



České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta biomedicínského inženýrství

**Laboratorní protokol z předmětu  
Biotechnologie, regenerativní medicína, tkáňové  
inženýrství, biomateriály a nanotechnologie,  
biosenzory**

Téma: Kultivace buněk a příprava bioinku pro 3D tisk

**Vypracovala:** Ing. Simona Stuchlíková  
**Studijní program:** Biomedicínské inženýrství  
**Datum:** 17. 1. 2022

## **Cíl:**

Úkolem laboratorních cvičení bylo:

- 1) Nasadit buňky do kultivačních destiček. Naučit se s buňkami správně manipulovat a vyhodnotit jejich růst.
- 2) Připravit bioink (hydrogel s buňkami) pro biotisk a následná aplikace bioinku na podložní sklíčko se závěrečným testem na mechanické vlastnosti tohoto výtisku z 3D tiskárny.

## **Pomůcky:**

PBS pufr, trypsin, pufr, EDTA, inkubátor, buněčná linie, kultivační médium, mikroskop, pipeta, 15 ml falkonky, centrifuga, mikrozukmavky, trypanová modř, Bürkerova komůrka, kultivační deska, lednice, prasečí kolagen, buněčná suspenze, voda, NaOH, buněčné médium, stříkačky, podložní sklíčka, mezičleny (ke stříkačkám), uzavíratelné zkumavky, špičky, centrifuga, rukavice, destilovaná voda, líh, pipetman

## **Postup:**

### **1)**

Z předem připravených kultivačních lahví (185 cm<sup>2</sup>) s buňkami odsajeme pipetmanem médium. Opláchneme buňky 8 ml sterilního PBS pufru a následně jej odsajeme jako v předchozím kroku. Přidáme 4 ml roztoku EDTA a po uplynutí jedné minuty toto množství odsajeme. Následuje přidání 1 ml roztoku trypsin-EDTA a následná inkubace flašek v inkubátoru po dobu 5 minut při 37 °C. Po uplynutí této doby se buňky zkontrolují pod mikroskopem. Měly by být zakulacené a odlepené od podkladu. V případě stálého přilnutí k povrchu stačí na flašku ze strany poklepat a i zbylé buňky by se měly uvolnit.

Ke směsi uvolněných buněk s médiem se přidá dalších 5 ml kultivačního média se sérem. Nyní se celý obsah flašky přepipetuje do 15 ml falkonky a vloží do centrifugy. Nastavíme program na dobu 5 minut, 21 °C a 300 g. Po úspěšném stočení bychom na dně falkonky měli vidět peletu s buňkami. Supernatant odlijeme nebo odsajeme, aby nám zbyly pouze buňky. K buňkám přidáme 3 ml čerstvého média se sérem a řádně resuspendujeme.

Do mikrozukmavky odebereme 40 µl buněčné suspenze, přidáme 40 µl roztoku trypanové modři a propipetujeme. Do Bürkerovi komůrky napipetujeme 10 µl směsi. Spočítáme počet živých a mrtvých buněk v minimálně 3 velkých čtvercích Bürkerovi komůrky. Výsledky zprůměrujeme a stanovíme viabilitu buněk a to jak budeme buněčnou suspenzi ředit.

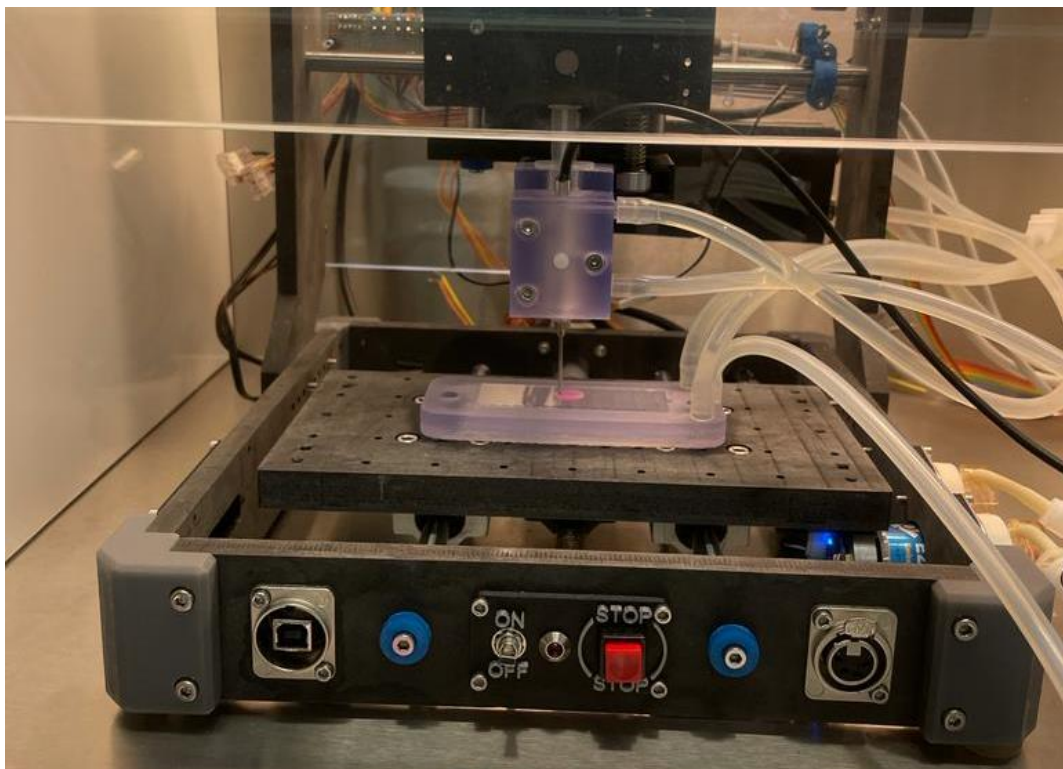
Buňky naředíme na požadovanou hustotu do kultivační desky, kterou si řádně popíšeme. Desku vložíme do inkubátoru a necháme kultivovat za standardních podmínek.

2)

Buňky, které jsme si připravili dříve vyndáme z inkubátoru a budeme je potřebovat pro přípravu bioinku. Koncentrace musí být přibližně 10 milionu buněk na mililitr. Vypočítali jsme si všechny složky potřebné pro vytvoření bioinku a rozplánovali jsme si promíchávání. Vše je potřebné připravovat rychle, neboť jednotlivé komponenty jsou uchovávány při teplotě 5 °C a je potřebné, aby nestihly moc zteplat, kvůli jejich skupenství. Celkem jsme připravili 2 ml bioinku s koncentrací 3 mil./ml. Bioink jsme složili z 20  $\mu$ l NaOH, 70  $\mu$ l desetkrát koncentrovaného média, 80  $\mu$ l vody, 110  $\mu$ l jedenkrát koncentrovaného kultivačního média, 220  $\mu$ l buněčné suspenze a 500  $\mu$ l hydrogelového kolagenu s pH 4.

Míchání bioinku má dané určité pořadí, aby nám nezatuhl dříve, než ho umístíme na místo určené pro tisk, popřípadě, aby nedošlo k poškození buněk díky kyselějšímu prostředí kolagenu. Připravíme si tři 2 ml stříkačky. Do první připravíme buněčnou suspenzi o objemu, který jsme pro náš pokus spočítali. Tuto stříkačku vkládáme do lednice, aby měly buňky stejnou teplotu jako zbylý materiál. Ve druhé stříkačce smícháme NaOH, desetkrát koncentrované médium, vodu a jedenkrát koncentrované kultivační médium. Ve třetí stříkačce je pouze kolagen o koncentraci 2 x větší než je plánovaná finální verze. Všechny stříkačky jsme před mícháním vložili do lednice.

Při smíchání jednotlivých stříkaček musíme pracovat velmi rychle, aby nám směs nestihla zatuhnout ve stříkačce ještě před tiskem. Nejdříve smícháme stříkačku s kolagenem a pomocnými aditivy skrze šroubovací mezičlen. Následně přimícháme stříkačku s buněčnou suspenzí a po důkladném promíchání umístíme stříkačku s přišroubovanou dlouhou jehlou do 3D tiskárny. Nyní spustíme pouze program a čekáme na výsledný produkt.



Obrázek 1: 3D tiskárna aplikující bioink na konkrétní výtisk

## **Závěr:**

Závěrem mohu říci, že jsem se naučila lépe pracovat s laboratorním vybavením týkající se molekulární biologie a zároveň si vyzkoušela práci s jiným biologickým materiálem a technikami než doposud. Bioing, který jsem připravovala poprvé dle návodu a pod dozorem vedoucího praktik se nám zcela nepovedl, proto nemohu přiložit žádné relevantní výsledné hodnoty. Ty se měly týkat pevnosti zatuhnutého bioingu s buňkami i bez nich, kterou vyhodnocoval počítačový program. Myslím si, že důvodem nemožného měření mohla být pomalejší příprava (směs začala tuhnout dříve a uvnitř vznikly vzduchové kapsičky, které konečný produkt narušily). Další možnou komplikací mohlo být nedostatečné zatuhnutí výtisku, či kolagen, který už byl starší a tak nemusel mít vlastnosti, které jsme si od něho slibovali. I když nám náš pokus nevyšel, vedoucí praktik nám ukázal a vysvětlil, jaké by měly výsledky reálně být.

Celkově tak hodnotím tento předmět velmi přínosně. Zjistila jsem i něco o jiných projektech, které u nás na fakultě probíhají a zároveň nahlédla na problematiku molekulární biologie z jiného úhlu využití.

## **Literatura:**

JEDRZEJCZAK-SILICKA, Magdalena. History of Cell Culture. Online. *New Insights into Cell Culture Technology*. 2017. ISBN 978-953-51-3133-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/66905>.