

# SZAKDOLGOZAT

NAGY ATTILA

OXBPS6

2015

Nyugat-Magyarországi Egyetem  
Savaria Egyetemi Központ  
Természettudományi és Műszaki Kar  
Biológia intézet Állattani Tanszék

**Mintázott sejtenyészetek készítése tintasugaras  
nyomtatóval**

**Konzulens:** Dr. Molnár Péter

Docens

Nyugat-magyarországi Egyetem  
Savaria Egyetemi Központ

Természettudományi és Műszaki  
Kar

**Készítette:** Nagy Attila

OXBPS6

Biológia B.Sc.

## Tartalom

1. Bevezetés .....	5
2. Célkitűzések.....	6
3. Irodalmi áttekintés .....	7
3.1. Sejtek és szövetek – többsejtű élőlények felépítése .....	7
3.2. Mivel több egy szövet a sejtek halmazánál? .....	7
3.2.1. A sejtszerveződés kialakulása (evolúció).....	8
3.2.2. Neuronokból álló szövetek, neuronok tulajdonságai .....	11
3.3. Sejttenyészetek a biológiai és orvosi kutatásban.....	14
3.3.1. Történeti áttekintés.....	14
3.3.2. Farmakológia.....	16
3.4. Sejttenyészeteken alapuló módszerek előnyei .....	17
3.5. Sejttenyészeteken alapuló módszerek korlátai .....	18
3.6. Komplex rendszerek létrehozása sejtekből .....	19
3.7. Szövetépítés.....	20
3.7.1. Szövetépítési módszerek .....	20
3.8. Tintasugaras nyomtatás (előnyei, hátrányai).....	22
4. Módszerek.....	23
4.1 Felületkezelési eljárások.....	23
4.2. A nyomtató átalakítása .....	24
4.3. Patronok átalakítása, sterilizálása.....	25
4.4. Nyomtatás folyamata.....	26
4.5. Sejttenyészetek, szövettenyészetek készítése.....	26

5.	Eredmények .....	27
5.1.	Nyomtatott ábrák .....	27
5.2.	A kapott eredmények kiértékelése.....	31
5.2.1.	Egy nyomtatóval mintázott felület kezelt tenyészet összehasonlítása nem mintázott tenyészettel.....	32
6.	Összefoglalás .....	34
7.	Köszönetnyilvánítás.....	36
8.	<i>Ábrajegyzék</i> .....	37
9.	<i>Felhasznált irodalmak</i> .....	38

## 1. Bevezetés

A sejttenyészeteken 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. A gyógyszerkutatásban is szükség van olyan, lehetőleg emberi sejteken (össejteken) alapuló, nagy áteresztőképességű, sok információt szolgáltató rendszerekre, amelyeken vegyületek fő és mellékhatása vizsgálható. A tesztrendszerek által szolgáltatott eredmények információtartalma és prediktív értéke függ attól, hogy a rendszer mennyire modellezi az emberi szövetek, szervek komplex felépítését és működését. Az utóbbi években számos módszert fejlesztettek ki sejttenyészetek mintázására, vagyis szövetszerű tulajdonságok kialakítására in vitro. Ezek közül talán a legegyszerűbb a tintasugaras nyomtatás, mellyel komplex, több sejtípusból álló, összetett geometriájú sejttenyészetek hozhatók létre. Az ilyen mintázott tenyészetek tulajdonságai különböznek a véletlenszerűen létrehozott sejt kultúráktól, de alapos jellemzésüket még nem végezték el, valamint lehetséges felhasználási lehetőségeiket még nem teljesen derítették fel. Fontosnak és érdekesnek tartom olyan módszerek kifejlesztését, melyek esetleg a jövőben alkalmasak lesznek neurodegeneratív betegségek (például Alzheimer kór) kialakulási mechanizmusainak modellezésére egy könnyen manipulálható, nagy áteresztőképességű, magas prediktív értékű in vitro rendszerben. A mintázott sejttenyészetek létrehozása ennek a folyamatnak az első lépéseit jelenti.

## 2. Célkitűzések

- Sejtmintázás irodalmának áttekintése
- Egy sejt-nyomtató rendszer létrehozása
- A rendszer képességeinek bemutatása kísérletek alapján

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Sejtek és szövetek – többsejtű élőlények felépítése

Az eukarióta sejtekből alakultak ki a soksejtű szervezetek, melyeknek szerveződési és működési alapegysége a sejt. Minden sejt önálló működésre képes. Tápanyagait energiává alakítja, és képes megsokszorozódni. Egyedfejlődésük során számos különböző sejtípus jön létre, melyek egymással együttműködve és egymásra hatva hozzák létre a szervezetüket felépítő szöveteket, szerveket. Az azonos módon differenciálódott, azonos funkciókkal rendelkező sejtek együttesét nevezzük szövetnek. A szöveteket funkció, morfológia és az alkotó sejtek szerint csoportosíthatjuk. Az alap szövetek: hámszövet, kötő- és támasztószövet, izomszövet, idegszövet (Pálfia & Kristóf, 2013).

#### 3.2. Mivel több egy szövet a sejtek halmazánál?

Nem minden sejtenyészet alkot szövetet. A szövetekben megtalálható a komplexitás, az a szervezett rendszer, ami a sejtek halmazában nem. A szövetben többféle sejt található, de mind egy azonos funkciót lát el. Létre jön köztük egy kapcsolatrendszer, egy kommunikációs hálózat. Egy szövetben a sejtek egymással kölcsönhatásba lépnek és biokémiai, mechanikai jeleket közvetítenek egymás felé. Ezek a jelek szabályozzák a szövetet alkotó sejtek működését (Pampaloni et al. 2007).

### 3.2.1. A sejtstruktúra kialakulása (evolúció)

Földünk kb.: 4.6 milliárd éve keletkezhetett. Nem tudjuk biztosan, a légkör akkori összetételét csak sejtethetjük. Mai napig kérdés, hogy redukáló, vagy neutrális jellegű volt-e, az viszont biztos, hogy sem oxigén, sem ózont nem tartalmazott.

Miller megpróbálta kísérlettel modellezni, hogy milyen egyszerű szerves vegyületek keletkezhetnek az őslégkörben. Gázkeveréket ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$  és  $\text{H}_2$ ) melegített vízzel, és elektromos szikrakísüléseket hozott létre, miközben hűtőn kondenzáltatta a vizgőzt és visszavezette azt az edénybe. Két hét alatt már kimutatható volt pár szerves vegyület. A sok millió év során sokkal több idő állt rendelkezésre az új anyagok, vegyületek képződésére az élet kialakulására (Novák 1998).

#### 3.2.1.1 Az eukarióta sejtek kialakulása

Az eukarióta sejtek elődjének a baktériumokat tartják. A baktérium sejteket kívülről merev sejtfa határolja, melyet murein alkot. Az eukariótákra ez nem jellemző, alakjukért a belső váz, a citoskeleton felel. Cavalier Smidt szerint a sejtfa elvesztése volt az első döntő lépés, ami megindította az eukarióták evolúcióját. Ősi prokarióták egy csoportjában valamilyen oknál fogva a plazmamembrán befűződött, és a DNS-t kettős membránnal ölelte körül (Smith 1997). A citoplazma membrán ily módon történő lefűződésével jöhetett létre a valódi sejtmag, illetve annak kettős membránja. Létrejön az Endoplazmatikus Retikulum (ER), melynek vezikulumaiból kialakul a Golgi apparátus. A Golgi zsákjaiból leszakadó vezikulumok összeolvadnak a sejtmembránnal és a tartalmuk a külvilágba ürül. Ez az exocitózis a sejt környezetébe juttatja az anyagokat és ez felel a sejt felszín növekedéséért is. Nem csak exocitózis létezik, hanem fagocitózis is, mely során a citoplazma membrán egy darabja leszakad, vezikulumot hoz létre, körülhatárol egy anyagot vagy sejtet, majd magába olvasztja azt. Az oxigén megjelenését az eukarióta sejtek őse úgy vészelte át, hogy szimbiózist alakított ki egy aerob baktériummal, bekebelezte és így kialakult az eukarióták mitokondriuma (Novák 1998).



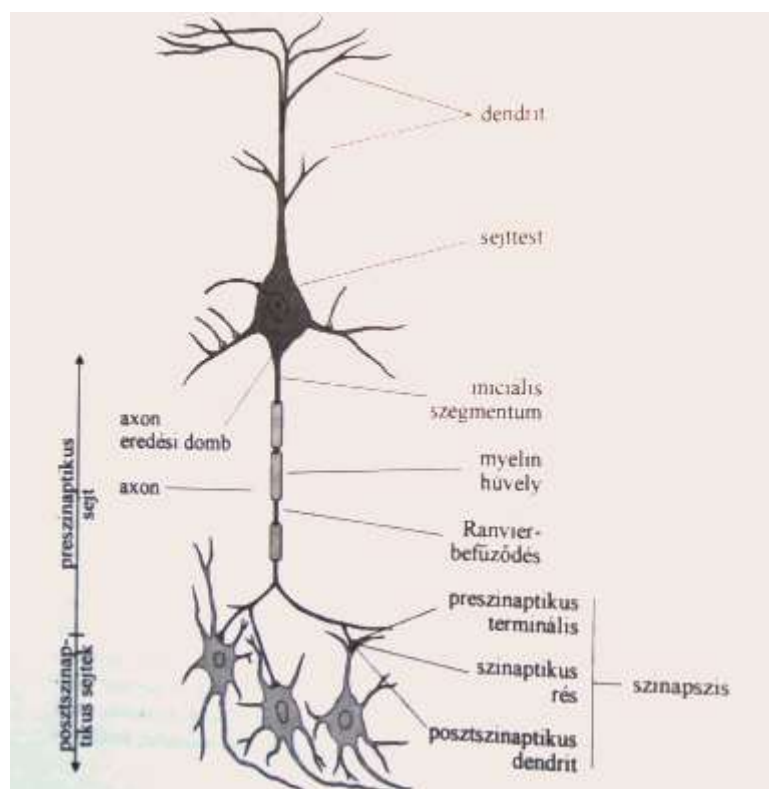
A sejtfa elvesztésével új szaporodási formára is szükség lett, ez a mitózis. Kialakulásával lehetségessé vált egy további változás, mely szükséges volt ahhoz, hogy a komplexitás tovább növekedhessen. A bakteriális replikáció során általában egyetlen replikációs origó van a teljes kromoszómán, noha a sérült sejtekben a DNS-replikáció más pontokon is megindulhat (Magee et al. 1992). Ezek a sérülések adhatták a mai képet, hogy több replikációs kezdőpont van, és így nem állít fel korlátokat a replikációnál. Talán így képződhetett a cirkuláris baktérium DNS-ből lineáris, ami az eukariótákra jellemző. Másik elmélet szerint az eukarióta sejt egy Archea és egy  $\alpha$ -proteobaktérium szimbiózisából ered. Viszont mivel az eukarióta sejtek membránjának felépítése inkább a prokariótákéra hajaz, sokan azt gondolják, hogy a sejtmag maga is endoszimbiózis eredménye, és egy prokarióta nyelt el végső soron egy archeát, valamint egy  $\alpha$ -proteobaktériumot, hogy létrejöhessen az ősi sejtmagvas sejt. De az archeák esetében nem igazán figyeltek meg fagocitózist, és sehol se található az ősi sejt genomja. A legújabb felvetés szerint az Archea nem bekebelezte, hanem a sejtfa nyílásain át kinyúló nyúlványaival körbenötte a vele szoros közösségben élő epibiotikus baktériumokat. A kilógó nyúlványok összenövése után alakulhatott ki a proto-eukarióta sejt, és a nyúlványok közti térből jött létre az eukarióta sejtek endoplazmatikus retikulum-hálózata (ER) (Critical Biomass Blog, 2015).

### *3.2.1.2 Többsejtű szervezetek létrejötte*

A többsejtű szerveződések egymástól függetlenül több alkalommal is kialakultak: gombáknál, növényeknél és állatoknál. Mind a három esetben ezeknek a szerveződéseknek az volt az oka, hogy ha sok egysejtű, sok sejt volt egy helyen, akkor ne kelljen minden sejtnak ugyan azt a reprodukív és vegetatív folyamatot véghez vinni. Ehhez szükséges a munkamegosztás, melyből adódik, hogy minden sejt a saját képességét fejleszti. Wolpert két modellt gondolt ki az ősi többsejtű állatok kifejlődésére. Az első, melyben a szaporítósejt aszimmetrikusan osztódik, a két sejt továbbra is összeköttetésben marad. Egyikük megőrzi az osztódás képességét, a másik viszont e képesség elvesztése árán a táplálkozásra specializálódik. A másik modell a vegetatív szaporodáson alapszik. Ez a módszer két sejtosztódást igényel. A második osztódást követően a két központi sejt elválik egymástól, ami új táplálósejt szabályozott differenciációját váltja ki az azzal nem rendelkező utódban. Ebben az esetben, a sejteknek ismerniük kell a környező sejtek állapotát. Ezek a szervezetek képesek regenerálódni egy sérülés esetén. (pl.: Plakozoa Trichoplax) Mindkét folyamat megtalálható magasabb rendű szervezeteknél is (Smith 1997).

### 3.2.2. Neuronokból álló szövetek, neuronok tulajdonságai

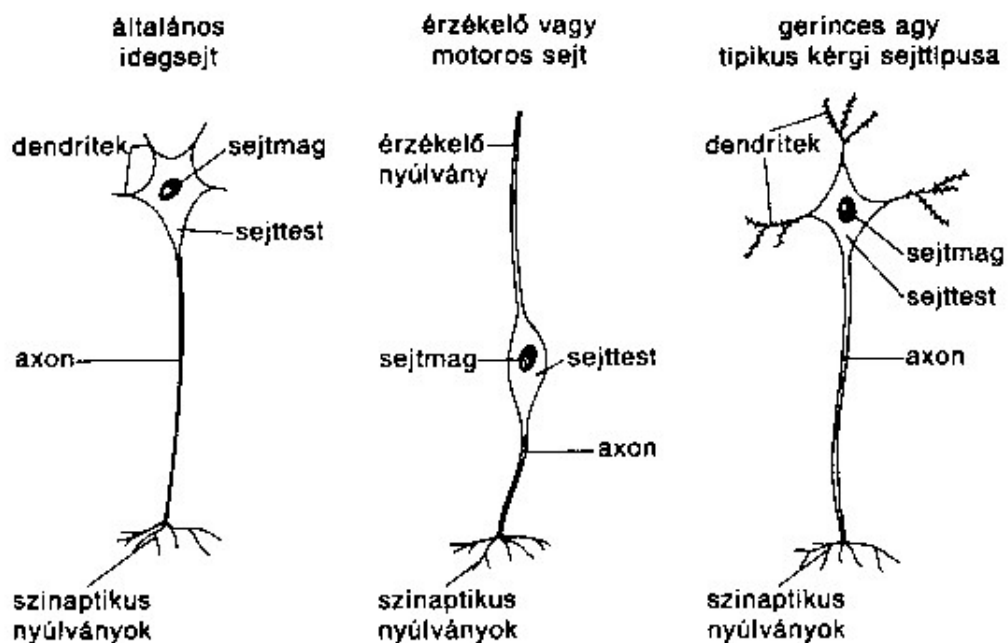
A neuronok ingerlékeny, nyúlványos sejtek, amelyek ingerfelvételre és idegi ingerületek vezetésére specializálódtak. Méretükben, működésükben és alakjukban jelentős változatosságot mutatnak, de minden idegsejten 4 régió különíthető el: a sejttest (szóma, perikaryon), a dendritek, az axon és az axonvégződés (axonterminális). A neuronok nagyon gyors ütemben szintetizálják a fehérjéket (1.ábra) (Czéh 2001).



1. ábra Neuronok felépítése (Czéh 2001)

A neuronok sejttestjeinek a mérete általában az 5  $\mu\text{m}$ -tól a 135  $\mu\text{m}$ -ig terjedhetnek, nyúlványaik több mint 1 m távolságra is elérhetnek. A nyúlványok száma, hossza, elágazódásuk módja, funkciójuk szerint osztályozzuk őket. (2. ábra)

- **Unipolaris neuronok:** Azok a neuronok, amelyeknek sejttestéből egy idegrost indul ki, ez röviddel kilépése után két ágra oszlik, amelyek közül az egyik valamilyen perifériás érző végződéshez fut ki, míg a másik belép a központi idegrendszerbe. Ennek az egy nyúlványnak az ágai az axonra jellemző szerkezeti és működési sajátosságokkal bírnak.
- **Bipolaris neuronok:** Megnyúlt sejttestük van, amelynek mindkét végéből kiindul egy-egy magányos nyúlvány. A neuronnak erre a típusára példák a retina bipolaris sejtjei.
- **Multipolaris neuronok:** Számos nyúlvány ered a sejttestből. Egy hosszú nyúlvány, az axon kivételével a többi dendrit. A legtöbb neuron az agyban és a gerincvelőben ehhez a típushoz tartozik.
- Az érző neuronok az ingerület felvételét és továbbítását végzik.
- Az interneuronok feladata az ingerület továbbadása, valamint más neuronok közötti kapcsolat fenntartása.
- A mozgató neuronok az ingerületre adott válaszreakciót valósítják meg (Wikipedia, EN).



2. ábra Neuronok csoportosítása funkció szerint

(<http://www.jataka.hu/rics/speci/src/class12/pict/bio/neuronok.jpg>)

Működésük szerint megkülönböztetünk receptor (ingerület felvevő) és effektor (ingerület továbbító) sejteket. Az idegsejteket és a gliasejteket magába foglaló szövet az idegszövet, amely ectodermális eredetű az egész állatvilágban. Legfőbb jellemző rá, hogy a benne található idegsejtek a synapsisok segítségével hálózatokat alakítanak ki. Az idegszövet elektromos impulzusok generálására és gyors továbbítására specializálódott. Benne mesodermális eredetű szövetek, illetve szövet elemek (idegrendszer ellátó erek, microglia) találhatóak. Mivel oxigén- és tápanyag igénye igen magas, gazdagon erezett, jó vérellátású szövet. Ha vérellátása zavart szenved, az idegszövet nem jut elegendő glükózhoz és oxigénhez, ami rövid idő alatt szövetkárosodáshoz vezet (Kovács 2011).

### 3.3. Sejttenyésztetek a biológiai és orvosi kutatásban

#### 3.3.1. Történeti áttekintés

Az állati sejttenyésztés története az 1900-as évek környékére nyúlik vissza. A kutatók célja az volt, hogy az élőlényeket felépítő különféle szövetek és szervek működését, normál és kóros élettani folyamatait szemmel követhessék mikroszkóp alatt.

**Sydney Ringer:** A 19. századi fiziológus.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  és  $Cl^-$  ionokat tartalmazó izotóniás sóoldatban, szervezeten kívül, életben tartotta a béka izolált szívét. (Ringer-oldat = BSS (balanced salt solution) a Ringer oldat laktáttal kiegészített változatát napjainkban is használják.

**Renato Dulbecco:** Olasz származású amerikai virológus, aki a reverz transzkriptáz felfedezéséért társaival, Howard Temin-nel és David Baltimore-ral 1975-ben orvosi Nobel díjat kapott. Emellett kifejlesztette a leggyakrabban használt sóoldatot a PBS-t.

**John H. Hanks:** Népszerű sóoldat kapcsolódik a nevéhez HBSS. Amerikai mikrobiológus a Lepa in vivo tenyésztéséhez fejlesztette ki ezt a sóoldatot, de nem ért el sikert vele.

**Wilhelm Roux:** - a Roux flaska, próbálkozott a tenyésztőedény elszigetelésére vattadugóval. Ez volt az első próbálkozás tenyésztő edény létrehozására.

**Ross Granville Harrison:** Sikeresen tenyésztett idegsejteket ebihalakból, béka nyirok folyadékban és ezzel megtette az első lépést az őssejtkutatások irányába, illetve létrehozta az első tápfolyadékot. Nobel-díjat kapott munkájáért.

**Montrose Burrows:** 1910-ben Burrows segítségével Alexis Carrel embrionális és felnőtt szöveteket is tenyésztett, pl.: kutyából, csirkéből, patkányból. Tenyésztőközeg: a frissen gyűjtött plazma ugyanabból a forrásból származik, mint a szövet. Sikeresen használta ezt a "plazma médiát" ami plazma alvadékat, szérumot, sóoldatot és csirke embrió kivonatot tartalmazott, és ez az 1950-es évekig a standard volt a csirke, patkány, kutya és humán tumorok sejt kultúráira.

**Alexis Carrel:** 1923-ban ő fejlesztette ki az első sejtenyésztő edényt. Ezek az úgynevezett D-palackok. Ezekkel az új edényekkel lehetővé vált a nagyobb mennyiségű médium használata az eddigi csepp kultúrákkal szemben. Ennek eredményeként, az új lombik kultúráknak könnyű volt a fenntartása és hetekig életképesek voltak a sejtek.

**Wilton R. Earle:** Az első rágcső sejtvonal (L929) létrehozása egyetlen sejtből 1943-ban.

**George O. Gey:** 1951 HeLa-sejtvonal létrehozása, az első humán folytonos sejtvonal Henrietta Lacks méhnyakrák sejtjeiből.

**Charles A. Lindbergh:** Lindbergh szivattyú szervkultúrákhoz: a leghíresebb találmánya egy üveggamra, melyet sikeresen alkalmazott csaknem 900 kísérletben (életben tartotta a szerveket, megoldotta a médium keringetését). Lindbergh kifejlesztett egy egyszerű sejtkultúra perfúziós kamrát is.

**Van Wezel:** - a mikrokarrieres sejtenyésztés kidolgozása, a sejtek tenyésztése apró hordozó szemcsék felületén.

**1970:** rekombináns DNS technika alkalmazása a mikroorganizmusokon kívül állati sejteknél is. Sikerült egy vektorral DNS-t bevinni és expresszálni állati sejtbe.

**1975:** Köhler és Milstein Nobel díjas felfedezése: emlősök (pl.: egér) sejt fúziójával, ún. hibridómát tudott létrehozni, mellyel immunfehérjéket lehetett gyártani (Turáni 2012).

### 3.3.2. Farmakológia

A farmakológia (gyógyszertan), az élő rendszerek működését befolyásoló anyagokkal foglalkozó tudomány. E tudománynak egyik legfontosabb részterülete az orvosi gyógyszerészet, amelynek tárgya az élő rendszerek közül az ember, és az emberi betegségek megelőzésére, diagnosztizálására, gyógyítására, valamint az emberi szervezet működésének javítására szolgáló anyagok, vegyületek megismerése és előállítása. A legtöbb kísérlet állatokon megy végbe, de az állatkísérletekkel valós információ nyerhető az emberi élet veszélyeztetése nélkül. A gyógyszeres kezelések már az ősidőkben is jelen voltak. Az ősember is fogyasztott már bódító, részegítő, hashajtó, fájdalomcsillapító és hánytató növényeket. De a legtöbb hatást még az ekkori ember a természetfelettinek tudta be. A tudomány a XIX-XX. században hatalmas fejlődésnek indult. Ekkor még bátrabbak voltak az emberek, nem gondolva bele a következményekbe. Előszeretettel alkalmaztak érdekes eljárásokat, földet, pókhálót, meszet tettek vágott, égetett sebre, ezen felül vizeletet, ópiumot, arzént, higany vegyületeket használtak gyógyításra (Gyires 2011).

Ezek a kezelések gyakran túladagoláshoz, függőséghez vagy halálhoz vezettek, ezért mindenképp szükség volt pontos eredményekre, előre megtervezett kísérletekre. Hatalmas áttörés volt az inzulin felfedezése, amit állatkísérleteknek köszönhetnek. Grant Banting, Charles Best és Clarc Noble 1921 augusztusában kioperálták két kutya hasnyálmirigyét, s azt vizsgálták, milyen különbséget találnak köztük, ha az egyiküknek inzulin injekciót adnak. Az inzulint a helyi vágóhidakról szerzett állatok hasnyálmirigyéből vonták ki. A kezelt kutya hosszabb ideig élt. Idővel emberen is kipróbálták és ennek a felfedezésnek köszönhető a diabetes kezelésére szolgáló injekcióval beadható inzulin (Wikipedia EN 2012).

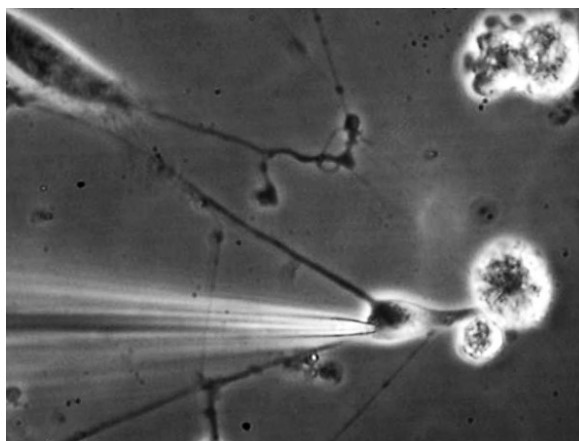
Ez csak egy példa a sok közül, de a gyógyszerek, a korszerű technika sok más vívmányához hasonlóan kétélű fegyverek. Többségük a kívánatos, terápiás hatás mellett enyhébb vagy súlyosabb nemkívánatos mellékhatásokat is kifejt. A mellékhatások elkerülése, megismerése érdekében vizsgálják a gyógyszer teljes



hosszú és rövid távú hatásmechanizmusát. Ezekhez elengedhetetlenek a sejti, szöveti, majd szervi szinten folytatott in vitro kísérletek.

### 3.4. Sejttenyészeteken alapuló módszerek előnyei

A sejttenyészeteken alapuló (in vitro) módszereknek számos előnye van. Ilyen előny például a módosítható, megváltoztatható környezet. A környezet változása hat a sejtek fejlődésére. Számos előny származik abból is, hogy kisselektált sejtípusok tenyészthetők. Ilyen előny az, hogy vizsgálhatjuk a toxicitást sejti szinten és ebből következik az is, hogy kevesebb állatkísérletre van szükség. Sok sejtben többféle sejtfunkció vizsgálható. Sokkal egyszerűbb egy tenyészetben az elektrofiziológiai vizsgálatokat végrehajtani (pl.: Patch Clamp mikroszkóp alatt), mint egy állat élő szervezetében, ahol a mikroszkóp használata nehézkes, tehát „vakon” kell megsúrni egy sejtet. (3. ábra) Egy sejt vonalban a sejtek jó szaporodó képességgel rendelkeznek, így viszonylag rövid idő alatt nagy mennyiségű sejt állítható elő. Ennek előnye, hogy a kísérletek könnyen és többször is megismételhetők.



3. ábra Egy sejt megsúrása mikroszkóp alatt Patch Clamp elektródával. Készült egy elektro fiziológiai vizsgálat során.

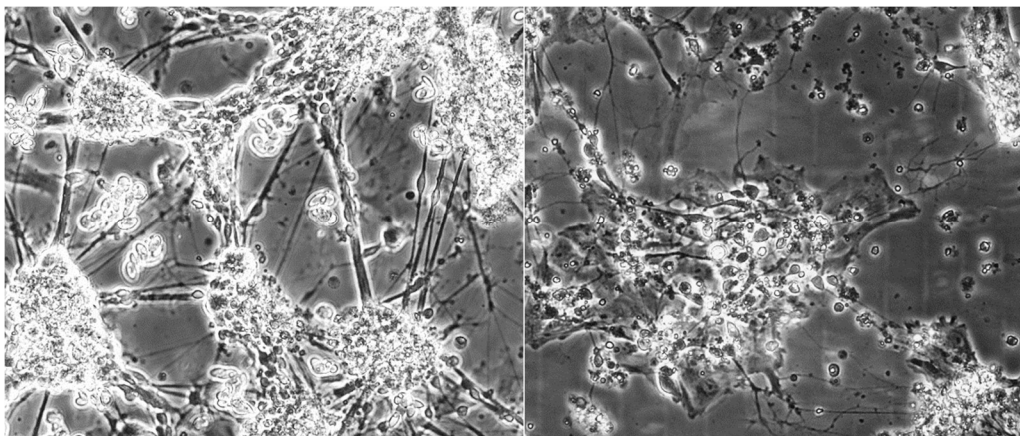
### 3.5. Sejttenyészeteken alapuló módszerek korlátai

A sejttenyészeteken végrehajtott kísérleteknek legfőbb hátránya az, hogy a tenyészet készítése során elveszik a szervekre, szövetekre jellemző komplex szerveződés. Nagy hátrány az is, hogy egyes vizsgálatok nagyon nehezen hajthatók végre ezekben a rendszerekben (pl.: a szinaptikus plaszticitás vizsgálata). Hátránya ezeknek a tenyészeteknek, hogy könnyen befertőződnek. In vitro felléphet a spontán dedifferenciáció jelensége is.

### 3.6. Komplex rendszerek létrehozása sejtekből

Az evolúció során először a komplex szövetszerű rendszerek a Metazoaéknál jelenhettek meg. Ezek sejtjei már helyzetük alapján más-más feladatok ellátására specializálódtak, ami azzal járt együtt, hogy a kezdetben teljesen azonos sejtek különbözővé váltak. A sejtek általában természetes környezetükben egy adott funkcióra specializált szövetet alkotnak. A szövetekben létrejövő komplexitás olyan jelenségekért felelős, mint egy bizonyos kommunikációs hálózat létrejötte, ami lehetővé teszi a szövetben a különböző sejtek közötti információcserét. Tehát egy szövetben, mint komplex rendszerben, a sejtek folyamatos kapcsolatban állnak egymással és ezek a kapcsolatok szabályozzák az egyes sejtek működését. Ezeket a tulajdonságokat és a sejtek regenerációs képességét használják ki a szövettenyésztési eljárásoknál. Az azonos szövetek alapvetően azonos eredetűek: (ectoderma, entoderma, mesoderma) (Molnár 2012).

Azonos szövetből származó sejtek általában azonos tenyésztési körülményeket követelnek meg. Minél „fiatalabbak” ezek a sejtek, annál nagyobb a túlélési képességük. Ezért készíthető egy 7 napos csirke embrióból kipreparált cortexből neuronális tenyészet. Ez a tenyészet azonban még nem nevezhető szövetnek, inkább egy szövet és a sejtek halmaza közötti átmenet, mivel rendelkezik a szövetek és az önálló sejttenyészetek valamennyi közös tulajdonságával. Többféle sejtípus is megfigyelhető.



4. ábra 7 napos csirke embrió neuronális tenyészete.

### 3.7.Szövetépítés

A szövetépítés a biológiában egy feltörekvő tudományág, melynek célja, hogy emberi beültethető szerveket hozzunk létre károsodott szervek pótlására in vitro. (Langer 1993). Rengeteg féle eljárás létezik bizonyos szövetek készítésére.

#### 3.7.1. Szövetépítési módszerek

A szövetépítés egyik fő módszere, hogy létrehozunk egy strukturált, 3D scaffoldot, amely tulajdonságaiban szimulálja a sejteket körülvevő extra celluláris mátrixot, melyet megfelelő sejtekkel népesítünk be. A megfelelően megtervezett és strukturált scaffold szabályozza és meghatározza a sejtek osztódását és differenciációját (O'Brien 2011). A szövetépítés területén hatalmas léptékű fejlődés figyelhető meg az utóbbi években.

Az azonos módon differenciálódott, azonos funkciókkal rendelkező sejtek együttesét nevezzük szövetnek. Tehát nem minden tenyészet alkot szövetet. Egy szövetben a sejtek egymással kölcsönhatásba lépnek és biokémiai, mechanikai jeleket közvetítenek egymás felé. Az így létrejövő 3D kommunikációs hálózatok tartják fent egy szövet specifitását és a homeosztázisát. A génexpresszió szintje is eltérő 2D és 3D tenyészetekben. A szövet tenyésztésnél az a fő szempont, hogy nem elkülönült sejteket szaporítunk, hanem sajátos szövet együttest tartunk fent, hogy az megőrizze sajátos tulajdonságait (Pampaloni et al. 2007). Tenyésztett szöveteket tudományos kutatás céljára is felhasználhatunk, mint például a sejt migráció tanulmányozása. (Lang 2013). A 3D környezetben tenyésztett sejtek tulajdonságai különböznek a hagyományos 2D tenyészetekben tapasztaltaktól. Például kimutatták, hogy a fibroblasztok elhelyezkedése és a transzmembrán adhéziós molekulák eloszlása eltérő 3D és 2D tenyészetekben (Pampaloni et al. 2007).

A szövettenyésztési eljárásokat sokszor alkalmazzák a tumor biológiában, mivel a sejtek mikrokozonyzatának zavara részt vesz a rák kialakulásában. A rosszindulatú daganatok legfőbb jellemzője a malignus transzformáció. Ez egy többlépcsős folyamat, amelynek során az egymást követő genetikai változások miatt új tulajdonságok jelennek meg a szövetekben, korlátlanul osztódó sejtek jönnek létre és más szövetekbe is behatoló, invazív sejtek kialakulását eredményezi. A tumor

sejtekben megszűnik a szabályzás, így instabilak lesznek (Hanahan et al. 2000). 3D szövetkultúrák létrehozására több módszert fejlesztettek ki. A szövet-szelet tenyészet lényege, hogy 200–400  $\mu\text{m}$  vastag szeleteket készítünk, melyeket steril körülmények között tartunk. A szeletek egy megfelelő hordozófelületen tapadnak és a sejtek egy-két hétig tartják eredeti elrendeződésüket és kapcsolataikat. Létezik expandátum tenyészet is, melyek készítése során kipreparált kb. 1  $\text{mm}^3$  –nél nem nagyobb szövetdarabkákat helyeznek egy olyan felületre, ahol a sejtek letapadnak és vándorolni tudnak. A vándorlás szinte azonnal megindul, melynek sebessége a sejtek migrációs aktivitását tükrözi (Madarász 2010).

Az eddig felsorolt módszereken kívül más módszereket is kidolgoztak magasabb rendű szervezettséggel rendelkező sejt kultúrák létrehozására. Az egyik ilyen módszer a fotolithográfia. A módszert a mikrocsipek készítésénél alkalmazták először, majd a biológiában is felhasználták. Ez egy olyan mintázási eljárás, mely során néhány 10 nanométeres felületen képesek mintákat létrehozni. Tudnak felületet és mikrocsatornákat nyomtatni az eljárással (Whitesides et al. 2001). A lithográfia során maszkokat alakítanak ki egymás felett (pl.: fehérje) és így bizonyos rétegek oldószerekkel és egyéb eljárásokkal könnyen eltávolíthatóvá válnak. Ez a módszer alkalmas a neuron tenyészetekben, a sejtek növekedésének befolyásolására (Kane et al. 1999). A soft lithographia legjobban a nyomtatás őséhez, a nyomda gépek működéséhez hasonlítható, csak mikrométeres nagyságrendben. Az eljárás során van egy elsődleges (PDMS) minta, melyet bélyegzőszerűen használnak és ezzel többször is reprodukálhatják az adott felületet (Sorribas et al. 2002).

Tintasugaras nyomtatással több sejt típusból álló, összetett geometriájú tenyészetek hozhatók létre. A mintázásnak alapvetően két útja van, vagy a sejtek letapadását, növekedését elősegítő extracelluláris mátrixot nyomtatjuk (Fedorovich et al. 2007) vagy magukat a sejteket (Boland et al. 2006). A tintasugaras nyomtatás felhasználható arra is, hogy DNS, RNS vagy fehérje molekulákat juttassunk a sejtekbe, mivel a nyomtatás során a sejtmembránon ideiglenes csatornák képződnek a sejtek életképességének lényeges csökkenése nélkül (Owczarczak et al. 2012).

### 3.8. Tintasugaras nyomtatás (előnyei, hátrányai)

Ma már a sejtnyomtatás technikáját szövetek létrehozására is használják vegyítve a 2 dimenziós és a 3 dimenziós nyomtatási technikákat. Ezekkel a módszerekkel akár a vastag és összetett szövetek is gyárthatók (Cui et al. 2012). Például bioprinter segítségével már ereket, csontokat és bőrszövetet is hoztak létre (Norotte et al. 2009), valamint egy patkány ülőideg sérülését javították nyomtatott grafftal (Owens et al. 2013). Bár már 3D sejtnyomtatók is hozzáférhetőek, mi egy 2 dimenziós tintasugaras nyomtatóból építettük meg a saját bio printerünket. Az egyszerűség kedvéért nem a sejteket, hanem a sejtek letapadását biztosító vegyületet nyomtattuk. Ezeken a mintákon többek között toxikológiai kísérletek hajthatók végre, például több, párhuzamos vizsgálatot lehet elvégezni kör alakú neuronális tenyészeteken. Ilyen mintázatokon vizsgálhatók a neuronok ingerület átviteli tulajdonságai is. A gyógyszerek fejlesztése során a gyógyszerek csak kis része (8%) jut túl az elsődleges vizsgálatokon. Mivel 3D kultúrákkal jobban reprodukálható a célszövet, ezért az ezekre alapuló tesztek sokkal hatékonyabbak és informatívabbak lehetnek a hagyományos vizsgálatoknál és ebből következően jelentősen felgyorsulhat a gyógyszerfejlesztés folyamata (Pampaloni et al. 2007).

## 4. Módszerek

### 4.1 Felületkezelési eljárások

A felületkezelés nagyon fontos eljárás a tenyészetek készítésénél. A felület kezelés lehetőséget biztosít a tenyésztő felület hibáinak javítására. Az eljárás nagymértékben segíti a sejtek letapadását. Különböző fizikai és kémiai módszerek léteznek a megfelelő felület előállítására. Fizikai módszereket például fém implantátumok gyártásánál használnak. Ekkor lézerrel, vagy egyéb eljárásokkal alakítják át a felületet, hogy az implantátumot könnyebben befogadja a szervezet (Nagy et al 2004). Maratással a felületi hibák tüntethetők el. Mi maratásra NaOH-t használtunk. A fedőlemezeket 10-15 percig áztattuk NaOH oldatban, majd jó alapos mosást követően megszáritottuk őket.

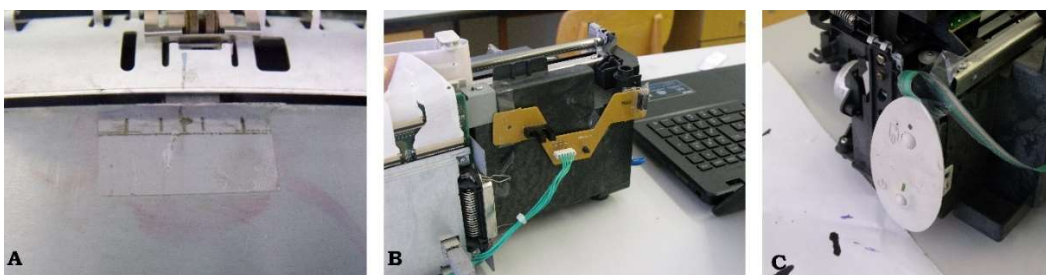
Az ezt követő felületkezelésre neuronális tenyészetek létrehozásánál PLL-t használunk. A Poly-L-Lysine (PLL) olyan szintetikus vegyület, amely a felületi feszültség módosítása által fokozza a sejtek tapadását és a fehérjeabszorpciót. A Poly-L-Lysine felületkezelés támogatja a különféle sejt vonalak letapadását és szaporodását magába foglaló feladatokat, a sejtek differenciálódását és a neurit kinövését, a transzfectált sejt vonalak tapadását, továbbá a tenyészet elsődleges idegsejtjeinek túlélését.

## 4.2. A nyomtató átalakítása

Az átalakítás alanyául egy HP Deskjet 640 c nyomtató szolgált. (5. ábra) Az átalakítás sok tintasugaras nyomtatón elvégezhető, de azért választottuk ezt a régi fajta nyomtatót, mert patronjai könnyen tisztíthatók és a nagyobb méretű fűvókák kevésbé tömődnek el. A nyomtató felbontása 300 dpi. Ez a felbontás még pont lehetővé teszi akár a sejtek nyomtatását is. Eltávolítottuk a nyomtató külső műanyag burkolatát, majd a bekapcsoló gombot áthelyeztük a nyomtató oldalára. Kiiktattuk a papíradagolót és építettünk egy állványt mely lehetővé tette a tárgylemezekre és a fedőlemezekre való nyomtatást. Ezután kívülrre helyeztük a fotocellás papír érzékelőt, így kézzel szabályozható a nyomtató indulása. (6. ábra) A sít, amelyen a nyomtató fej mozog feljebb állítottuk, hogy a nyomtató fej ne sodorja le a tárgylemezeket. (Owczarczak et al. 2012). Többszöri próbanyomtatással meghatároztuk a tárgyasztal középpontját.



5. ábra A nyomtató átalakításának főbb lépései (a képek még az első verziójú nyomtatónál készültek)



6. ábra A: A tárgyasztal felmért pontja, B: A Kívülrre helyezett fotocellás érzékelő, C: A kívülrre helyezett bekapcsoló panel



### 4.3. Patronok átalakítása, sterilizálása

A nyomtató HP 20-as és HP 29-es patronokkal használható. Első lépésként a tinta patronok fedelét fűrészeltük le. Kiöntöttük a tintát és folyó csapvíz alatt többször átmostuk a patronot. Ezután következett a fedél lefűrészeléséből következő sorják eltüntetése, lecsiszolása. Kivettük a patron belsejében található szűrőt. (7. és 8. ábra) 5 percig áztattuk a patronokat Clorox marószeres oldatban. Ezt követően alkoholos desztillált vizes oldatban szonikáltuk 180 másodpercig. Folyó csapvíz alatt többször is átöblítettük újból a patronokat. Ezek után, ha már nem oldódott ki több tinta, deszt. vizes öblítés következett. Megszárítottuk a kész patronokat és alkohollal sterilizáltuk őket minden nyomtatás előtt. A zártság megoldása érdekében a patronokat nyomtatáskor parafilmmel fedtük le.



7. ábra A kitisztított, átalakított tinta patronok alul és felülnézeti képe



8. ábra Az eltávolított szűrő

#### 4.4. Nyomtatás folyamata

A nyomtatót kezelő szoftverként MS Office Word 2013 programot használtunk, mellyel a grafikus formákat megalkottuk. Első alkalommal a printer tulajdonságait tintával teszteltük. Ekkor a nyomtatást gyári tintapatronokkal hajtottuk végre. Ez úgy zajlott, hogy miután kiadtuk a nyomtatási parancsot a nyomtató fej kimozdult balra és ekkor a papír érzékelő fotocelláját megszakítottuk úgy, hogy egy papírt helyeztünk az érzékelő nyílásába. A nyomtatás befejezése után eltávolítottuk ezt a papírt és a nyomtató fej visszaállt a kiindulási helyére. Sejtek mintázásához biotintaként poly-L-lysine-t (PLL) (1mg/ml) használtunk, mely vegyület neuronális tenyészetekben gyakran alkalmazzák felületkezelésre. Ebben az esetben az átalakított patronokat használtuk. 200 mikro liter PLL-t pipettáztunk a patronba, majd parafilmmel lefedtük. A fedőlemezt a tárgyasztalra helyeztük, és a nyomtatási parancsot kiadtuk. Ezután a többi folyamat nem tért el a tintával való nyomtatástól.

Miután az előre megtervezett mintákat fedőlemezre nyomtattuk, száradást követően alkohollal fertőtlenítettünk. A tárgylemezeket 24-lyukú plate-ekbe helyeztük és 500 mikro liter sejtes oldatot pipettáztunk rá. 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-n, 4-5 napig tenyésztettük.

#### 4.5. Sejttenyészetek, szövettenyészetek készítése

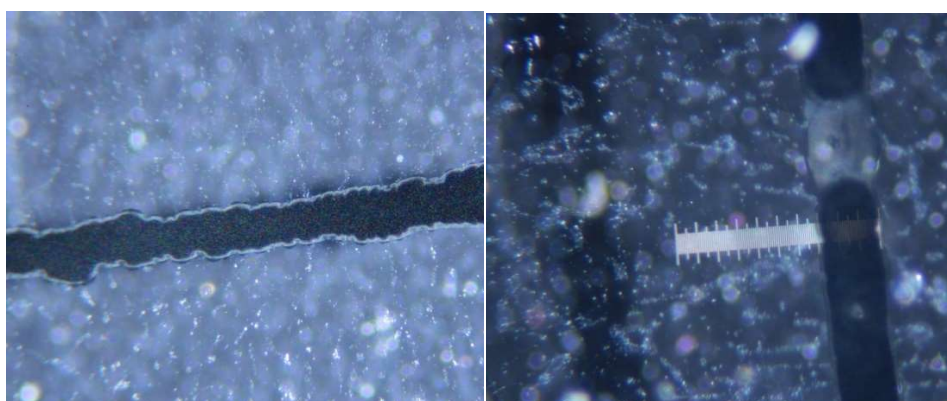
Csirke neuronális sejttenyészet

9 napos csirke embrió agyát steril fülke alatt kioperáltuk. A sejteket 5 ml DMEM médiumban 1 mm<sup>3</sup>-es darabokra aprítottuk, majd pipettázással disszociáltuk. A sejteket lecentrifugáztuk (200g 5 perc), majd 5 ml friss tápfolyadékban reszuszpendáltuk. A sejteket szétosztottuk 24 lyukú platekbe, melyekbe poly-L-lysine-nel felületkezelt tárgylemezeket helyeztünk. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-n, 4-5 napig tenyésztettük.

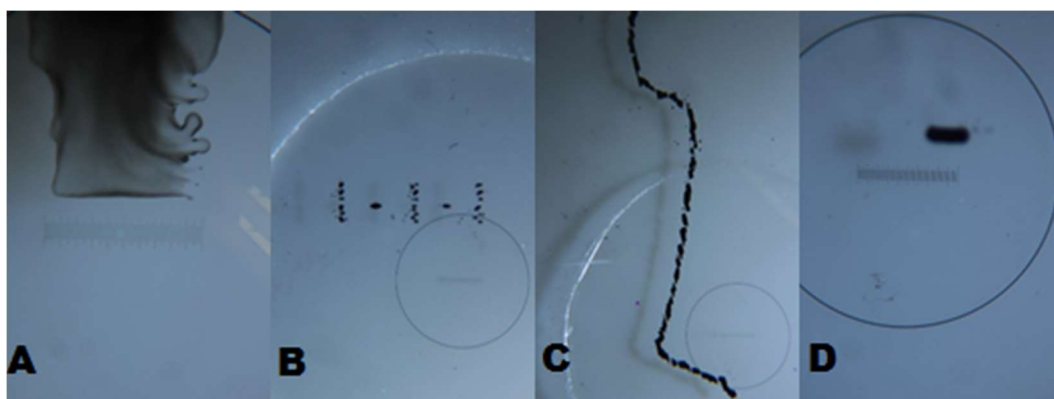
## 5. Eredmények

Először a tárgylemezekre tintával nyomtattam. Ezek után poly-L-lysine-t (PLL) nyomtattunk. Ezeket a tárgylemezeket 24-lyukú plate-ekbe helyeztük. 500 mikro liter sejtes oldatot pipettáztunk rá. A folyamat során az alább látható eredményeket kaptuk (9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18. és 19. ábra).

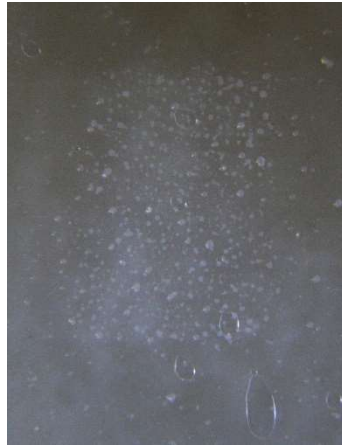
### 5.1.Nyomtatott ábrák



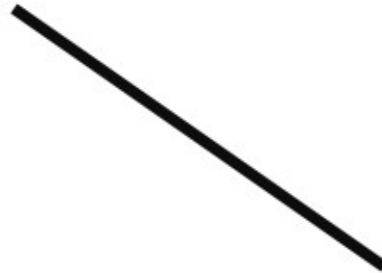
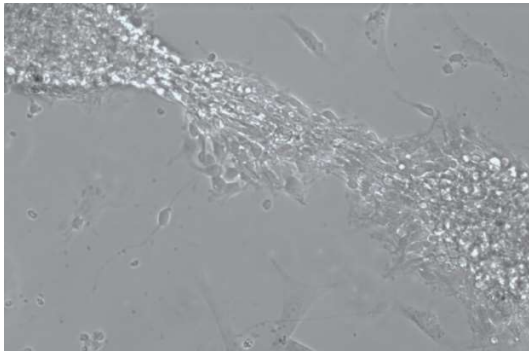
9. ábra Próba nyomtatások tintával. A képeken látható mérő skála teljes hossza 1 mm.



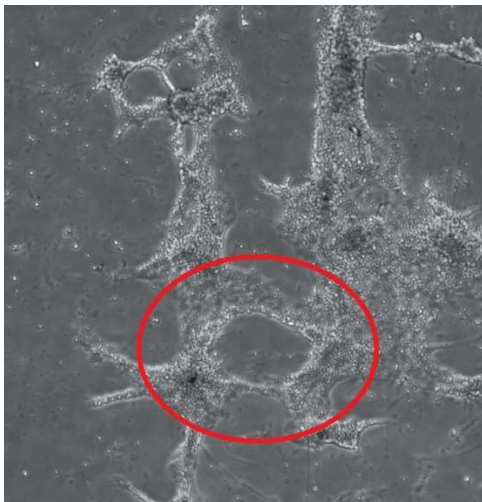
10. ábra További próbanyomtatások. A: Maximálisan nyomtatható vonal vastagság B: Minimális méretű ismétlődő minták C: Szabálytalan görbe D: A fejmagasság beállítás után egybefüggő minta is készíthető. A képeken látható mérő skála teljes hossza 1 mm



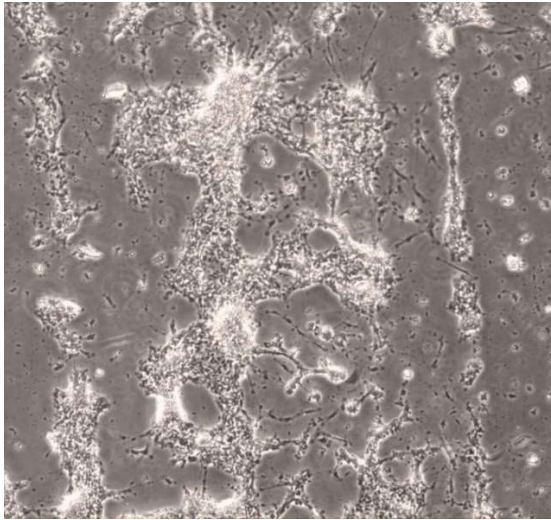
11. ábra A legelső nyomtatás eredménye formaldehiddel fixált téglalap alakú tenyészet. Mellette a nyomtatott ábra.



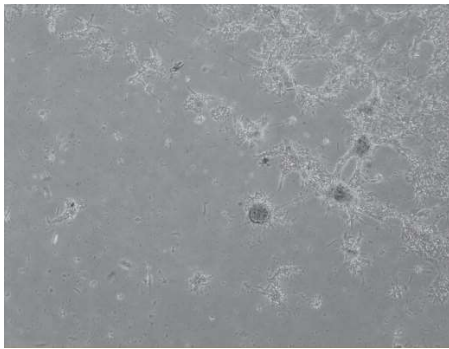
12. ábra 3 pt vastagságú vonal jól elkülönül a felületnyomtatott terület. Készült mellette található minta alapján.



13. ábraA túl közel nyomtatott neuronok axonjai egymással hidat képeznek. A mellette található minta alapján



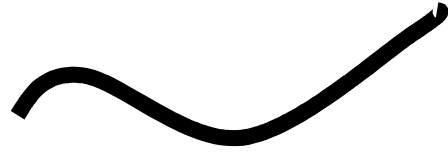
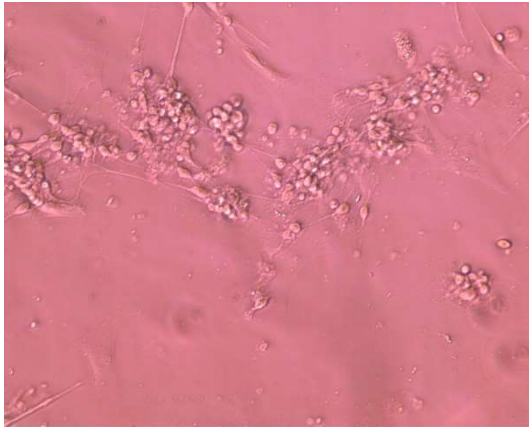
14. ábra 3 egyenes vonal egymás mellet. 2 azonos vastagságú (1pt) a középső vastagabb (4 pt). A mellette található minta alapján.



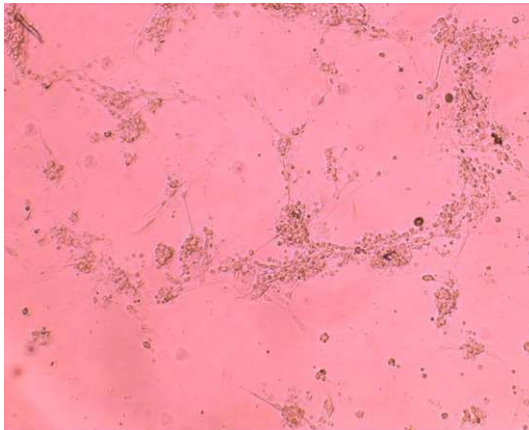
15. ábra Nyomatott vékonyvonal és egybefüggő vastag felületkezelt sáv. Jól látható hogy a nem felületkezelt területen nem tapadnak meg a sejtek. Készült a mellette található minta alapján



16. ábra Vízszintes sáv elválasztó egyenessel. Jól látható a nyomtatott és nem nyomtatott felület elkülönülése. Készült a mellette található ábra alapján.



17. ábra 1pt vastagságú hullámvonal. Készült a mellette található ábra alapján.



18. ábra 3pt vastagságú ellipszis alakú tenyészet. Készült a mellette található minta alapján.



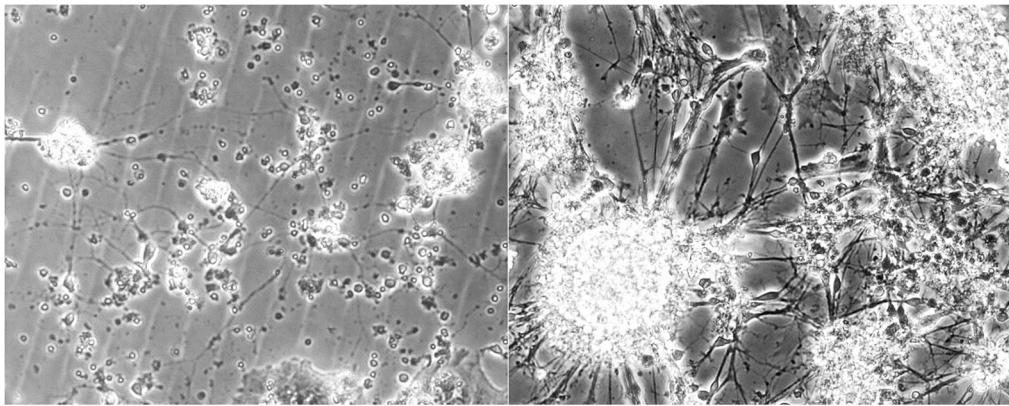
19. ábra Szem formájú tenyészet. Készült a mellette található ábra alapján.



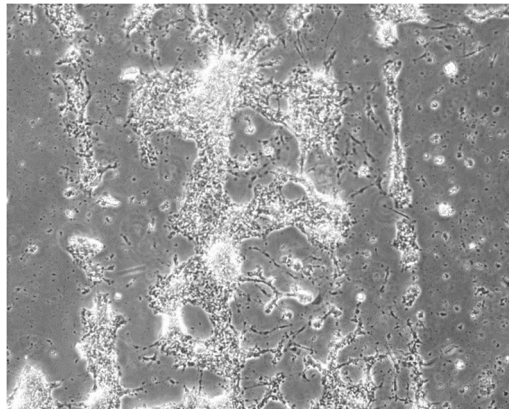
## 5.2.A kapott eredmények kiértékelése

A kész mintázott sejttenyészeteket lefényképeztem egy Olympus inverált fáziskontraszt mikroszkóp, valamint egy Olympus sztereó mikroszkóp segítségével. Szakdolgozatom során két nyomtatót használtam. Az átalakítás után a nyomtatók még három nagyobb változtatáson estek át. Az első nyomtatónak, miután sikeresen átalakítottam, körülbelül a tizedik nyomtatás alkalmával kiégett a vezérlő panelje, vélhetően egy zárlat miatt és ezt ezek után alkatrésznek használva megépítettem a jelenlegi nyomtót. Ennél két tárgyasztal került megépítésre. Az első nyomtatások alkalmával először tintával nyomtattam, hogy az új módszer használatában gyakorlatot szerezzek és kalibráljam a nyomtatót. (9-10. ábra) A fejmagasságot úgy kellett beállítani, hogy az ábrák folyamatosak legyenek, de a nyomtató fej közelsége ne tegyen kárt se a nyomtató fejből, se a tárgylemezben. A mérések során megkaptam eredményként a minimális nyomtatható vonalvastagságot (1pt ~ 0,300 mm) és a maximális vonalvastagságot (16pt ~ 4,8 mm). Mivel a neuronok sejttestjeinek mérete az 5 µm-től a 135 µm-ig terjedhet, ez a mérettartomány megfelelőnek bizonyult a sejt mintázatok elkészítésére. Ezután az átalakított patronnal nyomtattam és PLL-t használtam biotintaként. Ezzel egyre bonyolultabb mintákat készítettem. (11-19. ábra) Jól kivehető a mintákon megtapadt sejtek sokasága. Tehát ez bizonyítja, hogy a sejtek mintázására használható a tintasugaras nyomtatási módszer. Néhány tenyészetet formaldehiddel fixáltunk. Jól láthatók még az egyenes vonalak. Elkülöníthetők a nyomtatott és nem nyomtatott felületek egymástól. A kísérletek során megfigyelhető volt az is, hogy a jövőben szükséges a minták geometriájának optimalizálása, mivel az egymáshoz közel létrehozott neuronális minták között hidak jönnek létre. Bár ez új lehetőségeket adhat a sejtek közötti kapcsolatok vizsgálatára. Sajnálatos módon bebizonyosodott, hogy egy patron csak egy alkalommal, maximálisan 10 minta nyomtatására használható. A legalaposabb takarítás mellett is eltömődtek vagy beszáradtak a fűvókák. Ezzel magyarázhatók a sejtes minták minőség béli különbségei. Az eltömődés betudható a PLL halmazállapotának és tulajdonságainak is. A kísérletek során a tenyészetek nem fertőződtek be.

5.2.1. Egy nyomtatóval mintázott felület kezelt tenyészet összehasonlítása nem mintázott tenyészettel.



20. ábra 1 hetes csirke neuronális kontroll tenyészetek



21. ábra 1 hetes mintázott csirke neuronális tenyészet. 3 egyenes vonal egymás mellett. 2 azonos vastagságú (1pt) a középső vastagabb (4 pt).



Egy nyomtatóval mintázott, felület kezelt tenyészet és az egyszerű, nem mintázott tenyészet között a képek alapján is felismerhető különbségek figyelhetők meg. A 20. ábra képei és a 21. ábra képei is egy hetes tenyészetéről készült felvételek. Mind a két tenyészet azonos típusú sejtekből készült. A 20. ábra képein jól megfigyelhető, hogy a neuronok szabálytalan elrendeződésű csoportokat (plakkokat) hoznak létre. A véletlenszerű letapadásokkal nem szabályozható a neuronok elterjedése és ezek száma sem. A 21. ábrán megfigyelhető viszont, hogy a neuronok a felület kezelés méreteiből adódóan korlátokba ütköznek. Ahol nem felületkezelt a tárgylemez, azokon a helyeken többnyire nem tapadnak le a sejtek. Ahol felületkezelt a tárgylemez, ott szabályszerűen kitöltik a sejtek a rendelkezésükre álló területet, ezzel létrehozva a nyomtatott mintát. Itt pontosabban megbecsülhető a sejtek száma. A vékony mintázatoknál nincs, vagy csak alig figyelhető meg a neuronok egy helyre való csoportosulása. A mintázási módszernél szabályozható a neuronok közötti kapcsolatok ( a neuronális hidak) kialakulása is, míg a másik eljárásnál nem. Ezen hidak irányított létrejötte új lehetőségeket adhat további vizsgálatok végrehajtására a mesterségesen létrehozott neuron hálózatok ingerület átvivő képességének megfigyelésében. A felület nyomtatás számos új lehetőséget adhat a tenyészetek létrehozásához, mely során szabályos geometriai formákon hajthatók végre a farmakológiai, toxikológiai és fiziológiai vizsgálatok. Későbbiekben tervezem a sejtek nyomtatását. A sejtek nyomtatásával még jobban szabályozni lehetne a fentebb felsorolt tulajdonságokat. Fiziológiai és farmakológiai vizsgálatokat végezhetnénk ezeken a mintázott neuronális tenyészeteken. Megvizsgálhatnánk például, hogy a neuronhálózatok fiziológiai tulajdonsági (akciós potenciál generáció, spontán aktivitás, toxinokra való érzékenység) hogyan függ a kapcsolódó neuronok számától (a neuronális hálózat méretétől). A tintasugaras nyomtató segítségével különböző (kontrollált) méretű neuronális hálózatokat hoznánk létre és ezek tulajdonságait vizsgálnánk elektrofiziológiai, biokémiai és optikai módszerekkel.

## 6. Összefoglalás

Dolgozatomban áttekintettük a sejt- és szövet tenyésztéshez elengedhetetlen témákat, valamint a tenyésztés készítés történelmi hátterét. Áttekintőt írtam a komplex szerveződések kialakulásáról, a sejttenyészetek készítéséről és megvitattuk a szövetépítés fő módszereit. Ezek közül részletesen kitértem a sejtnyomatás folyamatára, hisz gyakorlati munkám során is ezekkel foglalkoztam. Sikeresen létrehoztunk és átalakítottunk egy sejtek és biológiai molekulák nyomtatására alkalmas tintasugaras nyomtatót. Kidolgoztunk egy módszert, amellyel mintázott idegsejt tenyészetek hozhatók létre. Először tintával való próbanyomatásokkal a nyomtató felbontását teszteltem. Itt megkaptam eredményként a minimális nyomtatható vonalvastagságot (1pt ~ 0,300 mm) és a maximális vonalvastagságot (16pt ~ 4,8 mm). A mintákat MS Office Word 2013 programmal szerkesztettem. Az előre megtervezett mintákat fedőlemezre nyomtattuk. Biotintaként Poly-L-Lysine-t (PLL) használtunk. A kész mintázott sejttenyészeteket lefényképeztük egy Olympus inverált fáziskontraszt mikroszkóp, valamint egy Olympus sztereo mikroszkóp segítségével. Jól kivehető volt a mintákon megtapadt sejtek sokasága. A tintával való nyomtatások során a nyomtató fejmagasság is után állítást követelt, mert a formák nem voltak folytonosak, egybefüggőek. A kész tenyészetek nem fertőzöttek be, tehát az alkoholos sterilizálás elegendőnek bizonyult. A nyomtató használata során bebizonyosodott, hogy egy patron csak egy alkalomra használható 10-20 tárgylemez nyomtatására. A legalaposabb takarítás mellett is, a többszöri felhasználás során a fűvókák eltömődhetnek. A tintasugaras nyomtatás könnyű és hatékony módszernek bizonyult a sejtmintázatok létrehozására. A minták geometriájának optimalizálása a későbbiekben szükséges, mivel az egymáshoz közel létrehozott neuronális minták között hidak jönnek létre. Ez nem feltétlen jó eredmény, de lehetőségeket adhat további vizsgálatok végrehajtására a mesterségesen létrehozott neuron hálózatok ingerület átvivő képességének megfigyelésében. Az így létrehozott 2D sejtnyomatási technika új lehetőségeket ad a tenyészetek létrehozásához, mely során szabályos geometriai formákon hajthatók végre a farmakológiai, toxikológiai és fiziológiai vizsgálatok.

A módszer használata hasznosnak is bizonyult számomra, mert jól soron követhető a sejtek fejlődése és a tenyészetek szövetek létrejötte. Így szakdolgozatom témája segített jobban szemléltetni a tanórákon tanultakat, és felkeltette az érdeklődésemet a kutatói munka iránt.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Nyugat-magyarországi Egyetem Természettudományi és Műszaki Karának a tanulási és fejlődési lehetőségekért. Köszönöm a támogatásokat, amiket kaptam. Különösen szeretném megköszönni Dr. Molnár Péternek, szakdolgozatom témavezetőjének, tanáromnak, a rengeteg segítséget, a sok türelmet és a támogatást. Köszönöm a gyakorlati tapasztalatszerzési lehetőséget, amit a munkám során elérhetővé tett számomra.

## 8. Ábrajegyzék

1. ÁBRA NEURONOK FELÉPÍTÉSE (CZÉH 2001) .....	11
2. ÁBRA NEURONOK CSOPORTOSÍTÁSA FUNKCIÓ SZERINT ( <a href="http://www.jataka.hu/rics/speci/src/class12/pict/bio/neuronok.jpg">HTTP://WWW.JATAKA.HU/RICS/SPECI/SRC/CLASS12/PICT/BIO/NEURONOK.JPG</a> ) .....	12
3. ÁBRA EGY SEJT MEGSZÚRÁSA MIKROSKÓP ALATT PATCH CLAMP ELEKTRODÁVAL. KÉSZÜLT EGY ELEKTRO FIZIOLÓGIAI VIZSGÁLAT SORÁN .....	17
4. ÁBRA 7 NAPOS CSIRKE EMBRIÓ NEURONÁLIS TENYÉSZETE. ....	19
5. ÁBRA A NYOMTATÓ ÁTALAKÍTÁSÁNAK FŐBB LÉPÉSEI (A KÉPEK MÉG AZ ELSŐ VERZIÓJÚ NYOMTATÓNÁL KÉSZÜLTEK) .....	24
6. ÁBRA A: A TÁRGYASZTAL FELMÉRT PONTJA, B: A KÍVÜLRE HELYEZETT FOTOCÉLLÁS ÉRZÉKELŐ, C: A KÍVÜLRE HELYEZETT BEKAPCSOLÓ PANEL .....	24
7. ÁBRA A KITISZÍTOTT, ÁTALAKÍTOTT TINTA PATRONOK ALUL ÉS FELÜLNÉZETI KÉPE .....	25
8. ÁBRA AZ ELTÁVOLÍTOTT SZŰRŐ .....	25
9. ÁBRA PRÓBA NYOMTATÁSOK TINTÁVAL. A KÉPEKEN LÁTHATÓ MÉRŐ SKÁLA TELJES HOSSZA 1 MM. ....	27
10. ÁBRA TOVÁBBI PRÓBANYOMTATÁSOK. A: MAXIMÁLISAN NYOMTATHATÓ VONAL VASTAGSÁG B: MINIMÁLIS MÉRETŰ ISMÉTLŐDŐ MINTÁK C: SZABÁLYTALAN GÖRBE D: A FEJMAGASSÁG BEÁLLÍTÁS UTÁN EGYBEFÜGGŐ MINTA IS KÉSZÍTHETŐ. A KÉPEKEN LÁTHATÓ MÉRŐ SKÁLA TELJES HOSSZA 1 MM .....	27
11. ÁBRA A LEGELSŐ NYOMTATÁS EREDMÉNYE FORMALDEHIDDEL FIXÁLT TÉGLALAP ALAKÚ TENYÉSZET. MELLETTE A NYOMTATOTT ÁBRA .....	28
12. ÁBRA 3 PT VASTAGSÁGÚ VONAL JÓL ELKÜLÖNÜL A FELÜLETNYOMTATOTT TERÜLET. KÉSZÜLT MELLETTE TALÁLHATÓ MINTA ALAPJÁN .....	28
13. ÁBRAA TÚL KÖZEL NYOMTATOTT NEURONOK AXONJAI EGYMÁSSAL HIDAT KÉPEZNEK. A MELLETTE TALÁLHATÓ MINTA ALAPJÁN .....	28
14. ÁBRA 3 EGYENES VONAL EGYMÁS MELLET. 2 AZONOS VASTAGSÁGÚ (1PT) A KÖZÉPSŐ VASTAGABB (4 PT). A MELLETTE TALÁLHATÓ MINTA ALAPJÁN. ....	29
15. ÁBRA NYOMTATOTT VÉKONYVONAL ÉS EGYBEFÜGGŐ VASTAG FELÜLETKEZELT SÁV. JÓL LÁTHATÓ HOGY A NEM FELÜLETKEZELT TERÜLETEN NEM TAPADNAK MEG A SEJTEK. KÉSZÜLT A MELLETTE TALÁLHATÓ MINTA ALAPJÁN .....	29
16. ÁBRA VÍZSZINTES SÁV ELVÁLASZTÓ EGYENESSEL. JÓL LÁTHATÓ A NYOMTATOTT ÉS NEM NYOMTATOTT FELÜLET ELKÜLÖNÜLÉSE. KÉSZÜLT A MELLETTE TALÁLHATÓ ÁBRA ALAPJÁN. ....	29
17. ÁBRA 1PT VASTAGSÁGÚ HULLÁMVONAL. KÉSZÜLT A MELLETTE TALÁLHATÓ ÁBRA ALAPJÁN. ....	30
18. ÁBRA 3PT VASTAGSÁGÚ ELLIPSZIS ALAKÚ TENYÉSZET. KÉSZÜLT A MELLETTE TALÁLHATÓ MINTA ALAPJÁN.....	30
19. ÁBRA SZEM FORMÁJÚ TENYÉSZET. KÉSZÜLT A MELLETTE TALÁLHATÓ ÁBRA ALAPJÁN .....	30
20. ÁBRA 1 HETES CSIRKE NEURONÁLIS KONTROLL TENYÉSZETEK .....	32
21. ÁBRA 1 HETES MINTÁZOTT CSIRKE NEURONÁLIS TENYÉSZET. 3 EGYENES VONAL EGYMÁS MELLET. 2 AZONOS VASTAGSÁGÚ (1PT) A KÖZÉPSŐ VASTAGABB (4 PT). ....	32

## 9. Felhasznált irodalmak

- Blog Biomaass Critical, 2015. Az eukarióta sejt eredetének “kifordított” elmélete. , pp.1–6. Available at:  
[http://criticalbiomass.blog.hu/2014/11/25/az\\_eukariota\\_sejt\\_eredetenek\\_kiforditott\\_elmelete](http://criticalbiomass.blog.hu/2014/11/25/az_eukariota_sejt_eredetenek_kiforditott_elmelete).
- Boland, T. et al., 2006. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnology Journal*, 1(9), pp.910–917.
- Cui, X. et al., 2012. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 6(2), pp.149–55. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3565591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Czéh, G., 2001. Celluláris neurobiológia.
- Emilia Madarász, 2010. 15. \* A sejtbiológia gyakorlata 15.1. Sejt- és szövettényésztés: módszertani alapismeretek M. *Hallgatói jegyzet*, pp.720–734.
- Fedorovich, N.E. et al., 2007. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue engineering*, 13(8), pp.1905–1925.
- Gyires, K. & Fürst, Z., 2011. A farmakológia alapjai. , p.1288.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2000. the hallmark of cancer. *Cell*, 60, pp.319–326. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>.
- John Maynard Smith & Szathmáry Eörs, 1997.  
*Az evolucio nagy lépesei*.

- Julia, L., 2013. Kis molekulatömegű szerves vízi szennyezőanyagok hatása a sejtadhézióra és migrációra – A sejt adhézió és migráció alk alkalmazhatósága ökotoxikológiai végpontként – Láng Júlia Anna. *Semmelweis Egyetem*.
- Kane, R.S. et al., 1999. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, 20(23-24), pp.2363–2376.
- Kovács Zsolt, 2011. Az állati szövetek. *NYME TTMK*.
- Langer, R. & Vacanti, J.P., 1993. - ARTICLES Tissue Engineering. *Science*, 260, pp.920–926.
- Magee, T.R. et al., 1992. DNA damage-inducible origins of DNA replication in Escherichia coli. *The EMBO journal*, 11(11), pp.4219–4225.
- Molnár, K., 2012. Bevezetés az állattanba. *ELTE TTK*. Available at: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/elte-ttk/kozos/tananyagok/molnar-kinga-bevezetes-az-allattanba.pdf>.
- Nagy Péter, Joób-Fancsaly Árpád, Schindler Árpád, Pammer Dávid & Eszter, B., 2004. Biomechanica Hungarica III. évfolyam, 1. szám FOGÁSZATI IMPLANTÁTUMOK FELÜLETKEZELÉSE. , pp.61–66.
- Norotte, C. et al., 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, 30(30), pp.5910–5917.
- Novák, B., 1998. Sejtbiológia biomérnök hallgatók számára. *BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék*, pp.1–19. Available at: <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/sejtbiol/evolucio.pdf>.
- O'Brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), pp.88–95. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).

- Owczarczak, A.B. et al., 2012. Creating Transient Cell Membrane Pores Using a Standard Inkjet Printer. *Journal of Visualized Experiments*, (61), pp.1–6.
- Owens, C.M. et al., 2013. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft. *Biofabrication*, 5(4), p.045007. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192236>.
- Pálfia, Z. & Zoltán, K., 2013. A sejtbiológia alapjai. , p.170.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G. & Stelzer, E.H.K., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), pp.839–845.
- Sorribas, H., Padeste, C. & Tiefenauer, L., 2002. Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials*, 23(3), pp.893–900.
- Turáni Melinda, 2012. SEJTKULTÚRÁK ÉS SEJTANI PREPARATÍV TECHNIKÁK (vázlat). *DEOEC-KODI*.
- Whitesides, G.M. et al., 2001. Soft Lithography in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3, pp.335–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447067>.
- Wikipedia EN, 2012. Insulin. , pp.1–20.



EGYÉB FELHASZNÁLT IRODALMAK:

ANGOL WIKIPEDIA

<https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin> (utolsó megtekintés 2015.11.18)

ANGOL WIKIPEDIA

<https://en.wikipedia.org/wiki/Neuron> (utolsó megtekintés 2015.11.18)

*VWR Online Shop*

[https://hu.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog\\_number=734-0178](https://hu.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=734-0178) (utolsó megtekintés 2015.11.18)