



OULUN YLIOPISTO
UNIVERSITY OF OULU

TIETOTEKNIIKAN OSASTO

Jukka Kaipala

**3D-TULOSETTAVAN MALLIN TUOTTAMINEN HIIREN
MUNUAISEN TOMOGRAFIAKUVISTA**

Kandidaatintyö
Tietotekniikan koulutusohjelma
elokuu 2015

Kaipala J. (2015) 3D-tulostettavan mallin tuottaminen hiiren munuaisen tomografiakuvista. Oulun yliopisto, tietotekniikan osasto. Kandidaatintyö, 45 s.

TIIVISTELMÄ

Elimistön sisäinen tasapaino on riippuvainen munuaisten toiminnasta, ja krooninen munuaistauti on väestöltään ikääntyvissä länsimaissa yleisimpiä sairastavuutta lisääviä ja kuolemaan johtavia sairauksia. Aikuisen munuaiskudos ei käytännössä uusiudu, ja taudin loppuvaiheessa munuaisensiirto on nykyisellään ainoa hoitokeino, jolla sen kaikki toiminnot voidaan korvata. Hoitokeinojen kehittämistä hidastaa osaltaan se, että munuainen on monimutkainen elin emmekä tunne tarkasti sen kehityksen ja toiminnan mekanismeja.

3D-tulostus on kehittyvä ala, jonka sovelluksilla on suuria tulevaisuuden mahdollisuuksia myös lääketieteessä. Tässä työssä tutkitaan lääketieteellisen 3D-tulostuksen ja erityisesti munuaisen 3D-biotulostuksen mahdollisuuksia teoriassa ja käytännössä. Työ taustoitetaan katsauksella munuaisen organogeneesiin ja työssä käytettäviin lääketieteellisiin kuvaus-, mallinnus- ja tulostusmenetelmiin. Lisäksi esitellään muista tutkimuksista yleistetty malli 3D-tulostusprosessin vaiheista.

Työn konkreettisenä vaatimuksena on luoda hiiren alkion munuaisen tomografiakuvista tulostettavat pintamallit ja rakentaa ne tarkoitukseen sopivilla 3D-tulostimilla. Lopulliset menetelmät on valittu visualisointia ajatellen ja teoriaa hyväksi käyttäen, huomioiden tutkimuksen tarpeet mutta mahdollisen tulostintekniikan puitteissa. Tulosteet mitataan ja niitä verrataan lähteenä käytettyihin malleihin. Vertailun perusteella jotkut tuloste- ja mallimittaukset eroavat toisistaan selkeästi, ja mahdollisia syitä tähän arvioidaan. Tuloksia ja käytettyjä menetelmiä arvioidaan kriittisesti. Lopuksi pohditaan siirremunuaisen 3D-tulostuksen mahdollisuuksia muiden munuaistautiin parannusta etsivien tutkimussuuntien ohella. Kaikki lähestymistavat ovat riippuvaisia munuaisen molekyyli-tason mekanismien paremmasta tuntemuksesta. 3D-biotulostus on vasta alkuvaiheessaan.

Avainsanat: Lääketieteellinen mallinnus, biotulostus, organogeneesi, OPT, SLA, FDM

Kaipala J. (2015) 3D printable model production of murine kidney tomograms. University of Oulu, Department of Computer Science and Engineering. Bachelor's Thesis, 45 p.

ABSTRACT

The inner balance of the body is dependent on renal function, and chronic kidney disease is one of the most common causes of morbidity and mortality in the aging population of the Western world. The adult kidney tissue does not actually regenerate, and renal transplantation is currently the only treatment that can replace all its functions. The development of treatments is slowed down by the fact that the kidney is a complex organ and we do not know precisely its development and functioning mechanisms.

Additive manufacturing is an evolving area, and its applications have great potential for the future, particularly in medicine. This thesis investigates the possibilities of medical 3D printing, kidney bioprinting in particular, in theory and in practice. The background overview on mammal kidney organogenesis and medical imaging, modeling and printing methods is provided with emphasis on the technologies used in this work. In addition, a generalized model of 3D printing process steps is presented based on other studies.

Concrete requirement of the work is to model and 3D print visual surface models of embryonic mouse kidney tomography images and build them with appropriate 3D printers at the Aalto University. The final methodology was selected utilizing the presented theory for visual modeling, taking into account the research needs but within the framework of available materials and printer technology. 3D printouts and models are measured and compared to each other. Based on the comparison, it is evident that some print and model measurements differ from each other more than measurement and printing resolution could be accounted for, and possible reasons for this are discussed. The results and the methods used are critically evaluated. Finally, the possibilities of kidney bioprinting are discussed along with other research areas that seek treatments for kidney diseases. All approaches appear to be dependent on better knowledge of the molecular mechanisms in the kidney. 3D bioprinting is still in its early stages.

Key words: Biomedical modelling, additive manufacturing, bioprinting, organogenesis, OPT, SLA, FDM

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYSLUETTELO

ALKULAUSE

LYHENTEIDEN JA MERKKIEN SELITYKSET

1.	JOHDANTO.....	8
2.	NISÄKKÄÄN MUNUAINEN.....	9
3.	OPTINEN PROJEKTOTOMOGRAFIA.....	11
4.	3D-TULOSTUSTEKNIIKAT.....	13
	4.1. Stereolitografia.....	13
	4.2. Pursotus.....	15
	4.3. Lasersintraus.....	16
5.	3D-TULOSTUKSEN TIEDOSTOFORMAATIT.....	18
6.	BIOTIETEELLINEN 3D-VALMISTUS.....	20
	6.1. 3D-Biotulostuksen tasot.....	20
	6.2. Yleisen 3D-valmistusprosessin vaiheet.....	20
	6.3. 3D-Biotulostuksen menetelmiä.....	22
7.	TOTEUTUS.....	24
	7.1. Lähdekuvat ja suunnitelma.....	24
	7.2. Mallinnus ja tulostus.....	25
	7.3. Mittaukset.....	30
8.	POHDINTA.....	32
	8.1. Tulosteiden arviointi.....	32
	8.2. Kohti munuaistulostusta?.....	35
9.	YHTEENVETO.....	37
10.	LÄHTEET.....	38
11.	LIITTEET.....	42

ALKULAUSE

Työn pohjana käytetty kuvamateriaali saatiin Oulun yliopiston Biocenteristä Renata Prunskaitte-Hyyryläiseltä. Tulosteet suunniteltiin ja rakennettiin Aalto-yliopistolla Jouni Partasen koneenrakennustekniikan laitoksen tulostuslaboratorioissa. Meng Wang auttoi käytännön tulostuksessa. Työtä ohjasivat tarvittaessa Seppo Vainio Biocenteristä sekä Juha Röning tieto- ja sähkötekniikan tiedekunnasta.

Helsinki, elokuu 20. 2015

Jukka Kaipala

LYHENTEIDEN JA MERKKIEN SELITYKSET

Δ	vaihteluväli
$\delta_{\bar{x}}$	suurin poikkeama keskiarvosta
$\Delta\bar{x}_{\delta}$	suurimpaan keskiarvopoikkeamaan perustuva virheraja-arvio
$\Delta\bar{x}_{ci}$	keskiarvon 95 %:n luottamusväliin perustuva virheraja-arvio
$\Delta\bar{x}_s$	keskiarvon otoskeskihajontaan perustuva virheraja-arvio
CI	luottamusväli
max	maksimiarvo
Md	keskiluku (mediaani)
min	minimiarvo
s_{n-1}	otoskeskihajonta
$s_{\bar{x}}$	keskiarvon otoskeskihajonta
\bar{x}	keskiarvo
3DP	3D printing (binder jetting); sidosainesuihkutukseen perustuva jauhekerroksia valikoiden liimaava 3D-tulostustekniikka
ABS	acrylonitrile butadiene styrene; akrylinitriilibutadienistyreeni, eräs 3D-tulostuksessa materiaalina yleisesti käytetty polymeeriseos
ABSPlus	acrylonitrile butadiene styrene plus; Stratasysin kehittämä ABS-pohjainen materiaaliseos
ADD	Aalto University Digital Design Laboratory; Aalto-yliopiston digitaalisen suunnittelun laboratorio
AM	additive manufacturing; materiaalia lisäävät valmistustekniikat
AMF	additive manufacturing file format; 3D-tulostuksessa toisinaan käytetty mallinnuksen tiedostoformaatti, aiemmin nimeltään STL 2.0
ASTM	American Society for Testing and Materials, tulostusalan toimijoiden järjestö
BMP	bitmap; bittikartta, yleinen rasterikuvien pakkaamaton tiedostoformaatti
CKD	chronic kidney disease; krooninen munuaisen vajaatoiminta
CM	confocal microscopy; konfokaalinen mikroskopia
CT	computed tomography; tietokonetomografia
ESRD	end stage renal disease; CKD:n loppuvaihe, jossa elimen toimintakyky on alentunut hengenvaaralliseksi
FDM	fused deposition modeling; Stratasysin termi materiaalia lisäävälle valmistustekniikalle, jossa pursotetaan kerroksittain tulostussäikeeltä sulatettua materiaalia
FFF	fused filament fabrication; valmistajariippumaton termi materiaalia lisäävälle valmistustekniikalle, jossa pursotetaan kerroksittain tulostussäikeeltä sulatettua materiaalia
GFP	green fluorescent protein; kudostutkimuksessa käytetty vihreä fluoresoiva proteiini
ISO	International Organization for Standardization; kansainvälinen standardoimisjärjestö

LAB	laser assisted bioprinting; LIFT-pohjainen 3D-biotulostustekniikka, jossa solumateriaali irrotetaan lasersäteellä tulostusnauhalta kohteeseen
LIFT	laser induced forward transfer; 3D-tulostustekniikka, jossa käytetään fokusoitua lasersädettä luomaan tulostekerroksen kuoren valikoidussa kohdassa mekaaninen pulssi, joka irrottaa tulostusmateriaalin kohteeseen
LSFM	light sheet fluorescence microscopy; valolevyyn perustuva fluoresenssimikroskopia
MRI	magnetic resonance imaging; magneettikuvaus
OPT	optical projection tomography; optinen projektiotomografia, eräs säteilytykseen ja sen tietokoneavusteiseen vastemittaukseen perustuva kudoksen kolmiulotteinen kuvantamismenetelmä
PCL	polycaprolactone; polykaprolaktoni, biohajoava 3D-tulostusmateriaalinakin käytetty polyesteri
SLA	stereolithography (apparatus); stereolitografia, tulostusmateriaalin vaiheittaisella säteilytyksellä tapahtuvaan polymerisaatioon perustuva materiaalia lisäävä valmistustekniikka; myös laite jolla valmistus tapahtuu
SLS	selective laser sintering; 3D-tulostustekniikka, jossa tuloste rakennetaan sintraamalla jauhekerroksia valikoiden lasersäteellä
STL	standard tessellation language; 3D-tulostuksessa yleisimmin käytetty digitaalisen mallin tallennusformaatti
TXR	Texas red; kudostutkimuksessa käytetty punainen fluoresoiva väriaine
UB	ureteric bud; alkiokehityksessä esimunuaistiehyen uretersilmu josta varsinaisen munuaisen kokoojaputkisto kehittyy

1. JOHDANTO

Elimistön sisäinen tasapaino on riippuvainen munuaisten toiminnasta, ja munuaistaudit ovat väestöltään ikääntyvissä länsimaissa yleisimpiä sairastavuutta lisääviä ja kuolemaan johtavia sairauksia [1, 2]. On arvioitu, että näissä maissa kroonista munuaistautia (CKD) sairastaa 11 % aikuisväestöstä [2]. Tyypillisesti taudinkuvaan kuuluu munuaiskudoksen vähittäisesti etenevä mutta peruuttamaton arpeutumisen, sillä aikuisen munuaiskudos ei käytännössä uusiudu [2]. Tauti johtaa lopulta sen viimeiseen vaiheeseen (ESRD), jossa vajaatoiminnan aste katsotaan hengenvaaralliseksi ilman dialyysia tai munuaissiirtoa [2]. Nykyiset passiivisesti suodattavat dialyysiteknologiat korvaavat munuaisten toimintaa vain osittain, sillä ne eivät toteuta munuaisten aktiivista molekyyliäsiirtoa eivätkä korvaa sen immunologisia tai sisäerityksen ja homeostaasiin liittyviä tehtäviä [1]. Säännöllisestä dialyysistä huolimatta heikentynyt munuaistoiminta ilmeneekin erilaisina terveysongelmina [1]. Taudin loppuvaiheessa munuaissiirto on nykyisellään ainoa hoitokeino, jolla kaikki munuaisten toiminnot voidaan korvata. Siihenkin liittyy omat puutteensa ja hankaluutensa, mutta siirteen vastaanottaja pystyy kuitenkin elämään jokseenkin normaalia elämää. Hoitokeinojen kehittämistä hidastaa osaltaan se, että munuaisten on monimutkainen elin emmekä tunne tarkasti sen kehityksen ja toiminnan mekanismeja [1]. Munuaisten on kiinnostava tutkimus- ja mallinnuskohde sen sairauksien lääketieteellisen ja yhteiskunnallisen merkityksen takia, ja tästä syystä munuaista myös tutkitaan aktiivisesti.

Tietokonetomografiakuvauksella (CT) tuotetaan rutiininomaisesti laadukasta kolmiulotteista kudosaikava, jota voidaan yhdistää hyödyllisesti 3D-tulostustekniikoiden kanssa. Tutkimalla ja kokeilemalla voidaan selvittää, missä määrin ja millä alueilla 3D-tulostuksella on mahdollista jalostaa ja hyödyntää tomografiakuvauksella saatua informaatiota. Lähtökohta on, että näin voidaan edistää biologista tietämystä niin munuaisten kehittämisestä kuin sen molekyyliäsiirto toiminnastakin sekä parantaa tutkimuksessa käytettäviä tekniikoita ja materiaaleja.

Oulun yliopiston Biocenteriltä saatiin tietokonetomografiakuvat hiiren 15,5-päiväisen alkion munuaisten ja sen kokoojaputkistosta ja lähtökohta sille, että kuvista voitaisiin luoda 3D-tulostettavia malleja, joilla olisi tutkimuksellista merkitystä. Kokoojaputkistoa esittävä kuvasarja oli tutkimuksen kannalta keskeisempi.

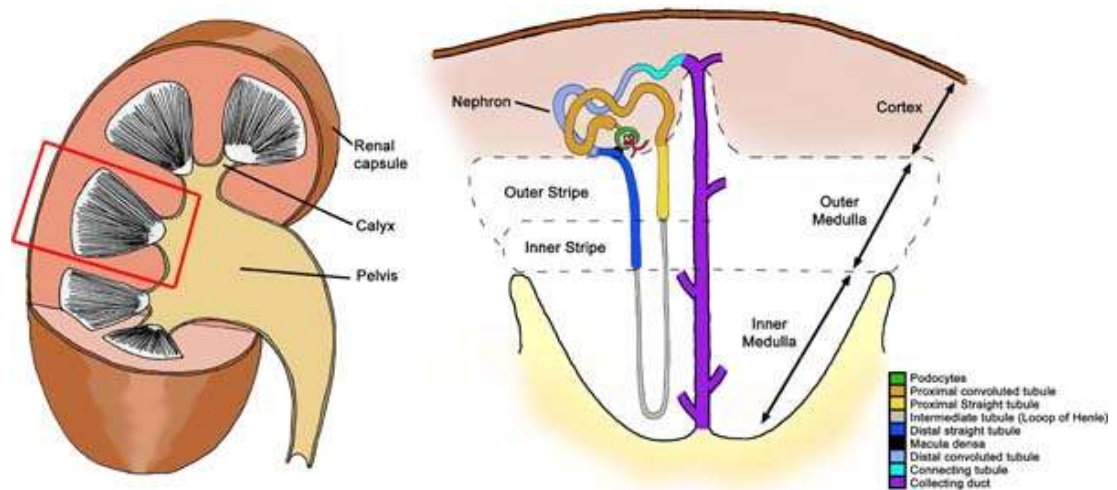
Tutkielmassa suunnitellaan menetelmät annettujen munuaisten tomografiakuvien muokkaamiseksi 3D-tulostettavaan muotoon siten, että malleja voidaan käyttää esimerkiksi kudoksen rakenteen visualisointiin ja soluviljelyaihion suunnitteluun. Ensisijainen tavoite on luoda tomografiakuvista 3D-pintamallit ja rakentaa niistä tarkoituksenmukaiset tulosteet Aalto-yliopiston käytävissä olevilla tulostimilla ja materiaaleilla. Lisäksi arvioidaan mallinnuksen onnistumista ja sitä miten vastaavaa tekniikkaa voitaisiin edelleen soveltaa.

2. NISÄKKÄÄN MUNUAINEN

Munuainen on parillinen elin, jonka perustehtävät ovat samankaltaiset kaikilla selkärangkaisilla [1, 3]. Sitä voi luonnehtia elimistön huoltojärjestelmäksi, sillä se vastaa osaltaan ruumiinnesteiden analysoinnista, puhdistuksesta ja säätelystä. Siten munuainen ylläpitää sellaista kemiallista tasapainoa jota elimistön normaali toiminta edellyttää.

Munuainen osallistuu elimistön kemiallisen tasapainon säätelyyn monin tavoin [1, 3]. Se suodattaa verestä elimistölle potentiaalisesti haitallisia aineenvaihduntatuotteita ja muita kemikaaleja ja poistaa ne elimistöstä. Samalla se säätää elimistön neste-, suola- ja elektrolyyttitasapainoa vaikuttamalla suodoksen koostumukseen. Munuainen osallistuu myös immuunivasteen säätelyyn tulehdustiloissa [1] sekä säätelee elimistön verenpainetta [4].

Munuaisen anatominen rakenne on kuvattavissa suhteellisen yksinkertaisin termein, vaikka kyseessä onkin kokonaisuutena hyvin monimutkainen elin [3]. Kuvassa 1 esitetään kaavamaisesti sen rakenteen pääosat.



Kuva 1. Munuaisen rakenne.¹

Munuainen on pavunmuotoinen, ja se jakautuu kuperan pinnan ja koverassa osassa sijaitsevan munuaisportin välisiin vyöhykkeisiin [3]. Uloimpana munuaista ympäröi sitkeä sidekudostelo. Sen sisäpuolella seuraa munuaiskuori, jossa sijaitsevat nefronien munuaiskeräset ja kiemuraiset munuaistiehyet. Nefroneiden suorat tiehyet ulottuvat munuaiskuoresta ydinkerrokseen eli medullaan, jossa sijaitsevat nefronien Henlen lingot ja munuaisen kokoojaputkistot. Munuaiskuoren sisäsuuntaiset munuaispylväät jakavat medullan kartiomaisiksi munuaispyramideiksi, joiden kärki koskettaa munuaisallasta. Nefronien munuaistiehyet yhdistyvät kuoressa

¹ Kuva: Davidson, A.J., Mouse kidney development (January 15, 2009), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.34.1, <http://www.stembook.org>. © 2008 Alan J. Davidson. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

kokoojaputkiin, laajenevat yhdistyessään ja johtavat munuaispyramidin kärjen kautta munuaisaltaaseen.

Munuaisen toiminnallisuus perustuu suurelta osin lukuisiin itsenäisiin ja olennaisesti samankaltaisiin tiehytmäisiin nefroneihin [3]. Esimerkiksi ihmisen munuaisessa niitä toimii noin miljoona. Nefroneissa munuaisen kautta kiertävästä verestä erotetaan elimistöstä poistettavat aineet.

Nefronin eri osilla on omat erityiset tehtävänsä suodoksen koostumuksen säätelyssä [2]. Kuoriosassa sijaitsevassa munuaiskeräessä alkuvirtsa suodattuu verestä medullan kautta kiertävään munuaistiehyeseen. Munuaistiehyen jaokkeissa² suodoksesta otetaan takaisin elimistölle hyödylliset aineet ja säädellään muutenkin sen koostumusta. Munuaistiehyt kytkeytyy takaisin munuaiskeräsen tuoja- ja viejävaltimoihin jukstaglomerulaarisessa laitteessa (macula densa ja jukstaglomerulaariset solut), joka säätelee verenpainetta ja glomeruluksen suodatustoimintaa. Munuaistiehyt johtaa suodoksen edelleen kokoojaputkistoon, joka hienosäätää suodoksen koostumusta ja kokoaa sen munuaisaltaaseen. Sieltä valmis virtsa siirtyy munuaisesta virtsajohtimen kautta virtsarakkoon ja pois elimistöstä.

Nisäkkään munuainen muodostuu kolmessa peräkkäisessä vaiheessa, joissa edeltävää elintä seuraa alkion kehityksessä monimutkaisempi munuaisversio [1]. Ensimmäisessä vaiheessa kehittyy alkumunuainen eli pronefros, jota seuraavat esimunuainen eli mesonefros ja lopulta varsinainen munuainen eli metanefros.

Lopullinen metanefrinen munuainen muodostuu kahden solukudoksen vuorovaikutuksesta ja yhdistymisestä [1]. Kehitys käynnistyy siten, että alkion häntäpäässä sijaitsevaan epiteeliseen esimunuaistiehyeseen syntyy pieni pussimainen ulkonema, uretersilmu (UB). Se pitenee päänsuuntaisesti kohti toista alkiokudosta, metanefristä mesenkyymiä, joka reagoi kontaktiin muodostamalla UB:n kärjen päälle lakkimaisen solutiivistymän. Tämä puolestaan indusoi UB:n haarautumaan ja muodostamaan munuaisen kokoojaputkiston. Lakkimesenkyymistä kehittyvät munuaiskeräset ja -tiehyet sekä muut munuaisen kokoojaputkistoa ympäröivät osat.

² Proksimaalinen tiehyt (kiemuratiehyt ja laskeva tiehyt), Henlen linko ((paksu ja ohut) laskeva, ohut nouseva, medullaarinen paksu nouseva sekä kortikaalinen paksu nouseva raaja) ja distaalinen kiemuratiehyt.

3. OPTINEN PROJEKTITOMOGRAFIA

Kudosten solurakenteiden ja -prosessien selvittäminen edellyttää niiden sisäisen rakenteen yksityiskohtaista tutkimusta [5]. Tomografia on kudostutkimuksen keskeinen menetelmä. Se tarkoittaa tässä yhteydessä tutkittavan kudoksen kolmiulotteista kuvaamista, jonka tuloksena saadaan yleensä kerroksittaiset poikkileikkauskuvat kohteesta. Alun perin tomografiakuvaus merkitsi useimmiten sitä, että kudoksenäyte oli konkreettisesti viipaloitava tarkempaa tutkimusta varten, mutta tietokonetomografiassa kohteen sisärakennetta voidaan tutkia myös pelkästään ulkoisesti.

Yleisellä tasolla tietokonetomografia perustuu tutkittavaa kudosta läpäiseviin energia-aaltoihin (kuten esimerkiksi ultraääniäni, magneettikenttä tai sähkömagneettinen säteily) ja niiden vaikutuksen vastemittauksiin [5]. Tekniikasta riippuen kuvaus tapahtuu joko suoran syvyysmittauksin tai niin että ympäri mitatusta läpäisystä tai heijastuksesta analysoidaan kudoksen tiheys tutkittavan volyymin eri pisteissä.

Tomografiakuvauksella voidaan esimerkiksi merkitä valikoituja proteiineja ja tunnistaa kudoksessa niiden määrä ja sijainti [5]. Tästä voidaan edelleen päätellä mikä on aktivoituneen geenin ekspressiomekanismi, mitkä geenit tai prosessit ovat aktivoituneet tai missä määrin tutkitut proteiinit liittyvät toisiinsa tai vastaaviin geeniekspressioihin.

Optinen projektitomografia (OPT) tietokoneavusteinen kuvausmenetelmä. Siinä valaistu kohde kierretään akselinsa ympäri, ja kuvauskohteesta mitataan halutuilla aallonpituuksilla kiertosuuntaan kohtisuoran valon absorptio- tai emissioprofiili eri kiertokulmista [5]. OPT-kuvaus voi perustua kohteesta mittaussuuntaan saapuvan valon läpäisymittauksiin tai mittaussuunnasta lähetetyllä valolla induoituun emissioon. Molemmissa tapauksissa kohteesta erkanevia säteilyä moneen suuntaan sironnan, taittumisen ja taipumisen takia, joten tapojen optinen periaate on sama. Mitattavan säteilyn kohtisuoruus kiertosuuntaan nähden varmistetaan linsijärjestelmällä, joka valikoi kuhunkin mittauspisteeseen vain kapean kartion alueelta saapuvan säteilyn. Tällä edellytyksellä arvio kohteen sisäisestä rakenteesta voidaan laskea tunnettujen kiertokulmien säteilyprofiileista.

Emissio-OPT perustuu tyypillisesti fluoresenssiin [5]. Tällöin kohteessa viritetään fluoresoivat merkkimolekyylit säteilyttämällä niitä virittävällä aallonpituusalueella. Virityksen induoima fluoresenssi mitataan merkkiaineelle ominaisella vasteaallonpituusalueella. Biologisissa kohteissa esiintyy myös laajakaistaista autofluoresenssia, joka voi häiritä varsinaisen kohteen erottamista. Mittaukseen käytetään erilaisia suodattimia kohteesta ja kontrastiaineista riippuen siten, että ei-toivotut vasteet saadaan minimoitua ja varsinaisen signaali vahvistettua. Emissio-OPT:n mittauskanavan määrittelevät fluoresenssin virittävä aallonpituuskaista sekä emissiosuodattimen tyyppi ja suodatusalue.

Käytettävä tekniikka määrää ne mahdolliset mitta- ja laskumenetelmät, joilla OPT-kuvainformaatio voidaan tuottaa, mikä rajoittaa menetelmän käytännön nopeutta, resoluutiota ja suuruusluokkaa [5]. Tarkkuutta voidaan parantaa mittauskulmia lisäämällä, mutta se lisää vastaavasti kuvaukseen ja laskentaan käytettävää aikaa. Mitattava säteily vaimenee suurissa ja heikosti läpikuultavissa kohteissa, mikä heikentää saatavan syvyyskuvan laatua. OPT:ssa kohde voi olla halkaisijaltaan luokkaa 1-10 mm, jolloin kohteen suuruusluokka sijoittuu magneettikuvauksen (MRI) ja konfokaalisen mikroskopian (CM) väliselle alueelle.

Kuvausmenetelmän mittakaava vastaa selkärankaisten alkioita ja niiden kehittyviä elimiä, joten OPT sopii erityisesti alkio kuvaukseen [5]. Optisena menetelmänä se sopii myös perinteisillä tavoilla värjättyjen tai fluoresoivien näytteiden tutkimukseen toisin kuin esimerkiksi magneettikuvaukseen. Kuvauksessa kohdetta ei tyypillisesti tarvitse vahingoittaa, joten OPT kelpaa myös elävien kohteiden tutkimiseen.

OPT-kuvauksessa laskettu kolmiulotteinen kuva tallennetaan digitaalisiksi tiedostoiksi, tyypillisesti sarjaksi kaksiulotteisia poikkileikkauskuvia kuten useimmissa muissakin tomografiamenetelmissä [5]. Lääketieteellisten tietokonekuvien formaatti ei ole kuitenkaan standardoitu, ja kuvauslaitteiden valmistajat voivat käyttää erilaisia tiedostomuotoja [6].

4. 3D-TULOSTUSTEKNIIKAT

3D-tulostuksella (AM) tarkoitetaan sellaisia valmistusmenetelmiä, joilla valmistusalueelle lisätään materiaalia automatisoidusti kerros kerrokselta kolmiulotteisen digitaalisen mallin mukaisesti [7].

Nykyisin käytössä on useita erilaisia AM-menetelmiä, jotka American Society for Testing and Materials (ASTM) F42 -standardikomitea on ryhmitellyt seitsemään luokkaan [8]. Menetelmien periaatteet luetellaan taulukossa 1. Eri tulostustavoilla on omat etunsa ja rajoitteensa. Seuraavassa esitellään menetelmistä yleisesti käytetyimmät.

Taulukko 1. Tulostusmenetelmien luokittelu ASTM F42 -standardikomitean mukaan

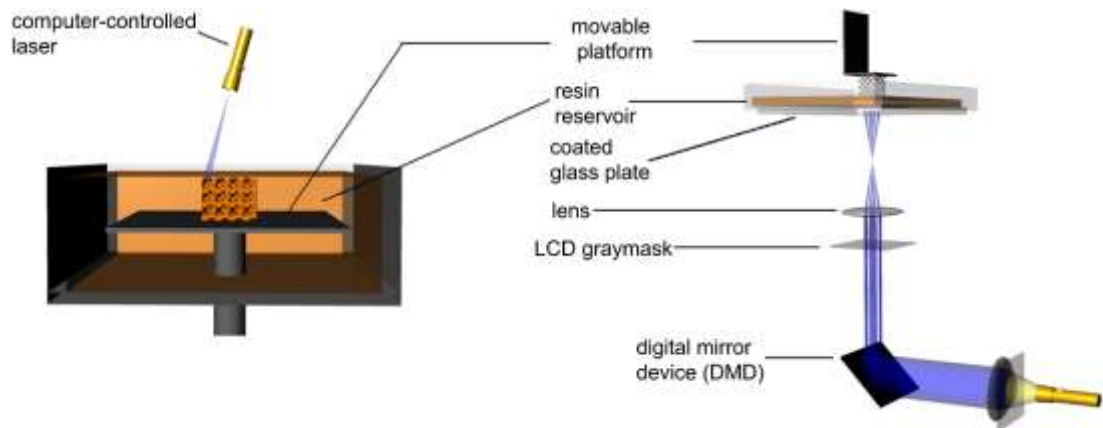
Periaate	Kuvaus ³
Fotopolymerisaatio	Sähkömagneettisella säteilyllä polymerisoituva nestemäinen materiaalikerros kovetetaan valikoidusti liikkuvalla säteellä tai dynaamisesti varjostettavalla projektorilla
Materiaalin suihkutetus	Kovettuva materiaali suihkutetaan pisaroina tulostettavan kappaleen kerrokseksi alustan suhteen liikkuvasta tulostuspäästä
Sideaineen suihkutetus	Jauhemaisen materiaalin pinta kiinnitetään valikoivasti tulostettavan kappaleen kerrokseksi alustan suhteen liikkuvasta tulostuspäästä suihkutetulla sideaineella
Materiaalin pursotus	Kovettuva materiaali puristetaan nauhana tulostettavan kappaleen kerrokseksi tulostusalueen suhteen liikkuvasta tulostuspäästä
Materiaalirakeiden sulatus	Rakeisen tai jauhemaisen materiaalin pinta kiinnitetään tulostettavan kappaleen kerrokseksi sulattamalla tai sintraamalla valikoivasti tulostusalueen suhteen liikkuvalla korkeaanenergialla säteellä
Laminointi	Muotoon leikatut materiaalikerrokset pinotaan ja liimataan toisiinsa tulostettavaksi kappaleeksi
Suoratulostus	Kirjoituspään kohteeseen fokusoituun lasersäteeseen syötetään sulatettava materiaali, joka jähmettyy saman tien kun kirjoituspää siirtyy kerroksen seuraavaan kohtaan

4.1. Stereolitografia

Ensimmäinen AM-menetelmä oli Yhdysvalloissa 1986 patentoitu stereolitografia (SLA) [9]. Se perustuu rakennusmateriaalina käytettävän nestemäisen hartsin pinnan valikoivaan kovettamiseen fotopolymeroimalla osaksi tulostettavaa kappaletta kerros kerrokselta. Yhden kerroksen säteilytys voi tapahtua tietokoneohjatusi lasersäteellä piirtäen tai selektiivisenä kertavalotuksena koko pinnan alueella. Kerrokset voidaan rakentaa perinteiseen tapaan yläkautta aloittaen kappaleen alimmasta kerroksesta, tai

³ Tulostuspään liikkuvuus alustan suhteen tarkoittaa että vähintään jompikumpi liikkuu tulostuksessa.

valotus voi tapahtua alakautta hartsiastian läpinäkyvän pohjan läpi, jolloin kerrokset tulostetaan ylhäältä alas. Molempien menetelmien periaatteet esitellään kuvassa 2. Valotuksen jälkeen kappaletta siirretään niin, että sen ja valolähteen väliin saadaan uusi polymeroitumaton hartsikerros. Näitä vaiheita toistetaan kunnes kaikki kerrokset on tulostettu. Lopuksi tuloste viimeistellään. Kappaleesta puhdistetaan ylimääräinen kovettumaton hartsi, mikä jälkeen kovettuneessa hartsissa käynnistynyt polymeroitumisprosessi viimeistellään ultraviolettivalolla.



Kuva 2. Laserstereolitografian toimintaperiaate.⁴

Tulostuksessa materiaalina käytettävä hartsi sisältää useita komponentteja [9]. Tyypillisesti se koostuu (i) polymeroituvista yhdisteistä (mono- tai oligomeerista, mahdollisesti useampien seoksesta), (ii) valoherkstä katalysaattorista joka laukaisee polymerisaation, (iii) väliaineesta joka rajoittaa polymerisaation paikalliseksi ja (iv) muista aineista joilla vaikutetaan hartsin ominaisuuksiin kuten viskositeettiin ja biohajoavuuteen.

Prosessilämpötilassa nestemäisen hartsin kovettuminen perustuu sen polymeroituvien molekyylien sitoutumiseen toisiinsa, jolloin ne eivät pääse enää liukumaan vapaasti toistensa ohi ja materiaali muuttuu lopulta nesteestä kiinteäksi [9]. Polymeroitumista voi tapahtua useiden eri reaktioiden kautta, ja hartsi voi sisältää useita eri tavoin polymeroituvia ainesosia. Hartsin polymeroituvilla komponenteilla ja niiden suhteilla voidaan vaikuttaa valmiin tulosteen ominaisuuksiin.

Polymeroitumissyvyyttä ja -herkkyttä kontrolloidaan säteilytyksen voimakkuudella ja kestolla sekä hartsin koostumuksella [9]. Varsinaisen materiaalin eli polymeroituvien molekyylien lisäksi hartsissa käytetään energiakynnyksen ylittävään säteilyyn reagoivia fotoinitiaattoreita, jotka indusoivat polymeroitumista ja siten nostavat hartsin valotuserkkyttä. Tällöin voidaan käyttää pienempää säteilyannosta, mikä madaltaa polymeroitumissyvyyttä. Vastaava vaikutus on hartsin sammutuskerrointa kasvattavilla aineilla kuten väriaineilla, jotka vaimentavat suoraan hartsissa kulkevan säteilyn energiaa.

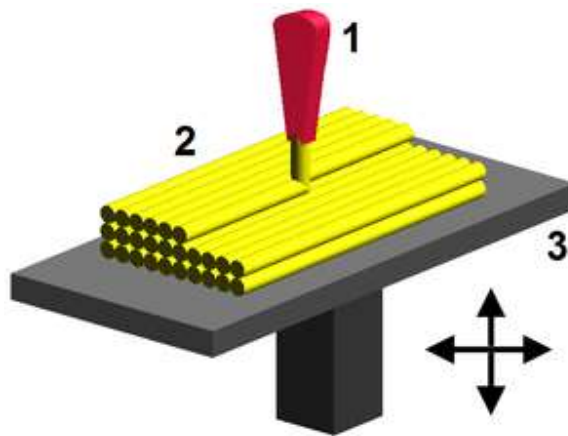
⁴ Kuva: Julkaisusta Biomaterials 31(24), Ferry P.W. Melchels, Jan Feijen, Dirk W. Grijpma, [A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering](#), © 2010, 6121–6130, Elsevierin luvalla.

Stereolitografiaa pidetään tarkkuudeltaan ja resoluutioltaan ylivertaisena muihin tulostustapoihin nähden [9]. Tekniikasta johtuen prosessissa on kuitenkin hyvin vaikea käyttää useampaa kuin yhtä materiaalia kerrallaan, mikä on merkittävä rajoite. Fotopolymeroituvien materiaalien valikoima on myös pieni verrattuna muihin AM-menetelmiin. Materiaalit kehittyvät kuitenkin koko ajan, ja markkinoilla on jo SLA-tulostimia joissa materiaali voidaan valita jopa kymmenestä eri vaihtoehdosta, kumimaisesta keraamiseen⁵.

4.2. Pursotus

Pursotustekniikka on yksi laajimmin käytetyistä AM-menetelmistä [10]. Se patentoitiin jo 1988 nimellä fused deposition modeling (FDM), joka on lyhenteineen Stratasysin rekisteröimä tavaramerkki. Sama menetelmä tunnetaan myös valmistajariippumattomalla nimityksellä fused filament fabrication (FFF).

Pursotuksen periaate on yksinkertainen. [10]. Kuvassa 3 esitellään tulostimen peruselementit. Kehikon tasossa liikkuva tulostinkärki (1) sekä pystysuunnassa liikkuva tulostusalusta (3) säätelevät kohtaa johon materiaali tulostetaan. Tulostus tapahtuu kerroksittain alkaen alimmasta kerroksesta. Tulostin syöttää muovijohtoa (2), jonka pää nesteytetään kuumentamalla ja materiaali puristetaan tulostuskärjen kautta alustalle vaadittuun kohtaan. Jäähtyvä materiaali kovettuu ja kiinnittyy edeltävään tasoon. Näin tulostetaan koko kerros, jonka valmistuttua alustaa lasketaan ja seuraava kerros tulostetaan edellisen päälle. Vaiheet toistetaan kunnes kappale on valmis.



Kuva 3. FDM-tulostimen toimintaperiaate.⁶

Tulostusmateriaalina käytetään yleensä amorfisia polymeroituja lämpömuoveja, joilla ei ole tarkkaa sulamispistettä vaan niiden viskositeetti pienenee vähitellen lämpötilan kasvaessa [10]. Korkea sulatuslämpötila tekee materiaalin juoksevammaksi ja vähentää pursotuspaineen tarvetta. Samalla se edistää tulostuskerrosten kiinnittymistä toisiinsa, mikä lujittaa tulostetta. Toisaalta liian korkea lämpötila voi pilkkoa muovin polymeerimolekyylejä ja siten heikentää

⁵ Esimerkiksi ks. <http://dwslab.com/xfab/>

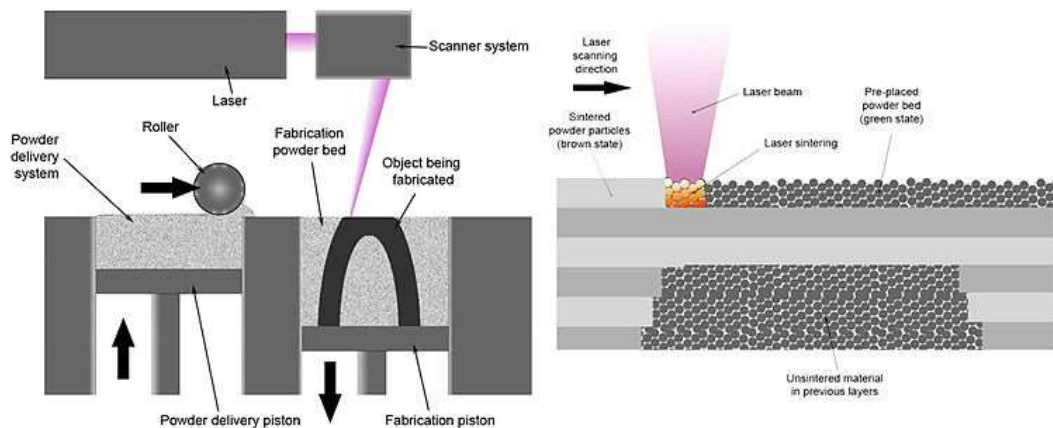
⁶ Kuva: © [käyttäjä:Zureks](#) / Wikimedia Commons / [CC-BY-SA-4.0](#) / [GFDL](#).

materiaalin lujuutta. Suuret lämpötilaerot kerrosten välillä voivat myös aiheuttaa jännitteitä ja vääristymiä valmiissa tulosteissa. Tätä voidaan yrittää hallita ylläpitämällä tulostustilassa riittävää lämpötilaa, jotta suhteelliset lämpötilaerot pysyvät siedettävänä.

Materiaalin syötön, sulamisen ja jäähmettymisen dynamiikan mahdollisimman tarkka mallinnus on FDM-tulostimen suunnittelun kannalta keskeistä [10]. Mallissa on huomioitava materiaalin viskositeettiin ja pintajännitykseen vaikuttavat tekijät kuten nesteyttimen ja kärjen muoto, kerrallaan sulatettavan tulosteen lämpötila ja määrä, tulostuspään liikenopeus sekä materiaalin syöttönopeuden hallinta. Nämä tekijät määräävät tulostusnopeuden ja kerrosresoluution rajat ja kuinka hyvin tuloste sitoutuu viereisiin materiaalikerroksiin. Dynaamisten tekijöiden vuoksi mallinnus on vaikeaa ja käytännössä siinä joudutaan tekemään yksinkertaistuksia.

4.3. Lasersintraus

Lasersintraus, selective laser sintering (SLS), on kolmas yleinen tulostusmenetelmä, joka patentoitiin 1989 [11]. Kuvassa 4 esitellään sen toimintaperiaatteet. Tulostus tapahtuu kerroksittain ja sitä ohjaa digitaalinen malli kuten muissakin menetelmissä. Tässä tapauksessa tulostettava kerros rakennetaan sintraamalla tai sulattamalla rae- tai jauhemaisen materiaalin hiukkasia valikoidusti yhteen. Kuumennus tapahtuu voimakkaalla fokusoidulla lasersäteellä. Kun kerros on valmis, tulostusalustaa lasketaan ja edellisen kerroksen päälle tuodaan uusi materiaalikerros. Samat vaiheet toistetaan kaikille kerroksille. Menetelmän etuja ovat muun muassa suuri materiaalivaihtoehtojen määrä ja se, että valmistettavia tukirakenteita ei tarvita, koska käyttämätön materiaali tukee keskeneräistä tulostetta joka puolelta.



Kuva 4. Lasersintraustulostimen toimintaperiaate.⁷

Korkea lämpötila rajoittaa solumateriaalien käyttöä, joten menetelmää on käytetty bio- tai lääketieteellisissä tarkoituksissa lähinnä mallinnukseen [11]. SLS:n avulla on esimerkiksi tulostettu polymeerimalleja lääketieteellisesti skannatuista kuvista helpottamaan diagnosoinnin ja operaatioiden suunnittelua. Käyttömahdollisuuden

⁷ Kuva: © [käyttäjä:Materialgeezu](#) / Wikimedia Commons / [CC-BY-SA-3.0](#) / [GFDL](#).

ovat kuitenkin tätä laajemmat. Erilaisten istutteen, steriilien tarvikkeiden, biohajoavien lääkeannostelijoiden ja kovien kudosaiteiden tulostusta on myös tutkittu, ja uusia bioyhteensopivia materiaaleja kehitetään.

5. 3D-TULOSTUKSEN TIEDOSTOFORMAATIT

Standard Tessellation Language⁸ (STL) on 3D-tulostettavien mallien yleisin tiedostoformaatti ja tosiasiallinen standardi [8]. Se kehitettiin alun perin stereolitografiaa varten, mutta formaatti on vakiintunut yleiseen käyttöön kaikissa tulostusmenetelmissä. Useimmat 3D-mallinnusohjelmistot pystyvät lukemaan ja tuottamaan jotain sen muotoa. STL-tiedosto kuvaa tulostettavan kappaleen ulkopintoja mallintavan kolmioverkon, jonka tulostusohjelmisto pystyy viipaloimaan volyymikerroksiksi ja muuntamaan edelleen operaatioiksi tulostinta varten.

Tekstimuotoinen STL-tiedosto luettelee orientoidut tasokolmiot kolmiulotteisessa suorakulmaisessa positiivisessa rationaalilukuavaruudessa oikean käden säännön mukaan järjestettyinä kolmen vektorin ryhminä [12]. Formaattiin kuuluu myös kunkin kolmion pinnasta ulospäin osoittava pintanormaalivektori, mutta ohjelmistot eivät yleensä vaadi sitä, koska normaali voidaan laskea kolmion järjestetyistä kärkivektoreista.

Formaatista on olemassa tekstiversio lisäksi myös binääri-versio [12]. Siinä vektoreiden koordinaatit esitetään 32-bittisinä liukulukuina, joten tiedosto vie vähemmän tallennustilaa. Binääri-formaattiin kuuluu myös 80-tavuinen otsikko ja 16-bittinen lisäkenttä. Niitä käytetään toisinaan formaatin ohjelmistokohtaisiin laajennuksiin, mutta useimmiten arvot jätetään huomiotta.

Muodollisen tiedostoformaatin lisäksi digitaalisen mallin tulee täyttää reaalisuusehdot. Kolmioiden tulee muodostaa yhtenäisiä (suljettuja, aukottomia) pintoja, kunkin särmän tulee kuulua täsmälleen kahteen kolmioon, eivätkä kolmiot saa leikata toisiaan. Monet tulostus- ja mallinnusohjelmat pystyvät analysoimaan ongelmat mallin tulostettavuudessa ja avustamaan käyttäjää mallin eheyttämisessä elleivät voi korjata niitä automaattisesti.

STL-formaatti on nykyisten tulostustekniikoiden tarpeiden näkökulmasta rajoittunut, koska se ei yksinään tallenna kaikkea valmiin mallin tulostukseen vaadittavaa tietoa [8]. STL kuvaa pelkästään mallin kolmioverkoksi approksimoidun pinnan geometrian eikä siis esimerkiksi värejä tai edes mittakaavaa. Tyypillisesti mittayksikköjä käyttävät ohjelmistot olettavat vektoriarvojen edustavan jotain omassa kontekstissaan tavallista mittayksikköä, joka voi olla sentti- tai millimetri tai jokin tuumapohjainen yksikkö. Lisäksi STL:n ohjelmistokohtaisissa laajennuksissa käytetään erilaisia standardista poikkeavia implementaatioita esimerkiksi väri-informaation tallennuksessa. Tästä syystä kaikki STL-mallit eivät ole yhteensopivia eri ohjelmistojen kesken.

Standardien puutteellisuutta pidetään yleisesti keskeisenä tekijänä joka hidastaa 3D-tulostuksen yleistymistä [8]. STL-formaatti on tästä esimerkki, ja sen puutteet ovat korostuneet sitä mukaa kun varsinainen valmistustekniikka on kehittynyt. ASTM on suunnitellut STL:stä uuden version, jonka standardoitiin ensimmäisen kerran 2011 ja yhdessä kansainvälisen standardoimisjärjestön (ISO) kanssa 2013 [8, 13]. Uusi formaatti palvelee paremmin kehittyvän 3D-tulostuksen tarpeita. Formaatin nimi oli alkuvaiheessa STL 2.0, mutta se tunnetaan nykyisin paremmin ja virallisesti nimellä Additive Manufacturing File Format (AMF).

AMF-tiedosto on XML-muotoinen ja tyypillisesti zip-pakattu [13]. AMF perustuu yksinkertaisimmillaan samanlaiseen geometriaan kuin STL, joten jokainen STL-

⁸ Alkujaan STL-loppuliite muotoiltiin lyhenteenä termistä ”STereoLitography”.

tiedosto on muunnettavissa AMF-formaattiin ilman että informaatiota menetetään⁹. AMF antaa kuitenkin mahdollisuuksia kuvata tulostusmalli tarpeen vaatiessa tarkemmin ja monipuolisemmin [8]. STL:n mukaisen pintageometrian lisäksi AMF-tiedostossa voidaan valinnaisesti määritellä kolmioverkon kolmioiden väri, kaarevuus ja tekstuuri, sekä volyymin materiaalit, pintamallin monistetut instanssit ja mallin elementtikohtaiset vapaat lisätietotekstit. Mallin lukuarvoattributteja voidaan määritellä vakioarvojen lisäksi myös funktiokaavoina.

AMF ei ole tätä kirjoitettaessa vielä kovinkaan käytetty tiedostomuoto, mutta se on kuitenkin hitaasti yleistymässä. Monet merkittävät CAD-ohjelmistojen tuottajat kuten SolidWorks, Autodesk, Cimatron ja Stratasys ovat ryhtyneet tukemaan uutta formaattia jossain muodossa. Lisäksi tulostuspalveluista ainakin Sculpteo, Shapeways ja Materialise ottavat vastaan AMF-formaatissa tallennettuja malleja. Toisaalta monet niistäkin ohjelmistoista, jotka tukevat AMF-tiedostoja, implementoivat vain formaattistandardin välttämättömät minimipiirteet, jolloin AMF-tiedosto vastaa käytännössä STL-tiedostoa.

⁹ AMF-yhteensopivuus on tietenkin taattu vain STL-formaatin perustandardille, toisin sanoen se ei koske STL:n standardista poikkeavia ohjelmistokohtaisia laajennuksia.

6. BIOTIETEELLINEN 3D-VALMISTUS

Biotieteissä tulostustekniikat voivat olla pitkälle samoja kuin tavanomaisessakin lisäävässä valmistuksessa, mutta bioyhteensopivuus vaatii 3D-tulosteelta erityisiä ominaisuuksia [14, 15]. Varsinkin visuaalisessa mallinnuksessa ja simuloinnissa riittää että huomioidaan vain mallinnuksen ulkoiset tarpeet, mutta varsinaisessa biotulostuksessa joudutaan koko prosessin ajan välttämään biohaitallisia olosuhteita, kuten korkeat lämpötilat, sopimattomat valmistus- ja prosessimateriaalit sekä sähkömagneettinen ja fysikaalinen stressi. Lisäksi mallin, laitteiston ja materiaalin suunnittelussa joudutaan huomioimaan solutason mittakaava sekä tulosteen biologisesti ja mekaanisesti dynaaminen luonne. Käytettyjen materiaalien biotoksisuus ja tulostusominaisuudet voivat muuttua tulostusprosessin aikana, ja toisekseen elävän solumateriaalin kehityskaari luonnollisesti jatkuu tulosteessa.

6.1. 3D-Biotulostuksen tasot

Bio- tai lääketieteellinen AM on jaettavissa eri tasoihin sen mukaan, miten pitkälle menevää bioyhteensopivuutta tulosteelta vaaditaan [16]. Vähiten vaativalla tasolla ovat lääketieteelliset mallit ja tarvikkeet, joiden materiaalien ei tarvitse välttämättä olla lainkaan bioyhteensopivia. Seuraavalla tasolla ovat elimistöön istutettavat stabiilit tulosteet, jotka eivät aiheuta haitallisia reaktioita mutta eivät myöskään hajoa elimistössä biologisesti. Kolmannella tasolla ovat biohajoavat aihiot ja muut sellaiset istutteen, joiden tulee hajota biologisesti ja poistua elimistöstä aineenvaihdunnan mukana sitten, kun ne ovat palvelleet tarkoituksensa. Biologisesti vaativimman tason tulosteissa käytetään eläviä soluja ja muita vastaavia biologisia materiaaleja, ja ne voivat integroitua istutteina pysyväksi osaksi elimistöä.

6.2. Yleisen 3D-valmistusprosessin vaiheet

3D-tulosteen valmistusprosessissa on erotettavissa jopa toista kymmentä mahdollista välivaihetta, kun huomioidaan myös biotulostuksen työnkulku [7, 14, 17, 18]. Viitatut tutkijat jakavat ja painottavat vaiheita hiukan eri tavoin, mutta seuraavassa hierarkkisessa luettelossa esitetään niistä tärkeimpiä mukaileva yhteenveto. Kaikissa menetelmissä ja yksittäisissä valmistusoperaatioissa ei käytännössä välttämättä tarvita jokaista tässä mainittua vaihetta.

- 1) Digitaalisen lähdedatan hankkiminen (mallinnettavaa kohdetta esittävä tietokonekuva, esim. OPT)
 - a) Käsitteellinen suunnittelu
 - b) 3D-datan luominen/valinta ja tuonti järjestelmään
- 2) Tulostettavan rakenteen segmentointi kuvadatasta (ellei jo valmis 3D-malli tai volyyymi)
 - a) Esikäsitteily (esim. suodatus)
 - b) Segmentointi (esim. kynnystys)
- 3) Volyymidatan mallinnus tesseloituksi kolmioverkoksi ja mallin optimointi tulostusta varten (esim. STL-tiedosto tai vastaava tulostusmalli)
 - a) Tesselointi (esim. marching cubes)
 - b) Geometrian muokkaus tulostusta varten

- i) Mallin tarkoituksenmukaistaminen tulostettavuutta ajatellen (tarpeellisten piirteiden vahvistus ja tarpeettomien eliminointi)
 - ii) Tukirakenteet, materiaalin poistoaukot jne.
- 4) Materiaalien ja tulostusparametrien valinta
 - a) Alusta- ja tukimateriaalit (esim. synteettiset tai luonnonpolymeerit)
 - b) Tulostusmateriaalit (esim. solutyypit)
 - c) Resoluutio, orientaatio, mittakaava jne.
- 5) Tulostusmallin analysointi tulostusoperaatioiksi ja valmistus (tuloste)
 - a) Tulostettavan mallin analysointi tulostusoperaatioiksi
 - b) Tulostus; useita eri metodeja
- 6) Tulosteen viimeistely käyttövalmiiksi (esim. pintakäsittely tai kehitys bioreaktorissa)
 - a) Pinnan tasoitus, tukirakenteiden poisto tai muu staattisen piirteiden viimeistely
 - b) Polymerisaation tai muun keskeneräisen prosessin loppuun saattaminen
- 7) Valmiin tulosteen testaus ja varsinainen käyttö (esim. siirteenä tai tutkimuksessa)
 - a) Testaus
 - b) Käyttö

Ensimmäiseksi tarvitaan yleensä digitaalinen lähdekuva [7, 14, 17, 18]. Tästä poiketaan silloin kun malli luodaan tietokoneella alusta lähtien, esimerkiksi kun malli suunnitellaan CAD-ohjelmistolla tai sen pinta lasketaan matemaattisista funktioista [9]. Lähdekuvana voidaan käyttää mitä hyvänsä kolmiulotteisesta digitaalista kuvamateriaalia kuten tietokonetomografiakuvia [19].

Kuvausmenetelmä asettaa perusraajat sille kuinka paljon tietoa kohteesta voidaan periaatteessa saada [20]. Laitteistosta tai mittausolosuhteista johtuva kohina, alhainen resoluutio, matala kuvanopeus ja epäterävyys vaikeuttavat kerroskuvasarjan analysointia. Lisähaasteita aiheuttavat kuvattavasta kohteesta johtuvat tekijät, kuten kohteen deformaatio tai pieni koko, mittausvasteen epävakaisuus, kohteen moniosaisuus tai osakohteiden lomittaisuus sekä epäselvät rajat ja tekstuurit.

Vokseliperustainen kuvadata on segmentoitava mallinnusta varten eli siitä on rajattava mallinnettava volyyymi [17]. Segmentoinnin lopputulokseen tarkkuuteen vaikuttavat alkuperäisen edellä mainittujen perustekijöiden lisäksi artefaktien ja kudoksen erotettavuus sekä tulkinnalliset tekijät manuaalisissa työvaiheissa [19, 21]. Erityisesti biologisen kohteen automaattinen segmentointi on vaikeaa, koska segmentoitavan alueen rajat ovat tyypillisesti epämääräiset [21]. Yleisessä tapauksessa 3D-kuvadatan automaattinen segmentointi on vaikea toteuttaa luotettavasti, joten se kannattaa usein tehdä ainakin osittain manuaalisesti [6]. Ihannetapauksessa mallinnettava kohde saadaan täydellisesti esille valikoimalla kuva-arvoista ne jotka ovat halutun kynnyksarvon toisella puolella, mutta käytännössä tulosta joudutaan korjaamaan [22]. Kynnystysmenetelmä on erityisen herkkä kohinalle, joten kohinan heikentämä kuva on esikäsiteltävä sen vähentämiseksi ennen kynnystystä [21].

Seuraavaksi volyymin muoto tesseloidaan eli kuvataan kolmioverkkopinnaksi 3D-tulostusta varten [7, 17]. On olemassa valmistustekniikoita, joissa tätä vaihetta ei suoriteta, vaan segmentoidut volyymit lähetetään sellaisenaan tulostinjärjestelmän analysoitaviksi [17]. Tällöin tulostettava malli on periaatteessa täsmällisempi kuin tesseloimalla rakennettu approksimaatio. Samalla jää pois kuitenkin myös tesseloituneen mallin muokkaustyövaihe.

Tyypillinen tesselointiin käytetty algoritmi on nimeltään marching cubes [23]. Menetelmässä matriisin jokainen kuutiomainen kahdeksan naapurivokselin keskipisteiden rajaama tila käydään (marssitaan) läpi yksi kerrallaan. Kuutiota rajaavien pisteiden vokseliarvojen sisä- ja ulkopuolisuuden yhdistelmän (8-bittisen lukuarvon) perusteella valitaan juuri se kuution särmien väliin viritettävä kolmio geometria, joka kuvaa parhaiten mallin pintaa kyseisen kuution sisällä. Lopuksi valitun kolmio geometrian muoto säädetään intrapoloimalla kunkin kolmioverteksin paikka kuutiosärmällä särmän naapurivokselien arvoista.

Tesseloinnin tuottamaa pintamallia voidaan vielä muokata ennen sen lopullista tallennusta tulostimen ymmärtämään 3D-formaattiin, joka on tyypillisesti STL [7, 14, 18]. Lähdekuvaa tai mallia voidaan joutua muokkaamaan muissakin tulostuksen vaiheissa, esimerkiksi edeltävän vaiheen tuottamien virheiden korjaamiseksi tai seuraavan vaiheen helpottamiseksi.

Sopivien materiaalien valinta ja hankkiminen kuuluvat biologisen 3D-tulostuksen keskeisimpiin haasteisiin [14]. Matriisi- tai biomustemateriaalien ominaisuuksien tulee olla bioyhteensopivia ja niiden tulee mukautua sekä käytettävän tulostustekniikan että rakennettavan kudoksen tarpeisiin. Erilaisten materiaalien määrä kasvaa jatkuvasti. Solutulosteita varten on pystyttävä hankkimaan tai eristämään riittävä määrä yhteensopivia kantasoluja, ja suurten tulosteiden tai tulostussarjojen tapauksessa solupopulaatiot joudutaan monistamaan viljelemällä [1]. Materiaalikysymys voi aiheuttaa työtä ei-biologisissakin tulostuskonteksteissa esimerkiksi silloin, kun materiaalien määrittely vaatii kokeita tai haluttuja materiaaleja joudutaan sovittamaan käytettävissä olevaan tulostusjärjestelmään.

Kaikki tulostusjärjestelmät eivät sijoita tukirakenteita ja muita tulostettavuuden vaatimia lisäpiirteitä automaattisesti, jolloin niiden luominen on oma työvaiheensa [7]. Tämä koskee tukirakenteiden ohella muun muassa orientaatiota, umpinaisten onteloiden tyhjennysaukkoja ja mallin skaalausta mahdollisen kutistumisen kompensoimiseksi.

Tulostusta varten mallitiedostosta luodaan laite- ja materiaalikohtainen tulostussuunnitelma [7]. Tulostinohjelmisto viipaloi tulostusmallin volyymin tulostusresoluution mukaisiksi kerroksiksi. Nämä puolestaan analysoidaan ja muunnetaan tulostinoperaatioiksi, jotka ohjaavat laitteistoa kun se rakentaa kerroksista varsinaisen tulosteen.

Seuraavana vaiheena voidaan pitää tulosteen viimeistelyä silloin, kun se on tarpeen eikä se sisälly loogisesti valmistusvaiheeseen [7, 14, 17]. Viimeistelyä tarvitaan tyypillisesti korkeimman tason biotulostuksessa, sekä yleisesti muissakin tapauksissa silloin, kun tulostetta halutaan vahvistaa jälkikäteen muilla materiaaleilla [17]. Biotulostuksessa soluista rakennetaan tyypillisesti aihioon tai matriisiin vain esikudos, josta varsinainen kudos kehittyy ohjelmoitujen soluprosessien avulla.

Tulosteen käyttöönotto voi olla triviaalia eikä sitä tarvitse aina lukea kuuluvaksi varsinaiseen tulostusprosessiin. Herkkien tai monimutkaisten tulosteiden asennus tai sovittaminen voi kuitenkin olla työtä vaativa operaatio, jonka vaatimukset on huomioitava edeltävissäkin vaiheissa. Tästä esimerkkinä käy biotulostamalla kehitetyn kudoksen siirto elimistöön.

6.3. 3D-Biotulostuksen menetelmiä

Tällä hetkellä biomateriaalien yleisimpiä AM-menetelmiä ovat edellä esiteltyjen (FDM, SLS, SLA) lisäksi 3D-sidostetulostus (3DP) ja solujen suoratulostus

mikroekstruusiona [19]. 3DP on periaatteeltaan muuten vastaava kuin SLS, mutta siinä hiukkaset liimataan toisiinsa sidosainesuihkulla sen sijaan, että ne sintrattaisiin yhteen lasersäteellä. Mikroekstruusiota lukuun ottamatta näitä tekniikoita on käytetty pääasiassa proteesien, muottien, kovien kudosaihoiden, kirurgisten tarvikkeitten ja lääketieteellisten mallien valmistuksessa.

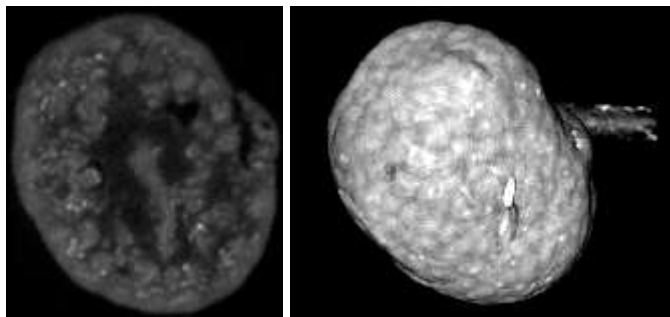
Varsinaisessa solutuloksessa keskeisimmät tekniikat ovat mustesuihkutulostus, edellä mainittu mikroekstruusio sekä laseravusteinen biotulostus (LAB) [14]. Mustesuihkutulostuksessa solut sisältävä biomuste pisaroidaan ja suihkutetaan kohteeseen. Mikroekstruusiossa matriisiin sekoitettu solumateriaali pursotetaan nauhana suoraan paikalleen. LAB perustuu laserindusoituun eteenpäin siirtoon (LIFT), ja siinä solut pudotetaan kohteeseen tulostusta varten valmistellulta tulostusnauhalla lasersäteen avulla. Myös SLA on solutulostuksessa jonkin verran käytetty tekniikka, mutta se ei kuitenkaan ole suosiossa edellä mainittujen materiaalirajoitteidensa takia [15]. Lisäksi tekniikassa käytettyjen sytotoksisten materiaalien mahdolliset jäämät voivat olla haitaksi biotulosteessa [19].

Biotulostamalla on pystytty jo generoimaan elävää kudoksia kuten luuta, rustoa, ihoa ja jopa vaskularisoitua pehmytkudosta [24]. Näistä ainakin rusto- ja ihokudosta on jo siirretty menestyksekkäästi ihmisiin, ja merkittävän kehityksen odotetaan jatkuvan.

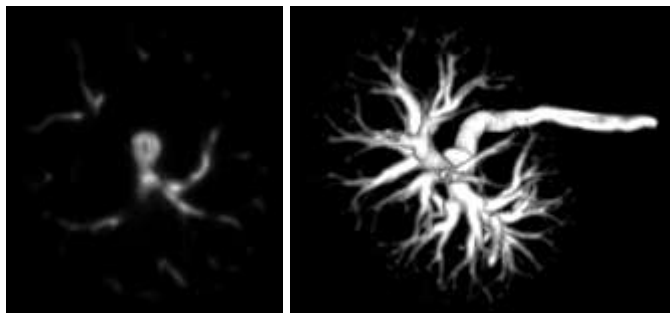
7. TOTEUTUS

7.1. Lähdekuvat ja suunnitelma

Tulostusmallien pohjaksi Oulun yliopiston Biocenteriltä saatiin kaksi optisella projektiotomografilla Bioptonics 3001 [25] eri suodatusparametrein kuvattua kerroskuvasarjaa samasta hiiren 15,5-päiväisen alkion munuaisesta. Kuvassa 5 esitellään ensimmäinen sarja (C1), joka kuvasi koko munuaisen autofluoresenssin. Fluoresenssin viritykseen oli käytetty vihreän fluoroivan proteiinin (GFP) kanavaa (405-445 nm, huippu 425 nm, emissiosuodattimen pitkäpäästökyynnys 475 nm). Kuva 6 esittelee toisen sarjan (C2), joka kuvasi munuaisen kokoojaputkiston pintasolukon immunohistologisesti Texas Red (TXR) -värikorostetun tukiproteiinin. Mittaus oli suoritettu laitteiston vastaavalla TXR-kanavalla (540-580 nm, huippu 560nm, emissiomittaus 610 nm pitkäpäästökyynnöksellä). Kaikki leikkauskuvat olivat 8-bittisiä harmaasävykuvia BMP-formaatissa kooltaan 512x512 pikseliä. Kuvapikselin koko oli 6.97 μm molemmissa dimensioissa, mikä oli samalla myös kuvien kerrosväli. Tutkittava kohde erottui taustasta selvästi molemmissa kerroskuvasarjoissa.



Kuva 5. OPT-datasarja Nrec C1 GFP1, koko munuaisen autofluoresenssi. Ote kerroksesta 87/195 (vasen kuva) ja koko datan tilavuusprojektiio, kuvakorkeus noin 1100 μm .



Kuva 6. OPT-datasarja Nrec C2 TXR1, munuaisen kokoojaputkiston värjätty sytokeratiini. Ote kerroksesta 96/195 (vasen kuva) ja koko datan tilavuusprojektiio, kuvakorkeus noin 1100 μm .

Tulostusvälineiksi oli tarjolla Aalto-yliopiston biotekniikan ja kemian tekniikan laitoksen sekä laitetekniikan osaston tulostimia. Alun perin tulosteet kaavailtiin

tehtäväksi biohajoavasta materiaalista ja mahdollisuuksien mukaan luonnollisessa koossa, mikä rajasi tulostusalueen noin kuutiomillimetriin. Tarkoitukseen oli käytettävissä yliopiston korkearesoluutioinen projektiomikrostereolitografi [26], jonka materiaalina voitaisiin käyttää kehitteillä olevaa biohajoavaan polykaprolaktoniin (PCL) perustuvaa hartsia. Tämä suunnitelma jouduttiin kuitenkin alustavien kokeilujen ja keskustelujen jälkeen hylkäämään, ja tomografiakuvista päätettiin suunnitella tulostettavat suurennokset.

Mallien rakenne rajoitti tulostimen ja materiaalin valintaa. Kokoojaputkiston mallin (C2) tulostettavuus edellytti runsaasti lisättyä tukimateriaalia, koska haarasto levittäytyi moneen suuntaan ja sisälsi tukemattomia ulokkeita kaikissa orientaatioissa. SLA-tulostuksessa tukimateriaalia ei voida käytännössä erottaa tulosteesta liuottamalla, koska SLA mahdollistaa vain yhden materiaalin käyttämisen kerrallaan. Samasta materiaalista tulostettujen tukirakenteiden mekaaninen poistaminen valmiista tulosteesta olisi vaikeaa ja mahdollinen riski koko tulosteen eheydelle ja muodonmukaisuudelle. Näillä ehdoilla tulostimen ja materiaalien valinta oli pakotettu, sillä liuotettavien tukirakenteiden käyttö oli mahdollista vain yhdellä tulostimella ja materiaaliparilla.

Koko munuaisen autofluoresenssin (C1) tulostemallinnuksen eräs hankaluus oli, ettei sen sisärakenne tulisi esille muuten kuin sopivasti valittuna poikkileikkauksena tai tulostaen läpinäkyvästä materiaalista. Mallista päätettiin tehdä kaksi versiota: Umpinainen pintaversio matalalla kynnyksarvolla, ja ontto versio läpinäkyvästä materiaalista kuvan sisärakennetta sopivasti korostavalla kynnyksarvolla. Läpinäkyvän tulosteen sisäpuoliset rakenteet jouduttaisiin jättämään paikalleen. Oletettiin kuitenkin ettei se merkittävästi heikentäisi tulosteen havainnollisuutta. Umpinaisen pintaversion tulostukseen valittiin sama tulostustapa kuin kokoojaputkiston (C2) tapauksessa. Jälkimmäiseen tarkoitukseen oli tarjolla vain yksi läpinäkyvää materiaalia käyttävä tulostin.

7.2. Mallinnus ja tulostus

Tulostusmallien rakentamiseen munuaisen kerroskuvista käytettiin kannettavaa tietokonetta Fujitsu Lifebook NH532¹⁰, jonka käyttöjärjestelmänä toimi 64-bittinen Windows 7 Enterprise sp1. Taulukossa 2 luetellut ohjelmistot asennettiin 64-bittisinä lukuun ottamatta Netfabbin ilmaisversiota, joka oli saatavilla vain 32-bittisenä.

Taulukko 2. Käytetyt ohjelmistot

Ohjelmisto	Julkaisija/lisenssi	Versio	Käyttötarkoitus
Fiji Is Just ImageJ	GPLv2 ¹¹	4.19m	Kerroskuvien suodatus ja ensimmäinen pintamallinnus
Maya	Autodesk/Student	2015 sp5	Pintamallien yleinen käsittely
Meshmixer	Autodesk/Freeware	10.7.84	Pintamallien alustava korjaus ja muokkaus
Netfabb	Netfabb/Freeware	Basic 5.2.1	Pintamallien eheytyt tulostusohjelmistolle

¹⁰ Intel® Core™ i5-3210M CPU @ 2.50GHz, 2501 Mhz, 2 ydintä, 4 loogista suoritinta, 16 GB RAM

¹¹ Fiji kattaa useita avoimen lähdekoodin projekteja eri lisensseillä, ks. <http://fiji.sc/Licensing>.

PreForm	Formlabs	1.8.1	Pintamallin tulostinkohtainen viimeistely
---------	----------	-------	---

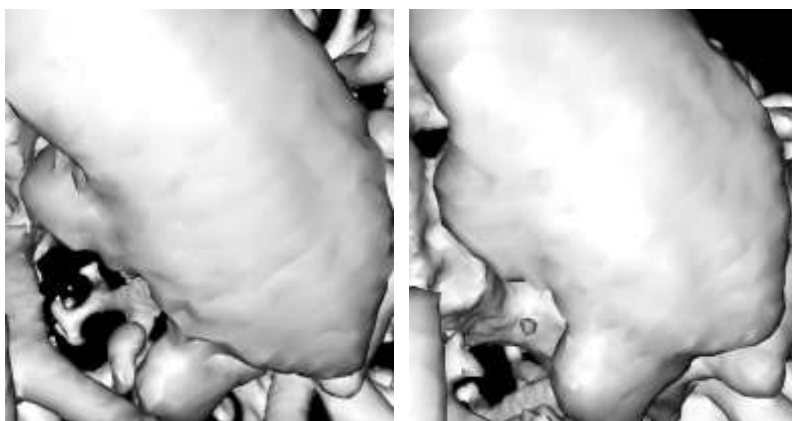
Ohjelmistoja valittaessa huomioitiin ennen kaikkea tarkoituksenmukaiset käyttöpiirteet, ilmaisuus, 64-bittisyys (muistinkäyttö), yleinen suosio sekä riittävä käytettävyys ja käyttötuki.

Kerroskuvasarjoista erotettiin alustava pintamalli käyttäen Fiji-ohjelmistoa [27]. Fiji on erityisesti biotieteelliseen kuvankäsittelyyn tarkoitettu yleisesti käytetty Java-pohjainen ImageJ-ohjelmistopaketti, jolla on mahdollista käsitellä ja visualisoida myös kolme- ja useampiulotteisia kerroskuvia.

3D-kuvan käsittely aloitettiin molemmissa tapauksissa avaamalla mallinnettavat tomografiakuvat Fijissä. Molemmat kuvasarjat tuotiin ohjelmistoon suoraan kuvatiedostoista. Toinen kuvasarja oli tallennettu Imaris-muodossa, joten se olisi ollut mahdollista avata myös Bio-Formats-liitännäisen kautta. Metadatan säilyttämiselle ei kuitenkaan ollut tarvetta eikä STL-formaatissa mahdollisuusiakaan, ja oli joka tapauksessa systemaattisempaa tuoda molemmat kuvasarjat samalla tavalla.¹²

- File > Import > Image Sequence
- Valitaan tiedostoluettelosta jokin sarjaan kuuluvista kerroskuvista
- File name contains: 1 Cer Wt E15 5_rec0¹³

Suodatuksen käyttö vaikeutti hieman haluttujen piirteiden erottamista artefakteista ja toisistaan. Tomografiakuvien laatu mahdollisti segmentoinnin ilman esisuodatustakin, joten siitä luovuttiin editointivaiheen tarkkuuden eduksi. Kuva 7 havainnollistaa kokeiltujen menetelmien eroavuuksia erään artefaktin osalta.

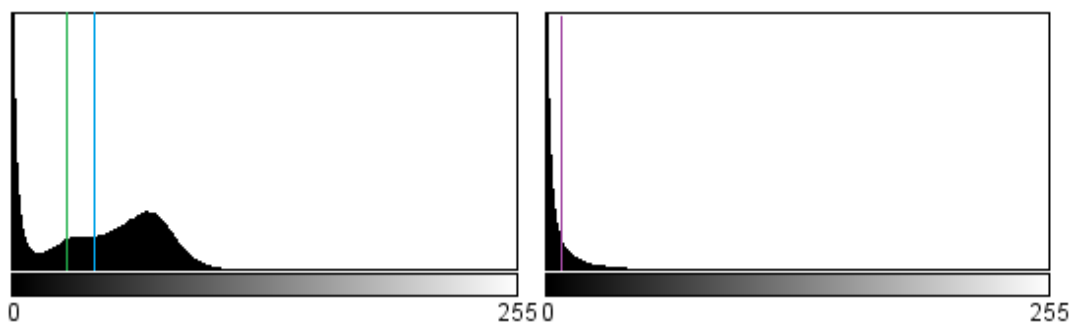


Kuva 7. Yksityiskohta artefaktista tomografiakuvan C2 pinnassa. Vasen pinta on segmentoitu suodattamattomasta datasta kynnsarvolla 7, oikea vastaavasti mediaanisuodatetusta datasta kynnsarvolla 4.

¹² Imaris-ohjelmiston tapauksessa metadata ei ole ainoa ero, koska liitännäisen kautta avattuna sama data segmentoitui hieman eri tavoin samoilla parametreilla.

¹³ Luettavien tiedostonimien yhteinen alkuosa, sama molemmille sarjoille C1 ja C2.

Seuraavaksi mallinnettavat alueet segmentoitiin OPT-kuvista kynnystämällä, ja niistä luotiin pintaverkot mallien muokkausta varten. OPT-datasta C1 tehtiin tulostusta varten kaksi mallia, munuaisen autofluoresenssin suljettu ulkopinta (C1-a) ja sen onttoa sisämuotoa korostava malli (C1-b). Datasta C2 tehtiin vastaavasti yksi kokoojaputkiston malli (C2-a). Sopiva kynnyksisarvo valittiin kullekin tulostettavalle pintamallille erikseen kokeilemalla. Apuna käytettiin tomografiakuvista Fijillä analysoituja histogrammeja, jotka on esitetty kuvassa 8. Lähtökohdaksi oletettiin, että selvät muutoskohdat histogrammien profiilissa saattaisivat edustaa sellaisia kynnyksisarvoja jotka erottavat fluoresenssiltaan toisistaan poikkeavia kuva-alueita.



Kuva 8. Tomografiakuvasarjojen C1 ja C2 histogrammit, joihin on korostettu pystyviivoin 3D-pintojen segmentointia varten valitut kynnyksisarvot. Arvot ovat vasemmalta oikealle 28 (C1-a, vihreä), 42 (C1-b, sininen) ja 7 (C2-a, violetti).

Kynnyksisarvoja kokeiltaessa segmentoinnin tulosta arvioitiin silmämääräisesti. Keskeiset ja osittain ristiriitaiset kriteerit olivat syntyvän volyymin havainnollisuus ja mallin tulostettavuus. Liian alhaisella kynnyksisarvolla tavoitellut piirteet katosivat yhdistymällä toisiinsa ja taustan artefakteihin, kun taas liian korkealla arvolla piirteet haurastuivat tai sirpaloituivat tulostuskelvottomiksi.

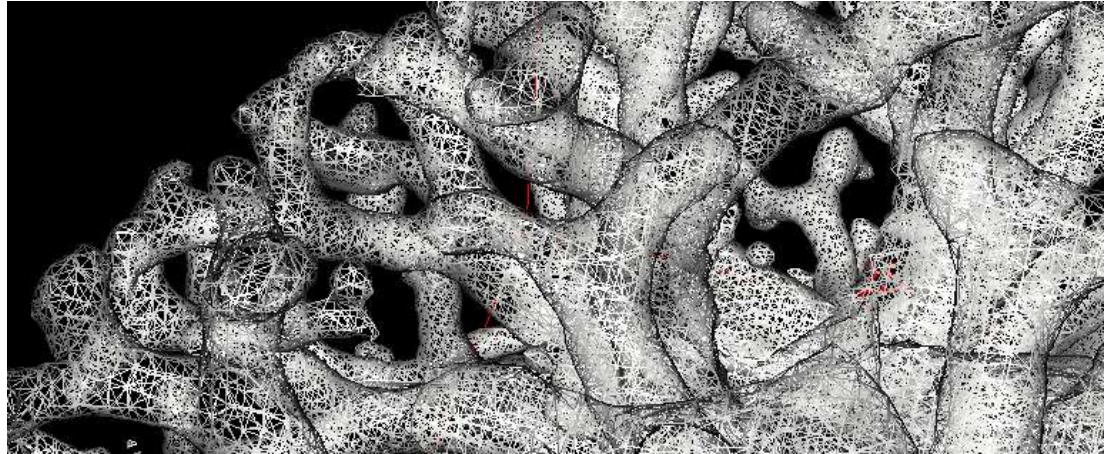
Pinnat segmentoitiin ja tesseloitiin Fijin 3D Viewer -liitännäisessä seuraavilla asetuksilla. Liitännäinen käyttää pinnan tesselointiin tavanomaista marching cubes -algoritmia.

- Plugins > 3D Viewer
 - Display as: Surface
 - Threshold: 28 (C1-a), 42 (C1-b), 7 (C2-a)
 - Resampling factor: 1 (täysi resoluutio)

Pintamallit tallennettiin alusta lähtien binääriseen STL-formaattiin, joka on suhteellisen kompakti ja jota kaikki käytetyt sovellukset pystyvät lukemaan ja kirjoittamaan.

- File > Export Surfaces > STL (Binary)

Käytetyillä algoritmeilla pintakolmioiden verteksit ovat pituudeltaan samaa suuruusluokkaa kuin lähdekuvan resoluutio. Kuva 9 havainnollistaa tallennetun kolmioverkon C2-a tiheyttä. Esimerkin mallissa on 373060 kolmiota, ja vastaavan STL-tiedoston koko on noin 20 MiB.



Kuva 9. Yksityiskohta OPT-kuvan C2 pohjalta luodusta pinnasta C2-a.

STL-tiedostojen kuvaamat pintakolmioverkot korjattiin alustavasti 3D-tulostettaviksi Meshmixerillä.

- Import
- Analysis > Inspector > Auto Repair All
- Export > Save As Type: STL Binary Format

Seuraavaksi näin saatujen STL-pintojen heikkouksia analysoitiin ja muokattiin hiukan Meshmixerissä ja Mayassa artefaktien ja muiden tulostusta heikentävien osien vähentämiseksi. Käytännössä tämä tarkoittaa että yksittäisiä pinnan geometrisia osia poistettiin, tasoitettiin, paksunnettiin tai erotettiin toisistaan. Kuva 10 esittelee tyypillisen esimerkin poistettavasta artefaktista.



Kuva 10. Kuvankaappaus artefaktista (rengastettu) kokoojaputkiston mallin (C2-a) esiversiossa.

Lopuksi SLA-tulostettava munuaismalli (C1-b) tuotiin PreFormiin, jossa se skaalattiin, orientoitiin, varustettiin tukikehikolla ja tallennettiin valmistajakohtaisessa formaatissa Formlabsin varsinaista tulostusohjelmistoa varten. Laboratorio rajoitti kertatulosteeseen käytettävän materiaalin maksimimääräksi 10 ml, joten malli jouduttiin tulostamaan pienempänä kuin muut ABS-tulostettavat mallit. Formlabsin SLA-tulostimella olisi ollut mahdollista tulostaa jopa 25 µm

kerrosresoluutiolla, mutta 100 µm arvioitiin tähän tarkoitukseen riittävän tarkaksi ja huomattavasti nopeammaksi tulostaa.

FDM-tulostettavan munuaismallin (C1-a) STL-pinta vaati hieman ylimääräistä työstämistä. Muokattu malli eheytetään aluksi Meshmixerin vika-analysointin avulla, mutta mitä ilmeisimmin se ei löytänyt pinnasta kaikkia ongelmia, koska malli kaatoi tulostusohjelman. Malli viimeisteltiin kuntoon tulostusta varten Netfabb-ohjelmiston vastaavalla automatiikalla, jota saman pinnan ongelmitta analysoinut PreForm-ohjelmisto sisäisesti käyttää.

Taulukossa 3 esitetään mallien tulostusparametrit ja suurennusarvot. Kerrosresoluution ohella tulostustarkkuuteen vaikuttaa pienin tulostettava lateraalinen seinämäpaksuus, johon puolestaan vaikuttavat kerrospaksuus ja tulostusmateriaali. Todellinen minimipaksuus riippuu lisäksi piirteen geometriasta ja on käytännössä tyypillisesti suurempi kuin ilmoitettu minimipaksuus. Tulostusmittakaavan kerrosresoluutio vastaa mallina käytettyjen kuvien mittakaavassa muutamien mikrometrien suuruusluokkaa (tässä 3,5 µm kaikilla malleilla), jota on pidetty hyvin käyttökelpoisena kerrosresoluutiona varsinaista solutulostusta ajatellen [22].

Taulukko 3. Mallien tulostusparametrit

Malli	Tulostin	Materiaali/tuki	Kerroksen resoluutio (µm)	Ohuin seinämä (µm)	Skaalaus	Suurennus kuvasta ¹⁴
C1-a, C2-a	Stratasys uPrint SE Plus	Valkoinen ABSPlus [28] / SR-30	254	914	0,5	71,7
C1-b	Formlabs Form1+	Clear Resin [29]	100	300	0,2	28,7

Mallit tulostettiin Aalto-yliopiston digitaalisen suunnittelun laboratorion (ADD) tiloissa. Molemmat FDM-tulostettavat STL-mallit (C1-a, C2-a) tuotiin tulostuspalvelimelle, jossa ne orientoitiin ja skaalattiin Stratasysin CatalystEx-tulostusohjelmistolla. SLA-malli (C1-b) tulostettiin suoraan aikaisemmin valmistellusta ja Formlabsin omaan formaattiin tallennetusta tiedostosta.

Tulostuksen jälkeen FDM-tulosteiden (C1-a ja C2-a) rakennuksessa käytetyt ylimääräiset tukirakenteet liuotettiin pois koneellisesti tähän tarkoitettuun pesulaitteella. Tulosteisiin jääneet näkyvät polymeerisäikeet poistettiin manuaalisesti. SLA-tulosteesta (C1-b) tukirakenteet poistettiin varovasti käsin, minkä jälkeen ylimääräinen hartsi pestiin pois mahdollisimman hyvin isopropanolilla ja alustavasti polymeroituneet rakenteet vahvistettiin ultraviolettisäteilytyksellä.

¹⁴ Arvo on tulosteen koon likimääräinen suhde OPT-kuvatun kohteen kokoon. Suurennus on johdettu varsinaisesta skaalausparametrilla ja tomografiakuvien vokseliresoluutiosta 6,97 µm. STL-mallien yksikkömitat (tässä OPT-kuvan pikseleitä) ovat periaatteessa mielivaltaisia. Esimuunnos tapahtuu jo, kun STL-tiedoston malli tuodaan sellaisenaan tulostussovelluksen mm-koordinaatistoon (1 px = 1 mm). Toisin sanoen, taulukon $28,7 = 0,2 * 1000 / 6,97$ ja $71,7 = 0,5 * 1000 / 6,97$.

7.3. Mittaukset

Tulosteista ja malleista suoritettiin mittausvertailu, jonka tulokset esitetään taulukossa 4. Kustakin mallista valittiin vähintään kolme mittauskohdetta, joista yksi oli karkeasti tulostuskerrosten suuntainen ja kaksi sitä vastaan kohtisuoria. Malli C2-b mitattiin lisäksi vielä kolmessa eri kerrossuunnassa. Mittausvälien valintaan vaikutti lisäksi se, kuinka luotettavasti piirteen mittaus oli suoritettavissa niin muovitulosteesta kuin digitaalisesta mallistakin.

Taulukko 4. Tulosteiden ja STL-mallien mittavertailu

Malli	Mittaussuunta	Mittausten keskiarvo (mm)	Mittausten virheraja ¹⁵ (mm)	Tulostuksen virheraja (mm) ¹⁶	STL-mallin skaalattua mitta (mm)	Tulostemien ero STL-mitasta (mm)	Jäännös virhe (mm)
C1-a	Kerrossuuntainen	63,86	0,04	0,254	63,47	+0,39	0,10
	Lateraalinen, pitkä	96,22	0,04	0,254	96,72	-0,50	0,21
	Lateraalinen, lyhyt	65,34	0,05	0,254	65,22	+0,12	
C1-b	Kerrossuuntainen	31,25	0,05	0,100	31,35	-0,10	
	Lateraalinen, pitkä	40,61	0,04	0,100	40,90	-0,29	0,16
	Lateraalinen, lyhyt	20,24	0,04	0,100	20,31	-0,07	
C2-a	Kerrossuuntainen	82,37	0,03	0,254	81,88	+0,48	0,20
	Lateraalinen, pitkä	74,33	0,03	0,254	74,28	+0,05	
	Lateraalinen, lyhyt	55,95	0,03	0,254	55,99	-0,04	
	Kerrossuuntainen 2	49,73	0,03	0,254	49,55	+0,18	
	Kerrossuuntainen 3	70,38	0,02	0,254	70,34	+0,04	
	Kerrossuuntainen 4	63,29	0,02	0,254	63,22	+0,07	

Tulosteista saadut mitat ovat 30 mittauksen keskiarvo. Mittaukseen käytettiin digitaalista työntömittaa¹⁷, jonka resoluutio oli 0,01 mm ja mittaustarkkuus 0,03 mm. STL-malleista luettiin vastaavat vertailumitat Maya-ohjelmiston mittaustyökalulla sisäisissä mittayksiköissä, jotka muunnettiin tulosteen mittakaavan millimetreiksi skaalauskerroinella 0,2 (C1-b) tai 0,5 (C1-a, C2-a). Mayan mittaustyökalu esitti STL-mallin välimatkat kuvapikselin miljoonasosan tarkkuudella ilman satunnaista mittausvirhettä.

Tulosteet ja niiden mittauspiirteet erosivat mitattavuudessa toisistaan. Esimerkiksi mallin C2-a tuloste antoi mittauksessa muita helpommin mekaanisesti periksi, mikä saattoi kasvattaa joidenkin välien mittaustulosten hajontaa. Toisaalta saman mallin mittauspisteet olivat muita helpommin erotettavissa ja mittaukset vastaavasti luotettavammin toistettavissa. Muissa malleissa (C1-a, C1-b) oli vähemmän valinnanvaraa helposti ja luotettavasti mitattavien välien suhteen.

Digitaalisen mallin ja muovitulosteen mittaustavat poikkesivat periaatteeltaan hyvin paljon, mikä lisää systemaattisia virhedimensioita ja vaikeuttaa jossain määrin mittausten rinnastettavuutta. Digitaalinen työntömitta on näissä mittakaavoissa varsin

¹⁵ Mittauskohtainen virheraja perustuu aineistosta lasketun t-jakauman 95 %:n luottamusväliin.

¹⁶ Virherajan arviona käytetään tulostimen kerrosresoluutiota.

¹⁷ CoCraft digitaalinen työntömitta 0-150 mm, tuotenumero 40-8747

tarkka väline jopa ohjelmalliseen mittaukseen verrattuna, mutta mekaaniseen mittaukseen sisältyy aina epävarmuustekijöitä. STL-mallin kahden pisteen (verteksin) väli on sama mittauksesta toiseen, mutta mittauspisteiden valinta voi tapahtua (systemaattisen) virheellisesti.

Tehtyjen mittausten virheraja-arvio riippui mitattavasta piirteestä (0,02 mm - 0,05 mm). Tulostuksen mittavirheeksi oletettiin tulostimen kerrosresoluutio (100 μm ja 254 μm). Mallin viipalointiin ja kerrostulostukseen liittyvät vääristymät oletettiin sisältyviksi edelliseen. Tulosteiden ja STL-mallien mittauskeskiarvojen poikkeamat vaihtelivat, mutta niiden keskiarvo oli melko lähellä nollaa, joten mittaukset eivät ainakaan todista suurta globaalia systemaattista virhettä mittauksissa tai tulosteissa. Suurin poikkeama (0,50 mm) oli moninkertaisesti arvioitua mittausvirhettä suurempi, joten merkittävimmät virheet johtunevat pääasiassa muista lähteistä kuin mittauksen satunnaisvirheistä. Kerrossuuntaisissa mitoissa havaittiin odotetusti keskimäärin hieman suurempia absoluuttisia poikkeamia kuin lateraalisissa (välit vastaavasti 0,85 mm ja 0,62 mm). Suurempi poikkeama saattaa heijastaa kerrossuunnan lateraalista karkeampaa resoluutiota.

Resoluution virherajakin huomioiden kahdestatoista mittauskeskiarvosta neljään jäi vielä merkitsevää jopa 0,21 mm huomioitua virherajat ylittävää poikkeamaa STL-mallien ja tulosteiden kesken. Ero jää selitettäväksi muilla vaikeasti arvioitavilla virhetekijöillä. Näitä ovat esimerkiksi virhe STL-mallin mitan määrittelyssä, tulosteen pienimmän seinämärajan tuottama mahdollinen lisäys mallin ohuimpiin piirteisiin, tulosteen vääntymisestä tai kulumisesta johtuva mittaero, tai tulosteen piirrekohtaisen mitattavuuden vaikeuteen liittyvä mittausvirhe. Viimeksi mainitulla tarkoitetaan tässä mittaussarjoja, joissa mittauspisteistä vähintään toinen sijaitsee sellaisessa paikallisessa maksimissa/minimissä, jonka epävarma paikannettavuus tai kohdistettavuus vääristää mittausta systemaattisesti.

8. POHDINTA

8.1. Tulosteiden arviointi

Kaikki tulosteet onnistuivat ja muistuttivat malleja oleellisilta osin, eikä niistä rakennettu useampia versioita. Kuvat 11 ja 12 esittävät malleista saatuja tulosteita. Malleihin nähden esiintyi muutamia poikkeamia, mutta erot olivat odotettuja tai selitettävissä.



Kuva 11. Kokoojaputkiston mallin C2-a valmis ABSPlus-tuloste.



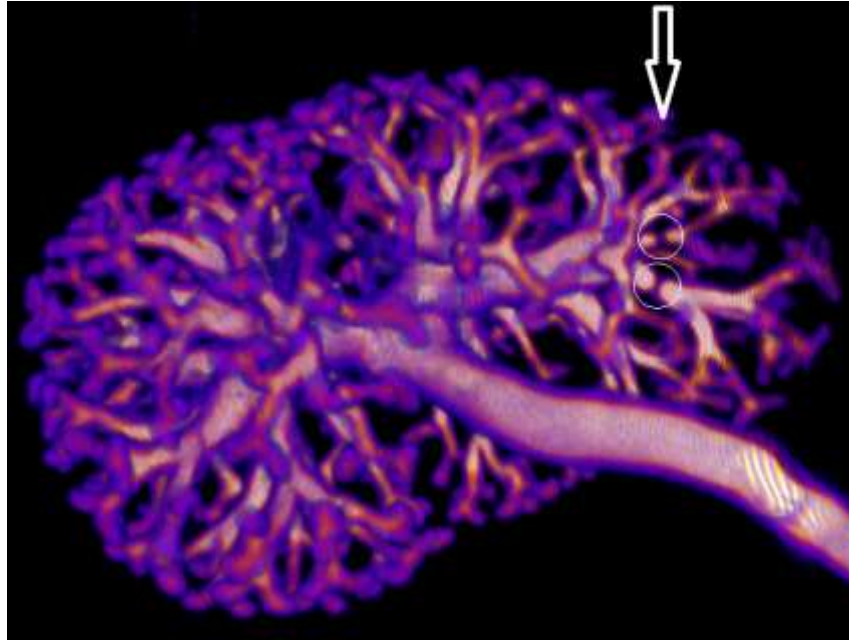
Kuva 12. Kaikkien kolmen mallin tulosteet ylhäältä myötäpäivään: Kokoojaputkisto C2-a, munuainen C1-a ja munuainen C1-b (läpikuultava tuloste).

Munuaiskuoren FDM-tuloste (C1-a) ei poikennut havaittavasti mallista, ja se olikin muodoltaan tukeva ja yksinkertainen. Vain muokatun STL-mallin pinnan eheytyksen suunnitteluvaiheessa aiheutti pieniä haasteita, kuten työosuudessa mainittiin. Näiltäkin ongelmilta olisi kenties välttytty, mikäli muokkaus olisi tehty mahdollisimman vähissä vaiheissa ja yksinkertaisimmilla menetelmillä. Jatkoa

ajatellen nykyisestä mallista kannattaisi muokata osittain ontto, mikäli halutaan säästää materiaalia tai tarvitaan kevyempi tuloste.

Munuaisen SLA-tulosteen (C1-b) tapauksessa sen sisäpuoliset tulostuksen tukirakenteet jouduttiin odotetusti jättämään paikalleen. Ulkopuolisen tukimateriaalin poistosta jäi tulosteen pintaan odotettua vähemmän rosoista tekstuuria. Tätä saattoi edistää se, että tukikehikolle oli valittu oletusarvoa pienempi kosketuspinta-ala varsinaiseen tulosteeseen, ja että pinta pyrittiin myös tasoittamaan mahdollisimman hyvin ennen pesua ja UV-kovetusta. Läpinäkyvyys oli keskeisin kriteeri kun umpinaiselle mallille valittiin tulostusmateriaalia, mutta materiaali ei osoittautunut käytännössä yhtä läpikuultavaksi kuin miltä se näytti sileässä ja litteässä esimerkkitulosteessa. Toisaalta oli jo ennen tulostusta tiedossa, ettei täydellistä optista läpinäkyvyyttä saavutettaisi. Tämän tuloste oli halkaisijaltaan alle puolet muihin malleihin verrattuna, ja on kuviteltavissa että se olisi ollut havainnollisempi samaan kokoon tulostettuna.

Kokoojaputkiston FDM-tuloste (C2-a) onnistui myös, mutta ainakin yksi sen ulommista haaroista oli murtunut kaventuman kohdalla ja irronnut tukimateriaalin liuotuspesun aikana. Tomografiadataa ei suodatettu ennen segmentointia, koska se vaikutti heikentävän kuvan ja pintamuodon terävyyttä ilman että siitä saataisiin vastaavaa hyötyä kuvan segmentoinnissa. Tosin terävyydelläkään ei ollut suurta merkitystä käytetyillä tulostusresoluutioilla, ja suodatettu data olisi mahdollistanut segmentoinnin hieman pienemmällä kynnsarvolla. Näin jo mallin esiversiosta olisi saatu hivenen tukevampi. Mutta kuten kuvasta 13 käy ilmi, mallin heikko kohta oli erityisen poikkeava jo alkuperäisessä datassa. Tästä syystä on luultavaa, että mallia olisi joka tapauksessa pakko muokata myös manuaalisesti. Ohentumat johtuvat mahdollisesti kohteen vauriosta tai kuvadatan artefaktista, eikä niitä olisi mahdollista kompensoida pelkästään segmentoinnin parametreilla. Ohuita kohtia oli jo vahvistettu mallissa, mutta tässä tapauksessa alkuperäisestä datasta olisi kannattanut poiketa vielä enemmän mallin tulostettavuuden eduksi.



Kuva 13. Alkuperäisen kuvadatan värikorostettu volyymiprojektio (Fiji), jossa nuolella osoitetut rengastetut kohdat erottuvat selvästi ohuempina muusta rakenteesta.

Yhteenvedona segmentoitujen mallien editointitarvetta aiheuttivat pääasiassa rakenteiden hauraus (erityisesti C2-a), artefaktit ja vastaavat tulosteeseen kuulumattomat piirteet (kaikki, erityisesti C2-a) ja munuaisen kuorimallin sulkeminen (C1-a).

Mallien muokkauksessa ilmeni pieniä käytännön ongelmia. Maya, Meshmixer ja Fijin 3D Viewer erosivat toisistaan siinä miten ne tuottivat ja lukivat STL-malleja, minkä vuoksi mallin pintanormaalit kääntyivät ja mittakaava muuttui kun se vietiin STL-tiedostona toistuvasti sovelluksesta toiseen. Mallin pintanormaalit oli helppo kääntää ja koko skaalata tarvittaessa uudelleen ennen pinnan suunnasta ja mittayksiköistä riippuvia muokkausoperaatioita, mutta virhemahdollisuuksien vuoksi jokin toinen yhteensopiva mitat säilyttävä tiedostoformaatti olisi ollut editointivaiheessa parempi valinta. Esimerkiksi Wavefront (.obj), olisi säilyttänyt skaalan ja pintanormaalit Mayan ja Meshmixerin kesken. Fijin 3D Viewer tesseloit pintanormaalit ilmeisesti jo alun perin nurin¹⁸. Pintaverkon kolmioiden normaalien kääntö tarvitsee kuitenkin tehdä vain kerran.

Myös mittaukset osoittivat että mallit ja tulosteet vastasivat hyvin toisiaan eikä tulostuksessa siis tapahtunut merkittävää deformaatiota. Erot olivat pääasiassa pieniä, ja eniten vaihtelua havaittiin kerrosten eli karkeimman resoluution suuntaisissa mitoissa. Vaikeasti eriteltävien virhetekijöiden merkitys tulosteiden ja mallien mittojen vertailussa osoittautui kuitenkin merkittäväksi. Erittelemättömiin virheisiin saattaa sisältyä sekä tulosteeseen, malliin että mittausmenetelmiin liittyviä tekijöitä,

¹⁸ Tällä laitteistolla tesseloitun alkuperäisen mallin tilavuus on Fijissä negatiivinen, ja Wavefront-tiedostosta tuodun pinnan kolmioiden normaalit osoittavat sisäänpäin kaikissa kokeilluissa sovelluksissa (Maya, Meshmixer, Netfabb).

eikä mittaustulosten perusteella kannata tehdä arvioita muusta kuin suoritetuista mittauksista ja käytetyistä mittausten menetelmistä.

Vertailun virherajaa voitaisiin ehkä parantaa valitsemalla malleista ja tulosteista mittauksia varten vain kaikkein helpoiten ja yksikäsitteisesti mitattavat piirteet. Valikointi saattaa kuitenkin vaikuttaa mittausten merkitsevyyteen, esimerkiksi jos eliminoidut piirteet ovat myös tulostuksen kannalta vaikeimpia. Tällöin potentiaalinen virhekomponentti on tietysti pyrittävä minimoimaan ja tarvittaessa huomioimaan tulosten tulkinnassa.

8.2. Kohti munuaistulostusta?

Tutkimuksen tavoitteena on parantaa kroonisesti munuaissairaiden elämänlaatua löytämällä kustannustehokkaat keinot korjata tai korvata vajaatoimintainen munuainen. Ongelma on kuitenkin monimutkainen eikä ratkaisu ole kehityksestä huolimatta vielä näköpiirissä [30].

Munuaisten konkreettisen 3D-tulostuksen tavoite on rakentaa munuainen biologiseen aihioon vastaanottajan omista soluista. Tavoitteen tiellä on kuitenkin vielä useita esteitä. Ensinnäkin tarvitaan kattavampi tietämys munuaisten organogeneesin mekanismeista, jotta tulostettava ja kehityskelpoinen esikudoksen rakenne olisi suunniteltavissa. Vaskularisaation rakentaminen on suuri ongelma, kun halutaan tulostaa mitään muutamaa solukerrosta paksumpaa aineenvaihduntaan osallistuvaa kudosta. Lisäksi tarvitaan biotulostin ja -reaktori, jotta rakentaminen olisi ylipäättään mahdollista. Tulostimelta vaaditaan biosopivuuden lisäksi erityistä tarkkuutta, nopeutta ja suurta materiaalivalikoimaa, ja bioreaktorin tulisi olla lähes elimistön kaltainen säätelyjärjestelmä, joka toimii kehityssuunnitelman mukaisesti ja reagoi asianmukaisesti esikudoksen kehittyessään tuottamiin herätteisiin. Kolmanneksi tarvitaan sellaiset solut ja muut materiaalit, joista elinkelpoinen esikudos olisi rakennettavissa suunnitelman mukaisesti. Solulinjojen on oltava stabiileja ohjelmoinnin puitteissa, materiaalien on oltava tulostettavissa, tulostetun esikudoksen on säilytettävä yleinen fyysinen muotonsa ja tulosteen on oltava sekä geneettisesti että materiaalisesti valmis kehittymään bioreaktorin valvonnassa ja ohjauksessa siirrekelpoiseksi funktionaaliseksi elimeksi. Viimeiseksi, mutta kenties ennen muuta, kaiken tämän olisi suotavaa tapahtua kustannushyödyllisesti.

3D-tulostustekniikan käyttö valmistuksessa ja tutkimuksessa on vain yksi mahdollisista kokeellisista lähestymistavoista. Menetelmät ovat keskenään hyvinkin erilaisia, ja niistä luetellaan seuraavaksi muutama esimerkki. Munuaisten tuottamiseksi on käytetty muun muassa desellularisoitua munuaisaihiota, joka on viljelty osittain onnistuneesti uusilla munuaissoluilla [30, 31]. Myös eksogeenisen siirremunuaisten kasvatusta toisen lajin elimistössä on kokeiltu, ja geneettisesti munuaista kehittämättömän vieraan lajin alkiorakkulan komplementointia ihmisen soluilla onkin pidetty yhtenä lupaavimmista tutkimussuunnista [30, 32]. Tutkimusta on tehty jo pitkään myös sellaisen kannettavan jatkuvatoimisen keuhkojen munuaislaitteen kehittämiseksi, joka dialyysin ohella korvaisi muutkin munuaisten elintärkeät tehtävät [33]. Myös korjaavia hoitoja kehitetään etsimällä keinoja ohjata munuaisten kantasolupopulaatioita ja elimistön immuunijärjestelmää tavalla, joka edistäisi vioittuneiden nefronien tehokasta uusiutumista [2]. Lisäksi perinnöllisistä syistä johtuvissa tapauksissa voidaan kehittää geeniterapiaa kehitysvirheiden korjaamiseksi [34].

Eri menetelmät eivät ole välttämättä toisensa poissulkevia, eikä mikään niistä ole vielä käytännössä toimiva tai edes kiistattomasti muita parempi tie kohti ongelman yleisintä ratkaisua. On luultavaa, että yksittäisissä toteutuksissa sovelletaan aikanaan samanaikaisesti jopa useita eri lähestymistapoja, ja että erilaisia rinnakkaisia ratkaisuja voidaan käyttää munuaisvaivan tyypistä, asteesta ja hoidollisista resursseista riippuen.

Nykytietämyksen perusteella vaikuttaa siltä, että elinkelpoisen munuaisen 3D-tulostus ei tule tapahtumaan aivan lähivuosina. Käytännössä tarvitaan paljon menetelmien ja materiaalien tutkimusta ennen kuin varsinaista elintulostusta voidaan ajatella. Biologisten prosessien parempi tuntemus edistäisi kaikkia edellä mainittuja tutkimussuuntia, joiden kautta erilaisia munuishiitoja voitaisiin kehittää. Tässä vaiheessa olemassa olevaa 3D-tekniikkaa voitaisiin käyttää apuna ennen kaikkea kun selvitetään organogeneesin solu- ja molekyyli-tason mekanismeja, esimerkiksi luomalla elintyypisiä 3D-soluviljelmiä ja testaamalla malleja 3D-biotulostuksen ja tietokoneavusteisen kuvauksen keinoin. OPT on edelleen käyttökelpoinen kuvaustekniikka, mutta uudemmat menetelmät kuten valolevyperustainen fluoresenssimikroskopia (LSFM) voivat antaa tarkempaa tai täydentävää tietoa solunsisäisistä prosesseista, varsinkin mitä tulee kuvauksen ajalliseen resoluutioon [35].

Kaiken kaikkiaan, lisää kehitystä tarvitaan ennen muuta niillä solubiologian tutkimusalueilla joista munuaisen kehityksen, toiminnan ja tautien tutkimus ovat riippuvaisia. Munuaisen kolmiulotteinen aihio- ja -biotulostus tulevat luultavasti vielä jonkin aikaa keskittymään enemmän resursseja vaativaan tutkimukseen kuin varsinaiseen valmistavaan tulostukseen.

9. YHTEENVETO

Tässä työssä pyrittiin tutkimaan lääketieteellisen ja biologisen 3D-tulostuksen mahdollisuuksia teoriassa ja käytännössä. Työ taustoitettiin katsauksella munuaisen organogeneesiin ja työssä käytettäviin lääketieteellisiin kuvaus- mallinnus- ja tulostusmenetelmiin. Lisäksi esiteltiin muista tutkimuksista yleistetty malli 3D-tulostusprosessin vaiheista. Hiiren 15,5-päiväisen alkion munuaisen kuoren ja kokoojaputkiston OPT-kuvista luotiin kolme tulostettavaa pintamallia, yksi putkistorakenteesta ja kaksi eri tavoin segmentoidusta munuaisesta. Malleista rakennettiin onnistuneesti 29- ja 72-kertaisiksi suurennetut 3D-tulosteet, pienin ontoksi segmentoitu munuaismalli läpinäkyvästä polymeeristä ja kaksi suurempaa ABS-muovista karkeammalla resoluutiolla.

Tulosteet mitattiin ja niitä verrattiin malleihin. Mitat pääasiassa yhtenivät hyvin, mutta kaikille eroille ei löytynyt selitystä mittaustarkkuuden puitteissa. Todennäköisimmäksi oletukseksi jäi, että ne johtuivat mittavälikohtaisista vaikeasti arvioitavista systemaattisista virheistä.

Tuloksia ja käytettyjä menetelmiä arvioitiin kriittisesti. Toisin kuin nyt tehtiin, mallien lähdekuvat olisi voitu hyvin suodattaa ennen tesselointia, koska suodattamattomuus ei tehnyt malliin sulautuneen artefaktin eliminointia toivotulla tavalla merkittävästi helpommaksi. Kokoojaputkistoa mallintavasta tulosteesta murtui haarake tukirakenteiden liuotuksessa, joten mallin kapeimpia kohtia olisi tullut laajentaa enemmän.

Lopuksi pohdittiin siirremunuaisen 3D-tulostuksen mahdollisuuksia muiden munuaistautiin parannusta etsivien tutkimussuuntien ohella. Mitään tapaa ei voi pitää kiistatta muita parempana, ja ne kaikki vaativat vielä paljon kehitystä ennen kuin niiden todellinen potentiaali tulee ilmi. Kaikki lähestymistavat ovat riippuvaisia munuaisen molekyylitason mekanismien paremmasta tuntemuksesta. Munuaisen 3D-biotulostus on muiden tutkimussuuntien tavoin vasta mahdollisuuksiensa alussa. Tällä hetkellä lupaavimpana munuaisen korvaajana pidetään pikemminkin ksenogeenistä kimeerisesti kasvatettua elinsiirrettä kuin sen biotulostettua vastinetta. Munuaisesta tuli 65 vuotta sitten ensimmäinen kokonainen sisäelinsiirre, mutta juuri nyt ei vaikuttaa siltä että siitä tulisi myös ensimmäinen vastaava elintuloste. 3D-biotulostus on kehittynyt paljon viime vuosina, mutta on tavoitteisiin nähden edelleen vasta alkuvaiheessaan.

10. LÄHTEET¹⁹

- [1] Humes HD, Buffington D, Westover AJ, Roy S, Fissell WH (2014) The bioartificial kidney: Current status and future promise. *Pediatric nephrology* 29(3): 343-351. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2013.10.006>.
- [2] Romagnani P (2009) Toward the identification of a "renopoietic system"? *Stem cells* 27(9): 2247–2253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.140>.
- [3] Davidson AJ (2009) Mouse kidney development. The stem cell research community (ed) StemBook. URL: <http://www.stembook.org/node/532>. DOI: <http://dx.doi.org/10.3824/stembook.1.34.1>. Noudettu 11.3.2015.
- [4] Farag E, Maheshwari K, Morgan J, Esa WAS, Doyle DJ (2015) An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesthesia and analgesia* 120(2): 275-292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0000000000000528>.
- [5] Sharpe J (2004) Optical projection tomography. *Annual review of biomedical engineering* 6: 209-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140210>.
- [6] Walter T, Shattuck DW, Baldock R, Bastin ME, Carpenter AE, Duce S, Ellenberg J, Fraser A, Hamilton N, Pieper S, Ragan MA, Schneider JE, Tomancak O, Hériché J-K (2010) Visualization of image data from cells to organisms. *Nature methods* 7: 26-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1431>.
- [7] Kim DB, Witherell P, Lipman R, Feng SC (2015) Streamlining the additive manufacturing digital spectrum: A systems approach. *Additive manufacturing* 5(1): 20-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addma.2014.10.004>.
- [8] Monzón MD, Ortega Z, Martínez A, Ortega F (2014) Standardization in additive manufacturing: activities carried out by international organizations and projects. *The international journal of advanced manufacturing technology* 76(5-8): 1111-1121. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00170-014-6334-1>.
- [9] Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW (2010) A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 31: 6121-6130. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.050>.
- [10] Turner BN, Strong R, Gold SA (2014) A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling. *Rapid*

¹⁹ DOI-linkki ei välttämättä avaa joidenkin julkaisujen artikkeleita suoraan dokumentista, jolloin nouto on tehtävä eksplisiittisesti annetulla osoitteella tai DOI-tunnuksella.

- prototyping journal 20(3): 192-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/RPJ-01-2013-0012>.
- [11] Mazzoli A (2013) Selective laser sintering in biomedical engineering. *Medical & biological engineering & computing* 51(3): 245-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11517-012-1001-x>.
- [12] StereoLithography Interface Specification (1989) 3D Systems, Inc. Valencia CA, 3D Systems publication.
- [13] ASTM subcommittee F42.04 (2013) ASTM ISO / ASTM52915-13, Standard specification for additive manufacturing file format (AMF) version 1.1. ASTM International, West Conshohocken, PA. URL: <http://www.astm.org/Standards/ISOASTM52915.htm>. Noudettu 13.5.2015.
- [14] Murphy SV, Atala A (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* 32(8): 773-785.
- [15] Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Huttmacher DW (2012) Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in polymer science* 37(31): 1079-1104.
- [16] Sun W (2013) Bio-3D printing: NSF workshop on frontiers of additive manufacturing research and education. University of Florida. URL: <http://nsfam.mae.ufl.edu/Slides/Sun.pdf>. Noudettu 13.5.2015.
- [17] Pinto JM, Arrieta C, Andia ME, Uribe S, Ramos-Grezd J, Vargase A, Irrazaval P, Tejos C (2015) Sensitivity analysis of geometric errors in additive manufacturing medical models. *Medical engineering and physics* 37(3): 328-334. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.01.009>.
- [18] Bibb R, Winder J (2009) A review of the issues surrounding three-dimensional computed tomography for medical modelling using rapid prototyping techniques. *Radiography* 16: 78-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radi.2009.10.005>.
- [19] Chia HN, Wu BM (2015) Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of biological engineering* 9(4): 1754-1611. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>.
- [20] Uchida S (2013) Image processing and recognition for biological images. *Development, growth & differentiation* 55: 523-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/dgd.12054>.
- [21] Young PG, Beresford-West TBH, Coward SRL, Notarberardino B, Walker B, Abdul-Aziz A (2008) An efficient approach to converting three-dimensional image data into highly accurate computational models. *Philosophical transactions - Royal Society. Mathematical, physical and engineering sciences* 366: 3155-3173. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2008.0090>.

- [22] Partridge R, Conlisk N, Davies JA (2012) In-lab three-dimensional printing: An inexpensive tool for experimentation and visualization for the field of organogenesis. *Organogenesis* 8(1): 22-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/org.20173>.
- [23] Lorensen WE, Cline HE (1987) Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm. *Computer graphics* 21(4), 163-169. DOI: <http://dx.doi.org/10.1145/37402.37422>.
- [24] Youssef RF, Spradling K, Yoon R, Dolan B, Chamberlin J, Okhunov Z, Clayman R, Landman J (2015) Applications of three-dimensional printing technology in urological practice. *BJU international* 2015: 1464-4096. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bju.13183>.
- [25] Bioptonics OPT scanner 3001M User Manual V1.10.7 (2008) MRC Technology. URL: http://depts.washington.edu/image3d/Forms_files/OPT%20operation%20manual%20V1.10.7.pdf. Noudettu 19.2.2015.
- [26] Lehtinen P (2013) Projection microstereolithography equipment. Diplomityö. Aalto-yliopisto, perustieteiden korkeakoulu. URL: https://aaltodoc.aalto.fi/bitstream/handle/123456789/8922/master_lehtinen_pekka_a_2013.pdf?sequence=1. Noudettu 1.2.2015.
- [27] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9(7): 676-682. DOI: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2019>
- [28] ABSplus™-P430: Production-grade thermoplastic for Design series 3D printers (2014). Stratasy inc. URL: <http://www.stratasys.com/~media/Main/Secure/Material%20Specs%20MS/Fortus-Material-Specs/Fortus-MS-ABSplus-01-13-web.pdf>. Noudettu 1.2.2015.
- [29] Clear photopolymer resin for Form 1+: Material properties (2014) Formlabs inc. URL: <http://formlabs.com/media/upload/Clear-DataSheet.pdf>. Noudettu 1.2.2015
- [30] Yamanaka S, Yokoo T (2015) Current bioengineering methods for whole kidney regeneration. *Stem cells international* 2015: 724205 [sic]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/724047>.
- [31] Tapiasa LF, Ott HC (2014) Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Current opinion in organ transplantation* 19(2): 145-152. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MOT.0000000000000051>.
- [32] Usui J-I, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H (2012) Generation of kidney from pluripotent stem cells via

blastocyst complementation. *American journal of pathology* 180(6): 2417-2426. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.007>.

- [33] Jansen J, Fedecostante M, Wilmera MJ, van den Heuvel LP, Hoenderop JG, Masereeuw R (2014) Biotechnological challenges of bioartificial kidney engineering. *Biotechnology advances* 32(7): 1317-1327. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.001>.
- [34] Reddy MA, Natarajan R (2015) Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney international* 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.148>.
- [35] Pampaloni F, Chang B-J, Stelzer EHK (2015) Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues. *Cell and tissue research* 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-015-2144-5>.

11. LIITTEET

Liite 1. Tulosteista ja digitaalisista malleista tehdyt mittaukset tunnuslukuineen

Liite 1. Tulosteista ja digitaalisista malleista tehdyt mittaukset tunnuslukuineen²⁰

Malli	Mittaussuunta	Mittaukset tulosteesta (mm)										Mittaus STL-mallista (px)	Skaalattu STL-mitta (mm)
C1-a	Kerrossuuntainen	63,50	63,64	63,74	63,76	63,76	63,78	63,81	63,82	63,82	63,82	126,937305	63,4686525
		63,85	63,87	63,88	63,90	63,90	63,91	63,91	63,92	63,92	63,92		
		63,92	63,93	63,93	63,93	63,94	63,94	63,94	63,95	63,96	63,97		
	Lateraalinen, pitkä	96,16	96,17	96,18	96,19	96,19	96,20	96,20	96,20	96,20	96,20	193,449041	96,7245205
		96,20	96,20	96,21	96,21	96,21	96,21	96,21	96,22	96,22	96,22		
		96,24	96,25	96,26	96,27	96,27	96,27	96,28	96,28	96,29	96,31		
	Lateraalinen, lyhyt	65,13	65,19	65,20	65,21	65,21	65,26	65,27	65,31	65,31	65,31	130,439606	65,219803
		65,33	65,34	65,35	65,36	65,36	65,37	65,37	65,38	65,38	65,38		
		65,38	65,39	65,40	65,40	65,40	65,40	65,41	65,41	65,41	65,49		
C1-b	Kerrossuuntainen	31,12	31,15	31,15	31,18	31,18	31,19	31,20	31,21	31,22	31,23	156,748853	31,3497706
		31,24	31,25	31,25	31,26	31,26	31,27	31,27	31,27	31,28	31,28		
		31,28	31,29	31,29	31,29	31,30	31,30	31,31	31,32	31,33	31,34		
	Lateraalinen, pitkä	40,50	40,51	40,57	40,57	40,58	40,58	40,58	40,59	40,59	40,59	204,511718	40,9023436
		40,61	40,61	40,61	40,62	40,63	40,63	40,63	40,63	40,63	40,63		
		40,63	40,63	40,63	40,64	40,65	40,65	40,65	40,66	40,66	40,66		
	Lateraalinen, lyhyt	20,14	20,15	20,15	20,16	20,16	20,16	20,17	20,19	20,20	20,20	101,55828	20,311656
		20,21	20,21	20,22	20,22	20,22	20,23	20,25	20,27	20,27	20,28		
		20,28	20,29	20,29	20,30	20,30	20,31	20,32	20,32	20,36	20,37		

²⁰ Tunnusluvut on laskettu mittaustuloksista Microsoft Excel -ohjelmistolla (Office 365 ProPlus).

C2-a	Kerrossuuntainen	82,13	82,23	82,23	82,27	82,28	82,28	82,29	82,29	82,30	82,31	163,768113	81,8840565	
		82,32	82,34	82,34	82,35	82,37	82,38	82,39	82,39	82,39	82,40			82,40
		82,41	82,42	82,43	82,46	82,47	82,47	82,49	82,50	82,50	82,52			82,53
	Lateraalinen, pitkä	74,21	74,22	74,23	74,23	74,23	74,27	74,28	74,28	74,28	74,29	74,29	148,564921	74,2824605
		74,30	74,30	74,31	74,33	74,34	74,34	74,34	74,34	74,34	74,34	74,36		
		74,36	74,36	74,37	74,38	74,40	74,40	74,46	74,46	74,46	74,49	74,50		
	Lateraalinen, lyhyt	55,87	55,89	55,91	55,92	55,92	55,92	55,93	55,93	55,93	55,93	55,94	111,984932	55,992466
		55,94	55,94	55,94	55,94	55,95	55,95	55,95	55,95	55,95	55,95	55,96		
		55,97	55,97	55,97	55,97	55,97	55,98	55,98	55,99	56,00	56,00	56,02		
	Kerrossuuntainen 2	49,65	49,65	49,67	49,68	49,70	49,70	49,70	49,71	49,71	49,71	49,72	99,100065	49,5500325
		49,72	49,72	49,72	49,72	49,72	49,73	49,73	49,73	49,73	49,74	49,74		
		49,74	49,75	49,75	49,76	49,76	49,78	49,78	49,79	49,79	49,79	49,83		
	Kerrossuuntainen 3	70,15	70,23	70,24	70,27	70,28	70,28	70,29	70,30	70,32	70,33	70,33	140,670996	70,335498
		70,33	70,33	70,35	70,35	70,35	70,35	70,36	70,37	70,37	70,41	70,41		
		70,43	70,45	70,49	70,50	70,51	70,52	70,52	70,52	70,53	70,53	70,56		
	Kerrossuuntainen 4	63,14	63,15	63,20	63,23	63,25	63,25	63,26	63,27	63,27	63,28	63,28	126,439704	63,219852
		63,28	63,29	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30	63,31	63,31	63,31	63,31		
		63,32	63,32	63,33	63,33	63,34	63,34	63,35	63,35	63,35	63,36	63,36		

Malli	Mittaussuunta	\bar{x} (mm)	Md (mm)	min (mm)	max (mm)	Δ (mm)	$\Delta\bar{x}_\delta$ (mm)	s_{n-1} (mm)	$s_{\bar{x}}$ (mm)	$\Delta\bar{x}_s$ (mm)	$s_{\bar{x}}/\bar{x}$ (%)	95% CI (\bar{x} - poikkeama, mm)	$\Delta\bar{x}_{ci}$ (mm)
C1-a	Kerrossuuntainen	63,861	63,905	63,50	63,97	0,47	0,12	0,10394 7378	0,01897 8108	0,02	0,03	0,038814589	0,04
	Lateraalin, pitkä	96,224	96,21	96,16	96,31	0,15	0,05	0,03847 0768	0,00702 3769	0,01	0,01	0,014365221	0,02
	Lateraalin, lyhyt	65,337	65,365	65,13	65,49	0,36	0,05	0,08242 6561	0,01504 8962	0,02	0,02	0,030778584	0,04
C1-b	Kerrossuuntainen	31,250	31,265	31,12	31,34	0,22	0,08	0,05653 7039	0,01032 2204	0,02	0,03	0,021111277	0,03
	Lateraalin, pitkä	40,612	40,63	40,50	40,66	0,16	0,03	0,03983 4427	0,00727 2738	0,01	0,02	0,014874420	0,02
	Lateraalin, lyhyt	20,240	20,225	20,14	20,37	0,23	0,09	0,06575 8178	0,01200 5746	0,02	0,06	0,024554507	0,03
C2-a	Kerrossuuntainen	82,366	82,375	82,13	82,53	0,40	0,09	0,09586 2090	0,01750 1943	0,02	0,02	0,035795493	0,04
	Lateraalin, pitkä	74,334	74,34	74,21	74,50	0,29	0,16	0,07779 2090	0,01420 2827	0,02	0,02	0,029048044	0,03
	Lateraalin, lyhyt	55,948	55,95	55,87	56,02	0,15	0,06	0,03152 2661	0,00575 5224	0,01	0,01	0,011770755	0,02
	Kerrossuuntainen 2	49,730	49,725	49,65	49,83	0,18	0,07	0,04072 4756	0,00743 5289	0,01	0,01	0,015206874	0,02
	Kerrossuuntainen 3	70,376	70,35	70,15	70,56	0,41	0,07	0,10535 5992	0,01923 5284	0,02	0,03	0,039340574	0,04
	Kerrossuuntainen 4	63,290	63,30	63,14	63,36	0,22	0,12	0,05496 0801	0,01003 4424	0,02	0,02	0,020522700	0,03