



Kandidaatintutkielma

# Kudosteknologian menetelmät vaskulaaristen rakenteiden mallintamisessa

Noora Korpi

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta  
2023

## Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet.....	3
1. Johdanto.....	4
2. Verenkiertojärjestelmän rakenteet .....	5
2.1. Verisuonten rakenteet .....	5
2.1.1. Verisuonten kerrokset .....	6
2.1.2. Verisuonten solut.....	7
2.2. Angiogeneesi ja vaskulogeneesi .....	8
3. Vaskulaarinen kudosteknologia.....	11
3.1. Vaskulaarisen kudosteknologian tekniikat .....	12
3.1.1. Skaffoldiperäiset tekniikat.....	12
3.1.2. Soluperäiset tekniikat .....	14
4. Optimaalisen verisuonimallin vaatimukset .....	16
4.1. Solut.....	16
4.1.1. Endoteelisolut.....	17
4.1.2. Tukisolut: Muraalisolut ja fibroblastit.....	17
4.1.3. Kantasolut ja progenitorisolut .....	18
4.2. Mikroympäristö .....	20
4.2.1. Kasvutekijät.....	20
4.2.2. Mekaaniset ominaisuudet .....	21
4.3. Hydrogeelit .....	21
4.3.1. Luonnolliset biomateriaalit .....	22
4.3.2. Synteettiset biomateriaalit .....	23
4.3.3. Hydrogeelien hajoaminen .....	24
5. Tulevaisuus .....	25
Lähteet .....	26

## Käytetyt lyhenteet

EC	endoteelisolu (engl. endothelial cell)
EPC	endoteelinen progenitorisolu (engl. endothelial progenitor cell)
ESC	alkion kantasolu (engl. embryonic stem cell)
FGF	fibroblastin kasvutekijä (engl. fibroblast growth factor)
HUVEC	ihmisperäinen napalaskimon endoteelisolu (engl. human umbilical vein endothelial cell)
iPSC	indusoitu pluripotentti kantasolu (engl. induced pluripotent stem cell)
MSC	mesenkymaalinen kantasolu (engl. mesenchymal stem cell)
PDGF	verihiutalekasvutekijä (engl. platelet-derived growth factor)
PEG	polyetyleeniglykoli
PGA	polyglykolidi
PLA	polylaktidi eli polymaitohappo
PLGA	poly(laktidi-ko-glykolidi)
SIS	ohutsuolen limakalvonalaiskerros (engl. small intestinal submucosa)
SMC	sileä lihassolu (engl. smooth muscle cell)
VEGF	verisuonen endoteelin kasvutekijä (engl. vascular endothelial growth factor)
VTE	verisuonikudosteknologia (engl. vascular tissue engineering)

# 1. Johdanto

Kudosteknologia on poikkitieteellinen osa-alue regeneratiivista lääketiedettä, jonka tavoitteena on kehittää uusia menetelmiä trauma- tai tautiperäisesti vahingoittuneiden kudosten ja elinten korjaamiseen. Kudosten mallintamisessa on eri ulottuvuuksia, ja vaikka tasaisia, tubulaarisia ja onttoja rakenteita on saatu onnistuneesti fabrikoidua (tuotettua), monimutkaisten rakenteiden fabrikointia hidastavat erilaiset haasteet (Shafiee & Atala, 2017).

Yksi suurimmista ongelmista on se, ettei *in vitro* -tuotetuille, eli elävän organismin ulkopuolella tuotetuille kudoksille saada riittävää verisuoniverkostoa tuomaan niille tarpeeksi happea ja ravintoaineita. Vaskulaarisen kudosteknologian (VTE, engl. vascular tissue engineering, verisuoniin liittyvä kudosteknologia) tavoitteena on kehittää ratkaisu tälle ongelmalle ja lopulta auttaa kehittämään ratkaisuja hyvinvoinnin parantamiseksi (Yang et al., 2020).

VTE:n menetelmät verisuonikudosten tuottamiseen ja mallintamiseen hyödyntävät sekä *in vivo* (elävässä organismissa) verisuonten muodostumista että synteettisesti valmistettuja muotteja eli skaffoldeja (engl. scaffold). Verisuonten haarautumista ja kasvamista kutsutaan angiogeneesiksi, ja angiogeneesissä uudet suonet muodostuvat solujen jakautumisen, migraation, järjestäytymisen ja lopulta anastomoosin eli yhdistymisen kautta. Angiogeneesiä pystytään mallintamaan *in vitro* tarjoamalla sille sopivat olosuhteet oikeilla vaskulaarisilla soluilla, kasvutekijöillä, virtauksilla ja muilla mikroympäristön tekijöillä (Yang et al., 2020).

Tässä työssä käsitellään vaskulaarisen kudosteknologian pääpiirteitä ja näiden tekniikoiden hyödyntämistä verisuonten *in vitro* -mallintamisessa. Menetelmiä kudosten mallintamiseen on lukuisia, ja on hyvä muistaa, ettei ole olemassa yhtä oikeaa menetelmää. Lupaavimmat tulokset saadaan soveltaen yhteensopivia lähestymistapoja. Vaskulaarisen kudosteknologian ollessa vielä kehittyvä tieteenala, sen tekniikat etenevät koko ajan, avaten ovia uusien hoitomenetelmien syntymiselle.

## 2. Verenkiertojärjestelmän rakenteet

Toimiva verisuonisto mahdollistaa aineiden, ensisijaisesti hapen ja glukoosin, kuljetuksen kaikille kudoksille, säätelee elimistön homeostaasia ja puolustaa elimistöä taudinaiheuttajilta. Verisuonet kuljettavat happipitoisen veren sydämen kautta suuriin valtimoihin, jotka haarautuvat pienemmiksi valtimoiksi ja lopulta hiussuoniksi, jotka luovuttavat hapen ympäröiville soluille. Hapeton veri kulkeutuu laskimoita pitkin sydämen kautta keuhkoihin, ja sama sykli toistaa itseään yli miljardi kertaa keskimääräisen elämän aikana.

### 2.1. Verisuonten rakenteet

Verisuonet jaetaan kolmeen päätyyppiin, joilla jokaisella on ominaiset piirteensä: valtimoihin, laskimoihin ja hiussuoniin. Valtimot ovat vahvoja ja kimmoisia suonia, jotka kuljettavat verta sydäimestä pois päin kudoksille. Suuret valtimot säätelevät verenpainetta ja veren virtausta eli perfuusiota, joten niiden seinämät ovat paksuja ja elastisia. Pienemmät valtimot eli arteriolit säätelevät myös veren virtausta, ja niiden seinämissä on enemmän sileää lihaskudosta mahdollistamassa supistumista (vasokonstriktiota) ja laajentumista (vasodilataatiota) (Vierimaa H & Laurila M, 2013).

Valtimot haarautuvat yhä pienemmiksi suoniksi, kunnes niiden seinämä koostuu enää yhdestä solukerroksesta ja tyvikalvosta. Näitä kutsutaan kapillaareiksi eli hiussuoniksi. Hiussuonet ovat rakenteeltaan erittäin ahtaita, < 10 µm paksuisia, ja ne levittäytyvät kaikkialle elimistöön. Hiussuonten ohuiden seinämien läpi aineet kulkeutuvat verestä kudoksille nopeasti (Vierimaa H & Laurila M, 2013; Betts et al., 2013).

Aineiden kulkeutumisen jälkeen hiussuonet yhdistyvät suuremmiksi ja muodostavat laskimoita, joita pitkin veri palaa takaisin sydämeen. Laskimoiden seinämien rakenne poikkeaa valtimoiden rakenteesta huomattavasti, koostuen ohuesta kerroksesta sileää lihaskudosta ja ohuesta, joustavasta sidekudoksesta. Verenpaine laskimoissa on tyypillisesti matala, ja luustolihasien supistuminen edesauttaa veren kulkeutumista takaisin sydämeen (Vierimaa H & Laurila M, 2013)

### 2.1.1. Verisuonten kerrokset

Isompien suonten, sekä valtimoiden että laskimoiden seinämä koostuu kolmesta kerroksesta, joita ovat sisäkerros (*tunica intima*), keskikerros (*tunica media*) ja ulkokerros (*tunica adventitia*). Valtimoiden ja laskimoiden kerrosrakenne on esitetty kuvassa 1.

*Tunica intima* koostuu levyepiteelisolukerroksesta ja sitä ympäröivästä sidekudoksesta (Vierimaa H & Laurila M, 2013). Kaikilla verisuonilla on sisäpinnallaan yksinkertainen levyepiteelisolusta koostuva ohut kerros, jota kutsutaan endoteeliksi, ja endoteeliä ympäröivä tyvikalvo. Endoteeli muodostaa valikoivasti läpäisevän ja dynaamisen esteen lumenin eli suonen ontelon ja suonissa kiertävän veren sekä ympäröivän kudoksen välille, mikä mahdollistaa veren virtauksen ilman trombogeenisyyttä, eli taipumusta muodostaa hyytymiä. Lisäksi endoteeli säätelee kapillaarista aineiden kuljetusta ja uusien suonten muodostumista (Kerr et al., 2011). Endoteeliä ja muita solukerroksia erottaa läpäisevä tyvikalvo, joka sitoo endoteelin sidekudokseen. Tämän lisäksi tyvikalvo tuo rakenteelle tukea ja joustavuutta. Tyvikalvoa ympäröi vielä ohut kerros sidekudosta, joka koostuu elastisista kuiduista ja kollageenista. Valtimoissa esiintyy myös *tunica median* rajalla elastinen kalvo, joka antaa valtimoille lisätukea (Betts et al., 2013).

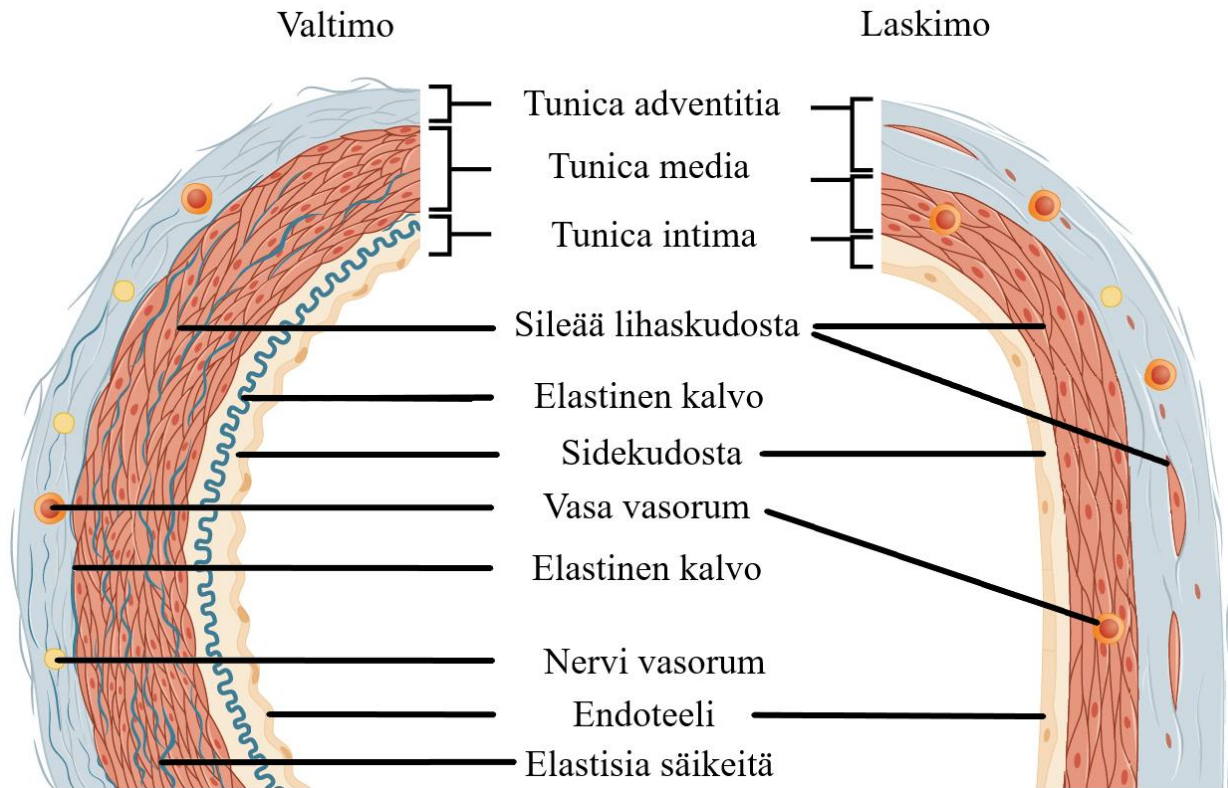
*Tunica median* koostumus muuttuu suonityypeittäin, sen ollessa paksumpi valtimoissa kuin laskimoissa. Se koostuu sileästä lihaskudoksesta, sitä säätelevistä *nervi vasorum* -hermoista, ja elastisista säikeistä muodostuneesta sidekudoksesta. Lihaskudoksen tehtävänä on säädellä vasokonstriktiota ja vasodilataatiota nostaen ja laskien verenpainetta. Elastiset säikeet kiinnittävät *tunica median* muihin kerroksiin (Betts et al., 2013).

*Tunica adventitia* tai *tunica externa* koostuu sidekudoksesta, pääosin kollageenista ja elastaanista. Isoissa valtimoissa tämä on usein paksuin suonten kerroksista. *Tunica adventitiassa* esiintyy myös suonen koosta ja sijainnista riippuen sileää lihaskudosta (laskimoissa), *vasa vasorum* -hiussuonia, jotka antavat lisäravintoa paksimpien suonten soluille, ja fibroblasteja, eli soluväliainetta tuottavia soluja. Uloin kerros on tiukasti kiinnittyneenä ympäristöönsä, kiinnittäen suonen paikalleen (Betts et al., 2013).

### **2.1.2. Verisuonten solut**

Suonten sisäpinta, endoteeli, on yksinkertainen kerros, joka muodostuu levyepiteelisoluista, joita kutsutaan endoteelisoluiksi (EC, engl. endothelial cell). Vasteena erilaisille ärsykeille endoteelisolut erittävät laajan kirjon erilaisia vasoaktiivisia, eli verisuonten laajenemista (vasodilaatio) ja supistumista (vasokonstriktio) sääteleviä tekijöitä, joilla on erilaisia vaikutuksia verisuonten toimintaan. Yksi näistä on typpioksidi, joka aktivoi ympäröivien solujen entsyymejä, johtuen sileän lihaskudoksen rentoutumiseen ja vasodilaatioon. Typpioksidi säätelee myös hyytymien muodostumista ja tulehdusreaktiota. Endoteelisolut kykenevät myös vastaamaan hypoksisiin eli vähähappisiin olosuhteisiin erittämällä uusien verisuonten muodostumista stimuloivia kasvutekijöitä, estämään hyytymien muodostumista ekspressoimalla eli tuottamalla antikoagulanttisia proteiineja ja säätelemään tulehdusreaktioita erittämällä inflammatorisia sytokiineja (Kerr et al., 2011).

Endoteelisolujen lisäksi vaskulaarisissa rakenteissa esiintyy muraalisoluja, joita ovat sileät lihassolut (SMC, engl. smooth muscle cell) ja perisytyt. Muraalisolut säätelevät suonten kasvua ja ylläpitoa. Isompia verisuonia ympäröivät suonten ympärille kerroksittain asettautuneet sileät lihassolut, joiden toimintaa säätelevät sympaattinen hermosto ja auto- ja parakriiniset hormonit. SMC:t vaikuttavat suonten läpimittaan supistamalla ja rentoutumalla vasteena erilaisiin ärsykkeisiin (Wilson, 2011). Mikroverisuonistossa kapillaarisuonten ja pienten laskimoiden ympärille on asettunut perisytyttejä, jotka ovat kiinnittyneenä tyvikalvoon epäsäännöllisin välein. Ne ovat endoteelisolujen välittömässä läheisyydessä ja kommunikoivat niiden kanssa, osallistuen suonten stabilisaatioon ja kasvun säätelyyn. Muraalisolujen lisäksi suonten muotoa ylläpitää soluväliaine, joka koostuu pääosin kollageenista ja elastiinista (Betts et al., 2013; Orekhov et al., 2014).



Kuva 1. Verisuonten yksinkertaistetuissa kuvissa näkyy kolme kerrosta, joista uloimpana on tunica adventitia, keskellä tunica media ja sisimpänä tunica intima. Kuva muokattu lähteestä (Betts et al., 2013), CC BY 4.0.

## 2.2. Angiogeneesi ja vaskulogeneesi

Vaskulogeneesissä verisuonia muodostuu prosessissa, joka on tiukasti sidottuna hematopoieesiin. Aikaisessa vaiheessa alkionkehitystä alkion kantasolujen generoimasta mesodermistä saa alkunsa moni verisuoniverkoston kehitymislinja, kuten hematopoieettiset kantasolut ja vaskulaariset endoteelisolut. Endoteelisoluja edeltävät progenitorisolut, angioblastit, kehittyvät mesodermaalisista lähteistä, multipotenteista hemangioblasteista. Hemangioblastit aggregoituvat ja muodostavat muun muassa ruskuaispussin ympärille verisaarekkeita, jotka koostuvat sekä hematopoieettisten kantasolujen että verisuonten endoteelisolujen edeltäjäsoluista: verisaarekkeiden sisemmät solut erikoistuvat hematopoieettisiksi kantasoluiksi ja ulommat angioblasteiksi, jotka kehittyvät lopulta alkion sydän- ja verisuonielimistön osiksi (Gilbert, 2000; Yang et al., 2020). Angioblastit lisääntyvät ja erikoistuvat endoteelisoluiksi, jotka muodostavat



putkimaisia rakenteita ja aggregoituvat alkeellisiksi kapillaariverkostoiksi. Verkostot muotoillaan hiussuonia, valtimoita ja laskimoita sisältäväksi kompleksiksi suonistoksi (Gilbert, 2000).

Kun primääriset intraembryonaaliset verisuonet ovat muodostuneet vaskulogeneesiin myötä, verisuoniverkostojen laajeneminen ja yhdistyminen tapahtuu angiogeneesiksi kutsutun prosessin kautta. Angiogeneesissä endoteelisolujen jakautuminen, migraatio, polarisaatio ja lumenin muodostaminen johtavat toimivan verenkiertojärjestelmän kehittymiseen (Yang et al., 2020).

Angiogeneesissä endoteelisolut erittävät matriksin metalloproteinaaseja (MMP) hajottamaan soluväliainetta halutusta kohdasta haarautuvalle suonelle. Solut etenevät näihin aukkoihin väliaineessa ja kehittyvät uusiksi verisuoniksi. Tämä on erittäin voimakkaasti säädelty prosessi, johon vaikuttaa signaalimolekyylien, adheesioproteiinien, kasvutekijöiden, endogeenisten inhibiittoreiden ja monien muiden molekyylien välinen kompleksinen vuorovaikutus (Laschke et al., 2006).

Angiogeneesissä osa leviämisalueen endoteelisolusta aktivoituu ja alkaa ilmentää uutta fenotyyppiä, jonka avulla ne kykenevät etenemään soluväliaineen läpi. Viereiset endoteelisolut seuraavat ja lisääntyvät tehostaen pidentymistä ja lumenin muodostusta sekä stabiloiden syntyvää suonta kiinnittymällä tyvikalvoon ja rekrytoimalla muraalisoluja (Jakobsson et al., 2010).

Suonten kypsyminen ja elongaatio ovat riippuvaisia muraalisoluista, jotka jaetaan kahteen alatyypin: verisuonten sileät lihassolut, jotka ympäröivät valtimoita ja -laskimoita, ja perisytyt, jotka kiinnittyvät hiussuoniin. Muraalisolut vaikuttavat angiogeneesiin stabiloimalla endoteelisolujen migraatiota, säätelevät endoteelin permeabiliteettia, vaikuttavat tyvikalvon muodostumiseen. Lopulta suonten kypsymisen jälkeen ne vaimentavat endoteelisolujen kasvua (Yang et al., 2020).

Angiogeneesi on voimakkaasti yhteyksissä organogeneesiin jokaisen elimen kapillaariverkoston kehittyessä samaan aikaan elimen kanssa. Angiogeeninen haarautuminen on elintärkeä prosessi ravintoaineiden ja kaasujen vaihtoon iskeemisillä alueilla. Verisuonten muodostumista tapahtuu myös aikuisiässä happea ja ravintoaineita vaativissa fysiologisissa olosuhteissa, kuten hypoksiassa, kudosten uusiutumisessa ja haavojen paranemisessa. Lisäksi angiogeneesillä on suuri rooli syöpäsairauksien etenemisessä sen vaikuttaessa myös kasvainten kehittymiseen (Yang et al., 2020).

Näistä syistä angiogeneesiä stimuloivia ja inhiboivia tekijöitä tutkitaan laajalti, jotta löydettäisiin ratkaisuja verisuonitautien parantamista ja syöpien estämistä varten (Haase & Kamm, 2017).

### 3. Vaskulaarinen kudosteknologia

Trauma- tai tautiperäiset kudosis- ja elinvauriot ovat yksi monesta lääketieteen kohtaamasta ongelmasta. Tarve kehittää uusia menetelmiä vahingoittuneiden elinten korjaamiseen on suuri. Elimiä odottavien potilaiden määrä kasvaa kasvamistaan: tilanne, jota puute elintenluovuttajista ja ikääntyvä väestö ei helpota (Shafiee & Atala, 2017). Yhdysvalloissa joka kymmenes minuutti lisätään uusi potilas uuden elimen odotuslistalle, jolla jo valmiiksi odottavista potilaista menehtyy 17 päivittäin (organdonor.gov, 2023). National Kidney Foundationin mukaan keskimääräinen munuaisen odotusaika on 3–5 vuotta: aika, joka on monelle potilaalle liikaa (National Kidney Foundation, 2023)

Kudosteknologia on poikkitieteellinen osa-alue regeneratiivista lääketiedettä, jossa on tapahtunut viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana huimaa kehitystä. Kudosteknologian päämääränä on lieventää luovuttavien elinten puutetta tuottamalla toimivia biologisia rakenteita, ja pitkällä tähtäimellä tavoitteena on vahingoittuneiden kudosten ja elinten korjaaminen tai korvaaminen (Shafiee & Atala, 2017). Tuotettuja rakenteita voidaan käyttää muun muassa implanteina, siirteinä tai *in vitro* tutkimuskohteina.

Kudosteknologian menetelmät kudosten mallintamisessa jaetaan soluperäisiin ja skaffoldiperäisiin tekniikoihin. Kudosten mallintamisessa on eri ulottuvuuksia, kattaen tasaisista kudoksista ja elimistä, kuten esimerkiksi ihosta, monipuolisimpiin, onttoihin ja kiinteisiin kudoksiin ja elimiin, kuten esimerkiksi sydämeen. Vaikka tasaisia, tubulaarisia ja onttoja rakenteita on saatu onnistuneesti fabrikoidua, kokonaisten, kiinteiden elinten fabrikointi on havaittu erittäin vaikeaksi. Haasteita ilmenee muun muassa sopivien skaffoldien ja biomateriaalien valinnan, solujen saatavuuden sekä kudosten vaskularisoinnin (verisuonistumisen) puitteissa (Jain et al., 2005).

Optimaalisten kudosten ja elinten normaalin toiminnan edellytyksenä on toimiva verenkiertojärjestelmä, jotta kudosten solut saavat niille elintärkeitä aineita normaalin toiminnan takaamiseksi. Ilman toimivaa aineiden kuljetusta tämä edellytys ei täyty ja kudoksen solut ovat riskialttiita hypoksialle ja aineiden puutostiloille. Siirteen riittävä vaskularisoituminen *in vivo* voi kestää viikkoja, jonka aikana soluilla on riski menettää toimintansa ja fenotyyppinsä (Yang et al., 2020). Koska hapen diffuusioraja on 100–200 µm (Olive et al., 1993), kudosteknologialla valmistetut siirteet (0,1–10 cm) ovat usein liian kookkaita riittävään aineiden kuljetukseen kaikkien

solujen tarpeisiin. Niille kudoksille, jotka vaativat haarautuneen verisuoniverkoston ja jotka ovat riippuvaisia hapen diffuusiosta solukalvojen läpi, tätä suuremmat etäisyydet kapillaarien välillä ovat liian suuria riittävän hapen ja ravintoaineiden kuljetuksen takaamiseksi.

Ratkaisua riittävien verenkiertojärjestelmien kehittämiseen voidaan etsiä vaskulaarisen kudosteknologian (VTE, engl. vascular tissue engineering) avulla. VTE:n rooli regeneratiivisessa lääketieteessä on merkittävä; koska angiogeneesi on renegeraatiotapahtumien edellytys, kudosteknologialla valmistetut etukäteen vaskularisoidut eli prevaskularisoidut siirteet voivat kasvattaa regeneraation mahdollisuuksia (Chen et al., 2017). Prevaskularisoiduilla kudoksilla voidaan mallintaa monimutkaisiakin elimiä mahdollistaen angiogeneesin roolin tutkimisen elinten kehityksessä ja verisuonitautien etenemisessä, ja kudosteknologialla valmistettuja mikrovaskulaarisia verkostoja sisältäviä siruja ja bioreaktoreita voidaan käyttää hyvänä välineenä tehokkaille tutkimuksille, esimerkiksi lääkekehitykselle (Yang et al., 2020).

### **3.1. Vaskulaarisen kudosteknologian tekniikat**

Vaskularisoitujen kudosten tuottamiseen on esitetty kahta strategiatyyppiä: soluperäiset tekniikat ja skaffoldiperäiset tekniikat. Soluperäiset tekniikat perustuvat endoteeliseen angiogeneesiin ja vaskulogeneesiin, kun taas skaffoldiperäiset tekniikat perustuvat tubulaarisiin rakenteisiin, jotka ovat valmistettu joko synteettisesti tai luonnollisin menetelmin. Monien tutkimusten yhdistäessä menetelmiä strategiatyyppien raja ei kuitenkaan aina ole itsestään selvä.

#### ***3.1.1. Skaffoldiperäiset tekniikat***

Jotta vaskulaarisella systeemillä olisi potentiaalia luoda toimivia verisuoniverkostoja ja mahdollistaa anastomoosi isäntäkudoksen kanssa, kehitetään kolmiulotteisia skaffoldeja ohjaamaan vaskulaaristen solujen järjestäytymistä. Skaffoldien tarkoitus on replikoida solujen luonnollista kolmiulotteista mikroympäristöä mahdollisimman hyvin, jotta solut voivat lisääntyä ja järjestäytyä oikean malliseksi kudoksiksi. Skaffoldien yhteensopivuus kudosspesifisten solutyypin ja niiden mikroympäristön kanssa on oleellista, ja erilaiset kudokset vaativatkin

omanlaisensa mitoitukset ja materiaalit. Skaffoldeja voidaan valmistaa luonnollisista materiaaleista, kuten kollageeni- ja desellularisoiduista matrikseista tai synteettisesti. Synteettisten skaffoldien fabrikoinnissa tulee huomioida tärkeitä biofysisiä tekijöitä, kuten materiaalit, kolmiulotteiset geometriat, huokoisuus, permeabiliteetti (läpäisemiskyky) ja hajoamisnopeus (Shafiee & Atala, 2017).

Yksinkertaisin verisuonta mallintava skaffoldi on kolmiulotteiseen hydrogeeliin (tarkemmin käsitelty kappaleessa 4.3) kaavoitettu ontto kanava, johon istutetaan viljeltäviä soluja. Hydrogeelin tarjoamasta mikroympäristöstä riippuen solut voivat pysyä ennalta määritetyssä geometriassaan tai haarautua vapaasti soluväliaineeseen luoden uusia kytköksiä. Kanavissa oleviin soluihin voidaan vaikuttaa erilaisin mikroympäristön olosuhtein, esimerkiksi aiheuttamalla verenkiertoa muistuttavaa virtausta kasvatusliuoksella.

Soluperäiset matriksit ovat biologisesti tuotettuja skaffoldeja. Ne ovat soluttomia, kolmiulotteisia rakenteita, jotka sisältävät fibrillaarisia proteiineja, soluväliaineen makromolekyylejä ja kasvutekijöitä, muistuttaen natiivia, suoniverkoston omaavaa soluväliainetta. Solut poistetaan kudospalasta desellularisaatioksi kutsutun prosessin avulla, joka voidaan tehdä kudokseen muun muassa pumppaamalla detergenttiä kudoksen verisuonistoon. Desellularisoituun skaffoldiin ja sen verisuoniin on saatu kylvettyä uusia soluja onnistuneesti, mikä osoittaa potentiaalia sen monipuolisista sovelluksista kudosteknologiassa (Brovold et al., 2018). Esimerkkinä yleisesti käytetystä soluperäisestä matriksista on ohutsuolen limakalvonalaisherros (SIS, engl. small intestinal submucosa), jonka on havaittu herättävän neovaskularisaatiota, eli uusien verisuonten muodostumista, ja angiogeenisiä proteiineja. Lisäksi SIS:iä sisältävien ihonalaisten implanttien on havaittu lisäävän neovaskularisaatiota (Wang et al., 2016).

Nano- ja mikrofibrillaarisilla skaffoldeilla saadaan aikaan järjestelmällisiä, huokoisia verkostoja, jotka voidaan implantoida isäntäyksilöön. Skaffoldeja voidaan valmistaa luonnollisista tai synteettisistä materiaaleista. Nanofibrillaariset skaffoldit mahdollistavat luonnollisen kasvuympäristön kudoksille, ja niitä on saatu onnistuneesti vaskularisoitumaan *in vivo*. Ne ovat myös osoittaneet suurta potentiaalia solujen adheesion, lisääntymisen ja erikoistumisen kannalta (Gupta et al., 2014).

Kolmiulotteiset (3D, engl. three-dimensional) tulostustekniikat ovat edistyneet viime vuosina avaten ovia myös vaskulaaristen rakenteiden tulostamiselle. Biotulostaminen mahdollistaa

erilaisen kolmiulotteisten geometrinen verkostojen ja kanavien mallintamisen. Tulostetut verkostot voidaan tehdä niin kutsutusta uhrimateriaalista, joka myöhemmin poistetaan hydrogeelistä ja jäljelle jää lumenisoitu rakenne. Sopivilla biomusteilla voidaan tulostaa myös templaatteja, skaffoldeja tai itse verisuonirakenteita (Kolesky et al., 2016; Lei et al., 2019).

Keinotekkoisten verisuonten kehittämistä on saatu huomattavasti edistettyä mikroskaalan teknologioiden ja mikrofluidistiikan kautta. Mikrofluidistiset systeemit yhdistävät hydrogeelit mikrofäbrikaatiotekniikoihin ja mahdollistavat korkean suoritustehon tutkimusten suorittamisen. Systeemeillä pystytään kontrolloimaan mekaanisia ja kemiallisia ominaisuuksia, nesteiden läpivirtausta ja solujen järjestäytymistä, helpottaen luonnollisten suonten mallintamista kolmiulotteisissa rakennelmissa (Haase & Kamm, 2017; Hasan et al., 2014). Mikrofluidistista systeemiä, jolla kasvatetaan tietyn elimen tai kudoksen solutyyppejä tavoitteena mallintaa sen toimintaa, kutsutaan organ-on-chipiksi. Yksinkertaisimmillaan organ-on-chip-systeemi sisältää yhtä solutyyppeä aktiivisessa mikroympäristössään, mutta tutkimustarkoituksesta riippuen tekniikalla on kuitenkin mahdollista mallintaa lähes mitä tahansa kudostyyppieä yhteisviljelemällä soluja ja säätelemällä niiden mikroympäristöä. Vasculature-on-chip-systeemeillä pystytään luomaan malleja, joilla voidaan tutkia verisuonikudosten kasvua ja toimintaa, tautimallinnuksia ja lääkekehitystä. On-chip systeemejä voidaan myös kehittää implanteiksi (Haase & Kamm, 2017).

### ***3.1.2. Soluperäiset tekniikat***

Angiogeneesin ja vaskulogeneesin mekanismeja voidaan hyödyntää muodostamaan 3D-hydrogeeleihin kontrolloituja verisuonirakenteita. Menetelmät sisältävät biomateriaalien, kasvutekijöiden ja solujen yhteisviljelyn erilaisia yhdistelmiä.

Verkostojen muodostumista voidaan tukea toiminnallisilla biomateriaaleilla. Skaffoldien materiaaleihin voidaan lisätä toiminnallisia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa solujen haarautumiseen, migraatioon ja järjestäytymiseen. Tämä voidaan saada aikaiseksi lisäämällä biomateriaaleihin soluja, angiogeenisiä kasvutekijöitä tai soluväliaineen makromolekyylejä. Hydrogeeliin voidaan lisätä soluja valmistusvaiheessa, jolloin ne sijaitsevat geelin pinnalle levittäytymisen sijaan geelin sisällä. Varsinkin monen eri solutyypin yhteisviljelyn geelissä on osoitettu indusoivan solujen järjestäytymistä tubulaarisiksi kokonaisuuksiksi. Kasvutekijöiden

lisääminen hydrogeeliin takaa niiden pitkäaikaisen ylläpidon, sillä kasvutekijöitä vapautuu säästeliäästi hydrogeelin hajoamisen ajan (Novosel et al., 2011). Endoteelisolulla on tapana liikkua kohti korkeita kasvutekijäpitoisuuksia, jolloin ne muodostavat kapillaarirakenteita niille alueille (Hasan et al., 2014).

Yhdistämällä skaffoldi- ja soluperäisiä tekniikoita voidaan myös pyrkiä tuottamaan suoniverkostoja siirteisiin ennen niiden istuttamista isäntään, jotta anastomoosi isäntäkudoksen kanssa tapahtuisi suuremmalla todennäköisyydellä. Siirteiden vaskularisaatio voidaan toteuttaa joko *in vitro* tai *in vivo*. *In vitro* -menetelmillä muun muassa endoteelisoluja istutetaan skaffoldeihin, joita viljellään kolmiulotteisen verkoston kasvattamiseksi. Skaffoldi valmiine verkostoineen istutetaan iskeemiselle alueelle anastomoitumaan, eikä isännän tarvitse itse kasvattaa suonistoa tuotettujen kudosten sisään. *In vitro* -menetelmän epäkohta on, että kasvatettujen suonten perfuusionopeudet ovat hitaampia kuin *in vivo* vaskularisaatiossa, sillä niitä ei välttämättä voi mikrokirurgisesti liittää isännän verenkiertoon (Novosel et al., 2011). *In vivo* vaskularisaatiossa mikrokirurgisilla anastomoositekniikoilla istutettuun soluttomaan, huokoiseen skaffoldiin tapahtuu vaskularisaatiota isännän kautta. Verisuonten kypsyminen tapahtuu niille relevantissa mikroympäristössä ilman immuunivasteriskejä. Onnistuneen vaskularisaation jälkeen skaffoldi siirretään iskeemiselle alueelle, menetelmän vaatiessa näin kolmea kirurgista toimenpidettä (Novosel et al., 2011; Yang et al., 2020).

## 4. Optimaalisen verisuonimallin vaatimukset

Ihanteellisesti onnistuneessa kasvatetussa verisuonistossa solut ovat tarpeeksi lähellä mallinnettua verisuoniverkostoa aineiden toimivan kuljetuksen takaamiseksi. Mallinnettujen suonien sisäpintaa vuoraa toimiva endoteeli, ja mikäli verisuoniverkostoa käytetään siirteenä, sen tulee helposti integroitua isännän verisuonistoon. Onnistunut verisuonimalli vaatii monta tekijää, kuten verisuoniston soluja ja niiden lisääntymiselle ja toiminnalle sopivat olosuhteet mahdollistavan mikroympäristön (Yang et al., 2020).

### 4.1. Solut

Yksi kudosteknologian haasteista on sopivien solujen ja tarpeeksi suurten solumäärien löytäminen. Käytettyjen solujen tulee olla aktiivisia lisääntymään, helposti kerättävissä sekä kykeneviä suorittamaan erikoistuneita toimintojaan ja ne eivät saa aiheuttaa immuunireaktiota (Rabkin & Schoen, 2002). Kudosteknologiassa käytetyt solut voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: potilaan omat solut (autologiset), toisen ihmispotilaan tai luovuttajan solut (allogeeniset) tai eläinperäiset solut (xenogeeniset) (Ikada, 2006). Potilaan omat solut eli autologiset solut koetaan kaikista sopivimmaksi niiden korkean aktiivisuuden takia. Lisäksi niiden kanssa ei ilmene samanlaisia riskejä immuunivasteen kanssa, kuten allo- tai xenogeenisillä soluilla. Autologisia soluja on kuitenkin vaikea kerätä riittäviä määriä, ja pieniä määriä kerättyjä soluja tulee viljellä *in vitro* tarkasti kontaminaatiota välttäen, mikä puolestaan vie aikaa. Tämän takia myös allogeneisiä soluja voidaan käyttää joissain sovelluksissa, yleisimmin ihokudosten fabrikoinnissa.

Endoteelisolujen keskeinen rooli verisuonimalleissa on selkeä. Tietyille kudoksille spesifisten, loppuun erikoistuneiden endoteelisolujen saamiseen liittyy kuitenkin itsessään paljon haasteita, kuten rajoitettu lisääntymiskyky ja toiminnalliset haasteet *in vitro* viljelmissä, puhumattakaan luovuttajien vaihtelevuudesta ja haastavista operaatioista. Näiden lisäksi endoteelisolut eivät myöskään yksinään riitä ylläpitämään pitkäaikaista toimivaa verisuonikudosta, vaan fabrikoinnissa tarvitaan myös verisuonirakenteiden tukisoluja, kuten muraalisoluja ja fibroblasteja (Ikada, 2006; Yang et al., 2020).



Endoteelisolujen käytön heikot puolet ovat johtaneet muiden solulähteiden käyttöön VTE:n sovelluksissa, ja kantasolujen käyttö on osoittautunut tulokselliseksi tekniikaksi. Verisuonimalleissa käytetään laajaa kirjoa erilaisia kantasolutyyppejä, kuten pluripotentteja kantasoluja, multipotentteja aikuisen kantasoluja ja progenitorisoluja (Yang et al., 2020).

#### ***4.1.1. Endoteelisolut***

Verisuonia mallintaessa käytetään muun muassa ihmisperäisiä mikrovaskulaarisia endoteelisoluja (HMVEC, engl. human microvascular EC) ja napalaskimon endoteelisoluja (HUVEC, engl. human umbilical vein EC). Koska molempia soluja on helppo kerätä muun muassa ihosta ja napanuorasta, ne ovat erittäin laajassa käytössä. Varsinkin HUVEC:ja on käytetty erityisen ahkerasti ja pitkän ajan. Niiden ominaisuudet ja käyttäytyminen ovat hyvin tunnettuja, mikä puolestaan rohkaisee niiden käyttöä yhä enemmän (Park et al., 2006).

#### ***4.1.2. Tukisolut: Muraalisolut ja fibroblastit***

Nopeuttaakseen endoteelisolujen järjestäytymistä ja stabilisoidakseen muodostuvaa verisuonta, endoteelisolujen kanssa usein yhteisviljellään muraalisoluja ja fibroblasteja (Song et al., 2018). Esimerkiksi SMC:iden yhteisviljelmä EC:iden kanssa hydrogeelillä kehitti SMC:iden lisääntymistä, verkostojen muodostamista ja elastiinisynteesiä (Hasan et al., 2014). Muraalisolut erilaisilla fenotyypeillä, eri kehitysvaiheista ja erilaisista lähteistä kykenevät elämään sovussa tietynlaisissa olosuhteissa. Tämä ja muraalisolujen tärkeä rooli angiogeenisissä korostaa niiden potentiaalia VTE:ssä (Yang et al., 2020).

Fibroblasteja ei käytetä suoraan verisuonten mallintamisessa, mutta niillä on kyky tuottaa kollageeni-, elastiini- ja fibronektiinipitoisia soluväliaineita, osoittaen niiden potentiaalia soluväliaineen tuottamisen sovelluksissa (Song et al., 2018). Lisäksi niiden sisällyttäminen verisuonimallien hydrogeeleihin stabiloi ja auttaa endoteelisoluja järjestäytymään verkostoiksi vaikuttamalla soluväliaineen synteesiin. Fibroblastit myös erittävät angiogeenisiä kasvutekijöitä ja vaikuttavat haarautumiseen ja lumenin muodostumiseen (Newman et al., 2011).

### ***4.1.3. Kantasolut ja progenitorisolut***

Kantasolujen ja progenitorisolujen (edeltäjäsolujen) uusiutumiskyky niiden mahdollistaa helpon *in vitro* -kasvattamisen, ja niiden erikoistumispotentiaali sallii erikoistumisen sekä endoteelisolujen edeltäjiksi (VEGF:n vaikutuksen alaisena) että muraalisoluiksi (PDGF:n indusoimana) (katso kappale 4.2.1. *Kasvutekijät*).

Sovelluksissa käytetään paljon pluripotentteja kantasoluja, kuten alkion kantasoluja (ESC, engl. embryonic stem cell) ja indusoituja pluripotentteja kantasoluja (iPSC, engl. induced pluripotent stem cell). Näiden lisäksi käytössä on myös multipotentteja aikuisen kantasoluja, kuten mesenkymaalisia kantasoluja (MSC, engl. mesenchymal stem cell) ja progenitorisoluja, kuten endoteelisiä progenitorisoluja (EPC, engl. endothelial progenitor cell) (Novosel et al., 2011; Yang et al., 2020).

#### *4.1.3.1. Pluripotentit kantasolut*

Alkion kantasoluja saadaan johdettua blastokystien sisäisestä solumassasta. Näillä pluripotentteilla kantasoluilla on kyky erikoistua mihin tahansa somaattiseen solutyyppiin sekä kattava lisääntymiskyky. Niiden käyttöä kuitenkin varotaan niitä ympäröivien eettisten kysymysten takia. Niillä on myös teratogeenisiä, eli epämuodostumia aiheuttavia piirteitä, ja lisäksi niistä on vaikea saada potilasspesifisiä (Brovold et al., 2018; Yang et al., 2020).

Näistä syistä yleisemmin käytössä ovat indusoidut pluripotentit kantasolut, joita voidaan johtaa potilaan somaattisista soluista tiettyjen transkriptiotekijöiden avulla kiertäen näin ongelmat biokompatibiliteetin eli yhteensopivuuden ja kudosten riittävyyden suhteen. Nämä solut kykenevät alkion kantasolujen tavoin erikoistumaan aikuisen kudoksiksi, ja niitä, jotka erikoistuvat endoteeliseluiksi, kutsutaan iPSC-EC:iksi. iPSC-EC:t endoteelisolujen tapaan muodostavat muun muassa tubulaarisia rakenteita ja tuottavat typpioksidia hydrogeelillä. Altistus PDGF:lle (katso kappale 4.2.1. *Kasvutekijät*) mahdollistaa niiden erikoistumisen myös iPSC-VSMC:iksi, jotka muun muassa kykenevät reagoimaan vasokonstriktiivisiin ärsykkeisiin, ja myös perisytyttien kaltaisia soluja on saatu ohjelmoitua. iPSC:t osoittavat suurta potentiaalia kudosteknologissa

sovelluksissa, koska niiden menetelmillä saadaan erikoistettua potilasspesifejä endoteeli- ja muraalisoluja (Patsch et al., 2015; Yang et al., 2020).

Potentiaalinen riski kasvainten kehittymiselle vastaanottajissa tiettyjen iPSC-linjojen aiheuttamana on herättänyt huolta niiden käytön suhteen. Siksi iPSC-terapiaissa tulee testata tuumorigeenisyyttä ja jakaututumiskäyttäytymistä niiden turvallisen käytön varmistamiseksi. Tämän lisäksi on syytä tarkkailla solujen geneettistä stabiilisuutta, jotta saadaan lisätietoa niiden kyvystä eliminoida geneettisiä mutaatioita (Yang et al., 2020).

#### *4.1.3.2. Endoteeliset progenitorisolut*

Alkion vaskulogeneesissä muodostuvat angioblastit ovat endoteelisiä progenitorisoluja. Aikuisella endoteelisiä progenitorisoluja löytyy verenkierrosta, jossa ne osallistuvat vaurioituneen endoteelin korjaamiseen. Ne ovat kykeneviä muodostamaan itsenäisesti lumenisoituja rakenteita hydrogeelissa, ja ovat myös muodostaneet vaskulaarisia rakenteita niin kutsutuissa 3D-sferoidikulttuureissa. Ihonalaisena Matrigel-siirteenä (katso kappale 4.3.1. *Luonnolliset biomateriaalit*) hiirelle MSC:jen kanssa ihmisen EPC:t muodostivat lumenisoituja, punasoluja sisältäviä suonia, ja EPC:itä on käytetty endotelisoimaan vaskulaarisia siirteitä *in vitro*, osoittaen EPC:iden olevan kannattava valinta prevaskularisoitavissa kohteissa (Melero-Martin et al., 2008; Yang et al., 2020).

#### *4.1.3.3. Mesenkymaaliset kantasolut*

Mesenkymaalisia kantasoluja löytyy muun muassa luuytimeistä ja rasvakudoksesta, mikä tekee niiden keräämisestä suhteellisen helppoa. Niillekin saadaan tehokkaasti erikoistettua endoteelisolujen ominaisuuksia oikeilla aineilla indusoituna, jolloin ne ilmentävät endoteelisoluille tuttuja markkereita ja kykenevät muodostamaan verkostoja hydrogeelillä. Injektoituna iskeemiseen hiirikudokseen, ihmisen MSC-EC:t helpottivat angiogeneesiä ja perfuusiota. MSC:iden on huomattu myös tukevan vaskulaarisia rakenteita muun muassa erittämällä VEGF:ää (katso kappale 4.2.1. *Kasvutekijät*) vaikuttaen sekä angiogeneesiin että EPC:iden erikoistumiseen EC:iksi. Näiden

lisäksi myös MSC:t pystyvät erikoistumaan SMC:den spesifisiä markkereita ilmentäviksi soluiksi (Narita et al., 2008; Yang et al., 2020).

## **4.2. Mikroympäristö**

Solujen mikroympäristö vaikuttaa laajasti niiden käyttäytymiseen, ja verisuonimalleissa tavoitteena onkin mallintaa suonten luonnollista mikroympäristöä, jotta mallit vastaisivat *in vivo*-vastineitaan mahdollisimman hyvin. Angiogeneesiä stimuloivat kasvutekijät ja veren virtausta mallintavat mekaaniset virtaukset ohjaavat solujen käyttäytymistä.

### **4.2.1. Kasvutekijät**

Tärkein verisuonten muodostumiseen vaikuttavista kasvutekijöistä on verisuonen endoteelin kasvutekijä (VEGF, engl. vascular endothelial growth factor). VEGF stimuloi endoteelisolujen replikaatiota. Se myös lisää suonen permabiliteettia, mikä helpottaa solujen migraatiota uusien suonten muodostamiseksi (Kerr et al., 2011). VEGF:llä on vaikutuksia myös alkion vaskulogeneesissä, jossa se vaikuttaa EPC:iden erikoistumiseen ja lisääntymiseen endoteeliputkien muodostamiseksi (Gilbert, 2000). VEGF ei kuitenkaan yksin riitä tuottamaan kypsiä, vakaita verisuonistoja (Jain et al., 2005).

Perisytytien erittämä angiopoietiini-1 (Angpt) säätelee vaskulogeneesissä endoteelisolujen, perisytytien ja tyvikalvon vuorovaikutusta mahdollistaen endoteelisolujen migraation perivaskulaariseen tilaan (McMahon & McCarthy, 2011). Fibroblastien kasvutekijä (FGF) vaikuttaa vaskulogeneesissä hemangioblastien kehittymiseen (Gilbert, 2000), ja angiogeneesissä se stimuloi endoteelisolujen lisääntymistä ja migraatiota. Verihiutalekasvutekijällä (PDGF, engl. platelet-derived growth factor) on rooli perisytytien rekrytoinnissa, stabiloiden suonta ja sen kypsymistä (Kerr et al., 2011).

#### **4.2.2. Mekaaniset ominaisuudet**

Verisuoniston fysiologisia olosuhteita pyritään mallintamaan simuloimalla verisuonikudoksiin vaikuttavia hemodynaamisia voimia, joita muun muassa veren virtaukset aiheuttavat. Endoteelisoluihin kohdistuvat voimat vaikuttavat niiden morfologiaan ja toimintaan, joten niiden mallintaminen *in vitro* on tärkeää, mikäli halutaan täysin mallintaa verisuonten toimintaa.

Mikrofluidistisissa kanavissa on helppo saada aikaan virtauksia monin eri menetelmin, kuten mekaanisin laittein. Toisissa geometrioissa, kuten samansuuntaisissa geelikanavissa, nesteiden virtaus saadaan aikaan massaperfuusiolla (engl. bulk perfusion), joissa käytetään suuria kasvatusliuosmääriä ja geelin alueen paine-eroja. Virtaukset aiheuttavat kanaviin leikkausjännitystä (engl. shear stress), jonka tiedetään vaikuttavan endoteelisolujen välisiin liitoksiin suorasti ja SMC:iden käyttäytymiseen endoteelisolujen signaalien kautta (Haase & Kamm, 2017; Seifu et al., 2013).

#### **4.3. Hydrogeelit**

Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia polymeeriverkostoja, jotka rakenteeltaan muistuttavat soluväliainetta. Yksi tärkeimmistä hydrogeelien ominaisuuksista on niiden hydrofiilinen rakenne, joka mahdollistaa merkittävien nestemäärien pidättämisen ilman, että ne liukenevat korkeissa vesipitoisuuksissa. Vesipitoisuus ja huokoisuus helpottavat aineiden diffuusiota, mikä on tärkeä ominaisuus verisuonimalleissa. Hydrogeelin soluväliaineen viskoelastisuutta muistuttava rakenne antaa ympäröiville soluille luonnollista rakenteellista tukea. Riippuen hydrogeelin käyttötarkoituksesta ja sen valmistukseen käytettävistä materiaaleista, hydrogeeli voi olla enemmän tai vähemmän jäykempää (Mantha et al., 2019).

Vaskulaarisia rakenteita mallintaessa hydrogeelin ominaisuuksilla on suuri merkitys. Jäykemmät geelit saavat aikaan suonille luonnollisemman morfologian, tukevat suonten rakenteita sekä kestävät virtauksia, kun taas löysemmät geelit antavat parempia mahdollisuuksia haarautumiselle ja neovaskularisaatiolle (Haase & Kamm, 2017). Mahdollisuus hapen ja ravintoaineiden diffuusiolle muistuttaa hyvin paljon verisuonten luonnollista toimintaa ja mikroympäristöä.

Hydrogeelit voidaan jakaa luonnollisiin ja synteettisiin hydrogeeleihin. Luonnollisilla hydrogeeleillä on adheesiokykyä ja biokompatibiliteettia, ja ne muistuttavat vahvasti solujen luonnollista soluväliainetta (Segura et al., 2005). Tästä syystä luonnollisiin hydrogeeleihin voidaan istuttaa soluja jo fabriikaatioprosessin aikana (Seifu et al., 2013).

#### ***4.3.1. Luonnolliset biomateriaalit***

Kollageenilla, soluväliaineen luonnollisella komponentilla on tärkeitä rooleja sekä solujen toiminnan säätelyssä että angiogeneesissä. On olemassa monia eri tyyppin kollageeneja, mutta yleisin sekä kudosteknologiassa sekä ihmiskehossa on tyyppin I kollageeni. Kollageeni on yleisessä käytössä kudosteknologisissa sovelluksissa sen monipuolisuuden takia; sen mekaniikkaan voi helposti vaikuttaa lämpötilan, pH:n ja proteiinikonsentraation muutoksilla (Haase & Kamm, 2017; Yang et al., 2020). Kollageenimatrikseilla on adheesiokykyä, ja niiden on havaittu edistävän EC:iden ja SMC:iden lisääntymistä (Seifu et al., 2013). Myös kollageenijohdannaista gelatiinia käytetään hydrogeeleissä sen helpomman muokattavuuden takia (Xie et al., 2020). Tämän lisäksi gelatiinista tekevät tehokkaan hydrogeelin sen korkea biokompatibiliteetti ja sen kyky adsorboida vettä (Kuijpers et al., 2000).

Hyvin usein fibriiniä käytetään yhdistelmägeelinä kollageenin kanssa, koska sillä on taipumusta jäykistyä mekaanisen stressin alaisena. Syntetisoitu yhdistelmägeeli mahdollistaa ideaaliset olosuhteet endoteelisolujen verkostoitumiseen. Fibriinin etuna on, että sitä saadaan helposti eristettyä potilaan verenkierrosta fibrinogeenina ja trombiinina, mutta haittapuolena on sen nopea hajoaminen. Fibriinin ominaisuudet ovat samankaltaiset, kuin kollageenilla, ja sillä on myös havaittu angiogeenisiä piirteitä, jonka takia se soveltuu oivallisesti verisuonten mallintamiseen (Ozolat & Hospodiuk, 2016; Yang et al., 2020). Fibriinin lisäksi vaskulaareja mallintaessa hydrogeeleissä käytetään myös muun muassa elastinia, fibronektiiniä, trombiinia ja laminiinia antamaan hydrogeelille toivottuja piirteitä.

Matrigel, joka tunnetaan myös Engelbreth–Holm–Swarm (EHS) -matriksina, on hiiren sarkooman tyvikalvosta peräisin olevaa soluväliainetta, jota on muokattu kaupalliseen käyttöön. Matrigelin tarjoama kasvuympäristö tukee angiogeneesiä, solujen lisääntymistä ja solujen erilaistumista (Xie

et al., 2020). Matrigeliä käytettäessä on havaittu korkeaa endoteelisolujen viabiliteettiä eli elinkykyisyyttä (Ozolat & Hospodiuk, 2016).

Hyaluronihappo (HA, engl. hyaluronic acid) ja agaroosi kuuluvat hydrogeeleissä käytetyimpien polysakkaridien joukkoon. Hyaluronihappo on tärkeä komponentti muun muassa alkionkehityksessä säädellessä solujen liikettä, lisääntymistä ja angiogeneesiä. Lisäksi se tukee solujen adheesiota. Sen nopea hajoaminen tekee siitä kuitenkin puutteellisen hydrogeelinä, joten sitä muokataan kemiallisesti niihin tarkoituksiin (Ozolat & Hospodiuk, 2016).

#### ***4.3.2. Synteettiset biomateriaalit***

Synteettiset biomateriaalit antavat enemmän joustavuutta muokata kemiallisia rakenteita ja mekaanisia ominaisuuksia. Kun materiaaleja tuotetaan synteettisesti, niiden elastisuutta ja hajoamista voidaan helposti säädellä. Lisäksi geelien laatu on tasaisempaa, tuottaen vakaampia tutkimustuloksia.

Polyetyleeniglykolia (PEG) käytetään laajalti hydrogeelinä sen biokompatibiliteetin takia. PEG-hydrogeelit sopivat hyvin solujen sisällyttämiseen geeliin, mutta sen huonon adheesiokyvyn vuoksi se vaatii modifikaatioita solujen kasvattamiseksi sen pinnalla (Zhang et al., 1998). PEG-hydrogeelejä voidaan muokata helposti ja niitä esiintyy monilla erilaisilla rakenteilla ja funktionaalisilla ryhmillä, joista yleisimmin käytössä on PEG-diakrylaatti (PEGDA) (Novosel et al., 2011).

Vaikka polylaktidia (PLA) ja polyglykolidia (PGA) käytetään erikseenkin hydrogeeleinä, Polylaktidin hydrofobisuutta ja polyglykolidin huonoa liukoisuutta helpottavat, kun ne polymerisoidaan yhdessä poly(laktidi-ko-glykolidiksi) (PLGA). PLGA:n ominaisuuksia voidaan helposti säädellä PLA:n ja PGA:n konsentraatioiden muutoksilla (Cheng et al., 2009).

Luonnollisia biomateriaaleja voidaan muokata synteettisesti. Sekä luonnollisten että synteettisten hydrogeelien fabrikointiin käytettäviä polymeerejä voidaan yhdistää, jotta saavutetaan toivotut ominaisuudet. Esimerkiksi gelatiinia ja hyaluronihappoa voidaan metakryloida muodostaen metakryloitua gelatiinia (GelMA) ja metakryloitua hyaluronihappoa (HAMA), joita käytettäessä MSC:den kanssa havaittiin lisääntynyttä vaskularisaatiota (Yang et al., 2020).

### ***4.3.3. Hydrogeelien hajoaminen***

Hydrogeeleille oleellinen ominaisuus on niiden biohajoavuus. Koska ne toimivat tukena kasvaville kudoksille, niiden tulee ajan myötä hajota samaan tahtiin kuin soluja kasvaa ja kudosta uusiutuu. Liian nopea hajoaminen voi johtaa solukuolemiin ja siten kudoksen uusiutumisen epäonnistumiseen, ja liian hidas hajoaminen voi tukehduttaa kasvavia soluja ja aiheuttaa immunogeenisen reaktion (Mantha et al., 2019).



## 5. Tulevaisuus

Kudosteknologian päätavoite, kokonaisten ja toimivien kudosten ja elinten fabrikointi potilaiden terveyden edistämiseksi, on jatkuvan kehityksen kohteena. 3D-tulostamisen erilaiset sovellukset ovat esimerkkejä potentiaalisista lähestymistavoista kudosteknologian ongelmien ratkaisuun. Vaikka tekniikassa on edistytty viime vuosien aikana, on kokonaisen, monimutkaisen ja toimivan verisuoniverkoston omaavien elinten teettäminen vielä pitkän matkan päässä, minkä takia tutkimuksia tehdäänkin jatkuvasti ympäri maailmaa.

Onnistuneen vaskularisaation saavuttaminen on merkittävä haaste kudosteknologian sovelluksissa ja sen ratkaisemiseksi on kehitetty lukuisia menetelmiä, kuten verisuoniperäisten solujen ja angiogeenisten tekijöiden käyttäminen, skaffoldien ja hydrogeelien soveltaminen *in vivo* ja *in vitro* sekä kehittyneemmät menetelmät, kuten 3D-biotulostaminen ja mikrofluidistiset sovellukset. Kaikkia menetelmiä yhdistävät niiden yhteiset tavoitteet ja optimaaliset vaatimukset, kuten vaskulaarisia rakenteita mallintavat solut ja näiden solujen toimintaa ohjaava mikroympäristö.

Vaikka menetelmiä on monia ja osa on suunniteltu tutkimustarkoituksiin ja osa hoitomenetelmiksi, on hyvä muistaa, ettei ole olemassa yhtä oikeaa ratkaisua, joka toimisi jokaiseen vastaantulevaan ongelmaan. Jatkossa mitä todennäköisimmin keksitään potilas- ja kudosspesifejä ratkaisuja poikkitieteellisin menetelmin ja sovelletaan lukuisia yhteensopivia menetelmiä vetämättä rajoja tekniikoiden välille. Parhaimpia tuloksia onkin tähän mennessä saatu yhdistämällä monia tekijöitä solujen yhteisviljelmillä, toiminnallisilla hydrogeeleillä ja monipuolisilla mikroympäristöillä.

Saavutukset tasaisten ja onttojen rakenteiden fabrikoinnissa osoittavat suurta potentiaalia kiinteiden ja monimutkaisten elintenkin mallintamiseen. Vaskulaarisen kudosteknologian avulla mallintamisen suuria haasteita työstetään jatkuvasti ja uusia ratkaisuja kehitetään koko ajan. Vaskulaarisen kudosteknologian ollessa vielä kehittyvä tieteenala, sen menetelmät etenevät koko ajan ja avaavat ovia uusien hoitomenetelmien kehittämiseksi.

## Lähteet

- Betts, J. G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Oksana, K., Kruse, D., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2013). *Anatomy & Physiology*. pp. 888–896. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/20-1-structure-and-function-of-blood-vessels>
- Brovold, M., Almeida, J. I., Pla-Palacín, I., Sainz-Arnal, P., Sánchez-Romero, N., Rivas, J. J., Almeida, H., Dachary, P. R., Serrano-Aulló, T., Soker, S., & Baptista, P. M. (2018). Naturally-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 1077, pp. 421–449. Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2\\_23](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_23)
- Chen, L., Xing, Q., Zhai, Q., Tahtinen, M., Zhou, F., Chen, L., Xu, Y., Qi, S., & Zhao, F. (2017). Pre-vascularization enhances therapeutic effects of human mesenchymal stem cell sheets in full thickness skin wound repair. *Theranostics*, 7(1), 117–131. <https://doi.org/10.7150/thno.17031>
- Cheng, Y., Deng, S., Chen, P., & Ruan, R. (2009). Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Front. Chem. China*, 4(3), 259–264. <https://doi.org/10.1007/s11458-009-0092-x>
- Gilbert, S. F. (2000). Lateral Plate Mesoderm - Developmental Biology. In *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>
- Gupta, K. C., Haider, A., Choi, Y. R., & Kang, I. K. (2014). Nanofibrous scaffolds in biomedical applications. *Biomaterials Research*, 18, 5. <https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-5>
- Haase, K., & Kamm, R. D. (2017). Advances in on-chip vascularization. *Regenerative Medicine*, 12(3), 285–302. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0152>
- Hasan, A., Paul, A., Vrana, N. E., Zhao, X., Memic, A., Hwang, Y. S., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2014). Microfluidic techniques for development of 3D vascularized tissue. *Biomaterials*, 35(26), 7308–7325. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.091>
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(10), 589–601. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>
- Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G., & Fukumura, D. (2005). Engineering vascularized tissue. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 23(7), 821–823. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-821>
- Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., & Gerhardt, H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology*, 12(10), 943–953. <https://doi.org/10.1038/ncb2103>

- Kerr, P., Tam, R., & Plane, F. (2011). Endothelium. In: *Fitridge R, Thompson M, editors. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. pp. 1-11. University of Adelaide Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803058-5.00008-4>
- Kolesky, D. B., Homan, K. A., Skylar-Scott, M. A., & Lewis, J. A. (2016). Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), 3179–3184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521342113>
- Kuijpers, A. J., Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J. A., Plantinga, J. A., Engbers, G. H. M., Krijgsveld, J., Zaat, S. A. J., Dankert, J., & Feijen, J. (2000). In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *Journal of Biomedical Materials Research*, *51*(1), 136–145. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200007\)51:1<136::AID-JBM18>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200007)51:1<136::AID-JBM18>3.0.CO;2-W)
- Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rücker, M., Junker, D., Häufel, J. M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2006). Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes. *TISSUE ENGINEERING*, *12*(8), pp. 2093-2104. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2093>
- Lei, D., Yang, Y., Liu, Z., Yang, B., Gong, W., Chen, S., Wang, S., Sun, L., Song, B., Xuan, H., Mo, X., Sun, B., Li, S., Yang, Q., Huang, S., Chen, S., Ma, Y., Liu, W., He, C., ... You, Z. (2019). 3D printing of biomimetic vasculature for tissue regeneration. *Materials Horizons*, *6*(6), 1197–1206. <https://doi.org/10.1039/c9mh00174c>
- Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O., Pham, H. M., & Tran, S. D. (2019). Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. *Materials*, *12*(20), 3323. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>
- McMahon, G. S., & McCarthy, M. J. (2011). Molecular Approaches to Revascularization in Peripheral Vascular Disease. In: *Fitridge R, Thompson M, editors. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. pp. 103-114. University of Adelaide Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534276/>
- Melero-Martin, J. M., De Obaldia, M. E., Kang, S. Y., Khan, Z. A., Yuan, L., Oettgen, P., & Bischoff, J. (2008). Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circulation Research*, *103*(2), 194–202. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178590>
- Narita, Y., Yamawaki, A., Kagami, H., Ueda, M., & Ueda, Y. (2008). Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell and Tissue Research*, *333*(3), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0654-0>
- National Kidney Foundation. (2023). *Understanding the transplant waitlist* | National Kidney Foundation. Luettu: 13.4.2023. <https://www.kidney.org/content/understanding-transplant-waitlist>.

- Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D., & Hughes, C. C. W. (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: Fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular Biology of the Cell*, 22(20), 3791–3800. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0393>
- Novosel, E. C., Kleinhans, C., & Kluger, P. J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4–5), 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.004>
- Olive, P. L., Vikse, C., & Trotter, M. J. (1993). MEASUREMENT OF OXYGEN DIFFUSION DISTANCE IN TUMOR CUBES USING A FLUORESCENT HYPOXIA PROBE. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22, 397–402.
- Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V., & Chistiakov, D. A. (2014). The complexity of cell composition of the intima of large arteries: focus on pericyte-like cells. *Cardiovascular Research*, 103, 438–451. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu168>
- organdonor.gov. (2023). *Organ Donation Statistics* | [organdonor.gov](https://www.organdonor.gov). Luettu: 13.4.2023. <https://www.organdonor.gov/learn/organ-donation-statistics>.
- Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76, 321–343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>
- Park, H.-J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., & Galper, J. B. (2006). Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Offer New Insights Into the Relationship Between Lipid Metabolism and Angiogenesis. *Stem Cell Reviews*, 2, 93–101. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s12015-006-0015-x>
- Patsch, C., Challet-Meylan, L., Thoma, E. C., Urich, E., Heckel, T., O’Sullivan, J. F., Grainger, S. J., Kapp, F. G., Sun, L., Christensen, K., Xia, Y., Florido, M. H. C., He, W., Pan, W., Prummer, M., Warren, C. R., Jakob-Roetne, R., Certa, U., Jagasia, R., ... Cowan, C. A. (2015). Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*, 17(8), 994–1003. <https://doi.org/10.1038/ncb3205>
- Rabkin, E., & Schoen, F. J. (2002). Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology*, 11(6), 305–317. [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(02\)00130-8](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(02)00130-8)
- Segura, T., Chung, P. H., & Shea, L. D. (2005). DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach. *Biomaterials*, 26(13), 1575–1584. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.007>
- Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K., & Mantovani, D. (2013). Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews Cardiology*, 10(7), 410–421. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.77>
- Shafiee, A., & Atala, A. (2017). Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual Review of Medicine*, 68(1), 29–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-102715-092331>

- Song, H. H. G., Rumma, R. T., Ozaki, C. K., Edelman, E. R., & Chen, C. S. (2018). Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*, 22(3), 340–354. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.009>
- Vierimaa H, & Laurila M. (2013). Verenkierto. In *Keho Anatomia ja Fysiologia: Vols. 1.-3.* (pp. 115–120). Sanoma Pro Oy.
- Wang, W., Zhang, X., Chao, N. N., Qin, T. W., Ding, W., Zhang, Y., Sang, J. W., & Luo, J. C. (2016). Preparation and characterization of pro-angiogenic gel derived from small intestinal submucosa. *Acta Biomaterialia*, 29, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.013>
- Wilson, D. (2011). Vascular Smooth Muscle Structure and Function. In: *Fitridge R, Thompson M, editors. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* (pp. 13–24). University of Adelaide Press. <https://doi.org/10.1017/UPO9781922064004.003>
- Xie, R., Zheng, W., Guan, L., Ai, Y., & Liang, Q. (2020). Engineering of Hydrogel Materials with Perfusable Microchannels for Building Vascularized Tissues. *Small*, 16(1902838). <https://doi.org/10.1002/sml.201902838>
- Yang, G., Mahadik, B., Choi, J. Y., & Fisher, J. P. (2020). Vascularization in tissue engineering: Fundamentals and state-of-art. *Progress in Biomedical Engineering*, 2(1). <https://doi.org/10.1088/2516-1091/ab5637>
- Zhang, M., Desai, T., & Ferrari, M. (1998). Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials*, 19(10), 953–960. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00026-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00026-x)