Tampereen yliopisto

Fanni Jänesniemi

SYDÄNLIHASSOLUJEN ORIENTAATIO BIOTULOSTUKSESSA

Kandidaatintutkielma
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Tarkastaja: Mari Pekkanen-Mattila
Syyskuu 2025

TIIVISTELMÄ

Fanni Jänesniemi: Sydänlihassolujen orientaatio biotulostuksessa
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologia ja biolääketieteen tekniikka
Syyskuu 2025

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat merkittävä maailmanlaajuinen terveysongelma ja aiheuttavat vuosittain lukuisia kuolemia, mikä liittyy osittain sydänlihassolujen rajalliseen uusiutumiskykyyn. Sydänlihassolujen vaurioituminen, esimerkiksi iskemian seurauksena, johtaa arpikudoksen muodostumiseen, joka ei kykene supistumaan tai johtamaan sähköisiä signaaleja terveen kudoksen tavoin. Tämän vuoksi on tärkeää löytää ratkaisuja vaurioituneen sydänkudoksen korjaamiseen sekä tutkia tekijöitä, jotka vaikuttavat sydänsairauksien syntymiseen. Koska sydän on rakeenteellisesti ja toiminallisesti suunnasta riippuvainen, on kudosten valmistuksessa keskityttävä saavuttamaan solujen samansuuntainen orientaatio. Ilman yhtenäistä suuntautumista, sydänkudos ei kykene toimimaan normaalisti. Kaksiulotteisissa malleissa solujen suuntauttaminen on osoittautunut haastavaksi, minkä vuoksi on siirrytty kolmiulotteisten mallien luomiseen muun muassa biotulostamisen avulla.

Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on tutkia erilaisia biotulostusmenetelmiä, joilla on saavutettu sydänlihassolujen järjestelmällinen orientaatio valmistetussa kudoksessa. Lisäksi tarkastellaan, onko menetelmien välillä merkittäviä eroja orientaation saavuttamisen kannalta. Menetelmät on jaettu kahteen kategoriaan: telinepohjaisiin ja solupitoisiin. Telinepohjaisissa menetelmissä biomateriaaleista tulostetaan ensin tukirakenne tai teline, johon solut siirrostetaan. Teline toimii soluväliaineena ja tarjoaa fyysistä tukea, minkä lisäksi solut voivat kiinnittyessään seurata rakenteen kuituja. Solupitoisissa menetelmissä solut kapseloidaan biomusteen sisään ja tulostetaan suoraa osaksi rakennetta. Menetelmän avulla solut voidaan sijoittaa jo tulostusvaiheessa haluttuihin kohtiin, ja niiden suuntautumiseen voidaan vaikuttaa esimerkiksi tulostussuunnan tai biomusteeseen lisättyjen ohjaavien komponenttien avulla.

Työssä tarkasteltujen tutkimusten perusteella biotulostaminen on lupaava menetelmä suuntautuneen sydänlihaskudoksen valmistukseen. Kaikissa tarkastelluissa menetelmissä onnistuttiin tuottamaan suuntautunutta kudosta, mikä viittaa siihen, ettei ole olemassa yhtä tiettyä tapaa saada solut suuntautumaan. Päätelmään vaikuttaa kuitenkin myös se, ettei kaikissa tutkimuksissa lopullinen tavoite ollut sama. Menetelmän valita riippuu siten pääosin halutusta lopputuloksesta ja suunnitellusta sovelluksesta, johon tulostettua kudosta aiotaan käyttää.

Avainsanat: sydänlihassolujen suuntautuminen, 3D biotulostus, sydänlihassolu, kudostekniikka

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

ABSTRACT

Fanni Jänesniemi: Cardiac cell orientation in bioprinting
Bachelor's thesis
Tampere University
Biotechnology and Biomedical Engineering
September 2025

Cardiovascular diseases are a major global health problem and cause numerous deaths each year, partly due to the limited regenerative capacity of cardiac muscle cells. Damage to heart muscle cells, for example, as a result of ischemia, leads to the formation of scar tissue that is unable to contract or conduct electrical signals in the same way as healthy tissue. It is therefore important to find solutions for repairing damaged heart tissue and to investigate the factors that contribute to the development of heart disease. Because the heart is structurally and functionally directional, tissue engineering must focus on achieving parallel orientation of cells. Without uniform orientation, heart tissue cannot function normally. In two-dimensional models, cell orientation has proven challenging, which is why researchers have moved on to creating three-dimensional models using methods such as bioprinting.

This literature review aims to examine various bioprinting methods that have achieved systematic orientation of cardiac muscle cells in manufactured tissue. Additionally, we investigate whether there are significant differences between the methods in terms of attaining orientation. The methods are divided into two categories: scaffold-based and cell-based. In scaffold-based methods, a support structure or scaffold is first printed from biomaterials, onto which the cells are transferred. The scaffold acts as a cell matrix and provides physical support, allowing the cells to follow the fibers of the structure as they attach. In cell-based methods, the cells are encapsulated in a biomaterial and printed directly into the structure. This method allows the cells to be placed in the desired locations during the printing stage, and their orientation can be influenced, for example, by the printing direction or by adding guiding components to the biomaterial.

Based on the studies reviewed in this thesis, bioprinting is a promising method for producing oriented heart muscle tissue. All of the methods reviewed were successful in producing oriented tissue, which suggests that there is no single specific way to orient cells. However, this conclusion is also influenced by the fact that not all studies had the same goal. The choice of method, therefore, depends mainly on the desired result and the planned application for which the printed tissue will be used.

Keywords: cardiac cell alignment, 3D bioprinting, cardiomyocyte, tissue engineering

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin Originality Check service.

TEKOÄLYN KÄYTTÖ OPINNÄYTTEESSÄ

Opinnäytteessäni on käytetty tekoälysovelluksia:

☐ Ei
☒ Kyllä

Ilmoitukseni mukaan olen käyttänyt opinnäytteessäni tutkielmaprosessin aikana seuraavia tekoälysovelluksia:

DeepL Translator
Microsoft 365 Copilot Chat
ChatGPT 5

Käyttötarkoitus:
DeepL Translator lähteiden osittaiseen suomentamiseen sekä tiivistelmän kääntämiseen englanniksi

Microsoft 365 Copilot Chat ja ChatGPT 5 kysytty apua kappaleen 4 lähestymistavan ja rakenteen hahmottamiseen. Annettu prompti *" Olen esitellyt aiemmassa kappaleessa erilaisia telinepohjaisia ja solupitoisia biotulostusmenetelmiä ja nyt seuraavassa kappaleessa minun pitäisi vertailla näitä keskenään. Mikä olisi paras lähestymis tapa kappaleelle, jos jokaisessa menetelmässä on saatu sama tulos"*

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien osat, joissa on hyödynnetty tekoälyä, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

ALKUSANAT

Tämä kirjallisuuskatsauksena toteutettu kandidaatintutkielma sydänlihassolujen orientaatiosta biotulostuksessa on osa bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan opintojani Tampereen yliopistossa. Kiinnostukseni biotulostusta kohtaan on kasvanut opintojeni aikana, ja tämän työn myötä opin paljon uutta sekä syvensin aiempaa osaamistani. Haluan erityisesti kiittää ohjaajaani Mari Pekkanen-Mattilaa mielenkiintoisen aiheen ehdottamisesta, rakentavasta palautteesta sekä mukavista jutteluhetkistä tapaamisissamme. Lisäksi haluan kiittää kumppaniani ja vanhempiani kaikesta tuesta kirjoitusprosessin aikana.

Tampereella, 25.9.2025

Fanni Jänesniemi

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO 1
2. SYDÄNLIHASSOLUJEN ORIENTAATIO 3
2.1 Sydänlihassolujen rakenne 3
2.2 Orientaation vaikutus kudoksen toimintaan 7
3. BIOTULOSTUSMENETELMÄT 10
3.1 Tausta 10
3.2 Telinepohjainen tulostus 11
3.3 Solupitoinen tulostus 12
4. MENETELMIEN VAIKUTUS ORIENTAATIOON 15
5. YHTEENVETO 19
LÄHTEET 20

LYHENTEET JA MERKINNÄT

µCOP	engl. micro-continuous optical printing, jatkuva optinen mikrotulostus
2D	engl. two-dimensional, kaksiulotteinen
3D	engl. three-dimensional, kolmiulotteinen
ADP	engl. adenosine diphosphate, adenosiinidifosfaatti
ATP	engl. adenosine triphosphate, adenosiinitrifosfaatti
CF	engl. cardiac fibroblast, sydämen fibroblasti
CM	engl. cardiomyocyte, sydänlihassolu
ECM	engl. extracellular matrix, soluväliaine
EFD	engl. electric field-driven, sähkökenttäohjattu
GelMA	engl. gelatin methacryloyl, metakryloitu gelatiini
HAGM	engl. hyaluronic acid glycidyl methacrylate, metakryloitu hyaluronihappo
hiPSC	engl. human induced pluripotent stem cell, ihmisen indusoitu pluripotentti kantasolu
hMSC	engl. human mesenchymal stem cell, ihmisen mesenkymaalinen kantasolu
ITOP	engl. integrated tissue-organ printer, integroitu kudos-elin-tulostin
MFC	engl. Meniscus fibrochondrocytes, Meniskin fibrokondrosyytti
MSC	engl. mesenchymal stem cell, mesenkymaalinen kantasolu
mTgase	engl. microbial transglutaminase, mikrobiperäinen transglutaminaasi
NMVCM	engl. neontal mouse ventricular cardiomyocyte, vastasyntyneen hiiren kammion sydänlihassolu
NorHA	engl. nonbornene modified hyaluronic acid, norborneenimodifoitu hyaluronihappo
NRVCM	engl. neontal rat ventricular cardiomyocyte, vastasyntyneen rotan kammion sydänlihassolu
PCL	engl. polycaprolactone, polykaprolaktoni
PEGDA	engl. poly(ethylene glycol) diacrylate, polyetyleeniglykolidiakrylaatti
Pi	engl. inorganic phosphate, epäorgaaninen fosfaatti
RNA	engl. ribonucleic acid, ribonukleiinihappo
SERCA	engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase, sarkoplasma-/endoplasmakalvoston kalsiumpumppu
UV	engl. ultraviolet, ultravioletti
µm	mikrometri
BPM	engl. beats per minute, lyöntiä minuutissa
mN	millinewton

1. JOHDANTO

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat olleet johtava kuolinsyy maailmalla jo kolmen vuosikymmenen ajan. Vuonna 2022 kuolemia oli arviolta 19,8 miljoonaa, eli noin kolmasosa kaikista maailman kuolemista.(“Cardiovascular diseases (CVDs),” 2025) Sydänlihassolut ovat alttiita useille tekijöille, kuten iskemian aiheuttamalle nekroosille, jotka voivat johtaa sydänsairauksiin (Wu et al., 2023). Sydänkohtauksen aikana sydän voi menettää satojatuhansia soluja, jonka seurauksena syntyy arpikudosta sydänlihassolujen rajallisen uusiutumiskykynsä vuoksi. Arpikudoksessa ei ole supistumiskykyisiä soluja, eikä se kykene johtamaan sähköisiä signaaleja terveen sydänkudoksen tavoin, mikä kasvattaa riskiä sydämen vajaatoiminnalle.(Beans, 2018)

Sydänsairauksia tutkitaan jatkuvasti, mutta kokeellisten mallien kehittäminen on edelleen haastavaa sydämen monimutkaisen rakenteen ja toiminnan vuoksi. Perinteisesti tautimallinnukseen käytetyissä kaksiulotteisissa (2D) soluviljelmissä sydänlihassolut kasvavat tasaisella, jäykällä pinnalla. Soluväliaineen (ECM) puuttuessa, solujen ja solunulkoisen ympäristön väliset vuorovaikutukset eivät vastaa luonnollisia olosuhteita, mikä vaikuttaa solujen kasvuun, erilaistumiseen ja signalointiin. Muuttunut morfologia vaikeuttaa sairauksien etenemisen ja hoitovasteiden ennustamista.(Foglietta et al., 2020; Jin et al., 2025)

Monet fysiologiset toiminnot, kuten supistusvoiman tuottaminen, ovat riippuvaisia sydänlihassolujen sijainnista ja suuntautumisesta soluväliaineessa. Lisäksi sydämen sähkövirran johtuminen on suunnasta riippuvaista signaalien levitessä nopeammin sydänlihaskuitujen pitkittäisakselia pitkin.(Navaee et al., 2023) Siksi kudoksia valmistaessa on tärkeää suunnitella myös solujen suuntautuminen, jotta ne vastaisivat rakenteellisesti ja toiminnalliseesti natiivia sydänkudosta. 2D-viljelmissä solujen suuntautuminen on satunnaista, koska ECM:n puuttuminen ja tasainen kasvuympäristö eivät tarjoa suuntautumista ohjaavia signaaleja. Rajoitteet ovat johtaneet kolmiulotteisten (3D) kudostekniikoiden yleistymiseen, sillä ne mahdollistavat solujen kasvun ja vuorovaikutuksen kaikissa suunnissa (Foglietta et al., 2020).

Yksi lupaava 3D-kudosteknologinen innovaatio sydänkudoksen valmistamiseen on biotulostaminen. Sen avulla voidaan tarkasti määrittää solujen ja biomateriaalien sijainti

rakenteessa, mikä mahdollistaa monimutkaisia rakenteita sisältävien 3D-kudoksien valmistuksen. Tulostusolosuhteita, kuten biomusteen koostumusta, tulostusnopeutta ja kerrosten paksuutta muuttamalla, voidaan vaikuttaa merkittävästi rakenteen tarkkuuteen ja solujen elinkelpoisuuteen.(Wu et al., 2023) Koska biotulostamisella voidaan valmistaa laajasti eri muotoisia ja rakenteellisia kudoksia sekä ohjata tarkasti solujen sijoittumista, menetelmä tarjoaa useita vaihtoehtoja orientaation saavuttamiseen.

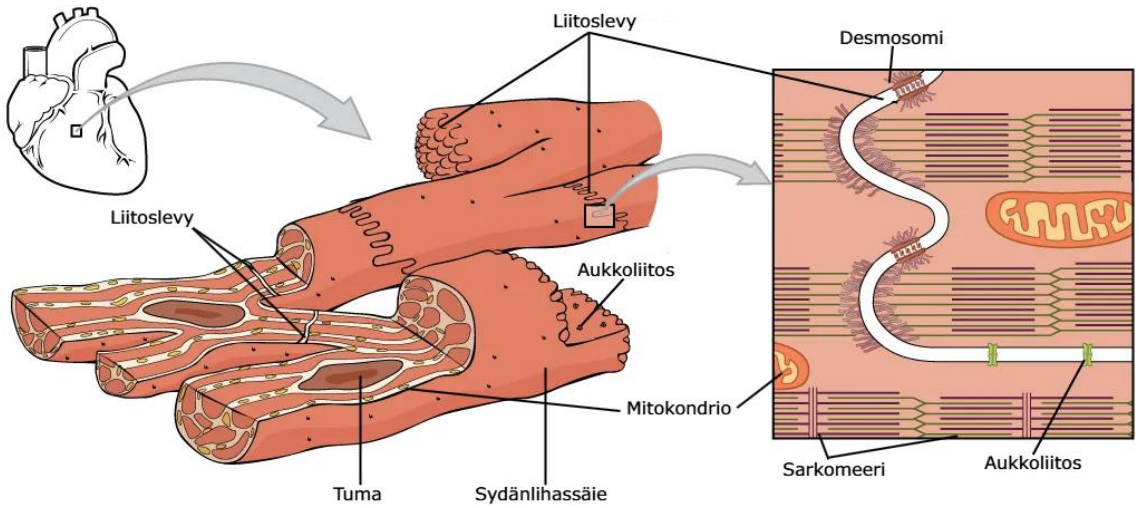
Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on esitellä erilaisia biotulostusmenetelmiä, joiden avulla voidaan saavuttaa sydänlihassolujen järjestelmällinen orientaatio valmistetussa kudoksessa. Menetelmät on jaettu kahteen kategoriaan: telinepohjaisiin ja solupitoisiin. Lisäksi arvioidaan, onko menetelmien välillä merkittäviä eroja orientaation saavuttamisen kannalta. Tutkielman toisessa luvussa perehdytään sydänlihassolujen rakenteeseen, sekä solujen orientaation vaikutukseen sydänkudoksen toiminnassa. Kolmannessa luvussa esitellään lyhyesti biotulostaminen ja biotulostus menetelmien tutkimukset. Neljännessä luvussa tarkastellaan, miten eri menetelmät vaikuttavat solujen orientaatioon. Viimeinen luku sisältää lyhyen yhteenvedon johtopäätöksistä, sekä katsauksen tulevaisuuden tutkimusmahdollisuuksiin.

2. SYDÄNLIHASSOLUJEN ORIENTAATIO

2.1 Sydänlihassolujen rakenne

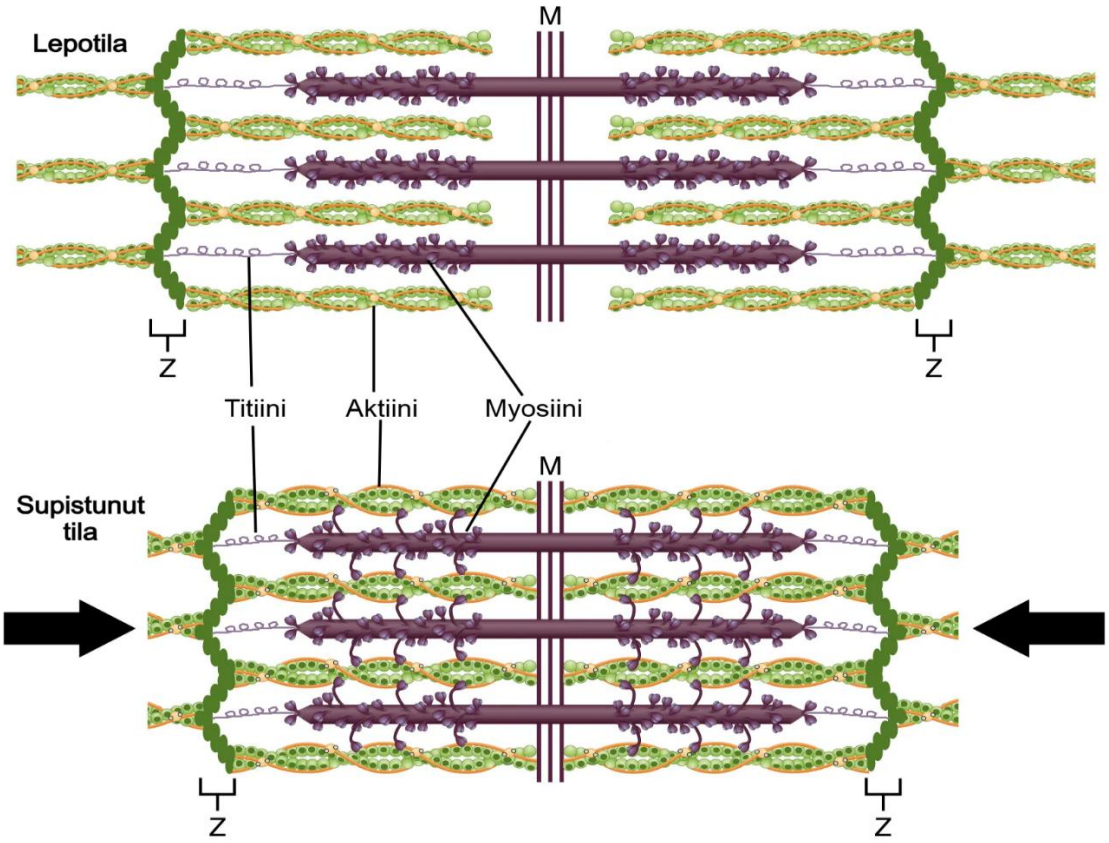
Sydän tekee taukoamatta työtä pumpatessaan verta elimistöön koko eliniän ajan. Se kehittyy raskauden alkuviikkoina ja alkaa sykkimään kuudennella raskausviikolla (Männer, 2022). Sydän koostuu kolmesta kerroksesta: sydänpussista, sydänlihaksesta ja sisäkalvosta, joista sydänlihas vastaa supistumisesta ja pumppaustoiminnasta (Ripa et al., 2023). Sydänlihas koostuu sydänlihassoluista, joilla on erityisiä rakenteellisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Näiden ansiosta se pystyy tuottamaan tarvittavan voiman verenkierron ylläpitämiseksi.(Tran et al., 2024) Koska sydänlihassolut ovat jatkuvasti rasituksen alaisina, niiden täytyy olla rakenteellisesti kestäviä ja tuottaa runsaasti energiaa.

Sydänlihassolut ovat yksi- tai kaksitumaisia, haarautuneita ja poikkijuovaisia lihassoluja (ks. kuva 1). Ne koostuvat myofibrilleistä eli lihassäiekimpuista, useista mitokondrioista, sekä solua ympäröivästä sarkolemmasta eli solukalvosta. Sarkolemma sisältää ionikanavia, reseptoreja, sekä putkimaisia T-tubuluksia, joissa jänniteherkät kalsiumkanavat sijaitsevat.(Ripa et al., 2023) Vierekkäiset solut kiinnittyvät toisiinsa liitoslevyjen avulla. Levyjen desmosomit kiinnittävät sydänlihassäikeiden päät toisiinsa, jolloin solut eivät irtoa toisistaan rasituksen aikana. Aukkoliitokset nimensä mukaisesti ovat aukkoja, jotka liittävät solut sähköisesti toisiinsa.(Betts et al., 2022a)



Kuva 1. *Sydänlihassolun rakenne. Sydänlihassoluissa on järjestäytyneitä myofibrillejä, runsaasti mitokondrioita sekä T-tubuluksia, jotka välittävät impulssin sarkolemmasta solun sisälle. Sydänlihassolut ovat yhteydessä toisiinsa liitoslevyjen kautta, jotka sisältävät desmosomeja ja aukkoliitoksia. Mukailtu lähteestä (Betts et al., 2022a).*

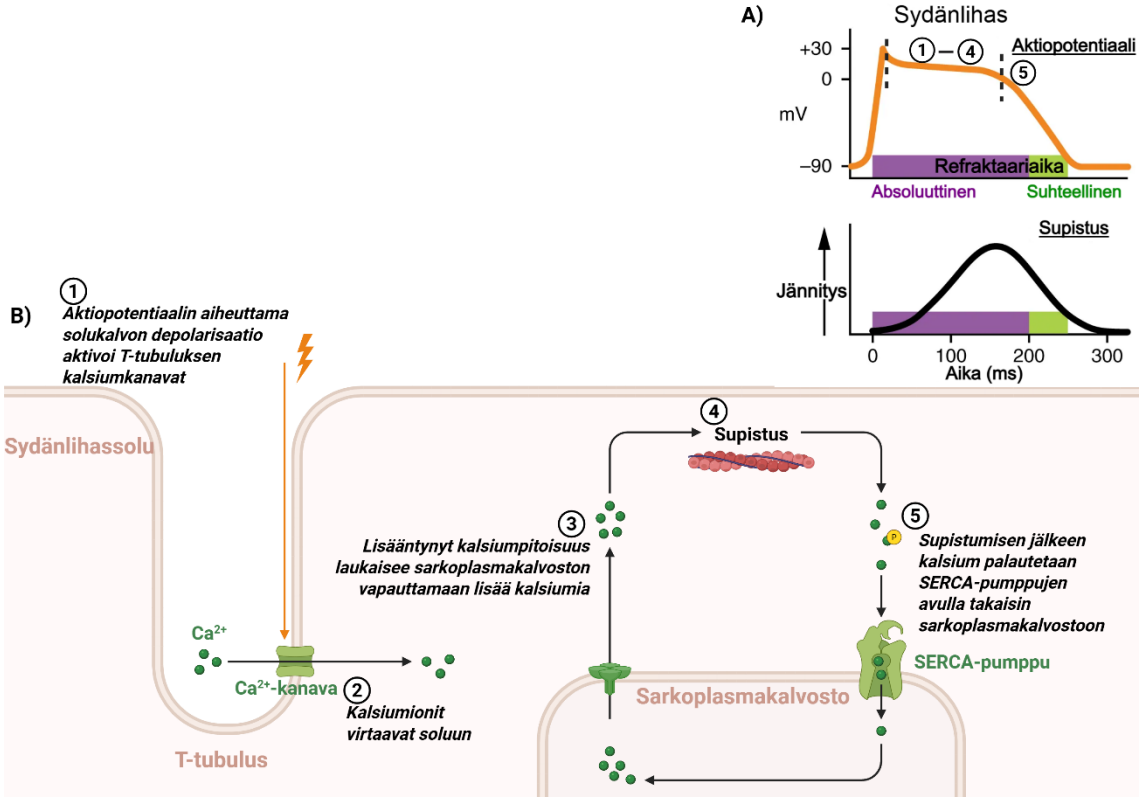
Myofibrillit ovat solun supistuva osa ja sisältävät toistuvia rakenneyksiköitä, sarkomeerejä, jotka erottuvat toisistaan Z-levyjen avulla (Morano, 2016). Sen rakennetta ja supistumista on havainnollistettu kuvassa 2. Sarkomeeri koostuu ohuista aktiini-, paksuista myosiini- sekä elastisista titiinisäikeistä. Aktiini on kiinnittyneenä Z-levyihin ja myosiini sarkomeerin keskellä olevaan M-linjaan, jonka avulla säikeet ovat yhteyksissä toisiinsa. Titiini yhdistää Z-levyn ja M-linjan sekä pitää myosiinin paikoillaan.(Morano, 2016) Supistumisessa aktiini ja myosiini muodostavat ristisillan keskenään. Sarkomeeri lyhenee, kun kiinnittynyt myosiini vetää aktiinia M-linjaa kohti. Titiinin puristuminen tuottaa palautusvoiman, jonka avulla sarkomeeri palaa lepopituuteen supistuksen loputtua.(Morano, 2016; Ripa et al., 2023)



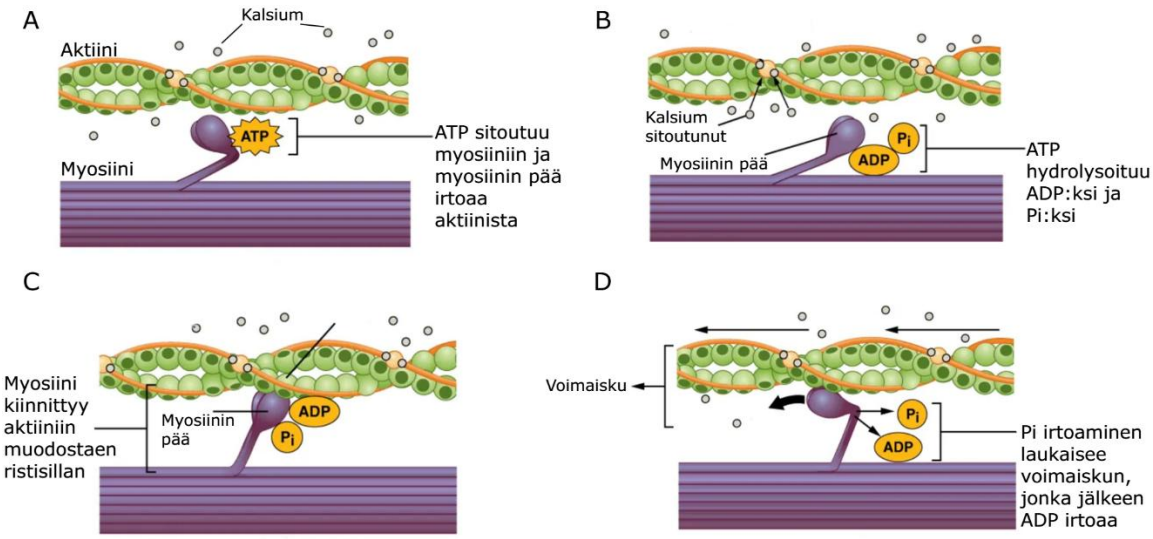
Kuva 2. *Sarkomeerin rakenne. Lepotilassa Z-levyt ovat etäällä toisistaan, eivätkä aktiini ja myosiini ole vuorovaikutuksessa keskenään. Supistumisen aikana sarkomeeri lyhenee, kun myosiini vetää aktiinia M-linjaa kohti. Mukailtu lähteestä (Betts et al., 2013).*

Sydämen supistuminen on autonomista ja sen aktivoituminen alkaa sinussolmussa sijaitsevien tahdistinsolujen aiheuttamana. Supistuminen saa energiansa ATP:stä, joka syntetisoidaan aerobisen aineenvaihdunnan kautta. Kolmasosa sydänlihassolun tilavuudesta on mitokondrioita, jotka tuottavat 95 % sydänlihaksen tarvitsemasta ATP:stä (Nguyen et al., 2019). Sinussolmussa natrium/kalsium- pumppujen avautuminen depolarisoi lepopotentiaalin kynnyspotentiaaliin, mikä aiheuttaa spontaanin aktiopotentiaalin, joka leviää koko sydämeen sydänlihassolujen välissä olevien aukkoliitosten avulla.(Morano, 2016) Aukkoliitokset toimivat selektiivisesti läpäisevinä kalvoina yhdistäen vierekkäiset solut sähköisesti (Kotadia et al., 2020). Aktiopotentiaali kulkee sarkolemman T-tubuluksiin, joissa se aktivoi kalsiumkanavat, jolloin kalsiumionit pääsevät virtaamaan soluun (ks. kuva 3). Lisääntynyt kalsiumpitoisuus sytoplasmassa laukaisee sarkoplasmakalvoston vapauttamaan lisää kalsiumia. Vapautunut kalsium kiinnittyy myosiinia sitovaan tropoiini C:hen siirtäen tropomyosiinin sivuun, jolloin aktiini ja myosiini pystyvät muodostamaan ristisillan.(Ripa et al., 2023; Tran et al., 2024) Supistuminen tapahtuu kuvan 4 mukaisesti siten, että ATP sitoutuu myosiiniin, jolloin se irtoaa aktiinista. Kiinnittynyt ATP hydrolysoituu ADP:ksi ja epäorgaaniseksi fosfaatiksi P_i, jolloin myosiini kiinnittyy uuteen

kohtaan aktiinia. P_i:n irtoaminen laukaisee voimaiskun (power stroke), jonka seurauksena myosiini vetää aktiinia kohti M-linjaa. Voimaiskun jälkeen ADP:n irtoaminen muodostaa väliaikaisen jäykkyystilan ja titiini palauttaa sarkomeerin lepopituuteen.(Morano, 2016) Supistumisen jälkeen sarkoplasmakalvostossa oleva SERCA-pumppu pumppaa vapaana olevat kalsiumionit takaisin sarkoplasmakalvostoon, sarkolemman kalvopumput palauttavat sydänlihassolujen kalvopotentiaalin, ja sydänlihas palaa rentoutuneeseen tilaan odottamaan uutta sykliä (Tran et al., 2024).



Kuva 3. ***A)*** *Sydänlihassolun aktiopotentiaalin ja supistumisen kuvaajat ajan suhteen. Absoluuttisen refraktaariajan aikana uutta aktiopotentiaalia ei voi syntyä. Suhteellisen refraktaaliajan aikana tarvitaan voimakas ärsyke uuden aktiopotentiaalin syntymiseen. Mukailtu lähteestä (Betts et al., 2022b)* ***B)*** *Kalsiumin vapautuminen supistuksen aikana. Depolarisaatio avaa T-tubulusten kalsiumkanavat, jolloin kalsiumionit virtaavat soluun ja vapauttavat lisää kalsiumia sarkoplasmakalvostosta. Kohonnut kalsiumpitoisuus laukaisee supistuksen, jonka jälkeen SERCA-pumput siirtävät kalsiumionit takaisin sarkoplasmakalvostoon. Kuva tehty BioRenderillä (Jänesniemi, 2025).*



Kuva 4. *Yksinkertaistettu kaavio sydänlihassolun supistumisesta. A) ATP sitoutuu myosiiniin, jolloin myosiini irtoaa aktiinista. B) ATP hydrolysoituu ADP:ksi ja P_i:ksi. C) Aktiini ja myosiini muodostavat ristisillan myosiinin kiinnittyessä. D) P_i irtoaminen johtaa voimaiskuun eli kiinnittynyt myosiini vetää aktiinia kohti M-linjaa. Voimaiskun jälkeen myös ADP irtoaa ja muodostuu väliaikainen jäykkyystila, kunnes uusi ATP sitoutuu. Mukailtu lähteestä (Betts et al., 2013).*

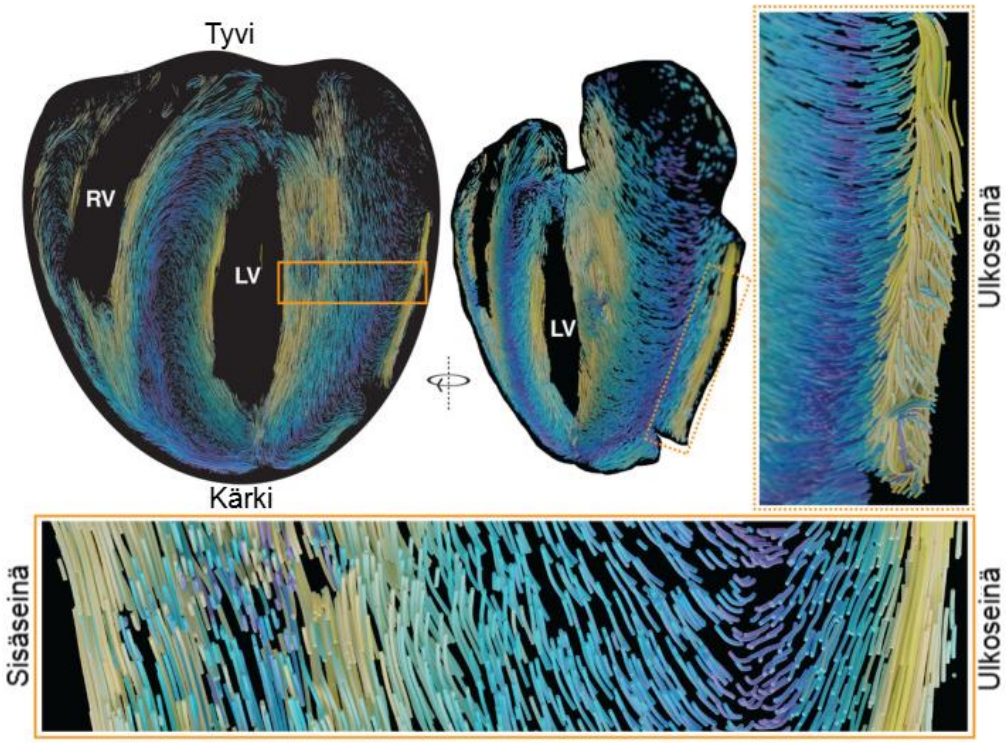
Sydänlihassolujen rakenne mahdollistaa sydämen jatkuvan supistumisen. Sähköisten signaalien leviäminen solusta toiseen on elintärkeää sydämen toiminnan kannalta, sillä signaalin katketessa osa sydämestä ei supistu oikeaan aikaan, mikä voi johtaa esimerkiksi rytmihäiriöön. Signaalit etenevät nopeasti sydänlihassolujen järjestäytyneen orientaation ansiosta (Kotadia et al., 2020).

2.2 Orientaation vaikutus kudoksen toimintaan

Sydän on anatomisesti ja toiminnallisesti anisotrooppinen eli suunnasta riippuvainen. Solujen orientaatio eli suuntautuminen tarkoittaa niiden tilallista ja suuntautunutta järjestäytymistä (Li et al., 2014). Käytännössä tämä tarkoittaa, että solut asettuvat kudoksessa säännöllisiin rakenteisiin ja suuntautuvat samaan suuntaan. Orientoituminen liittyy solujen proliferaatioon ja erilaistumiseen, joiden aikana solujen muoto ja kiinnittyminen ympäristöön tapahtuu (Li et al., 2014). Sydänlihaksessa solut ovat järjestäytyneet rinnakkaisina nippuina pitkittäissuunnassa muodostaen ohuita levymäisiä kerroksia (Kotadia et al., 2020). Järjestys tukee synkronoitua supistumista ja lisää kudoksen mekaanista kestävyyttä (Dileep et al., 2023). Sydämen lisäksi orientaatiota on havaittu myös hermo- ja epiteelikudoksessa sekä ECM:ssä (Li et al., 2014).

Orientaatiota on havainnollistettu myös kokeellisesti, jotta sen vaikutusta sydämen toimintaan voidaan ymmärtää paremmin. Dileepin (2023) tutkimuksessa hiiren sydänlihassolujen orientaatiota tutkittiin mikroskopian ja konenäön yhdistelmällä. Saatu malli on esitetty kuvassa 3. Menetelmän avulla sydän saatiin kuvattua mikrometrin tarkkuudella aiemman millimetrin tarkkuuden sijaan, mikä paljasti sydänlihassolujen järjestyksen pitkittäisakselilla. Vaikka hiiren sydän ei ole täysin samanlainen ihmisen sydämen kanssa, kuva auttaa havainnollistamaan sydänlihassolujen orientaatiota.

Supistuksessa sydänlihas kiertyy myötäpäivään pitkittäisakselinsa ympäri tehostaen vääntöliikettä. Tämän vuoksi sydänlihassolut ovat orientoituneet kierteisesti ja niiden suuntauskulma muuttuu asteittain sydänlihaksen seinämän läpi. (Dileep et al., 2023; Navaee et al., 2023) Kierteisyyden uskotaan syntyneen korkean verenpaineen tarpeesta ja ilman sitä, sydän ei kykene tyhjentämään kammioita kunnolla ja pumppaamaan tarpeeksi verta elimistöön (Aumentado-Armstrong et al., 2018; Navaee et al., 2023).



Kuva 5. *Sydänlihassäikeiden arvioitu orientaatio virtausviivoilla esitettynä hiiren vasemmasta kammiosta. Värit ilmaisevat orientaatiota pitkittäisakselin poikkileikkaustasoon nähden siten, että keltainen väri on tason suuntainen ja sininen väri tasosta poikkeava. Mukailtu lähteestä (Dileep et al., 2023).*

Sähköiset signaalit leviävät sydämessä nopeasti sähköisen johtumisen anisotropian eli suuntariippuvuuden ansiosta. Hyvä johtumisanisotropia muussa sydänlihaskudoksessa mahdollistaa sen, että kammiokudoksen sydänlihassolujen orientaatio on optimoitu ensisijaisesti mekaanisen voiman tuottamiseen johtumisnopeuden sijaan (Kotadia et al.,

2020). Näin kammiot kykenevät tuottamaan riittävän supistusvoiman, samalla kun ympäröivä kudos varmistaa sähköisten signaalien nopean leviämisen. Sydänlihaskuitujen orientaatio vaikuttaa suuresti sähkövirran kulkuun, koska signaalit leviävät nopeammin pitkittäisakselia pitkin kuin poikittaissuunnassa (Kotadia et al., 2020). Pitkittäissuunnassa johtumista auttaa sytoplasman pieni vastus, sekä solujen liitoslevyjen useat natriumkanavat ja aukkoliitokset. Poikittaissuunnassa signaali kohtaa enemmän solurajoja, joiden ylitys on hitaampaa. Lisäksi solujen koko, muoto ja kudoksen lamellikerrokset vaikuttavat johtumisen nopeuteen eri ulottuvuuksissa. Tätä on havainnollistettu mittaamalla sydämen eri osista johtumisnopeuksia, joiden erot osoittavat, että kudoksen sähköinen johtavuus riippuu solujen orientaatiosta.(Kotadia et al., 2020; Li et al., 2014)

Natiivin sydänkudoksen mikroympäristössä elävät sydänlihassolut kokevat jatkuvasti mekaanisia ärsykkeitä (kuten leikkaus- ja vetojännitys), joilla on tärkeä rooli kudoksen rakenteen ja toiminnan kannalta (Li et al., 2014). Aikuisen sydämessä nämä ärsykkeet voivat aiheuttaa fysiologisia muutoksia ECM:ssä, mikä johtaa solujen uudelleenjärjestäytymiseen. Muutokset voivat kuitenkin olla patologisia ja altistaa kardiomyopatialle ja sähköisen johtumisen häiriöille (Dileep et al., 2023; Li et al., 2014). Tutkimusten mukaan etenkin solujen pituuden ja leveyden suhteeseen vaikuttavat muodonmuutokset vaikuttavat johtumisen anisotropiaan (Kotadia et al., 2020). Ilman mekaanisia ärsykkeitä solut eivät kuitenkaan kykene kehittymään ja toimimaan kunnolla. Pitkään 2D-ympäristössä ilma mekaanisia ärsykkeitä viljellyt sydänlihassolut menettävät vähitellen fenotyyppinsä ja toiminnallisuutensa.(Navaee et al., 2023) Siksi on tärkeää, että sydänlihassolujen tutkimuksissa keskitytään myös saavuttamaan oikeanlainen orientaatio, joka mahdollistaa rakenteellisesti ja toiminnallisesti oikeanlaisen kudoksen valmistuksen.

3. BIOTULOSTUSMENETELMÄT

3.1 Tausta

Biotulostaminen on yleistynyt kovaa vauhtia biolääketieteen tutkimuksessa sen potentiaalin ansiosta valmistaa natiivin kudoksen kaltaisia rakenteita. Tavoitteena on kehittää menetelmiä, joilla voitaisiin esimerkiksi tulostaa toimivia elimiä elinsiirtoa tarvitseville potilaille ja tautimalleja sairauksien tutkimuksiin.

Biotulostus on 3D-tulostustekniikka, jossa perinteisten filamenttien ja resiinin sijaan käytetään biomusteita. Musteet koostuvat luonnollisista tai synteettisistä biomateriaaleista ja elävistä soluista (Tripathi et al., 2022). Näiden lisäksi musteeseen voidaan lisätä kasvutekijöitä ja muita lisäaineita, jotka parantavat haluttuja ominaisuuksia, kuten johtavuutta (Wu et al., 2023). Tärkeintä on kuitenkin se, että käytetty biomuste on biologisesti yhteensopiva, ja pysyy stabiilina haluttuun valmistusvaiheeseen asti (Tripathi et al., 2022).

Sydänkudoksen valmistuksessa käytettävien biomusteiden tulisi tukea sydänlihassoluja paineenvaihteluilta ja auttaa tukirakenteiden muodostumisessa. Lisäksi tukirakenteiden biomateriaalien tulisi tukea solujen adheesiota ja erilaistumista, jotta kudos kehittyisi ja toimisi halutun mukaisesti. Yleisimpiä biomateriaaleja, joita käytetään sydänkudoksen valmistamiseen ovat polysakkaridit, proteiinit, polyakryylin johdannaiset, polykaprolaktoni (PCL) sekä näiden hybridit. Hybridibiomateriaaleissa yhdistyvät luonnollisten ja synteettisten materiaalien parhaat ominaisuudet, minkä ansiosta voidaan tulostaa monimutkaisempia rakenteita. Haluttuja ominaisuuksia tulostetussa sydänlihaskudoksessa on muun muassa suuri venymä ja vetolujuus, sekä alhainen kimmokerroin.(Wu et al., 2023)

Nykyään saatavilla on monenlaisia biotulostimia, jotka eroavat toisistaan hyödyntämiensä tulostustekniikoiden perusteella. Tämän kirjallisuuskatsauksen menetelmissä käytetään ekstruusio-, sähkökenttäohjattua- ja digitaalista valotulostusta. Näiden lisäksi voidaan hyödyntää mustesuihkutulostinta, jota on perinteisesti käytetty paperitulostimena. Jokaisen menetelmän tulostuskyky eroaa muista, minkä vuoksi biomuste pitää kehittää tulostusmenetelmään sopivaksi (Tripathi et al., 2022). Menetelmästä riippumatta tulosteet täytyy ristisilloittaa tulostuksen aikana tai sen jälkeen, jotta ne kestävät mekaanista rasitusta ja säilyttävät 3D-rakenteensa. Ristisilloituksessa biomusteen materiaalit muodostavat kemiallisia sidoksia, jotka vaikuttavat valmiin tulosteen ominaisuuksiin. Erilaisia ristisilloitusmenetelmiä ovat esimerkiksi UV-valo ja lämpö (Tripathi et al., 2022).

Valmistetun sydänkudoksen rakennetta ja toimintaa arvioidaan yleensä biomarkkereiden, supistusvoiman sekä kalsiumkuvantamisen avulla.(Wu et al., 2023)

3.2 Telinepohjainen tulostus

Telinepohjaisessa tulostuksessa tulostetaan väliaikainen tukirakenne, johon solut siirrostetaan. Telineen tarkoitus on jäljitellä luonnollista mikroympäristöä tarjoten soluille fyysisen tuen, ja edistää niiden kypsymistä (Chandika et al., 2020). Lisäksi sen rakenteet ohjaavat soluja suuntautumaan niiden suuntaisesti. Telineet voidaan tulostaa biomusteista, jotka hajoavat vähitellen solujen kypsyessä kudokseksi (Chandika et al., 2020). Toisaalta teline voidaan poistaa viljelyn jälkeen tai jättää paikoilleen osaksi lopullista kudosrakennetta.

Solujen käyttäytyminen ja morfologia ovat vahvasti riippuvaisia pinnan ominaisuuksista. Erilaisia uria ja harjanteita on käytetty solujen suuntaamiseen, mitkä on valmistettu jäykistä synteettisistä polymeereistä. Luonnolliset hydrogeelipohjaiset materiaalit ovat kuitenkin bioyhteensopivampia ja tarjoavat paremman kasvualustan soluille. Tijore et al. tutkimuksessa valmistettiin eri kokoisia hydrogeelisiä mikrokanavarakenteita solujen suuntaamiseksi. Tarkoituksena oli tutkia, miten kanavat ja niiden leveys vaikuttavat kantasolujen erilaistumiseen sydänlihassoluiksi, sekä solujen suuntautumiseen tasaiseen hydrogeelipintaan nähden.(Tijore et al., 2018)

Kanavat tulostettiin ekstruusiotulostimella gelatiini hydrogeelistä, joka ristisilloitettiin mTgase-entsyymin avulla. Tutkittavina soluina käytettiin luuytimen mesenkymaalisia kantasoluja (hMSC) ja vastasyntyneiden rottien sydänlihassoluja (CM). Molempia soluja viljeltiin ja tutkittiin erikseen. hMSC-soluille kanavien leveydet olivat 200-250µm. Heti ensimmäisenä päivänä solut suuntautuivat mikrokanavan suuntaisesti. Seitsemäntenä päivänä havaittiin sydänspesifisen markkerin tropoiini T:n ilmentymisen lisääntymistä sekä kanavan suuntaisesti järjestäytyneitä F-aktiini-stressikuituja eli aktiinifilamentti kimppuja. Havainnot viittaisivat siihen, että hMSC-solut olivat alkaneet erilaistumaan sydänlihasoluiksi. Solujen katsottiin olevan suuntautuneita, jos niiden tuman suuntautuminen oli alle 20° kanavan suuntaan katsottuna. Tämän perusteella suurin osa kanavan soluista oli suuntautunut. Kuvioimattomassa hydrogeelissä ei havaittu koko viljelyn aikana järjestäytynyttä suuntutumista eikä tropoiini T:n ilmentymistä, mikä viittaa siihen. etteivät kantasolut olleet erilaistuneet. Pienempiä CM-soluja viljeltiin 100µm leveissä kanavissa. Mikrokanavien solut levisivät kanavien suuntaisesti jo ensimmäisenä päivänä. Viljelyn toisena päivänä molemmissa näytteissä oli havaittavissa sykkimistä, mutta mikrokanavissa syke oli näkyvämpää ja nopeampaa. Neljäntenä päivänä mikrokanavien solut sykkivät

voimakkaammin ja synkronisesti, kun taas kuvioimattomassa rakenteessa solut osoittivat heikkoa, epäsäännöllistä sykkimistä erillisissä klustereissa. Lyöntien määrä kasvoi joka päivä mikrourissa ja yhdeksäntenä päivänä syke oli korkeimmillaan 62 lyöntiä minuutissa (bpm). Toisaalta kuvioimattomassa rakenteessa sykkiminen hidastui 7. ja 9. päivän välillä 30 bpm:stä 26 bpm:ään.(Tijore et al., 2018)

Kokeen tulokset osoittivat, että mikrokanavat saavat solut suuntautumaan niiden mukaisesti, ja ohjaavat kantasolujen erilaistumista sydänlihassoluiksi. Yli 500µm leveissä urissa solujen suuntautuminen väheni tai suuntautumista ei tapahtunut laisinkaan.(Tijore et al., 2018)

Solujen suuntautumisen auttamiseksi voidaan tulostaa monikerroksinen teline, jonka kuidut jäljittelevät sydänlihassäikeiden järjestystä. Sähkökenttäohjattua suihkutulostusta (EFD) hyödyntäen Wu et al. valmisti PLC-telineen, jonka kerrosten välinen kulma vaikutti solujen kasvuun. Sydänlihassäikeiden järjestys määritettiin sian sydänkudoksesta ja huomattiin syiden järjestäytyneen eri kulmiin 30°– 55° välillä. Havaintojen perusteellä päädyttiin valmistamaan ristikkotukirakenne, jossa kulmien suuruus oli 45°.(Wu et al., 2025)

Telineet valmistettiin PCL:stä EFD:n avulla. Kuidut tulostettiin 45° (PCL-45) ja 90° (PCL-90) ristikkorakenteiksi, joihin viljeltiin hiPSC-CM-soluja. Solujen kypsymistä ja suuntautumista tutkittiin immunofluorenssivärjäyksellä sekä RNA-sekvensoinnilla. PCL-45 rakenteeseen viljellyt solut järjestyivät tukirakenteen suuntaisesti ja ilmensivät kalsiumin käsittelykykyä paremmin kuin PCL-90 rakenteessa. RNA-sekvensoinnin tuloksena todettiin PCL-45 rakenteen edistävä solujen kypsymistä pääasiassa säätelemällä ECM:n toimintaa.

Kokeen tulokset osoittivat, että 45° kulmia sisältävä ristikkorakenne toimii luonnollisen ECM ympäristön tavoin tukien hiPSC-CM-solujen kasvua. Rakenteen kuidut auttoivat soluja suuntautumaan niiden mukaisesti.(Wu et al., 2025)

3.3 Solupitoinen tulostus

Telineisiin viljelemisen sijaan, voidaan rakenne valmistaa suoraan soluja sisältävistä biomusteista. Näin solut saadaan aseteltua jo tulostusvaiheessa haluttuihin kohtiin ja suuntautumista voidaan edistää esimerkiksi tulostuksessa tapahtuvan leikkausjännityksen avulla. Menetelmässä on kuitenkin tärkeää huomioida, että esimerkiksi liian korkea tulostuslämpötila tai -nopeus sekä liiallinen UV-valo ristisilloituksen aikana voivat vaurioittaa soluja (Wu et al., 2023).

Prendergast et al. tutkimuksessa valmistettiin kudosrakenteita, joiden sisältämät kuidut ohjasivat soluja suuntautumaan kuitujen suuntaisesti. Ekstruusiotulostuksessa tulostuksen aikana syntyvät leikkausjännitykset suuntauttavat kuidut ja solut tulostussuunnan mukaan. Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa vertailtiin biomustekoostumuksia ja tulostusparametrejä parhaimman lopputuloksen saamiseksi. Soluina käytettiin Meniskin fibrokondrosyyttejä (MFC) eli rustosoluja. Toisessa vaiheessa testattiin, toimiiko menetelmä myös mesenkymaalisilla kantasoluilla (MSC) sekä sydämen fibroblasteilla (CF).(Prendergast et al., 2021)

Mikrokuidut valmistettiin elektrospinnauksella kemiallisesti muokatusta hyaluronihaposta (NorHA), joiden ominaisuuksia pystyttiin muokkaamaan. Kuidut sekoitettiin biomusteeseen ennen tulostamista. Elinkelpoisuuskokeiden perusteella biomusteina käytettiin 3 % ja 5 % gelatiini-metakrylaatti (GelMA) -pitoisia hydrogeelejä. Molemmista pitoisuuksista tulostettiin kuituja sisältävät ja kuiduttomat mallit. Tämän lisäksi tehtiin tulostamattomat vertailumallit. Ensimmäisen päivän jälkeen jokaisessa näytteessä elinkelpoisuus pysyi korkeana ja MFC-solut osoittivat satunnaista aktiinin suuntautumista. Tulostetuissa kuiturakenteissa kuidut olivat suuntautuneet tulostussuuntaan, mutta tulostamattomissa rakenteissa kuidut olivat suuntautuneet satunnaisesti. Viikon jälkeen elinkelpoisuus pysyi edelleen korkeana kaikissa näytteissä, mutta 5 % kuitutuloste osoitti merkittävää aktiinin suunnan kasvua ja kuitujen suunnan säilymistä, verrattuna 3 % kuitutulosteeseen. Kuiduttomissa rakenteissa suuntautumista ei havaittu, mikä viittaa siihen, että leikkausjännitys ei yksinään riitä ohjaamaan solujen suuntautumista. Tulokset osoittivat 5 % kuitubiomusteen tukevan parhaiten MFC-solujen kasvua ja suuntautumista.(Prendergast et al., 2021)

Menetelmän sovellettavuuden osoittamiseksi koe toistettiin kahdella biomusteella, joista toinen sisälsi MSC-soluja ja toinen CF-soluja 5 % GelMA:ssa. Viikon jälkeen kuituja sisältävissä tulosteissa solujen suuntautuminen kuitujen suuntaan oli lisääntynyt aiemman kokeen tavoin. Kuiduttomissa näytteissä solujen suuntautuminen oli satunnaista. Tulokset viittaisivat siihen, että menetelmää voitaisiin hyödyntää useilla solutyypeillä. Menetelmän vahventamiseksi 5 %:n biomusteella tulostettiin vielä ympyrä-risti rakenne, jossa tulostussuunta vaihteli säteittäisesti sekä pysty- ja vaakasuuntaisesti. Viikon jälkeen solut olivat suuntautuneet kuitujen ja tulostussuunnan mukaisesti todentaen konseptin toimivaksi.(Prendergast et al., 2021)

Wang et al. tutkimuksessa keskityttiin valmistamaan toimivia sydänkudoksia ilman musteessa olevia ohjaavia kuituja vastasyntyneiden rottien kammio sydänlihassoluista (NRVCM). Tulostamiseen käytettiin integroitua kudos-elin-tulostinta (ITOP), joka mahdollistaa useamman biomusteen tulostamisen samaan aikaan verrattuna tavalliseen

ekstruusiotulostimeen. Musteina käytettiin solupitoista hydrogeeliä, tukihydrogeeliä ja PCL:ää. PCL:stä tulostettiin kehys, johon hydrogeelit pystyivät kiinnittymään pituussuunnassa. Solupitoista- ja tukihydrogeeliä tulostettiin vuorotellen haluttujen rakenteiden valmistamiseksi.(Wang et al., 2018)

Kolmen päivän jälkeen solut osittivat heikkoa, paikallista supistumista. Viikon kuluttua pidentyneet α-aktiini positiiviset solut olivat lisääntyneet. Lisäksi spontaania ja synkronista supistelua oli havaittavissa. Ensimmäisen neljän viikon aikana kudosrakenteet kutistuivat PCL-kehyksen kiinnittymättömillä sivuilla, jonka jälkeen mitat pysyivät vakaina 9 viikon ajan. Kiinnittyminen PCL-kehykseen oli merkittävä sydänkudoksen kehitykselle ja kypsymiselle, koska ilman kiinnittymistä sydänsolut eivät kehittyneet. Viljelyn jatkuessa sydänlihassoluista kehittyi tiheä ja tasaisesti suuntautunut kudos, jolla oli vahva synkroninen supistuvuus.(Wang et al., 2018)

Kudoksia voidaan tuottaa myös jatkuvalla optisella tulostuksella (COP), missä peilien avulla projisoidaan UV-valo-kuvio polymeeriliuokseen, joka ristisilloituksen avulla jähmettyy heijastuneen kuvion muotoon. Liu et al. tutkimuksessa hyödynnettiin μCOP tulostusta suuntautuneen kammion sydänlihaskudoksen valmistukseen. Soluina käytettiin vastasyntyneiden hiirten kammion sydänlihassoluja (NMVCM). Solupitoinen 5 % GelMA tulostettiin aluksi yksinkertaiseksi laattakuvioksi ja nauhoiksi. Jo ensimmäisen päivän jälkeen yksittäisiä soluja havaittiin sykkivän, ja kolmen päivän jälkeen sykkiminen oli synkronoitua. Soluissa havaittiin myös α-aktiinia ja sarkomeerien kasvua. Monimutkaisemmassa rakenteessa tulostettiin HAGM/PEGDA-pohja ja sen ympärille15 % GelMA kehikko. Solupitoisella 5 % GelMA:lla tulostettiin pohjien päälle neljä kuviota: yhtenäinen laatta, ruudukko, viuhkamainen viivakuvio (dispersion) ja satunnainen viivakuvio (random). Kaikissa tulosteissa solut olivat suuntautuneet GelMA-viivojen mukaan, mutta laatta ja ruudukko häiritsivät solujen suuntautumista pääakselin suunnassa. Alkuperäinen viivakuvio oli ainoa, joka paransi merkittävästi solujen voimantuottoa.(Liu et al., 2020)

4. MENETELMIEN VAIKUTUS ORIENTAATIOON

Edellisessä kappaleessa esitellyt tutkimukset osoittivat, että telinepohjaisilla ja solupitoisilla biotulostusmenetelmillä voidaan saavuttaa sydänlihassolujen yhtenäinen ja suuntautunut rakenne. Solujen suuntautumisen arviointiin käytetään yleensä mikroskooppikuvia (Li et al., 2014). Arviointiin kuuluu fyysisten seurausten tunnistaminen, kuten solujen venyminen ja aktiinin suuntautuminen (Li et al., 2014). Tässä kirjallisuuskatsauksessa esitellyissä tutkimuksissa sydänlihassolujen kypsymistä ja suuntautumista arvioitiin muun muassa immunofluorenssi värjäyksellä, kalsiumkuvantamisella sekä visuaalisella havainnoinnilla. Taulukkoon 1 on koottu vielä tiivistettynä tutkimusten tavoitteet, solut, tulostustekniikat ja tavat, joilla orientaation saavutettiin.

Taulukko 1. *Yhteenveto tutkimuksissa käytetyistä biotulostusmenetelmistä.*

Menetelmä	Tavoite	Käytetyt solut	Tulostin	Orientaation saavuttaminen
Telinepohjaiset				
Mikrourat Tijore et al.	mTgase-silloitetun gelatiinin soveltaminen mikrourien valmistuksessa solujen suuntautumisen ja hMSC-solujen kypsymisen tukemiseksi.	hMSC, CM	Ekstruusio-tulostin	Solut saivat topografisia vihjeitä mikrourien reunoista, jolloin solut venyivät ja suuntautuivat urien suuntaisesti.
Ristikkorakenne Wu et al.	Tukirakenteen valmistus, joka tukee sydänkudoksen muodostumista ja hiPSC-solujen kypsymistä.	hiPSC	Sähkökenttä-ohjattu suihkutulostin	Ristikkorakenteen kerrosten väliset kulmat jäljittelevät luonnollisen kudoksen rakennetta. Solut kasvoivat rakennetta pitkin.
Solupitoiset				
Nanokuidut Prendergast et al.	Erilaisten solujen suuntauttaminen biomusteeseen lisättävien nanokuitujen avulla.	MFC, MSC, CF	Ekstruusio-tulostin	Mikrokuidut suuntautuivat leikkausjännityksen avulla. Solut saivat topografisia vihjeitä kuiduista ja suuntautuivat niiden mukaisesti.
Multitulostin Wang et al.	Toiminnallisen sydänkudoksen kehittäminen lääketutkimukseen, mikä jäljittelee luonnollisen sydänlihaksen rakennetta.	NRVCM	Ekstruusio-tulostin kolmella suuttimella	Sydänlihassolut suuntautuivat kudosrakenteen päissä olevien kiinnikkeiden avulla. Kudosrakenteen sisäiset voimat tiivistivät kudosta ja ohjasivat suuntautumista.
uCOP Liu et al.	Kammion sydänlihaksen rakennetta ja toimintaa muistuttava kudoksen tulostaminen tautimallinnukseen.	NMVCM	Jatkuva mikro-optinen tulostin (μCOP)	Rakenteet valmistettiin yhdensuuntaisista viivoista, jolloin solut suuntautuivat niiden mukaan.

Topografian on havaittu vaikuttavan merkittävästi sydänlihassolujen suuntautumiseen, koska ne aistivat mekaanisia ja rakenteellisia vihjeitä ympäristöstään (Tijore et al., 2018). Tijoren ja Wun tutkimuksissa solut saivat topografisia vihjeitä PCL-telineen kuiduista sekä mikrokanavien reunoista, jotka ohjasivat solujen kiinnittymistä ja venymistä rakenteen suuntaisesti (Tijore et al., 2018; Wu et al., 2025). Prendergast sen sijaan hyödynsi musteen sisältämiä nanokuituja solujen ohjaamiseen (Prendergast et al., 2021). Topografisten vihjeiden puuttuessa Liun ja Wangin malleissa solujen suuntautumista ohjattiin kudosten päissä olevien kiinnikkeiden avulla (Liu et al., 2020; Wang et al., 2018). Kiinnikkeet mahdollistivat kudosrakenteen sisäisen voiman aikaansaaman tiivistymisilmiön, joka taas ohjasi lihassäikeiden suuntautumista. Wang havaitsi myös, että kiinnikkeiden puuttuminen johti siihen, ettei sydänkudos kehittynyt toiminnalliseksi ja sykkiväksi.(Wang et al., 2018)

Kuten aiemmin todettiin, sydänlihaskuitujen orientaatio vaikuttaa suuresti sähkövirran kulkuun, minkä vuoksi tutkimuksissa arvioitiin myös sähköistä johtumista muun muassa kalsiumkuvantamisen avulla. Kuvantamisen avulla havaitaan solunsisäisten kalsiumtasojen muutokset, joiden avulla voidaan seurata aktiopotentiaalin etenemistä kudoksessa (Ripa et al., 2023). Wun valmistamassa PCL-rakenteessa havaittiin lisääntynyttä aukkoliitosproteiini konneksiini 43:n ilmentymistä, mikä viittaa solujen parantuneeseen sähköiseen kytkeytymiseen. Lisäksi kalsiumkäsittely, eli kyky säädellä kalsiumin sisään- ja ulosvirtausta, oli tehokkaampaa verrattuna kontrollinäytteisiin.(Navaee et al., 2023; Wu et al., 2025) Wang havaitsi kalsiumkuvantamisen avulla, että kudoksen kypsyessä solunsisäiset kalsiumtasojen nousut etenivät yhtenäisenä aaltona koko kudoksen läpi supistumisen aikana (Wang et al., 2018). Liun tutkimuksessa puolestaan todettiin, että kudosrakenne kykeni välittämään säännöllisiä kalsiumsignaaleja (Liu et al., 2020). Havaintojen perusteella voidaan päätellä, että sydänlihassolujen suuntautuminen vaikuttaa suotuisasti solujen väliseen sähköiseen johtumiseen.

Tutkimusten välillä havaittiin eroja, milloin sydänlihassolujen spontaani sykkiminen alkoi ja kuinka voimakkaaksi se kehittyi. Wangin mallissa heikkoa sykkimistä havaittiin kolmantena päivänä viljelystä ja synkroninen supistelu alkoi viikon viljelyn jälkeen. Suurimmillaan sykkiminen oli viikoilla kolme ja neljä, jolloin syke ylsi noin 80 bpm ja supistusvoima 2,80 mN.(Wang et al., 2018) Liun tutkimuksessa yksittäisten solujen sykkimistä havaittiin jo ensimmäisenä päivänä, ja kolmantena päivänä se oli synkronista. Supistusvoima oli kuitenkin pienempi kuin Wangin mallissa, vain 0,16 mN.(Liu et al., 2020) Tijoren mallissa sykkiminen havaittiin toisena päivänä ja muuttui synkroniseksi neljäntenä päivänä. Suurin mitattu syke oli 62 bpm yhdeksäntenä päivänä.(Tijore et al., 2018) Wangin valmistamassa kudoksessa saavutettiin suurin supistusvoima ja korkein syke verrattuna

muihin. Toisaalta Prendergastin ja Wun tutkimuksissa kudoksen sykkimistä ja supistusvoimaa ei tutkittu (Prendergast et al., 2021; Wu et al., 2025). Synkroninen sykkiminen tukee myös havaintoa, että solujen yhtenäinen suuntautuminen edistää sydänkudoksen kypsymistä ja toimintaa.

Käytetyt biomateriaalit vaikuttivat merkittävästi solujen elinkelpoisuuteen. Lisäksi solupitoisissa menetelmissä ristisilloitukseen käytettävät menetelmät piti ottaa huomioon rakenteen valmistuksessa. GelMA-hydrogeelit ovat yksi yleisimmin käytetyistä biomusteista niiden sopivien biologisten ominaisuuksien ansiosta (Yue et al., 2015). GelMA muistuttaa luonnollisen ECM ominaisuuksia, koska se sisältää soluja kiinnittäviä ja entsymaattisesti hajoavia aminohappojaksoja, jotka tukevat solujen kasvua ja leviämistä. Se myös ristisilloittuu nopeasti UV-valon avulla.(Yue et al., 2015) Biomusteita valmistaessa GelMA-pitoisuus on tärkeä huomioida, sillä se vaikuttaa solujen kasvuun ja elinkelpoisuuteen. Tämän huomasivat myös Prendergast ja Liu omissa tutkimuksissaan. Prendergastin tutkimuksessa osoitettiin, että liian korkea pitoisuus (10 %) heikensi sydänlihassolujen elinkelpoisuutta, kun taas liian alhainen pitoisuus (3 %) ei riittänyt tukemaan kudoksen rakennetta (Prendergast et al., 2021). Liu puolestaan havaitsi, että suuremmissa GelMA-pitoisuuksissa (7,5–15 %) α-aktiinin ilmentyminen oli vähäistä ja sarkomeerit lyhyempiä verrattuna 5 %:n pitoisuuteen (Liu et al., 2020). Myös Tijore päätyi käyttämään 5 %:n gelatiinihydrogeeliä ryhmän aiemman tutkimustuloksen perusteella (Tijore et al., 2018). Näiden havaintojen pohjalta voidaan päätellä, että 5 %:n gelatiinipitoisuus biomusteessa tukee parhaiten sydänlihassolujen kypsymistä, kehitystä ja suuntautumista. Se on tarpeeksi matala viskositeettistä, jotta solut pääsevät leviämään, mutta samalla pysyy muodossaan. Lisäksi 5 %:n gelatiinibiomuste hajoaa tarpeeksi hitaasti, jotta solut ehtivät kiinnittymään toisiinsa. GelMA ristisilloitetaan UV-valon avulla, mikä mahdollistaa nopean ja tarkan rakenteen muodostumisen. Haittapuolena on kuitenkin UV-säteilyn toksisuus, joka voi vaikuttaa solujen elinkelpoisuuteen. Entsymaattinen ristisilloitus on huomattavasti turvallisempi vaihtoehto. Tijore käytti gelatiinihydrogeelin ristisilloittamiseen mTgase entsyymiä ja Wang trombiinia (Tijore et al., 2018; Wang et al., 2018). Ongelmia voi kuitenkin aiheuttaa se, että silloittuminen on hitaampaa entsyymeillä, minkä vuoksi paksummissa rakenteissa geeli ei ehdi jähmettymään riittävän nopeasti (Tijore et al., 2018).

Kudosten valmistukseen käytettävä tulostusmenetelmä vaikuttaa solujen suuntautumisen lisäksi rakenteen tarkkuuteen ja menetelmän soveltamiseen. Prendergast, Tijore ja Wang käyttivät tutkimuksissaan ekstruusiotulostusta, jossa biomuste puristetaan suuttimen läpi (Prendergast et al., 2021; Tijore et al., 2018; Wang et al., 2018). Menetelmässä voidaan käyttää laajasti erilaisia materiaaleja, mikä tekee siitä monipuolisen ja laajasti

käytetyn (Tripathi et al., 2022). Sen avulla voidaan tulostaa monimateriaalisia rakenteita, kuten Wang teki, ja sopii suurten elinten valmistukseen (Wang et al., 2018). Toisaalta ekstruusiotulostus ei ole tehokas monimutkaisten kudosrakenteiden valmistukseen. Tulostuslämpötila ja suuttimen koko vaikuttavat solujen elinkykyyn. Tulostusresoluutio paranee pienemmillä suuttimilla, mutta heikentää solujen elinkelposuutta mekaanisen rasituksen kasvaessa. Suuremmilla suuttimilla taas solut pysyvät hengissä, mutta tulostusresoluutio ja -nopeus heikkenevät.(Tripathi et al., 2022) Wun käyttämässä sähkökenttäohjatussa suihkutulostuksessa biomusteen virtausta ohjataan voimakkaan sähkökentän avulla (Wu et al., 2025). Suuttimen kärjessä muste polarisoituu ja venyy Taylor-kartioksi, josta lähtevä ohut suihku kerrostuu halutuksi rakenteeksi. Menetelmän avulla saadaan huomattavasti tarkempi tulostusresoluutio ilman suurta mekaanista rasitusta musteen sisältämille soluille. Sähkökenttäohjattu suihkutulostus sopii mikro- ja nanorakenteiden valmistukseen.(Cao et al., 2021) Liu käytti jatkuvaa optista tulostusta kudosrakenteen valmistamiseen. Biomuste ristisilloitetaan jatkuvasti projisoidun valon avulla, jossa haluttu kuvio heijastetaan kerros kerrokselta biomusteeseen. Menetelmä on nopea ja sillä saavutetaan todella tarkkoja rakenteita, jotka voivat olla myös monimutkaisempia. Solut välttyvät mekaaniselta rasitukselta, mutta heijastettu UV-valo saattaa vaikuttaa elinkelpoisuuteen.(Liu et al., 2020; Yuan et al., 2019)

Havainnot osoittavat, että sydänlihassolujen orientaatioon vaikuttavat useat tekijät, kuten rakenteelliset vihjeet, biomateriaalin koostumus sekä itse tulostusmenetelmä. Näistä selkeästi rakenteelliset vihjeet ovat keskeisimpänä tekijänä orientaation ohjaamisessa, mikä vahvistui kontrollinäytteistä, joissa suuntautumista ei tapahtunut ilman ulkoista ohjaavaa tekijää. Solujen yhtenäinen suuntautuminen heijastuu suoraa sähköiseen kytkeytymiseen ja kudoksen synkroniseen supistumiseen, mikä havaittiin sekä visuaalisesti että kalsiumkuvantamisen avulla. Tulosten perusteella Wangin menetelmä vaikuttaa tehokkaimmalta vahvasti supistuvan sydänkudoksen valmistukseen, mutta on huomioitava, ettei kaikissa tutkimuksissa käytetty samoja solutyyppejä. Olisi ollut mielenkiintoista selvittää, miten nanokuidut vaikuttaisivat kudoksen supistumiskykyyn, mutten löytänyt tutkimustietoa aiheesta. Tulostimien osalta ekstruusiotulostin on todennäköisesti edullisin ja helpoimmin käytettävä vaihtoehto, kun taas COP-tulostuksella voidaan saavuttaa paljon tarkempia rakenteita, jotka jäljittelevät paremmin sydämen monimutkaista rakennetta.

5. YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli tutustua erilaisiin biotulostusmenetelmiin, joiden avulla voidaan valmistaa suuntautunutta sydänlihaskudosta. Lisäksi tarkoitus oli selvittää, onko jokin menetelmä selvästi muita parempi. Lopputuloksena kaikissa menetelmissä onnistuttiin tuottamaan suuntautunutta kudosta, mikä viittaisi siihen, ettei ole olemassa yhtä ainoaa tapaa saada solut suuntautumaan. Menetelmän valinta riippuu siis pitkälti halutusta lopputuloksesta ja mihin sovellukseen tulostetta aiotaan käyttää. Telinepohjaiset rakenteet ovat monikäyttöisiä ja soveltuvat hyvin mekaanista tukea vaativiin sovelluksiin, sillä teline voi tarjota tukea myös sitä ympäröivälle kudokselle. Telineitä voidaan myös hyödyntää vain orientaation ohjaamiseen, jolloin kudos voidaan irrottaa telineestä kypsymisen jälkeen. Solupitoiset rakenteet puolestaan valmistetaan usein hydrogeeleistä, jolloin ne ovat pehmeitä ja joustavia. Tällainen rakenne sopii hyvin elastisuutta tarvitseviin sovelluksiin.

Biomusteiden ja rakenteiden muokkaamisen mahdollisuudet ovat lähes rajattomat, mikä mahdollistaa hyvinkin erilaisten kudosrakenteiden valmistamisen. Menetelmien yhdistämisellä voitaisiin mahdollisesti saavuttaa entistä monimutkaisempia ja toiminnallisempia rakenteita. Esimerkiksi telineissä voitaisiin sijoittaa solut tarkasti haluttuihin kohtiin tulostamalla biomustetta ohuen neulan avulla suoraa rakenteen sisään. Lisäksi sydänlihaskudoksen sähköistä johtavuutta voitaisiin parantaa lisäämällä telineisiin, kuituihin tai hydrogeeliin sähkönjohtavaa materiaalia. Toisaalta pitää miettiä häiritseekö lisätty sähkönjohtavuus kudoksen normaalia toimintaa. Biotulostuksen etuna on myös se, että sen avulla voidaan valmistaa rakenteita, jotka tarkoituksellisesti häiritsevät solujen orientaatiota, mikä tarjoaa uusia lähestymistapoja sairauksien mallintamiseen ja tutkimiseen. Menetelmästä riippumatta voidaan kuitenkin todeta, ettei orientaatio synny itsestään, vaan solut tarvitsevat ulkoisen vihjeen, oli se sitten valmistettu teline tai mekaaninen voima.

Työssä tarkasteltujen tutkimusten perusteella biotulostaminen on lupaava menetelmä suuntautuneen sydänlihaskudoksen valmistukseen ja sen avulla voidaan kehittää malleja, jotka vastaavat natiivin kudoksen rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia. Lisäksi osa esitetyistä menetelmistä osoitti, että menetelmiä voidaan soveltaa myös kantasoluilla, jotka saatiin erilaistettua sykkiviksi sydänlihassoluiksi. Uskon biotulostettujen mallien yleistyvän sydän- ja muiden sairauksien tutkimuksissa lähitulevaisuudessa. Jotta näistä malleista saataisiin kaikki potentiaali irti, on seuraavaksi keskityttävä tulostuksen jälkeisiin vaiheisiin, kuten kudoksen kypsyttämiseen ja toiminnallisuuden optimointiin.

LÄHTEET

Aumentado-Armstrong, T., Kadivar, A., Savadjiev, P., Zucker, S.W., Siddiqi, K., 2018. Conduction in the Heart Wall: Helicoidal Fibers Minimize Diffusion Bias. Sci. Rep. 8, 7165. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25334-7

Beans, C., 2018. The race to patch the human heart. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, 6518–6520. https://doi.org/10.1073/pnas.1808317115

Betts, J.G., Young, K.A., Wise, J.A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D.H., Korol, O., Johnson, J.E., Womble, M., DeSaix, P., 2022a. 10.7 Cardiac Muscle Tissue - Anatomy and Physiology 2e | OpenStax [WWW Document]. URL https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/10-7-cardiac-muscle-tissue (accessed 9.7.25).

Betts, J.G., Young, K.A., Wise, J.A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D.H., Korol, O., Johnson, J.E., Womble, M., DeSaix, P., 2022b. 19.2 Cardiac Muscle and Electrical Activity - Anatomy and Physiology 2e | OpenStax [WWW Document]. URL https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/19-2-cardiac-muscle-and-electrical-activity (accessed 9.8.25).

Betts, J.G., Young, K.A., Wise, J.A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D.H., Korol, O., Johnson, J.E., Womble, M., DeSaix, P., 2013. 10.3 Muscle Fiber Contraction and Relaxation - Anatomy and Physiology | OpenStax [WWW Document]. URL https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/10-3-muscle-fiber-contraction-and-relaxation (accessed 7.7.25).

Cao, H., Zhang, G., Yang, J., Zhu, X., Song, Y., Qi, X., He, J., Li, D., Lan, H., 2021. Electric-field-driven jet deposition micro-nano 3D printing based on a single-plate electrode. Chin. Sci. Bull. 66, 2745–2757. https://doi.org/10.1360/TB-2020-1434

Cardiovascular diseases (CVDs) [WWW Document], 2025. URL https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds) (accessed 8.4.25).

Chandika, P., Heo, S.-Y., Kim, T.-H., Oh, G.-W., Kim, G.-H., Kim, M.-S., Jung, W.-K., 2020. Recent advances in biological macromolecule based tissue-engineered composite scaffolds for cardiac tissue regeneration applications. Int. J. Biol. Macromol. 164, 2329–2357. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.054

Dileep, D., Syed, T.A., Sloan, T.F., Dhandapany, P.S., Siddiqi, K., Sirajuddin, M., 2023. Cardiomyocyte orientation recovery at micrometer scale reveals long-axis fiber continuum in heart walls. EMBO J. 42, e113288. https://doi.org/10.15252/embj.2022113288

Foglietta, F., Canaparo, R., Muccioli, G., Terreno, E., Serpe, L., 2020. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. Life Sci. 254, 117784. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117784

Jänesniemi, F., 2025. A) Sydänlihassolun aktiopotentiaalin ja supistumisen kuvaajat ajan suhteen. B) Kalsiumin vapautuminen supistuksen aikana [WWW Document]. Creat. BioRender. URL https://BioRender.com/gp7u7sb

Jin, L., Hwang, B., Rezapourdamanab, S., Sridhar, V., Nandwani, R., Amoli, M.S., Serpooshan, V., 2025. Bioengineering Approaches to In Vitro Modeling of Genetic and Acquired Cardiac Diseases. Curr. Cardiol. Rep. 27, 1–14. https://doi.org/10.1007/s11886-025-02218-7

Kotadia, I., Whitaker, J., Roney, C., Niederer, S., O'Neill, M., Bishop, M., Wright, M., 2020. Anisotropic Cardiac Conduction. Arrhythmia Electrophysiol. Rev. 9, 202–210. https://doi.org/10.15420/aer.2020.04

Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Wang, L., Du, Y., Lu, T.J., Xu, F., 2014. Engineering cell alignment *in vitro*. Biotechnol. Adv. 32, 347–365. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.007

Liu, J., Miller, K., Ma, X., Dewan, S., Lawrence, N., Whang, G., Chung, P., McCulloch, A.D., Chen, S., 2020. Direct 3D bioprinting of cardiac micro-tissues mimicking native myocardium. Biomaterials 256, 120204. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120204

Männer, J., 2022. When Does the Human Embryonic Heart Start Beating? A Review of Contemporary and Historical Sources of Knowledge about the Onset of Blood Circulation in Man. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 9, 187. https://doi.org/10.3390/jcdd9060187

Morano, I., 2016. The Contractile Apparatus of the Heart, in: Congenital Heart Diseases: The Broken Heart. Springer, Vienna, pp. 237–250. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1883-2_17

Navaee, F., Khornian, N., Longet, D., Heub, S., Boder-Pasche, S., Weder, G., Kleger, A., Renaud, P., Braschler, T., 2023. A Three-Dimensional Engineered Cardiac In Vitro Model: Controlled Alignment of Cardiomyocytes in 3D Microphysiological Systems. Cells 12, 576. https://doi.org/10.3390/cells12040576

Nguyen, B.Y., Ruiz-Velasco, A., Bui, T., Collins, L., Wang, X., Liu, W., 2019. Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials. Br. J. Pharmacol. 176, 4302–4318. https://doi.org/10.1111/bph.14431

Prendergast, M.E., Davidson, M.D., Burdick, J.A., 2021. A Biofabrication Method to Align Cells within Bioprinted Photocrosslinkable and Cell-degradable Hydrogel Constructs via Embedded Fibers. Biofabrication 13, 10.1088/1758-5090/ac25cc. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac25cc

Ripa, R., George, T., Shumway, K.R., Sattar, Y., 2023. Physiology, Cardiac Muscle, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Tijore, A., Irvine, S.A., Sarig, U., Mhaisalkar, P., Baisane, V., Venkatraman, S., 2018. Contact guidance for cardiac tissue engineering using 3D bioprinted gelatin patterned hydrogel. Biofabrication 10, 025003. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaa15d

Tran, D.B., Weber, C., Lopez, R.A., 2024. Anatomy, Thorax, Heart Muscles, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Tripathi, S., Mandal, S.S., Bauri, S., Maiti, P., 2022. 3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications. MedComm 4, e194. https://doi.org/10.1002/mco2.194

Wang, Z., Lee, S.J., Cheng, H.-J., Yoo, J.J., Atala, A., 2018. 3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs. Acta Biomater. 70, 48–56. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.007

Wu, C.A., Zhu, Y., Woo, Y.J., 2023. Advances in 3D Bioprinting: Techniques, Applications, and Future Directions for Cardiac Tissue Engineering. Bioengineering 10, 842. https://doi.org/10.3390/bioengineering10070842

Wu, Y., Wang, Y., Xiao, M., Zhang, G., Zhang, F., Tang, M., Lei, W., Jiang, Z., Li, X., Zhang, H., Ren, X., Xu, Y., Zhao, X., Guo, C., Lan, H., Shen, Z., Zhang, J., Hu, S., 2025. 3D-Printed Myocardium-Specific Structure Enhances Maturation and Therapeutic Efficacy of Engineered Heart Tissue in Myocardial Infarction. Adv. Sci. 12, 2409871. https://doi.org/10.1002/advs.202409871

Yuan, C., Kowsari, K., Panjwani, S., Chen, Z., Wang, D., Zhang, B., Ng, C.J.-X., Alvarado, P.V. y, Ge, Q., 2019. Ultrafast Three-Dimensional Printing of Optically Smooth Microlens Arrays by Oscillation-Assisted Digital Light Processing. ACS Appl. Mater. Interfaces 11, 40662–40668. https://doi.org/10.1021/acsami.9b14692

Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N., Khademhosseini, A., 2015. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. Biomaterials 73, 254–271. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045