

Mintázott sejtenyészetek készítése tintasugaras nyomtatóval

Nagy Attila, Molnár Péter

Nyugat-magyarországi Egyetem, Savaria Egyetemi Központ, Természettudományi és Műszaki Kar, Biológia intézet, Állattani tanszék
Szombathely, Károlyi Gáspár tér 4.

Összefoglalás

A sejtenyészeteken alapuló *in vitro* módszereknek a fő hátránya az *in vivo*, állatokon végzett kísérletekhez képest, hogy a tenyészet készítése során elveszik a szervekre, szövetekre jellemző komplex szerveződés. Ennek következtében számos jelenség (pld. szinaptikus plaszticitás, tanulás neuronhálózatokban) ilyen rendszereken csak nehezen vizsgálható. Az utóbbi években számos módszert fejlesztettek ki sejtenyészetek mintázására, vagyis szövetszerű tulajdonságok kialakítására *in vitro*. Ezek közül talán a legegyszerűbb a tintasugaras nyomtatás, mellyel komplex, több sejttípusból álló, összetett geometriájú sejtenyészetek hozhatók létre. A módszer beállítása érdekében egy HP Deskjet 440 c nyomtatót alakítottunk át.

Kiiktattuk a papíradagolót és kívülre helyeztük a fotocellás papírzékelőt, ami a nyomtatóban elindítja a nyomtatási folyamatot, valamint építettünk egy állványt, mely lehetővé tette a tárgylemezekre és a fedőlemezekre való nyomtatást. A nyomtatót kezelő szoftverként MS Office Word 2013 programot használtunk, mellyel a grafikus formákat megalkottuk.

A tintával nyomtatott ábrákon végzett mérésekkel megkaptuk a minimális nyomtatható vonalvastagságot 1pt ~ 0,300 mm és a maximális vonal vastagságot 16pt ~ 4,8 mm. Biotintaként poly-L-lysine-t (PLL) használtunk, mely vegyületet neuronális tenyészetekben gyakran alkalmaznak felületkezelésre. Különböző vastagságú PLL vonalakat nyomtattunk fedőlemezekre.

Az így felületkezelt, felület nyomtatott fedőlemezeket csirke embrió kiperarált neuronjaiból álló sejtés oldatba helyeztük. A nyomtatott formákon megtapadtak és differenciálódtak a neuronok. A párhuzamosan, közel nyomtatott vonalakon a neuronok axonjai egymással hidat képeztek. A módszerrel létrehozott neuronális mintázatokon fiziológiai, farmakológiai és toxikológiai vizsgálatokat fogunk végezni, egyrészt, hogy több sejttípusból álló összetett, funkcionális szövet-analógokat hozzunk létre és bemutassuk, hogy az ilyen rendszerek mennyiben adnak több információt az egyszerűbb *in vitro* rendszereknél.

Módszerek

Bio printer készítése

Az átalakítást egy HP Deskjet 440 c nyomtatón végeztük el. Ez az átalakítás sok tintasugaras nyomtatón elvégezhető, de azért választottunk egy régi fajta nyomtatót, mert patronjai könnyen tisztíthatók és a nagyobb méretű fűvókák kevésbé tömődnek el. A nyomtató felbontása 300 dpi.

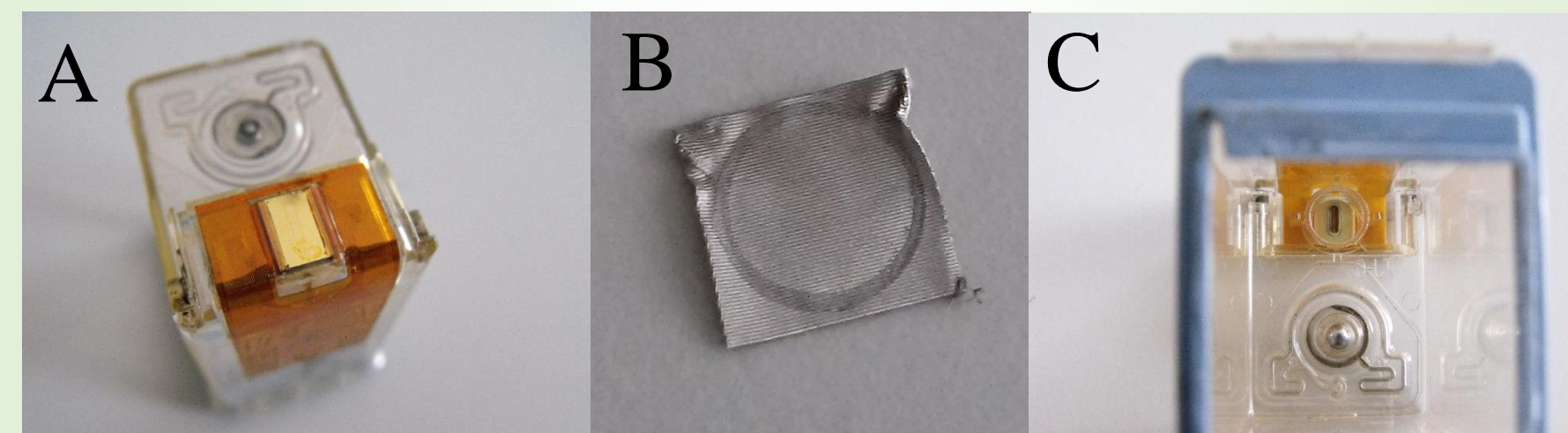


A képeken a nyomtató elkészítésének főbb lépései láthatók.

1. Burkolat eltávolítása. 2. Állvány 3. Takarítás, magasság beállítása 4. Összeépítés, kezelő gombok, papír érzékelő kiemelése

A tintapatronok tisztítása

A patronok könnyen tisztíthatók. A tisztítás teljes folyamata kb. 1 órát vett igénybe.

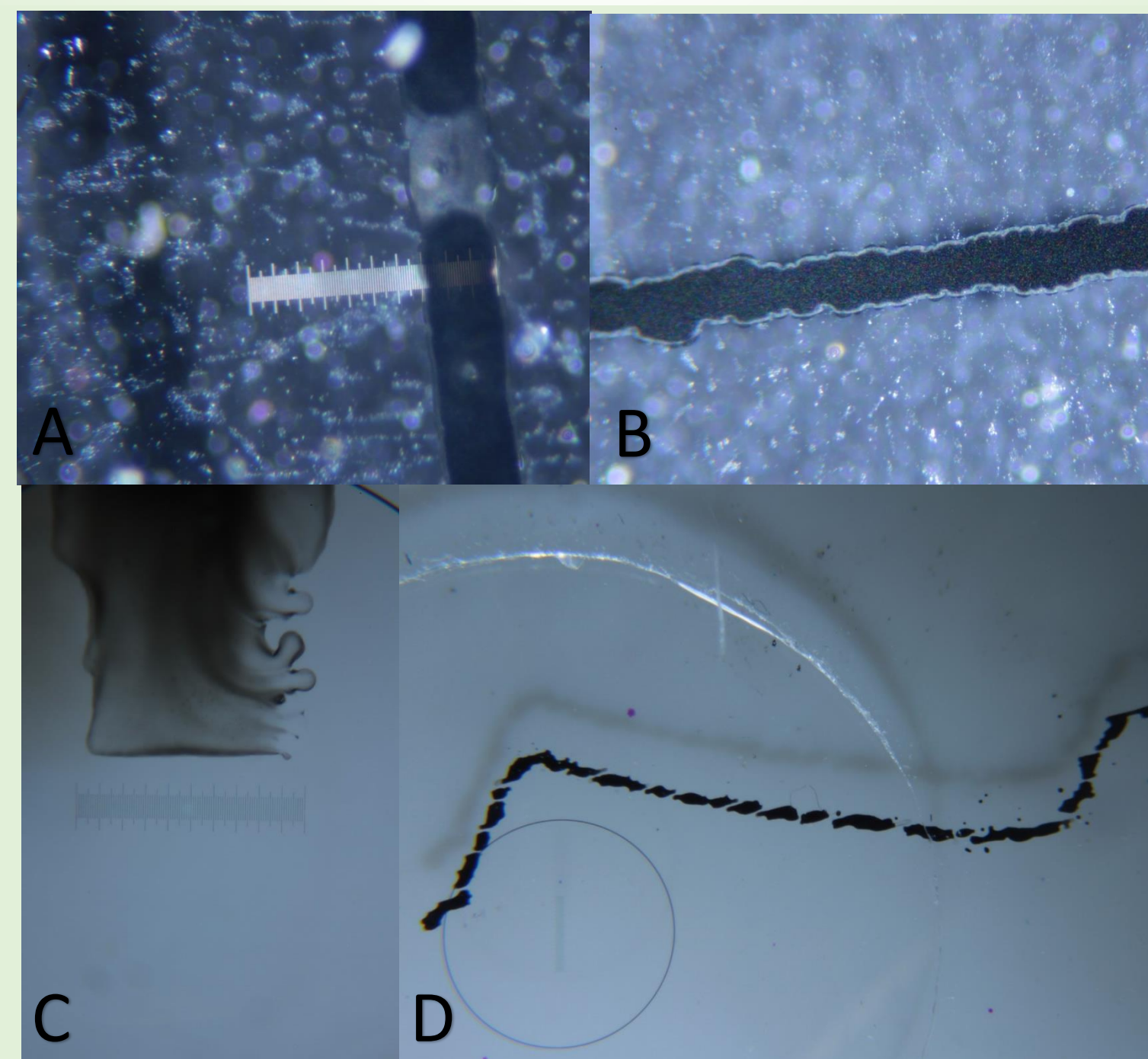


A: Kitakarított tinta patron alulnézetből B: Patron belsejében található szűrő
C: Kitakarított tinta patron belül nézeti képe

- 1) A tinta patron fedelét lefűrészeltük
- 2) A patron belsejében található szűrőt eltávolítottuk
- 3) Többszörös átmosás után cloroxsal kezeltük 5 percig
- 4) Denaturált szesszel átmostuk
- 5) 90s-ig szonikáltuk deszt. vízben
- 6) Alkohollal fertőtlenítettük, majd megszáritottuk

Nyomtatás

A nyomtatót kezelő szoftverként MS Office Word 2013 programot használtunk, mellyel a grafikus formákat megalkottuk. Először tintával nyomtattunk a tárgylemezekre. Egy steril fedőlemezt az állványra helyeztünk. A steril patronba 400 mikro liter (PLL)-t pipettáztunk. Miután kész a felület nyomtatása, a tárgylemezeket behelyeztük 24-lyukú plate-ekbe, és 500 mikro liter 9 napos csirke embrió kisagyi neuronjaiból készített sejtés oldatot pipettáztunk rá. 37 °C -on 5%-os CO₂ 4-5 napig tenyésztettük.



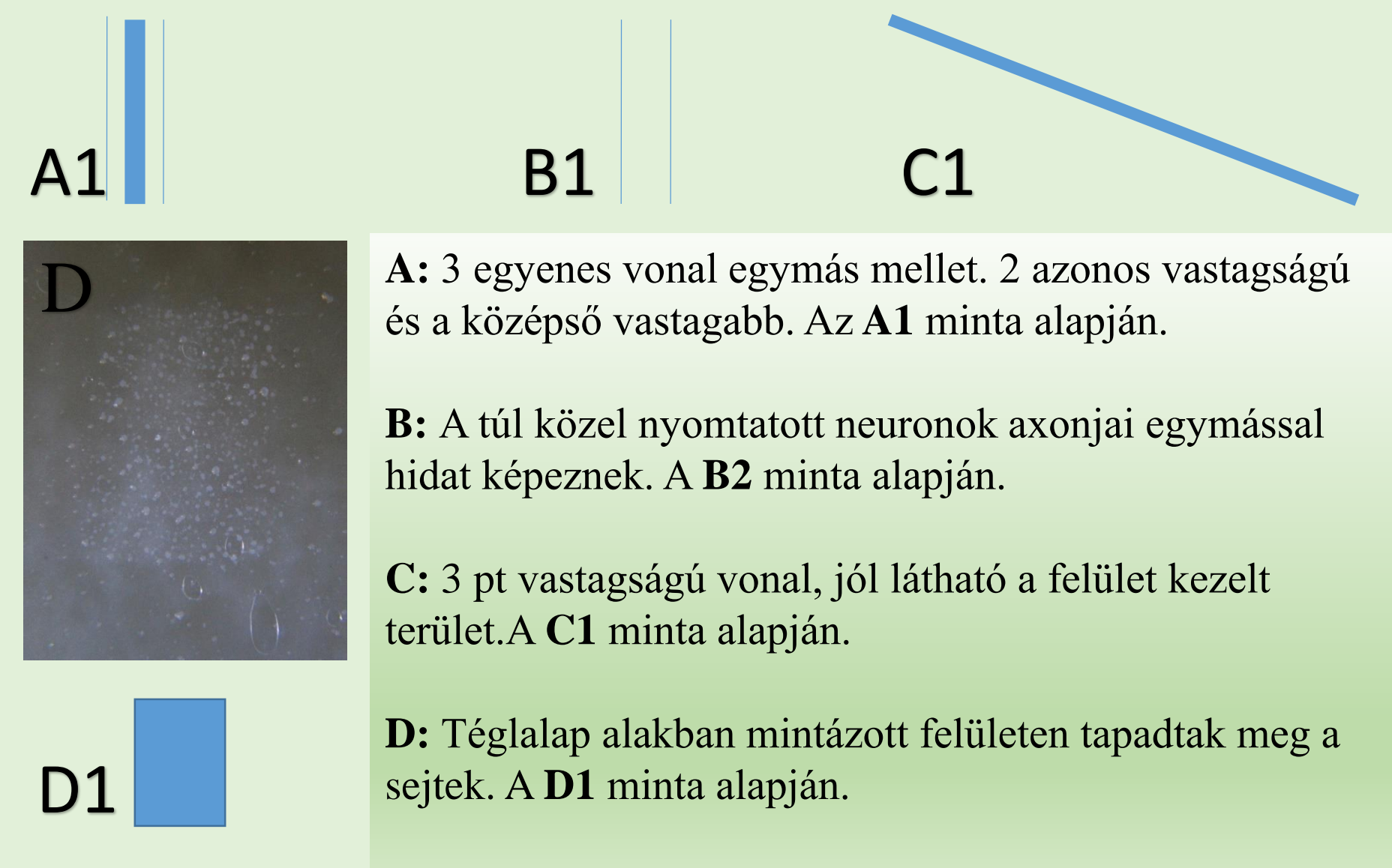
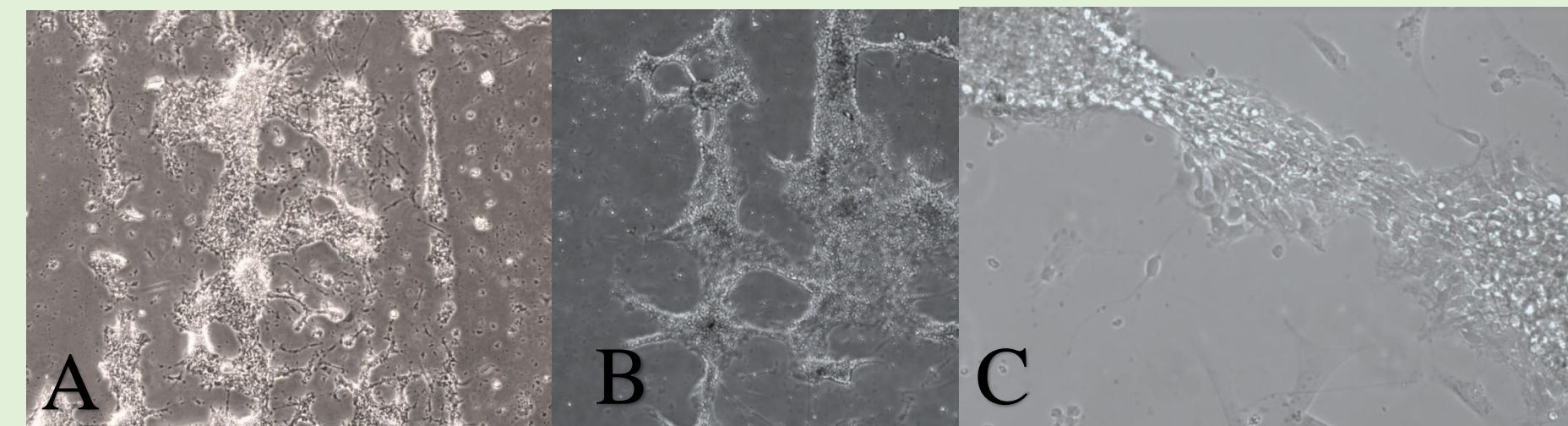
A : legkisebb nyomtatható vonalvastagság 1pt ~ 0,300 mm , B: egyenes vonal, C: egy vízszintes sáv maximális vastagsága 16pt ~ 4,8 mm, D: szabálytalan görbe

Csirke neuronális tenyészet

9 napos csirke embrió agyát steril fülke alatt kioperáltuk. A sejteket 5 ml DMEM médiumban 1 mm³-es darabokra aprítottuk, majd pipettázással disszociáltuk. A sejteket lecentrifugáltuk (200g 5 perc), majd 5ml friss tápfolyadékban reszuszpendáltuk. A sejteket szétosztottuk 24 lyukú platekbe, melyekbe poly-L-lysine-nel felület kezelt tárgylemezeket helyeztünk. A sejteket 37 °C -on 5%-os CO₂ 4-5 napig tenyésztettük.

Eredmények

A kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy a mintázott tárgylemezen hogyan tapadnak le a neuronok és milyen formákat lehet alkotni.



A: 3 egyenes vonal egymás mellett. 2 azonos vastagságú és a középső vastagabb. Az **A1** minta alapján.

B: A túl közel nyomtatott neuronok axonjai egymással hidat képeznek. A **B2** minta alapján.

C: 3 pt vastagságú vonal, jól látható a felület kezelt terület. A **C1** minta alapján.

D: Téglalap alakban mintázott felületen tapadtak meg a sejtek. A **D1** minta alapján.

Konklúzió

A tintasugaras nyomtatás könnyű és hatékony módszer sejt mintázatok létrehozására. A minták geometriájának optimalizálása szükséges, mivel az egymáshoz közel létrehozott neuronális minták között hidak jönnek létre. A kísérletek során a tenyészetek nem fertőződtek be.

A felület nyomtatás új lehetőségeket ad a tenyészetek létrehozásához, mely során szabályos geometriai formákon hajthatók végre a farmakológiai toxikológiai és fiziológiai vizsgálatok.

Köszönetnyilvánítás:

Szeretnénk megköszönni a Talentum műhely - A tudományért és tehetségért a Nyugat-magyarországi Egyetemen TÁMOP 4.2.2.B-15/1/Konv.-2015-0005-nek a támogatást.