimalla ulos ruiskun suuttimesta. Pneumaattisissa järjestelmissä taas musteruiskuun syötetään pumpulla sterilisoitua paineilmaa, joka työntää biomusteen suuttimen kärjestä halutulla nopeudella. [17.] Koska työntävä voima ei altista biomustetta mekaaniselle kontaktille ja leikkausjännitykselle, pneumaattinen tekniikka on mekaanista pursotusta steriilimpi ja vähemmän haitallinen biomusteen soluille [18].

Pursotustekniikalla voidaan tulostaa lähes kaikkia hydrogeelipohjaisia biomusteita viskositeetista tai solutiheydestä riippumatta [17]. Pursottamalla voidaan

siksi valmistaa mekaanisilta ominaisuuksiltaan vahvempia kudusrakenteita kuin esimerkiksi mustesuihkutulostusta käytettäessä. Toisaalta menetelmä altistaa biomusteen suuremmalle leikkausjännitykselle ja muulle mekaaniselle rasitukselle, mikä saattaa vahingoittaa musteen soluja muita tulostustekniikoita enemmän. [19.] Pursotus- ja mustesuihkutekniikoiden yhteinen ongelma on suuttimien tukkeutuminen, joka vaikuttaa myös biomateriaalien valintaan. Viskositeettiltaan korkea biomuste tukkii helposti suuttimet, kun taas koostumukseltaan ohuemmista musteista on hankala valmistaa muotonsa säilyttäviä rakenteita. [20.]

### Laseravusteinen biotulostus

Laseravusteinen tulostus on kolmesta menetelmästä teknologisesti monimutkaisin. Siinä nanosekuntien pituinen laserpulssi ohjataan ohueen energiaa absorboivaan luovuttajakerrokseen (engl. *donor layer*), joka voi koostua esimerkiksi kullasta tai titaanista. Kerroksen alapinnalle on kiinnitetty biomustetta sisältävä kalvomainen nauha. Pulssin osumakohdassa luovuttajakerroksen materiaali höyrystyy, jolloin kerrokseen muodostuu kupla, joka työntää biomustekalvosta mustepisaran tulostusalustalle. [17.] Laseravusteisen biotulostuksen toimintaperiaate havainnollistetaan kuvassa 3.



Kuva 3. Laseravusteisen tulostuksen toimintaperiaate. Laserpulssi kulkee ohuen lasikerroksen (a) läpi luovuttajakerrokseen (b). Kerroksen höyrystyminen muodostaa kuplan (c), joka irrottaa pisaran biomustenauhasta. [mukaillen 21.]

Laseravusteisessa tekniikassa biomuste ei altistu tulostusvaiheessa mekaaniselle stressille, mikä edesauttaa solujen elinkykyisyyttä. Koska biomuste ei ole kosketuksissa tulostuspään tai mustesäiliön kanssa, myös kontaminaatoriski on pieni. Laseravusteisella tulostuksella voidaan saavuttaa korkeampi tulostusresoluutio kuin esimerkiksi pursotustekniikalla, mutta käytettävien biomusteiden viskositeetin ja solutiheyden on oltava melko matalat. [16.]

### 2.3 Biomusteet

Grollin ym. [22] määritelmän mukaan biomuste on ”soluja sisältävä kemiallinen seos, joka soveltuu käsiteltäväksi biovalmistuksessa (engl. *biofabrication*) käytettävillä automatisoiduilla teknologisilla menetelmillä”. Biovalmistuksella tarkoitetaan mitä hyvänsä valmistusmenetelmää, jossa hyödynnetään soluja tai biologisia molekyylejä [3]. 3D-biotulostuksen musteena voidaan käyttää monenlaisia biologisesti aktiivisia materiaaleja, mutta varsinainen biomuste sisältää aina soluja. [22.] Solujen lisäksi muste voi sisältää luonnollisia tai synteettisiä

tukimateriaaleja sekä biologisia kasvutekijöitä, jotka edistävät solujen toimintaa ja kudoksen uusiutumista [11].

Musteen keskeisimmät ominaisuudet ovat tulostettavuus ja bioyhteensopivuus. Tulostettavuudella viitataan niihin tekijöihin, jotka vaikuttavat musteen kykyyn tulostua ja säilyttää muotonsa suunnittelumallin mukaisesti [23]. Bioyhteensopivuus voidaan puolestaan määritellä positiiviseksi vuorovaikutukseksi musteen materiaalien ja sen solujen sekä siirteen vastaanottajan elimistön välillä [24].

Viskositeetti eli nestemäisen aineen kyky vastustaa virtaamista on tärkeimpiä biomusteen tulostettavuuteen liittyviä ominaisuuksia. Jos musteen viskositeetti on liian alhainen, tulostetut rakenteet eivät välttämättä säilytä suunniteltua muotoa. Viskositeetti vaikuttaa myös solujen hyvinvointiin. Biomuste, jolla on korkea viskositeetti, vaatii yleensä korkean tulostuspaineen, joka lisää musteeseen kohdistuvaa soluille haitallista leikkausjännitystä. [20; 24.]

Biomusteet sisältävät usein pseudoplastisia materiaaleja, jotka vähentävät leikkausjännityksestä aiheutuvia haittoja. Pseudoplastisen materiaalin viskositeetti alenee, kun siihen kohdistuu leikkausjännitystä. Toisin sanoen, kun biomustetta pursotetaan tulostuspään suuttimesta, musteen koostumus ohenee. Leikkausjännityksen vaikutuksen lakattua biomuste palautuu alkuperäiseen jähmeämpään muotoonsa. [25.]

## Solut

Solut ovat biomusteen tärkein komponentti, sillä ne määrittävät tulostettavan kudoksen toiminnallisuuden. Siirteinä käytettävien tulosteiden tulisi koostua useista solutyypeistä, jotka yhdessä tuottavat kudoksen biologiset ominaisuudet. 3D-biotulostuksen biomusteissa voidaan käyttää esimerkiksi uusiutumisen ja erilaistumiskykyisiä kantasoluja tai kudoksesta eristettyjä erilaistuneita primaarisoluja. [26.] Ihanteellisessa tilanteessa solut ovat autologisia, eli ne on kerätty kudossiirron kohteelta, jolloin riski siirteen aiheuttamaan immunologiseen hylkimisreaktioon pienenee [27].



Suoraviivainen tapa hankkia biomusteessa käytettävät solut on eristää erilaistuneita primaarisoluja kudossiirteen kohteelta ja kasvattaa niiden määrää *in vitro* -menetelmin [26]. Erilaistuneiden solujen eristäminen ja viljely on kuitenkin usein hankalaa, ja niiden elinaika on rajallinen. Siksi biotulostuksessa käytetäänkin usein erilaistumattomia kantasoluja, joilla on monia kudosteknologian kannalta suotuisia ominaisuuksia. [27.]

Biotulostuksessa voidaan hyödyntää monia erilaisia kantasolutyyppejä, mutta yleisimmin käytettyjä ovat seuraavat solutyypit:

- mesenkymaaliset kantasolut (engl. MSC, *mesenchymal stem cell*)
- alkion kantasolut eli ES-solut (engl. ESC, *embryonic stem cell*)
- indusoidut pluripotentit kantasolut eli iPS-solut (engl. iPSC, *induced pluripotent stem cell*). [17; 27.]

Mesenkymaaliset kantasolut voidaan eristää esimerkiksi luuytimeistä tai rasvakudoksesta. Ne ovat multipotentteja eli kykeneviä erilaistumaan useiksi solutyypeiksi. [16.] *In vitro* -menetelmillä mesenkymaalisia kantasoluja voidaan viljellä ja erilaistaa esimerkiksi luu-, rusto-, jänne- ja lihaskudoksen soluiksi. Multipotentteilla soluilla on kuitenkin rajallinen uusiutumiskyky, ja luovuttajan ikä voi heikentää niiden uusiutumisen- ja erilaistumiskykyä. [26.]

Varhaisvaiheen alkioista eristettävät ES-solut ovat pluripotentteja, eli ne voivat erilaistua lähes minkä hyvänsä kudoksen solutyypiksi. Tämän ja rajattoman uusiutumiskykynsä ansiosta ne soveltuvat hyvin kudosteknologian tarkoituksiin. Koska ES-solut eristetään ihmisalkioista, niiden käyttöön liittyy kuitenkin eettisiä ongelmia ja lainopillisia rajoituksia. [16.]

iPS-kantasolut ovat niin ikään pluripotentteja ja muistuttavat muiltakin ominaisuuksiltaan ES-soluja. Merkittävin ero on solujen alkuperä: iPS-solut on uudelleenohjelmoitu erilaistuneista soluista takaisin pluripotenttiin muotoon. iPS-solujen hyviä puolia ovat voimakas uusiutumiskyky ja mahdollisuus kerätä siirteessä käytettävät solut suoraan potilaasta, jolloin elimistön immuunireaktion

todennäköisyys pienenee. Toisaalta sekä iPS-solujen että alkion kantasolujen on havaittu olevan taipuvaisia tuumorigeneesiin eli kasvainten muodostamiseen. [28.]

## Biomateriaalit

3D-biotulostuksessa käytettävät biomusteet voidaan jakaa kahteen kategoriaan: tukirakenteellisiin (engl. *scaffold-based*) ja tukirakenteettomiin (engl. *scaffold-free*) musteisiin. Tukirakenteellisissa biomusteissa solujen tukena käytetään useimmiten *hydrogeelejä* eli luonnollisia tai synteettisiä polymeerejä, jotka kykenevät imemään rakenteeseensa runsaasti vettä. Tukirakenteettomat musteet eivät sisällä ylimääräistä biomateriaalia vaan koostuvat kokonaan solujen muodostamista aggregaateista eli solurykelmistä, jotka voivat tulostetussa rakenteessa yhdistyä toiminnalliseksi kudokseksi. [29.]

Biomusteet sisältävät usein hydrogeelejä, jotka koostuvat luonnollisista polymeereistä, kuten gelatiinista, fibriinistä, kollageenista ja alginaatista [24]. Luonnolliset hydrogeelit ovat bioyhteensopivia, useimmiten biohajoavia ja muistuttavat rakenteeltaan oikeaa soluväliainetta. Ne voivat myös edistää biomusteen solujen toimintaa, kuten esimerkiksi liikkumista, kiinnittymistä ja solujen välistä viestintää. [30; 11.] Toisaalta luonnollisten hydrogeelien mekaaniset ominaisuudet ovat usein heikot, mikä vaikuttaa tulostettujen rakenteiden lujuuteen ja suunnittelumallin mukaisen muodon säilymiseen [30]. Biotulostuksessa käytetään usein myös synteettisiä polymeerejä, joiden mekaanisia ja biologisia ominaisuuksia voidaan helpommin muovata jäljittelemään haluttua kudostyyppiä. Synteettisten polymeerien bioyhteensopivuus ei kuitenkaan vedä vertoja luonnollisille hydrogeeleille, joiden materiaalit ovat usein peräisin soluväliaineesta. [31.]

## 3 Kirjallisuuskatsaus

Insinööriyön ensimmäinen osa oli katsaus 3D-biotulostuksen peruskäsitteisiin, menetelmiin ja materiaaleihin. Seuraavissa luvuissa perehdytään tuoreeseen

aihetta käsittelevään tutkimuskirjallisuuteen. Biotulostuksen kudosteknologisia sovelluksia ja niiden kehityksessä kohdattuja kompastuskiviä kartoitetaan narratiivisen kirjallisuuskatsauksen avulla.

### 3.1 Narratiivinen kirjallisuuskatsaus

Narratiivinen kirjallisuuskatsaus soveltuu menetelmäksi, kun valitusta aiheesta halutaan muodostaa laaja yleiskuva. Sen avulla monenkirjavista lähteistä peräisin oleva epäyhtenäinen tieto voidaan koota eheäksi kokonaisuudeksi. Aineiston analyysissä pyritään luomaan kuvaileva synteesi, joka ajankohtaistaa ja tiivistää tutkimustietoa. [32.]

Narratiivisen kirjallisuuskatsauksen laatimisessa ei ole tarpeen noudattaa yhtä tiukasti määriteltyjä sääntöjä kuin esimerkiksi systemaattisissa katsauksissa. Jotta insinööriyö kuitenkin noudattaisi hyvän tieteellisen käytännön periaatteita, katsauksen laatimisen ohjenuorana käytettiin SANRA (*Scale for the Quality Assessment of Narrative Review Articles*) -mittaria [33]. Sen mukaan narratiivisen kirjallisuuskatsauksen tulee täyttää seuraavat kriteerit:

- Katsauksen tieteellinen merkitys perustellaan lukijalle.
- Katsauksen tavoitteet tai tutkimuskysymykset määritellään kattavasti ja selkeästi.
- Tiedonhaun hakutermit ja katsaukseen sisällytettävän aineiston tyyppi esitellään läpinäkyvästi.
- Kaikkiin olennaisiin väittämiin lisätään lähdeviittaukset, ellei kyse ole yleisesti tiedetystä tosiasiaista.
- Tieteelliset väittämät perustellaan kattavasti.
- Tulosten oleellinen data esitetään tarkoituksenmukaisessa muodossa.

### 3.2 Tavoitteet ja tutkimuskysymykset

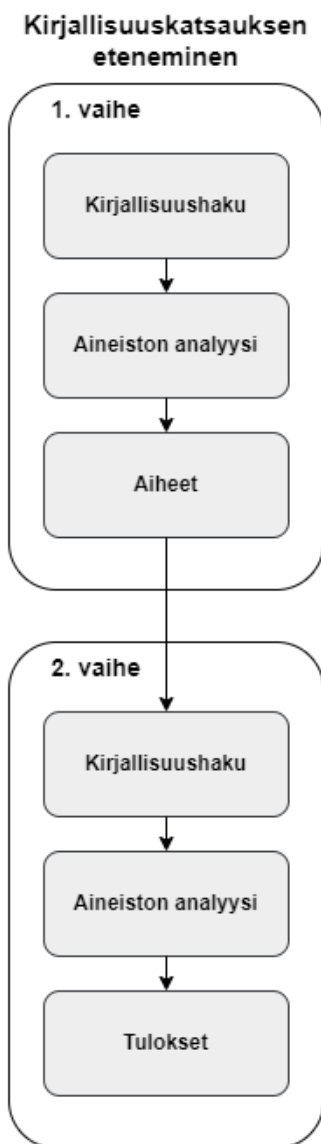
3D-biotulostus on nopeasti kehittyvä ja useita tieteenaloja yhdistävä menetelmä, jolla on jo ollut mullistava vaikutus kudosteknologian saralla. Aihetta käsittelevää suomenkielistä aineistoa on kuitenkin saatavalla vain niukasti. Tämän

kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on muodostaa tuoreen kirjallisuuden pohjalta ajankohtainen kuva 3D-biotulostuksen tutkimuksen ja käytännön sovellusten tilanteesta sekä selvittää biotulostuksen haasteita. Narratiivinen kirjallisuuskatsaus sallii verrattain löyhästi määritetyt tutkimuskysymykset, ja tässäkin katsauksessa ne on muotoiltu melko väljästi. Tutkimuskysymyksiä on kaksi:

- Mitkä ovat keskeisimmät 3D-biotulostuksen sovelluksiin liittyvät tutkimuskohteet kudosteknologian saralla?
- Millaisia ongelmia liittyy 3D-biotulostuksen käytännön sovellusten kehittämiseen?

### 3.3 Tiedonhaun vaiheet

Tutkimusaineiston keruu- ja valintaprosessi oli kaksivaiheinen. Kirjallisuuskatsauksen etenemisprosessia havainnollistetaan kuvassa 4.

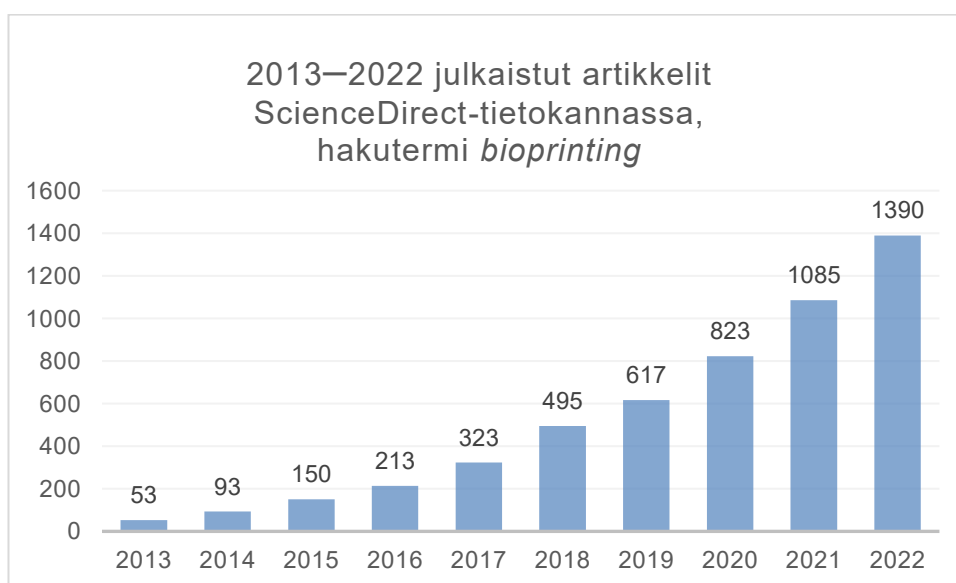


Kuva 4. Kirjallisuuskatsauksen etenemisprosessi

Kirjallisuuskatsauksessa käsiteltävät aiheet valittiin ensimmäisessä tiedonhaku- vaiheessa kerätyn alustavan aineiston perusteella. Tavoitteena oli tunnistaa aineistosta yleisimpiä kudosteknologian tutkimuskohteita ja kartoittaa sovellusten kehityksessä kohdattuja ongelmia. Kun katsauksessa käsiteltävät aiheet oli valittu, aineistoa täydennettiin uusin hakutermein tiedonhaun toisessa vaiheessa.

### 3.4 Aiheiden kartoittaminen

Syyskuussa 2023 hakutermin *bioprinting* tuotti ScienceDirect-sivuston tietokannassa 6 773 artikkelia, joista valtaosa on julkaistu kolmen viime vuoden aikana. Kuvan 5 kaavio havainnollistaa tutkimusaiheen suosion kehitystä kymmenen viime vuoden aikana. Kaaviosta voidaan esimerkiksi todeta, että vuonna 2022 julkaistujen artikkelien määrä oli yli kaksi kertaa suurempi kuin vuonna 2019. Koska 3D-biotulostusta käsitteleviä tutkimuksia julkaistaan tihenevään tahtiin, katsausta varten oli tarjolla runsaasti monentyyppistä aineistoa.



Kuva 5. ScienceDirect-tietokannan hakutulokset termillä *bioprinting* vuosina 2013–2022.

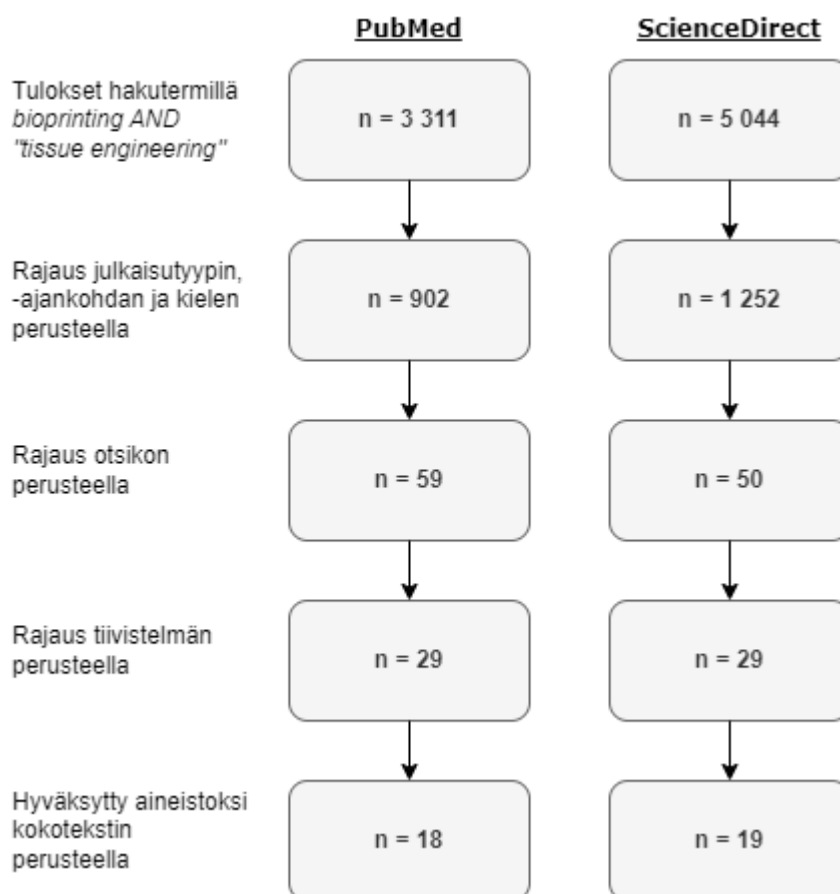
Tiedonhauk tehtiin lokakuussa 2023 PubMed- ja ScienceDirect-tietokantoihin. PubMed on Yhdysvaltain kansallisen lääketieteellisen kirjaston NLM:n (engl. *U.S. National Library of Medicine*) ylläpitämä hakukone ja viitetietokanta, joka sisältää yli 36 miljoonan lääke- ja biotieteellisen artikkelin viitetiedot [34]. ScienceDirect taas on tieteellisen kirjallisuuden hakukone ja verkkosivusto, jonka koelmassa on yli 19 miljoonaa vertaisarvioitua kokotekstiä ja tiivistelmää eri tutkimusaloilta. Sivustoa ylläpitää hollantilainen kustantamo Elsevier. [35.]

Tuoreiden kirjallisuuskatsausten arvioitiin istuvan parhaiten ensimmäisen tiedonhakuvaiheen tavoitteeseen eli 3D-biotulostuksen keskeisten sovellusten ja ongelmien kartoittamiseen. Seuraavassa luettelussa esitellään aineiston tarkemmat mukaanottokriteerit.

Aineistoon mukaan otettavaksi soveltuva artikkeli

- on vertaisarvioitu tieteellinen julkaisu
- on tyypiltään kirjallisuuskatsaus
- on julkaistu vuosina 2019–2023
- on suomen-, ruotsin- tai englanninkielinen
- on kokonaisuudessaan luettavissa joko vapaasti tai Metropolia Ammattikorkeakoulun lisenssillä
- käsittelee 3D-biotulostusta kudosteknologian ja/tai yleisesti lääketieteen sovellusten näkökulmasta.

Ensimmäisen vaiheen tiedonhaut tehtiin molempiin tietokantoihin käyttäen samaa Boolean hakulogiikkaa hyödyntävää termien yhdistelmää: *bioprinting AND "tissue engineering"*. Hakutulosten rajausprosessi havainnollistetaan kuvassa 6.



Kuva 6. Hakutulosten rajausprosessi

Ennen mukaanottokriteerien soveltamista hakutuloksia oli ScienceDirect (SD) -tietokannassa 5 044 ja PubMed (PM) -tietokannassa 3 311. Julkaisutyyppi, -ajankohta ja kieli rajattiin hakukoneiden omilla työkaluilla, minkä jälkeen hakutulosten määräksi jäi 1 252 (SD) ja 902 (PM). Muut rajaukset tehtiin harkinnanvaraisesti. Otsikon perusteella mukaanottokriteerit täyttäviä julkaisuja oli 50 (SD) ja 59 (PM). Tuloksia rajattiin edelleen tiivistelmän (PM = 29, SD = 29) ja kokotekstin perusteella (SD = 19, PM = 18). Ensimmäisen vaiheen aineistoon hyväksyttiin lopulta yhteensä 37 tutkimuskysymysten kannalta relevanttia kirjallisuuskatsausta. Aineisto esitellään taulukkomuodossa liitteessä 1.



### 3.5 Lähdemateriaalin valinta

Vain harva yllä mainituista artikkeleista päätyi kirjallisuuskatsauksen varsinaiseksi lähdemateriaaliksi. Alustavalla aineistolla olikin välineellinen tehtävä auttaa tunnistamaan teemat, joista etsittiin syventävää tietoa uusien aihekohtaisiin hakutermeihin, kuten *skin AND bioprinting*. Tiedonhaun jälkimmäisessä vaiheessa aineiston mukaanottokriteerejä väljennettiin, jotta välttyttäisiin sulke-  
masta pois keskeisiä julkaisuja. Mukaan hyväksyttiin katsausartikkelien lisäksi myös tutkimusartikkeleja ja viranomaistahojen julkaisuja ja ajallista rajausta la-  
vennettiin vuosiin 2013–2023.

Menetelmänä narratiivinen kirjallisuuskatsaus ei aseta tiukkoja sääntöjä aineiston valinnalle. Lopullinen lähdemateriaali valittiinkin harkinnanvaraisesti ja ilman aineiston sisältöä rajaavia kriteerejä. Valinnassa suosittiin alallaan arvostettujen tutkijoiden ja tutkimusryhmien runsaasti viitattuja artikkeleja. Tietokantahakujen lisäksi julkaisuja löydettiin jäljityshaulla, jossa artikkelien sisältö ja lähdeluettelot johdattivat uusiin aihepiireihin ja julkaisuihin.

Kirjallisuuskatsauksen lopulliseen aineistoon otettiin mukaan yhteensä 62 artikkelia. Artikkeleista 39 oli tyypiltään katsausartikkeleja, 18 tutkimusartikkeleja, neljä näkökulma-artikkeleja ja yksi lainsäädännöllinen ohjeistus. Aineisto on luetteloitu liitteen 2 taulukkoon.

### 3.6 Aineiston analysointi

Katsauksen ensimmäisessä vaiheessa mukaan valittuja artikkeleja analysoitiin aineistolähtöisesti. Niissä esiintyneitä teemoja ryhmiteltiin kahteen kategoriaan: 1) kudosteknologian sovelluksiin ja 2) haasteisiin. Keskeisimmät teemat pyrittiin tunnistamaan laskemalla ja vertailemalla niiden absoluuttista esiintymisfrekvenssiä aineistossa. Pelkkä maininta ei riittänyt, vaan aiheita oli käsiteltävä artikkelissa hivenen pintaa syvemältä. Yleisimmät sovellukset ja haasteet sekä niiden esiintymismäärät esitellään taulukossa 1.

Taulukko 1. Aineistossa useimmin esiintyneet sovellukset ja haasteet.

Sovellukset		Haasteet	
Kudostyyppi	Esiintyminen aineistossa (n)	Aihe	Esiintyminen aineistossa (n)
Iho	22	Vaskularisaatio	19
Luu ja rusto	19	Biomusteiden kehittäminen	18
Sydän	16	Solujen tuotanto	10
Maksa	12	Tulostusteknologia	10
Verisuonet	9	Etiikka	8

Suurimmassa osassa aineiston artikkeleja kudosteknologian sovelluksia tarkasteltiin kudostyypeittäin ja samaa luokittelua noudatetaan tässä kirjallisuuskatsauksessa. Useimmin käsitellyt kudostyyppit olivat iho (n = 22), luu ja rusto (n = 19), sydämen kudokset (n = 16) sekä maksan kudokset (n = 12). Muita aineistossa usein mainittuja kudoksia olivat verisuonet (n = 9), hermokudos (n = 8), lihaskudos (n = 6) sekä munuaisen (n = 4) ja silmän (n = 5) kudokset.

Haasteiden osalta aineistossa useimmin käsitellyt teemat olivat vaskularisaatio eli verisuoniston rakentaminen kudoksiin (n = 19), biomusteisiin liittyvät ongelmat (n = 18), solujen saatavuuteen ja viljelyyn liittyvät ongelmat (n = 10) sekä teknologiset haasteet (n = 10), kuten riittämätön tulostusresoluutio ja -nopeus. Lisäksi aineistossa nousi esiin etiikkaan (n = 8), regulaatioon (n = 5) ja kustannuksiin (n = 4) liittyvät haasteet.

Kirjallisuuskatsaukseen valittiin tarkasteltavaksi kolme yleisimmin esiintynyttä kudostyyppiä tai teemaa kummastakin kategoriasta. Kudostyyppien osalta käsitellään ihon, luun ja sydämen kudosten 3D-biotulostusta. Tunnistettujen haasteiden joukosta tarkasteltavaksi valittiin verisuoniston rakentaminen, biomusteiden kehitys ja solujen tuotanto.

## 4 Tulokset

Seuraavissa alaluvuissa paneudutaan edellä mainittujen kudosten 3D-biotulostukseen sekä ongelmiin, joita biotulostuksen kudosteknologisten sovellusten

kehityksessä on kohdattu. Esittelemällä kolmea keskeistä kudostyyppiä ja ongelmaa pyritään muodostamaan kokonaiskuva 3D-biotulostuksen nykytilasta. Aiheet täydentävät toisiaan ja ovat osin limittäisiä; esimerkiksi verisuoniston rakentamista käsitellään oman lukunsa lisäksi myös iho- ja luukudoksen yhteydessä.

Eri kudoksia käsittelevissä luvuissa esitellään biotulostuksessa käytettäviä menetelmiä, biomusteiden materiaaleja sekä tulostuksen kudostyypin erityispiirteitä. Jokaisen kudostyypin yhteydessä nostetaan esiin myös yksittäisiä tutkimuksia, joissa on saavutettu erityisen merkittäviä tuloksia tai jotka muutoin edustavat hyvin kudokselle tyypillisiä tulostusmenetelmiä. Haasteita käsittelevissä luvuissa taas paneudutaan tunnistettujen ongelmien syihin ja seurauksiin sekä nostetaan esiin tutkimuksissa kehitettyjä mahdollisia ratkaisuja.

## 4.1 Kudosteknologian sovellukset

### 4.1.1 Iho

Iho suojaa elimistöä ulkoisilta uhkilta ja on siksi altis monenlaisille vaurioille. Sillä on myös tärkeitä fysiologisia tehtäviä, kuten tuntoaistin välittäminen, kehon lämmönsäätely ja elimistön suojaaminen kuivumiselta. [36.] Autologisten ihosiirteiden käyttöä rajoittaa saatavuus, kun taas allograftit voivat aiheuttaa potilaassa hylkimisreaktioita. Vaurioituneen ihon korvikkeeksi on kehitetty myös sekä soluttomia että soluja sisältäviä keinotekoisia siirteitä. Yleensä ne eivät kuitenkaan täytä riittävän hyvin ihokudoksen toiminnallisia vaatimuksia. [37.]

Ohuen ja selkeän kerroksittaisen rakenteensa sekä tulostuksessa tarvittavien solujen hyvän saatavuuden ansiosta iho on otollinen kohde 3D-biotulostuksen sovellusten kehittämiseen [26]. Kudosteknologiassa on yleensä pyritty jäljittelemään ihon kaksikerroksista rakennetta, johon kuuluvat ulompi orvaskesi eli *epidermis* ja sisempi verinahka eli *dermis*. Toisinaan ihon rakenteeseen luetaan myös rasvasoluista koostuva ihonalaiskerros eli *hypodermis*. Ihanteellinen biotulostettu ihosiirre muistuttaa oikeaa ihoa sekä rakenteeltaan että biologisilta

ominaisuuksiltaan: siinä on oltava hiussuonistoa, hermosoluja, normaali pigmentaatio, karvatuppia sekä hiki- ja talirauhasia. [36.] Keinotekoisien ihon tulos- tukseen ja transplantointiin on kaksi lähestymistapaa. Ihokudos voidaan tulos- ttaa 1) laboratorioympäristössä myöhemmin transplantoitavaksi tai 2) hoitotilan- teessa suoraan potilaaseen. Jälkimmäisessä menetelmässä potilaan elimistö toimii bioreaktorina, jossa tulostettu kudos kehittyy toiminnalliseksi. [26.]

Ihokudoksen tulostuksessa käytetään yleisimmin pursotustekniikkaa, mutta lu- paavia tutkimustuloksia on saatu aikaan myös mustesuihku- ja laseravusteisella tulostuksella [38; 39]. Erityisesti haavanhoitoon liittyviä tutkimuksia varten on kehitetty myös pieniä käsikäyttöisiä biotulostimia, joiden toiminta perustuu yleensä pursotustekniikkaan. Käsikäyttöiset laitteet ovat edullisia ja helposti kul- jetettavia, mutta niiden tulostusresoluutio on alhainen, ja usein niiden käsittely vaatii käyttäjältä harjaantuneisuutta. [40.]

Ihokudoksen tulostuksessa käytettävät hydrogeelit koostuvat yleensä luonnolli- sista biomateriaaleista, jotka ovat bioyhteensopivia ja biohajoavia. Biomusteisiin voidaan lisätä myös synteettisiä materiaaleja parantamaan tulostettavan ihora- kenteen mekaanisia ominaisuuksia. [36.] Ihon biomusteiden kehityksessä on saavutettu lupaavia tuloksia, jotka voivat osaltaan silottaa tietä kliinisiin tutki- muksiin. Liun ym. [38] in vitro -tutkimuksessa ihmisen istukasta ja napanuorasta eristettyjä soluja kapseloitiin alginaatista ja gelatiinista koostuvaan hydrogeeli- seokseen. Pursotustekniikalla tulostetun kaksikerroksisen ihorakenteen solujen viabiliteetti säilyi korkeana (yli 95 %) kuuden vuorokauden viljelyjakson ajan. Hydrogeelin koostumus ja tulostusolosuhteet optimoitiin erilliseen mekaaniseen testiin, jossa monimutkaisetkin tulosteet säilyttivät muotonsa ilman ylimääräisiä tukirakenteita. [38.]

3D-biotulostuksen ja muiden kudosteknologian menetelmien turvallisuutta ja te- hoja tutkitaan usein koe-eläimillä suoritettavilla in vivo -kokeilla. Cubon ym. [41] läpimurtotutkimuksessa pääosin fibriinistä sekä fibroblasti- ja keratinosyyttiso- luista koostuvasta biomusteesta tulostettiin kaksikerroksista ihokudosta, joka transplantoitiin laboratoriohiiriin. Integroiduttuaan ympäröivään kudokseen

tulostettu ihorakenne muistutti ihmisen ihoa sekä silmämääräisesti että tarkemmissa histologisissa tutkimuksissa. Immunofluoresenssikuvantamisen avulla havaittiin, että siirteen rakenne muistutti erittäin tarkasti aitoa ihokudosta ja että sen verinahkaan oli muodostunut hiussuonistoa. Tutkimuksessa käytetty pur-sotusmenetelmä oli myös nopea: neliömetrin kokoisen ihokappaleen tulostus ja hydrogeelin stabiloituminen kesti alle 35 minuuttia. [41.]

Iho on ohut ja verisuonistoltaan melko yksinkertainen elin. Hapen ja ravintoai-neiden kulkeutuminen kudoksen soluihin on silti tärkeää myös ihosiirteissä. Ihon verisuonistoa on tutkimuksissa rakennettu eri tavoin, kuten lisäämällä biomu-steisiin hiussuoniston muodostumista edistäviä kasvutekijöitä sekä istuttamalla verisuonten endoteelisoluja tulostettuihin suonistokanaviin. [36.] Baltazarin ym. [42] tutkimuksessa käytettiin hyväksi endoteelisolujen kykyä muodostaa itsenäi-sesti verisuonirakenteita. Tutkijaryhmä tulosti kaksikerroksisia ihosiirteitä kolla-geenipohjaisesta hydrogeelistä ja neljästä eri solutyypistä. Tulosteet upotettiin in vitro -olosuhteissa kasvatusliuokseen, joka edesauttoi endoteelisolujen järjes-täytymistä mikrovaskulaariseksi verkostoksi. Kun ihosiirteet transplantoitiin labo-ratoriohiiriin, itsenäisesti muodostunut suoniverkosto yhdistyi nopeasti siirrettä ympäröivään hiiren hiussuonistoon. [42.]

Iho sisältää tusinan verran solutyyppejä, jotka yhdessä vastaavat sen raken-teesta ja toiminnoista [36]. Esimerkiksi keratinosyytit tukevoittavat ihoa ja sääte-levät sen solujen jakaantumista ja erilaistumista, kun taas fibroblastit tuottavat soluväliainetta ja tekevät ihosta venyvän ja kestävä [41]. Toistaiseksi ihon koostumusta ja rakennetta on jäljitelty tarkimmin Jorgensenin ym. [37] tutkimuk- sessa, jossa käytettiin peräti kuutta solutyyppeä. Tutkimusryhmä tulosti pur- sotustekniikalla fibrinogeenipohjaisia kolmikerroksisia ihorakenteita, joihin kuului orvaskeden ja verinahan lisäksi myös pääosin adiposyyttirasvasoluja sisältävä ihonalaiskerros. Keratinosyyttien, fibroblastien ja rasvasolujen lisäksi ihotulos- teet sisälsivät melanosyyttejä pigmentaatiota varten, endoteelisoluja verisuonis- ton muodostumiseen sekä ihon karvatuppien soluja. 56 vuorokauden pituisen in vitro -jakson jälkeen tulosteessa oli silmin havaittavaa pigmentaatiota ja sen kolme kerrosta olivat säilyneet selkeästi eriytyneinä. [37.]

Tutkimuksen in vivo -osuudessa ihosiirteitä transplantoitiin laboratoriohiiriin tehtyihin haavoihin. Siirteet integroituivat ympäröivään kudokseen, nopeuttivat huomattavasti haavan umpeutumista ja vähensivät ihon kiristymistä sen parantuksessa. Uuteen ihoon havaittiin myös muodostuneen haavan paranemiselle olennaista hiusverisuonistoa. Tutkimuksessa suoritettiin myös proof-of-concept-koee, jossa sikojen nahkaan transplantoitiin samoin menetelmin tulostettuja täysin autologisia ihosiirteitä. Neljästä solutyypistä koostuvat fibrinogeenipohjaiset siirteet edistivät tehokkaasti haavojen parantumista. Paranemisen aikana solujen muodostama soluväliaine muistutti terveen ihon soluväliainetta, mikä ehkäisee paranevan ihon kiristymistä. [37.]

#### 4.1.2 Luu

Luu on heterogeeninen komposiittimateriaali, joka koostuu suurelta osin mineraalisesta hydroksiapatiitista ja kollageenista [43]. Se on yksi ihmisen harvoista kudostyypeistä, joilla on kyky parantua itsenäisesti uusiutumalla [44]. Suuria luuvaurioita keho ei kuitenkaan kykene itse korjaamaan, jolloin vahingoittunut kudos on korvattava erilaisilla siirteillä tai hoidettava muilla kirurgisilla toimenpiteillä [45]. Luu onkin transplantoituin kiinteä kudostyyppi [26].

Auto- ja allograftien käyttöä hankaloittavat muun muassa heikko saatavuus, leikkausinfektiot, hylkimisreaktiot ja kudoksen riittämätön uusiutumiskyky [43]. Keinotekoisissa luuimplanteissa tähän asti käytetyt synteettiset biomateriaalit taas eivät yleensä muistuta rakenteellisesti aitoa luukudosta, eivätkä ne siten integroidu riittävän hyvin ympäröivään kudokseen [46]. Usein solut myös istutetaan luuvalmisteisiin jälkeinpäin, jolloin rakenteet eivät välttämättä ole riittävän tasakoosteisia eivätkä solut kiinnity niihin kovin tehokkaasti. [26]. Perinteiset synteettiset implantit voivat lisäksi aiheuttaa potilaan kehossa lukuisia ongelmia, kuten infektioita, pehmytkudoksen kuoliota sekä implantin heikosta istuvuudesta johtuvia komplikaatioita [47].

3D-biotulostuksen avulla on mahdollista valmistaa potilaskohtaisia siirteitä, jotka jäljittelevät tarkasti luun huokoista rakennetta. Koska valmistusprosessissa

käytettävät solut lisätään jo biomusteeseen, siirteiden koostumus voi myös olla muita menetelmiä homogeenisempi. Solut ja muut biomateriaalit voidaan sijoitella tulostettavaan luurakenteeseen tarkasti, mikä tekee siirteistä aiempaa biomimeettisempiä ja mahdollistaa esimerkiksi verisuoniston rakentamisen. [46.]

Luukudoksen tulostukseen soveltuvien biomusteiden kehittäminen on haastavaa. Musteen on oltava tulostettavaa, ja samalla tulostetun rakenteen täytyy vastata luun mekaanisia ja biologisia ominaisuuksia [45]. Luun mekaanisten ominaisuuksien jäljentäminen onkin ongelma, jota ei vielä ole onnistuttu selättämään. Luonnollisista polymeereistä koostuvat tulosteet ovat usein liian heikkoja. Helpommin muovattavat synteettiset polymeerit puolestaan voivat olla biohyteensopimattomia tai tuottaa haitallisia hajoamistuotteita [48]. Luonnollisten hydrogeelien mekaanisia ominaisuuksia on yritetty vahvistaa esimerkiksi termoplastisilla polymeereillä, keraamisilla biomateriaaleilla ja nanokuiduilla [49].

Luun biotulostuksessa oleellisia termejä ovat materiaalien *osteokonduktiivisuus* ja *osteoinduktiivisuus*. Osteokonduktiivisten materiaalien koostumus ja rakenne tukevat uuden luukudoksen muodostumista, kun taas osteoinduktiiviset materiaalit edistävät kantasolujen erilaistumista luuta muodostaviksi osteoblastisoluiksi. [45.]

Osteoinduktiivisuutta ja uuden luukudoksen muodostumista tehostetaan lisäämällä musteisiin biologisia kasvutekijöitä. Yleisimmin käytettyjä kasvutekijöitä ovat BMP-2 (engl. *bone morphogenetic protein*), joka tehostaa solujen osteogeenistä erilaistumista, ja VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), joka edistää luun muodostumiselle tärkeää angiogeneesiä eli verisuonten uudismuodostumista. [45.] Yleisimpiin osteokonduktiivisuutta edistäviin materiaaleihin kuuluvat puolestaan hydroksiapatiitti ja trikalsiumfosfaatti, joita oikeakin luu sisältää. Niitä ja muita keraamisia yhdisteitä käytetään usein myös kohentamaan tulostettavien luurakenteiden mekaanisia ominaisuuksia. [46.]

Merilevästä saatava alginaatti on yleisin luun tulostuksessa käytettävä luonnollinen polymeeri [mm. 45; 46; 47]. Alginaatti soveltuu hyvin kudosteknologian

sovelluksiin, sillä sen polymeerirakenne voidaan silloittaa useilla eri mekanismeilla. Muita usein käytettäviä luonnollisia polymeerejä ovat gelatiini, kitosaani, kollageeni ja hyaluronihappo [45].

Oikean luun tavoin myös biotulostetun luukudoksen tulisi sisältää useita eriläisiä solutyyppejä, jotka yhdessä muodostavat kudostyypille ominaisen rakenteen ja toiminnallisuuden [46]. Tutkimuksissa luuta muodostavina soluina käytetään usein eläinperäisiä osteoblastityypisiä solulinjoja tai ihmisestä eristettyjä mesenkymaalisia kantasoluja ja iPS-kantasoluja. Verisuoniston muodostamiseen taas hyödynnetään usein ihmisen napanuoran verisuonten endoteelisoluja. [45.]

Tutkimuksissa luukudoksen biotulostuksessa käytetään usein pursotustekniikkaa, koska siihen on saatavilla laaja valikoima koostumukseltaan ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan erilaisia biomusteita. Useita suuttimia käyttämällä voidaan samanaikaisesti tulostaa useampia biomusteita ja materiaaleja. [45.] Tällöin voidaan tulostaa monikerroksisia rakenteita, joiden ydinosa koostuu esimerkiksi mekaanisilta ominaisuuksiltaan helposti muokattavasta synteettisestä materiaalista, kun taas kuoriossa koostuu soluista ja bioyhteesopivasta luonnollisesta hydrogeelistä. [46.]

Luussa on tiheä verisuonisto, jolla on kudoksen aineenvaihdunnan, uusiutumisen ja vaurioiden parantumisen kannalta oleellinen rooli. Verisuoniston muodostuminen onkin oleellinen osa osteogeneesiä eli uuden luukudoksen kasvua. [44.] Muiden kudostyyppien tavoin verisuoniston rakentaminen on ollut iso ongelma myös luun 3D-biotulostuksen kehityksessä. Lupaavia tutkimustuloksia on kuitenkin saavutettu.

Shenin ym. [50] tutkimuksessa rakennettiin verisuonistoa sisältävää luukudosta menetelmällä, jota voidaan kenties tulevaisuudessa hyödyntää suurten luuvaurioiden korjaamiseen. Tutkimuksessa kahta erilaista biomustetta pursotettiin vuoroviivoin kerroksittaiseksi ristikkorakenteeksi. Ensimmäinen, gelatiinipohjainen muste sisälsi mesenkymaalisia kantasoluja, jotka myöhemmin erilaistettiin in vitro -menetelmin luusoluiksi. Tulostuksen yhteydessä musteen



gelatiinikomponentti silloitettiin sinisellä valolla, jolloin tuloste jähmettyi suunnitelmallin mukaiseksi rakenteeksi. Toinen muste koostui synteettisestä polymeeriseoksesta ja verisuonten endoteelisoluista, jotka kiinnittyivät gelatiinirakenteen pinnoille. Muste toimi väliaikaisena, niin kutsuttuna uhribiomusteena, jonka lämpönsensitiivinen polymeerikomponentti poistettiin sulattamalla. Lopputulos oli siis gelatiinipohjainen rakenne, johon oli muodostunut endoteelisolujen pinnoittamia suonikanavia. [50.]

In vitro -kokeissa havaittiin, että ryhmän kehittämä menetelmä edisti sekä verisuoniston muodostumista että kantasolujen osteogeenistä erilaistumista. Tutkimuksen in vivo -osuudessa todettiin lisäksi, että laboratoriorottiin transplantoitujen luusiirteiden vaskularisaatio tehosti merkittävästi vammojen parantumista ja uuden luukudoksen muodostumista. [50.]

Aiemmissa in vivo -tutkimuksissa on havaittu, että luusiirteiden verisuoniston muodostumisen ja suonten välisten yhteyksien rakentumisen kannalta on tärkeää, että angiogeneesi edeltää osteogeneesiä [51]. Chiesan ym. [52] tutkimuksessa saavutettiin kuitenkin lupaavia tuloksia menetelmällä, jossa luukudosta muodostettiin jo ennen suonten endoteelisolujen istuttamista biotulostettuihin rakenteisiin. Pursotustekniikalla tulostettuun gelatiini- ja hydroksiapatiittipohjaiseen rakenteeseen istutettiin ihmisen reisiluusta eristettyjä kantasoluja, joiden annettiin erilaistua osteogeenisesti kahden viikon ajan. Tämän jälkeen luurakenteen huokokset täytettiin endoteelisoluja sisältävällä hydrogeelillä. Toisen kahden viikon in vitro -jakson jälkeen endoteelisolut olivat muodostaneet tulosteeseen yhtenäisiä hiussuonten verkostoja ja myös huokoisen luukudoksen muodostuminen oli ollut tehokasta. [52.]

#### 4.1.3 Sydämen kudokset

Noin 30–40 prosenttia sydämen soluista on uusiutumiskyvyltään erittäin rajallisia sydänlihassoluja eli kardiomyosyyttejä. Ne sijaitsevat sydänlihaksessa eli myokardiumissa, joka on sydämen seinämän keskimäinen ja paksuin kerros. Koska kardiomyosyyttien uusiutumiskyky on heikko, sydänlihas ei kykene itse

korjaamaan esimerkiksi sydäninfarktin aiheuttamia vaurioita. Kuollut kudokse korvautuu kollageeniarpikudoksella, joka heikentää sydämen toimintaa. Vakavien sydänlihaskudosten vaurioiden hoitokeinot ovat rajalliset, joten keinotekoiselle sydänkudokselle on selkeä tarve. [53.]

Runsaasti tutkittu 3D-biotulostuksen sovellus sydämen kudosten saralla ovat sydänlaastarit (engl. *cardiac patch*), joista toivotaan uutta hoitomuotoa vakaville sydänlihaksen vaurioille. Sydämen pinnalle kiinnitettävät laastarit voivat esimerkiksi tukea sydäninfarktissa vaurioitunutta sydänlihaskudosta mekaanisesti tai välittää vaurioalueelle soluja, lääkkeitä ja biologisia kasvutekijöitä. [54.]

Jangin ym. [55] tutkimuksessa selvitettiin tulostettujen laastarien tehoa sydäninfarktin hoidossa. Biomusteena käytettiin eläinperäistä, soluista puhdistettua soluväliainetta, joka sisälsi mesenkymaalisia kantasoluja ja erilaistumiskykyisiä hCPC (engl. *human cardiac progenitor cell*) -sydänsoluja. In vivo -kokeiden tulokset osoittivat biotulostettujen laastarien voivan muun muassa vähentää infarktialueen laajentumista ja arpikudoksen muodostumista, edistää sydänlihaksen uusiutumista sekä lisätä sydämen toimintaa tukevan verisuoniston muodostumista. [55.]

Sydänlihaksen sähköinen toiminta asettaa erityisvaatimuksia sydämen kudosten biotulostuksessa käytettäville materiaaleille. Yleisimpien hydrogeelien sähköjohtavuus on usein heikko, mikä voi hidastaa aktiopotentiaalien etenemistä tulostetuissa sydänkudoksissa [56]. Tutkimuksissa biomusteisiin onkin lisätty erilaisia konduktiivisuutta parantavia materiaaleja, kuten synteettisiä polymeerejä, nanokuituja ja hiilinanoputkia [57]. Zhun ym. [56] tutkimuksessa gelatiinipohjaiseen musteeseen lisättiin kullasta valmistettuja noin 35 nanometrin pituisia nanosauvoja. Tulostetussa sydänlihasrakenteessa havaittiin muun muassa tehostunutta synkronista supistelua, sähköisen impulssin etenemistä ja kardiomyosyyttien kiinnittymistä hydrogeelirakenteeseen [56].

Sydänlihaksen korkea solutiheys rajoittaa käytettävissä olevia tulostusmenetelmiä. Mustesuihku- ja laseravusteiset tulostusmenetelmät soveltuvat kehnosti

viskositeetiltaan ja solutiheydeltään korkeiden biomusteiden tulostukseen, joten tutkimuksissa käytetään usein pursotustekniikkaa. [57.] Hankaluuksia tuottaa myös sydämen monimutkainen rakenne. Painovoiman hajottavan vaikutuksen vuoksi onttoja osia sisältävien kudsmallien biotulostus on vaikeaa. Ongelman ratkaisuksi on kehitetty menetelmä, joka hyödyntää niin kutsuttua tukikylpyä (engl. *support bath*), joka pitää monimutkaiset rakenteet koossa tulostuksen ajan. Nimellä FRESH (engl. *freeform reversible embedding of suspended hydrogels*) tunnetussa menetelmässä tulostettavat rakenteet pursotetaan geelimäiseen kylpyyn, joka sulatetaan tulostuksen jälkeen esimerkiksi lämpötilaa säätämällä, jolloin jäljelle suunnittelumallin mukainen silloitettu rakenne. [58.]

FRESH-menetelmää käytettiin Leen ym. [59] tutkimuksessa, jossa tulostettiin kollageenipohjaisesta biomusteesta anatomisesti tarkkoja ja toiminnallisia malleja sydämen eri osista, kuten kammioista, kolmiliuskeläpystä ja verisuonista. Tulostettavat rakenteet pursotettiin gelatiinipohjaiseen tukikylpyyn, jonka ph-taso silloitti biomusteen kollageenin. Gelatiinikylpy sulatettiin lämmön avulla, jolloin lopputuloksena olivat suunnittelumallien mukaiset sydänkudusrakenteet. Tulostetuissa kammioissa havaittiin in vitro -jakson aikana sydämelle ominaista sähköistä toimintaa ja spontaania supistelua. Oikean sydämen tapaan kammiot myös laajentuivat systolen aikana. Lisäksi tutkimuksessa havainnollistettiin suurempien ja monimutkaisten elinten rakentamista tulostamalla anatomisesti tarkka vastasyntyneen vauvan sydämen kokoluokkaa vastaava kollageenisydän. [59.]

Ihanteellisessa tilanteessa 3D-biotulostuksessa käytettävä muste sisältää autologisia primaarisoluja, jolloin immunologisen reaktion riski pienenee [27; 60]. Solujen saatavuuden ja viljelyn haasteiden takia primaarisolujen käyttö sydänlihassirteiden biotulostuksessa ei kuitenkaan ole mahdollista. Sydänlihaksen solutiheys on moniin muihin kudoksiin verrattuna korkea, ja suurempiin tulosteisiin tarvitaan miljardeja kardiomyosyyttejä. [61.] Kardiomyosyyttien heikon uusiutumiskyvyn vuoksi sydänkudoksen tulostuksessa käytetään usein kantasoluista, kuten iP5-soluista, erilaistettuja sydänlihassoluja. [57.]

Noorin ym. [60] proof-of-concept-tyyppinen tutkimus osoitti, että nykyisillä biotulostusmenetelmillä on mahdollista valmistaa täysin autologisia vaskularisoituneita sydänlaastereita. Tutkimuksessa hyödynnettiin isosta vatsapaidasta (lat. *omentum major*) otetusta näytteestä eristettyjä rasvasoluja ja soluista puhdistettua dECM (engl. *decellularized extracellular matrix*) -soluväliainetta. Kudoslaastarin biomustetta varten rasvasolut uudelleenohjelmoitiin iPS-soluiksi ja erilaistettiin kardiomyosyyteiksi. [60.]

Tutkimuksessa luotiin tietokonetomografian ja CAD-ohjelmiston avulla sydänlaastarimallinnos, jonka koko ja verisuoniston rakenne vastasivat potilaan sydämen vasemman kammion anatomiaa. Laastari tulostettiin käyttäen kahta mustetta, joista toinen oli sydänlihassoluja sisältänyt dECM-biomuste ja toinen endoteelisoluja sisältänyt gelatiinipohjainen uhrimuste. Mallinnoksen mukainen laastari suonistorakenteineen luotiin pursottamalla biomusteita kerroksittain, minkä jälkeen dECM-rakenteet silloitettiin lämpötilaa nostamalla. Korkeamman lämpötilan nesteyttämä gelatiiniseos huuhdottiin pois, jolloin tulosteeseen muodostui endoteelisolujen pinnoittamia onttoja verisuonikanavia. [60.]

Kupferin ym. [62] tutkimuksessa tulostettiin kaksikammioinen sähköisesti ja mekaanisesti toiminnallinen sydänrakenne, joka supisteli spontaanisti ja kykeni oikean sydämen tavoin pumppaamaan nestettä lävitseen. Leen ym. [59] tutkimuksen tavoin rakenne tulostettiin FRESH-menetelmällä gelatiinipohjaiseen tukikylpyyn. Erityisen merkittäväksi tutkimuksen tekee menetelmä, jolla tulosteessa tarvittavat kardiomyosyytit tuotettiin. Biomusteen iPS-solut erilaistettiin sydänsoluiksi vasta tulostuksen ja sitä seuranneen in vitro -viljelyjakson jälkeen. Kantasolujen annettiin ensin lisääntyä ja saavuttaa haluttu solutiheys tulostetussa sydänlihaskäytössä, minkä jälkeen ne erilaistettiin kardiomyosyyteiksi. [62.]

## 4.2 3D-biotulostuksen haasteet

### 4.2.1 Verisuoniston rakentaminen

Suurin osa ihmisen kudoksista on täynnä hiussuonia eli kapillaareja, jotka välittävät kudoksiin happea ja ravintoaineita. Kun kudosten solujen etäisyys verisuoniin ylittää 100–200 mikrometriä, solut eivät saa tarvitsemiaan aineita ja kuolevat. Ilman toimivaa verenkiertoa keinotekoisien kudosten paksuus rajoittuu siis muutamain sataan mikrometriin. [26; 63.] Hierarkkisesti järjestyneen verisuoniston rakentaminen on ollut pitkään 3D-biotulostuksen suurimpia haasteita. Viime vuosina tutkimuksessa on kuitenkin otettu merkittäviä edistysaskelia. [64.]

Verisuonten halkaisijat vaihtelevat hiussuonten muutamista mikrometreistä aortan ja suurten laskimoiden useisiin senttimetreihin. Suonet eroavat toisistaan paitsi kooltaan myös rakenteeltaan. Hiussuonet koostuvat vain yhdestä endoteelisolukerroksesta, kun taas valtimoissa ja laskimoissa on kolme erilaisesta kudoksesta rakentuvaa kerrosta. [65.] Rakenteellisen vastaavuuden lisäksi 3D-biotulostettujen suonten on täytettävä koko joukko biologisia ja mekaanisia vaatimuksia. Bioyhteensopivuuden lisäksi suoniston on esimerkiksi kyettävä kuljettamaan ja välittämään soluihin kudosten tarvitsemia aineita sekä sietämään veren virtauspaineen aiheuttamaa räsitusta. [66.]

Tutkimuksissa biotulostettaviin kudoksiin on rakennettu verisuonistoa kahdella tavalla. Ensimmäinen perustuu verisuonten uudismuodostumiseen eli angiogeneesiin, joka on alkionkehityksen aikana tapahtuvan vaskulogeneesin ohella toinen suonten luonnollisista syntymekanismeista [26]. Angiogeneesiä hyödyntävässä tulostuksessa biomuste sisältää verisuonten endoteelisoluja ja biologisia kasvutekijöitä, jotka stimuloivat soluja toimintaa ja edistävät niiden autonomista järjestäytymistä. Menetelmässä suonirakenteita ei siis tulosteta suoraan, vaan tulosteen soluja ohjataan kasvutekijöiden avulla itse järjestäytymään toiminnalliseksi suonistoksi. [67.]

Koska angiogeneesin mekanismit eivät ole riippuvaisia tulostustekniikan tarkkuudesta, siihen nojaava menetelmä soveltuu erityisesti hiussuoniston

muodostamiseen [7]. Toisaalta endoteelisolujen kiinnittyminen tulostettuun rakenteeseen ja toiminnallisten suonten kehittyminen voi kestää useita viikkoja, eivätkä tulostetun kudoksen solut säily kauaa elossa ilman happea [68]. Keinotekoisissa kudoksissa hapen ja ravintoaineiden siirtyminen hiussuonista soluihin on yleensä hitaampaa kuin kudosten hapenkulutus, mikä heikentää entisestään solujen selviytymismahdollisuuksia [26]. Ratkaisuksi ongelmaan on kehitetty happea tuottavia biomusteita, jotka auttavat soluja selviämään hiussuonten ja verenkierron kehittymiseen asti [69].

Toiseen lähestymistapaan, suonten varsinaiseen tulostamiseen, on vakiintunut kaksi erilaista menetelmää. *Suorassa* menetelmässä tulostetaan biomusteesta onttoja suonirakenteita, kun taas *epäsuorassa* menetelmässä hyödynnetään uhrimustetta, joka tulostetaan yhdessä muiden biomusteiden tai -materiaalien kanssa. Kun suunnittelumallin mukainen rakenne on tulostettu, uhrimuste poistetaan esimerkiksi sulattamalla. Tällöin tulosteeseen muodostuu onttoja kanavia, joihin voidaan istuttaa verisuonten rakenteelle ja toiminnolle keskeisiä endoteelisoluja. Vaihtoehtoisesti soluja voidaan lisätä jo uhrimusteeseen. [70.]

Tutkimuksissa verisuonia on rakennettu monilla eri tulostustekniikoilla. Nykyisten tekniikoiden tulostustarkkuus on kuitenkin liian matala pienimpien suonten tulostamiseen. Hiussuonten halkaisijat vaihtelevat tyypillisesti 5–10 mikrometrin välillä, kun taas tulostettujen suonirakenteiden halkaisijat eivät yleensä alita satua mikrometriä. [67.] Isompien suonten tulostuksessa on saatu aikaan lupaavia tuloksia käyttämällä koaksiaalista pursotustulostusta, joka mahdollistaa useiden biomusteiden samanaikaisen tulostuksen yhdestä suuttimesta. Koaksiaalisten tulostuspäiden ja suuttimien avulla voidaan pursottaa monikerroksisia putkimaisia tulosteita, joissa solujen ja materiaalien sijoittelu jäljittelee tarkasti luonnollisten verisuonten rakennetta ja koostumusta. [71.]

Gao ym. [72] käyttivät koaksiaalista tekniikkaa tutkimuksessaan, jossa tulostettiin useita erikokoisia verisuonia endoteelisoluja sisältävästä alginaattipohjaisesta biomusteesta. Suonten ydinmateriaalina käytettiin uhrimusteena toiminnutta polymeeriseosta, johon oli lisätty kalsiumioneja silloittamaan suonten

seinämien alginaattirakenne. In vitro -tutkimuksissa havaittiin, että tulostetuilla suonilla oli monia luonnollisten verisuonten olennaisia ominaisuuksia, kuten valikoiva solukalvon läpäisevyys, hiussuoniston muodostaminen sekä kyky kestää mekaanista rasitusta. [72.]

Gao ym. [73] hyödynsivät koaksiaalista tekniikkaa myös toisessa tutkimuksessaan, jossa tulostettiin sisähalkaisijaltaan ihmisen sepelvaltimon paksuisia kaksoisrakenteita. Tulostuksessa käytettiin suutinta, jolla voitiin pursottaa samanaikaisesti kolmea biomateriaalia. Suonirakenteen sisempi ja ulompi kerros koostuivat soluista puhdistetusta soluväliaineesta ja alginaatista sekä endoteelisoluista ja sileistä lihassoluista. Kuten edellisessäkin tutkimuksessa, ytimen uhrimuste sisälsi kalsiumioneja, jotka silloittivat kemiallisesti biomusteiden alginaattikomponentin. In vivo -kokeessa suonirakenteet transplantoitiin kolmen viikon ajaksi laboratoriorotilta poistetun vatsa-aortan tilalle. Siirteet integroituivat tehokkaasti kohteen suoniin, veren virtaus oli normaalia ja suonten endoteeli säilyi eheänä koko koejakson ajan. [73.]

Epäsuoraa tulostusmenetelmää edustaa Skylar-Scottin ym. [63] tutkimus, jossa rakennettiin erilaisia vaskularisoituneita kudoksia tutkijaryhmän kehittämällä SWIFT (engl. *sacrificial writing into functional tissue*) -tekniikalla. Tutkimuksessa iPSC-soluista erilaistetuista soluaggregaateista ja luonnollisista polymeereistä valmistettiin kudostyyppikohtaisia hydrogeeliseoksia, joihin tulostettiin verisuonirakenteita gelatiinisesta uhrimusteesta. Tulostuksen lopuksi geelimäinen gelatiini sulatettiin ja huuhdottiin pois, jolloin kudoksiin muodostui onttoja suonikanavia. Kanavissa kierrätettiin endoteelisoluseosta verisuoniston pintojen endoteelin muodostamiseksi. [63.] Vaikka suonten endoteelikerros jäikin epätäydelliseksi, erilaisia soluaggregaatteja elinten rakennuspaikoina (engl. *OBB, organ building block*) hyödyntävää SWIFTiä pidetään lupaavana menetelmänä vaskularisoituneiden ja kooltaan skaalattavien kudosten valmistamiseen [7; 63; 65].

Ylempänä ja aiemmissa luvuissa esitellyt tutkimukset ovat esimerkkejä edistyksistä, jota on tapahtunut sekä suurempien verisuonten tulostuksessa että hiussuoniston muodostamisessa angiogeneesin kautta. Hankalampaa onkin

rakentaa toiminnallinen verisuoniverkosto, johon kuuluu sekä kookkaampia suonia että hiussuonistoa [70].

Seymour ym. [74] hahmottelevat artikkelissaan mahdollista taktiikkaa hierarkkisen verisuoniverkoston muodostamiseen. Ensin suoniverkoston perustaksi tulostetaan pursotustekniikalla onteloita, jotka vastaavat halkaisijaltaan pikkuvaltimoita ja -laskimoita. Tulostuksessa voidaan hyödyntää esimerkiksi uhrimusteita, koaksiaalista tekniikkaa tai FRESH-menetelmää, joka esiteltiin luvussa 4.1.3. Tulostuksen jälkeen suonikanavien sisäpuolet pinnoitetaan endoteelisoluilla. Verisuoniston muodostumisen kannalta oleellista on valita biomusteeseen materiaaleja, jotka edesauttavat endoteelisolujen tehokasta kiinnittymistä ja jakautumista. [74.]

Hiussuoniston muodostumista taas edistetään ohjaamalla solujen ja muiden materiaalien välistä biokemiallista viestintää. Suonikanavan angiogeenistä haaurtumista voidaan stimuloida esimerkiksi lisäämällä materiaaleihin biologisia kasvutekijöitä, kuten aiemmin mainittua VEGF:ää, sekä aiheuttamalla hypoksiaa eli hapenpuutetta, joka aktivoi soluissa angiogeneesiä edistäviä HIF (engl. *hypoxia-inducible factor*) -kasvutekijöitä. [74.]

Seymourin ym. mallin mukaan hiussuoniston rakenteen vakautuminen ja kehittyminen toiminnalliseksi edellyttää in vitro -käsittelyä. Se voi tarkoittaa esimerkiksi endoteelisolujen ja muiden solutyyppeiden yhteisviljelyä, jossa jäljitellään verisuoniston luonnollista kehitysympäristöä. Suonikanavien kypsyttämisessä voidaan hyödyntää myös mikrofluidisia järjestelmiä, joissa virtaavan nesteen avulla tuotetaan kontrolloidusti suonten rakennetta ja toimintaa vahvistavia hemodynaamisia voimia. [74.]

#### 4.2.2 Biomusteiden kehittäminen

Biomusteiden kehittämiseen liittyvät ongelmat ovat merkittävä 3D-biotulostuksen kliinisten sovellusten toteutumista hidastava pullonkaula [26; 64]. Jotta tulostettua kudostetta voitaisiin käyttää siirteinä potilashoidossa, musteen



on täytettävä monia kudostyyppin mukaan vaihtelevia vaatimuksia. Musteelta vaaditut ominaisuudet ovat usein ristiriidassa keskenään, mikä tekee biomusteiden kehittamisestä erityisen haastavaa [25].

Biomusteen on ennen kaikkea oltava koostumukseltaan tulostettavaa. Termille *tulostettavuus* ei kuitenkaan vielä ole olemassa vakiintunutta määritelmää, mikä hankaloittaa tutkimuksissa käytettävien musteiden vertailua ja kehittämistä [30; 23]. Gillispian ym. [75] laajan määritelmän mukaan tulostettavuus on ”*materiaalin kyky tulostua tietyissä tulostusolosuhteissa siten, että tulostuksessa saavutetaan tarkoituksenmukaisia lopputuloksia.*” Naghieh ja Chen [23] taas määrittelevät sen ”*kyvyksi muodostaa biomusteesta säilyviä ja toistettavia 3D-tukirakenteita biotulostustekniikkaa käyttämällä.*” Tutkimuksissa tulostettavuuteen on liitetty laaja skaala erilaisia muuttujia musteen pursotettavuudesta sen biohajoavuuteen. Koska vakiintunut arviointiprotokolla puuttuu, tulostettavuutta on tarkasteltu puutteellisesti ja usein täysin kvalitatiivisesti. [75.]

Tulostusprosessin keskeisten parametrien, kuten silloittamismenetelmien sekä tulostuspaineen ja tulostusnopeuden, voidaan katsoa kuuluvan osaksi tulostettavuutta [23]. Tutkimuksissa biomusteen koostumuksen ja tulostusparametrien yhteisvaikutuksia on arvioitu lähinnä silmämääräisesti, ja tuloksia on pyritty parantamaan yrityksen ja erehdyksen kautta [76]. Koska tällaiset kokeilut ovat tehoittomia ja aikaavieviä, musteen koostumuksen ja tulostusprosessin optimointiin on kehitetty tekoälyratkaisuja. Tekoälymallien rakentamista ja hyödyntämistä hankaloittavat kuitenkin saatavilla olevan datan vähäinen määrä ja sen yhdenmukaisuuden puute. [77.]

Skardal [78] kuvailee artikkelissaan hypoteettista ”universaalialia biomustetta”, joka soveltuisi käytettäväksi laajasti eri solutyyppeiden ja tulostustekniikoiden kanssa. Skardalin mukaan tämän ihmemusteen tulisi täyttää seuraavat neljä vaatimusta:

- Sen tulisi koostua suureksi osaksi luonnollisesta soluväliaineesta kerätystä materiaalista.

- Sen mekaanisten ominaisuuksien tulisi mahdollistaa vaivaton tulos ilman tarvetta ulkoisille silloitussärsykkeille biomusteen rakenteen kovettamiseksi.
- Sen biokemiallisen koostumuksen tulisi olla helposti muovattavissa, esimerkiksi lisäämällä musteeseen solujen viestintää ja toimintaa tukevia molekyylejä.
- Tulostuksen jälkeen musteen mekaanisia ominaisuuksia, kuten jäykkyyttä tai elastista kerrointa, tulisi voida muovata vastaamaan haluttua kudostyyppiä. [78.]

Skardalin mainitsemaa soluväliainetta sisältäviä biomusteita käyttämällä onkin saavutettu lupaavia tutkimustuloksia [60; 73]. Jokaisella kudostyyppillä on omanlainen soluväliaineensa, joka muodostaa soluille suotuisan ja niiden toimintaa tukevan mikroympäristön. Biomusteita varten soluväliaineesta poistetaan solut, jolloin jäljelle jää kollageenisäikeistä, proteiineista, proteoglykaaneista sekä kasvutekijöistä koostuva dECM-soluväliaine [79]. dECM-pohjaiset musteet voivat olla merkittävästi muita biomateriaaleja bioyhteensopivampia, ja niitä käyttämällä onkin saavutettu solujen viabiliteetin kannalta erinomaisia tuloksia [24; 80].

Soluväliaineesta koostuvat musteet ovat bioyhteensopivuudeltaan ylivertaisia, mutta useimpien luonnollisten hydrogeelien tapaan niiden mekaaniset ominaisuudet ovat monien kudostyyppien vaatimuksiin nähden riittämättömät [24; 26; 80]. Tutkimuksissa dECM-pohjaisiin biomusteisiin lisätäänkin usein synteettisiä tai luonnollisia polymeerejä, jotka voivat parantaa musteen tulostettavuutta ja tulostettujen rakenteiden kestävyttä [81].

Tutkijoille harmaita hiuksia aiheuttavat myös musteiden materiaalien vaihtelevat hajoamisnopeudet. Musteen biohajoavuuden säätelyminen on välttämätöntä, jos tulostettua rakennetta on tarkoitus käyttää kudossiirteenä [4]. Solujen ja niiden tuottaman soluväliaineen tulisi ennen pitkää korvata siirteän hydrogeelikomponentti, joten biohajoavuuden tulisi vastata kudoksen uusiutumistahtia [25]. Luonnolliset, esimerkiksi dECM-pohjaiset hydrogeelit, saattavat hajota tarpeettoman nopeasti, mikä saattaa heikentää kudossiirteän mekaanisia ominaisuuksia [4]. Synteettisten polymeerien hajoamisnopeutta voidaan puolestaan

säädellä helpommin, mutta ne saattavat hajotessaan tuottaa soluille haitallisia aineita [31].

#### 4.2.3 Solujen tuotanto

Biomusteet voivat sisältää 10–20 miljoonaa solua millilitraa kohden, ja suuremman kudonvaurion korjaamiseen tarvittava solumäärä voi ylittää jopa 100 miljardia [64]. Eri kudosten 3D-biotulostusprosessin parametrien optimointi vaatii suuria määriä toistettuja kokeita ja tulostettuja kudoksia. Solujen puute onkin muodostunut merkittäväksi biotulostuksen kehitystä hidastavaksi tekijäksi. [82.] Tutkimuksia varten tarvittavat solumäärät kasvatetaan usein monikerroksisissa 2D-kasvatusalustoissa tai pienikokoisissa bioreaktoreissa, mikä on hidasta ja kallista. Jotta 3D-biotulostusta voitaisiin joskus hyödyntää kudosteknologian soveluksena potilashoidossa, valtaviin solumääriin tuottamiseen tarvitaan tehokkaampia ja edullisempia menetelmiä. [64.]

Bioreaktorien kehityksellä on ratkaiseva rooli solutuotannon skaalauksessa. Nykyisin yleinen tapa kasvattaa solujen määrää ovat pienehköt automatisoidut bioreaktorit, jotka ylläpitävät solujen lisääntymiselle suotuisia olosuhteita. Reaktoreissa voidaan kontrolloida soluviljely-ympäristön keskeisiä muuttujia, kuten lämpötilaa, pH-arvoa, happi- ja hiilidioksiditasoja sekä kasvatusliuoksen ravintoaineiden ja kasvutekijöiden pitoisuuksia. Toisin kuin monet perinteiset kasvatusalustat, bioreaktorit ovat suljettuja järjestelmiä, mikä pienentää merkittävästi kontaminaatoriskiä. [83.] Koska reaktorit ovat automatisoituja, tuotettujen soluerien välillä on myös vähemmän laadunvaihtelua ja prosessin työvoimakustannukset ovat alhaisemmat [84].

Ulkoisesti havaittavat ominaisuudet välittävät tärkeää tietoa solujen toiminnallisuudesta, joten solujen morfologian tarkka seuranta kasvatuksen aikana on oleellista tuotannon standardisoinnin ja tasalaatuisuuden kannalta. [84.] Markkinoilla olevat bioreaktorit – joita yleensä ei ole kehitetty varta vasten solujen tuotantoon – eivät kuitenkaan välttämättä anna riittävän tarkkaa ja reaaliaikaista tietoa solujen tilasta kasvatusjakson aikana [64]. Reaktorien sensorteknologian

kehittyminen olisikin oleellista tuotannon parametrien tarkkailun ja soluerien tasalaatuisuuden edistämiseksi [64; 85]. Tuotannon optimoimiseen on kehitetty myös tekoälymenetelmiä, jotka ennakoivat kasvatettavien solujen ominaisuuksia soluviljelmästä kerättävän datan perusteella. Kuva-analyysiin perustuvia koneoppimismenetelmiä on käytetty esimerkiksi solumäärän kasvun ennakoimiseen sekä solutyypin fenologian ja rakenteen tunnistamiseen. [84.]

Kun soluja ja niitä sisältäviä lääkinnällisiä valmisteita tuotetaan kliinisiin tutkimuksiin, potilashoittoon ja kaupallisiin tarkoituksiin, lainsäädännön vaatimukset kiristyvät. Euroopan unionin alueella solujen tuotantoon sovelletaan lääkkeitä ja ATMP (engl. *Advanced Therapy Medicinal Product*) -valmisteita koskevaa GMP (engl. *Good Manufacturing Practice*) -tuotanto-ohjeistusta [86]. GMP-ohjeistus pohjautuu riskiperusteiseen lähestymistapaan, jonka tavoitteena on varmistaa tuotannon laatu, turvallisuus ja tehokkuus [86]. Myös lainsäädäntö lisää siis tarvetta valmistusmenetelmille, joissa solujen kehitystä voidaan seurata tuotannon eri vaiheissa mahdollisimman tarkasti.

Solumäärien kasvattamisen lisäksi hankaluuksia aiheuttavat myös solujen ominaisuudet. Primaarisolujen heikon uusiutumiskyvyn ja niiden eristykseen ja viljelyyn liittyvien ongelmien takia 3D-biotulostuksessa käytetään usein pluripotenttejä kantasoluja, jotka voidaan erilaistaa halutuiksi solutyypeiksi. [28; 64.] Tutkimuksissa biomusteet sisältävät usein iPS-soluja, joita voidaan kerätä potilaasta autologisesti ja noninvasiivisesti, jolloin väistetään niin ikään pluripotentteihin alkion kantasoluihin liittyvät eettiset ja lainsäädännölliset kompastuskivet [87].

Erilaistumattomat iPS-solut ovat kuitenkin poikkeuksellisen alttiita haitoille, joita tulostusprosessin ulkoiset tekijät soluille aiheuttavat [64; 87]. Tulostustekniikan valinnalla onkin suuri vaikutus solujen viabiliteettiin. Erityisen haitallista on soluihin kohdistuva leikkausjännitys, jota voidaan pienentää muun muassa käyttämällä suuttimettomia tulostustekniikoita, halkaisijaltaan suurempia suuttimia tai pienentämällä tulostusnopeutta ja pursotuspainetta. [64.] Myös biomusteen koostumuksella ja sen polymeerirakenteen kovettamiseen käytetyllä

silloittamismenetelmällä, esimerkiksi lämpötilalla tai UV-valolla, voi olla suuri vaikutus solujen elinkykyisyyteen [87].

Pluripotenttien solujen hyödyntämistä biotulostuksessa hankaloittavat myös niiden turvallisuuteen liittyvät tekijät. Tutkimuksissa uudelleenohjelmoiduissa kantasoluissa on havaittu muun muassa haitallista geneettistä variaatiota, taipumusta kasvainten muodostamiseen sekä kehon immuunivasteen laukaisevia ominaisuuksia [88]. Kliinisiä kokeita, joissa iP5-soluja on transplantoitu potilaaseen, onkin toteutettu vain vähäisessä määrin [89]. Kehitteillä on kuitenkin monia uusia tuotantomenetelmiä, joilla pyritään lisäämään pluripotenttien solujen turvallisuutta ja tehostamaan niiden valmistusta [90].

## 5 Yhteenveto

Tässä insinööriyössä laadittiin yleiskatsaus 3D-biotulostukseen kudosteknologian menetelmänä. Tavoitteena oli muodostaa kuva tutkimuksen nykytilasta – sen saavutuksista ja ongelmakohdista. Kolme kudostyyppiä valittiin toimimaan esimerkkeinä, joiden kautta esiteltiin biotulostuksessa käytettäviä menetelmiä, materiaaleja ja mahdollisuuksia. Työssä kartoitettiin ja kuvailtiin myös hankaluuksia, jotka hidastavat 3D-biotulostuksen kehitystä.

Narratiivisessa kirjallisuuskatsauksessa pyrittiin haalimaan tietoa uusista mutta samalla runsaasti viitatuista lähteistä. On kuitenkin huomioitava, että suuri osa aineistosta on tyypiltään katsausartikkeleja, joissa tutkimustuloksia käsitellään väistämättä viipeellä. Lisäksi lienee syytä mainita, että insinööriyössä esiteltävä tietoa valittiin harkinnanvaraisesti ilman aiempaa perehtymistä 3D-biotulostukseen. Työtä laadittaessa pyrittiin parhaimman mukaan tunnistamaan asetelman synnyttämät riskit, kuten liiallinen yleistäminen, oleellisen tiedon sivuuttaminen tai tiedon esittäminen mittakaavaansa merkityksellisempänä.

Tässä insinööriyössä 3D-biotulostusta tarkasteltiin laajasta näkökulmasta, ja siksi monia teemoja on täytynyt sulkea pois tai käsitellä vain suppeasti. Aineistossa nousi esiin useita aihepiirejä, joita soisi tutkittavan syvällisemmin tulevaisuudessa.

opinnäytetöissä. Hyödyllistä olisi selvittää esimerkiksi tekoälymenetelmien yhdistämistä tulostusprosessin eri osa-alueiden optimointiin. Myös biotulostusta ja tulostettuja kudossiirteitä koskevaa regulaatiota ja lainsäädännöllistä kenttää olisi syytä kartoittaa.

Kuten on käynyt selväksi, 3D-biotulostus kehittyy vauhdilla, ja siihen liittyviä tutkimuksia julkaistaan yhä tiheämpään tahtiin. Kehitystä jarruttavat kuitenkin monet ongelmat, jotka on selätettävä ennen kuin menetelmä voidaan ottaa laajasti käyttöön kudosteknologian kliinisenä sovelluksena. Shapira ja Dvir [91] esittävät artikkelissaan tulevaisuudennäkymän, jossa 3D-biotulostuksesta ei olekaan ratkaisemaan maailmanlaajuisia elinpulaa, vaan sen kehitys kohtaa syystä tai toisesta ns. biologisen lasikaton. Tällöin biotulostuksesta voisi edelleen olla merkittävää hyötyä esimerkiksi lääketutkimuksessa, mutta suurimmat lupaukset jäisivät toisten kudosteknologian menetelmien lunastettaviksi.

Vaikka 3D-biotulostuksen kehityksen tielle onkin kylvetty esteitä, insinööriyön aineistosta välittyy tutkijoiden vankka usko menetelmän mahdollisuuksiin. Tiuhaan julkaistut läpimurtotutkimukset ovat omiaan lujittamaan luottamusta biotulostuksen tulevaisuuteen. Helmikuussa 2024 maailmalla on käynnissä kourallinen 3D-biotulostusta hyödyntäviä kliinisiä tutkimuksia. Etelä-Koreassa potilaalle on tarkoitus siirtää kantasoluista, rustosoluista ja hydrogeelistä tulostettu henkitorvi [92], ja Yhdysvalloissa potilaat ovat jo saaneet autologisista soluista biotulostettuja korvaimplantteja [93]. Kokeiden etenemistä on syytä seurata jännityksellä, sillä ensimmäisillä tutkimuksilla saattaa olla kliinisiä tuloksiaan suurempi merkitys 3D-biotulostuksen tulevaisuudelle.

## Lähteet

- 1 Elinluovutus- ja siirtotoiminnan ammattilaismateriaalia. 2023. Verkkomateriaali. HUS. <<https://www.hus.fi/ammattilaiselle/elinluovutus-ja-siirtotoiminnan-ammattilaismateriaalia>>. Luettu 14.9.2023.
- 2 Kivilinna, Kirsti. 2019. 3D-tulostettu sarveiskalvo oli läpimurto. Verkkoaineisto. Tampereen yliopisto. <<https://www.tuni.fi/fi/ajankohtaista/3d-tulostettu-sarveiskalvo-oli-lapimurto>>. 2.9.2019. Luettu 14.9.2023.
- 3 Khademhosseini, Ali & Langer, Robert. 2016. A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols*. Vol. 11, s. 1775–1781.
- 4 Ashammakhi, Nureddin; GhavamiNejad, Amin; Tutar, Rumeysa; Fricker, Annabelle; Roy, Ipsita; Chatzistavrou, Xanthippi; Hoque Apu, Ehsanul; Nguyen, Kim-Lien; Ahsan, Taby; Pountos, Ippokratis & Caterson, Edward J. 2022. Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B Reviews*. Vol. 28 (3), s. 633–664.
- 5 Murphy, Sean V. & Atala, Anthony. 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. Vol. 32 (8), s. 773–785.
- 6 Bishop, Elliot S.; Mostafa, Sami; Pakvasa, Mikhail; Luu, Hue H.; Lee, Michael J.; Wolf, Jennifer Moriatis; Ameer, Guillermo A.; He, Tong-Chuan & Reid, Russell R. 2017. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & Diseases*. Vol. 4 (4), s. 186–195.
- 7 Barrs, Ryan W.; Jia, Jia; Silver, Sophia E.; Yost, Michael & Mei, Ying. 2020. Biomaterials for Bioprinting Microvasculature. *Chemical Reviews*. Vol. 120 (19), s. 10887–10949.
- 8 Datta, Pallab; Barui, Ananya; Wu, Yang; Ozbolat, Veli; Moncal, Kazim K. & Ozbolat, Ibrahim T. 2018. Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting. *Biotechnology Advances*. Vol 36 (5), s. 1481–1504.
- 9 Saini, Gia; Segaran, Nicole; Mayer, Joseph L.; Saini, Aman; Albadawi, Hassan & Oklu, Rahmi. 2021. Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Journal of Clinical Medicine*. Vol. 10 (21).
- 10 Gu, Zeming; Fu, Jianzhong; Lin, Hui & He, Yong. 2020. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 15 (5), s. 529–557.

- 11 Gungor-Ozkerim, P. Selcan; Inci, Ilyas; Zhang, Yu Shrike; Khademhosseini, Ali & Dokmeci Mehmet Remzi. 2018. Biopinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*. Vol. 6, s. 915–946.
- 12 Pakhomova, Catherine; Popov, Dmitry; Maltsev, Eugeni; Akhatov, Iskander & Pasko, Alexander. 2020. Software for Bioprinting. *International Journal of Bioprinting*. Vol. 6 (3).
- 13 Mancha Sánchez, Enrique; Gómez-Blanco, J. Carlos; López Nieto, Esther; Casado, Javier G.; Macías-García, Antonio; Díaz Díez, María A.; Carrasco-Amador, Juan Pablo; Torrejón Martín, Diego; Sánchez-Margallo, Francisco Miguel & Pagador, J. Blas. 2020. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 8.
- 14 Hull, Charles W. 1984. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. Patent number US4575330A.
- 15 Wilson, W. Cris Jr & Boland, Thomas. 2003. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anatomical Records*. Vol. 272A (2), s. 491–496.
- 16 Heinrich, Marcel Alexander; Liu, Wangjun; Jimenez, Andrea; Yang, Jingzhou; Akpek, Ali; Liu, Xiao; Pi, Qingmeng; Mu, Xuan; Hu, Ning; Schiffelers, Raymond Michel; Prakash, Jai; Xie, Jingwei & Zhang, Yu Shrike. 2019. 3D Bioprinting: from Bench to Translational Applications. *Small*. Vol. 15 (23).
- 17 Persaud, Alicia; Maus, Alexander; Strait, Lia & Zhu, Donghui. 2022. 3D Bioprinting with Live Cells. *Engineered Regeneration*. Vol. 3 (3), s. 292–309.
- 18 Tong, Anh; Pham, Quang Long; Abatemarco, Paul; Mathew, Austin; Gupta, Dhruv; Iyer, Siddharth & Voronov, Roman. Review of Low-Cost 3D Bioprinters: State of the Market and Observed Future Trends. *SLAS Technology*. Vol. 26 (4), s. 333–366.
- 19 Boularaoui, Selwa; Hussein, Ghada; Khan, Kamran; Christoforou, Nicolas & Stefanini, Cesare. 2020. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting*. Vol. 20.
- 20 Matai, Ishita; Kaur, Gurvinder; Seyedsalehi, Amir; McClinton, Aneesah & Laurencin, Cato T. 2020. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. Vol. 226.
- 21 Kačarević, Željka P.; Rider, Patrick M.; Alkildani, Said; Retnasingh, Sujith; Smeets, Ralf; Jung, Ole; Ivanišević, Zrinka & Barbeck, Mike. 2018. An



- Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials*. Vol. 11 (11).
- 22 Groll, J.; Burdick, J. A.; Cho, D. W.; Derby, B.; Gelinsky, M.; Heilshorn, S. C.; Jüngst, T.; Malda, J.; Mironov, V. A.; Nakayama, K.; Ovsianikov, A.; Sun, W.; Takeuchi, S.; Yoo, J. J. & Woodfield, T. B. F. 2018. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. Vol. 11 (1).
  - 23 Naghieh, Saman & Chen, Xiongbiao. 2021. Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 11 (5), s. 564-579.
  - 24 Fatimi, Ahmed; Okoro, Oseweuba Valentine; Podstawczyk, Daria; Siminska-Stanny, Julia & Shavandi, Amin. 2022. Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review. *Gels*. Vol. 8 (3).
  - 25 Karvinen, Jennika & Kellomäki, Minna. 2023. Design aspects and characterization of hydrogel-based bioinks for extrusion-based bioprinting. *Bioprinting*. Vol. 32.
  - 26 Murphy, Sean V.; De Coppi, Paolo & Atala, Anthony. 2020. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nature Biomedical Engineering*. Vol. 4, s. 370–380.
  - 27 Ong, Chin Siang; Yesantharao, Pooja; Huang, Chen Yu; Mattson, Gunnar; Boktor, Joseph; Fukunishi, Takuma; Zhang, Huaitao & Hibino, Narutoshi. 2018. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric Research*. Vol. 83, s. 223–231.
  - 28 Romanazzo, Sara; Nemeč, Stephanie & Roohani, Iman. 2019. iPSC Bioprinting: Where are We at? *Materials*. Vol. 12 (15).
  - 29 Hospodiuk, Monika; Dey, Madhuri; Sosnoski, Donna & Ozbolat, Ibrahim T. 2017. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Bio-technoly Advances*. Vol. 35 (2), s. 217–239.
  - 30 Schwab, Andrea; Levato, Riccardo; D'Este, Matteo; Piluso, Susanna; Eglin, David & Malda, Jos. 2020. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chemical Reviews*. Vol. 120 (19), s. 10850–10877.
  - 31 Khoeini, Roghayeh; Nosrati, Hamed; Akbarzadeh, Abolfazl; Efterkhari, Aziz; Kavetsky, Taras; Khalilov, Rovshan; Ahmadian, Elham; Nasibova, Aygun; Datta, Pallab; Roshangar, Leila; Deluca, Dante C. Davaran, Soodabeh; Cucchiarini, Magali & Ozbolat, Ibrahim T. 2021. Natural and

- Synthetic Bioinks for 3D Bioprinting. *Advanced NanoBiomed Research*. Vol. 1 (8).
- 32 Salminen, Ari. 2021. Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyyppeihin ja hallintotieteellisiin sovelluksiin. 2., uudistettu painos. Vaasa: Vaasan yliopisto.
- 33 Baethge, Christopher; Goldbeck-Wood, Sandra & Mertens, Stephan. 2019. SANRA-a scale for the quality assessment of narrative review articles. *Research Integrity and Peer Review*. Vol. 4 (5).
- 34 PubMed Overview. 2023. National Library of Medicine. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/about/>>. Päivitetty 15.8.2023. Luettu 25.10.2023.
- 35 ScienceDirect. 2024. Elsevier. Verkkoaineisto. <<https://www.elsevier.com/products/sciencedirect>>. Luettu 4.2.2023.
- 36 Weng, Tingting; Zhang, Wei; Xia, Yilan; Wu, Pan; Yang, Min; Jin, Ronghua; Xia, Sizhan; Wang, Jialiang; You, Chuangang; Han, Chunmao & Wang, Xingang. 2021. 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives. *Journal of Tissue Engineering*. Vol. 12.
- 37 Jorgensen, Adam M.; Gorkun, Anastasiya; Mahajan, Naresh; Willson, Kelsy; Clouse, Cara; Jeong, Claire G.; Varkey, Mathew; Wu, Mingsong; Walker, Stephen J.; Molnar, Joseph A.; Murphy, Sean V.; Lee, Sang Jin; Yoo, James J.; Soker, Shay & Atala, Anthony. 2023. Multicellular bioprinted skin facilitates human-like skin architecture in vivo. *Science Translational Medicine*. Vol. 15 (716).
- 38 Liu, Pengchao; Shen, Hongzhou; Zhi, Yin; Si, Jiawen; Shi, Jun; Guo, Lihe & Shen, Steve Guofang. 2019. 3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 181, s. 1026–1034.
- 39 Olejnik, Anna; Semba, Julia Anna; Kulpa, Adam; Dańczak-Pazdrowska, Aleksandra; Rybka, Jakub Dalibor & Gornowicz-Porowska, Justyna. 2022. 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives. *ACS Synthetic Biology*. Vol. 11 (1), s. 26-38.
- 40 Zhang, Mengde; Zhang, Chao; Li, Zhao; Fu, Xiaobing & Huang, Sha. 2022. Advances in 3D skin bioprinting for wound healing and disease modeling. *Regenerative Biomaterials*. Vol. 10.

- 41 Cubo, Nieves; Garcia, Marta; Del Cañizo, Juan F.; Velasco, Diego & Jorcano, Jose L. 2016. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication*. Vol. 9 (1).
- 42 Baltazar, Tânia; Merola, Jonathan; Catarino, Carolina; Xie, Catherine B.; Kirkiles-Smith, Nancy C.; Lee, Vivian; Hotta, Stephanie; Dai, Guohao; Xu, Xiaowei; Ferreira, Frederico C.; Saltzman, W. Mark; Pober, Jordan S. & Karande, Pankaj. 2020. Three Dimensional Bioprinting of a Vascularized and Perfusable Skin Graft Using Human Keratinocytes, Fibroblasts, Pericytes, and Endothelial Cells. *Tissue Engineering Part A*. Vol. 26 (5–6), s. 227–238.
- 43 Turnbull, Gareth; Clarke, Jon; Picard, Frédéric; Riches, Philip; Jia, Lu-anluan; Han, Fengxuan; Li, Bin & Shu, Wenmiao. 2018. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*. Vol. 3 (3), s. 278–314.
- 44 Watson, Emma C. & Adams, Ralf H. 2018. *Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Vol. 8 (7).
- 45 Yazdanpanah, Zahra; Johnston, James D.; Cooper, David M. L. & Chen, Xiongbiao. 2022. 3D Bioprinted Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State-Of-The-Art and Emerging Technologies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 10.
- 46 Ashammakhi, Nureddin; Hasan, Anwarul; Kaarela, Outi; Byambaa, Batzaya; Sheikhi, Amir; Gaharwar, Akhilesh K. & Khademhosseini, Ali. 2019. Advancing Frontiers in Bone Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 6 (7).
- 47 Maresca, Jamie A.; DeMel, Derek C.; Wagner, Grayson A.; Haase, Colin & Geibel, John P. 2023. Three-Dimensional Bioprinting Applications for Bone Tissue Engineering. *Cells*. Vol. 12 (9).
- 48 Yang, Zhimin; Yi, Ping; Liu, Zhongyue; Zhang, Wenchao; Mei, Lin; Feng, Chengyao; Tu, Chao & Li, Zhihong. 2022. Stem Cell-Laden Hydrogel-Based 3D Bioprinting for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 10.
- 49 Askari, Mohsen; Naniz, Moqaddaseh Afzali; Kouhi, Monireh; Saberi, Azadeh; Zolfagharian, Ali & Modaghi, Mahdi. 2020. Recent progress in extrusion 3D bioprinting of hydrogel biomaterials for tissue regeneration: a comprehensive review with focus on advanced fabrication techniques. *Biomaterials Science*. Vol. 9, s. 535-573.

- 50 Shen, Mingkui; Wang, Lulu; Gao, Yi; Feng, Li; Xu, Chuangye; Li, Sijing; Wang, Xiaohu; Wu, Yulan; Guo, Yao & Pei, Guoxian. 2022. 3D bioprinting of in situ vascularized tissue engineered bone for repairing large segmental bone defects. *Materials Today Bio*. Vol. 16.
- 51 Correia, Christina; Grayson, Warren L.; Park, Miri; Hutton, Daphne; Zhou, Bin; Guo, X. Edward; Niklason, Laura; Sousa, Rui A.; Reis, Rui L. & Vunjak-Novakovic, Gordana. 2011. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One*. Vol. 6 (12).
- 52 Chiesa, Irene; De Maria, Carmelo; Lapomarda, Anna; Fortunato, Gabriele Maria; Montemurro, Francesca; Di Gesù, Roberto; Tuan, Rocky S.; Vozzi, Giovanni & Gottardi, Riccardo. 2020. Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. Vol. 12 (2).
- 53 Zhang, Yu Shrike; Yue, Kan; Aleman, Julio; Moghaddam, Kamyar Mollazadeh; Bakht, Syeda Mahwish; Yang, Jingzhou; Jia, Weitao; Dell'Erba, Valeria; Assawes, Pribpandao; Shin, Su Ryon; Dokmeci, Mehmet Remzi; Oklu, Rahmi & Khademhosseini, Ali. 2017. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*. Vol. 45 (1), s. 148-163.
- 54 Zhang, Yi; Mu, Wenying; Zhang, Yanping; He, Xuetao; Wang, Yiming; Ma, Hongyu; Zhu, Tianyang; Li, Aoyuan; Hou, Qinzheng; Yang, Weimin; Ding, Yumei; Ramakrishna, Seeram & Li, Haoyi. 2022. Recent Advances in Cardiac Patches: Materials, Preparations, and Properties. *Biomaterials Science & Engineering*. Vol. 8, s. 3659-3675.
- 55 Jang, Jinah; Park, Hun-Jun; Kim, Seok-Won; Kim, Heejin; Park, Ju Young; Na, Soo Jin; Kim, Hyeon Ji; Park, Moon Nyeo; Choi, Seung Hyun; Park, Sun Hwa; Kim, Sung Won; Kwon, Sang-Mo; Kim, Pum-Joon & Cho, Dong-Woo. 2017. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials*. Vol. 112, s. 264-274.
- 56 Zhu, Kai; Shin, Su Ryun; van Kempen, Tim; Li, Yi-Chen; Ponraj, Vidhya; Nasajpour, Amir; Mandla, Serena; Hu, Ning; Liu, Xiao; Leijten, Jeroen; Lin Yi-Dong; Hussain, Mohammad Asif; Zhang, Yu Shrike; Tamayol, Ali & Khademhosseini, Ali. 2017. Gold Nanocomposite Bioink for Printing 3D Cardiac Constructs. *Advanced Functional Materials*. Vol. 27 (12).
- 57 Wang, Zihan; Wang, Ling; Li, Ting; Liu, Sitian; Guo, Baolin; Huang, Wenhua & Wu, Yaobin. 2021. 3D bioprinting in cardiac tissue engineering. *Theranostics*. Vol. 11 (16), s. 7948-7969.

- 58 Shiwarski, Daniel J.; Hudson, Andrew R.; Tashman, Joshua W. & Feinberg, Adam W. 2021. Emergence of FRESH 3D printing as a platform for advanced tissue biofabrication. *APL Bioengineering*. Vol. 5 (1).
- 59 Lee, A.; Hudson, A. R.; Shiwarski, D. J.; Tashman, J. W.; Hinton, T. J.; Yerneni, S.; Bliley, J. M.; Campbell, P. G. & Feinberg, A. W. 2019. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*. Vol. 365 (6452), s. 482–487.
- 60 Noor, Nadav; Shapira, Assaf; Edri, Reuven; Gal, Idan; Wertheim, Lior & Dvir, Tal. 2019. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science*. Vol. 6 (11).
- 61 Hu, James B.; Tomov, Martin L.; Buikema, Jan W.; Chen, Caressa; Mahmoudi, Morteza; Wu, Sean M. & Serpooshan, Vahid. 2018. Cardiovascular tissue bioprinting: Physical and chemical processes. *Applied Physics Reviews*. Vol. 5 (4).
- 62 Kupfer, Molly E.; Lin, Wei-Han; Ravikumar, Vasanth; Qiu, Kaiyan; Wang, Lu; Gao, Ling; Bhuiyan, Didarul B.; Lenz, Megan; Ai, Jeffrey; Mahutga, Ryan R.; Townsend, DeWayne; Zhang, Jianyi; McAlpine, Michael C.; Tol-kacheva, Elena G. & Ogle, Brenda M. 2020. In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid. *Circulation Research*. Vol. 127 (2), s. 207–224.
- 63 Skylar-Scott, Mark A; Uzel, Sebastien G. M.; Nam, Lucy L.; Ahrens, John H.; Truby, Ryan L.; Damaraju, Sarita & Lewis, Jennifer A. 2019. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Science Advances*. Vol. 5 (9).
- 64 Sun, Wei; Starly, Binil; Daly, Andrew C.; Burdick, Jason A.; Groll, Jürgen; Skeldon, Gregor; Shu, Wenmiao; Sakai, Yasuyuki; Shinohara, Marie; Nishikawa, Masaki; Jang, Jinah; Cho, Dong-Woo; Nie, Minghao; Takeuchi, Shoji; Ostrovidov, Serge; Khademhosseini, Ali; Kamm, Roger D.; Mironov, Vladimir; Moroni, Lorenzo & Ozbolat, Ibrahim T. 2020. The bioprinting roadmap. *Biofabrication*. Vol. 12.
- 65 Zhang, Yi; Kumar, Piyush; Lu, Songwei; Xiong, Di; Zhao, Hongbin; Cai, Zhiqiang & Zhao, Xiubo. 2021. Recent advances in 3D bioprinting of vascularized tissues. *Materials & Design*. Vol. 199.
- 66 Chen, Earnest P.; Toksoy, Zeren; Davis, Bruce A. & Geibel, John P. 2021. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 9.

- 67 Enrico, Alessandro; Voulgaris, Dimitrios; Östmans, Rebecca; Sundaravadivel, Naveen; Moutaux, Lucille; Cordier, Aurélie; Niklaus, Frank; Herland, Anna & Stemme, Göran. 2022. 3D Microvascularized Tissue Models by Laser-Based Cavitation Molding of Collagen. *Advanced Materials*. Vol. 34 (11).
- 68 Zhang, Boyang & Radisic, Milica. 2020. Organ-level vascularization: The Mars mission of bioengineering. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Vol. 159 (5), s. 2003–2007
- 69 Erdem, Ahmet; Darabi, Mohammad Ali; Nasiri, Rohollah; Sangabathuni, Sivakoti; Ertas, Yavuz Nuri; Alem, Halima; Hosseini, Vahid; Shamloo, Amir; Nasr, Ali S.; Ahadian, Samad; Dokmeci, Mehmet R.; Khademhosseini, Ali & Ashammakhi, Nureddin. 2020. 3D Bioprinting of Oxygenated Cell-Laden Gelatin Methacryloyl Constructs. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 9 (15).
- 70 Yeo, Miji; Sarkar, Anwita; Singh, Yogendra Pratap; Derman, Irem Deniz; Datta, Pallab & Ozbolat, Ibrahim T. 2024. Synergistic coupling between 3D bioprinting and vascularization strategies. *Biofabrication*. Vol. 16 (1).
- 71 Kjar, Andrew; McFarland, Bailey; Mecham, Keetch; Harward, Nathan & Huang, Yu. 2021. Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting. *Bioactive Materials*. Vol. 6 (2), s. 460–471.
- 72 Gao, Ge; Park, Ju Young; Kim, Byoung Soo; Jang, Jinah & Cho Dong-Woo. 2018. Coaxial Cell Printing of Freestanding, Perfusable, and Functional In Vitro Vascular Models for Recapitulation of Native Vascular Endothelium Pathophysiology. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 7 (23).
- 73 Gao, Ge; Kim, Hyeok; Kim, Byoung Soo; Kong, Jeong Sik; Lee, Jae Yeon; Park, Bong Woo; Chae, Suhun; Kim, Jisoo; Ban, Kiwon; Jang, Jinah; Park, Hun-Jun & Cho, Dong-Woo. 2019. Tissue-engineering of vascular grafts containing endothelium and smooth-muscle using triple-coaxial cell printing. *Applied Physics Reviews*. Vol. 6 (4).
- 74 Seymour, Alexis J.; Westerfield, Ashley D.; Cornelius, Vincent C.; Skylar-Scott, Mark A. & Heilshorn, Sarah C. 2022. Bioprinted microvasculature: progressing from structure to function. *Biofabrication*. Vol. 14 (2).
- 75 Gillispie, Gregory; Prim, Peter; Copus, Joshua; Fisher, John; Mikos, Antonio G.; Yoo, James J.; Atala, Anthony & Lee, Sang Jin. 2020. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*. Vol. 12 (2).

- 76 Bertsch, Pascal; Diba, Mani; Mooney, David J. & Leeuwenburgh, Sander C. G. 2023. Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*. Vol. 123, s. 634–873.
- 77 Malekpour, Ali & Chen, Xiongbiao. 2022. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *Journal of Functional Biomaterials*. Vol. 13 (2).
- 78 Skardal, Aleksander. 2018. Perspective: “Universal” bioink technology for advancing extrusion bioprinting-based biomanufacturing. *Bioprinting*. Vol. 10.
- 79 Khoshnood, Negin & Zamanian, Ali. 2020. Decellularized extracellular matrix bioinks and their application in skin tissue engineering. *Bioprinting*. Vol. 20.
- 80 Kim, Byoung Soo; Das, Sanskrita; Jang, Jinah & Cho, Dong-Woo. 2020. Decellularized Extracellular Matrix-based Bioinks for Engineering Tissue- and Organ-specific Microenvironments. *Chemical Reviews*. Vol. 120 (19), s.10608–10661.
- 81 Zhang, Huihui; Wang, Yilin; Zheng, Zijun; Wei, Xuerong; Chen, Lianglong; Wu, Yaobin; Huang, Wenhua & Yang, Lei. 2023. Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink. *Theranostics*. Vol. 13 (8), s. 2562–2587.
- 82 Ho, Debbie L. L.; Lee, Stacey; Du, Jianyi; Weiss, Jonathan D.; Tam, Tony; Sinha, Soham; Klinger, Danielle; Devine, Sean; Hamfeldt, Art; Leng, Hope T.; Herrmann, Jessica E.; He, Mengde; Fradkin, Lee G.; Tan, Tze Kai; Standish, David; Tomasello, Peter; Traul, Donald; Dianat, Noushin; Ladi, Rukmini; Vicard, Quentin; Katikireddy, Kishore & Skylar-Scott, Mark A. 2022. Large-Scale Production of Wholly Cellular Bioinks via the Optimization of Human Induced Pluripotent Stem Cell Aggregate Culture in Automated Bioreactors. *Advanced Healthcare Matters*. Vol. 11 (24).
- 83 Jankovic, Marina Gazdic; Stojkovic, Miodrag; Bojic, Sanja; Jovicic, Nemanja; Kovacevic, Marina Miletic; Ivosevic, Zeljko; Juskovic, Aleksandar; Kovacevic, Vojin & Lujic, Biljana. 2023. Scaling up human mesenchymal stem cell manufacturing using bioreactors for clinical uses. *Current Research in Translational Medicine*. Vol. 71 (2).
- 84 Doulgkeroglou, Meletios-Nikolaos; Di Nubila, Alessia; Niessing, Bastian; König, Niels; Schmitt, Robert H.; Damen, Jackie; Szilvassy, Stephen J.; Chang, Wing; Csontos, Lynn; Louis, Sharon; Kugelmeier, Patrick; Ronfard, Vincent; Bayon, Yves & Zeugolis, Dimitrios I. 2020. Automation Monitoring and Standardization of Cell Product Manufacturing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 8.

- 85 Sharma, Rajesh; Harrison, Susan T. L. & Tai, Siew L. 2021. Advances in Bioreactor Systems for the Production of Biologicals in Mammalian Cells. *ChemBioEng Reviews*. Vol. 9 (1), s. 42-62.
- 86 Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. 2017. Verkkoaineisto. Euroopan komissio. <<https://www.ema.europa.eu/en/news/new-guidelines-good-manufacturing-practices-advanced-therapies>>. 24.11.2017. Luettu 26.1.2024.
- 87 Shukla, Arvind Kumar; Gao, Ge & Kim, Byong Soo. 2022. Applications of 3D Bioprinting Technology in Induced Pluripotent Stem Cells-Based Tissue Engineering. *Micromachines*. Vol. 13 (2).
- 88 Romanazzo, Sara; Lin, Kang; Srivastava, Pallavi & Kilian, Kristopher A. 2020. Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 162-162, s. 124-144.
- 89 Kim, Jennifer Yejean; Nam, Yoojun; Rim, Yeri Alice & Ju, Ji Hyeyon. 2022. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. Vol. 18 (1), s. 142-154.
- 90 Karami, Zahra; Moradi, Sharif; Eidi, Akram; Soleimani, Masoud & Jafarian, Arefeh. 2022. Induced pluripotent stem cells: Generation methods and a new perspective in COVID-19 research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Vol. 10.
- 91 Shapira, Assaf & Dvir, Tal. 2021. 3D Tissue and Organ Printing-Hope and Reality. *Advanced Science*. Vol. 8 (10).
- 92 Bae, Ja Seong. 2023. Patient-Customized Bioprinting Technology for Practical Regeneration of the Respiratory Tract (Trachea). Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://clinicaltrials.gov/study/NCT06051747>>. 29.8.2023. Luettu 9.2.2024.
- 93 Rabin, Rory Caryn. 2022. Doctors Transplant Ear of Human Cells, Made by 3-D Printer. Verkkoaineisto. The New York Times. <<https://www.nytimes.com/2022/06/02/health/ear-transplant-3d-printer.html>>. 2.6.2022. Luettu 9.2.2024.



## Liite 1. Kirjallisuuskatsauksen ensimmäisen vaiheen aineisto

Taulukko 1. Kirjallisuuskatsauksen ensimmäisen vaiheen aineisto.

Tekijä(t)	Otsikko	Julkaisija	Julkaisu- vuosi	Julkaisutyyppi
Ambhorkar ym.	Biofabrication strategies for engineering heterogeneous artificial tissues	Additive Manufacturing	2020	Kirjallisuuskatsaus
Ashammakhi ym.	Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering	Tissue Engineering. Part B, Reviews	2022	Kirjallisuuskatsaus
Askari ym.	Recent progress in extrusion 3D bioprinting of hydrogel biomaterials for tissue regeneration: a comprehensive review with focus on advanced fabrication techniques	Biomaterials Science	2020	Kirjallisuuskatsaus
Bejoy ym.	An insight on advances and applications of 3d bioprinting: A review	Bioprinting	2021	Kirjallisuuskatsaus
Chen ym.	3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2021	Kirjallisuuskatsaus
Dell ym.	3D Bioprinting Using Hydrogels: Cell Inks and Tissue Engineering Applications	Pharmaceutics	2022	Kirjallisuuskatsaus
Fang ym.	Advances in 3D Bioprinting	Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers	2022	Kirjallisuuskatsaus
Gu ym.	Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications	Asian Journal of Pharmaceutical Sciences	2020	Kirjallisuuskatsaus
Harding ym.	Application of additive manufacturing in the biomedical field- A review	Annals of 3D Printed Medicine	2023	Kirjallisuuskatsaus
Heinrich ym.	3D Bioprinting: from Benches to Translational Applications	Small	2019	Kirjallisuuskatsaus
Jamee ym.	The promising rise of bioprinting in revolutionizing medical science: Advances and possibilities	Regenerative Therapy	2021	Kirjallisuuskatsaus

Ji ja Guvendiren	Complex 3D bioprinting methods	APL Bioengineering	2021	Kirjallisuuskatsaus
Jovic ym.	3D Bioprinting and the Future of Surgery	Frontiers in Surgery	2020	Kirjallisuuskatsaus
Koçak ym.	Three dimensional bioprinting technology: Applications in pharmaceutical and biomedical area	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	2021	Kirjallisuuskatsaus
Leberfinger ym.	Bioprinting functional tissues	Acta Biomaterialia	2019	Kirjallisuuskatsaus
Lima ym.	3D Bioprinting Technology and Hydrogels Used in the Process	Journal of Functional Biomaterials	2022	Kirjallisuuskatsaus
Liu ym.	3D Bioprinting tissue analogs: Current development and translational implications	Journal of Tissue Engineering	2023	Kirjallisuuskatsaus
Matai ym.	Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering	Biomaterials	2020	Kirjallisuuskatsaus
Murphy ym.	Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting	Nature Biomedical Engineering	2019	Kirjallisuuskatsaus
Panda ym.	A focused review on three-dimensional bioprinting technology for artificial organ fabrication	Biomaterials Science	2022	Kirjallisuuskatsaus
Persaud ym.	3D Bioprinting with Live Cells	Engineered Regeneration	2022	Kirjallisuuskatsaus
Raees ym.	Classification, processing, and applications of bioink and 3D bioprinting: A detailed review	International Journal of Biological Macromolecules	2023	Kirjallisuuskatsaus
Ramadan ym.	3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries	Frontiers in Medical Technology	2020	Kirjallisuuskatsaus
Ramesh ym.	Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities	Bioprinting	2021	Kirjallisuuskatsaus
Saini ym.	Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine	Journal of Clinical Medicine	2021	Kirjallisuuskatsaus
Shapira ja Dvir	3D Tissue and Organ Printing-Hope and Reality	Advanced Science	2021	Kirjallisuuskatsaus
Shinkar ja Rhode	Could 3D extrusion bioprinting serve to be a real alternative to organ transplantation in the future?	Annals of 3D Printed Medicine	2022	Kirjallisuuskatsaus
Song ym.	Progress of 3D Bioprinting in Organ Manufacturing	Polymers	2021	Kirjallisuuskatsaus

Stapenhorst ym.	Bioprinting: A promising approach for tissue regeneration	Bioprinting	2021	Kirjallisuuskatsaus
Tripathi ym.	3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications	MedComm	2020	Kirjallisuuskatsaus
Unagolla ja Jayasuriya	Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives	Applied Materials Today	2020	Kirjallisuuskatsaus
Veeravalli ym.	Three-Dimensional Bioprinting in Medicine: A Comprehensive Overview of Current Progress and Challenges Faced	Cureus	2023	Kirjallisuuskatsaus
Xie ym.	3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid	Polymers	2020	Kirjallisuuskatsaus
Yilmaz ym.	Bioprinting: A review of processes, materials and applications	Bioprinting	2021	Kirjallisuuskatsaus
Yu ym.	Current Advances in 3D Bioprinting Technology and Its Applications for Tissue Engineering	Polymers	2020	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	3D Bioprinting: A Novel Avenue for Manufacturing Tissues and Organs	Engineering	2019	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs	SLAS Technology	2019	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Recent advances in 3D bioprinting of vascularized tissues	Materials & Design	2021	Kirjallisuuskatsaus

## Liite 2. Kirjallisuuskatsauksen toisen vaiheen aineisto

Taulukko 1. Kirjallisuuskatsauksen toisen vaiheen aineisto

Tekijä(t)	Otsikko	Julkaisija	Julkaisu- vuosi	Julkaisutyyppi
Ashammakhi ym.	Advancing Frontiers in Bone Bioprinting	Advanced Healthcare Materials	2019	Kirjallisuuskatsaus
Askari ym.	Recent progress in extrusion 3D bioprinting of hydrogel biomaterials for tissue regeneration: a comprehensive review with focus on advanced fabrication techniques	Biomaterials Science	2020	Kirjallisuuskatsaus
Baltazar ym.	Three Dimensional Bioprinting of a Vascularized and Perfusable Skin Graft Using Human Keratinocytes, Fibroblasts, Pericytes, and Endothelial Cells	Tissue Engineering Part A	2020	Tutkimusartikkeli
Barrs ym.	Biomaterials for Bioprinting Microvasculature	Chemical Reviews	2020	Kirjallisuuskatsaus
Bertsch ym.	Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Engineering	Chemical Reviews	2023	Kirjallisuuskatsaus
Chen ym.	3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2021	Kirjallisuuskatsaus
Chiesa ym.	Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting	Biofabrication	2020	Tutkimusartikkeli
Correia ym.	In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis	PLoS One	2011	Tutkimusartikkeli
Cubo ym.	3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis	Biofabrication	2016	Tutkimusartikkeli
Doulgkeroglou ym.	Automation Monitoring and Standardization of Cell Product Manufacturing	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2020	Kirjallisuuskatsaus
Enrico ym.	3D Microvascularized Tissue Models by Laser-Based Cavitation Molding of Collagen	Advanced Materials	2022	Tutkimusartikkeli

Erdem ym.	3D Bioprinting of Oxygenated Cell-Laden Gelatin Methacryloyl Constructs	Advanced Healthcare Materials	2020	Tutkimusartikkeli
Euroopan komissio	Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products	Euroopan komission verkkosivusto	2017	Ohjeistus
Fatimi ym.	Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review	Gels	2022	Kirjallisuuskatsaus
Gao ym.	Coaxial Cell Printing of Freestanding, Perfusable, and Functional In Vitro Vascular Models for Recapitulation of Native Vascular Endothelium Pathophysiology	Advanced Healthcare Materials	2018	Tutkimusartikkeli
Gao ym.	Tissue-engineering of vascular grafts containing endothelium and smooth-muscle using triple-coaxial cell printing	Applied Physics Reviews	2019	Tutkimusartikkeli
Gillispie ym.	Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability	Biofabrication	2020	Kirjallisuuskatsaus
Ho ym.	Large-Scale Production of Wholly Cellular Bioinks via the Optimization of Human Induced Pluripotent Stem Cell Aggregate Culture in Automated Bioreactors	Advanced Healthcare Matters	2022	Tutkimusartikkeli
Hu ym.	Cardiovascular tissue bioprinting: Physical and chemical processes	Applied Physics Reviews	2018	Kirjallisuuskatsaus
Jang ym.	3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair	Biomaterials	2017	Tutkimusartikkeli
Jankovic ym.	Scaling up human mesenchymal stem cell manufacturing using bioreactors for clinical uses	Current Research in Translational Medicine	2023	Kirjallisuuskatsaus
Jorgensen ym.	Multicellular bioprinted skin facilitates human-like skin architecture in vivo	Science Translational Medicine	2023	Tutkimusartikkeli
Karami ym.	Induced pluripotent stem cells: Generation methods and a new perspective in COVID-19 research	Frontiers in Cell and Developmental Biology	2023	Kirjallisuuskatsaus

Karvinen ym.	Design aspects and characterization of hydrogel-based bioinks for extrusion-based bioprinting	Bioprinting	2023	Kirjallisuuskatsaus
Kim ym.	Decellularized Extracellular Matrix-based Bioinks for Engineering Tissue- and Organ-specific Micro-environments	Chemical Reviews	2020	Kirjallisuuskatsaus
Kim ym.	Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells	Stem Cell Reviews and Reports	2022	Kirjallisuuskatsaus
Kjar ym.	Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting	Bioactive Materials	2021	Kirjallisuuskatsaus
Khoshnood ja Zamalian	Decellularized extracellular matrix bioinks and their application in skin tissue engineering	Bioprinting	2020	Kirjallisuuskatsaus
Kupfer ym.	In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid	Circulation Research	2020	Tutkimusartikkeli
Malekpour ja Chen	Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views	Journal of Functional Biomaterials	2022	Kirjallisuuskatsaus
Murphy ym.	Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting	Nature Biomedical Engineering	2020	Kirjallisuuskatsaus
Naghieh ja Chen	Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting	Journal of Pharmaceutical Analysis	2021	Kirjallisuuskatsaus
Noor ym.	3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts	Advanced Science	2019	Tutkimusartikkeli
Lee ym.	3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart	Science	2019	Tutkimusartikkeli
Liu ym.	3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels	Biointerfaces	2019	Tutkimusartikkeli

Maresca ym.	Three-Dimensional Bioprinting Applications for Bone Tissue Engineering	Cells	2023	Kirjallisuuskatsaus
Olenjik ym.	3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives	ACS Synthetic Biology	2022	Kirjallisuuskatsaus
Romanazzo ym.	iPSC Bioprinting: Where are We at?	Materials	2019	Kirjallisuuskatsaus
Romanazzo ym.	Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming	Advanced Drug Delivery Reviews	2020	Kirjallisuuskatsaus
Schwab ym.	Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting	Chemical Reviews	2020	Kirjallisuuskatsaus
Seymour ym.	Bioprinted microvasculature: progressing from structure to function	Biofabrication	2022	Kirjallisuuskatsaus
Sharma ym.	Advances in Bioreactor Systems for the Production of Biologicals in Mammalian Cells	ChemBioEng Reviews	2021	Kirjallisuuskatsaus
Shen ym.	3D bioprinting of in situ vascularized tissue engineered bone for repairing large segmental bone defects	Materials Today Bio	2022	Tutkimusartikkeli
Shiwarski ym.	Emergence of FRESH 3D printing as a platform for advanced tissue bio-fabrication	APL Bioengineering	2021	Näkökulma-artikkeli
Shukla ym.	Applications of 3D Bioprinting Technology in Induced Pluripotent Stem Cells-Based Tissue Engineering	Micromachines	2022	Kirjallisuuskatsaus
Skardal	Perspective: "Universal" bioink technology for advancing extrusion bioprinting-based biomanufacturing	Bioprinting	2018	Näkökulma-artikkeli
Skylar-Scott ym.	Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels	Science Advances	2019	Tutkimusartikkeli
Sun ym.	The bioprinting roadmap	Biofabrication	2020	Näkökulma-artikkeli
Turnbull ym.	3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering	Bioactive Materials	2018	Kirjallisuuskatsaus

Watson ym.	Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System	Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine	2018	Kirjallisuuskatsaus
Wang ym.	3D bioprinting in cardiac tissue engineering	Theranostics	2021	Kirjallisuuskatsaus
Weng ym.	3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives	Journal of Tissue Engineering	2021	Kirjallisuuskatsaus
Yang ym.	Stem Cell-Laden Hydrogel-Based 3D Bioprinting for Bone and Cartilage Tissue Engineering	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2022	Kirjallisuuskatsaus
Yazdanpanah ym.	3D Bioprinted Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State-Of-The-Art and Emerging Technologies	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2022	Kirjallisuuskatsaus
Yeo ym.	Synergistic coupling between 3D bioprinting and vascularization strategies	Biofabrication	2024	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ja Radisic	Organ-level vascularization: The Mars mission of bioengineering	The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	2020	Näkökulma-artikkeli
Zhang ym.	3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication	Annals of Biomedical Engineering	2017	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Advances in 3D skin bioprinting for wound healing and disease modeling	Regenerative Biomaterials	2022	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Recent Advances in Cardiac Patches: Materials, Preparations, and Properties	Biomaterials Science & Engineering	2022	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Recent advances in 3D bioprinting of vascularized tissues	Materials & Design	2021	Kirjallisuuskatsaus
Zhang ym.	Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink	Theranostics	2023	Kirjallisuuskatsaus
Zhu ym.	Gold Nanocomposite Bioink for Printing 3D Cardiac Constructs	Advanced Functional Materials	2017	Tutkimusartikkeli