



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sergej BOHINC

**TRIDIMENZIONALNO BIOTISKANJE
KOMPLEKSIH TKIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sergej BOHINC

TRIDIMENZIONALNO BIOTISKANJE KOMPLEKSNIH TKIV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

3D BIOPRINTING OF COMPLEX TISSUE

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Ireno Oven

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 12. 9. 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602:57.08:681.6-3 (043.2)
- KG biotehnologija/biotiskanje/tridimenzionalno
- AV BOHINC, Sergej
- SA OVEN, Irena (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2017
- IN TRIDIMENZIONALNO BIOTISKANJE KOMPLEKSNIH TKIV
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 23 str., 6 sl., 33 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Tridimenzionalno biotiskanje je metoda tkivnega inženirstva, ki za natančno odlaganje celičnega materiala oziroma biočrnila uporablja tri načine. Biočrnila so v osnovi sestavljena iz vodne raztopine pred-polimerne zasnove in celic. Glavna naloga biočrnila je zagotavljanje mehanične podpore modelu, ki je v procesu tiskanja, obenem pa ustvari primerne razmere za celično preživetje in rast. Prvi način za izgradnjo tridimenzionalnega modela je tehnika izbrizga, ki temelji na treh načinih doziranja celic: pnevmatska, piezoelektrična in toplotno osnovana. Tehnika: laser uporablja za odmerjanje celic laserski žarek, ki usmerjeno pade na absorpcijsko plast titana ali železa, na spodnji strani pa nato odpade posamezen del biočrnila (celice) na absorpcijsko podlago. Tehnika potiska ima dva načina za odmerjanje pravilne količine biočrnila, in sicer pnevmatični ali hidravlični potisni bat. Vsekakor pa imajo opisani pristopi številne tehnične pomanjkljivosti. Zato bo potrebno v naslednjih letih izboljšati resolucijo tiskanja, hkratio razporejanje več različnih celičnih tipov, vaskularizacijo, mehanično trdnost tiskanega modela in zagotavljanje visokega preživetja celic. Trenutno se tridimenzionalni konstrukti že obsežno pojavljajo na področju regenerativne medicine za zagotavljanje presadkov in farmacevtske stroke za preizkušanje farmakokinetike zdravil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602:57.08:681.6-3 (043.2)
- CX biotechnology/bioprinting/tridimensional
- AU BOHINC, Sergej
- AA OVEN, Irena (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2017
- TI TRIDIMENSIONAL BIOPRINTING OF COMPLEX TISSUE
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 23 p., 6 fig., 33 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Three-dimensional bioprinting is a method of tissue engineering that uses three methods for precise deposition of cellular material or bioink. The bioinks are basically composed of an aqueous solution of pre-polymeric basis and cells. The main task of bioink is to provide mechanical support for the model that is in the process of printing, while creating the appropriate conditions for cell survival and growth. The first way to build a three-dimensional model is a technique of injection, based on three manners of cell dosing: pneumatic, piezoelectric and heat-based. Technique: laser uses laser beam for determining cells that falls targeted on the absorption layer of titanium or iron, and on the underside, then separate part of the bioink (cell) falls off on the absorption basis. The push technique has two methods of dosing the correct amount of bioink, namely a pneumatic or hydraulic push piston. In any case, the described approaches have many technical failures. Therefore, it will be necessary in the following years to improve the printing resolution, simultaneously allocating several different cell types, vascularization, mechanical strength of the printed model and ensuring the high cell survival. At the moment, three-dimensional constructs are already extensively appearing in the field of regenerative medicine for the provision of grafts and pharmaceutical fields for testing pharmacokinetics of medicines.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 TEHNIKE BIOTISKANJA	2
2.1 TEHNIKA IZBRIZGA	4
2.2 LASER	5
2.3 TEHNIKA POTISKA	5
2.4 OSTALE TEHNIKE TISKANJA	6
3 BIOČRNILA	8
3.1 CELICE	9
3.1.1 Tiskanje in medsebojno povezovanje celic	10
3.1.2 Biokompatibilnost	11
3.2 ALGINAT	11
3.3 HIALURONSKA KISLINA	12
3.4 KOLAGEN	12
3.5 ŽELATINA	13
3.6 FIBRINOGEN	14
4 PODROČJA, KJER LAHKO UPORABIMO 3D BIOTISKANJE	14
4.1 ŽILE	15
4.2 SRCE	15
4.3 JETRA	16
4.4 ŽIVČNO TKIVO	17
4.5 PREIZKUŠANJE ZDRAVIL	17
5 REGENERATIVNA MEDICINA	18
5.1 TRDA TKIVA	18
5.2 MEHKA TKIVA	19
6 KOMERCIALIZACIJA BIOTISKA	19
7 ZAKLJUČEK	19
8 VIRI	21

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1 (A) Za človeške terapevtske aplikacije značilni potek dela vključuje izolacijo in razmnoževanje človeških celic pred tiskanjem zelenega celičnega modela. Takšni modeli se lahko navsezadnje uporabijo kot terapevtske naprave same po sebi, kot testne platforme za pregledovanje in odkrivanje zdravil ali kot in vitro model za bolezen. (B) Tiskalniki izbrizga (inject) izločajo hkrati majhne kapljice celic in vodnih gelov ter tako tvorijo tkiva. (C) Laserski biotiskalniki uporabljajo laser za izhlapevanje območja donorske plasti, ki tvori mehurček ta pa nato vzpodbudi biočrnilo, da pade na substrat. (D) Biotiskalniki osnovani na tehnologiji potiska uporabljajo pnevmatsko ali hidravlično silo za kontinuirano doziranje tekoče celične raztopine vodnega gela. (E) Stereolitografski tiskalniki uporabljajo digitalni svetlobni projektor za selektivno navzkrižno povezovanje biočrnila, ravnino po ravnino. V (C) in (E) barvne puščice predstavljajo laserski impulz ali projiciran žarek svetlobe (Mandrycky in sod., 2015: 424)	3
Slika 2 Pregled najbolj razširjenih tiskalnih tehnik in ključni parametri za tisk materialov (Hözl in sod., 2016: 2)	7
Slika 3 CAD model (a) in SEM (vrstični elektronski mikroskop) slika (b) (Stratakis in sod., 2009: 150)	8
Slika 4 Proces 3D biotiskanja. Korak 1, slikovna obdelava in oblikovanje modela. Korak 2, izbiranje celic (zgoraj) in materialov (spodaj). Korak 3, tiskana 3D struktura in aplikacija (Gu in sod., 2016: 337)	14
Slika 5 Fabrikacija sintetičnega živčnega presadka s tiskanjem gostih celičnih tubic Schwanovih in BSM celic (Mandrycky in sod., 2015: 430)	17
Slika 6 Aplikacija 3D-tiskanja od molekularne ravni do končnega organa (Li in sod., 2016: 11)	18

1 UVOD

Tridimenzionalno biotiskanje je konstrukcijska metoda, s pomočjo katere lahko natančno razporedimo celične materiale (biočrnilo), da bodo na koncu sestavljali kompleksno tkivo ali organ. Na področju regenerativne medicine gre razvoj predvsem v smeri pridobivanja funkcionalnih tkivnih nadomestkov. Tradicionalne metode, ki uporabljajo tehnologijo mikroinženirstva, so zelo omejene pri pridobivanju tkiv z ustreznimi biološkimi lastnostmi. Prav zapolnitev vrzeli med umetno generiranimi in nativnimi tkivi je možno z uporabo tehnologije tridimenzionalnega tiskanja konstruktov, ki posnemajo tkiva ali organe v njihovem naravnem okolju (Donderwinkel in sod., 2017). Omenjena tehnologija je obetavna tehnika, ki lahko s svojimi zmožnostmi zagotovi natančno razporeditev, sestavo in obliko natiskanega modela, obenem pa lahko hkrati uporablja številne celične tipe in zagotovi kar se da podobno sestavo s prvotnim tkivom.

Tkivno inženirstvo je vse večji igralec na področju regenerativne medicine in farmacevtskega raziskovanja, saj hitro zapolnjuje pomanjkanje tkiv in organov (Jose in sod., 2016), tako za presadke kot konstrukte za preizkušanje zdravil. Pri konstrukciji modelov lahko oblikovalci izbirajo med različnimi celičnimi tipi, biomateriali in različnimi tehnologijami, s čimer lahko čim boljše posnemajo biološke funkcije oziroma jih celo izboljšajo.

V zadnjih desetletjih se je obseg uporabe znatno razširil, s čimer so se odprla tudi nova področja uporabe, na primer regeneracija poškodovanih tkiv *in vivo*, ki nimajo zmožnosti samo običajne regeneracije, ter izgradnja modelov *in vitro*, ki služijo za boljše razumevanje celičnega obnašanja in preizkušanja zdravil (Zhu in sod., 2016) med drugim z uporabo t. i. platform OOC (Organs-On-a-Chip). Pri razvoju tkiv moramo upoštevati biološke omejitve, konstrukti namreč zahtevajo uporabo velike gostote celičnih tipov, da dosežemo primeren sprejem tridimenzionalnega modela v organizmu prejemnika.

Za spopadanje s problemi in izzivi, ki se pojavljajo na področju tkivnega inženirstva, so znanstveniki razvili številne strategije. Pri konvencionalnih metodah se za izgradnjo tkiva uporabljajo ogrodja, ki služijo kot matrice za nadaljnjo obdelavo s celicami. Ta ogrodja so lahko tako iz naravnih kot tudi iz umetnih polimerov. Naravni so: želatina, hialurovska kislina, alginat ... Umetni so: PGA (poliglikolna kislina), PLGA (polilaktičnoglikolna kislina), PLA (polilaktična kislina), PCL (polikaprolakton) (Zhang in sod., 2016). Ta ogrodja skrbijo za optimalno okolje celicam in jih podpirajo pri pritrditvi, razmnoževanju in širjenju po prostoru, preden le-te razvijejo lastni ekstracelularni matriks. Vendar pa je treba za uspešno doseganje izražanja ustreznega fenotipa, dodajati v ogrodja rastne faktorje in signalne molekule, da lahko celice spodbudimo, da se diferencirajo v ustrezen tip in obliko (Li in sod., 2016). V ogrodja moramo tudi dodajati različne biološke in mehanske vložke, ki poskrbijo, da bo funkcija in oblika novonastalega tkiva v skladu z našimi pričakovanji. Opisana metodologija

pa ni zmožna posnemati zapletene zgradbe organov, kot so tanki nefroni v ledvicah, posamezna živčna vlakna, miokardna zasnova ...

Pri novodobnih tehnikah skušamo pridobiti čim bolj mimetično tkivo, ki je prisotno v naravnem okolju (Cui in sod., 2017). Pri tej metodi je arhitektura modela sestavljena s pomočjo več gradbenih delov, ki jih funkcionalno povežemo v celoto. Na voljo imamo štiri načine oblikovanja zelenega konstrukta. Pri prvem uporabljamo celice, ki so enkapsulirane v gelu podobni strukturi, nato te zasnove poljubno oblikujemo oziroma sestavljamo. Pri drugem načinu v celični kulturi gojimo posamezen tip celic, ki oblikujejo agregate, ki jih znova sestavimo v tkivo. Metoda je dokaj nenatančna, celični skupki so različnih velikosti in posledično težko določimo meje posameznih tipov celic v tkivu. Tretja metoda temelji na vzpostavitvi plasti celic, ki jih po želji oblikujemo in sestavimo v tridimenzionalni model.

Četrta metoda je opisana v diplomski nalogi, in sicer tridimenzionalno tiskanje posameznih celic. Največja prednost te metode je zmožnost natančnega oblikovanja mikroskopsko majhnih struktur, ki posledično sestavljajo zelo viabilno in funkcionalno tkivo (Zhu in sod., 2016). Tridimenzionalno tiskanje ima največjo prednost pred ostalimi tkivno inženirskimi metodami v tem, da lahko vzporedno uporablja več tipov celic in jih hkrati zelo natančno prostorsko razporedi.

Tehnologijo 3D-tiskanja lahko v grobem razdelimo na dva tipa, in sicer na indirektno in direktno fabrikacijo. Pri indirektni metodi najprej ustvarijo ogrodja oziroma modele, ki služijo kot oblika in podporna komponenta za tkivo ali organ. Nato pa model s pomočjo kemične ali fizične spremembe odstranijo, za njim pa ostane biološko funkcionalno tkivo. Pri direktnih metodah pa tiskalnik odlaga celico na celico oziroma tiska plast za plastjo (Richards in sod., 2016). S tem lahko veliko natančneje odmerimo posamezen tip celic (biočrnila) na točno določeno mesto, hkrati pa uporabljamo več celičnih tipov, tako da nastane tkivo ali organ, ki ima zelo dobre viabilne in razmnoževalne sposobnosti ter odlično posnema razmere *in vivo*.

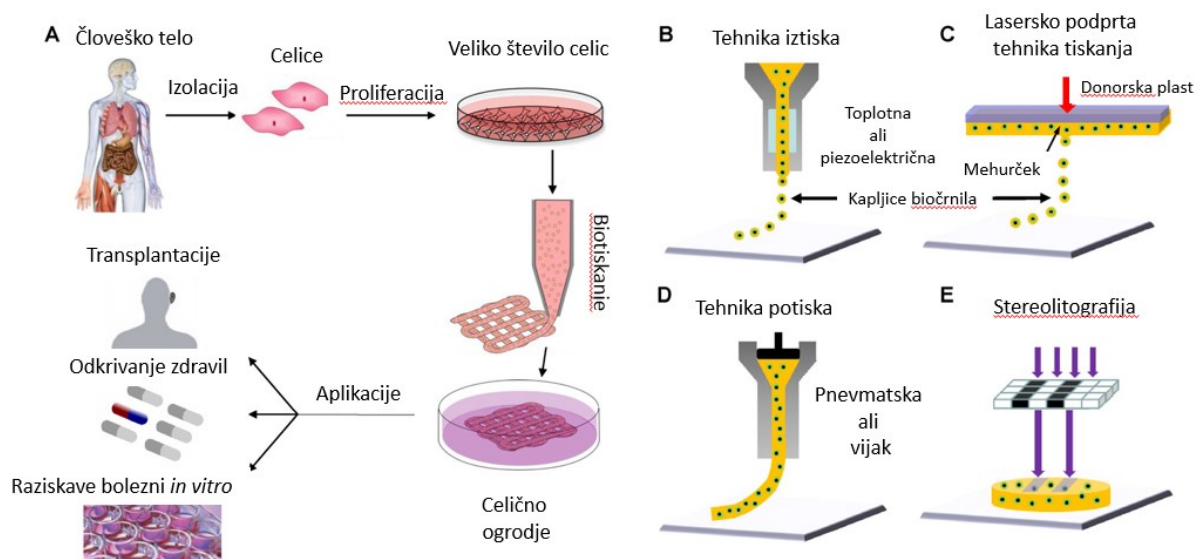
2 TEHNIKE BIOTISKANJA

Čeprav vse tri najbolj uporabljene metode tiskanja temeljijo na različnih tehnikah doziranja celic in načina, kako delujejo, je vsem skupno to, da tridimenzionalni model gradijo na podlagi odlaganja posameznih slojev celic eden na drugega. Ob upoštevanju takega načina gradnje se pojavi problem pri tiskanju struktur, ki imajo v svoji zasnovi votle prostore, kot na primer: srce, pljuča, mehur ..., obenem pa je pri vseh težavna izgradnja zadostne prepletenosti z žiljem. V tem delu se številni oblikovalci spopadajo s težavo nezadostne preskrbe s hranilnimi elementi (Donderwinkel in sod., 2017).

Tehnologija, ki jo imamo trenutno na voljo, lahko zagotovi natiskani model v nekaj minutah do nekaj ur, vendar pa se pri vaskularizaciji večjih zasnov tkiva pojavi problem nekroze, saj je

ob samo izgrajenem prepletu žil, ta proces prepočasen. Oblikovalci morajo zato z izbiro celic in materialov zagotoviti dobro medsebojno povezovanje ter zagotoviti mehansko podporo modelu, ki je v procesu tiskanja (Cui in sod., 2017).

Delna rešitev problema je možna ob uporabi razgradljivih materialov, ki zagotavljajo zadostno podporo, kasneje pa jih lahko s spremembo fizičnih ali kemičnih pogojev odstranimo. Številne raziskovalne skupine so se poslužile uporabe: Pleuronic F127, sladkornega stekla in želatinskih mikrodlecev. Vsekakor strmimo k temu, da uporabljamo snovi, ki se lahko uporabljajo s celicami in ob razgrajanju v tkivu ne sproščajo toksičnih snovi, ki bi bile škodljive za celično okolje. Kot najbolj obetaven polimer lahko štejemo Pleuronic F127, saj je dobro kompatibilen s celicami (Pleuronic ..., 2017) in med tiskanjem ohranja želene lastnosti (Müller in sod., 2015). Obenem se pri uporabi navedenih dodatkov poveča kompleksnost tiskalnega procesa, saj potrebujemo tiskalnik z več dozirniki, ki premorejo istočasno odlaganje več biočrnil. Zahteven in časovno potraten je tudi proces priprave črnil, ki zahtevajo več dni ali celo tednov za gojenje v *in vitro* kulturi ob sočasni pripravi biomaterialov, ki so sestavni del biočrnil. Ko so ta pripravljena pa se pojavi problem vzdrževanja viabilnosti črnil med tiskanjem. Za rešitev teh problemov bo morala stroka razviti tiskalnike, ki so sposobni zelo natančnega in obenem hitrejšega nalaganja celic.



Slika 1: (A) Za človeške terapevtske aplikacije značilni potek dela vključuje izolacijo in razmnoževanje človeških celic pred tiskanjem želenega celičnega modela. Takšni modeli se lahko navsezadnje uporabijo kot terapevtske naprave same po sebi, kot testne platforme za pregledovanje in odkrivanje zdravil ali kot *in vitro* model za bolezni. (B) Tiskalniki izbrizga (inject) izločajo hkrati majhne kapljice celic in vodnih gelov ter tako tvorijo tkiva. (C) Laserski biotiskalniki uporabljajo laser za izhlapevanje območja donorske plasti, ki tvori mehurček ta pa nato vzpodbudi biočrnilo, da pade na substrat. (D) Biotiskalniki osnovani na tehnologiji potiska uporabljajo pnevmatsko ali hidravlično silo za kontinuirano doziranje tekoče celične raztopine vodnega gela. (E) Stereolitografski tiskalniki uporabljajo digitalni svetlobni projektor za selektivno navzkrižno povezovanje biočrnila, ravnino po ravnino. V (C) in (E) barvne puščice predstavljajo laserski impulz ali projiciran žarek svetlobe (Mandrycky in sod., 2015: 424)

2.1 TEHNIKA IZBRIZGA

1. pnevmatska
2. piezoelektrična
3. termalno bazirana

1. Ta metoda temelji na zračnem pritisku, ki iz glave tiskalnika izbrizga biočrnilo, ventil na odmerniku pa regulira količino in čas prehajanja črnila prek odprtine.

2. Prostor, v katerem je biočrnilo, je praviloma prevlečen s piezoelektričnim materialom, ki se ob delovanju električnega toka volumetrično spremeni in iztisne točno določeno količino raztopine, ki ustreza volumski spremembi.

3. Toplotno osnovana sprememba temelji na lokaliziranem segrevanju notranje komore z biočrnilom, kar povzroči nastanek zračnih mehurčkov, ki potisnejo odmerjeno količino črnila iz tiskalne glave (Wang in sod., 2016).

Tehniko izbrizga (»inject«) so kot prvo uporabili za biotiskanje. Tiskalnik je sestavljen iz mehničnega dela, ki skrbi za pravilno odmerjanje celične raztopine ali tako imenovanega biočrnila, drugi del pa predstavlja posodico, v katero naložimo raztopino hidrogela z enkapsuliranimi celicami. Biočrnilo, ki izhaja iz tiskalnika, je veliko približno 10–50 μm in ima volumen 1–100 pikolitrov (Rúben in Paulo, 2015).

Glava tiskalnika je osnovana na sistemu MEMS (»micro-electromechanical system), ki onemogoča potisk visoko viskoznih tekočin ($>15 \text{ mPa/s}$), obenem pa deluje slabo tudi ob uporabi črnil z visoko gostoto ($>1 \cdot 10^6 \text{ celic/ml}$) (Mandrycky in sod., 2015). Problem se pojavi kljub nenehnemu mešanju biočrnila, saj se v mešanici pojavijo gostejša področja, ki lahko posledično zamašijo tiskalno glavo.

Uporaba takega tipa tiskalnika ima nekatere prednosti pred drugimi tehnologijami. Cena tiskalnika s tehnologijo izbrizga je neprimerno cenejša, saj uporablja tehniko, ki jo izrabljajo komercialni tiskalniki za tiskanje dokumentov. V napravo lahko namestimo več tiskalnih glav z različnimi posodicami, ki vsebujejo vsaka svoje biočrnilo, s čimer je možno hitrejše oziroma paralelno tiskanje konstrukta. Zaradi načina doziranja celic pa je končna viabilnost zelo visoka (80–90 %), vendar se lahko ob pojavu strižnih sil ta znatno zniža (Hözl in sod., 2016).

2.2 LASER

Tiskalnik je sestavljen iz vira pulzirajočega laserskega žarka. Ključni element pri temu sistemu je donorska plast celic, ki se odziva na laserski impulz. Pas materiala, ki služi kot sprejemnik laserskega impulza, je obdelan s silikatom ter kasneje prevlečen z absorptivno plastjo kovine. Ta traku podobna struktura na vrhu vsebuje tanko plast titana ali zlata, ki sprejema signal laserskega žarka, na spodnji strani pa je suspendirana plast biočrnila (Richards in sod., 2016). Med tiskanjem pade ozko usmerjen žarek laserja na absorpcijsko plast, ki jo vzpodbudi na ta način, da se na spodnji strani naredijo posamezne kapljice, ki se nato odložijo na podlago in oblikujejo zasnovo za tkivo ali organ. Sistem, ki poganja to tehniko tiskanja, temelji na laserskem žarku, ki vaporizira del donorske plasti, nato se na stičišču pojavi mehurček, ki posledično inducira doziranje posameznih kapljic biočrnila (celic) (Mandrycky in sod., 2015). Ta se odlaga na sprejemni substrat, na katerem se kasneje medsebojno poveže. Pomembni parametri, ki vplivajo na kakovost in hitrost natiskanega tridimenzionalnega modela, sta energijska vrednost laserskega žarka in viskoznost biočrnila.

Prednost te metode pred tiskanjem z vbrizgom je predvsem to, da celice nimajo direktnega stika z odmernikom, ki je nameščen pod tiskalno glavo (Ahm in sod., 2016). To posledično pomeni manjši mehanski stres, ki deluje na celice, s tem pa zagotovimo tudi večjo viabilnost, ki se giblje okoli 95 %. Obenem pa lahko z opisano metodo uporabljamo širši spekter biočrnin, ki so bolj viskozna ali gostejša.

Velik problem se pojavi pri ceni diod z visoko resolucijo in intenziteto oddajanja laserskih žarkov, hkrati pa je ta tehnika tiskanja neprimerno zahtevnejša kot pa metode, ki izrabljajo mehanske sisteme doziranja biočrnin. Laserski tiskalniki so še vedno zelo okorni in nepraktični zaradi neraziskanih parametrov tiskanja, ki vplivajo na velikost in kakovost izgrajenega kompleksnega tkiva (Zhu in sod., 2016). Zato je potrebno na področju valovne dolžine žarka, intenzitete in časa impulza v primerjavi s samo kakovostjo tiskanega vzorca opraviti dodatne raziskave. Tudi vpliv laserja na celice še ni dovolj natančno preučen.

2.3 TEHNIKA POTISKA

Ta tehnika uporablja modificirano verzijo tehnike izbrizga. Sistem odmerjanja biočrnila je osnovan na tehnologiji zračnega potiska ali pa za iztisk izrablja mehanski bat; oba pa zagotavljata natančno odmerjanje posameznih celic iz glave tiskalnika (Wang in sod., 2016). Sistem temelji na mehanizmu več tiskalnih glav, ki jih lahko tako spremenimo, da istočasno odlagajo več celičnih tipov oziroma biočrnin z različno viskoznostjo in tudi visoko celično gostoto. Posebnost takega sistema je, da lahko ob zagotavljanju enakomernega nenehnega pritiska tiskalnik naredi neprekinjeno cilindrično črto in ne samo odmerek posameznih celic, ki se morajo kasneje še medsebojno povezati. Če lahko ti tiskalniki izrabljajo velik spekter biočrnin, pa obenem zaradi mehanskih sil, ki delujejo med iztiskom celic iz odmernika, ne

morejo zagotoviti visoke viabilnosti natiskanega tkiva (Ahn in sod., 2016). Natančnost modela v gradnji je nekoliko slabša v primerjavi z ostalima dvema in je v velikostnem rangu 50–400 μm . Zaradi slabe mehanske in strukturne stabilnosti vodnih raztopin gelov, so znanstveniki razvili tako imenovano metodo ITOP. Pri tej se istočasno odmerjata celična raztopina gela, obenem pa vzporedno poteka tok sintetičnega polimera, ki zagotavlja fizično podporo modelu.

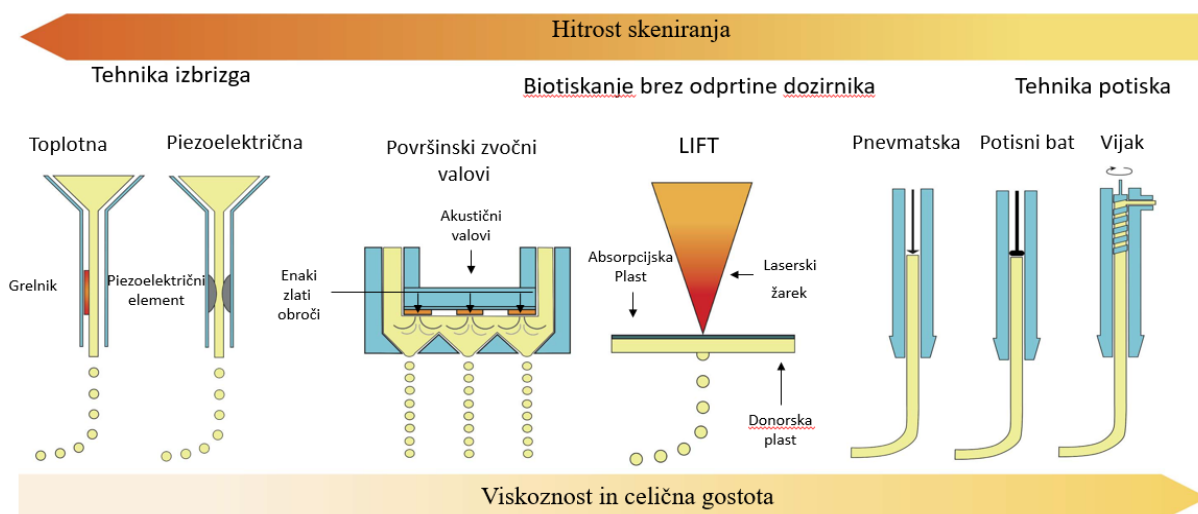
V uporabi so že nekateri biotiskalniki: Bioplotter (EnvisionTec, Germany), NovoGen 3D biotiskalna platforma (Organovo, USA) (Jia in sod., 2016).

Tehnologija s potiskom je primerna za uporabo hidrogelov, katerih zamreževanje temelji na foto, kemični in toplotni obdelavi, poleg tega pa so lahko črnila visoko viskozna in so obenem poceni (Mandrycky in sod., 2015). Potrebno je omeniti tudi različne modele tiskalnih odmernikov. Pnevmatične šobe, ki so osnovane na iztisku črnila na podlagi tlaka plinov, dovoljujejo uporabo široke palete različno viskoznih črnil, vendar se pri njih pojavi problem natančnega odmerjanja celične mase in izgradnje želenega tkiva. Drugi sistem temelji na uporabi vijaačne šobe, ki s hidravličnim potiskom bata na celično suspenzijo zagotovi primerno količino iztisnjene materiala, težave pa se pojavilo pri visoko viskoznih črnilih. Primernejši je drugi sistem, saj se lahko pri pnevmatičnem modelu pojavijo zastoji zraka, kar vpliva na tiskalni proces (Hölzl in sod., 2016).

2.4 OSTALE TEHNIKE TISKANJA

V svetu tridimenzionalnega biotiskanja kompleksnih tkiv so se razvile tudi alternativne možnosti za izgradnjo takih struktur (Wang in sod., 2016). Pojavile so se številne metode, ki učinkoviteje zagotavljajo vaskularizacijo tkiva. Ena izmed metod uporablja tehniko pnevmatskega potiska tako imenovanega raztopljenega sladkornega stekla. To suspenzijo nato vključimo v zasnove hidrogelov, v katerem se oblikovani kanali iz sladkornega stekla strdijo. V kasnejših stopnjah te zasnove ožilja razgradimo, za tem pa ostane preplet cevk, ki služijo kot žile novonastalemu tkivu in posledično omogočajo prenos kisika in hranil, saj ob izgradnji večjih modelov tkiv ne moremo zagotoviti zadostne preskrbljenosti z viabilnimi parametri samo prek difuzije skozi tanke plasti celic.

Drug sistem, ki je v uporabi, je preoblikovana tehnika stereolitografije, ki je tako kot laserski tiskalniki osnovana na podlagi svetlobnega žarka, ki načrtno utrjuje plast za plastjo biočrnila in posledično zgradi tridimenzionalni model tkiva (Vanderburgh in sod., 2016). Velika prednost takega sistema je v tem, da ni pomembno, kako kompleksna je posamezna rezina oziroma plast tkiva, saj je celoten tiskan vzorec prenesen čez tiskalno površino v enem elementu. To pomeni, da tiskalnik ne gradi modela na podlagi posameznega odlaganja celic, ampak naloži posamezne plasti tkiva enega na drugega in s tem veliko hitreje pridobimo končni izdelek.



Slika 2: Pregled najbolj razširjenih tiskalnih tehnik in ključni parametri za tisk materialov (Hözl in sod., 2016: 2)

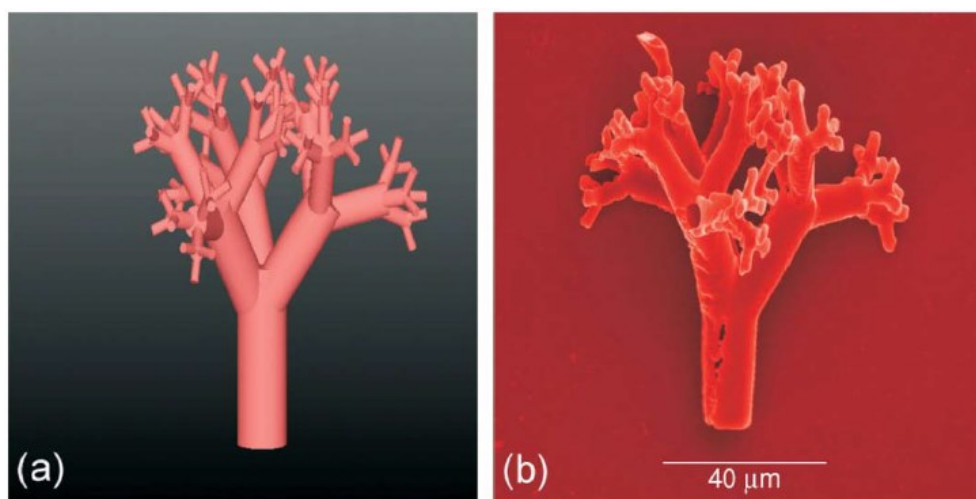
Tipičen proces biotiskanja vključuje (Mandrycky in sod., 2015):

1. Oblikovalec nariše geometrične lastnosti tiskanega objekta in ročno preveri izvedljivost za izgradnjo modela.
2. Glede na obliko, zahtevnost in funkcionalnost tiskanega tkiva se odloči za primeren tip celic in hidrogela, nato oba sestavna dela poveže v biočrnilo in ga naloži v tiskalno glavo (Li in sod., 2016).
3. Med procesom izgradnje modela moramo dati tiskalniku navodila za pot premikanja in doziranja biočrnila, zato uporabimo računalniški kontrolni jezik, kot je na primer RS 274 ali LabView.
4. Računalnik s pomočjo programa odmeri optimalno pot premikanja tiskalne glave in doziranja celic, tiskalnik pa posledično natančno in usmerjeno nalaga plasti celic in gradi tridimenzionalno kompleksno tkivo.
5. Izgrajeni model se ročno preveri s pomočjo mikroskopije.

Zaradi potreb po čim hitrejšem biotiskanju in čim boljši avtomatični zasnovi tiskanega modela, ob hkratni visoki učinkovitosti, se znanstveniki poslužujejo računalniških programov, ki oblikujejo konstrukt v virtualnem okolju, v katerem pa tudi preverijo učinkovitost in predvsem realizacijo v obstoječem okolju. Najprimernejši računalniški oblikovalski program je tako imenovan sistem CAD (computer-aided design) (Wang in sod., 2016). Večinoma se modeli za biotiskanje prenesejo v dokument STL, ki služi kot vmesna povezava med modelom v računalniškem svetu in dejansko natiskano kompleksno strukturo. Te datoteke vsebujejo številne informacije o tridimenzionalni zasnovi. Oblikujemo ga lahko s pomočjo grafičnega vmesnika ali pa pridobimo potrebne podatke prek MRI (Magnetic Resonance Imaging) in CT (Computed Tomography) kliničnih slik. Obe tehniki nam ponudita podatke za

oblikovanje tridimenzionalne zasnove tiskanega modela, saj temeljita na slikanju posameznih ravnin oziroma rezin tkiva ali organa, ki ga s pomočjo računalniškega vmesnika sestavita v urejeno celoto (Wang in sod. 2016). Ob pretvorbi kliničnih slik v dokument STL lahko tiskalniku omogočimo natančno izvajanje tiskanja z informacijami o poti tiskalne glave in odlaganja posameznih tipov celic na točno določeno področje tkiva, ki se tiska. Debelina vsake ravnine določa natančnost tiskanja, ki pa se giblje med 100 in 500 μm . To pa je zelo odvisno od tipa uporabljenega tiskalnika in izbire biočrnila. Velika prednost izgradnje modela ob pomoči sistema CAD (CAD SOFTWARE ..., 2016) je, da lahko vsakemu posamezniku oblikujemo točno določeno zgradbo tkiva ali organa (Vanderburgh in sod., 2016).

Model CAD se v svetu tridimenzionalnega tiskanja uporablja že nekaj časa in se imenuje Bio-CAM. S tem lahko preverimo fizično izvedljivost natiskanega konstrukta (Li in sod., 2016), saj program prek številnih fizičnih simulacij preveri optimalno zasnovo in funkcijo končnega izdelka. Obenem model Bio-CAM omogoča boljše razumevanje fizičnih in kemičnih parametrov tiskanja. Prek tega lahko znanstveniki lažje izboljšajo ključne elemente biotiskanja in optimizirajo proces. Vsekakor s svojimi zmogljivimi program Bio-CAM zagotavlja kakovost tiskanih modelov.



Slika 3: CAD model (a) in SEM (vrstični elektronski mikroskop) slika (b) (Stratakis in sod., 2009: 150)

3 BIOČRNILA

Biočrnila so v osnovi sestavljena iz vodne raztopine pred-polimerne zasnove in celic svojevrstnega tipa. Vodne raztopine gelov, ki služijo kot opora novo nastajajočemu tkivu, pomembno vplivajo tudi na kemične in fizične lastnosti biočrnila (Gu in sod., 2016).

Zahteve za biočrnila (Donderwinkel in sod., 2016):

1. Relativno visoka viskoznost, kar zagotavlja homogeno celično mešanico, s čimer zagotovimo nastajajočemu modelu začetno podporo.
2. Glede na prejšnjo točko se fizikalna količina viskoznosti odraža na podlagi odziva tekočine na strižno deformacijo, podana je kot razmerje med strižno napetostjo in hitrostjo, kar pa opisuje notranje trenje tekočih snovi; za minimaliziranje celičnih poškodb morajo biti te sile čim večje.
3. Za pridobitev zelene oblike modela moramo zagotoviti kar se da hitro strjevanje vodnih raztopin pred polimeri.

Za komponento biočrnil – vodne raztopine gela so v uporabi tako naravni kot umetni polimeri. Pri uporabi naravnih virov se znanstveniki poslužujejo snovi, ki jih lahko najdemo v ekstracelularnem matriksu: želatin, kolagen, laminin, fibronektin, alginat, citosan in fibroin svile.

V kontrastu so v uporabi tudi nekateri umetni materiali, katerih učinek na celice še ni dodobra raziskan, vendar pa je njihova velika prednost zmožnosti oblikovanja kemičnih in fizičnih lastnosti (Zhang in sod., 2016).

Novost na področju tkivnega inženirstva so decelularizirane ekstracelularne matrice (Whitford, 2016). Nedavne raziskave so pokazale, da je možno dECM specifičnih tkiv pretvoriti v topno obliko biočrnila. Veliko črnil je po svoji sestavi dokaj nezahtevnih, pri dECM pa se pojavi večje število sestavin, ki jih tkiva ekscelularnega matriksa vsebujejo, zato to na koncu pomeni večjo podobnost z dejanskim stanjem v okolju, v katerem bo novonastalo tkivo ali organ vključeno (Kim in sod., 2016). Vseeno pa črnila dECM ne premorejo takih mehaničnih značilnosti, kot jih imajo tkiva v organizmu, a pa so zanimiv dodatek k ostali paleti biočrnil (sintetične komponente).

3.1 CELICE

Za izgradnjo modela na makro ravni morajo biti naše celice po tiskanju zmožne nadaljnje rasti in oblikovanja tkiv prek diferenciacije (Cui in sod., 2017). Za to imamo na voljo dva dejavnika, po katerih se oblikovalec tkiva zgleduje, ko izbira celice za biotiskanje.

Prva ugotovitev, ki jo upošteva, je, kako natančno lahko celice posnemajo fiziološko stanje *in vivo*, druga pa, ali so se celice zmožne razvijati in ohranjati prvotne funkcije pod izboljšanimi pogoji, ki bi jih prvotno imele v organizmu (Kim in sod., 2016). Pri samem tiskanju imamo tako na voljo dve možnosti, ki se ju poslužujejo znanstveniki. Pri prvi uporabljajo primarne s podpornimi celicami, pri drugem načinu oblikovanja modela pa so jim na voljo zarodne/izvorne celice.

Z uporabo primarnih celic se nam pojavi problem natančnega odmerjanja različnih tipov celic in inkorporiranja v strukturno celoto (Mandrycky in sod., 2015). Tako moramo posledično opremiti tiskalnik z več tiskalnimi glavami in več posodicami za različne tipe biočrnih, ki bodo nato kasneje zmožne odmerjati posamezen tip celic ob točno določenem trenutku, na točno določeno mesto v modelu. Prav zaradi teh zahtev se zaradi trenutne tehnologije, ki še ne dosega natančnosti in paralelnega odlaganja celic, pojavijo številne napake med tiskanjem.

Pri uporabi nediferenciranih celic se pojavijo še večji problemi, in sicer pri oblikovanju končnega tkiva ali organa. Z uporabo tega postopka se sicer izognemo uporabi različnih tipov biočrnih, ampak je težavno predvsem natančno doziranje rastnih faktorjev in signalnih molekul, ki zagotovijo pravilno oblikovanje celičnih tipov (Ozolat in sod., 2016). Zagotavljanje teh parametrov je najbolj problematično pri gradnji žilnega prepleta. Vsekakor so najobetavnejši način za izbiro ustreznega tipa celic prav darovalčeve lastne celice. S tem se izognemo številnim težavam, povezanim z imunološkim zavračanjem presajenega tkiva ali organa, tega pa bo posledično organizem veliko lažje sprejel in implantiral. Tak sistem je še posebej obetaven pri presaditvi tkiv, ki se sama ne morejo obnavljati, kot na primer srčnomišične celice.

3.1.1 Tiskanje in medsebojno povezovanje celic

Tako imenovna tiskalnost se nanaša na razmerje med biočrnili in odlagalnimi substrati, kar pomeni visoko kakovosten vzorec tiskanja. V biotiskanju se to nanaša na površinsko napetost, ki je izmerjena s pomočjo stičnih kotov med dvema medijema. Raziskave so pokazale, da ima prav površinska napetost odločilno vlogo pri vpletenosti na podporo celicam, ki gradijo nastajajoči tridimenzionalni model (Axpe in Oyen, 2016), kar pa tudi vpliva na njihov kasnejši razvoj in končno diferenciacijo. Vodne raztopine pred-polimernih gelov morajo ohranjati napetost v navpično smer, kot tudi imeti veliko stično površino s substratom.

Najbolj uporabljena podlaga za odlaganje celic je petrijevka, ki pa ima zelo slabo stično površino, kar pomeni, da se celice le težka oprimejo steklenega dna. Da bi se izognili temu problemu, so znanstveniki začeli stekleno podlago petrijevk tretirati z različnimi prevlekami, ki zagotavljajo optimalen oprijem biočrnih. Eden izmed najbolj uporabljenih materialov za tak postopek je TMSPMA (3-(trimetoksil) propil metakrilat). Na tiskalnost pa močno vpliva tudi težnja tiskanih materialov, da se medsebojno povežejo.

Do sedaj najbolj znane in razširjene metode biotiskanja lahko uporabljajo za biočrnilo le tekoče podporne materiale oziroma morajo biti le-ti v obliki tekoče paste.

3.1.2 Biokompatibilnost

Biokompatibilnost se nanaša na funkcijo materiala, da se po implementiranju v gostitelja obnaša v skladu z našimi pričakovanju in ne povzroča dodatnih težav, ki bi rezultirale v imunskem zavračanju tkiva ali organa. Na splošno je pomembno, da implantant v *in vivo* okolju ne zaustavlja celične proliferacije, obenem pa zagotavlja ustrezno povezovanje med celicami in tkivom (Donderwinkel in sod., 2017). Prav zaradi pomembnosti, da se tridimenzionalno natiskano tkivo zlije z gostiteljevim organizmom, mora imeti model zmožnost razgradnje oziroma vključitve s celičnim ekstracelularnim matriksom.

Ob razgradnji tkivno se sme v okolje sproščati toksičnih produktov, ki bi zaviralno vplivali na implantacijo, zato je treba opraviti študije *in vivo* za pregled interakcij med biološkim tkivom in hidrogeli ter njihov vpliv na regeneracijo kompleksnega tkiva (Rúben in Paulo, 2015). Zelo pa je zaželena uporaba vodnih gelov, ki imajo čas razgradnje podoben izgradnji medceličnine.

3.2 ALGINAT

Alginat je naravno pridobljen anionski polisaharid, ki ima določene lastnosti raztopin gelov, obenem pa ima to prednost, da se ob prisotnosti Ca^{2+} ionov začne strjevati (Axpe in Oyen, 2016). Alginatne mešanice v laboratorijskih pogojih ni zahtevno pripraviti, obenem pa ima material dobro celično združljivost, kar pomeni, da ne moti celičnega razvoja in ne predstavlja dodatnega bremena za celično okolje. Ena izmed slabih lastnosti je, da sesalske celice niso zmožne razgraditi alginatnega materiala, kar pomeni, da tkiva ali organa ne moremo spreminjati, ko je vsajen v prejemnika. Težava se pojavi tudi pri neučinkovitem pripenjanju celic na alginatno verigo, kar lahko dosežemo le s kemijsko spremembo vezi, ki povezujejo celice in tridimenzionalni model.

Ob pomoči tehnike vbrizga so znanstveniki uspeli natisniti dve votli ogrodji (Kim in sod., 2016), ki sta imeli na zunanjem obodu premer 25 μm in sta ob združitvi predstavljala delujoče miniaturno srce. Znano je tudi, da lahko ob uporabi tehnike tiskanja LIFT (laser-induced forward transfer) naredimo model različnih tipov celic kože na Matrigel prevlečenem substratu. Ta snov je sicer tržno ime za želatinasto mešanico proteinov, ki jih v svojo okolico izločajo Engelbreth Holm Swarm mišje sarkomske (tumorske) celice, vsebujejo pa zmes 60 % laminina, 30 % kolagena in nidogena-1, bolj znanega pod imenom entaktin, ki je esencialna komponenta bazalne membrane in ima povezovalno funkcijo, obenem pa skrbi za pravilno oblikovanje ekstracelularnega matriksa. V nadaljnjih korakih so preverili, kako se suspenzija alginata in različnih tipov celic: keratinocite, fibroblasti in človeške adipocitne zarodne celice obnašajo ob tiskanju z metodo LIFT. Vse so bile podvržene preiskavam viabilnosti, proliferacije, poškodb DNK in apoptoze. Posledično ni bilo opaziti signifikantnih sprememb, pri katerem koli parametru, viabilnost celic pa je celo dosegala 98 % (Axpe in Oyen, 2016).

Tudi pri tiskanju s potisno metodo so znanstveniki dosegli viabilnost >90 % (Wu in sod., 2016), zato lahko trdimo, da sta tako potisna kot metoda LIFT primerni za uporabo z visoko viskozno alginatnim gelom in zagotavljata ustrezno zasnovo za izgradnjo kompleksnejših modelov.

3.3 HIALURONSKA KISLINA

Hialuronska kislina je naravna sestavina človeškega telesa, ki jo najdemo kot sinovalno tekočino v sklepkih, hrustancu, steklovini in na steni žil, v koži ... (Pogačnik, 2006: 1540). Po sestavi je linearni polimer, ki ga sestavljata glukuronska kislina in N-acetilglukozamin, zato jo lahko definiramo kot glukozaminoglikan. Funkcija hialuronske kisline je predvsem omejena na vzpodbujanje celične proliferacije in je vključena v premikanje celičnih zasnov. Visoka molekularna teža in velika razvejanost med posameznimi polimernimi molekulami prispevata k visoki viskoznosti in težnji po intramolekularni tvorbi vodikovih vezi. Uporaba hialuronske kisline je bila optimizirana z dodatkom PEG (poli etilen glikola), katerega vezi so pripomogle k polimerizaciji, inducirane s foto signalom (Donderwinkel in sod., 2017). Sicer se PEG pogosto uporablja v raztopinah polimerov. Ni toksičen in obenem tudi ne imunogen, lahko se doda v raztopine medijev in ne ovira celičnih funkcij (PEG/PEO ..., 2016).

Raztopina PEG-a ima hidrofilen značaj, kar pomeni, da se dobro topi v vodi in poskrbi, da se ob vezavi na biomolekule ne formirajo agregati, temveč se poveča njihova topnost (PEG/PEO, 2016). Za čim boljše polimerizacijo in povezovanje med celicami so uporabili kemično sintezo in iz molekule PEG naredili štirivezno molekulo TetraPAC linker, ki je reagirala s tiolirano hialuronsko kislino, tiolirano karboksimetil hialuronsko kislino in tiolirano želatino (Kim Hyun in sod., 2016). Predpona tiolirana označuje pripeto funkcionalno skupino tiol (-SH). Za celice, ki bodo sestavljale biočrnilo, so vzeli več celičnih linij: NIH3T3 (NIH/3T3 ..., 2016), HepG2 (Hep G2 ..., 2016) in INT 407. Tiskane celice (NIH3T3) gostote $25 \cdot 10^6$ celic/ml so bile razporejene v cilindrično strukturo, da bi oblikovale votle podolgovate zasnove. Te so bile prevlečene z agarozo, da se je zagotovila zadostna mehanična podpora in orientacija natisnjene skupke. Rezultati so pokazali, da se je oblika ohranila 4 tedne ob viabilnosti, orientaciji in ustrezni funkciji celic.

3.4 KOLAGEN

Kolagen je glavni protein v ekstracelularnem matriksu in njegova naloga je predvsem zagotavljanje opore celičnim strukturam in tkivom (Pogačnik, 2006: 2072), kot so na primer hrustanec, vezi, koža, tetiva ... (Donderwinkel in sod., 2017). V telesu predstavlja do 35 % vse beljakovinske mase. Za njegovo fizično obnašanje je odgovorna stopnja mineralizacije, ki določa v kakšnem tipu tkiva se bo kolagen pojavil (kost, hrustanec, vezi). Pod ustreznimi pogoji, kot so optimalna temperatura in pH in ob pravilni koncentraciji raztopine kolagena, ta začne gelirati. To lastnost lahko učinkovito izrabimo kot medij za biočrnilo. Dobra funkcija,

ki jo ima kolagen, je možna encimatska razgradnja ob hkratnem povezovanju z integrinskimi transmembranskimi receptorji, ki olajšajo oprijemljivost med celicami in ekstracelularnim matriksom (Axpe in Oyen, 2016). Tako lahko vsadek organizem spremeni in bolj učinkovito vključi v svoj sistem. Za kar najboljšo uporabnost kolagenske raztopine, moramo to ohranjati v temperaturnem območju 4–10°C.

Primer:

Znanstveniki so uporabili raztopino kolagena in celic, ki sta bila prostorsko ločena z uporabo dveh mikro dozornikov, tiskanje je potekalo z metodo vbrizga (inkjet). Raztopina kolagena je imela gostoto 2 mg/ml, ohranjali so jo v rahlo kislem pH-ju in pri temperaturah pod 8°C.

Koža: Pri izgradnji modela kože so oblikovalci uporabili biočrnilo osnovano na kolagenu (Axpe in Oyen, 2016). Nato so natisnili enocelično plast in jo obdelali z natrijevim dikarbonatom, da so vzpodbudili tvorjenje gela. Postopek so večkrat ponovili. Pridobili so sendviču podobno ureditev, v kateri je bila med dvema plastema kolagena ujeta plast fibroblastov, sledilo je šest plasti kolagena in ponovno slojevita zasnova, v kateri je bila plast keratinocitov.

V končnem so dobili konstrukt, ki je imel biološke funkcije kože. Celična viabilnost se po enem dnevu ni spremenila v primerjavi s kontrolo (Yoon in sod., 2016). Nato so naredili imunohistokemično obarvanje s pan-keratinskimi in β -tubulinskimi antitelesi, rezultati so pokazali uspešno ločitev različnih slojev zasnov kože.

3.5 ŽELATINA

Želatina predstavlja heterogeno mešanico vodotopnih proteinov z visoko molekularno težo in je pravzaprav toplotno denaturiran kolagen (Pogačnik, 2006: 5077). Večinoma jo pridobivamo s postopkom, pri katerem v vodo dodamo živalske dele, kot so: koža, ligamenti, vezi, kosti, nato jih prevremo, za tem pa ostane snov, ki jo imenujemo želatina. Snov tvori toplotno reverzibilne, gelom podobne strukture, sama trdnost pa je odvisna predvsem od koncentracije (Donderwinkel in sod., 2017).

Znova se je za najprimernejšo izkazala metoda LIFT, pri kateri so uporabili ESC (embrionske zarodne celice). Pod absorbtivno plastjo so znanstveniki nanесли 20-odstotno raztopino želatine, nato pa nanjo dodali suspenzijo celic ESC v koncentraciji ($2-5 \cdot 10^6$ celic). Na sprejemni substrat je bila tudi nanescna 10-odstotna raztopina želatine, ki je služila kot snov, na katero bodo padle posamezne celice ESC. Po sedmih dneh kultivacije v kulturi so s pomočjo imunohistoloških metod potrdili razvoj embrioidnih telesc, ki so se razvijala in ohranjala svoj fenotip (Kim Hyun in sod., 2016). Za izboljšanje medsebojnega povezovanja celic in bioaktivnosti je potrebo želatino kemično spremeniti, da lahko s tem pridobimo snov, ki ima izboljšane nekatere lastnosti.

3.6 FIBRINOGEN

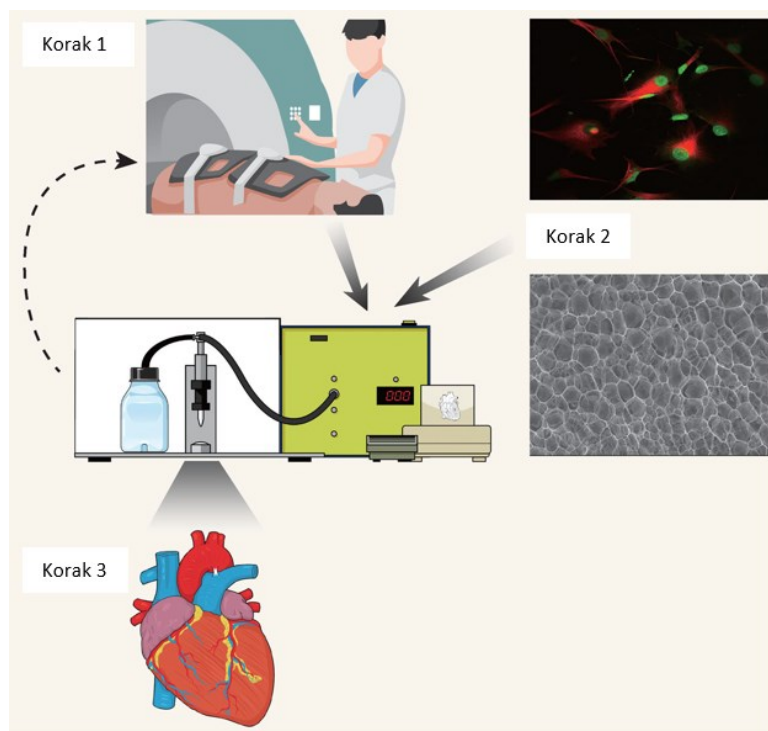
Fibrinogen je glikoprotein in je odgovoren za nastanek krvnih strdkov in se prek trombina spremeni v večjo molekulo fibrin (POGAČNIK, 2006: 1139). Sinteza poteka v jetrih, izločajo ga hepatocite. Fibrinska vlakna se sestavijo samodejno in povežejo v nitaste zasnove. Tako kot kolagen ima fibrin veliko povezovalnih motivov, ki omogočajo celično pripenjanje in so občutljivi na delovanje proteaz (Axpe in Oyen, 2016).

Znova lahko ugotovimo, da se lahko tako tkivo, po tem ko je vgrajeno v gostiteljski organizem, veliko bolje odziva na vse signale in se posledično tako spremeni, da zagotavlja kar najboljšo in najhitrejšo implantacijo (Donderwinkel in sod., 2017).

Primer uporabe:

Raziskava je pokazala, da raztopina 60 mg/ml fibrinogena, 50 U/ml trombina in 80 mM kalcijevega klorida ponudi najbolj optimalne rezultate pri izgradnji vzorcev, ki so rezultat oblikovanja fibrinskih vlaken (Kim Hyun in sod., 2016). Človeške celice EC (embrionalni karcinom) – tumorske tvorbe, ki jih najdemo v ovarijih in testisih; so bile dane v mešanico trombina in CaCl_2 , nakar je bila mešanica tiskana na podlago, prevlečeno z fibrinogenom. Po enaindvajsetih dneh v celični kulturi so celice oblikovale tridimenzionalno endotelijsko plast.

4 PODROČJA, KJER LAHKO UPORABIMO 3D BIOTISKANJE



Slika 4: Proces 3D biotiskanja. Korak 1, slikovna obdelava in oblikovanje modela. Korak 2, izbiranje celic (zgoraj) in materialov (spodaj). Korak 3, tiskana 3D struktura in aplikacija (Gu in sod., 2016: 337)

4.1 ŽILE

Splošno znano je, da je tiskanje tkiv z razvejanim žilnim sistemom (Kim in sod., 2016) zelo zahteven proces in da je potrebno na tem področju opraviti številne raziskave, ki bodo pripomogle k večji učinkovitosti vaskularizacije tiskanih modelov. Na tem področju se vseskozi pojavljajo nove tehnike in ena izmed njih je metoda, pri kateri se uporablja spremenjena tiskalna glava, ki ima v svoji zasnovi dva toka, ki vzporedno brizgata tekočino iz injekcije, ki je pravzaprav odmernik (Zhu in sod., 2016). Ta ima spremenjeno zasnovano tako, da po notranji cevi teče tok vodne pred-polimerne raztopine, po zunanem obodu pa poteka tok tekočine, ki zagotavlja povezovanje in integriteto natiskanih struktur. Opisani sistem zagotavlja izgradnjo žilnih zasnov, dolgih več kot en meter. Te so sestavljene iz ogljikovih nanocevk in podprte s pomočjo alginata. Znanstveniki so to zasnovano uspešno vključili v model gladkega mišičja in zagotovili razvoj koronarno-arterijskega žilja, vendar pa se s to tehniko niso uspeli približati velikosti kapilar. S sedanjo tehniko lahko dosežemo resolucijo (150–200 μm), kar je veliko manj kot pa velikost kapilar (10–20 μm) (Richards in sod., 2016).

Obetajoč način za izgradnjo krvožilja je vključitev nanodelcev z magnetnimi lastnostmi v biočrnilo. Tako lahko posledično s spreminjanjem magnetnega polja modificiramo obliko in položaj žil. Znova je potrebno kar nekaj časa, da bo znanstvena stroka potrdila učinek magnetnih delcev na celice in medceličnino. Po vedno večji težnji k oblikovanju čim manjših žilnih konstruktov znanstveniki vedno pogosteje posegajo po razgradljivem biočrnilu Pleuronic F127 (Duan, 2016), s katerim dosežemo velikost žilnih kanalov do 45 μm natančno, ki jim nato dodajo celice HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), ki tvorijo učinkovite zasnove (Zhang in sod., 2016). Pristop je bil uspešen tudi pri izgradnji multicelularnih kompleksov, pri katerem so bile endotelijske celice enkapsulirane v želatinasto metakrilatno biočrnilo (gelMA), ki je naravnega izvora in ga pridobivajo s hidrolitično razgradnjo kolagena, povezovanje med posameznimi delci polimera pa je vzbujeno s fotoindukcijo. Za odstranitev Pleuronic F127 je potrebno temperaturo spustiti do 4°C (Müller in sod., 2016), nakar se med agregati miceljev porušijo povezave in material se utekočini, za sabo pa pusti prehodne žilne zasnove, ki so primerne za nadaljnjo obdelavo s celicami.

4.2 SRCE

Srce je prvi funkcionalni organ, ki se razvije med razvojem zarodka. Iz embrionalnih, mezodermskih zarodnih celic se razvijejo krvne žile, krvne celice in srce. Po procesu gastrulacije se plast embrionalnih mezodermskih celic razvije v endokard, miokard in perikard (Zhang in sod., 2016). Perikardij se razvije na zunanji strani srca, medtem ko endotelij dozori v notranjost ter oblikuje limfatične in krvne žile. Glavne celične komponente, ki sestavljajo srce, so kardiomiocite, srčni fibroblasti in endotelijske celice.

Najpomembnejši 3D-biotiskani konstrukt so srčne zaklopke. Aortna zaklopka je sestavljena iz treh delov in omogoča črpanje krvi v arterije in preprečuje povratne tokove. Pri različnih komplikacijah, ki se pojavijo pri srčni zaklopki, je najuspešnejša rešitev prav zamenjava.

Znanstveniki so s pomočjo podjetja Solidworks uporabili dva hidrogela: MeHA (metakrilat hialuronska kislina) in želatino GellMA, značilnosti teh dveh so spreminjali s pomočjo koncentracijskega razmerja (Ozbolat in sod., 2016). V hidrogel so bile pomešane človeške vaskularne interstitalne celice. Po tiskanju konstrukta je bilo po sedmih dneh še vedno opaziti visoko viabilnost celic >90 %, z možnostjo preoblikovanja modela. Raziskava je pripomogla k razširitvi obsega biomaterialov, ki se lahko uporabljajo za tiskanje srčnih tkiv ter omogočila boljši vpogled v razumevanje oblik in obnašanja človeških aortnih intersticijskih celic.

Pri drugi raziskavi so uspešno bionatisnili aortni zaklopni vod z neposredno inkapsulacijo SMC-jev v korenu zaklopke in človeškimi aortnimi intersticijskimi celicami v listu. 3D-model aortne zaklopke je bil ustvarjen na podlagi CT-slikanja prašičje aortne zaklopke, ki je po 7 dneh inkapsuliranih celic v alginatu oziroma želatini pokazal približno 80-odstotno viabilnost (Ozbolat in sod., 2016). Raziskava je dokazala, da je pri 3D-biotiskanju mogoče ustvariti kompleksne raznolike aortne zaklopne vode.

Toda do zdaj bionatisnjenih aortnih zaklopk še niso preizkusili v človeškem telesu.

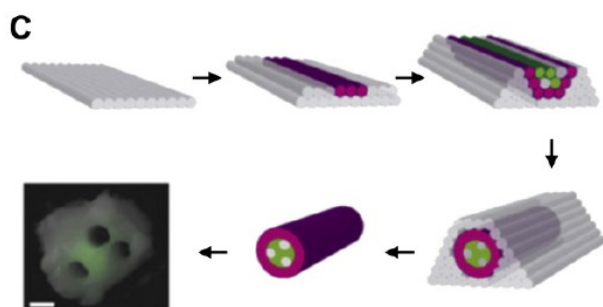
4.3 JETRA

Jetra imajo v prvotnem stanju izjemno sposobnost obnavljanja tudi ob obsežnih poškodbah (Ozbolat in sod., 2016) Posamezna enota jeter se imenuje hepaticna lobulus in je heksagonalno grajena enota, ki v dolžino meri 1 mm, v debelino pa 2 mm. Lobulusi so odgovorni za številne eksokrine, endokrine in detoksifikacijske lastnosti jeter. Parenhimski hepatociti sestavljajo poglavitni del jeter. Ostale celice, ki so prisotne v jetrih so: fibroblasti, sinusoidne endoteljske celice in epiteljske. Obstajajo tudi celice, ki izhajajo iz mezoderma: jetrne zvezdaste celice, stromalne celice in Kupfferjeve celice. Te so izredno pomembne pri sintezi različnih rastnih dejavnikov in obnavljanju proteinov, ki se nahajajo v ekstracelularnem matriksu.

Kolagen in glikozaminoglikani predstavljajo večinski delež ekstracelularnih mest, ki zagotavljajo strukturno integriteto. Najprej so znanstveniki uspešno poustvarili 2D-model parenhimske celične kulture, same celice pa so se nato uspešno diferencirale. Velika pomanjkljivost teh metod je bila odsotnost povezav med celicami in ekstracelularnem matriksu in s tem omejenost viabilnosti celičnega konstrukta. V nadaljnjih raziskavah so znanstveniki opazili pomembnost kolagenske opore za funkcionalnost jetrnega tkiva. Pri tiskanju jetrnega tkiva so uporabili MeHA, PEG, želatina alginat (Zhang in sod., 2016).

Podjetje Organovo™ je eno najinovativnejših na področju 3D-biotiskanja in je uspešno razvilo vaskularizirane modele jeter s hkratno visoko stopnjo preživetja. Pri tiskanju so uporabili tudi jetrne sferoide s funkcijo, da nadomestijo posamezne hepatocite. Sferoidi lahko zaščitijo jetrne celice pred silami, ki se ustvarjajo med postopkom tiskanja in zagotovijo prostorsko povezovanje med celicami (Donderwinkel in sod., 2017). Ob uporabi GelMa in sferoidov so pokazali, da tak sistem preživi do 30 dni z izločanjem jetrnih komponent. Jetrni sferoidi pa služijo tudi kot model za študijo hepatotoksičnih zdravil.

4.4 ŽIVČNO TKIVO



Slika 5: Fabrikacija sintetičnega živčnega presadka s tiskanjem gostih celičnih tubic Schwanovih in BSM celic (Mandrycky in sod., 2015: 430)

Izgradnja živčnega tkiva ob različnih poškodbah, motnjah in boleznih je še vedno velika prepreka (Cui in sod., 2017). Ob izgradnji novega 3D-konstrukta je ključno, da se tako tkivo kar najbolj učinkovito poveže z živčnim tkivom osebk, ki bo prejel implantant.

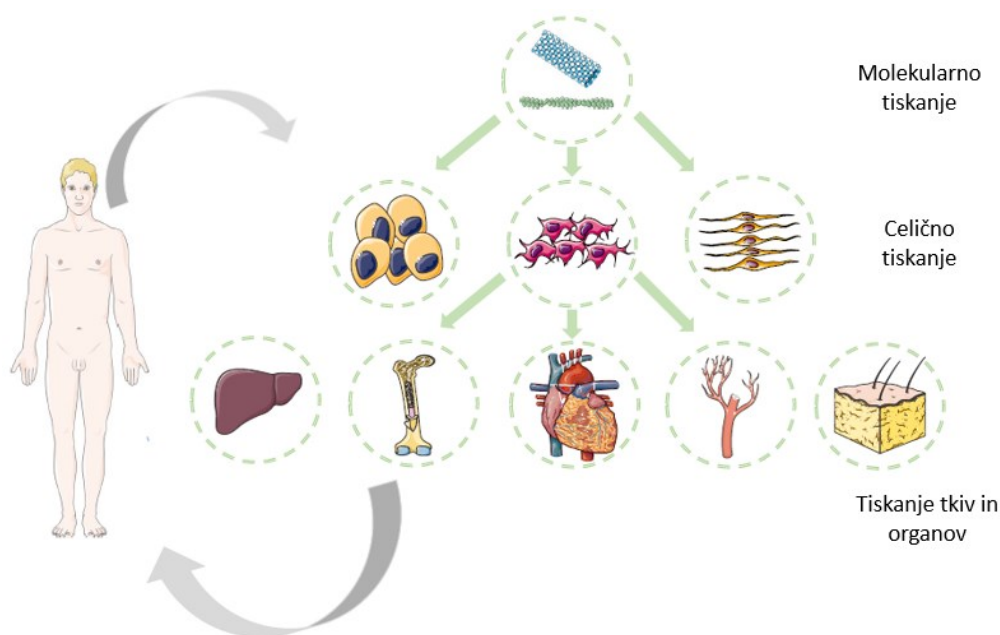
Owens je s sodelavci leta 2013 iz miši izoliral celice kostnega mozga in Schwanove celice, ki so bile nato oblikovane v tubice s premerom 500 μm in dodane v tiskalnik. Slednji je nato stiskal gost žilni preplet Schwanovih celic, ki so jih obdajale celice kostnega mozga. Model je kasneje služil za študije implementiranja živčnih vlaken na živalih. Vzporedno je Lorber s sodelavci pokazal učinkovitost tehnike vbrizga retinalnih ganglijskih in glia celic (Ozbolat in sod., 2016).

4.5 PREIZKUŠANJE ZDRAVIL

Na tem področju je tridimenzionalni model tiskanja obetaven dodatek k raziskavam učinkovitosti zdravil v samem tkivu ali organu. S tem lahko natančno določimo parametre, v katerih je tkivo in dobimo še natančnejše podatke o farmakokinetiki zdravil (Donderwinkel in sod., 2017).

Razbremenili bomo lahko tudi živali, na katerih se opravlja večina tovrstnih raziskav. Obenem se lahko s pomočjo 3D-modela razvijejo mikročipi, ki bodo vsajeni v tkivo in bodo zagotavljali podatke o učinkih in razporeditvi posameznih zdravil na zgrajeni konstrukt.

5 REGENERATIVNA MEDICINA



Slika 6: Aplikacija 3D-tiskanja od molekularne ravni do končnega organa (Li in sod., 2016: 11)

Regenerativna medicina in tkivno inženirstvo ustvarjata umetne materiale in celice *in vitro* (Ozbolat in sod., 2016). Nato se jih prestavi v organizem kot del terapevtskega procesa z namenom ponovne pridobitve funkcije. Področje regenerativne medicine je danes v porastu predvsem zaradi dolgih čakalnih vrst za transplantacijo. V ZDA je v enem letu zamenjanih 80.000 srčnih zaklopk in vstavljenih kar 600.000 žilnih implantantov (Duan, 2016). Regenerativna medicina zato predstavlja obetaven pristop, ki s pomočjo fizikalnih in kemičnih dejavnikov močno pomaga pri obnovi poškodovanih tkiv in regeneraciji.

V uporabi so biomateriali, ki so razvrščeni predvsem v tri skupine: sintetično pridobljeni, naravnega izvora in hibridni materiali. Največ obeta prav združevanje različnih materialov. V medicini so že naredili umetne kosti, srčno zaklopko, sklepe, živčne končiče, uho in celo umetno srce (pri živalih).

5.1 TRDA TKIVA

Gre za lažje procese, ker tkiva vsebujejo predvsem trde komponente, kot je na primer kostnina, kolagen. S pomočjo biotiskanja je moč pripraviti specifične dele, ki so namenjeni individualnemu pacientu in njegovi poškodbi. Tehnologija je računalniško podprta, zaradi česar je potencialno uporabna še za druge kirurške posege (Gu in sod., 2016).

5.2 MEHKA TKIVA

Travmatske poškodbe mehkih tkiv potrebujejo veliko dela za rekonstrukcijo in vplivajo na kakovost življenja poškodovancev (Gu in sod., 2016). Primer takega organa je koža, ki so jo poizkušali narediti *in vitro*. Tkivno inženirstvo pri tem kaže obetavne rezultate; v klinični praksi se že uporablja nadomestke kože, kot sta Integra in Matriderm, vendar pa problem leži v podkožju. S pomočjo biotiskanja je možno dokaj natančno skonstruirati tudi podkožne strukture, kot so znojnice in mikrovaskularno omrežje (Cubo in sod., 2016). Obetavni rezultati so bili pridobljeni tudi na poskusih na živalih glede regeneracije živčnega tkiva. Z uporabo novega polisaharidnega hidrogela so uspeli natisniti primarne živčne celice.

Problem krvno-žilnega sistema je v njegovo integraciji v organizem. Po poizkusih je sedaj možno doseči, da se tkivo vaskularizira s pomočjo polimerov, ki v predhodni zasnovi tkiva naredi posamezne kanalčke, ki služijo kot žile.

6 KOMERCIALIZACIJA BIOTISKA

Oprelitev tridimenzionalnega biotiska je bilo postavljena šele nedavno, zato je karakterizacija proizvodov še vedno nejasna. Leta 2014 je bil svetovni trg 3D-biotiska vreden 487 milijonov dolarjev, v letu 2017 pa se bo ta vrednost predvidoma povzpela do 840 milijonov (Jose in sod., 2016). V prihodnjih letih pričakujemo izrazito rast, tako da bi lahko do leta 2022 celotna vrednost področja dosegla 1,80 milijarde dolarjev. Napovedi za leto 2030 so še obetavnejše, in sicer naj bi skupna vrednost dosegla 10 milijard dolarjev (Chua in sod., 2016).

7 ZAKLJUČEK

V zadnjih dveh desetletjih je bilo na področju 3D-biotiskanja opaziti velik napredek v proizvodnji viabilnih in funkcionalnih celičnih konstruktov. 3D-tehnologije biotiskanja imajo velik potencial, da bi lahko v prihodnjih letih rešile ovire tako na področju tkivnega inženirstva, kot tudi regenerativne medicine. V trenutnem obdobju je veliko pozornosti posvečene razvijanju novih tehnologij in novih tipov biočrnih. Napredne tehnike lahko zagotovijo zahtevne zasnove tkiv, ki so po anatomskem smislu zelo podobni nativnim (Ozbolat in sod., 2016). Trenutna metoda izbrizga je zmožna tiskanja dokaj visokih resolucij biočrnih (20–100 μm), vendar pa se pri njej pojavijo omejitve pri gradnji večjih tkiv oziroma organov. Tehnologija s potiskom ima natančnost tiskanja med 50–400 μm , uporabljamo lahko visoko viskozne gele, ampak se pri manjšanju premera šobe povečajo strižne sile, ki negativno vplivajo na celično preživetje po tiskanju. Veliko pozornosti bo treba posvetiti razvoju biočrnih s spremenljivimi mehničnimi lastnostmi, obenem zagotoviti ustrezno interakcijo s celičnim matriksom, ob razpadu pa ne smejo v svojo okolico izločati toksičnih snovi (Jose in sod., 2016). Prek 3D-tehnologij tiskanja smo do sedaj že uspeli narediti kompleksne tridimenzionalne oblike tkiv in organov, ob hkratni uporabi več celičnih tipov,

biomaterialov in bioaktivnih molekul. Obstajajo številne publikacije, ki potrjujejo take teze, vendar pa se je treba zavedati razlik med stopnjo preživetja celic po tiskanju in dejansko uporabno vrednot pridobljenega modela in kako se bo ta odzival v gostiteljskem organizmu. Celice morajo v novonastalem konstrukt izraziti pričakovane lastnosti in te ohranjati zadosten čas, tako da dosežejo zadostno fiziološko učinkovitost. Pri sedanjih modelih je celična viabilnost omejena na dneve oziroma tedne, znano pa je, da bo potrebno ta čas preživetja podaljšati na mnogo večji časovni razpon.

Več kot desetletje je bil največji problem zagotoviti biomateriale, ki prek UV-svetlobe, visokih temperatur in kemično inducirane povezovanja ne izražajo negativnih vplivov na celično okolje (Jose in sod., 2016): V kolikor smo že zagotovili nekatere snovi, ki so dobro kompatibilne s celicami, se še vedno soočamo s težavami, povezanimi s topljenjem, raztapljanjem in nepričakovanim zvijanjem, ko je konstrukt vstavljen v realno biološko okolje. Obenem lahko visoka celična koncentracija v raztopini biočrnil zaviralno vpliva na prečno povezovanje pred-polimernih struktur v gelu.

Kompromise, ki jih moramo sprejeti med strukturno močjo in biokompatibilnostjo, močno omejuje aplikacije, ki se predvsem pojavljajo na biomedicinskem področju (Kim in sod., 2016). Dejavniki, kot so struktura in moč konstrukta, so pogosto nezdržljivi z biomateriali, ki se morajo približati celičnemu okolju. Zato bo potrebno na tem področju posvetiti veliko pozornosti razvoju novih metod in tehnologij. Potrebno je tudi zagotoviti učinkovito simultano nanašanje več celičnih tipov.

Na področju 3D-tkivnega inženirstva lahko opazimo dve panogi, kjer bodo ti modeli najbolj ključni. Prva je regenerativna medicina, pri kateri že sedaj opažamo veliko pomanjkanje transplantantov, dva najbolj iskana pa sta srce in ledvice, zato so znanstveniki veliko pozornosti usmerili preiskovanju mikroceličnih zasnov teh organov. Na farmacevtskem področju bodo 3D-konstrukte uporabljali pri raziskovanju vpliva zdravil na celice in bolezni (Jose in sod., 2016).

Velika prednost se kaže v tem, da lahko model, na katerem bomo opravljali tovrstne preiskave, natančno geometrijsko opredelimo, obenem pa imamo na voljo več diagnostičnih orodij, ki nam bodo pomagala pri določanju specifičnih parametrov, kako se neko zdravilo obnaša v določenem tkivu.

Menim, da se področju 3D-biotiskanja kot panogi tkivnega inženirstva obeta svetla prihodnost. Po podatkih analiz v naslednjih letih pridobivalo pomen tako za znanstvene študije kot za komercialno uporabo med iskalci presadkov. Z razvojem novih tehnik in orodij se bo pridobitev takih konstruktov posledično pocenila in postala dostopna širšemu krogu uporabnikov. Že sedaj obstajajo naprave, ki so poceni (npr. CellINK: 10.000 dolarjev), vendar

pa so tudi najboljše omejene v trenutnih zmožnostih natančnega nanosa, hkratnega odlaganja več celičnih tipov ob hkratni zagotovitvi visoke viabilnosti in funkcionalnosti.

Če pogledamo še nekoliko dlje v prihodnost, se mi zdi, da bodo 3D-tkiva in organi popolnoma prevladali na področju transplantatov. Menim celo, da bo prišlo do tega, da bomo take presadke uporabljali za pomlajevanje organizma. Celice bomo preprosto vzeli darovalcu in jih inkorporirali v biočrnilo, 3D-model pa bomo hitro in učinkovito vstavili v prejemni organizem, verjetno s pomočjo robotsko asistiranih operacij.

8 VIRI

Ahn S. H., Lee J., Park S. A., Kim W. D. 2016. Three-dimensional bio-printing. *Equipment Technologies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13: 663–676

Axpe E., Oyen M. L. 2016. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1976;doi:10.3390/ijms17121976: 11 str.

CAD SOFTWARE. 2017. Autodesk.

<https://www.autodesk.com/solutions/cad-software> (21. avg. 2017)

Chua C. H., Yeong W. Y., An J. 2016. Special issue “Biomaterials and bioprinting”. *Molecules*, 21, 1231, doi:10.3390/molecules21091231: 2 str.

Cubo N., Garcia M., Cañizo J. F., Velasco D., Jorcano J. L. 2016. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication*, 9, 015006, doi:10.1088/1758-5090/9/1/015006: 12 str.

Cui H., Nowicki M., Fisher J. P., Zhang L. G. 2017. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Science News*, 6, 1601118, doi:10.1002: 29 str.

Donderwinkel I., Hest J. C. M., Cameron N. R. 2017. Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *Polymer Chemistry*, 8: 4451–4471

Duan B. 2016. State of the art review of 3D bioprinting for cardiovascular tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 45: 195–209

Gu Q., Zhu H., Li J., Li X., Hao J., Wallace G. G., Zhou Q. 2016. Three-dimensional bioprinting speeds up smart regenerative medicine. *National Science Review*, 3: 331–334

Hep G2 [HEPG2]. 2016. ATCC.

https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=si
(22. avg. 2017)

Hözl K., Lin S., Tytgat L., Vlierberghe S. V., Gu L. in Ovsianikov A. 2016. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8, 032002, doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002: 19 str.

- Jia W., Ozkerim P. S. G., Zhang Y. S., Yue K., Zhu K., Liu W., Pi Q., Byambaa B., Dokmeci M. R., Shin S. R., Khademhosseini A. 2016. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend Bioink. *Biomaterials*, 106: 58–68
- Jose R. R., Rodriguez M. J., Dixon T. A., Omenetto F., Kaplan D. L. 2016. Evolution of bioinks in additive manufacturing technologies for 3D Bioprinting. *ACS Biomaterials science & engineering*, 2: 1662–1678
- Kim J. H., Yoo J. J., Lee S. J. 2016. Three-dimensional cell-based bioprinting for soft tissue regeneration, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13: 636-646
- Kim Ji E., Kim S. H., Jung Y. 2016. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. *TERM*, 13: 636–646
- Li Ji., Chen M., Fan X., Zhou H., Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future projects. *Journal of Translational Medicine*, 14:271, doi 10.1186/s12967-016-1028-0: 15 str.
- Mandrycky C., Wang Z., Kim Keekyoung., Kim D. H. 2015. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34: 422–434
- Müller M., Becher J., Schnabelrauch M., Wong M. Z. 2015. Nanostructured pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication*, 7, 035006, doi:10.1088/1758-5090/7/3/035006: 17 str.
- NIH/3T3. 2016. ATCC.
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo_country=si
(22. avg. 2017)
- Ozbolat I. T., Peng W., Ozbolat V. 2016. Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today*, 21: 1257–1271
- PEG/PEO (Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene oxide)). 2017. Sigma-Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=20204110> (22. avg. 2017)
- Pereira R. F., Bartolo P. J. 2015. 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. *Applied Polymer. Journal of Applied Polymer Science*, doi:10.1002/app.42458: 15 str.
- Pleuronic F-127. 2017. Sigma – Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2443?lang=en®ion=SI>
(23. avg. 2017)
- Pogačnik A. 2006. Veliki splošni leksikon. 1. izd. Ljubljana, DZS: 5108 str.

- Richards D., Jia J., Yost M., Markwald R., Mei Y. 2016. 3D Bioprinting for vascularized tissue fabrication. *Additive Manufacturing of Biomaterials. Annals of Biomedical Engineering*, 45: 132–147
- Stratakis E., Ranellaa A., Farsaria M., Fotakis C. 2009. Laser-based micro/nanoengineering for biological applications. *Progress in Quantum Electronics*, 33: 127–163
- Vanderburgh J., Sterling J. A., Guelcher S. A. 2016. 3D printing of tissue engineered constructs for in vitro modeling of disease progression and drug screening. *Annals of Biomedical Engineering*, 45: 164–179
- Wang X., Ao Q., Tian X., Fan J., Wei Y., Hou W., Tong H., Bai S. 2016. 3D Bioprinting technologies for hard tissue and organ engineering. *Materials*, 9, 802; doi:10.3390/ma9100802: 23 str.
- Whitford W. G. 2016. A bioink by any other name: terms, concepts and constructions related to 3D bioprinting. *Future Science OA*, 2, doi:10.4155/fsoa-2016-0044: 5 str.
- Wu Z., Su X., Xu Y., Kong B., Sun W., Mi S. 2016. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific reports*, 6:24474, doi: 10.1038/srep24474: 10 str.
- Yoon H., Lee J. S., Yim H., Kim G., Chun W. 2016 Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *RSC Advances*, 6: 21439–21447
- ZhanG Y. S., Yue K., Aleman J., Moghaddam K. M., BakhT S. M., Yang J., JiA W., Dell'erba V., Assawes P., Shin S. R., Dokmeci M. R., Oklu R., Khademhosseini A., 2016, 3D Bioprinting for tissue and organ fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, 45: 148–163
- Zhu W., Ma X., Gou M., Mei D., Zhang K., Chen S. 2016. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 40: 103–112