

Voiko 3d-tulostuksessa käytetyistä muovimateriaaleista valmistettuja astioita käyttää soljen viljelyssä?

TuKoKe työ



Kuvan lähde: tekijän oma kuva-arkisto

Sisälllys:

Tiivistelmä s. 2

Johdanto s. 2

Suunnitelma s. 3

Toteutus s. 3

Materiaalien valinta ja astioiden valmistus s. 3

Työskentely laboratorioissa s. 5

Tutkimusdata s. 5-7

Tulokset s. 7

Mitä olisimme voineet tehdä paremmin s. 8

3d-tulostettujen astioiden etu kaupallisiin nähden s. 8

Kiitokset s. 8

Tiivistelmä

Valitsimme neljä erilaista tulostusmateriaalia, ja tulostimme niistä soluviljelyssä käytettävät kuoppalevyt. Tulostimme kullakin materiaalilla kolme kuoppalevyä. Tämän jälkeen sterilioimme kuoppalevyt etanolilla. Tutkimuksessa käytimme 293-t munuaissoluja ja HeLa syöpäsoluja. Otimme myös yhden yleisesti käytössä olevan kuoppalevyn, johon laitoimme kasvamaan kontrollierän samoja soluja. Annoimme solujen kasvaa 48 tuntia inkubaattorissa, jonka jälkeen laskimme solujen kokonaismäärän, sekä elävien, että kuolleiden solujen määrän suhteessa solujen kokonaismäärään. Katsoimme, kuinka suuri eroavaisuus luvuilla oli kontrollikappaleeseen verrattuna, ja siitä arvioimme eri materiaalien soveltuvuuden soluviljelyyn. Kahdessa neljästä valitsemastamme materiaalista (CPE+ ja PLA) tulokset olivat suurin piirtein linjassa kontrolliastian kanssa. Kahdessa muussa materiaalissa (TPU95 ja ABS) tulokset olivat epäjohdonmukaisia ja selvästi huonompia kuin kontrollissa. Tästä voimme päätellä, että CPE+ ja PLA materiaalit voisivat soveltua käyttämiemme solujen viljelyyn. TPU95 ja ABS eivät vaikuta soveltuvilta soluviljelyyn.

Johdanto

Halusimme tutkia onko mahdollista viljellä soluja materiaaleissa, jotka ovat helposti manipuloitavissa. Jos soluja kyetään kasvattamaan tällaisissa materiaaleissa voi soluviljelyä mahdollisesti parantaa esimerkiksi astialla, jonka kasvupinta-alaa on suurennettu. Kysymys siis on voiko 3d-tulostuksessa käytetyistä muovimateriaaleista valmistettuja astioita käyttää soluviljelyssä? Hypotesimme mukaan PLA olisi paras vaihtoehto, koska se on ympäristöystävällisin vaihtoehtoista, CPE+ ja TPU95 olisivat myös sopivia, koska ainakaan havaintojemme mukaan tulostettaessa ne eivät vapauta myrkykaasuja ja ABS olisi huonoin vaihtoehto sen tulostettaessa päästämien myrkykaasujen takia.

Suunnitelma

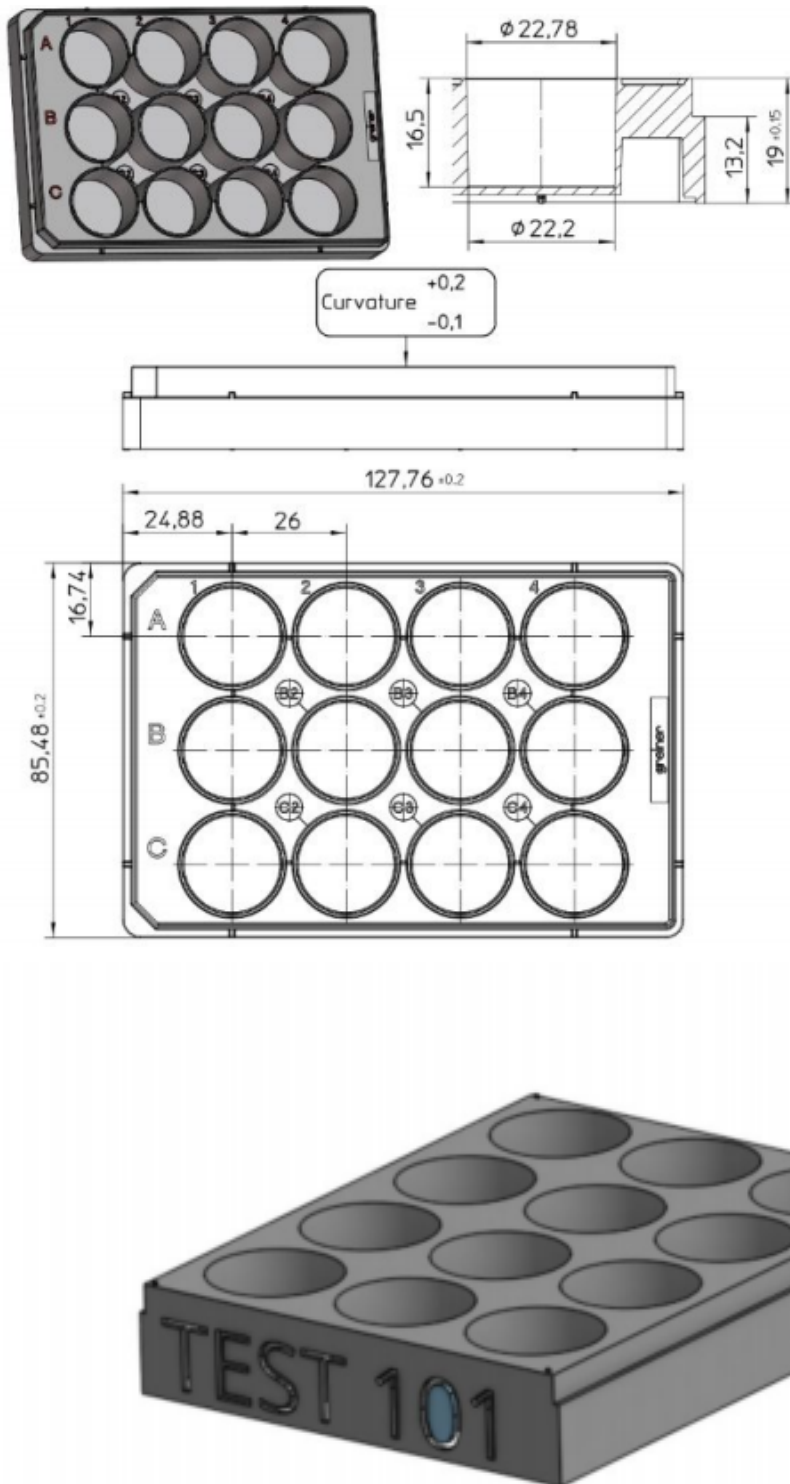
Valitsemme neljä saatavilla olevaa 3D-tulostuksessa käytettävää muovimateriaalia, ja tulostamme niistä soluviljelyssä käytettävät kuoppalevyt. Valitsemme kustakin materiaalista kolme tulostettua kuoppalevyä. Tämän jälkeen sterilisoimme kuoppalevyt etanolilla. Tutkimuksessa käytämme 293-t munuaissoluja. Irrotamme solut niiden kasvatusalustasta, ja laskemme niiden määrän millilitraa kohden solulaskentalaitteella. Laskennan jälkeen siirrämme solut 3D-tulostettuihin soluviljelyastioihin. Otamme myös yhden yleisesti käytössä olevan kuoppalevyn, johon laitamme kasvamaan kontrollierän samoja soluja. Annamme solujen kasvaa kaksi päivää inkubaattorissa, jonka jälkeen irrotamme solut kuoppalevyistä. Laskemme solujen kokonaismäärän, sekä elävien ja kuolleiden solujen määrän suhteessa solujen kokonaismäärään. Katsomme, kuinka suuri eroavaisuus luvuilla on kontrollikappaleeseen verrattuna, ja siitä päätelemme eri materiaalien soveltuvuuden soluviljelyyn. Kokeen kannalta merkittävä tulos on, jos solut elävät hyvin kuoppalevyn pinnalla, koska se kertoo, että kuoppalevyn materiaali ei haittaa solujen kasvua. Silloin kuoppalevy voi olla käyttökelpoinen soluviljelyyn.

Toteutus

Materiaalien valinta ja astioiden valmistus

Valitsimme materiaaleiksi ABS Ultimaker valkoinen, BASF Ultrafuse PLA, TPU95 ja CPE+ Ultimaker kirkas filamentit. Valitsimme PLA muovin sen yleisyyden ja tulostusprosessin helppouden takia, ABS muovin sen kestävyden ja yleisyyden takia, elastisen TPU95 muovin, koska halusimme nähdä materiaalin joustavuuden vaikutukset tulokseen ja CPE+ muovin sen läpinäkyvyyden takia. Astiat mallinnettiin 12 kaivoisen kuoppalevyn valmiiden piirustusten mukaan OnShape mallinnus sivustolla ja mallia kevennettiin muutaman testikappaleen version aikana ohentamalla reunoja. Huomasimme nimittäin, että tulostamiseen menee tuhattomasti aikaa, jos seinämät ovat paksuja. Ohuemmillä seinämillä tulostusaika oli paljon lyhyempi, eikä astian toiminnalle seinämien paksuudella ollut merkitystä. Tulostaminen suoritettiin Käpylän Peruskoulun omistuksessa olevalla Makerbot 2+ 3d printterillä. Käytimme 0.4mm suutinta ja materiaalien oletusasetuksilla. Malli muutettiin printterille ja materiaaleille sopivaksi käyttämällä Ultimaker Cura 3d leikkuri ohjelmistoa. Ehdimme tulostamaan vain kolme ABS-kuoppalevyä, jonka vuoksi päädyimme valitsemaan kolme kuoppalevyä jokaisesta materiaalista.

Kuva: Screenshot Greiner Bio-Onen astiamallista.



Kuva: Tutkimusta varten mallinnettu, printtaamista varten suunniteltu malli.

Työskentely laboratoriossa

Laboratoriotyöskentelyn alkuvaiheissa meille tarjottiin mahdollisuus viljellä HeLa-syöpäsoluja. Tämä on hyvä myös tutkimuksen kannalta, koska kahdella solukannalla tutkimus on kattavampi. Aloitimme steriloimalla viljelyastiat 95% etanolilla ja päällystimme jokaisen astian kaivoista puolet gelatiinilla. Tiedämme, että solut pystyvät kasvamaan gelatiinilla, joten pinnoite antaa kasvatukseen varmasti sopivan pohjan. Jos solut kasvaisivat vain päällystetyllä puolella saisimme selville, että solut hylkivät astian pohjan materiaalia. Tämän jälkeen teimme kontrolliviljelyn molemmista solukannoista teollisesti tuotettuun kuoppalevyyn, jotta saisimme vertailuaineistoa siitä, kuinka solut käyttäytyvät teollisissa astioissa. Kontrollin avulla pystymme päättämään 3d-tulostuksessa käytettävien muovimateriaalien vaikutuksen solujen käyttäytymiseen.

Viljelimme munuaissolut ja HeLa-solut irrottamalla ne alkuperäisistä viljelmistään trypsiinillä, neutraloimme trypsiinin alpha-1 antitrypsiinillä, ja laskimme solujen määrät värjäämällä ne trypaanisinella ja syöttämällä näytteen solulaskuriin laimennussuhdetta varten. Laskimme laimennussuhteen ja teimme kasvunesteen soluille laskurin tuloksen mukaan. Näin saimme kuhunkin kaivoon kokeen alkutilanteeseen yhtä paljon soluja. Lopuksi pipetöimme solut viljelyastioihin. Keräsimme 48 tunnin jälkeen viljelmistä kelluvat solut, värjäsimme ne, ja laskimme ne solulaskurilla. Sitten irrotimme loput solut trypsiinillä, neutralisoimme trypsiinin ja värjäsimme solut trypaanisinella laskettaviksi. Laskimme solut laskurilla ja kirjasimme tulokset Excel-taulukkoon. Soluviljelyt, mittaukset ja niihin liittyvät työt tehtiin Helsingin Yliopiston Tutkimusohjelmayksikössä (TOY) Meilahdessa.

Tutkimusdata

© merkki kertoo jos astia on päällystetty gelatiinilla.

Control Dish	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
293T	27 %	4,11*10 ⁴	89 %	1,77*10 ⁶
Mystery 1	40 %	1,17*10 ⁴	95 %	8,4*10 ⁵
293T ©	17 %	5,86*10 ³	96 %	1,35*10 ⁶
Mystery © 2	52 %	9,38*10 ⁴	95 %	5,10*10 ⁵

PLA 101	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	57%	7.62*10 ⁴	87%	2.64*10 ⁵
293T	40%	5.86*10 ⁴	98%	1.42*10 ⁶
Hela ©	50%	5.86*10 ³	94%	2.70*10 ⁵
293T ©	35%	5.28*10 ⁴	93%	1.01*10 ⁶
PLA 103	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)

		alive)		
Hela	0%	0	84%	2.29*10 ⁵
293T	17%	1.76*10 ⁴	34%	2.05*10 ⁵
Hela ©	33%	5.86*10 ³	24%	1.17*10 ⁵
293T ©	0%	0/ml	92%	8.09*10 ⁵
PLA 104	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/ml alive)
Hela	21%	1.76x10 ⁴	93%	2.46*10 ⁵
293T	17%	5.86*10 ³	99%	7.39*10 ⁵
Hela ©			96%	3.75*10 ⁵
293T ©	26%	2.93x10 ⁴	97%	1.19*10 ⁶
ABS 101	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	32%	7,04x10 ⁴	93%	4.75*10 ⁵
293T	FAIL	FAIL	24%	2.87*10 ⁵
Hela ©	25%	1.17*10 ⁴	77%	6.80*10 ⁵
293T ©	FAIL	FAIL	53%	5.86*10 ⁴
ABS 102	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	0%	0 (1.17*10 ⁴ /ml dead)	30%	3.58*10 ⁵
293T	FAIL	FAIL	96%	3.93*10 ⁵
Hela ©	33%	5.28*10 ⁴	19%	4.11*10 ⁴
293T ©	33%	2.93*10 ⁴	30%	2.93*10 ⁵
ABS 103	Floating (% alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	11%	5.86*10 ³	Ruined	ruined
293T	0%	0 (1.29*10 ⁵ /ml dead)	33%	1.06*10 ⁵
Hela ©	17%	5.86*10 ³	90%	1.11*10 ⁵
293T ©	0%	0 (3.52*10 ⁴ /ml dead)	94%	4.75*10 ⁵
TPU 101	Floating (%)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	29%	9.97*10 ⁴	28%	6.45*10 ⁴
293T	25%	1.17*10 ⁴	55%	2.64*10 ⁵
Hela ©	28%	1.29*10 ⁵	28%	1.06*10 ⁵
293T ©	42%	2.93*10 ⁴	29%	9.38*10 ⁴

TPU 103	Floating (%) alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	41%	1.14*10 ⁵	Fail	Fail (1.58*10 ⁵)
293T	22%	4.69*10 ⁴	25%	4.69*10 ⁴
Hela ©	51%	1.64*10 ⁵	25%	4.11*10 ⁴
293T ©	31%	9.38*10 ⁴	19%	1.76*10 ⁴
CPE+ 104	Floating (%) alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	34%	9.38*10 ⁴	32%	4.11*10 ⁴
293T	28%	6.45*10 ⁴	59%	2.58*10 ⁵
Hela ©	61%	2.35*10 ⁵	24%	9.38*10 ⁴
293T ©	25%	7.62*10 ⁴	57%	3.93*10 ⁵
CPE+ 105	Floating (%) alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	fail	fail	71%	2.99*10 ⁵
293T	33%	1.76*10 ⁴	97%	1.41*10 ⁶
Hela ©	fail	fail	95%	4.34*10 ⁵
293T ©	0%	0/ml	96%	9.79*10 ⁵
CPE+ 106	Floating (%) alive)	Floating (/mL alive)	Attached (% alive)	Attached (/mL alive)
Hela	22%	1.17*10 ⁴	95%	4.87*10 ⁵
293T	Fail	Fail	95%	1.19*10 ⁶
Hela ©	27%	2.35*10 ⁴	46%	1.99*10 ⁵
293T ©	38%	5.86*10 ⁴	92%	7.92*10 ⁵

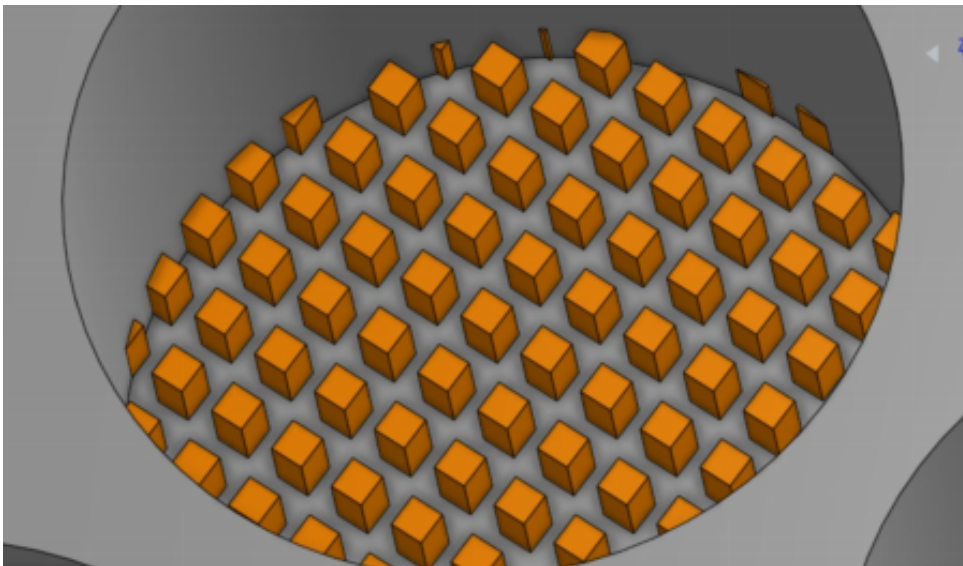
Tulokset

Mittaus- ja viljelymenetelmän, sekä tutkimuksen pienen mittakaavan johdosta jotkut tulokset ovat epäselviä. Tästä huolimatta voimme nähdä selvästi etteivät TPU95 ja ABS muovit sovi tutkimuksen perusteella solujen viljelyyn vällinneissa oloissa. Näemme myös, että PLA ja CPE+ muovien tulokset vaikuttavat lupaavilta. Tämä siis, kun viljellään käyttämiämme Hela- ja 293T-soluja. Muille solukannoille sopivuudesta tämä tutkimus ei kerro. PLA ja CPE+ muoveista valmistettujen astioiden tulokset ovat suurinpiirtein linjassa kontrolliastian kanssa. Esimerkiksi PLA 101 astian 1.42*10⁶/ml elossa olevien solujen tiheys ei jää kontrollin 1,77*10⁶/ml paljon jälkeen. Astioissa oli myös heikkoutena se, että niitä ei voinut tarkastella mikroskoopilla, koska valo ei pääse astian läpi. Tutkimustuloksia tarkastellessa tulee huomata, että jos kiinnittyneiden solujen selviämisen todennäköisyys on yli 90 prosenttia ja solujen määrä on yli muutaman sadantuhannen on tulos erittäin hyvä. Lähes kaikissa astioissa on hieman jotakin häikkää joka voi johtua useammasta asiasta. Epäilemme että yleisin selitys on, että näytteitä ottaessa pipetöimme soluja liikaa ja osa niistä kuoli tässä prosessissa. Leijuvien solujen määrällä voimme tarkistaa pysyvätkö solut kiinni astioissa ja pienempi määrä niitä on hyvä tulos.

Mitä olisimme voineet tehdä paremmin?

Työmme suunnitelma ei ollut tarpeeksi viimeistelty aikataulusongelmien ja kokemattomuuden vuoksi. Alunperin tutkimuksen laajuus ei ollut selvää. Emme tieneet viljelisimmekö vain 293-t soluja vai viljelisimmekö useita erilaisia soluja. Lopulta päädyimme viljelemään 293-t munuaissoluja sekä HeLa syöpäsoluja. Meillä oli myös puutteita tiedon kirjaamisessa. Kirjaamisvirheen takia kokonaisen astian data katosi täysin. Kontaminaation välttämiseksi oli myös puutteita, mutta tuloksissa emme siitä huolimatta havainneet merkkejä solujen kontaminoitumisesta. Olisimme voineet tehdä suuremman määrän astioita selkeämpien tulosten kannalta, mutta ikävä kyllä aikaraja tuli vastaan.

3d-tulostettujen astioiden etu kaupallisiin nähden



Päätimme myös kokeilla astian “kaivojen” pohjapinta-alan kasvattamista muuttamalla ne epätasaisiksi. Tämä voisi mahdollistaa 2 kertaa suuremman kasvupinnan soluille samassa tilassa ja auttaa tutkijoita työssään. Testit ovat tältä osalta kuitenkin vielä tekemättä.

Kiitokset

Suuret kiitokset Helsingin Yliopiston Meilahden Tutkimusohjelmayksikölle ja sen henkilökunnalle tämän tutkimuksen mahdollistamisesta. Yhtälailla kiitämme Käpylän peruskoulun opettajia työmme ohjaamisesta, tukemisesta - ja painostamisesta - pitkin koko prosessia.

Rasmus Pouta
Okko Siljander
Pessi Bask