

Mimosa Peltokangas

ITSEKORJAUTUVAT HYDROGEEELIT JA NIIDEN 3D-TULOUSTUS

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Huhtikuu 2020

TIIVISTELMÄ

Mimosa Peltokangas: Itsekorjautuvat hydrogeelit ja niiden 3D-tulostus
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2020

Itsekorjautuvat hydrogeelit ovat herättäneet viime vuosina kiinnostusta tutkijoiden keskuudessa suuren korjautumiskykynsä ja pitkän käyttöikänsä ansiosta. Nämä hydrogeelit ovat dynaamisia ja paljon vettä sitovia verkkorakenteita, joten niiden luoma ympäristö muistuttaa läheisesti solujen soluväliainetta. Itsekorjautuvuutensa avulla hydrogeelit kykenevät muodostamaan uusia sidoksia hajonneiden tilalle, ja näin ne pystyvät ylläpitämään ominaisuuksiaan kauemmin kuin perinteiset hydrogeelit. Itsekorjautuvuuden ansiosta hydrogeelit soveltuvat hyvin myös 3D-tulostukseen, sillä prosessin aikana ja sen jälkeen muodostuvat uudet sidokset pitävät materiaalin halutussa muodossa. Tämän työn tarkoituksena onkin perehtyä uusimpiin tutkimuksiin itsekorjautuvista hydrogeeleistä ja niiden tulostuksesta, sekä selvittää niihin liittyviä haasteita ja löytää ratkaisuehdotuksia.

Tällä hetkellä biomateriaalien tulostukseen käytetään kolmea menetelmää: ekstruusioon, pisaroihin ja laseriin perustuvaa tulostusta. Ekstruusioon perustuva tulostusmenetelmä on yleisin hydrogeelien ja solujen tulostuksessa, sillä sen avulla voidaan tulostaa myös materiaaleja, joilla on korkea viskositeetti. Sen resoluutio on kuitenkin huono, ja oletettavasti tulevaisuudessa keskitytäänkin parantamaan tätä tarkempien rakenteiden aikaansaamiseksi. Pisaroihin ja laseriin perustuvia menetelmiä käytetään myös jonkin verran, mutta niiden rajoitukset ovat suuremmat. Erityisesti lisää tutkimuksia täytyy tehdä laseriin perustuvan menetelmän kanssa, sillä vaikka sen resoluutio on erittäin hyvä, laserin vaikutuksia soluihin ei vielä täysin tunneta.

Solujen tulostus on aiemmin ollut haastavaa, sillä ne kestävät huonosti prosessista aiheutuvaa painetta. Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että itsekorjautuvuutensa avulla hydrogeelit kykenevät suojaamaan soluja tulostuksen aiheuttamalta paineelta. Itsekorjautuvat hydrogeelit ovatkin osoittautuneet hyviksi kasvatusalustoiksi soluille. Lisäksi solujen kanssa tulostaminen mahdollistaa niiden tasaisen jakautumisen kudoksessa. Luonnolliset ja bioaktiiviset polymeerit ovat solujen kannalta hyviä materiaaleja, mutta myös kestävämmillä polymeereillä on saatu hyviä tuloksia, kun niihin on liitetty bioaktiivisia motiiveja.

Itsekorjautuvien hydrogeelien 3D-tulostamisessa on vielä paljon haasteita, joista suurin on niiden huono mekaaninen kestävyys. Rakenteet ovat pehmeitä ja menettävät muotonsa helposti, eikä suuria kudoksia pystytä tulostamaan. Viime aikoina tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että ominaisuudet paranevat, jos samassa hydrogeelissä hyödynnetään useampaa sidostapaa. Itsekorjautuvuuden kannalta näiden molempien sidostyyppien tulisi olla reversiibeileitä, jotta täydellinen paranemiskyky saavutetaan. Materiaalin viskositeetti ei kuitenkaan saa kasvaa liikaa, jos materiaalista halutaan helposti tulostettavaa. Toisaalta pseudoplastinen eli leikkausoheneva materiaali muuttuu juoksevaksi kohdistetun paineen alaisena ja mahdollistaa suuremmatkin viskositeetit. Pseudoplastinen ominaisuus yhdistettynä itsekorjautuvuuteen mahdollistaa siis hydrogeelien tulostamisen ilman muita muokkauksia. Potentiaalisiksi materiaaleiksi ovatkin osoittautuneet dynaamisella kaksoisverkkorakenteella muodostetut hydrogeelit, joilla on sekä itsekorjautuvuus että pseudoplastinen ominaisuus. Tällaisten biomateriaalien ja niistä johdettujen sovellusten määrä tulee oletettavasti kasvamaan tulevina vuosina.

Avainsanat: itsekorjautuva hydrogeeli, 3D-tulostus, biomuste, pseudoplastisuus, solujen tulostus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintyö on kirjoitettu Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekuntaan. Kirjoitusprosessi on ollut antoisa, ja se on opettanut paljon. Haluankin kiittää tästä mahdollisuudesta yliopistoa, tiedekuntaa ja kaikkia tukenani olleita ihmisiä.

Erityiskiitokset haluan sanoa ohjaajalleni Jennika Karviselle, joka jaksoi ohjata työtäni oikeaan suuntaan ja vastata jokaiseen mieleeni nousseeseen kysymykseen. Lisäksi haluan kiittää Kandidiseminaarin vetäjää Anne Kallioniemeä, joka loi hyvän pohjan kirjoittamiselle ja oli aina valmiina auttamaan. Kiitos myös kaikille teille perheenjäsenille ja ystäville, jotka olette jaksaneet kuunnella ja pohtia kanssani työhön liittyviä asioita.

Tampereella, 19.4.2020

Mimosa Peltokangas

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET JA MERKINNÄT	4
1. JOHDANTO	5
2. ITSEKORJAUTUVAT HYDROGEEELIT	6
2.1 Tärkeimmät ominaisuudet.....	7
2.2 Tukiverkon muodostustapoja	8
2.3 Yleisimpiä käytettyjä materiaaleja	12
3. ITSEKORJAUTUVIEN HYDROGEEELIEN 3D-TULOSTUS.....	13
3.1 3D-tulostusmenetelmät biomateriaaleille.....	13
3.2 Tulostuksen mahdollistavia ominaisuuksia ja menetelmiä.....	15
3.3 Tulostuksessa käytettyjä materiaaleja ja sidostapoja	18
3.4 3D-tulostus solujen kanssa	19
3.5 3D-tulostuksen haasteet ja tulevaisuus	22
4. YHTEENVETO	23
LÄHTEET	25

LYHENTEET JA MERKINNÄT

3D	Kolmiulotteinen
Ad	Adamataani
Ca ²⁺	Kalsiumioni
CD	Syklodekstriini
DA	Dialdehydi
DBB	Pisaroihin perustuva biotulostus (eng. Droplet-based bioprinting)
EBB	Ekstruusioon perustuva biotulostus (eng. Extrusion-based bioprinting)
ECFC	Endoteelikolonioita muodostava solu
Gtn	Gelatiini
HA	Hyaluronihappo
hMSCc	Ihmisen mesenkymaalinen kantasolu
LBB	Laseriin perustuva biotulostus (eng. Laser-based bioprinting)
Odex	Hapetettu dekstraani
OHA	Hapetettu hyaluronihappo
PAEH	Polyaspartaattihappo
PEG	Polyetyleeniglykoli
PVA	Polyvinyylialkoholi
RGD	Arginiini-glysiini-aspartaattihappo
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
UV	Ultravioletti

1. JOHDANTO

Vaikka elinsiirtojen määrä onkin kasvanut suuresti 2010-luvulla, luovutettuja elimiä ja kudossiirteitä ei tällä hetkellä riitä kaikille tarvitseville. Suomessa tehtiin vuonna 2019 453 elinsiirtoa, mutta vuoden lopulla siirtoa odottavien ihmisten määrä oli silti 578 (<https://www.hus.fi/sairaanhoito/sairaanhoitopalvelut/elinsiirrot/Sivut/default.aspx> viitattu 21.3.2020). Elin- ja kudossiirteiden vähyden lisäksi ongelmia voivat tuottaa hylkimisreaktiot, jotka aiheutuvat vieraan kudoksen joutumisesta elimistöön. Tämän takia elinsiirtopotilaat joutuvat yleensä syömään hyljinnänestolääkkeitä elämänsä loppuun asti. Jos tarvittavia kudoksia pystyttäisiin helposti kasvattamaan laboratorioissa potilaan omista soluista, luovuttajien tarve sekä riski immunireaktiolle pienentyisi (Leberfinger ym. 2019). Tähän tarkoitukseen on kehitelty paljon erilaisia biomateriaaleja, ja muun muassa itsekorjautuvat hydrogeelit ovat herättäneet viime vuosina suurta kiinnostusta (Taylor & in het Panhuis 2016, Tu ym. 2019).

Hydrogeelimateriaalit muodostavat paljon vettä sitovia verkkomaisia rakenteita, joten ne muistuttavat solujen luonnollista soluväliainetta. Itsekorjautuvat hydrogeelit taas ovat biomateriaaleja, jotka pystyvät korjaamaan rakenteensa vaurion jälkeen. (Taylor & in het Panhuis 2016, Townsend ym. 2019, Tu ym. 2019) Itsekorjautuvia hydrogeelejä voidaankin käyttää tukirakenteena, jossa soluja kasvatetaan halutun muotoisiksi kudoksiksi (Taylor & in het Panhuis 2016). Tätä käytetään hyödyksi kudosten 3D-mallintamisessa eli kolmiulotteisessa mallintamisessa tai siirteiden valmistamisessa laboratorioissa. Myös *in situ* -sovelluksia, eli suoraan kehoon siirrettäviä itsekorjautuvia hydrogeelejä, on kehitelty onnistuneesti (Wei & Gerecht 2018, Tu ym. 2019). Itsekorjautuvia hydrogeelejä tehdään niin luonnollisista kuin synteettisesti valmistetuista polymeereistä tai niiden sekoituksista. Luonnolliset polymeerit ovat usein bioaktiivisia ja solujen kasvua tukevia, mutta ne hajoavat helposti. Synteettisten polymeerien hyvä puoli on niiden hyvä mekaaninen kestävyys, mutta ne ovat lähes aina inerttejä. (Ji & Guvendiren 2017) Käytetyn materiaalin lisäksi hydrogeelin ominaisuuksiin vaikuttaa todella paljon myös se, millä tavalla hydrogeeli on ristosilloitettu.

Itsekorjautuvien hydrogeelien on todettu soveltuvan hyvin myös 3D-tulostamiseen (Tu ym. 2019). Biomateriaalien tulostaminen on halpaa, ja sen avulla pystytään saamaan aikaan haastaviakin rakenteita (Leberfinger ym. 2019). Lisäksi tulostamalla pystytään tuottamaan jokaiselle potilaalle kohdennetusti oikean kokoisia ja muotoisia kudoksia tai elimiä (Ji & Guvendiren 2017). Nopean ja automaattisen korjautumiskapasiteettinsa ansiosta itsekorjautuvia hydrogeelejä on kohtalaisen helppoa tulostaa, ja ne säilyttävät hyvin muotonsa tulostuksen jälkeen (Heidarian ym. 2019).

Eräs tärkeimmistä sovelluksista, johon itsekorjautuvien hydrogeelien on todettu soveltuvan hyvin, on solujen kanssa tulostaminen (Wei & Gerecht 2018). Mukautuvaisuutensa ansiosta itsekorjautuva materiaali kykenee suojaamaan soluja tulostusprosessin aiheuttamalta stressiltä, ja solujen elinkyky tulostuksen on tutkimuksissa todettu todella hyväksi (Wei & Gerecht 2018, Heidarian ym. 2019). Lisäksi solujen tulostus materiaalin kanssa mahdollistaa hyvän homogeenisen kasvun materiaalin sisäosiin, sekä parhaassa tapauksessa useamman solulinjan hyödyntämisen kudoksia muodostettaessa (Leberfinger ym. 2019).

Tämän työn tavoitteena on perehtyä viimeisimpiin tutkimuksiin itsekorjautuvista hydrogeeleistä, ja erityisesti niiden käytöstä 3D-tulostuksessa. Tavoitteena on selvittää, kuinka hyvin itsekorjautuvat hydrogeelit soveltuvat 3D-tulostukseen, ja onko niiden tulostuksen onnistumisessa eroja perinteisiin hydrogeeleihin verrattuna. Lisäksi tarkoituksena on ottaa selvää, kuinka hyvin itsekorjautuvat hydrogeelit soveltuvat solujen tulostamiseen, ja mitkä ovat tällä hetkellä suurimmat haasteet näiden hydrogeelien tulostamisessa. Työ on kirjallisuuskatsaus, jossa syvennytään ensin itsekorjautuvien hydrogeelien ominaisuuksiin ja muodostustapoihin, mutta pääpainona on tulostuksen mahdollistavat materiaalit ja menetelmät. Luvussa 3 kerrotaan eri tulostusvaihtoehdoista, niihin vaikuttavista ominaisuuksista, sekä solujen tulostamisesta ja tulostuksen yleisistä haasteista. Myös ratkaisuehdotuksia kyseisille haasteille pyritään esittämään.

2. ITSEKORJAUTUVAT HYDROGEELIT

Itsekorjautuvat hydrogeelit ovat biomateriaaleja, joita voidaan käyttää solujen tai kudosten kasvatamiseen. Ne erottuvat perinteisistä hydrogeeleistä suurella korjautumiskapasiteetillaan. Nämä materiaalit pystyvät rikkoutumisen tai halkeamisen jälkeen rakentamaan uuden ja eheän geelin muodostamalla uudestaan tukiverkkonsa sidokset. (Taylor & in het Panhuis 2016, Tu ym. 2019) Tämän ja suuren vesipitoisuutensa ansiosta ne muistuttavat paljon solujen luonnollista ympäristöä, soluväliainetta. Itsekorjautuvia hydrogeelejä kehitellessään tutkijat ovat ottaneet mallia luonnosta, jossa kudosten korjautuminen on tärkeä osa elossapysymistä. (Shi ym. 2019) Myös laboratoriokasvatuksessa on ehdottoman tärkeää, että tukirakenne pysyy tarpeeksi kauan stabiilina, jotta solut ehtivät jakautua ja erilaistua tarpeeksi.

2.1 Tärkeimmät ominaisuudet

Itsekorjautuvien hydrogeelien tärkein ominaisuus on niiden korjautumiskapasiteetti, kuten edellä jo todettiin. Tämä ominaisuus on hyödyllinen myös 3D-tulostuksessa, sillä materiaali pystyy tulostuksen jälkeen muodostamaan tukisidoksia ja ylläpitämään halutun muodon (Tu ym. 2019). On tärkeää, että hydrogeeli korjautuu sekä mikro- että makroskaalassa, jotta solujen kasvu ei häiriinny (Taylor & in het Panhuis 2016, Shi ym. 2019). Spontaanisti korjautuvat geelit mahdollistavat tämän, ja itsekorjautuvat hydrogeelit kykenevätkin korjaamaan muotonsa, rakenteensa, toiminnallisuutensa sekä kemialliset ja fysikaaliset ominaisuutensa vaurion jälkeen (Shi ym. 2019). Toinen tärkeä ominaisuus dynaamisille hydrogeeleille etenkin tulostuksen kannalta on pseudoplastisuus eli leikkausohenevuus, josta kerrotaan tarkemmin kappaleessa 3.2 (Townsend ym. 2019).

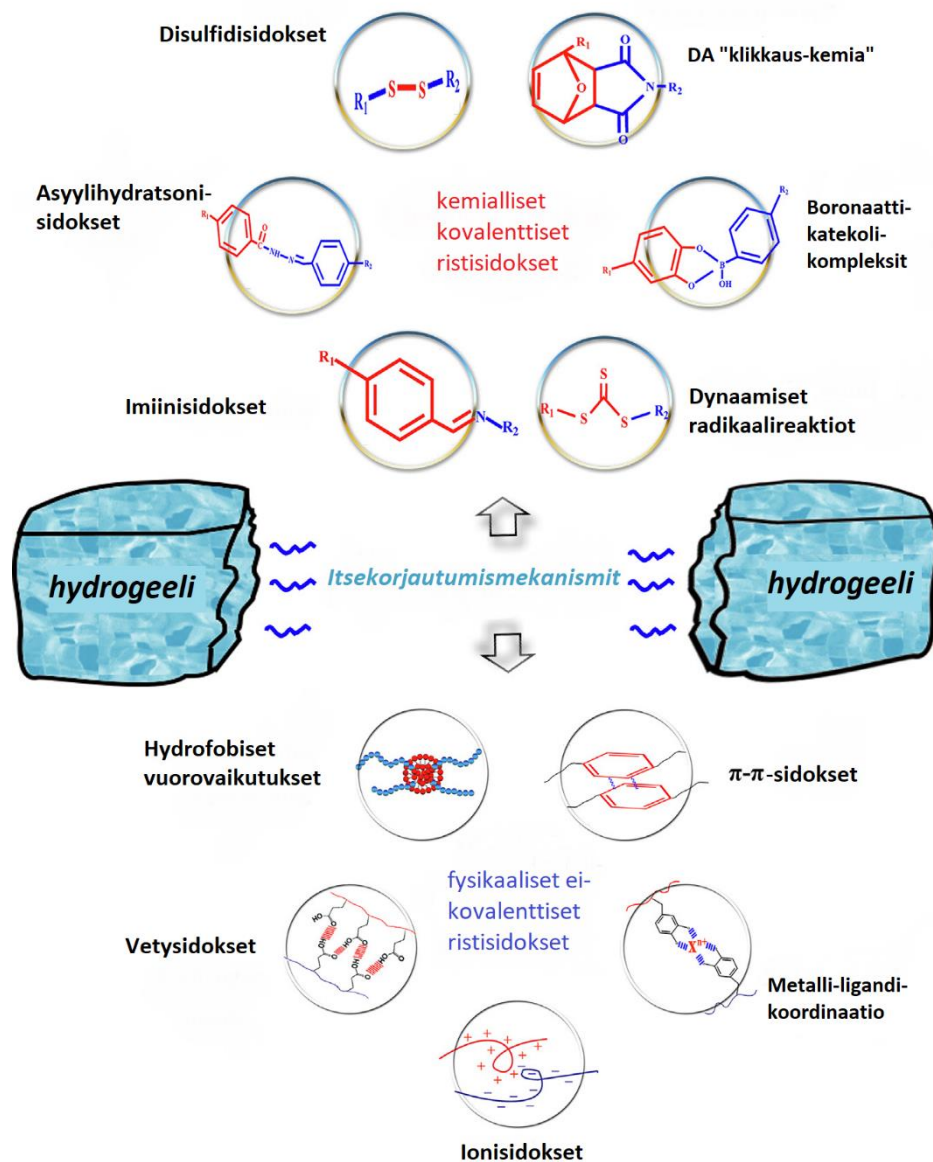
Perinteiset hydrogeelit kestävät kovalenttisten sidostensa takia huonosti ympäristön kohdistamia mekaanisia voimia (Hafeez ym. 2018). Irreversiibelien sidosten rikkoutuessa rakenne hajoaa, eikä hydrogeeli pysty takaamaan stabiilia kasvuympäristöä soluille. Rikkoutunut rakenne voi myös altistaa korjautuvan kudoksen infektiolle. (Tu ym. 2019) Tätä ongelmaa ei kuitenkaan tule itsekorjautuville geeleille, sillä ne pystyvät muokkaamaan sidoksiaan ympäristön mukaan (Townsend ym. 2019). Tämän ansiosta itsekorjautuvien hydrogeelien elinikä on pidempi, ja ne pystyvät kauemmin ylläpitämään ominaisuuksiaan (Yoon ym. 2011, Taylor & in het Panhuis 2016). Itsekorjautuvat hydrogeelit pystyvät myös mukautumaan sisällään kasvavien solujen tarpeisiin. Solujen levittäytyessä sidoksia hajoaa, mutta toisaalla niitä muodostuu lisää. Näin kasvuolosuhteet pysyvät vakaampina kuin perinteisissä hydrogeeleissä. (Hafeez ym. 2018) Itsekorjautuvien hydrogeelien dynaamisten sidosten onkin todettu edistävän solujen elonkaikua ja migraatiota (Wei & Gerech 2018, Heidarjan ym. 2019).

Itsekorjautuvat hydrogeelit ovat myös biologisesti yhteensopivia ja biohajoavia, sillä ne muodostetaan polymeereistä, jotka kyetään hajottamaan solun aineenvaihdunnassa tai erittämään muuta reittiä pitkin pois (Leberfinger ym. 2019). Monet luonnollisia polymeerejä sisältävät hydrogeelit ovat lisäksi bioaktiivisia, ja solut kykenevät tarttumaan näihin materiaaliin. Esimerkiksi kollageenin sisältämän RGD-motiivin (arginiini, glysiini ja aspartaatti) on todettu lisäävän solujen sitoutumista, kun taas hyaluronihappo voi saada solussa aikaan kollageenin ja aggregaation tuotannon. (Wei & Gerech 2018, Kim ym. 2019) Myös inertteihin polymeereihin voidaan liittää bioaktiivisia osia, kuten Hazeef tutkimusryhmänsä kanssa teki (Hafeez ym. 2018). He lisäsivät alun perin inerttiin alginaattipohjaiseen polymeeriin RGD-motiivin, jonka ansiosta solut kasvoivat paremmin itsekorjautuvan hydrogeelin sisällä (Hafeez ym. 2018). Myös Shi kollegoineen käytti samanlaista menetelmää hyaluronihapon kanssa (Shi ym. 2017).

2.2 Tukiverkon muodostustapoja

Hydrogeelin sisäisen tukiverkon muodostamiseen käytetään useita erilaisia sidoksia. Jos kuitenkin halutaan, että geelillä on myös itsekorjautumisominaisuus, täytyy polymeerien välisten ristsidosten olla reversiibeileitä (Taylor & in het Panhuis 2016, Townsend ym. 2019). Tämäkin onnistuu useilla sidostavoilla, mutta tässä kappaleessa keskitytään yleisesti 3D-tulostuksessa käytettyihin sidoksiin.

Yleisimmät itsekorjautuvat sidostyypit näkyvät kuvassa 1. Soveltuvia kemiallisia sidoksia ovat muun muassa imiini-, asyylihydratsoni- ja disulfidididokset. Myös eräät fysikaaliset ei-kovalenttiset sidokset, kuten hydrofobinen vuorovaikutus, vety-, ioni- ja koordinaatiosidokset sekä erilaiset isäntä-vieras-vuorovaikutukset ovat riittävän vahvoja ylläpitämään hydrogeelin rakennetta. (Tu ym. 2019) Näitä ei-kovalenttisiä sidoksia kutsutaan myös supramolekulaarisiksi sidoksiksi (Heidarian ym. 2019). Kovalenttisten ja fysikaalisten sidosten suurin ero on se, että fysikaaliset sidokset muodostuvat automaattisesti uudestaan, mutta kemialliset sidokset tarvitsevat usein ulkopuolisen laukaisijan, esimerkiksi pH:n muutoksen tai säteilytyksen (Taylor & in het Panhuis 2016). Tämän ansiosta dynaamisten fysikaalisesti muodostettujen hydrogeelien itsekorjautumisnopeudet ovat yleisesti paljon suurempia kuin kemiallisissa geeleissä (Heidarian ym. 2019).



Kuva 1. Yleiset itsekorjautumismekanismin mahdollistavat sidostyyppit. Itsekorjautuvien hydrogeelien sidokset muodostetaan joko dynaamisilla kovalenttisilla sidoksilla tai fysikaalisilla ei-kovalenttisilla sidoksilla. Muokattu lähteestä (Tu ym. 2019).

Imiinisidokset voidaan muodostaa miedoissa olosuhteissa amiinin ja karbonyylin tai aldehydin kanssa. Näiden sidosten korjautumiskyky on erittäin hyvä, mutta ne eivät kestä liian happamia olosuhteita aminoryhmän protonoitumisen takia. Asyylihydratsoni-sidokset ovat stabiilimpia verrattuna imiinisidoksiin, ja niitä onkin käytetty menestyksekkäästi itsekorjautuvien hydrogeelien luomiseen. Ne kuitenkin pysyvät kasassa vain lievästi happamissa olosuhteissa ja muuttuvat nopeasti pH:n kasvaessa nestemäisiksi, mikä rajoittaa niiden käyttöä. (Tu ym. 2019) Esimerkiksi Kim kollegoineen kehitti hydrogeelin, joka sisälsi sekä hapetettua hyaluronihapon ja glykolikitosaanin välisiä imiinisidoksia, että samaisen hyaluronihapon ja

adiipiinihappodihydratsidin välisiä hydratsonisidoksia (Kim ym. 2019). Hydrogeelillä todettiin olevan hyvä itsekorjautumiskyky. Lisäksi korjautuminen oli nopeaa ja rasiustestissä mekaaniset ominaisuudet palautuivat täysin kahdessa minuutissa. (Kim ym. 2019)

Toisin kuin monet muut kovalenttisia sidoksia sisältävät itsekorjautuvat hydrogeelit, disulfidisidoksin muodostettu hydrogeeli kykenee korjautumaan ilman ulkopuolista laukaisijaa. Lisäksi sen muodostaminen onnistuu huoneenlämpötilassa. (Tu ym. 2019) Yoon kollegoineen kehitti itsekorjautuvan poly(n-butyylakrylaatti)-pohjaisen hydrogeelin, jossa tähden muotoon liitettyjen polymeerien kärjissä oli SH-sivuryhmät (Yoon ym. 2011). Nämä tioliryhmät muodostivat hapetuksen avulla reversiibelin disulfidisidosten verkon. Hydrogeeli oli itsekorjautuva, mutta korjautuakseen muodostettujen leikkauspintojen täytyi olla todella lähellä toisiaan, jotta sidosten uudelleenmuodostaminen oli mahdollista. (Yoon ym. 2011)

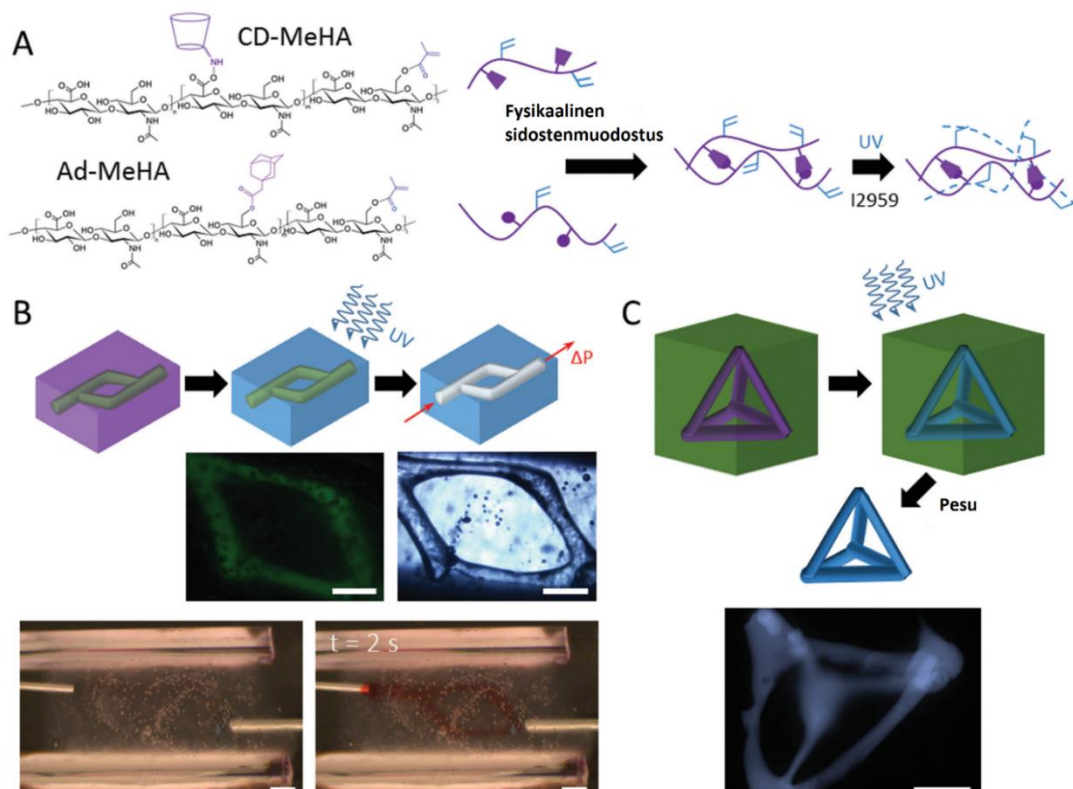
Hydrofobisia vuorovaikutuksia hyväksikäyttävät itsekorjautuvat hydrogeelit muodostuvat yhteen liitettyistä hydrofiilistä ja hydrofobisista komonomeereistä. Nämä monomeerit hylkivät toisiaan, jolloin syntyy misellimäinen itsestään korjautuva rakenne. (Taylor & in het Panhuis 2016) Tällainen hydrogeeli vaatii kuitenkin polymeerien hydrofobisten domeenien lisäksi vapaita pinta-aktiivisia detergentejä, esimerkiksi natriumdodekyylisulfaattia eli SDS:ää, pysyäkseen kasassa (Tu ym. 2019). Can kehitti tutkimusryhmänsä kanssa itsekorjautuvan hydrogeelin, joka perustui akryyliamidiin kovalenttisesti liitettyyn hydrofobiseen stearyylimetakrylaattiin ja SDS:ään (Can ym. 2016). Tällä tavalla muodostetulla hydrogeelillä todettiin olevan hyvä itsekorjautumiskapasiteetti. Hydrofobiset komponentit eivät kuitenkaan vedä toisiaan puoleensa, joten korjautumisen onnistumiseksi täytyi hydrogeelin palat viedä lähelle toisiaan. Samasta syystä korjautuneeseen geeliin jäi helposti ilmataskuja. (Can ym. 2016)

Myös vetysidoksia voidaan käyttää itsekorjautuvien hydrogeelien luomiseen. Sidosten voimakkuus riippuu muodostajien protonaatioasteesta ja kemikaalisesta ympäristöstä. Lisäksi optimaalisen itsekorjautumisominaisuuden mahdollistaakseen muodostunut sidos ei saa olla liian lyhyt eikä pitkä. (Tu ym. 2019) Dynaamisen luonteensa ansiosta vetysidoksin muodostetut hydrogeelit ovat kuitenkin pseudoplastisia, ja tämän ansiosta niiden tulostaminen on helppoa (Taylor & in het Panhuis 2016). Suurin osa kestävästä itsekorjautuvista hydrogeeleistä muodostavista materiaaleista pysyy kuitenkin stabiilina vain happamissa olosuhteissa, mikä rajoittaa näiden geelien käyttöä biologisessa ympäristössä (Tu ym. 2019).

Toinen varauksia hyödyntävä sidoksenmuodostustapa on ionisidokset, jotka ovat huomattavasti vahvempia kuin vetysidokset (Taylor & in het Panhuis 2016). Ionisidoksellisissa itsekorjautuvissa hydrogeeleissä on kuitenkin tärkeää, että polymeerit eivät ole varautuneet vain yhdestä kohdasta. Jotta rikkoutuneiden polymeerien välille syntyisi uusia sidoksia, täytyy molemmille puolille jäädä

sekä positiivisesti että negatiivisesti varautuneita ioneja. (Tu ym. 2019) Monet ionit myös deprotonoituvat helposti hydrogeelissä, mikä heikentää niiden itsekorjautumiskykyä (Taylor & in het Panhuis 2016).

Isäntä-vieras-vuorovaikutukset (host-guest interaction) ovat yleisiä supramolekulaarisia sidoksenmuodostustapoja itsekorjautuvissa hydrogeeleissä. Isäntämolekyylin ja vierasmolekyylin välillä olevat sidokset ovat usein heikkoja sidoksia, kuten vetysidoksia, mikä mahdollistaa nopean itsekorjautumisen. (Taylor & in het Panhuis 2016) Highley kollegoineen kehitti hyaluronihappopohjaisen hydrogeelin, jossa sidokset muodostuvat polymeeriin muokattujen adamantaani- ja β -syklodekstriiniryhmien (Ad-HA ja CD-HA) välille, kuten kuvassa 2A on havainnollistettu (Highley ym. 2015). Muodostuneet sidokset ovat luonteeltaan supramolekulaarisia isäntä-vieras-vuorovaikutuksia, mikä mahdollistaa hyvän itsekorjautumiskapasiteetin sekä pseudoplastisuuden. Itsekorjautuvan HA-hydrogeelin sidokset muodostuivat uudelleen lähes täydellisesti muutamassa minuutissa, ja myöhemmin julkaistussa protokollassa saman geelin todettiin soveltuvan hyvin myös solujen ja lääkeaineiden tulostukseen. (Loebel ym. 2017)



Kuva 2. Isäntä-vieras-vuorovaikutusten ja kovalenttisten ristisidosten muodostus sekä tukigeeliin tulostaminen. A) Isäntä- ja vierasmolekyyleillä sekä metakrylaatilla muokattu hyaluronihappo. B) Metakrylaattiryhmiä sisältävään tukihydrogeeliin tulostettu geeli pestään UV-valotuksen jälkeen pois, jolloin valmiin geelin sisälle jää onkaloita. C) Metakrylaattia sisältävä hydrogeeli tulostetaan tukigeeliin sisään, ja UV-valotuksen jälkeen voidaan ulompi ja heikompi hydrogeeli pestä pois. Muokattu lähteestä (Highley ym. 2015).

Myös useita koordinaatiosidoksia, kuten metalli-ligandi-sidoksia on käytetty itsekorjautuvien hydrogeelien valmistamisessa (Tu ym. 2019). Keskustan metalli-onia valitessa tulee kuitenkin olla tarkkana, että hajoamistuotteina ei synny elimistölle tai kudokselle haitallisia aineita. Tämä rajoittaa paljon koordinaatiosidosten valintaa, sillä useat metalli-ionit ovat toksisia. Magnesiumin, raudan, kuparin ja koboltin ioneja on kuitenkin käytetty jo onnistuneesti. (Shi ym. 2019) Toinen käyttöä rajoittava tekijä on se, että muodostunut hydrogeeli ei aina ole läpinäkyvä. Solujen kasvatuksessa on tärkeää, että niitä pystytään kuvaamaan ja tutkimaan hydrogeelin sisällä. Esimerkiksi rautai- oneja sisältävät hydrogeelit ovat usein ruskeita, jolloin ne eivät läpäise hyvin valoa (Shi ym. 2019). Shi kollegoineen valmisti hydrogeelin hyödyntäen bisfosfonaatilla muokatun hyaluronihapon (HA-BP) ja Ca^{2+} -ionin välistä koordinaatiosidosta (Shi ym. 2017). Hydrogeelillä oli hyvä itsekorjautumis- kapasiteetti (lähes 100%) ja se käyttäytyi pseudoplastisesti. Ca^{2+} -ionia käytettäessä itsekorjautuva hydrogeeli oli myös väritön. Hydrogeeli oli kuitenkin pH-sensitiivinen, joten se hajosi nopeasti happamissa olosuhteissa. (Shi ym. 2017)

2.3 Yleisimpiä käytettyjä materiaaleja

Hydrogeelejä voidaan valmistaa sekä luonnollisista että synteettisistä polymeereistä. Luonnollisia yleisimmin käytettyjä polymeerejä ovat kollageeni, hyaluronihappo, gelatiini, fibriini, gellaanikumi ja alginaatti, synteettisiä taas polyetyleeniglykoli eli PEG ja polyvinyylialkoholi eli PVA. (Taylor & in het Panhuis 2016, Tu ym. 2019) Kaikkia näitä materiaaleja kuitenkin muokataan lisäksi niihin reagoivia sivuryhmiä, jotta saadaan muodostettua hydrogeelien sisäinen tukiverkko ja itsekorjautumisominaisuus.

Synteettiset materiaalit ovat paljon käytettyjä, sillä ne ovat helposti muokattavissa ja kestävät yleensä eroosiota ja painetta paremmin kuin luonnolliset polymeerit (Ji & Guvendiren 2017). Esimerkiksi An kollegoineen käytti polyetyleeniglykolia eli PEG-polymeeriä itsekorjautuvien hydrogeelien tekoon (An ym. 2020). He kehittivät hydrogeelin, jossa ristosilloituksen muodostaa hydroksyylietyylillä muokattu polyaspartaattihappo (PAEH) ja polyetyleeniglykolialdehydi (PEG DA) (An ym. 2020). PAEH:n hydratsoniryhmä reagoi PEG:n aldehydiryhmän kanssa, jolloin muodostunut sidostyyppi oli dynaaminen hydratsonisidos. Tutkimuksessa todettiin materiaalilla olevan hyvä itsekorjautumiskyky ilman ulkoista ärsykettä 24 tunnin inkubaatiossa. Lisäksi hydrogeelin todettiin olevan pH-sensitiivinen, sillä se muuttui pH:ssa 3 viskoosiksi nesteeksi, mutta pH:n palauttua neutraaliksi materiaali pystyi muodostamaan uudestaan sidoksensa. (An ym. 2020)

Synteettiset materiaalit ovat kuitenkin lähes aina inerttejä, joten solujen on vaikeaa kasvaa pelkästään synteettisistä polymeereistä muodostetuissa biomateriaaleissa. Tämän takia on järkevää tehdä heterogeenisiä hydrogeelejä, jolloin voidaan hyödyntää sekä synteettisten polymeerien mekaanista kestävyttä että luonnollisten polymeerien bioaktiivisuutta. (Leberfinger

ym. 2019) Useamman polymeerin hydrogeelien on todettu olevan myös sidoslujuudeltaan vahvempia ja kestävämpiä paremmin ympäristöstä aiheutuvaa painetta (Xu ym. 2019).

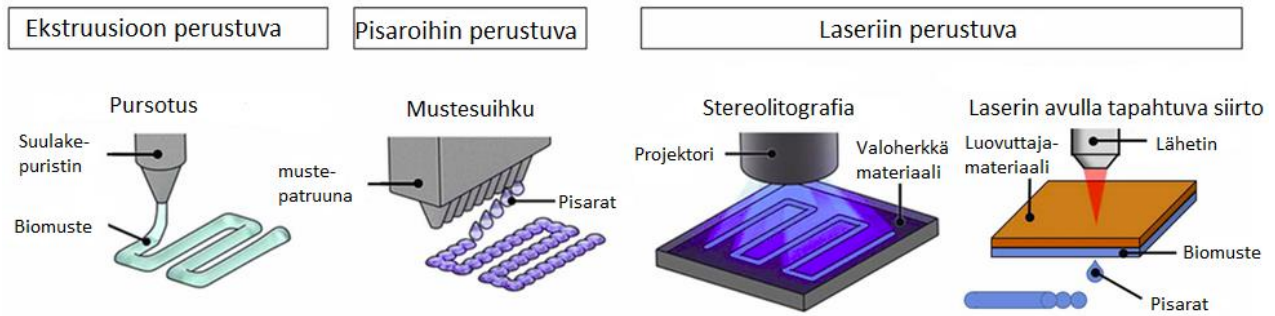
Alginaatti on yksi yleisimmistä hydrogeeleissä käytetyistä luonnollisista polymeereistä, koska sillä on hyvät mekaaniset ominaisuudet ja se on helposti muokattavissa (Ji & Guvendiren 2017, Bedell ym. 2020). Sen on lisäksi huomattu parantavan resoluutiota tulostuksessa, ja puoliläpäisevyytensä ansiosta se saattaa ehkäistä immuunireaktioita (Leberfinger ym. 2019). Alginaatti yksinään ei kuitenkaan sisällä sitoutumisdomeeneja, vaan se on inertti eikä edistä solujen kasvua (Bedell ym. 2020). Siksi sitä käytetäänkin yleensä muokattuna tai sekoituksena luonnollisen polymeerin kanssa. de Melo valmisti tutkimusryhmänsä kanssa kaksoisverkkorakenteisen hydrogeelin, joka sisälsi UV-valon eli ultraviolettivalon avulla kovalenttisesti liitettyjä dimetyyliakrylaatilla muokattuja PEG-polymeerejä ja Ca^{2+} -ionin avulla muodostettuja koordinaatiosidoksia alginaattien välillä (de Melo ym. 2019). Hydrogeelin todettiin olevan vahva ja joustava, ja sillä oli sekä itsekorjautuvuus että pseudoplastinen ominaisuus. Solujen tulostusta tutkiessa hydrogeeliin lisättiin fibriiniä, mikä paransi solujen kasvua. (de Melo ym. 2019)

3. ITSEKORJAUTUVIEN HYDROGEEELIEN 3D-TULOSTUS

3D-tulostus on kohtalaisen helppoa, halpaa ja nopeaa, ja se onkin yleistynyt nopeasti kudosteknologian alalla (Ji & Guvendiren 2017, Leberfinger ym. 2019). Tämä menetelmä on mahdollistanut kokonaisien kudosten ja elinten tuottamisen ja tutkimisen laboratoriossa. Lisäksi biotulostaminen mahdollistaa myös haastavien ja tarkkojen rakenteiden muodostamisen, mikä on aiemmin ollut mahdotonta. Itsekorjautuvat hydrogeelit toimivat hyvin biomusteena, sillä tulostuksen aikana hajooneet sidokset kytetään muodostamaan uudestaan. Tällöin rakenne pysyy kasassa ja mekaaniset ominaisuudet säilyvät hyvinä. (Tu ym. 2019)

3.1 3D-tulostusmenetelmät biomateriaaleille

Biomateriaalien tulostaminen vaatii tarkkaan säädellyt olosuhteet, jotta herkkien materiaalien, kuten itsekorjautuvien hydrogeelien ja solujen, tulostaminen onnistuu (Ji & Guvendiren 2017). Tämä rajoittaa mahdollisten tulostustapojen ja tulostimien määrää, vaikka uusia menetelmiä kehitelläänkin kaiken aikaa. Tällä hetkellä yleisessä käytössä on 3 menetelmää, joiden peruserätykset näkyvät kuvassa 3 (Ji & Guvendiren 2017, Leberfinger ym. 2019).



Kuva 3. Yleisimmät 3D-tulostusmenetelmät biomateriaaleille. Ekstruusioon perustuvassa menetelmässä biomuste tulostetaan yhtäjaksoisesti puristimen läpi. Pisaroihin perustuvassa tulostuksessa muste suihkutetaan pisaroina suuttimen läpi. Laseriin perustuvassa tulostuksessa voidaan UV-valoa tai laseria osoittaa keskitetysti valoherkälle materiaalille, jolloin se kovettuu (stereolitografia). Toinen vaihtoehto on kohdistetun laserin ja luovutuskerroksen avulla muodostettu mustesuihku. Muokattu lähteestä (Ji & Guvendiren 2017).

Ekstruusioon perustuvassa biotulostuksessa (Extrusion-based bioprinting, EBB) hydrogeeli tulostetaan ohuen neulan tai suuttimen läpi. Tulostustapa sopii usealle eri materiaalille, myös korkean viskositeetin omaaville, koska neulan halkaisijaa voidaan muuttaa. (Ji & Guvendiren 2017, Leberfinger ym. 2019) EBB onkin yleisimmin käytetty tulostusmenetelmä, ja useiden biomateriaalien lisäksi sillä voidaan tulostaa myös korkeita solupitoisuuksia. (Heidarian ym. 2019, Xu ym. 2019). Tällöin täytyy kuitenkin olla tarkkana, että paine, joka aiheutuu solujen puristuessa neulan läpi, ei vahingoita niitä (Heidarian ym. 2019). Solujen selviytymisprosentti EBB:llä tulostettaessa on yleensä 40–80%. Suuret erot johtuvat kyseisen paineen sekä tulostusajan eroista. Mitä isompi on tulostettava rakenne ja mitä kauemmin tulostus kestää, sen enemmän solut rasittuvat prosessin aikana. (Leberfinger ym. 2019) Koska EBB:llä pystyy tulostamaan myös korkean viskositeetin omaavia hydrogeelejä, se mahdollistaa soluaggregaattien tulostamisen ja erilaisten solu- tai lääkekantajien käytön materiaaleissa (Ji & Guvendiren 2017). Miinuspuolena tässä menetelmässä on sen heikko resoluutio (yleensä noin 100 μm –muutama millimetri), eli EBB:llä ei pystytä tulostamaan tarkkaa työtä vaativia rakenteita (Leberfinger ym. 2019). Toisaalta menetelmä on ainoa, joka mahdollistaa tällä hetkellä kokonaisten elinten tulostuksen (Shi ym. 2017).

Pisaroihin perustuva biotulostus (Droplet-based bioprinting, DBB) käyttää hyödykseen gravitaatiota, ilmakehän painetta ja fluidien mekaniikkaa. Näiden avulla hydrogeelistä saadaan tulostettua mustesuihkuna haluttu rakenne. (Leberfinger ym. 2019) Menetelmää voidaan hyödyntää matalan viskositeetin omaaville, lähes nestemäisille hydrogeeleille (Ji & Guvendiren 2017). DBB on yksinkertainen, nopea ja halpa menetelmä, joka mahdollistaa hyvän kontrollin varsinkin, jos käytetään yhtä aikaa useampaa suutinta. Lisäksi solut kestävät hyvin tämän menetelmän, ja niiden selviyty-

misprosentti on yleensä yli 85%. (Leberfinger ym. 2019) DBB:n hankaluutena on musteeksi sopivien biomateriaalien vähyys, sillä viskositeetin tulee olla matala ($<10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$) (Ji & Guvendiren 2017). Tämä hankaloittaa myös rakenteen kasassa pysymistä tulostuksen jälkeen. Lisäksi tulostuksessa käytettävät suuttimet tukkeutuvat helposti, joten DBB:llä ei pystytä tulostamaan suuria solupitoisuuksia (Heidarian ym. 2019).

Kolmas biotulostukseen soveltuva menetelmä on laseriin perustuva tulostus (Laser-based bioprinting, LBB). Tässä menetelmässä hyödynnetään lasereita ja korkeaa lämpötilaa, joiden avulla saadaan biomateriaali kerrostumaan pisara pisaralta alustalle. (Leberfinger ym. 2019) Tulostuslaitteita on useita hiukan eri tavalla toimivia, mutta jokaisen perustana on kohdistetun valon avulla tapahtuva tulostus (Ji & Guvendiren 2017). LBB on käytetyistä biomateriaalien tulostusmenetelmistä monimutkaisin ja kallein, mutta sillä on myös paras resoluutio, ja tämän menetelmän avulla pystytäänkin suunnittelemaan jopa yksittäisten solujen paikat. Solujen säilyminen on LBB:llä tulostettaessa lähes 95% nopeimman tulostusajan takia, mutta vielä ei tiedetä kuinka laserille altistuminen vaikuttaa soluihin ajan myötä. (Leberfinger ym. 2019) LBB:n suurin haaste onkin löytää miedot ja soluille sopivat olosuhteet tulostuksessa (Ji & Guvendiren 2017). Haastavuutensa takia menetelmään soveltuvia materiaaleja on vähän, sillä viskositeetti ei saa olla suuri, ja materiaalin pitää muodostaa tukisidokset nopeasti tulostuksen jälkeen. Toisaalta tällä menetelmällä on helppoa tulostaa oikean huokoskoon omaavia tukirakenteita, joissa solut kiinnittyvät ja jakautuvat hyvin. (Leberfinger ym. 2019)

3.2 Tulostuksen mahdollistavia ominaisuuksia ja menetelmiä

Yksi hydrogeelille hyödyllisimmistä ominaisuuksista tulostuksen kannalta on pseudoplastisuus eli leikkausohenevuus. Pseudoplastisen materiaalin sisäiset sidokset purkautuvat kohdistetun paineen alaisena, kuten esimerkiksi leikatessa tai ohuen neulan läpi tulostettaessa, ja hydrogeeli muuttuu juoksevaksi. Ulkoisen paineen poistuessa itsekorjautuva hydrogeeli kykenee muodostamaan kyseiset sidokset uudelleen, ja viskositeetti palautuu normaaliksi. (Taylor & in het Panhuis 2016, Townsend ym. 2019) On kuitenkin tärkeää, että nämä muutokset tapahtuvat nopeasti, jotta tulostettu rakennelma pitää muotonsa (Loebel ym. 2017). Materiaalin viskositeetin pienentyminen neulan läpi tulostettaessa estää myös neulaa tukkeutumasta. Lisäksi pseudoplastisuus ehkäisee kasaumien muodostumista, jolloin hydrogeeli tulostuu tasaisemmin eikä muodosta liian tiiviitä kohtia, joissa solujen kasvu estyy. (Townsend ym. 2019, Tu ym. 2019) Esimerkiksi Highleyn isäntävieras-vuorovaikutuksia sisältävällä hydrogeelillä, jonka rakenne löytyy kuvasta 2, todettiin olevan pseudoplastinen ominaisuus (Highley ym. 2015). Myös Shin kehittämän Ca^{2+} -ionien ja bisfosfonaatilla muokatun hyaluronihapon väliset koordinaatiosidokset mahdollistivat pseudoplastisuuden (Shi ym. 2017).

Pseudoplastisuus ei ole ainoa tulostamisen mahdollistava ominaisuus. Osa hydrogeeleistä on nestemäisiä tietyissä olosuhteissa, jolloin geelin muodostuminen tapahtuu olosuhteita vaihtamalla (Tu ym. 2019). Tätä voidaan hyödyntää tulostuksessa. Esimerkiksi lämpötila- tai pH-sensitiivisiä itsekorjautuvia hydrogeelejä on onnistuttu tulostamaan menestyksekkäästi (Leberfinger ym. 2019, Tu ym. 2019). Rakenteen säilymisen kannalta on kuitenkin tärkeää, että geeli-neste-geeli-muutokset tapahtuvat mahdollisimman kapealla muutosvälillä ja lyhyessä ajassa. Lisäksi lämpökäsittely saattaa heikentää polymeeriketjujen kestävyttä ja johtaa rakenteen hajoamiseen, jonka takia tällaisia geelejä on käytetty vain vähän. (Heidarian ym. 2019) Ympäristösensitiivisiä materiaaleja valittaessa on aina tärkeää, että hydrogeeli on pysyvimmillään solujen luonnollisissa olosuhteissa. Muuten solujen kasvu ja kudoksen muodostus ei ole optimaalista, eikä materiaalia pystytä hyödyntämään *in situ* -tulostuksessa. (Leberfinger ym. 2019) Lisäksi solujen kanssa tulostaminen voi olla mahdotonta, jos olosuhteet tulostuksen aikana vahingoittavat soluja.

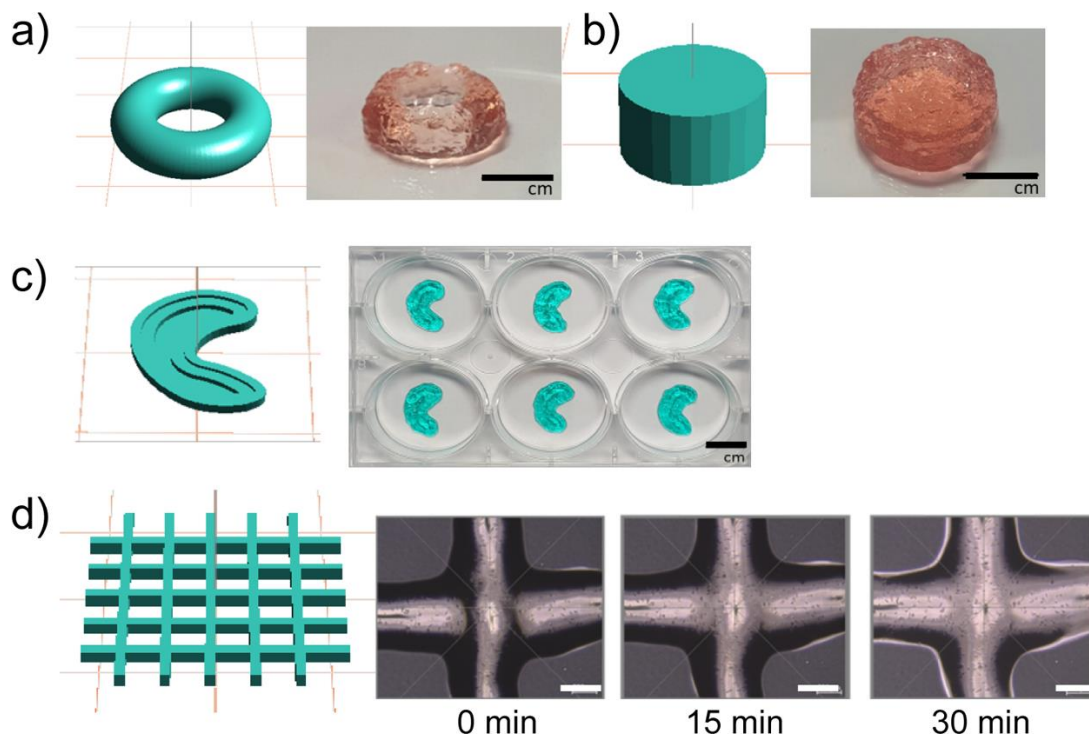
Lähes nestemäisiäkin materiaaleja voidaan tulostaa, jos hydrogeeliä muokataan vielä tulostuksen jälkeen. UV-valon avulla tapahtuvaa ristosilloitus on yksi tähän tarkoitukseen usein käytetyistä menetelmistä. Tällöin mekaanisia ominaisuuksia parannetaan lisäämällä kovalenttisia sidoksia polymeerien välille. (Taylor & in het Panhuis 2016) On kuitenkin tärkeää, että käytetty materiaali on läpinäkyvä, jotta valo pystyy läpäisemään jokaisen kohdan materiaalista (Townsend ym. 2019). Tulostuksen jälkeistä ristosilloittamista voidaan käyttää myös pehmeille fysikaalisilla sidoksilla muodostetuille hydrogeeleille lisäämään mekaanista kestävyttä (Shi ym. 2017). Esimerkiksi Highleyn tutkimuksessa itsekorjautuvassa isäntä-vieras-vuorovaikutuksiin perustuvassa hydrogeelissä oli sellaisenaan heikot mekaaniset ominaisuudet, joten tutkimuksessa käytettiin stabilointina UV-valolla aikaansaatuja metakrylaattisidoksia (Highley ym. 2015).

Vahvistusmenetelmää hyödyntäessä täytyy kuitenkin muistaa, että suuri määrä irreversiibeileitä sidoksia heikentää korjautumiskykyä sekä saattaa tehdä hydrogeelistä liian tiiviin soluille. Jos geelin huokoisuus pienenee liikaa, solut eivät pysty enää kasvamaan rakenteessa tasaisesti. (Leberfinger ym. 2019) Jos hydrogeeli tulostetaan ilman tukigeelejä, valotuksen täytyy tapahtua heti, kun materiaali on valmiilla pinnalla. Tällöin valotus ei tapahdu samaan aikaan kaikkialla materiaalissa, mikä saattaa johtaa heterogeeniseen koostumukseen. (Shi ym. 2017) lisäksi sidoksia täytyy muodostua myös eri aikaan tulostettujen kerrosten välille, ei vain kerrosten sisälle (Heidarian ym. 2019). Pelkästään kovalenttisia sidoksia hyödyntäviä hydrogeelejä on siis haastavaa käyttää 3D-tulostuksessa. Liian hidas tukisidosten muodostuminen saa aikaan materiaalin rakenteen leviämisen, liian nopea taas tukkii tulostettavan laitteen (Loebel ym. 2017).

Pehmeiden itsekorjautuvien hydrogeelien tulostamisessa voidaan käyttää apuna tukigeeliä, kuten kuvissa 2B ja 2C on tehty (Highley ym. 2015, Shi ym. 2017). Toisen geelin sisälle tulostettaessa materiaali säilyttää paremmin muotonsa, ja sillä voidaan tulostaa huomattavasti useampia kerroksia kuin ilman ympäröivän geelin tukea. Ympäröivä tukigeeli mahdollistaa myös suuntaamattoman

tulostuksen, eli tulostuksen ylhäältä alaspäin tai viistosti perinteisen kerrostamisen sijaan. (Highley ym. 2015) Yleensä toinen käytetyistä materiaaleista muokataan kestävämmäksi ylimääräisten kovalenttisten sidosten avulla, jonka jälkeen heikompi geeli pystytään pesemään tai liuottamaan pois (Shi ym. 2017). Tällä tavalla voidaan tulostaa haastaviakin rakenteita ja esimerkiksi muodostaa materiaalin sisälle valmiita kanavia verisuonien synnylle (Highley ym. 2015).

Itsekorjautuvien hydrogeelien hyöty verrattuna perinteisiin hydrogeeleihin on tulostuksessa merkittävä. Sidosten rikkoutuminen prosessin aikana ei haittaa, joten geeli voidaan muodostaa jo ennen tulostusta (Wei & Gerecht 2018, Shi ym. 2019). Perinteiset hydrogeelit eivät irreversibelien sidosten takia kestäisi tätä, vaan niiden rakenne hajoaa sidosten hajotessa. Perinteisiä hydrogeelejä voidaan tulostaa vain neste-geeli-muutoksen aikana, kun taas itsekorjautuvien hydrogeelien tulostukselle ei ole aikarajaa (Wei & Gerecht 2018). Lisäksi itsekorjautuminen mahdollistaa tulostettavien kerrosten yhteensulautumisen. Tämän ansiosta eri aikaan tulostetut rakenteet muodostavat yhtenäisen kokonaisuuden, eivätkä jää erillisiksi kerroksiksi. (Kim ym. 2019) Kuvassa 4D on kuvattu tätä sulautumista mikroskoopilla. Solujen tulostuksen yhteydessä itsekorjautuvien geelien on myös todettu suojelevan soluja niihin kohdistetulta paineelta. Tämä on mahdollista, koska itsekorjautuva materiaali kykenee järjestäytymään uudella tavalla solujen ympärille tulostuksen aikana. (Wei & Gerecht 2018, Heidarian ym. 2019)



Kuva 4. Imiini- sekä hydratsonisidoksia sisältävän itsekorjautuvan hydrogeelin tulostus. a) Donitsin, b) sylinterin ja c) nivelkierukan muotoon tulostettu hydrogeeli. d) Mikroskooppikuvat itsekorjautumisominaisuudesta hydrogeelissä, johon on lisätty kondrosyyttejä (1×10^7 solua/ml). Otettu lähteestä (Kim ym. 2019).

3.3 Tulostuksessa käytettyjä materiaaleja ja sidostapoja

Itsekorjautuvien hydrogeelien on todettu soveltuvan hyvin 3D-tulostukseen, sillä ne pysyvät paremmin kasassa prosessin aikana, eivätkä välttämättä tarvitse muokkausta jälkikäteen (Tu ym. 2019). Tulostukseen käytettyjen materiaalien komponentit ovat samoja kuin muutenkin itsekorjautuvissa materiaaleissa, mutta sidostyypillä on suurempi merkitys. Mitä nopeammin hydrogeeli kykenee muodostamaan sidoksensa uudelleen tulostuksen jälkeen, sen paremmin se soveltuu biomuuteeksi. (Heidarian ym. 2019)

Hazeef tutki kollegoidensa kanssa hapetetun alginaatin ja semikarbatsonin, hydratsonin sekä oksiimien muodostamia hydrogeelejä ja niiden tulostusta (Hafeez ym. 2018). Semikarbatsonin ja hydratsonin avulla muodostetuilla geeleillä todettiin olevan itsekorjautumiskapasiteetti ilman ulkoista laukaisijaa, oksiimihydrogeelillä taas ei ollut havaittavissa korjautumista. Sekä semikarbatsonihydrogeeliä että hydratsonihydrogeeliä pystyttiin myös tulostamaan onnistuneesti. Hydratsonihydrogeelillä onnistuttiin tulostamaan tarkkaa jälkeä suuremmilla pitoisuuksilla verrattuna muihin hydrogeeleihin, mikä johtui hydratsonisidosten muodostamasta pehmeämmästä rakenteesta. (Hafeez ym. 2018)

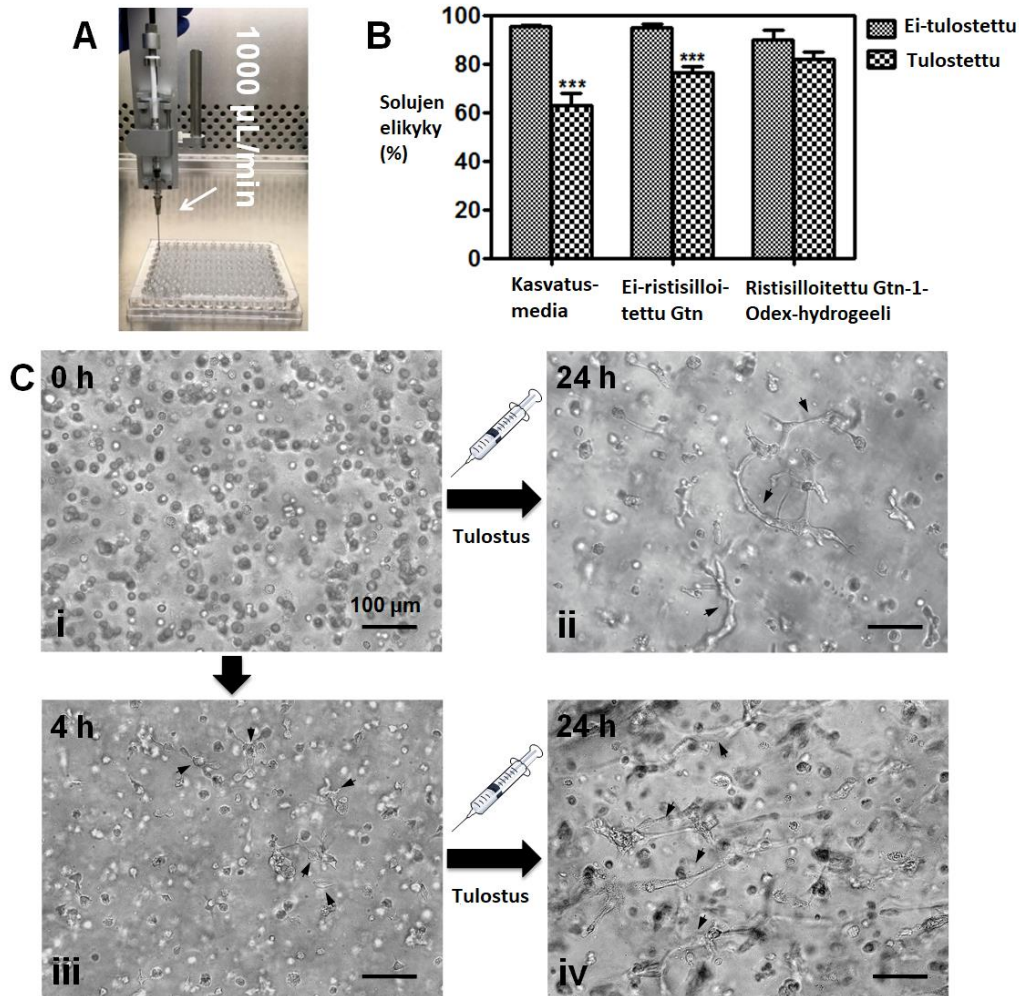
Myös Kim valmisti tutkimusryhmänsä kanssa imiini- ja hydratsonisidoksilla muodostetun itsekorjautuvan hydrogeelin, jota pystyttiin tulostamaan ilman muokkauksia ekstruusioon perustuvalla menetelmällä (Kim ym. 2019). Käytetyssä hydrogeelissä hapetettu hyaluronihappo (OHA) muodosti imiinisidoksia glykolikitosaanin kanssa ja hydratsonisidoksia adipiinihappodihydratsidin kanssa. Kuvassa 4 on kuvattu tämän hydrogeelin soveltuvuutta 3D-tulostukseen. (Kim ym. 2019) Wei kollegoineen taas käytti gelatiinin (Gtn) ja hapetetun dekstraanin (Odex) muodostamaa hydrogeeliä 3D-tulostukseen *in vivo*- ja *in vitro* -tutkimuksessa (Wei & Gerecht 2018). Tämän imiinisidoksilla muodostetun Gtn-1-Odex-hydrogeelin todettiin korjaavan kahden yhteen liitetyn osan väliset sidokset täydellisesti 20 minuutissa. Lisäksi hydrogeeliä pystyttiin tulostamaan hyvin myös geelitymisen jälkeen. (Wei & Gerecht 2018)

Yksinkertaisen tukiverkon omaavia hydrogeelejä on helppo tulostaa, mutta ne kestävät usein huonosti eroosiota tai *in situ* -olosuhteiden aiheuttamaa painetta (Xu ym. 2019). Tähän ratkaisuna on kaksoisverkko rakenne, joista toinen voidaan muodostaa ulkoisen laukaisijan avulla tulostamisen jälkeen. Sekä Highley että Shi käyttivät tulostuksessaan apuna kovalenttisten sidosten avulla muodostettua kaksinkertaista tukiverkkoa vahvistamaan rakennetta (Highley ym. 2015, Shi ym. 2017). Highley kollegoineen käytti isäntä-vieras-vuorovaikutusten lisäksi UV-valolla aikaansaatuja sidoksia (kuva 2A), jotka muodostettiin metakrylaattisivuryhmien avulla (Highley ym. 2015). Shi kollegoineen taas käytti akryyliamidiryhmien ja UV-valon avulla muodostettuja sidoksia vahvistamaan itsekorjautuvaa hydrogeeliä bisofonaatin ja Ca^{2+} -ionien välisten metalli-ligandi-sidosten lisäksi (Shi ym. 2017).

3.4 3D-tulostus solujen kanssa

Solujen tulostuksessa huomioon otettavia tekijöitä on useita. Käytetty tulostustapa, paine ja neulan koko vaikuttavat paljon lopputulokseen, mutta eniten merkitystä on käytetyn biomusteen ominaisuuksilla (Zhao ym. 2015). Käytetyn materiaalin tulee olla helposti tulostettavaa ja muotonsa säilyttävää, mutta sen pitää olla aiheuttamatta liikaa painetta soluille. Lisäksi tulostuksen täytyy olla nopeaa, jotta soluilla riittää ravinteita koko prosessin ajan. (Leberfinger ym. 2019) Zhao totesi tekemässään tutkimuksessa, että tulostusajan pitäisi kokonaisuudessaan olla muutamasta sekunnista puoleen tuntiin (35s–2900s), riippuen lämpötilasta ja käytetyn hydrogeelin konsentraatioista. Tutkimuksessa käytettiin perinteisiä hydrogeelejä, jotka valmistettiin gelatiinin ja alginaatin sekoituksesta, sekä soluina kondrosyyttejä eli rustosoluja. (Zhao ym. 2015) Samansuuntaista tulostusaikarajoitusta voidaan kuitenkin olettaa myös itsekorjautuvilla hydrogeeleillä.

Wei kuitenkin totesi tutkimuksessaan, että endoteelisolujen tulostaminen oli tuloksettaampaa, kun soluja kasvatettiin ensin 4 tuntia itsekorjautuvan hydrogeelin sisällä (Wei & Gerecht 2018). Tämän epäiltiin johtuvan siitä, että soluilla oli tarpeeksi aikaa sopeutua muuttuviin olosuhteisiin. Kuvassa 5C näytetään ero ECF-solujen eli endoteelikolonioita muodostavien solujen onkaloidenmuodostuksessa, kun solut on tulostettu suoraan tai 4 tunnin jälkeen hydrogeelin sekoituksesta. Tällaisesta välikasvatuksesta huolimatta itse tulostusajan täytyy olla lyhyt, jos halutaan, että solut eivät vaurioidu prosessin aikana. (Wei & Gerecht 2018)



Kuva 5. ECF-solujen säilyvyys itsekorjautuvan Gtn-1-Odex-hydrogeelin sisään tulostettuna. A) Tulostuslaitteisto, B) eri ympäristöissä tulostettujen solujen elinkyky verrattuna ei-tulostettuun, C) Onkaloiden muodostus heti sekoituksen jälkeen tulostetussa ja 4 tuntia kasvatetussa hydrogeelissä. Muokattu lähteestä (Wei & Gerecht 2018).

3D-tulostamista varten solut kapseloidaan eli ympäröidään tulostettavalla materiaalilla. Materiaalin valinnassa on huomioitava, että solujen lisäys lisää adheesiota ja materiaalin viskositeettiä, mikä saattaa vaikuttaa negatiivisesti tulostukseen. (Leberfinger ym. 2019) Korkea viskositeetti vaikeuttaa tulostusta myös solujen kannalta, sillä ne sietävät huonosti niihin kohdistuvaa painetta (Heidarian ym. 2019). Soluihin kohdistuva paine onkin yksi eniten soluvahinkoa aiheuttava syy tulostuksen aikana (Zhao ym. 2015, Xu ym. 2019). Soluja ei siis voida sekoittaa hydrogeeliin liikaa, jotta tulostaminen onnistuu. Eri tulostusmenetelmillä voidaan tulostaa erilaisia solutiheyksiä. EBB:llä voidaan tulostaa suuriakin pitoisuuksia, jopa soluagregaatteja. LBB:llä pystytään tulostamaan noin 10^8 solua/ml, kun taas DBB:llä pystytään tulostamaan pienimpiä pitoisuuksia, noin 10^6 solua/ml, suuttimen nopean tukkeutumisen takia. (Leberfinger ym. 2019) Mahdollisiin solutiheyksiin vaikuttaa kuitenkin myös materiaalin alkuperäinen viskositeetti ja kyky sitoutua lisättyihin soluihin.

Tulostuksessa on tärkeää, että käytetty materiaali soveltuu solujen kasvatukseen. Bedell kollegoineen tutki perinteisten kollageeni-, hyaluronihappo-, gelatiini- ja alginaattipohjaisten hydrogeelimusteiden yhteensopivuutta solujen kanssa (Bedell ym. 2020). Tutkimuksessa todettiin, että 7 päivän inkubaation jälkeen suurimmat solutiheydet olivat kollageeni- ja gelatiinigeleissä. Lisäksi näissä geeleissä tapahtui suurinta levittäytymistä biomateriaalin sisälle. Kaikki geelit alginaattia lukuun ottamatta myös autoivat käytettyjä ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja (hMSCs) erilaistumaan oikeaan suuntaan. (Bedell ym. 2020) Loebel kollegoineen taas totesi tutkimuksessaan, että heidän kehittämänsä hyaluronihappopohjaisen itsekorjautuvan isäntävieras-vuorovaikutuksiin perustuvan hydrogeelin injektoiminen solujen kanssa sydämeen vähensi huomattavasti arpikudoksen muodostumista verrattuna pelkkien solujen käyttöön (Loebel ym. 2017). Myös Kimin tutkimuksessa hyaluronihappopohjainen itsekorjautuva hydrogeeli mahdollisti yli 80% elonjäämisen viikon päästä tulostuksesta, ja tämän lisäksi käytetyt kondrosyytit ekspressoivat niille ominaisia geenejä (Kim ym. 2019).

Hazeef kollegoineen tutki hydratsoni-, semikarbatsoni-, ja imiinisidoksellisten itsekorjautuvien hydrogeelien soveltumista solujen kasvatukseen ja tulostukseen (Hafeez ym. 2018). Tutkimuksessa todettiin, että hydratsonisidoksin muodostetussa geelissä kondrosyytit jakautuivat ja kiinnittyivät paremmin kuin semikarbatsoni- tai oksiimihydrogeelissä. Soveltuvaksi tulostuspaineeksi saatiin itsekorjautuvalle hydratsonisidoksiin perustuvalla hydrogeelillä solujen kanssa 140 kPa ja nopeudeksi 5 mm/s, kun alginaatin pitoisuus oli 2% (w/v) ja käytetty tulostustapa EBB. Tulostuksessa käytettiin neulaa, jonka halkaisija oli 0.22 mm. Solujen elinkyky tulostuksen jälkeen oli korkea, vaikka stressi vaikutti soluihin useamman vuorokauden ajan tulostuksen jälkeen. (Hafeez ym. 2018)

Wei kollegoineen tutki gelatiinipohjaisen ja imiinisidoksiin perustuvan itsekorjautuvan Gtn-1-Odex-hydrogeelin vaikutusta endoteelikolonioita muodostavien solujen (endothelial colony-forming cell, ECFC) verisuonten muodostukselle (Wei & Gerecht 2018). *In vitro* -tutkimuksessa todettiin, että EBB:llä hydrogeelin kanssa tulostettujen solujen elinkyky oli huomattavasti suurempi (82%) kuin ilman geeliä kasvatetuilla soluilla (60%), eikä eroa ilman tulostusta kasvatettuun hydrogeeliin ollut. Tämä tutkimus ja siitä saadut tulokset näkyvät koottuina kuvissa 5A ja 5B. Lisäksi hydrogeeliä ja EFC-soluja tulostettiin 0.65 mm neulalla hiireen *in situ*. Solut alkoivat muodostaa onkaloita jo 12 tunnissa, ja 3 päivän jälkeen oli muodostunut lähes valmiita verisuonia. (Wei & Gerecht 2018)

Soluja tulostettaessa täytyy myös huomioida, että eri solutyypit vaativat kasvatuksen onnistumiseen erilaisia ominaisuuksia. Esimerkiksi luusto sekä lihakset tarvitsevat kovan ja kestävännen rakenteen, kun taas rasvasolut pehmeään ympäristön erilaistukseen oikein. (Leberfinger ym. 2019) Kim totesi tutkimuksessaan, että kondrosyytit ilmentävät enemmän niille tyypillisiä geenejä jäykässä hydrogeelissä (Kim ym. 2019). Toisaalta de Melon tutkiessa kondrosyyttien tulostusta huomattiin, että liian jäykkä ja tiivis hydrogeeli estää aineiden diffuusion biomateriaalin läpi, jolloin solujen

kasvu ei ole optimaalista. Itsekorjautuvat hydrogeelit poistavat osan tästä ongelmasta, sillä ne ovat tarpeeksi pehmeitä mahdollistaakseen aineiden kulkeutumisen, mutta niiden paineen- ja venytyksensietokyvyt voivat olla yhtä hyviä kuin luonnollisillakin kudoksilla. (de Melo ym. 2019) Itsekorjautuvissa hydrogeeleissa voidaan siis kasvattaa onnistuneesti useita solutyyppejä.

3.5 3D-tulostuksen haasteet ja tulevaisuus

Yksi suurimmista haasteista itsekorjautuvien hydrogeelien käytössä ja tulostuksessa on niiden mekaaniset ominaisuudet (Taylor & in het Panhuis 2016, Townsend ym. 2019, Xu ym. 2019). Dynaamisilla ja reversiibeileillä sidoksilla vahvistetut hydrogeelit ovat usein heikkoja, eivätkä sovellu suurien rakennelmien tulostamiseen (Shi ym. 2017). Pehmeiden materiaalien tulostuksessa on myös haastavaa saavuttaa tarkkaa resoluutiota (Heidarian ym. 2019). Toisaalta sidosten määrää lisättäessä mekaaninen kestävyys lisääntyy, mutta samalla huokoisuus ja solujen mahdollisuus jakautua sekä liikkua vähenee (Tu ym. 2019). Lisäksi materiaalin viskositeetti ei saa olla suuri, jotta sitä pystytään tulostamaan vaivatta (Townsend ym. 2019). Itsekorjautuvien hydrogeelien tulostuksessa joudutaankin tasapainottelemaan hyvän tulostettavuuden ja hyvien mekaanisten ominaisuuksien välillä (Taylor & in het Panhuis 2016, Shi ym. 2019). Hydrogeelejä voitaisiin kyllä vahvistaa tulostuksen jälkeen kovalenttisilla sidoksilla, mutta tämä heikentäisi niiden itsekorjautumiskykyä. Tulevaisuudessa itsekorjautuvia materiaaleja muodostetaan luultavasti hyödyntämällä useampaa dynaamista ja fysikaalista sidostyyppiä samassa hydrogeelissä. Näin voidaan varmistaa hyvä itsekorjautuminen, mutta parantaa mekaanista kestävyyttä.

Toinen yleinen ongelma on se, että käytettyjä tutkimusmenetelmiä ei pystytä vertailemaan keskenään. Varsinkin lujouden ja kestävyuden tutkimiseen on käytetty monia eri tapoja, joiden vertailu suoraan on mahdotonta. (Townsend ym. 2019) Lisäksi harvat tutkimukset kertovat tarkkaan, millä tavalla hydrogeelin ominaisuuksia on mitattu. Ominaisuustutkimuksia on tehty todella vähän solujen fysiologisissa olosuhteissa tai *in vivo*, jolloin on haastavaa tietää, kuinka hyvin kyseiset hydrogeelit toimivat jatkosovelluksissa (Taylor & in het Panhuis 2016, Leberfinger ym. 2019). Olisikin sovelluksien kannalta tärkeää, että käytössä olisi standardimenetelmät ja raportointitavat, jolloin saatujen tuloksien tulkinta ja vertailu helpottuisi.

Solujen tulostuksessa suurin ongelma on niihin kohdistuva paine materiaalia tulostettaessa, varsinkin jos viskositeetti on suuri (Zhao ym. 2015). Haasteena onkin tulostaa tarpeeksi tukevaa materiaalia niin, että solut pysyvät paikoillaan hydrogeelin sisällä, mutta eivät kuole prosessin aikana. Solujen tulostuksen pitäisi myös tapahtua nopeasti, joten isojen rakenteiden tulostaminen on myös tästä syystä haastavaa. (Zhao ym. 2015, Leberfinger ym. 2019) Toisaalta liian nopea tulostus saattaa aiheuttaa reaktioita käytetyissä polymeereissä, ja heikentää niiden ominaisuuksia (Heidarian ym. 2019). Lisäksi tällä hetkellä käytetyt materiaalit ovat harvoin bioaktiivisia, jolloin solut kasvavat

niissä pyöreiksi pitkästä kasvatusajasta huolimatta (Wei & Gerech 2018). Pseudoplastiset itsekorjautuvat hydrogeelit vastaavat tulevaisuudessa näihin ongelmiin, sillä ne suojaavat viskositeettinsa muuttumisella soluja (Shi ym. 2017). Lisäksi materiaaleihin kannattaa lisätä solujen tarttumista edistäviä motiiveja, varsinkin jos pohjana käytetään synteettistä tai inerttiä materiaalia. Nämä ohjaavat soluja erilaistumaan haluttuun suuntaan.

Vaikka itsekorjautuvien hydrogeelien tulostuksessa on vielä monia haasteita, sen tulevaisuudelta odotetaan paljon. Itsekorjautuvien hydrogeelien ja tarkkojen tulostimien avulla tulevaisuudessa pystytään oletettavasti tulostamaan ja kasvattamaan heterogeenisiä eli useamman solutyypin sisältäviä kudoksia, kun solut voidaan lokeroida omiin kohtiinsa tarkan resoluution avulla (Leberfinger ym. 2019). Viime vuosina parhaimpia tuloksia solujen tulostuksessa on saatu ekstruusioon perustuvalla menetelmällä, mutta sen resoluutio on rajallinen. Tulevaisuudessa kehitelläänkin varmasti ekstruusiutulostukseen tarkempia laitteistoja, ja toisaalta tutkitaan lisää hyvin tarkan resoluution omaavien laseriin perustuvien tulostimien vaikutusta solujen toimintaan.

Koska verisuonitusta vaativien kudosten tulostus on haastavaa, ja niiden ravinteiden saantia on vaikea turvata, ensimmäiset kliiniseen käyttöön tulevat tulostetut kudokset ovat oletettavasti rustoa tai muuta verisuonetonta kudosta (Loebel ym. 2017, Leberfinger ym. 2019). Viime vuosina kiinnostusta on herättänyt myös tulostettujen kudosten sisälle kapseloidut lääkeaineet ja sytokiinit, jotka vapautuvat itsestään tai säännötellysti ulkoisen laukaisijan vaikutuksesta, ja vaikuttavat ympäröivän kudoksen toimintaan (Loebel ym. 2017, Shi ym. 2019). Itsekorjautuvat hydrogeelit soveltuvat dynaamisen luonteensa ansiosta hyvin myös näiden molekyylien sitomiseen, ja aiheeseen liittyvä tutkimus jatkuu varmasti tulevina vuosina.

4. YHTEENVETO

Itsekorjautuvien hydrogeelien merkitys kudosteknologiassa on kasvanut paljon viime vuosina niiden korjautumiskyvyn ja pitkän säilyvyyden ansiosta (Taylor & in het Panhuis 2016, Kim ym. 2019). Nämä hydrogeelit sitovat paljon vettä ja takaavat soluille vakaat, mutta dynaamiset olosuhteet. Lisäksi itsekorjautuvat hydrogeelit ovat lähes aina bioyhteensopivia ja helppoja käsitellä, eivätkä ne tunkeudu ympäröiviin kudoksiin *in vivo* -olosuhteissa (Tu ym. 2019). Tämän kaiken ansiosta itsekorjautuvat hydrogeelit muistuttavat solujen luonnollista soluväliainetta, ja niitä onkin käytetty menestyksekkäästi solujen kasvatukseen sekä tulostukseen.

Yleisimpiä itsekorjautuvuuden ja tulostuksen mahdollistavia tukisidostyypppejä ovat imiini- ja hydratsonisidokset, isäntä-vieras-vuorovaikutukset sekä koordinaatiosidokset (Tu ym. 2019). Pelkätään fysikaalisia ei-kovalenttisia sidoksia omaavat hydrogeelit ovat kuitenkin melko pehmeitä, ja isoja rakenteita tulostettaessa ne sortuvat helposti. Tämän takia usein käytetäänkin joko useampaa fysikaalista sidostyyppiä samassa hydrogeelissä, tai vahvistetaan hydrogeeliä tulostamisen jälkeen, esimerkiksi UV-valon aikaansaamalla kovalenttisilla sidoksilla. Toisaalta ylimääräiset sidokset vähentävät huokoisuutta ja korjautumiskapasiteettia, joten usein tasapainotellaankin hyvien mekaanisten ominaisuuksien ja tulostettavuuden sekä dynaamisten ominaisuuksien välillä (Taylor & in het Panhuis 2016, Shi ym. 2019). Tulevaisuudessa keskitytäänkin luultavasti luomaan kaksoisverkkorakenteisia hydrogeelejä, joilla olisi sekä itsekorjautuvuus että pseudoplastinen ominaisuus. Tällainen hydrogeeli mahdollistaa hyvät mekaaniset ominaisuudet, mutta sitä on helppo tulostaa.

Biomateriaaleja on yleisesti tulostettu kolmella eri menetelmällä: ekstruusioon perustuvalla, pisaroihin perustuvalla ja laseriin perustuvalla tulostuksella (Ji & Guvendiren 2017, Leberfinger ym. 2019). Suurimmassa osassa itsekorjautuvilla hydrogeeleillä tehdyistä tutkimuksista on kuitenkin käytetty ekstruusioon perustuvaa tulostustapaa, sillä se mahdollistaa tulostuksen korkealla viskositeetilla ja solupitoisuudella. Itsekorjautuvat hydrogeelit soveltuvat korjautumiskykynsä ja yleisen pseudoplastisuutensa ansiosta hyvin tulostukseen. Itsekorjautuva hydrogeeli voidaan tulostaa myös geelilytymisen jälkeen, eikä se tarvitse yhtä suuria muokkauksia jälkikäteen kuin perinteinen hydrogeeli (Wei & Gerecht 2018). Useat itsekorjautuvat hydrogeelit ovat lisäksi ympäristösensitiivisiä, mikä mahdollistaa helpon tulostuksen, vaikka hydrogeelillä ei olisikaan pseudoplastista ominaisuutta.

Myös solujen on todettu kestävän hyvin tulostusta, kun tulostus tapahtuu itsekorjautuvan hydrogeelin kanssa. Itsekorjautuva hydrogeeli kykenee mukautumaan ympäristön paineeseen ja suojaamaan soluja prosessin aikana (Wei & Gerecht 2018, Heidarian ym. 2019). Lisäksi luonnolliset tai bioaktiiviseksi muokatut polymeerit voivat saada solut erikoistumaan ja jakautumaan haluttuun suuntaan. Tutkimuksissa onkin ollut jo näyttöä siitä, että itsekorjautuvissa hydrogeeleissä kasvatetut solut jakautuvat ja levittäytyvät paremmin kuin perinteisissä hydrogeeleissä (Heidarian ym. 2019). Varsinkin hyaluronihappo ja alginaatti ovat osoittautuneet toimiviksi materiaaleiksi solujen tulostuksessa. Inerttejä materiaaleja käytettäessä polymeerejä kannattaa kuitenkin muokata bioaktiivisemmiksi lisäämällä niihin tarttumista edistäviä motiiveja, kuten RGD:tä.

Itsekorjautuvien materiaalien hyödyntämisessä on silti vielä useita ongelmia. Ominaisuuksien tutkimiseen ja ilmoittamiseen ei ole olemassa yhtä yhteistä tapaa, ja käytettyjä menetelmiä on haastavaa verrata luotettavasti keskenään. Lisäksi tutkimuksia on tehty vasta vähän fysiologisissa tai *in vivo* -olosuhteissa, joten on vaikea tietää, kuinka hyvin materiaalit todellisuudessa soveltuvat käytäntöön (Taylor & in het Panhuis 2016, Leberfinger ym. 2019). Lisäksi täytyy ottaa huomioon myös eri kudostyyppien vaatimat toisistaan poikkeavat olosuhteet. Ei siis ole olemassa yhtä täydellistä

materiaalia ja sidosmenetelmää kudosten kasvatukseen suunnitellulle materiaalille, vaan se täytyy muodostaa aina tilanteen vaatimien olosuhteiden mukaan. Haasteista huolimatta itsekorjautuvat hydrogeelit ja niiden 3D-tulostus ovat osoittautuneet potentiaalisiksi menetelmiksi kudosteknologiassa, ja tulevaisuudessa tullaan varmasti näkemään monia niistä johdettuja sovelluksia.

LÄHTEET

- An H., Zhu L., Shen J., Li W., Wang Y. & Qin J. (2020) Self-healing PEG-poly(aspartic acid) hydrogel with rapid shape recovery and drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **185**, 110601.
- Bedell M.L., Melchiorri A.J., Aleman J., Skardal A. & Mikos A.G. (2020) A high-throughput approach to compare the biocompatibility of candidate bioink formulations. *Bioprinting* **17**, e00068.
- Can V., Kochovski Z., Reiter V., Severin N., Siebenbürger M., Kent B., Just J., Rabe J.P., Ballauff M. & Okay O. (2016) Nanostructural Evolution and Self-Healing Mechanism of Micellar Hydrogels. *Macromolecules* **49**(6), 2281-2287.
- de Melo B. A. G., Jodat Y.A., Mehrotra S., Calabrese M.A., Kamperman T., Mandal B.B., Santana M.H.A., Alsberg E., Leijten J. & Shin S.R. (2019) 3D Printed Cartilage-Like Tissue Constructs with Spatially Controlled Mechanical Properties. *Advanced Functional Materials* **29**(51), 1906330-n/a.
- Hafeez S., Ooi H.W., Morgan F.L.C., Mota C., Dettin M., Van Blitterswijk C., Moroni L. & Baker M.B. (2018) Viscoelastic Oxidized Alginates with Reversible Imine Type Crosslinks: Self-Healing, Injectable, and Bioprintable Hydrogels. *Gels (Basel, Switzerland)* **4**(4), 1-19.
- Heidarian P., Kouzani A.Z., Kaynak A., Paulino M. & Nasri-Nasrabadi B. (2019) Dynamic Hydrogels and Polymers as Inks for Three-Dimensional Printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **5**(6), 2688-2707.
- Highley C.B., Rodell C.B. & Burdick J.A. (2015) Direct 3D Printing of Shear-Thinning Hydrogels into Self-Healing Hydrogels. *Advanced Materials* **27**(34), 5075-5079.
- Ji S. & Guvendiren M. (2017) Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **5**, 23.
- Kim S.W., Kim D.Y., Roh H.H., Kim H.S., Lee J.W. & Lee K.Y. (2019) Three-Dimensional Bioprinting of Cell-Laden Constructs Using Polysaccharide-Based Self-Healing Hydrogels. *Biomacromolecules* **20**(5), 1860-1866.
- Leberfingher A.N., Dinda S., Wu Y., Koduru S.V., Ozbolat V., Ravnicek D.J. & Ozbolat I.T. (2019) Bioprinting functional tissues. *Acta Biomaterialia* **95**, 32-49.
- Loebel C., Rodell C.B., Chen M.H. & Burdick J.A. (2017) Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing. *Nature Protocols* **12**(8), 1521-1541.
- Shi L., Carstensen H., Hölzl K., Lunzer M., Li H., Hilborn J., Ovsianikov A. & Ossipov D.A. (2017) Dynamic Coordination Chemistry Enables Free Directional Printing of Biopolymer Hydrogel. *Chemistry of Materials* **29**(14), 5816-5823.

- Shi L., Ding P., Wang Y., Zhang Y., Ossipov D. & Hilborn J. (2019) Self-Healing Polymeric Hydrogel Formed by Metal–Ligand Coordination Assembly: Design, Fabrication, and Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **40**(7), e1800837-n/a.
- Taylor D.L. & in het Panhuis M. (2016) Self-Healing Hydrogels. *Advanced Materials* **28**(41), 9060-9093.
- Townsend J.M., Beck E.C., Gehrke S.H., Berkland C.J. & Detamore M.S. (2019) Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting. *Progress in Polymer Science* **91**, 126-140.
- Tu Y., Chen N., Li C., Liu H., Zhu R., Chen S., Xiao Q., Liu J., Ramakrishna S. & He L. (2019) Advances in injectable self-healing biomedical hydrogels. *Acta Biomaterialia* **90**, 1-20.
- Wei Z. & Gerecht S. (2018) A self-healing hydrogel as an injectable instructive carrier for cellular morphogenesis. *Biomaterials* **185**, 86-96.
- Xu C., Dai G. & Hong Y. (2019) Recent advances in high-strength and elastic hydrogels for 3D printing in biomedical applications. *Acta Biomaterialia* **95**, 50-59.
- Yoon J.A., Kamada J., Koynov K., Mohin J., Nicolaÿ R., Zhang Y., Balazs A.C., Kowalewski T. & Matyjaszewski K. (2011) Self-Healing Polymer Films Based on Thiol–Disulfide Exchange Reactions and Self-Healing Kinetics Measured Using Atomic Force Microscopy. *Macromolecules* **45**(1), 142-149.
- Zhao Y., Li Y., Mao S., Sun W. & Yao R. (2015) The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication* **7**(4), 045002.