

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.753>

<https://orcid.org/0000-0003-0976-3680>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Romuald Eimont

Bioimitacinių hidrogelių sintezė ir nanoformavimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Chemija (N 003)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2017–2023 metais studijuojant doktorantūroje Fizinių ir technologijos mokslų centre ir ginama eksternu

Mokslinis konsultantas – dr. Ramūnas Valiokas (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – dr. Vytautas Smirnovas (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Nariai:

dr. Vaidas Klimkevičius (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003),

dr. Edvinas Krugly (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, aplinkos inžinerija – T 004),

prof. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelbergo universitetas, Vokietija, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

dr. Martynas Talaikis (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. gegužės mėn. 16 d. 13:00 val. Fizikos instituto posėdžių salėje (Savanorių pr. 231, Vilnius, Lietuva, tel. +37064515557 ; el. paštas info@ftmc.lt)

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.753>

<https://orcid.org/0000-0003-0976-3680>

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

Romuald Eimont

Synthesis and Nanofabrication of Biomimetic Hydrogels

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Chemistry (N 003)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2017 and 2025 at the Center for Physical Sciences and Technology.

Scientific Advisor – Dr. Ramūnas Valiokas (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

This doctoral dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairperson – Dr. Vytautas Smirnovas (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

Members:

Dr. Vaidas Klimkevičius (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry – N 003);

Dr. Edvinas Krugly (Kaunas Technological University, Technological Sciences, Environmental Engineering – T 004);

Prof. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelberg University, Germany, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr. Martynas Talaikis (Centre for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003).

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 16:00 on 16 May 2025 in the auditorium of the Institute of Physics (Savanorių 231, Vilnius, Lithuania, tel. +37064515557; email info@ftmc.lt)

The text of this dissertation can be accessed at the Library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

TLU – tarpląstelinis užpildas
3D – trimatis (*angl. three-dimensional*)
AR – aminorūgštis
FACIT - su fibrilių formavimu susiję kolagenai su nutraukta triguba spirale (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices, angl.*)
MULTIPLEXIN - daugybiniai trigubos spiralės fragmentai su pertraukimais (*multiple triple-helix domains and interruptions, angl.*)
G, Gly – Glicinas
P, Pro – Prolinas, arba prolino AR liekana
O, Hyp – Hidroksiprolinas, arba hidroksiprolino AR liekana
PEG – Polietileno glikolis
R, Arg – argininas
D, Asp - asparaginas
RGD – argininas-glicinas-asparaginas (RGD)
MPC – 2-metakriloiloksietilfosforilcholinai
Fmoc – 9-fluorenilmetoksikarbonil
Boc – t-butiloksikarbonil
Cys – cisteinas
Tyr – tirozinas
EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidai
NHS – N-hidroksisucimidas
DMTMM – 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino chloridas
PDMS – polidimetilsiloksanai
DMF – dimetilformamidas
DIPEA – N,N-Diisopropiletilamino
HCTU – O-(1H-6-chlorbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio heksafluorofosfatas
DCM – dichlormetanas
TFA – trifluoracto rūgštis
TIS – triizopropil silanas
EDT – etanditolis
DET – dietilo eteris
HPLC – aukšto slėgio skysčio chromatografija
ACN – acetonitrilas
CA – Gyvulinės kilmės I tipo kolagenas

CA-MPC – Gyvulinės kilmės I tipo kolagenas modifikuotas fosforilcholinu
CA-HA – Gyvulinės kilmės I tipo kolagenas modifikuotas hialurono rūgštimi
CLP – kolageną imituojantis peptidas
CLP-PEG – kolageną imituojantis peptidas konjuguotas su PEG-maleimidu
MES – 2-(N-morfolino)etansulfoninės rūgštis
PDMS – polidimetilsiloksanas
AFM – atominių jėgų mikroskopija
DMEM – Dulbeko modifikuota Eagle terpė
PBS – fosfatinio buferio ir druskų tirpalas
CCK8 – ląstelių skaičiavimo rinkinys Nr. 8 (*cell counting kit 8*, angl.)
BSA – jaučio serumo albuminas (*bovine serum albumine*, angl.)
Rc – išlinkimo spindulys (*radius of curvature*, angl.)
PLA – polilaktinės rūgšties polimeras
mMSL – miokardo mezenchiminės stromos ląstelės
HDAC – histonų deacetilazė
SAHA – suberoilanolido hidroksamo rūgštis

TURINYS

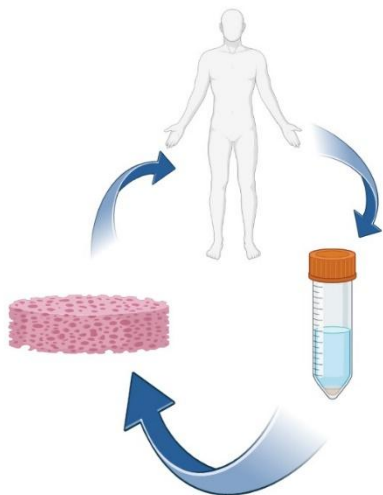
IVADAS.....	10
NAUJUMAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Bioimitacinės medžiagos	13
1.2. Hidrogelinės medžiagos	14
1.3. Hidrogelinių medžiagų klasifikavimas	14
1.4. Hidrogelinių medžiagų parametrai.....	15
1.4.1. Vandens kiekis hidrogeliuose	16
1.4.2. Mechaninės savybės.....	17
1.4.3. Optinės savybės.....	18
1.4.4. Biosuderinamumas.....	19
1.5. Hidrogelių formavimui naudojami polimerai	20
1.5.1. Natūralios kilmės medžiagos: kolagenas	20
1.5.2. Natūralios kilmės medžiagos: hialurono rūgštis	26
1.5.3. Sintetinės kilmės medžiagos: Polietileno glikolis.....	26
1.5.4. Sintetinės kilmės medžiagos: Bioimitaciniai peptidai	27
1.6. Peptidų sintezė ant kietosios fazės	31
1.7. Baltymų ir peptidų cheminis susiuvimas	33
1.8. Hidrogelinių medžiagų mikro- ir nanoformavimas.....	36
1.9. Hidrogelinės medžiagos kaip pralaidumo modelis	37
1.9.1. Akies ragenos pralaidumas	37
1.10. Organotipinės kultūros formavimas.....	39
1.10.1. Kardiomiogeninė diferenciacija.....	39
1.10.2. Nervinių audinių ląstelių kultūros.....	41
2. NAUDOTOS METODIKOS.....	42
2.1. Peptidų sintezė ir gryninimas.....	42
2.2. Susintetintų junginių ir hidrogelių analizė	43
2.3. Šviesos lauko ir fluorescencinė mikroskopija.....	44

2.4. Atominių jėgų mikroskopija	45
2.5. Hidrogelių medžiagų ruošimas	46
2.5.1. CA hidrogelių ruošimas	46
2.5.2. CA hidrogelių modifikuotų fosforilcholinu ruošimas (CA-MPC).....	46
2.5.3. CA hidrogelių modifikuotų hialurono rūgštimi ruošimas (CA-HA)..	47
2.5.6. Mikro- ir nanostruktūruotų hidrogelių substratų gamyba	48
2.5.7. Mikro- ir nanostruktūruotų hidrogelių stabilumo vertinimas.....	49
2.6. Hidrogelio lakštų suklijavimas.....	50
2.7. Ląstelių kultūros eksperimentai	50
2.7.1. Ląstelių proliferacijos vertinimas.....	51
2.7.2. Nanostruktūrų poveikio ląstelių kultūrai vertinimas	51
2.8. Vaistinių medžiagų pralaidumo matavimai	52
2.9. Kardiomiogeninė diferenciacija	52
2.10. Smegenėlių ląstelių kultūros	53
3. REZULTATAI	54
3.1. Kolageno hidrogelių paviršiaus nanoformavimas.....	54
3.2. Kolageno hidrogelių paviršiaus mikroformavimas	60
3.3. Hidrogelių stabilumo ir ląstelių proliferacijos vertinimas.....	62
3.4. Tūrinių struktūrų formavimas kolageno hidrogelyje	65
3.5. Ląstelių įaugimo modelis	66
3.6. Akies ragenos pralaidumo modelis	69
3.7. Kardiomiogeninė diferenciacija ant bioimitacinių hidrogelių.....	73
3.8. Smegenėlių ląstelių kultūra ant sintetinių ir natūralios kilmės bioimitacinių hidrogelių	78
3.9. Naujų bioimitacinių hidrogelių kūrimas	83
DISKUSIJA.....	86
IŠVADOS.....	92
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	95
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	112

SUMMARY	113
AUTORIAUS INDĖLIS	170
KITŲ BENDRAAUTORIŲ INDĖLIS	170
PADĖKA.....	171
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	172

IVADAS

Sužalotų ar pažeistų audinių ir organų įprastinės funkcijos atkūrimas ir palaikymas bioimitacinių medžiagų pagalba yra pagrindinis audinių inžinerijos tikslas (pav. 1). Konstruktai naudojami audinių inžinerijai dažniausiai yra sudaryti iš bioimitacinių karkasų ir įterptų į juos audinio ląstelių, formuojančių organotipinę kultūrą [1].



pav. 1 Principinė audinių inžinerijos schema, kai iš organizmo išskirtos ląstelės yra padauginamos ir apjungiant su bioimitaciniu karkasu formuoja organotipinį konstruktą, kuris gali būti implantuojamas į organizmą.

Tarpląstelinis užpildas (TLU) ir jo mechaninės savybės yra ne tik fizinė aplinka ląstelių augimui, bet ir atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant ląstelių funkcijas audinių regeneracijos, žaizdų gijimo arba ligų progresavimo metu. Vis daugiau mokslinių tyrimų, ypač naujos mechanobiologijos ir užpildo biologijos kryptys, yra skirti išsiaiškinti, kaip TLU mechaninė aplinka, tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, daro įtaką ląstelių elgesiui ir funkcijoms. Sintetinės medžiagos, atkartojančios pagrindines mechanines ir biologines specifinių audinių savybes, yra svarbi priemonė, padedanti suprasti mechanizmus, kuriais ląstelės jaučia ir pertvarko jas supančią aplinką [2], [3].

Šios daktaro disertacijos tikslas buvo ištirti bioimitacinių hidrogelių mikroformavimo, nanoformavimo ir modifikavimo galimybes, išbandyti suformuotus hidrogelius organotipinėse ląstelių kultūrose. Šiam tikslui įgyvendinti buvo suformuoti tokie disertacijos uždaviniai:

- 1) Kolageno bioimitacinius hidrogelius panaudoti mikro ir nanoformavimui ir sukurti platformą pažangioms ląstelių kultūrų technologijoms. Įvertinti šios platformos stabilumą žmogaus ląstelių linijų kultūrose.
- 2) Įvertinti organotipinės ląstelių kultūros parametrus, kai žmogaus odos fibroblastų ląstelės sąveikauja su nanostruktūras turinčiais paviršiais.
- 3) Kolageno hidrogelio pagrindu sukurti mikroprietaisą leidžiantį vertinti žmogaus odos fibroblastų ląstelių įaugimą joms draugiškoje aplinkoje.
- 4) Kolageno hidrogelio pagrindu sukurti akies ragenos modelį tinkamą *in vitro* medžiagų pralaidumo bandymams.
- 5) Modifikuoti kolageno hidrogelį ir patikrinti jo tinkamumą žmogaus sveikų ir patologinių kardiomiocitų diferenciacijai *in vitro*.
- 6) Įvertinti bioimitacinių hidrogelių tinkamumą smegenėlių ląstelių kultūrų kultivavimui.
- 7) Sukurti mikrošulinėlių matricą ant bioimitacinių hidrogelių, tinkamą smegenėlių organoidų formavimui.
- 8) Susintetinti ir išbandyti naujas peptidinio hidrogelio modifikacijas, įterpiant papildomas bioimitacines sekas į kolageną imituojančio peptido seką.

NAUJUMAS

Audinių inžinerija yra vienas iš pagrindinių regeneracinės medicinos įrankių. Ji suteikia galimybę kurti ir išbandyti novatoriškas strategijas, skirtas įveikti audinių praradimo, disfunkcijos, organų nepakankamumo ir kt. iššūkius. Taip pat audinių inžinerija gali būti sėkmingai naudojama kuriant į specifinį audinį panašius organotipinius konstruktus, skirtus geriau suprasti medžiagų pernašą, metabolizmą, signalinius procesus, įvertinti potencialių vaistinių medžiagų poveikius sveikoms ar patologinėms ląstelėms, tirti tam tikras audinių vystymosi stadijas.

Bioimitacinių medžiagų pritaikymas audinių inžinerijoje reikalauja biologijos, chemijos, medžiagų mokslo ir inžinerijos žinių, metodų bei jų apjungimo, be kurio nepavyktų efektyviai imituoti ir atkurti sudėtingos *in vivo* audinių architektūros ir funkcionalumo. Pavyzdžiui, įvairios biomedžiagos, pvz. polimerai, kompozitai, hidrogeliai gali būti kartu panaudojami konstruojant visiškai naujo tipo karkasus, savo savybėmis panašesnius į trimatę aplinką, skatinančius ląstelių adheziją, proliferaciją, diferenciaciją ar kitas funkcijas.

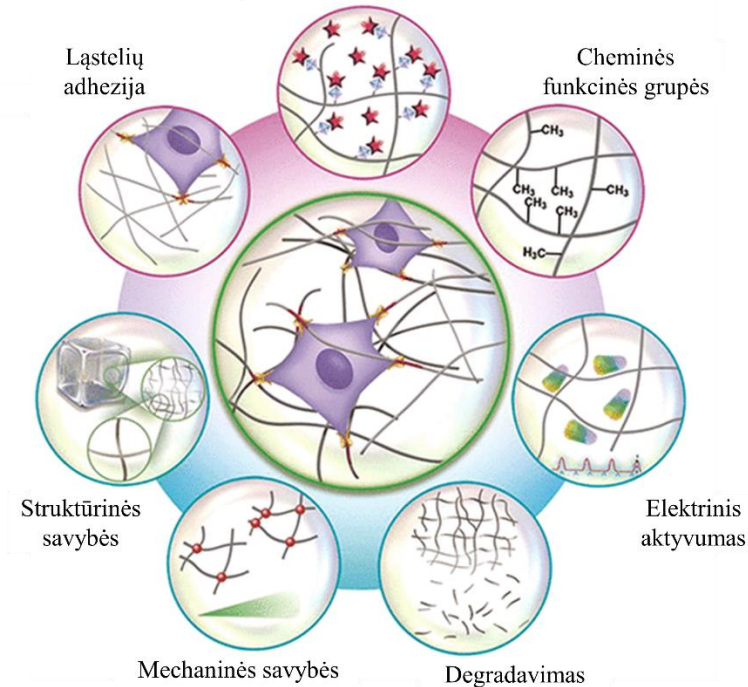
Šio darbo naujumas – tai kolageno ir sintetinių bioimitacinių peptidinių hidrogelių panaudojimas tam tikrų biologinių efektų išgavimui pasitelkiant tiek mikroinžinerijos (mikro- ir nanoformavimo), tiek cheminės sintezės metodus (keičiant peptidų sekas). Naujausioje literatūroje sintetinių bioimitacinių peptidų naudojimas audinių inžinerijoje ir regeneracinėje medicinoje tampa vis populiariesnis dėl jų gebėjimo palaikyti ir reguliuoti natūralius biologinius procesus. Tai aktuali ir perspektyvi sritis, nes tokių peptidų modifikacijos leidžia pasiekti norimus biologinius efektus, tokius kaip ląstelių adhezijos, proliferacijos ir diferenciacijos skatinimas, atveriant platesnes galimybes kurti efektyvesnius terapinius konstruktus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Bioimitacinės medžiagos

Bioimitacinės medžiagos, tai dirbtinės medžiagos kurių tam tikros savybės atkartoja natūralias biologines medžiagas, tačiau pilnai jų nekopijuoja. Dažniausiai toks rezultatas yra pasiekiamas pasitelkiant cheminio arba gamybinio modifikavimo įrankius (pav. 2). Pasirenkant pačią medžiagą svarbu suprasti kokie biologiniai audiniai būtų atkarojami. Yra žinoma, kad didžioji dalis minkštųjų audinių, įskaitant raumenis, yra sudaryti iš 70-80 % vandens [4]. Žinant, kad didžiąją audinio dalį sudaro vanduo, biomimitaciniai hidrogeliai yra labai tinkama karkaso medžiagų klasė. Be to, jie gali būti papildomai modifikuojami (pav. 2) įterpiant augimo faktorius, apdorojant chemiškai, keičiant jų sandarą, mechanines savybes ir kt.

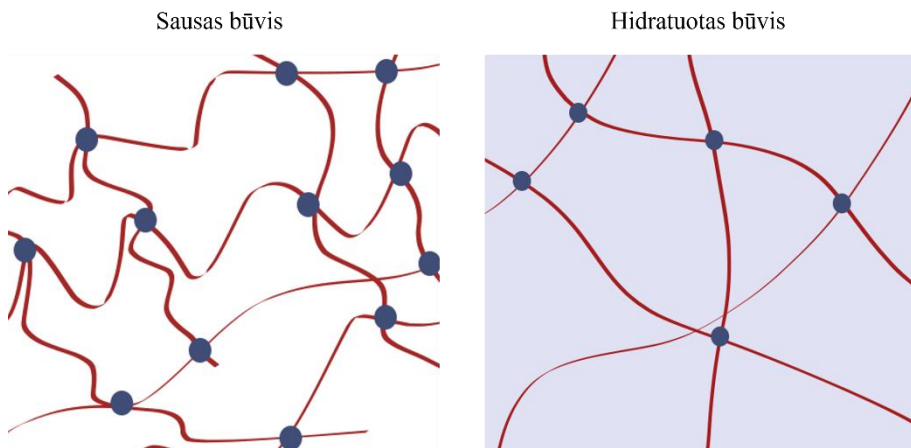
Augimo faktorių imobilizavimas



pav. 2 Bioimitacinių medžiagų modifikavimo galimybės. Adaptuota iš [5].

1.2. Hidrogelinės medžiagos

Diskusijos dėl plastikinių detalių netinkamumo implantavimui, nes jos nėra pralaidžios metabolitams ir savo prigimtimi nėra artimos minkštųjų audinių aplinkai, vyksta nuo maždaug 1960-ųjų metų. Tada pirmą kartą buvo pasiūlyta naudoti hidrogelines medžiagas, kaip tinkamesnes siekiant pagaminti chemiškai susiūtus, metabolitams laidžius implantus [6]. Hidrogelis apibrėžiamas kaip erdvinis (3D) tinklas sudarytas iš polimerų grandinių, kuris gali išbrinkti ir savyje išlaikyti didelę dalį vandens, pats neištirpdamas (pav. 3). Jo hidrofilines savybes daugiausia lemia funkcinės grupės, o sąveika tarp tinklo polimerinių grandinių apsaugo jį nuo ištirpimo vandenyje [2]. Pagal tokio tipo medžiagos nusistovėjusį apibrėžimą, vanduo turi sudaryti ne mažiau 10 % nuo bendros masės (arba tūrio)- tokia medžiaga galėtų būti vadinama hidrogeliu. Būtent dėl didelio vandens kiekio hidrogeliai dažniausiai pasižymi mechaninėmis savybėmis, kurios artimos audiniams [7].



pav. 3 Scheminis sauso ir hidratuoto hidrogelio atvaizdavimas

Chemijos požiūriu, medžiagos hidrofilumą lemia joje esančios hidrofilinės cheminės grupės, pavyzdžiui $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH-$, SO_3H [7].

1.3. Hidrogelinių medžiagų klasifikavimas

Literatūroje pateikiama nemažai hidrogelių klasifikacijos būdų ir randama bent keletas nuomonių. Kalbant apie hidrogelių tipų apibrėžimus, remiantis šaltiniais, hidrogelius galima skirstyti į suformuotus iš natūralių polimerų ir suformuotus iš sintetinių polimerų [8]. Priklausomai nuo surištų grupių

joninių krūvių, hidrogeliai gali būti katijoniniai, anijoniniai arba neutralūs. Klasifikavimo kriterijumi taip pat gali būti skersinio ryšio agentų rūšys.

Hidrogeliai taip pat gali būti fizikiniai, cheminiai arba biocheminiai. Fizikiniai hidrogeliai gali pereiti iš skysčio į gelinę būseną pasikeitus aplinkos sąlygoms, pavyzdžiui, temperatūrai, jonų koncentracijai, pH arba kitoms sąlygoms. Cheminiais hidrogeliais laikomi tie, kuriuose susidaro kovalentinės jungtys bei užtikrina mechaninį vientisumą ir atsparumą irimui, lyginant su kitomis silpnesnėmis medžiagomis. Biocheminiuose hidrogeliuose stingimo procese dalyvauja biologinės medžiagos, pavyzdžiui, fermentai ar aminorūgštys [7].

Hidrogelius dar galima skirstyti pagal:

1. monomerų kilmę
 - a. natūralūs (kolagenas, želatina, krakmolos, agarozė, alginatas)
 - b. sintetiniai
2. polimerinę kompoziciją
 - a. homopolimerai (hidrogelis iš vieno tipo monomero)
 - b. kopolimerai (hidrogelis iš dviejų ar daugiau monomerų tipų)
 - c. multipolimeriniai (hidrogelis iš dviejų nepriklausomų persipynusių polimerinių tinklų)
3. fizikinę – cheminę struktūrą
 - a. amorfiniai
 - b. dalinai kristaliniai
 - c. kristaliniai
4. polimerizavimo tipą (angl. cross – linking type)
 - a. cheminis (negrįžtama reakcija)
 - b. fizikinis (laikinos jungtys: fizinis persipynimas, joniniai ryšiai, vandeniliniai ryšiai ar hidrofobinė sąveika)
5. Pagal tinklo elektrinius krūvius
 - a. nejoniniai
 - b. joniniai
 - c. amfoteriniai elektrolitai
 - d. zwitterijoniniai (angl. zwitterionic, kiekviename pasikartojančiame struktūriniame viename yra ir anijoninių, ir katijoninių struktūrų)

1.4. Hidrogelių medžiagų parametrai

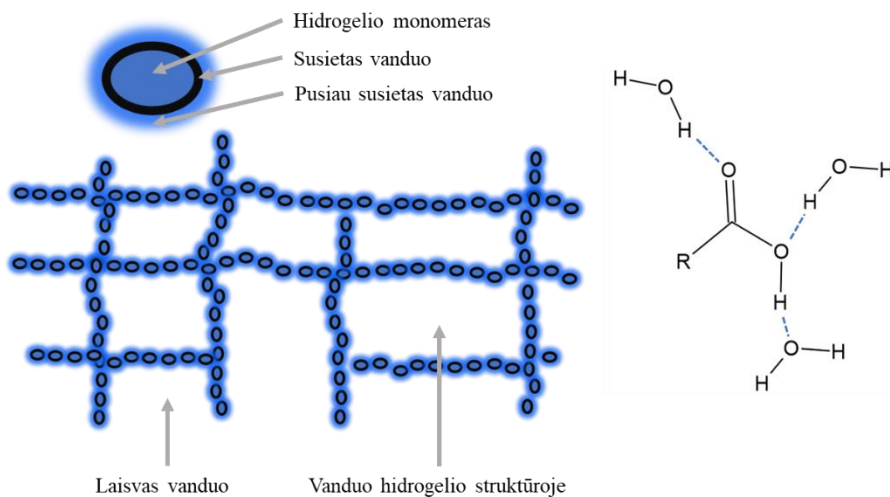
Pagrindiniai bioimitacinių hidrogelių parametrai, į kuriuos reikia atkreipti dėmesį kuriant produktus ir terapijas medicininiams poreikiams, yra šie: brinkimas, mechaninės savybės, porėtumas ir pralaidumas, jautrumas išoriniams veiksniams [9]. Chemiškai susiūti hidrogeliai dažnai pasižymi

geresnėmis mechaninėmis savybėmis, lyginant su savaimė susiformuojančiomis (fiziškai susijungiančiomis) sistemomis, kurioms labiau daro įtaką išoriniai veiksniai (pH, temperatūra, joninės jėgos, etc.) [10].

1.4.1. Vandens kiekis hidrogeliuose

Kaip minėta, hidrogeliai - tai hidrofilinės polimerinės medžiagos, kurios gali sugerti nuo 10-20 % (apatinė riba yra sutartinė ir gali varijuoti priklausomai nuo šaltinio) iki tūkstančių savo svorio ekvivalentų vandens. Vandens kiekis ir pobūdis hidrogelinėje medžiagoje gali turėti įtakos medžiagų skverbimuisi į gelį ir ląstelių produktų pašalinimui iš jo [11].

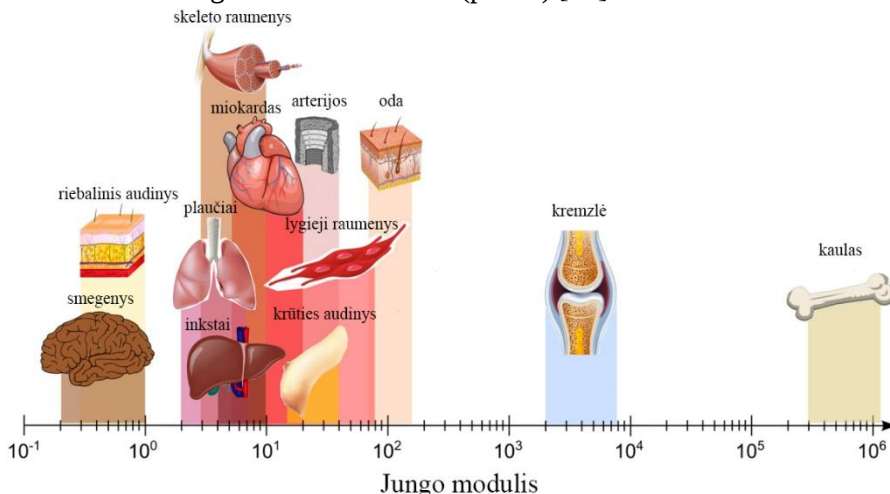
Kai išdžiovintas hidrogelis sugeria vandenį, pirmosios vandens molekulės patenkančios į matricą hidratuos labiausiai polines, hidrofilines grupes. Tai vadinama pirminiu surištu vandeniu. Kai polinės grupės yra hidratuotos, tinklas išsipučia ir atskleidžia hidrofobines grupes, kurios taip pat sąveikauja su vandens molekulėmis – tai hidrofobiškai surištas vanduo, arba „antrinis susietas vanduo“. Pirminis ir antrinis susietas vanduo dažnai būna apjungiami ir tiesiog vadinami „visu susietu vandeniu“. Tarp surišto vandens, esančio polimerinio monomero paviršiuje, ir laisvo vandens yra vandens sluoksnis, vadinamas pusiau surištu vandeniu (pav. 4). Po polinių ir hidrofobinių grupių sąveikos su vandens molekulėmis dėl osmosinio vandens judėjimo, tinklas įsiurbis papildomą vandenį. Tai galėtų vesti link begalinio praskiedimo, tačiau priešinasi kovalentiniai arba fizikiniai hidrogelį laikantys ryšiai. Tad kažkuriuo metu hidrogelis pasieks brinkimo pusiausvyrą, ir vandens kiekis nustos didėti. Toks vanduo, užpildantis tūrį po to kai hidrofilinės ir hidrofobinės grupės yra hidratuotos, yra vadinamas vandeniu hidrogelio struktūroje [12], [13].



pav. 4 Scheminis vandens hidrogelyje ir karboksilo grupės formuojamų vandenilinių ryšių atvaizdavimas [11].

1.4.2. Mechaninės savybės

Audinių standumas (Jungo modulis), kuris matuojamas paskaliais (Pa), labai skiriasi įvairiuose organuose ir audiniuose. Jis yra neatsiejamai susijęs su audinio funkcija. Mechanškai statiški audiniai, pavyzdžiui, smegenys, arba paslankūs audiniai, pavyzdžiui, plaučiai, pasižymi mažu standumu, o didelės mechaninės apkrovos veikiami audiniai, pavyzdžiui, kaulai ar oda, pasižymi aukštesnėmis Jungo modulio vertėmis (pav. 5) [14].



pav. 5 Skirtingų audinių standumo pasiskirstymas, adaptuota iš [15].

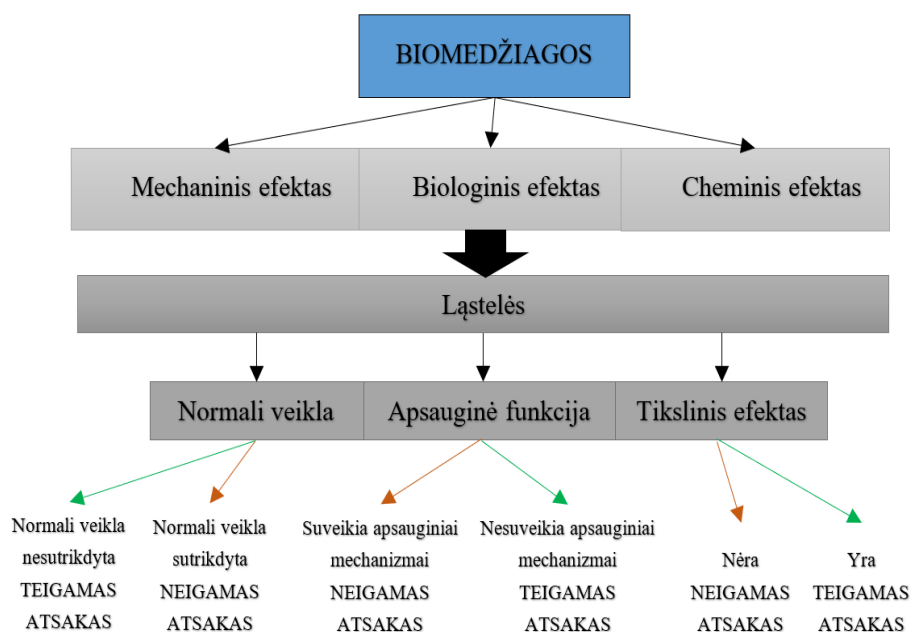
1.4.3. Optinės savybės

Medžiagos lūžio rodiklis lemia greitį, kuriuo šviesa sklinda medžiaga, ir atitinkamai lemia optines medžiagos savybes. Hidrogelių lūžio rodiklis dažnai yra artimas vandens lūžio rodikliui, todėl jie tinka biologiniams ir medicininiams tikslams, ypač ten kur yra reikalingas skaidrumas. Ši savybė sumažina optinius iškraipymus, kai hidrogeliai liečiasi su biologiniais audiniais ar skysčiais, o tai padidina jų suderinamumą optinėse sistemose. Taip pat optiškai skaidrios medžiagos labiau tinka darbui su ląstelių kultūromis *in vitro* ir *in vivo* biologiniuose tyrimuose, supaprastina mikroskopavimą, histologinius ir imunohistocheminius tyrimus [16].

1.4.4. Biosuderinamumas

Biosuderinamumas apibrėžiamas kaip medžiagos gebėjimas išlikti šeiminingo organizme, atlikti numatytą funkciją ir nesukelti imuninės sistemos atsako (pav. 6). Svarbu, kad tokios medžiagos nesukeltų pažeidimų, nebūtų toksiškos ir neturėtų atmetimo rizikos bei jokio nepageidaujamo vietinio ar sisteminio poveikio [17]–[19]. Terminų sutarimo konferencijoje Čengdu buvo galutinai patvirtintas biosuderinamumo apibrėžimas, grindžiamas panašiu dar 1985 metais sukurtu apibrėžimu [17]. Biosuderinamos medžiagos buvo apibrėžtos kaip gebančios sąveikauti su šeiminingo organizmu taip, kad būtų gaunamas reikiamas atsakas konkrečiais pritaikymo atvejais.

Terminas biomedžiaga buvo apibrėžtas 1985 m., kaip „medžiaga, kuri nėra gyvas audinys ir naudojama medicinos prietaise, skirta sąveikauti su biologinėmis sistemomis“. Biomedžiagos naudojamos vis įvairesnėms ir sudėtingesniems pritaikymams, tokiems kaip audinių inžinerija, invaziniai jutikliai, vaistų tiekimas ir genų transfekcijos sistemos, į mediciną orientuotose nanotechnologijose ir biotechnologijose, taip pat ir nuo seniau žinomuose implantuojamuose medicinos prietaisuose.



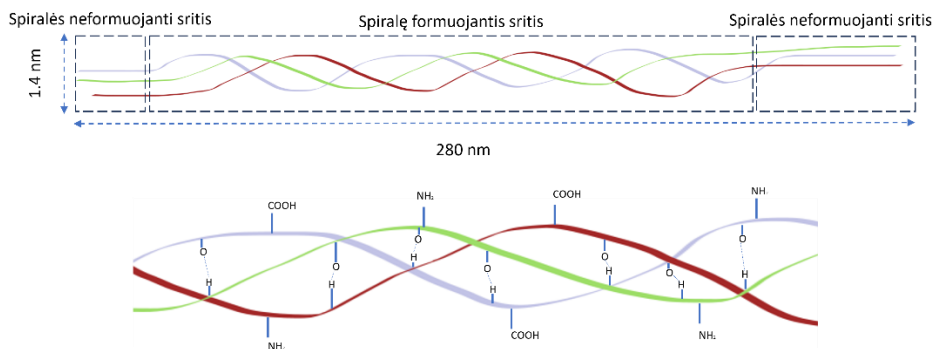
pav. 6 Principinė biosuderinamų medžiagų biologinėje sistemoje veikimo analizės schema, adaptuota iš [19].

1.5. Hidrogelių formavimui naudojami polimerai

Paprasčiausias būdas suskirstyti hidrogelinių medžiagų formavimui naudojamus polimerus būtų skirstymas į natūralios ir sintetinės kilmės medžiagas. Prie populiariausių natūralių medžiagų gali būti priskiriami: kolagenas, hialurono rūgštis, fibrinas, agarozė, chitozanas, želatina, celiuliozė. Prie populiariausių sintetinių medžiagų gali būti priskiriami poliakrilinė rūgštis, polihidroksi metakrilatas, polivinil alkoholis, polietilenglikolis, silikonas [20].

1.5.1. Natūralios kilmės medžiagos: kolagenas

Kolagenas tai dažniausiai žinduoliuose sutinkamas baltymas, jis sudaro apie 30 % visos baltymų masės. [21]. Žodis kolagenas yra kilęs iš graikų kalbos, reiškiantis „klijus“ ir „gaminti“, nes buvo žinoma, kad verdant audinius gali būti gaminami klijai. Pats žodis pirmą kartą buvo panaudotas XIX amžiuje, kaip pavadinimas jungiamųjų audinių, verdant kuriuos gali būti išgaunama želatina [22].



pav. 7 Scheminis kolageno sandaros pavaizdavimas, adaptuota iš [22]

Kolageno makromolekulė turi būdingą trigubos spiralės struktūrą ir dvi spirales neformuojančias sritis abiejuose savo galuose (pav. 7). Trigubos spiralės formavimas – visus kolagenus apibūdinantis parametras. Kolageno triguba spiralė susideda iš trijų lygiagrečių α polipeptidinių grandinių, kurios vyniojasi viena aplink kitą formuodamos taisyklingą spiralę, t.y. į virvę panašią struktūrą, kurios apytikrė molinė masė yra 300 kDa, gijos ilgis- 280 nm, skersmuo- 1,4 nm [22]. Trigubą spiralę stabilizuoja tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp glicinų gretimose polipeptidinėse grandinėse. Vandenilinius ryšius taip pat formuoja hidroksiprolino hidroksilo grupė. Per aminorūgščių (AR) tripletą yra formuojamos dvi vandenilinės jungtys: viena

tarp glicino AR liekanų amino grupės ir karboksi grupės AR liekanų esančių antroje tripleto pozicijoje šalia esančios spiralės grandinės. Gly–Pro–Hyp seka kolagene sudaro 12 % molekulės, Gly–Pro–Y ir Gly–X–Hyp sekos sudaro apie 44 % ir Gly–X–Y sudaro likusius 44 %.

lentelė 1 Skirtingų kolageno tipų specifikacijos ir pasiskirstymas audiniuose, adaptuota iš [22]

Kolageno tipas	Grandinės	Supramolekulinė struktūra	α spiralės molekulinis svoris	Pasiskirstymas audiniuose
I (Hetero trimeras)	$[\alpha 1(I)]2\alpha 2(I)]$	Didesnio skersmens gijos, monomerų periodas 67 nm	95	Oda, sausgyslės, raiščiai, akies ragena, organų kapsulės, smegenų ir nugaros smegenų kieta medžiaga, pagrindinis organinis kaulo komponentas
I (Homo trimeras)	$[\alpha 1(I)]_3$	Monomerų periodas 67 nm		Navikai, derma, kaulai
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Monomerų periodas 67 nm	95	Kremzlė, stiklakūnis, sausgyslių kremzlinės zonos, tarpslanksteliniai diskai.
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Mažesnio skersmens, monomerų periodas 67 nm	95	Derma, aorta, gimda, sausgyslės, žarnynas, kraujagyslės, kepenys, blužnies ir aplinkinių vidaus organų jungiamasis audinys
IV	$[\alpha 1(IV)2\alpha 2(IV)]; \alpha 3(IV),$	Nanofibrilės formuoja pintą tinklą	170-180	Pamatinė membrana

$\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$				
V	$[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$ $[\alpha 1(\text{V}) \alpha 2(\text{V}) \alpha 3(\text{V})] [\alpha 1(\text{V})]_3$	9 nm skersmens išsiskuotniauvisios fibrilės	120-145	Placentos/embriono audinys, derma, kaulai, akies ragena
VI	$[\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha \alpha 3(\text{VI})]$	5 – 10 nm skersmens mikrofibrilės su tarpais, 100 nm periodiškumas, formuoja pintą tinklą	$\alpha 1(\text{VI})$ 140 $\alpha 2(\text{VI})$ 140 $\alpha (\text{VI})$ 340	Gimda, derma, kremzlė
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Inkarinės fibrilės	170	Oda, amniotinė membrana, ragena, gleivinės epitelis
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2 \alpha 2(\text{VIII})$	Nefibrinė struktūra, formuoja šešiakampį tinklą	61	Decemento membrana, endotelio ląstelės
IX	$[\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha \alpha 3(\text{IX})]$	FACIT (su fibrilių formavimu susiję kolagenai su nutraukta triguba spirale)	68-115	Pasiskirstęs kartu su II tipo kolagenu
X	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	Nefibrinė struktūra, formuoja šešiakampį tinklą	59	Kalcifikuota kremzlė (įskaitant saugyslių dalis)
XI	$[\alpha 1(\text{XI}) \alpha 2(\text{XI}) \alpha \alpha 3(\text{XI})]$	Plonos fibrilės, artimos V tipo kolagenui	110-145	Kremzlė, tarpląsteliniai diskai
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	FACIT, neformuoja fibrilių	220, 340	Derma, raiščiai, kremzlė
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	Transmembraninis	62-67	Endotelio ląstelės, epidermis
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	FACIT, neformuoja fibrilių	220	Derma, raiščiai, kremzlė
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	MULTIPLEXIN (daugybiniai trigubos spiralės fragmentai su pertraukimais), neformuoja fibrilių	125	Placenta, inkstai, širdis, kiaušidės, sėklidės

XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	FACIT, neformuoja fibrilių	150-160	Širdis, inkstai, raumenys
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	Įpintas į ląstelės membraną	180	Specializuotas epitelis, hemidezmosomos (oda)
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	MULTIPLEXIN, neformuoja fibrilių	200	Inkstai, kepenys
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	FACIT, neformuoja fibrilių	165	Interneuronai, hipokampo sinapsių formavimas, pamatinės membranos, raumenų ląstelės
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	FACIT	185, 170, 135	Ragenų epitelis, embriono oda, raiščiai, krūtinkaulio kremzlė
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	FACIT		Kraujagyslių sienelės, išskiriamas lygiųjų raumenų ląstelių
XXII	$[\alpha 1(\text{XXII})]_3$	FACIT	200	Audinių jungtys
XXIII	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$	Transmembraninis		Augliai (prostata)
XXIV	$[\alpha 1(\text{XXIV})]_3$	Fibrilinis, susijęs su fibrilių formavimu		I tipo kolageno fibrilogenozės reguliacija, osteoblastų diferenciacijos markeris
XXV	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$	Transmembraninis	50/100	Sąveika su β Amiloido plokštelėmis, esant Alzheimerio ligai
XXVI	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$	FACIT	~80	Kiaušidės ir sėklidės

XXVII	$[\alpha 1(\text{XXVII})]_3$	Fibrilės, susirenkančios į tankų tinklą		Hipertrofinė kremzlė
XXVIII	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	Granuliuoto užpildo formavimas	~50	Periferinė nervų sistema, Schwann'o ląstelių pamatinė membrana
XXIX	$[\alpha 1(\text{XXIX})]_3$	Neformuoja fibrilių		Suprabazinės ląstelės epidermyje, plaučiuose, mažajame žarnyne, gaubtinėje žarnoje ir sėklidėse

Šiuo metu yra identifikuotos 29 kolageno rūšys (lentelė 1), dalis jų pasižymi unikaliomis savybėmis. Dauguma kolagenų rūšių atrodo giminingos, tačiau jas skiria griežtas pasiskirstymas audiniuose, kur juos galima aptikti. Toks kolageno rūšių kiekis nurodo, kad yra didelė biologinių funkcijų įvairovė, kurią lemia didelis kiekis skirtingų struktūrų į kurias susirenka kolageno molekulės. Priklausomai nuo pirminės struktūros, trigubos spiralės domeno ilgio, molekulinio svorio, krūvio pasiskirstymo, tarpų triguboje spiralėje, kraštinių segmentų dydžių, formos ir po-transliacinių modifikacijų, kolagenus galima suskirstyti į keturias stambias grupes [23].

Pirmai grupei priklauso fibriles formuojantys kolagenai (I, II, III, V, IX, XXIV ir XXVII). Šios grupės kolagenai formuoja trigubą spiralę, su nepertraukiamais Gly–X–Y AR (aminorūgščių) domenais, kurie yra ~300 nm ilgio. Yra žinoma, kad XXI ir XXVII kolagenai turi intarpų Gly–X–Y sekoje, tai reikštų trigubos spiralės gijos trumpus nutrūkimus. Dermos, raiščių ir kitų audinių fibrilės dažniausiai yra formuojamos kelių skirtingų kolagenų (I, III, V). Tokių audinių fibrilės yra vadinamos heterotipinėmis. Jeigu fibrilės yra formuojamos vieno tipo kolageno, kaip pavyzdžiui VII kolageno formuojamos dermos–epidermio jungtys, jos vadinamos homotipinėmis [22].

Antrai grupei priklauso pamatinės membranos formuojantys kolagenai (IV, VII, XXVIII). Tai gali būti smulkus IV kolageno fibrilių tinklas, bei išsišakojusios VII kolageno inkarinės fibrilės [22].

Trečiai grupei priklauso trumpos grandinės kolagenai (VI, VIII ir X), visi jie formuoja pintą tinklą su skirtingais tarpais. VI tipo kolagenas formuoja

granuliuotą tinklą, o VIII ir X kolagenai formuoja taisysklingą šešiakampę tinklinę struktūrą [22].

Ketvirtai grupei priklauso kolagenai su daugybiniais tarpais Gly–X–Y trigubos spiralės fragmentuose (XII, XIV, XVI, XIX, XXII). Tokie kolagenai priskiriami FACIT kolagenams, ir yra susiję su fibrilių formavimu. Prisijungę prie kolageno fibrilių FACIT kolagenai gali keisti fibrilės plotį.

Terminas MULTIPLEXIN buvo sukurtas XV ir XVIII kolagenams, nes jų tretinėje struktūroje yra daugiausiai pertraukimų triguboje spiralėje.

Dar viena svarbi kolagenų subgrupė yra transmembraninės kolageno molekulės (XIII, XVII, XXIII, XXV), kurios turi domenų tiek leidžiančius įsiterpimą į ląstelės membraną, tiek ir trigubą spiralę formuojančius tarpląsteliniame užpilde [22].

lentelė 2 Skirtingų kolageno išgavimo būdų privalumai ir trūkumai [24]

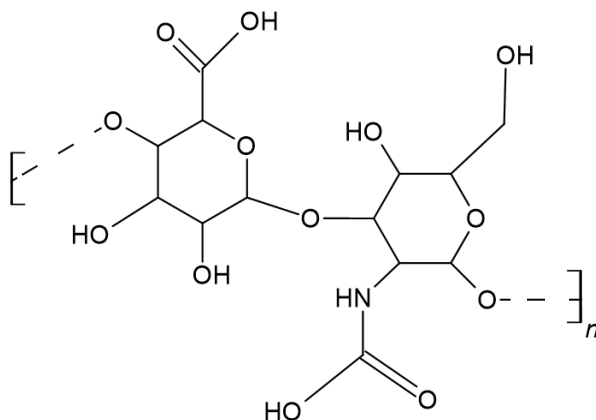
Šaltinis	Privalumai	Trūkumai
Kolagenas išskirtas iš audinio	Didelės išeigos naudojant rūgštinę arba pepsino ekstrakciją	Galimas tarprūšinio užkrato pernešimas
Ląstelėse susintetintas kolagenas	Gali būti autogeninis	Mažos išeigos
Rekombinantinis kolagenas	Silpnas imuninis atsakas	Mažos išeigos, stabilumo problemos
Peptidų sintezės būdu pagamintas kolagenas	Pilnai sintetinis	Mažos išeigos, tretinės struktūros formavimo problemos

Kolagenas dažnai naudojamas hidrogelių gamybai dėl jo biologinio suderinamumo ir gebėjimo imituoti natūralų TLU, todėl jis puikiai tinka audinių inžinerijos ir biomedicinos reikmėms. Kolagenas turi AR sekų skatinančių ląstelių adheziją [25]–[27]. Kolageno hidrogeliai gali būti naudojami kaip vaistinių medžiagų ir baltymų nešikliai [28], [29], taip pat audinių rekonstrukcijai (kepenų [30], odos [31], kraujagyslių [32], plonosios žarnos [33], kremzlės [34], balso stygų [35] ir stuburo [36] pažeidimų atvejais). Kolageno hidrogeliai taip pat gali būti skirstomi pagal kolageno medžiagos išgavimo būdą. Skirtingi išgavimo būdai turi savo trūkumus ir privalumus (lentelė 2).

1.5.2. Natūralios kilmės medžiagos: hialurono rūgštis

Hialurono rūgštis (hialuronatas) - tai linijinis polimeras iš disacharidų, kurių monomerą sudaro D-gliukuroninė rūgštis ir N-acetil-D-gliukozaminas (pav. 8). Hialurono rūgštis yra aptinkama visuose žinduoliuose, dažniausiai jungiamuose audiniuose, kaip užpildas, lubrikantas ir/arba osminis buferis. Tai didelės molekulinės masės polisacharidas, formuojantis pintus tinklus net ir nedidelėse koncentracijose ($< 1 \text{ mg/mL}$). Žmogaus organizme hialurono rūgštis formuoja 3-7 MDa molekulinės masės polimerus [37].

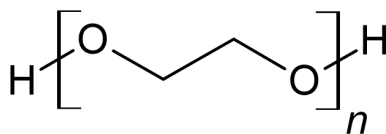
Hialurono rūgšties hidrogeliai yra natūralios kilmės, nesukelia imuninio atsako, biodegraduojantys. Dėl šių priežasčių tokie hidrogeliai naudojami kaip ląstelių [38] arba vaistinių medžiagų [39], [40] nešikliai, kamieninių ląstelių terapijoje [41], [42], kremzlės audinių inžinerijoje [39], [43], širdies raumenų atstatyme [44].



pav. 8 Hialurono rūgšties polimeras

1.5.3. Sintetinės kilmės medžiagos: Polietileno glikolis

Polietileno glikolis (PEG) - tai polimeras, kuris dažniausiai yra gaunamas anijoninės arba katijoninės etileno oksido polimerizacijos būdu (pav. 9). Yra eilė būdų kaip gali būti formuojami PEG hidrogeliai. PEG grandinės galai gali būti modifikuojami reikiamomis cheminėmis grupėmis ir visa PEG grandinė gali atlikti susiuvimo agento funkciją, reaguojant su kitais monomerais [45]. Taip pat PEG hidrogeliai gali susidaryti ir dėl fizikinės sąveikos. Tokių hidrogelių fizikocheminės savybės, tokios kaip laidumas cheminėms medžiagoms, vandens kiekis, elastingumas, Jungo modulis, degradavimo greitis ir kitos gali būti labai įvairios [46], [47].



pav. 9 PEG polimeras

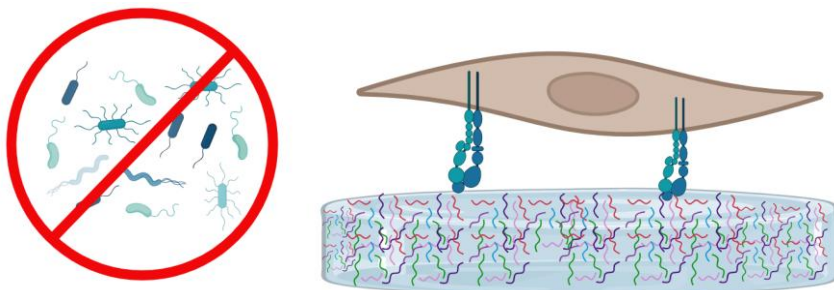
Svarbiausias parametras, dėl kurio PEG hidrogeliai yra tinkami naudojimui regeneracinėje medicinoje – PEG polimerų hidrofilinės savybės [47]. Žemo susiuvimo laipsnio PEG hidrogelis gal sulaikyti 95 % vandens nuo savo bendros masės. Tokio aukšto vandens kiekio medžiagos yra artimos audiniams, ir tuo pačiu yra tinkama aplinka ląstelių ar aktyviųjų medžiagų inkapsuliacijai. Naudojant tokį hidrogelį audinių regeneracijai jis užtikrina ląstelių metabolitų mainus, nes veikia kaip pusiau laidė membrana [48].

Dar viena svarbi PEG hidrogelių savybė – jie „nematomi“ ląstelėms, nes nesukelia baltymų nespecifinės adhezijos [49], [50]. Ši savybė leidžia dekoruoti PEG polimero suformuotą paviršių biologinėmis molekulėmis, taip bandant gauti tinkamą (specifinį) ląstelių atsaką. Taip pat reikia pripažinti, kad šios savybės gali turėti ir neigiamo poveikio, nes prie PEG medžiagos (pvz. dangos) nesijungia ir ląstelių gaminami TLU baltymai. Tai sumažina ląstelių, augančių PEG hidrogelyje, gyvybingumą, tuo atveju, kai joms reikalingas kontaktas su TLU baltymais. Tačiau biologiškai aktyvūs fragmentai gali būti įterpiami į PEG hidrogelį, užtikrinant ląstelių gyvybingumą [48].

Rinkoje parduodama labai daug ir įvairių PEG polimerų, įskaitant skirtingų molekulinį masių, šakotumo ir funkcionalumo. Funkcinės grupės gali būti šios: amino-, karboksi-, tiolio, sucimido, maleimido, nitrofenil karbonato, metakrilato, izocianato ir kitos. Toks funkcinų grupių spektras leidžia pritaikyti PEG polimerus labai įvairiems poreikiams, naudojant įvairius cheminius įrankius, bei regeneracinei medicinai tinkamas bioaktyvias medžiagas.

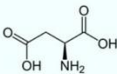
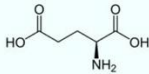
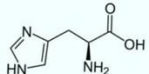
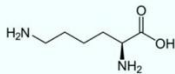
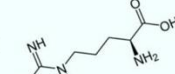
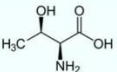
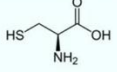
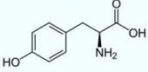
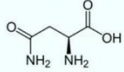
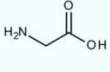
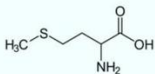
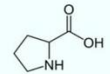
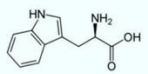
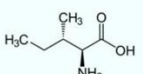
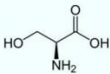
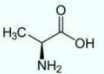
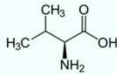
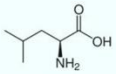
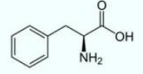
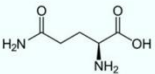
1.5.4. Sintetinės kilmės medžiagos: Bioimitaciniai peptidai

Ląstelių atsakas į aplinką ir jas supantį paviršių dažniausiai yra užkoduotas struktūrinių ir signalinių baltymų, esančių ląsteles supančiame TLU (pav. 10). Tokie baltymų segmentai gali būti panaudojami kaip struktūrinis ir tuo pačiu kaip funkcinis elementas, konstruojant bioimitacinę medžiagą [51]. Baltymus sudaro šimtai, arba tūkstančiai AR, o nuo dviejų iki keliasdešimt AR turintys junginiai vadinami peptidais [52]. Kaip baltymai, taip ir peptidai yra sudaryti iš dvidešimties proteinogeninių AR (pav. 11)



pav. 10 Ląstelės sąveikų su TLU imituojančiu hidrogeliu, kurio sudėtyje yra bioimitacinės peptidinės sekos, scheminis paaiškinimas. Idealiu atveju, tokios sekos ne tik užtikrina reikiamą ląstelių adheziją, bet ir neleidžia formuotis bakterinėms plėvelėms.

Peptidai yra patraukli medžiaga hidrogeliams gaminti dėl reguliuojamo savaiminio surinkimo galimybės, biologinio suderinamumo ir gebėjimo formuoti natūralius audinius imituojančias struktūras. Peptidiniai hidrogeliai gali imituoti ne tik mechanines, bet ir biochemines TLU funkcijas, kas reikštų didesnę poveikį ląstelių kultūrai. Papildomai hidrogelyje gali būti įterpiami antimikrobiniai peptidai, kurie stabdytų bakterijų dauginimąsi ir plėvelės susidarymą hidrogelio paviršiuje (pav. 10). Yra žinoma, kad iš TLU išskirti peptidai pagerina ląstelių adheziją prie paviršiaus ir jų augimą. Tokios sekos gali būti įterptos į hidrogelio struktūrą, programuojant reikiamas tarpląstelines sąveikas, arba sąveiką su kitais peptidiniais hidrogelio fragmentais [53]. Tokie TLU peptidais praturtinti hidrogeliai tinka tiek *in vitro*, tiek *in vivo* audinių inžinerijos pritaikymams ir skatina audinių regeneraciją [54].

RŪGŠTINĖS	 Asparto rūgštis (Asp, D) MM: 115,03 g/mol	 Glutamo rūgštis (Glu, E) MM: 129,04 g/mol	BAZINĖS	 Histidinas (His, H) MM: 137,06 g/mol	 Lizinas (Lys, K) MM: 128,10 g/mol	 Argininas (Arg, R) MM: 156,10 g/mol
	 Treoninas (Thr, T) MM: 101,05 g/mol	 Cisteinas (Cys, C) MM: 103,01 g/mol		 Tirozinas (Tyr, Y) MM: 163,06 g/mol	 Asparaginas (Asn, N) MM: 114,04 g/mol	 Glicinas (Gly, G) MM: 57,02 g/mol
POLINĖS, NEUTRALIOS	 Metioninas (Met, M) MM: 131,04 g/mol	 Prolinas (Pro, P) MM: 97,05 g/mol	NEPOLINĖS, HIDROFOBINĖS	 Triptofanas (Trp, W) MM: 186,08 g/mol	 Izoleucinas (Ile, I) MM: 113,08 g/mol	 Serinas (Ser, S) MM: 87,03 g/mol
	 Alaninas (Ala, A) MM: 71,04 g/mol	 Valinas (Val, V) MM: 99,07 g/mol		 Leucinas (Leu, L) MM: 113,08 g/mol	 Fenilalaninas (Phe, F) MM: 147,07 g/mol	 Glutaminas (Gln, Q) MM: 128,06 g/mol

pav. 11 Dvidešimt proteinogeninių aminorūgščių. Paveiksle jos pateiktos su vienos ir trijų raidžių kodavimu, bei monoizotopine molekuline mase.

Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad peptidai yra stabilesni nei pilno ilgio baltymai ir gali veikti labai efektyviai [55]. Pavyzdžiui, tarpląstelinio užpildo baltymo fibronektino peptidas, kurį sudaro argininas-glicinas-aspartato rūgštis (RGD), *in vitro* bei *in vivo* sąlygomis, pagerina ląstelių adheziją prie paviršiaus bei proliferaciją [56], [57]. Kito svarbaus tarpląstelinio užpildo baltymo- laminino- peptidas, kurį sudaro izoleucinas-lizinas-valinas-argininas-valinas (IKVAV), yra žinomas dėl savo biologinio aktyvumo, skatina ląstelių adheziją ir migraciją [58]. IKVAV seka yra dalis didesnio laminino domeno, vadinamo "trumpąja ranka", kuri sąveikauja su ląstelės paviršiaus integrinais. IKVAV seka turi specifinį giminingumą tam tikriems integrino receptoriams, ypač integrinui $\alpha\beta3$, kurie randami įvairių ląstelių tipų, įskaitant neuronus, endotelio ląsteles ir vėžio ląsteles, paviršiuje.

lentelė 3 Ląstelių adhezijos tarpląstelinio užpildo baltymai ir jų peptidiniai epitopai.

Šaltinis	Epitopas
Fibronektinas	RGDS [59]–[62]
	KQAGDV [63]

	PRARI [63]
Lamininas	IKVAV [64]–[67]
	YIGSR [68]–[70]
	PDSGR [70]
	RKRLQVQLSIRT [71]
	CGGRKRLQVQLSIRT [66]
	RYVVLPR [72]
	RNIAEIIKDI [73]
	AGQWHRVSVRWG [74]
	IKLLI [63]
	SINNNR [63]
	LRGDN [63]
Kolagenas	POG [75], [76]
	DGEA [77], [78]
	GFOGER [79]
	FPGERGVEGPGP [80]
	GFPGER [81], [82]
	NYYSNS [63]
Nidogenas	FRGDGQ [83]
Calmodulinas	QIDS [84]
	LDT [84]
Netrinas	QWRDTWARRLRKFQREKKGKCRKA [85]
Trombospondinas	CSVTCG [86], [87]
Kadherinas	HAVDI [88]–[90]
De novo	RRETAWA [91]

Labai svarbu, kad TLU sudaro daug skirtingų biologinių molekulių, kurios lemia ląstelių biologinį atsaką. Bioinžinerinės platformos, kurių tikslas atkartoti arba imituoti sudėtingus biologinius scenarijus turi „komunikuoti“ su ląstelėmis panašiu būdu. Peptidiniai epitopai (lentelė 3) gali būti naudojami kaip statybiniai blokai konstruojant ląstelių karkasus *in vivo* ir *in vitro*. Peptidiniai epitopai gali būti sukurti taip, kad pagerintų ląstelių adheziją arba migraciją, paskatintų ląstelių diferenciaciją, sukeltų imuninį atsaką [58]. Taip pat yra svarbu, kad keli skirtingi epitopai gali būti ant vieno karkaso, taip skatindami funkcinių efektų sinergiją, artimą gyvos sistemos funkcionalumui [39].

1.6. Peptidų sintezė ant kietosios fazės

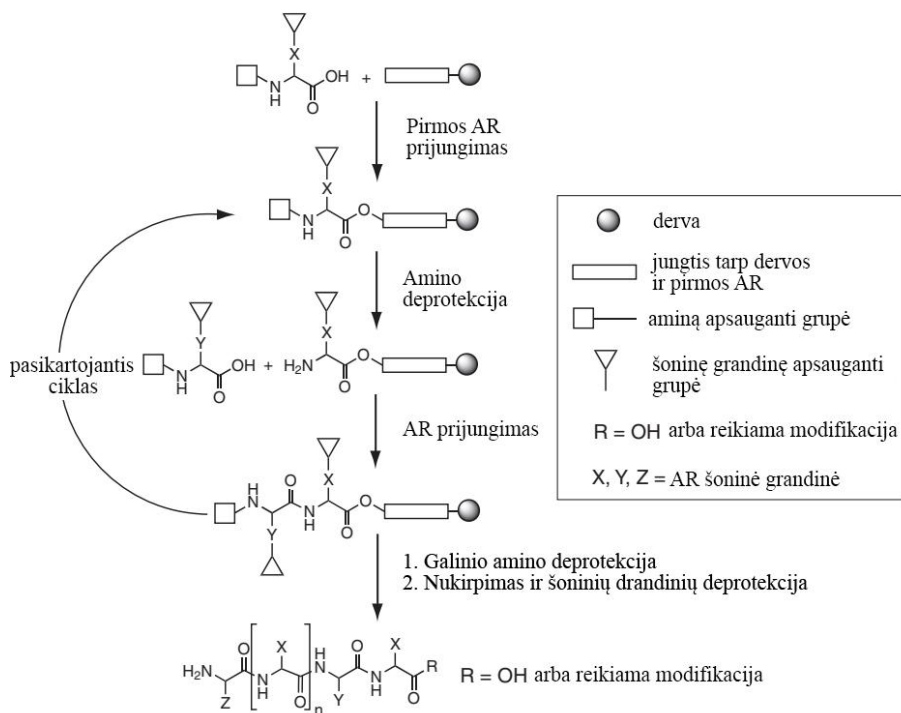
Daug sintetinių peptidų yra svarbūs kaip komerciniai arba farmaciniai produktai, pradedant nuo dipeptidinio cukraus pakaitalo aspartamo iki klinikoje plačiai naudojamų hormonų, tokių kaip oksitocinas, adenokortikotropinis hormonas, kalcitoninas ir kiti [92]. Dar prieš 2010 metus terapeutinių peptidų rinka pasiekė multimilijardinį lygį [93]. Greiti, efektyvūs ir tikslūs peptidų gamybos metodai yra svarbūs tiek farmacijos, tiek audinių inžinerijos poreikiams. Peptidų sintezė iš AR ir reikalingų prekursorių pirmą kartą buvo aprašyta daugiau nei prieš amžių. Tokios reakcijos principas buvo paprastas, įvykus reakcijai tarp AR papildomos apsauginės grupės buvo pašalinamos. Toje pačioje publikacijoje buvo pirmą kartą pavartotas terminas „peptidas“ [94].

Peptidų sintezės procesas tapo gerokai praktiškesnis po sintezės ant kietosios fazės atsiradimo. Pačios sintezės reakcijų principas išlieka panašus, tačiau besiformuojanti peptidinė grandinė yra prijungta prie netirpios polimerinės dervos molekulės. Besiformuojantis peptidas yra pratęsiamas pasikartojančių ciklų serija, naudojamas reagentų perteklius, tačiau jis gali būti pašalintas praplaunant ir nufiltruojant dervos granules, ant kurių yra sintetinamas peptidas. Kai susintetinamas reikalingo ilgio peptidas, jis gali būti nukerpamas nuo polimerinio nešiklio, taip pat yra pašalinamos apsauginės grupės.

XX amžiaus šeštojo dešimtmečio pradžioje Briusas Merifildas pasiūlė naudoti modifikuotas polistireno pagrindu pagamintas dervos granules, kaip kietąją fazę peptidų sintezei. Peptidai galėjo būti sintetinami pridedant po vieną AR, nuo C galo link N galo, naudojant N^α-apsaugotas AR. Tetrapeptido sintezė ant kietosios fazės buvo atlikta naudojant karboksibenziloksi (Boc) kaip α -amino apsauginę grupę, kaip reakcijos aktyvatorius buvo naudojamas

N,N'-dicikloheksikarbodiimidas, peptidas nukerpamas HBr [95]. Vėliau peptidų sintezė ant kietosios fazės buvo modifikuota taip, kad t-butiloksikarbonil grupė būtų naudojama N^α apsaugai, o peptido nukirpimui nuo kietosios fazės buvo naudojama fluoro rūgštis [96].

Carpino ir Han 1970 metais pasiūlė 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc) grupės įvedimą N^α grupės apsaugai. Fmoc grupės pašalinimui reikėjo vidutinės bazinės savybės turinčio reagento, kas reikštų mažiau agresyvaus reagento panaudojimą, nei reikalinga Boc grupės šalinimui [97].

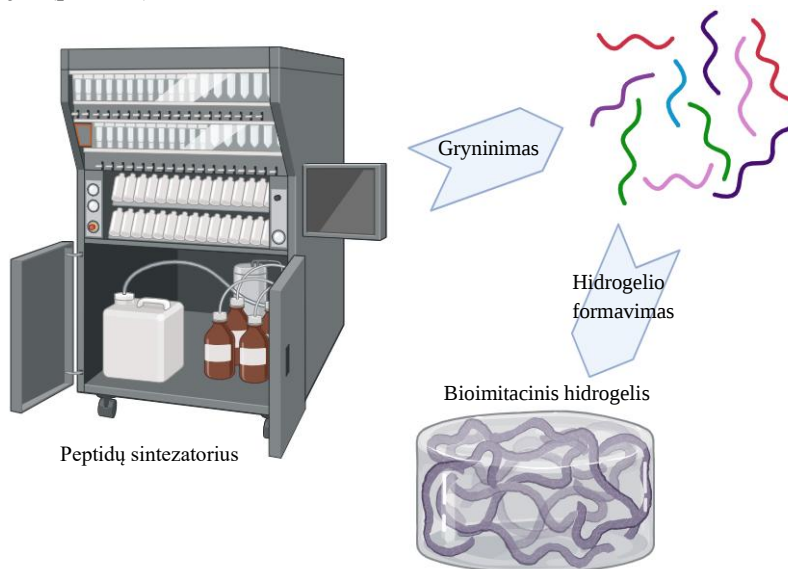


pav. 12 Peptidų sintezės ant kietosios fazės algoritmas, adaptuota iš [98]

Peptidų sintezė ant kietosios fazės (pav. 12) yra gana nesudėtingai automatizuojamas procesas, kuriam naudojami specialus sintezės indeliai su filtru, leidžiantys nesunkiai keisti reakcijos reagentus ir praplauti dervos granules tarp reakcijos žingsnių. Teisingai parinkus sintezės reagentus ir sąlygas vienos AR prijungimas užtrunka ~60-90 minučių, su 60-80 % tikslinio peptido išeiga po sintezės. Tokių peptidų gryninimui dažniausiai naudojamos atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčio chromatografijos sistemos, tiksliai peptido masei nustatyti naudojama masių spektrometrija [99].

Dėl spartaus ir aukštų išeigų proceso, leidžiančio greitai ir našiai sintetinti reikiamo peptidinio produkto kiekius, toks procesas labai gerai tinkamas

bioimitacinių peptidų sintezei, kurie toliau gali būti panaudojami audinių inžinerijai (pav. 13).



pav. 13 Peptidų sintetizatoriaus pritaikymas bioimitacinių peptidų sintezei, iš kurių toliau cheminių manipuliacijų metu gali būti formuojamas bioimitacinis hidrogelis, tinkamas audinių inžinerijos taikymams.

1.7. Baltymų ir peptidų cheminis susiuvimas

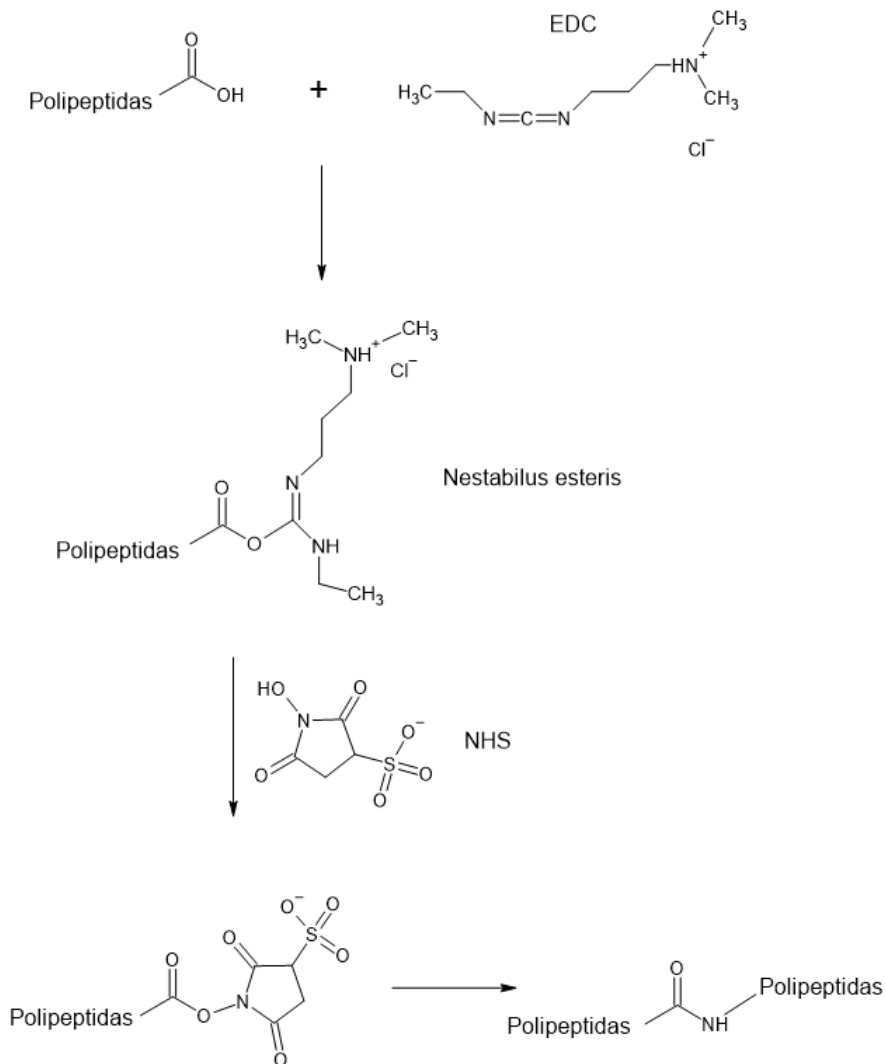
Baltymų ir peptidų kovalentinis susiuvimas leidžia sukurti stabilias ir apibrėžtas biomolekulinės konstrukcijas. Šio proceso metu formuojamas stiprus ryšys tarp specifinių AR peptidų arba baltymų grandinėse (lentelė 4). Įprasti susiuvimo metodai apima reagentų, kurie selektyviai nukreipia funkcines grupes reakcijai (pvz., aminus, tiolius), naudojimą. Dažniausiai sutinkami susiuvimo reagentai būtų glutaraldehidas, formaldehidas, succimidai.

Kovalentinėmis jungtimis sujungti peptidai ir baltymai vaidina svarbų vaidmenį tiek fiziologiniuose, tiek patologiniuose procesuose. Tokie kovalentiniai ryšiai gali būti formuojami žinduolių ląstelių endoplazminiame tinkle, arba Goldžio aparate, sudarant disulfidines jungtis tarp dviejų cisteino (Cys) AR [100] arba vabzdžio egzoskeleto formavimosi metu, yra apjungiami du tirozinai (Tyr) [101]. Jungtys gali formuotis tarp tos pačios molekulės skirtingų zonų arba tarp dviejų skirtingų molekulių. Jos yra ypatingai svarbios baltymo struktūros stabilizavimui, arba baltymo funkcionalumui [102].

lentelė 4 Baltymuose besiformuojantys ryšiai, adaptuota iš [103]

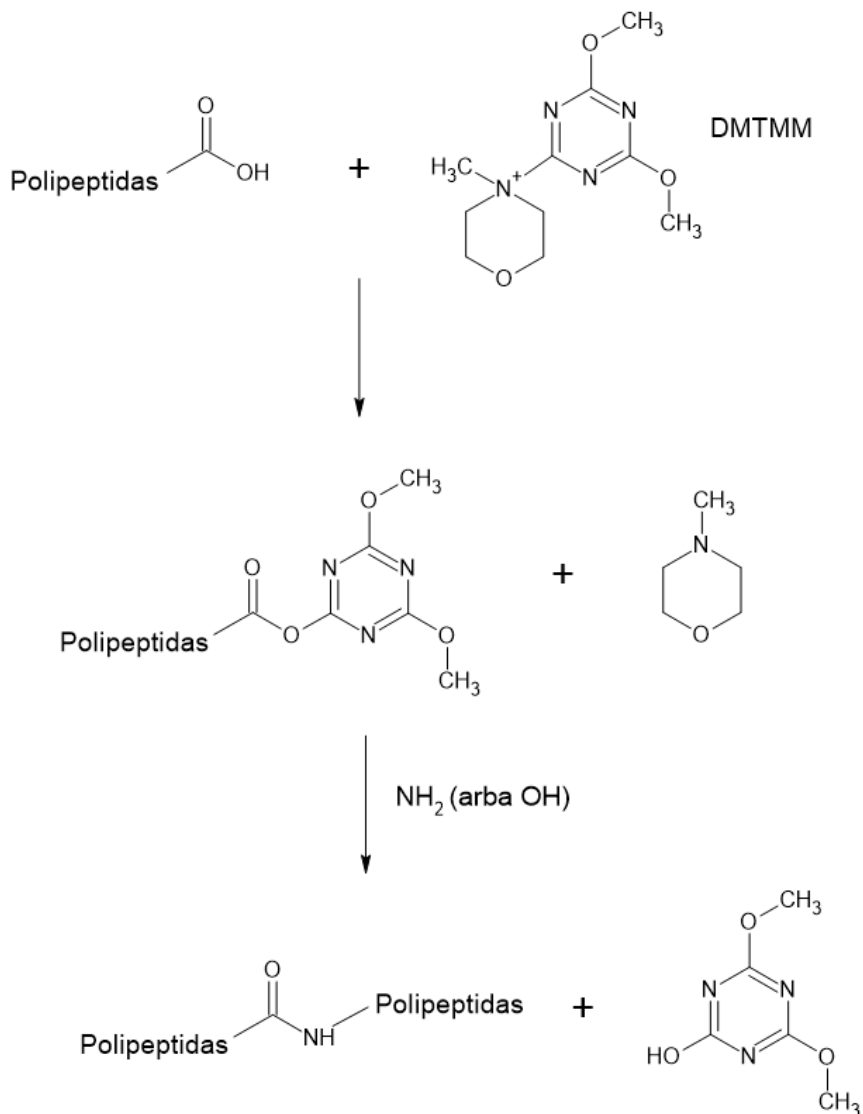
Susiuvimo tipas	Pavyzdys
Sieros turintys	Disulfidai
	Sulfiliminai
	Sulfenamidai, sulfinamidai, sulfonamidai
	Glutationilinti produktai
Anglis-Anglis	Di-Tirozinas
	Di-Triptofanas
	Tirozinas-Triptofanas
Anglis-Azotas	Lizinas-Histidinas
	Argininas-Histidinas
	Histidinas-Histidinas
Anglis-Deguonis	Izo-Di-Tirozinas
	Vinilo eteriai

Naudojant peptidus ar baltymus audinių inžinerijos taikymams, labai svarbus įrankis yra taip vadinami nulinio ilgio susiuvimo agentai. Populiariausias pavyzdys būtų 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidas (EDC), kuris veikia aplinkoje esant N-hidroksisucimidui (NHS), žr. pav. 14. Kadangi tarp sujungtų cheminių grupių nėra jokio papildomo intarpo – toks susiuvimo būdas yra vadinamas nulinio ilgio [104].



pav. 14 NHS/EDC reakcijos mechanizmas, adaptuotas iš [105]

Dar vienas dažnai naudojamas nulinio ilgio susiuvimo agentas – 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino chloridas (DMTMM) (pav. 15). Kaip ir karbodiimidai, šis reagentas buvo kurtas peptidų sintezės taikymui [106]. Lyginant su NHS/EDC reakcija, DMTMM naudojimas yra paprastesnis, šis reagentas mažiau jautrus pH pokyčiams ir veikia neutraliame pH ruože. Vieno reagento naudojimas vietoje dviejų supaprastina reakcijos eigą [107]. Naudojant DMTMM peptidų susiuvimui buvo pastebėta, kad reakcijos trukmė yra ilgesnė ir sudaro galimybes papildomai modifikuoti peptidų tirpalą hidrogelio susidarymo metu.



pav. 15 DMTMM amido formavimo mechanizmas, adaptuota iš [108]

1.8. Hidrogelinių medžiagų mikro- ir nanoformavimas

Ląstelių gyvybingumas, fiziologija, proliferacija, gebėjimas migruoti, sąveika su audinių inžinerijos karkasais *in vitro* arba realiu tarpląstelinio užpildu *in vivo* sąlygomis labai priklauso nuo karkaso/užpildo savybių (standumo, vandens kiekio, sandaros, paviršiaus morfologijos). Audinių inžinerijoje visų šių parametų suvaldymas yra būtinas konstruojant funkcinį audinį *in vitro* sąlygomis [109].

Šiuo metu praktikoje dažniausiai *in vitro* ląstelių auginimui tebenaudojami paviršiniai (2D) karkasai, kurie optimizuoti geresnei ląstelių proliferacijai ir adhezijai plokščiose ląstelių kultūrose [110]. Svarbu atkreipti dėmesį, kad kartais plokščios ląstelių kultūros nesukuria tikroviškos aplinkos, be kita ko, pasižyminčios būdingomis mikroskopinėmis ir nanoskopinėmis struktūromis. Tokio supaprastinto eksperimento rezultatai bus nutolę nuo *in vivo* sąlygų [111].

Kuriant audinių inžinerijos konstruktus su reikiamomis paviršiaus topografijomis arba kitomis struktūromis dažniausiai yra pasirenkamos kietos medžiagos, tokios kaip silicis [112], titanas [113], cirkonis [114] ir kt. Iš šių medžiagų gaunami substratai arba karkasai nelaidūs ir negali užtikrinti ląstelių maisto medžiagų ir metabolitų difuzijos. Todėl labai ribotos galimybės, pvz., gauti skirtingų ląstelių kokultūras. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad tai kietosios medžiagos pasižymi visiškai kitomis mechaninėmis savybėmis, kurios daugeliui ląstelių tipų nėra tinkamos.

Yra pavyzdžių kai mikroformavimas, kuriuo siekiama atkurti būdingą ląstelių aplinkos ir audinių sandarą, lengvai atliekamas ir ant minkštų medžiagų. Polidimetilsiloksanas (PDMS) puikiai tinka mikroformavimui, o po papildomo cheminio aktyvavimo- ir TLU baltymų padengimui [115]. Tačiau tai nėra porėtas polimeras ir jis irgi negali užtikrinti ląstelių maisto medžiagų ir metabolitų transporto. Yra pavyzdžių kai kolagenas arba želatina naudojami paviršiaus mikro- ir nanoformavime (ypač- erdvių karkasų gamyboje) ir neblogai tinka audinių kultūroms kurti. Tačiau literatūroje trūksta ilgalaikio stabilumo rezultatų [116]–[119].

1.9. Hidrogelinės medžiagos kaip pralaidumo modelis

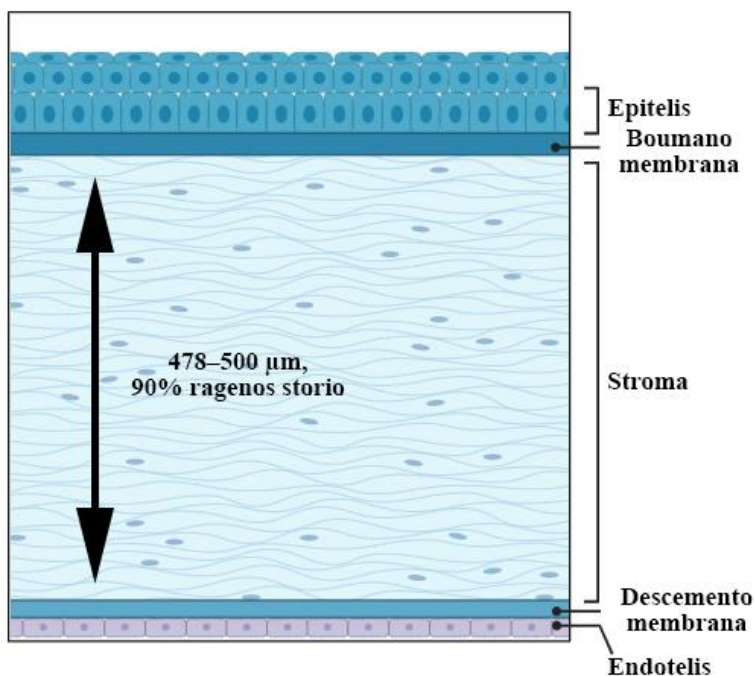
Hidrogelinės medžiagos savo sandara yra artimos natyviems audiniams, tad gali būti naudojamos vaistinių medžiagų pralaidumo tyrimuose. Tokiais atvejais hidrogelis gali būti naudojamas ir be ląstelių, ir su organotipiniu ląstelių sluoksniu ant paviršiaus [120].

1.9.1. Akies ragenos pralaidumas

Akis yra sistema, su sudėtinga anatomija ir mažu kontaktiniu paviršiumi (pav. 16). Dėl mažo paviršiaus ploto dažnai sunku pasiekti terapines vaistinių medžiagų koncentracijas akies viduje, kadangi įprastai naudojamas vietinis vaistinės medžiagos dozavimas (akių lašai, tepalai, vaistines medžiagas atpalaiduojantys lęšiai ir kita). Norint palaikyti aukštesnes vaistinių medžiagų

koncentracijas naudojamos injekcijos į akies audinius bei implantai [121]–[123].

Vietinis vaistinių akių lašų naudojimas yra labiausiai paplitęs ir patogiausias pacientui, nes gali būti atliekamas savarankiškai. Toks panaudojimo būdas turi savo trūkumų, tokių kaip maža vaistinių medžiagų skvarba pro akies rageną, bei su tuo susijęs didelių vaistinių medžiagų koncentracijų naudojimas [124]. Mirksėjimas, akių ašarojimas, vaistinių medžiagų nutekėjimas į nosies ašarų kanalą gali žymiai sumažinti vaistinės medžiagos kiekį akyje vos per 15–30 sekundžių po vaistinių medžiagų panaudojimo [125], [126]. Įprastai vaistinių medžiagų pralaidumas nesiekia 5 % nuo vaistinės medžiagos pradinio kiekio. Naudojant didesnes vaistinių medžiagų koncentracijas tirpalų klampa dažnai būna didesnė, kas gali sukelti diskomforto jausmą, dirginimą, išsiliejusį vaizdą [121], [124]. Nors tik nedidelė vaistinių medžiagų dalis prasiskverbia per rageną, akių lašai ar tepalai yra dažniausiai naudojamas vaistinių medžiagų pristatymo būdas. Stratifikuotų ragenos keratinocitų epitelio sluoksnis sudaro esminį pralaidumo barjerą, trukdantį hidrofilinių junginių pralaidumui. Tuo tarpu ragenos stroma, didžiąja dalimi sudaryta iš vandens (~80 %), sudaro pagrindinį hidrofobinių junginių barjerą [127].



pav. 16 Scheminis žmogaus akies ragenos atvaizdavimas, adaptuota iš [126]

Kuriant vaistinius preparatus skirtus skverbtis per akies rageną svarbu tinkamai įvertinti medžiagų pralaidumą. Dažnai tokiems tikslams naudojamos *ex vivo* gyvulinės kilmės ragenos [128], tačiau Europos Parlamento direktyva 2010/63/EU siūlo tokiems matavimams ir kitiems vaistinių medžiagų tyrimams naudoti sintetinius ragenos analogus, kurie nekeltų etikos klausimų [129].

Yra žinomų ir aprašytų akies ragenos modelių, skirtų vaistų pralaidumui tirti. Tokie modeliai leidžia gauti reikiamus vaistinių medžiagų pralaidumo rezultatus greičiau ir pigiau, nei naudojant *ex vivo* ragenas. Tačiau vertinant publikuotų modelių rezultatus galima matyti, kad rezultatų, gautų tiriant oftalmines vaistines medžiagas *in vitro* ragenos pralaidumo modeliuose, nepakanka [130], [131]. Ląsteliniai akies ragenos modeliai yra ankstyvose vystymosi stadijose, nors jau rodo daug žadančius rezultatus su potencialiu pritaikymu medžiagų pralaidumui arba citotoksiškumui vertinti. Ląsteliniai modeliai gali būti konstruojami naudojant tik epitelio ląsteles [132]–[134], arba epitelio ir stromos ląstelių kultūras [131], [135], [136]. Esamuose modeliuose karkasu dažniausiai pasirenkamas iš kolageno pagamintas hidrogelis, nes taip imituojama natūrali stromos aplinka [137].

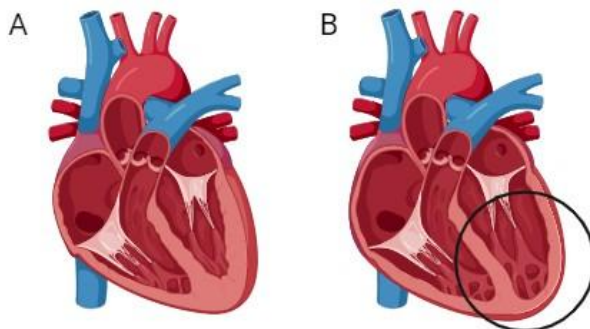
1.10. Organotipinės kultūros formavimas

Organotipinė ląstelių kultūra leidžia *in vitro* sąlygomis gauti biologinius audinius primenančius konstruktus, kuriuose yra išlaikoma jų normali fiziologija ir funkcijos [138]. Kuriamos bioimitacinės medžiagos, įvairūs karkasai bei užpildai, tarp jų- ir kolageno hidrogelis su modifikacijomis, taip pat baltymus imituojančio peptido hidrogeliai yra tinkami organotipinės audinių kultūros formavimui.

1.10.1. Kardiomiogeninė diferenciacija

Dilatacinė kardiomiopatija apima įvairius miokardo sutrikimus, kuriems būdingas skilvelių išsiplėtimas ir sumažėjęs miokardo veikimas (pav. 17). Dilatacinei kardiomiopatijai būdinga vieno ar abiejų skilvelių ertmės išsiplėtimas, sutrikusi sistolinė širdies funkcija [139]. Toks sutrikimas prasideda kairiajame skilvelyje, sukelia skilvelio kameros išsiplėtimą, ištempia ir išretina sienes. Dėl pakitusios kairiojo skilvelio funkcijos išsiplėčia dešinysis skilvelis, toliau- prieširdžiai bei visa širdis [140]. Dilatacinė kardiomiopatija esant komplikacijoms gali būti širdies nepakankamumo, aritmijos, trombozės priežastimi. Tokie sutrikimai yra viena iš pagrindinių žmonių mirtingumo priežasčių [141]. Audinių inžinerijos, kuri

leistų modifikuoti širdies raumens ląsteles arba tarpląstelinį užpildą bei modeliuoti kardiomiopatijas poreikis yra labai didelis, nes dabartinės strategijos neretai veda prie širdies transplantacijų.



pav. 17 Dilatacinės kardiomiopatijos scheminis atvaizdavimas. A - sveikos širdies skerspjūvis, B - patologinė širdis su išplitusiu kairiuoju skilveliu. Adaptuota iš [142].

Yra darbų, skirtų ištirti tiesioginių kamieninių ląstelių injekcijų į širdies raumenį arba epikardą poveikius, kai naudojamos embrioninės, indukuotos pluripotentinės, hematopoetinės arba mezenchiminės kamieninės ląstelės. Tokios studijos yra atliekamos tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo* [143]–[145]. Dilatacinės kardiomiopatijos gydymo strategijos, paremtos kamieninių ląstelių panaudojimu, susidūrė su tokiais problemomis, kaip imuninis atsakas, injekuotų ląstelių kancerogeniškumas bei nepakankamas pasiskirstymo audinyje tikslumas [145]. Naudojant bioimitacinius audinių inžinerijos karkasus pagerėja transplantuojamų ląstelių gyvybingumas, dėl to galima tikėtis geresnio regeneracinio efekto [146]–[148].

Ruošiant ląsteles transplantacijai, dažnai reikalinga kardiomiogeninė diferenciacija, kuri *in vitro* sąlygomis indukuojama viduląsteliniais arba išoriniais faktoriais. Yra žinoma, kad organotipinėmis sąlygomis auginamos ląstelės patiria mažesnę stresą ir suformuoja artimesnį natyviame fenotipą [149]. Taip pat yra studijų, rodančių, kad ilgai augintos ant plastiko mezenchiminės kamieninės ląstelės pakeičia ląstelės formą ir kitaip reaguoja į išorinius dirgiklius [150]. Plastiko paviršius negali atkartoti ląstelėms įprasto TLU, tad *in vivo* sąlygomis taip pat pasikeičia ir tarpląstelinės sąveikos. Tyrimai rodo, kad sąveika su TLU komponentais ir viduląsteliniai integrinų indukuojami signaliniai keliai yra labai svarbūs vystantis miokardo hipertrofijai, dilatacinei kardiomiopatijai, širdies nepakankamumui [151]–[153].

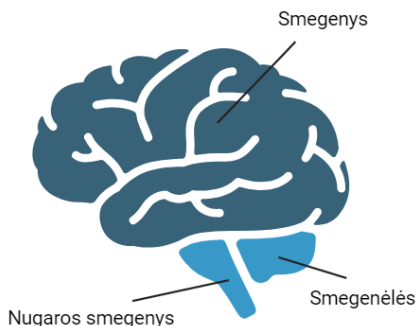
Pagrindinis širdies TLU komponentas yra I tipo kolagenas, jis sudaro apie 80 % viso tarpląstelinio užpildo. Galimybė rinktis ir modifikuoti jo mechanines savybes bei priedus, su kuriais gaminami kolageno bioimitaciniai

hidrogeliai, daro jį labai patraukliu kuriant efektyvius modelius, taip pat terapeiškai kardiomiogeninei diferenciacijai [154]. Hialurono rūgštis – dar vienas širdies TLU komponentas, kuris buvo sėkmingai išbandytas žiurkės širdies audinių inžinerijai [155]. Jos vaidmuo širdies audinyje siejamas su audinio reparacija bei pažaidų gijimo procesais. Be to, hialurono rūgštis svarbi širdies audiniui vystantis bei įvairių lėtinių ligų (aterosklerozės, miokardo infarkto) atsiradimui bei progresavimui.

Kitas, irgi perspektyvus komponentas širdies audinio inžinerijoje – tai metakriloiloksietilfosforilcholino (MPC) polimeras. Pagal neseniai atlikto tyrimo rezultatus, savo struktūra jis primena ląstelės membranos fosfolipidus bei turi priešūždegiminių savybių [156].

1.10.2. Nervinių audinių ląstelių kultūros

Dabartinės nervinių audinių kultūrų, pvz. išskirtų iš smegenų, 2D ir 3D kultivavimo strategijos (pav. 18) yra dažniausiai pagrįstos adheziją skatinančiomis medžiagomis, tokiomis kaip polilizinas, poliornitinas, lamininas, fibronektinas, kolagenas ir panašiomis [157]. Tokiose kultūrose dažniausiai galima stebėti neuronų ir glijos ląstelių tolygiai pasiskirsčiusius tinklus. Nors tokias kultūras lengva tyrinėti, tačiau ląstelių tankis ir morfologija labai skiriasi nuo stebimos natyviomis audinio sąlygomis. Mikroglijos ląstelės *in vitro* sąlygomis dažniausiai yra stipraus uždegiminio atsako būsenoje, tai galima pamatyti iš padidėjusių ląstelių ir trumpų ataugų. Jos labai skiriasi nuo išsišakojusių mikroglijų smegenų audinyje, kurias sudaro nedidelis ląstelės kūnas ir labai išsišakojusios ataugos, atsakingos už sinapsių skenavimą ir karpymą [158], [159]. Ląstelės turinčias stiprią sąveiką su paviršiumi patogu stebėti eksperimento metu, tačiau tokios ląstelės sunkiau juda paviršiumi ir sąveikauja su kitomis ląstelėmis, tai kliudo tarpląstelių jungčių susidarymui ir organotipinės kultūros formavimui.



pav. 18 Smegenų scheminis pavaizdavimas, adaptuota iš [160]

2. NAUDOTOS METODIKOS

2.1. Peptidų sintezė ir gryninimas

Peptidų sintezei buvo naudotas automatinis pusiau pramoninis peptidų sintezatorius Symphony (ProteinTech, JAV). Pasirinkta peptidų sintezės skalė – 60 μmol , naudota sintezės kietoji fazė Fmoc-Gly-Wang derva, su iš anksto įkrauta Gly amino rūgštimi. Pagrindinis sintezės tirpiklis buvo dimetilformamidas (DMF). Kaip Fmoc deblokavimo reagentas naudotas 20 % Piperidino tirpalas DMF tirpiklyje. Aktyvavimui buvo naudotas N,N-Diisopropiletilamino (DIPEA) ir O-(1H-6-chlorbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio heksafluorofosfato (HCTU) mišinys DMF tirpiklyje.

AR prijungimo algoritmas:

- 1) DMF tirpiklis naudojamas dervos praplovimui sintezės indelyje, plovimo trukmė 30 sekundžių, kartojama 2 kartus;
- 2) 20 % Piperidino tirpalas DMF tirpiklyje naudojamas Fmoc deblokavimui, ekspozicijos laikas 5 minutės, kartojama 2 kartus;
- 3) DMF tirpiklis naudojamas dervos praplovimui sintezės indelyje, plovimo trukmė 30 sekundžių, kartojama 5 kartus;
- 4) Patiekama prijungiamoji AR, tirpalo koncentracija 100 mM;
- 5) Patiekiamas aktyvavimo tirpalas 195 mM HCTU, 400 mM DIPEA, ekspozicijos trukmė 30 minučių. Trukmė gali varijuoti priklausomai nuo prijungiamos AR ir nuo prijungimo vietos peptido grandinėje, ekspozicijos laikas gali būti ilginamas iki 45 arba 60 minučių;
- 6) DMF tirpiklis panaudojamas dervos praplovimui sintezės indelyje, plovimo trukmė 30 sekundžių, kartojama 2 kartus;

AR prijungimo algoritmas kartojamas tiek kartų, kiek turi būti prijungta aminorūgščių. Po paskutinės AR prijungimo 20 % Piperidino tirpalas DMF tirpiklyje naudojamas Fmoc deblokavimui nuo paskutinės prijungtos AR amino. Po sintezės proceso dervos granulės yra praplaunamos dichlormetanu.

Peptidų nukirpimui nuo dervos yra naudojamas trifluoracto rūgšties (TFA), triizopropilsilano (TIS) ir vandens mišinys. Standartiškai vienam gramui chemiškai funkcionalizuotos dervos naudojame 10 ml nukirpimo mišinio. Procentinė mišinio sudėtis: 95 % TFA, 2,5 % H_2O , 2,5 % TIS. Peptide esant cisteino ar metionino, mišinio sudėtis yra papildoma etanditioliu (EDT): 94 % TFA, 2,5 % H_2O , 2,5 % TIS ir 1 % EDT.

Peptidų nukirpimui nuo dervos yra naudojami įprastiniai laboratoriniai plastikiniai švirkštai su filtrais. Peptidas ant kietosios fazės yra perkeliamas iš reakcijos indelių, užpilamas nukirpimo mišiniu, procesas vyksta 3 valandas.

Po to filtratas perkeliamas į plastikinį mėgintuvėlį ir išsodinamas dietilo eteriu (DET). Po išsodinimo peptidas nucentrifuguojamas ir precipitatas dar keturis kartus praplaunamas DET.

Atlikus peptido nukirpimą nuo kietosios fazės yra tikrinama susintetinto produkto masė masės spektroskopijos metodu, taip yra patvirtinama ar buvo susintetintas tikslinis peptidas. Jeigu aptinkamas tikslinis peptidas, jis toliau gryninamas aukšto slėgio skysčio chromatografijos (HPLC) būdu. Naudojama Waters (Waters, JAV) sistema, Waters 2545 gradiento sudarymo modulis, Waters 2489 UV/Vis detektorius, Waters Fraction Collector III frakcijų kolektorių ir Waters Empower programinė įranga. Atvirkščių fazių HPLC buvo naudojami vandens ir acetonitrilo (ACN) mišiniai su TFA priedu:

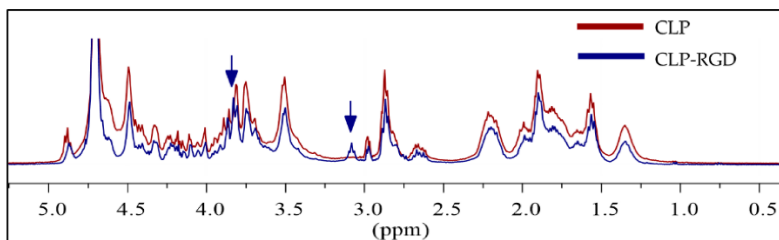
- 1) A tirpiklis 90 % H₂O, 10 % ACN, paskui pridedant 0,1 % TFA;
- 2) B tirpiklis 10 % H₂O, 90 % ACN, paskui pridedant 0,1 % TFA.

Tirpiklių pasikeitimui buvo naudojamas linijinis gradientas, detektorius matavo eliuento sugertį ties 215 nm bangos ilgiu. Surinktos frakcijos vėliau buvo koncentruojamos rotaciniu garintuvu Heidolph Hei-VAP (Heidolph, Vokietija), sukonzentruotas peptido tirpalas buvo šaldomas skystame azote ir liofilizuojamas LyoQuest -85 (Telstar, Ispanija) liofilizatoriuje.

2.2. Susintetintų junginių ir hidrogelių analizė

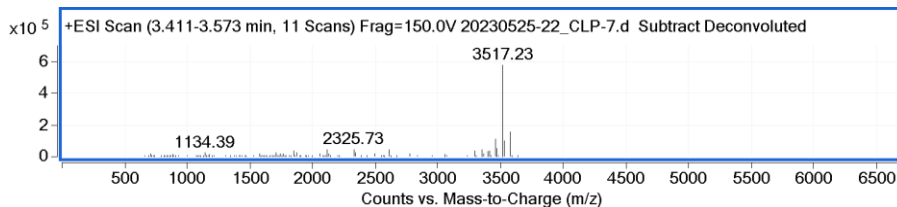
Paruošti hidrogelių pirmtako junginiai buvo analizuoti pasitelkiant įvairius metodus:

- branduolių magnetinio rezonanso (BMR) metodu 400 MHz Bruker Ascend BMR spektrometru (pav. 19);



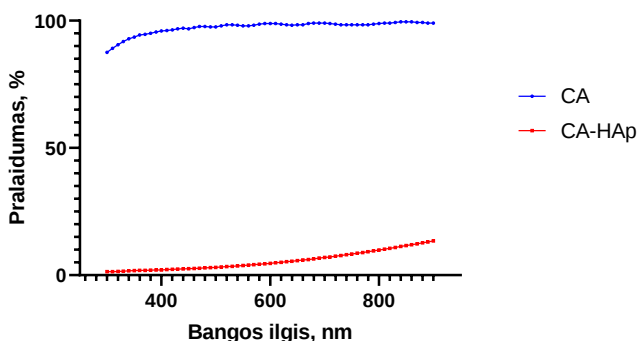
pav. 19 Skirtingų susintetintų peptidų BMR spektro vertinimas.

- masių spektrometrija (pav. 20) (MS) buvo tikrinama ar sintezės metu gautas tinkamas produktas. Tik tada gryninama aukšto slėgio chromatografijos sistemoje.



pav. 20 Susintetinto į kolageną panašaus peptido CLP masių spektras. Po kiekvienos sintezės įsitikinama, kad tikslinis produktas tikrai aptinkamas produkte.

- Hidrogelių bandinių optinis pralaidumas (pav. 21) matuojamas spektrometriškai Epoch 2 (Biotek) spektrofotometru, 300-900 nm bangos ilgio ruože, 10 nm žingsniu, pralaidumas pateikiamas santykis tarp į 500 μm storį hidrogelį kritusios ir per bandinį perėjusios spinduliuotės stiprio.



pav. 21 Šviesos pralaidumas kolageno hidrogelyje CA ir, palyginimui, kolageno hidrogelio kompozite su hidroksiapatito dalelėmis, CA-HAp. Hidroksiapatito dalelių dalis medžiagos tūryje yra 3 % ir toks hidrogelis yra neskaidrus.

2.3. Šviesos lauko ir fluorescencinė mikroskopija

Pagaminus hidrogelius su mikrostruktūromis, buvo atliktas medžiagos morfologijos, defektų patikrinimas ir stabilumo terpėje tyrimas. Pagaminti hidrogeliai ir naudotos PDMS formos su mikrostruktūromis buvo apžiūrėtos šviesiniu mikroskopu Olympys BX51 (Olympus, Tokyo, Japonija), buvo naudotas 10 $\times$ NA 0.3 imersinis objektyvas ir Peltier elementu aušinama Fview II CCD kamera, kartu su Stream Motion programine įranga (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Vokietija).

Ant mikrostruktūrų augančios ląstelės buvo stebimos invertuotu Olympus IX51 mikroskopu ir skaitmenine kamera (*U-CMAD3, Olympus*), 10× oriniu objektyvu.

2.4. Atominių jėgų mikroskopija

Jungo modulio matavimai ir paviršiaus nanometrinės struktūros apžiūrėjimas buvo atlikti atominių jėgų mikroskopijos būdu. Nanostruktūros išgautos ant PDMS, polistireno ir hidrogelio buvo ištirtos atominiu jėgų mikroskopu (NanoWizard III, JPK Instruments, Vokietija). AFM vaizdinimui hidrogelių mėginiai buvo pritvirtinti prie (3-aminopropil)trimetoksi silanu modifikuoto stiklo paviršiaus, naudojant gliutaraldehidą. Jėgos matavimai buvo atlikti fosfatinio buferinio tirpalo ir druskų (PBS) mišinyje, naudojant HQ:NSC35 AFM zondo svirtelę (Micromasch, Bulgarija) su šviesą atspindinčia aukso danga. Paviršiaus charakterizavimas buvo atliktas naudojant MLCT-A zondą.

Jungo modulio apskaičiavimams buvo naudotas Hertz modelis zondui su sfera:

$$F = \frac{E}{1 - \nu} \left[\frac{a^2 + R^2}{2} \ln \frac{R + a}{R - a} - aR \right]$$

Formulėje: F – pritaikyta apkrova, E - Jungo modulis, R - naudotos sferos skersmuo, ν - indentacijos gylis.

Jungo modulis yra apskaičiuojamas sugretinant išmatuotą jėgos kreivę su modeline kreive, šie skaičiavimai buvo atliekami JPK Instruments programine įranga.

Hertz modelio naudojimas indentacijai leidžia tiksliai nustatyti hidrogelių Jungo modulį. Norint gauti patikimų rezultatų, labai svarbu tinkamai paruošti, sukalibruoti prietaisą su naudojamu zondų ir tinkamai analizuoti duomenis. Toks matavimo metodas kiekybiškai įvertina mechanines savybes ląstelių aplinkoje, tačiau matavimo paklaidos gali stipriai priklausyti nuo artefaktų hidrogelio tūryje (oro burbulai, kietos dalelės arba nehomogeniškas išmaišymas).

Paviršiaus topografijų vaizdavimas skystyje buvo atliktas naudojant QI režimą. Toks matavimo režimas užfiksuoja jėgos ir atstumo kreives kiekviename vaizdo taške, iš kreivių suskaičiuojamas bandinio aukščio poveikslas- žemėlapis. Jam gauti naudota JPK Data Processing programinė įranga.

2.5. Hidrogelinių medžiagų ruošimas

Bioimitaciniai hidrogeliai buvo gaminti iš skirtingų žaliavų, kurių pagrindiniai komponentai buvo:

- 1) Gyvulinės kilmės I tipo kolagenas (CA), (NMP collagen PS, Nippon Meatpackers, Japonija)
- 2) CA modifikuotas fosforilcholinu (CA-MPC)
- 3) CA modifikuotas hialurono rūgštimi (CA-HA)
- 4) Kolageną imituojantis peptidas konjuguotas su 8 šakų PEG-Maleimidu (CLP-PEG)
- 5) Kolageną imituojantys peptidai (CLP)

2.5.1. CA hidrogelių ruošimas

Pagal standartinį protokolą, apie 600 – 700 mg 12 % (m/m) kolageno tirpalo sumaišoma su 150 μ l 0,625 M 2-(N-morfolino)etansulfoninės rūgšties (MES) buferiniame tirpale (pH = 4,5), naudojant dviejų švirkštų, sujungtų 90° kampu, sistemą. NaOH 2M tirpalas naudojamas pH korekcijai, 600 mg 12 % gauti reikia apie 12 μ L 2M NaOH. Gerai išmaišius, pridedamas 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolin chloridas (DMTMM) (DMTMM:Col-NH₂ (mol:mol) 1:1). Įvedus DMTMM reagentą, tirpalas maišomas 30 sekundžių ir išpilamas tarp dviejų stiklo plokštelių, su norimo storio tarpine tarp jų. Dažniausiai naudojamos tarpinės storis buvo 500 μ m. Hidrogelis yra paliekamas drėgnoje aplinkoje (≥ 85 %) per naktį ir kitą dieną gali būti išimamas.

2.5.2. CA hidrogelių modifikuotų fosforilcholinu ruošimas (CA-MPC)

CA-MPC hidrogeliai buvo formuojami analogiškai, tik kolageno aminų ir DMTMM molinis santykis buvo 1:1, o kolageno ir MPC molinis santykis 2:1. Pirmiausia į 12 % (m/m) kolageno tirpalą buvo pridedamas MPC reagentas, po to kruopščiai maišant buvo įnešamas polietilenglikolio diakrilatas, molinis santykis su MPC 1:3. Toliau pridedamas amonio persulfatas, molinis santykis su MPC 0,03:1. Tada- N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diaminas, molinis santykis su amonio persulfatu 1:0,77. Paskutinis pridedamas DMTMM reagentas cheminiam kolageno susiuvimui. Įvykus reakcijai, MPC suformuoja atskirą persipinančią tinklą su chemiškai sutvirtintu kolageno hidrogeliu [161]. Galutiniai kolageno ir fosforilcholino kiekiai tokiaame hidrogelyje 6,5 %

(m/m) ir 3 % (m/m) atitinkamai. Hidrogelis yra paliekamas drėgnoje aplinkoje (≥ 85 %) per naktį ir kitą dieną gali būti išimamas.

2.5.3. CA hidrogelių modifikuotų hialurono rūgštimi ruošimas (CA-HA)

Siekiant sustiprinti kolageno hidrogelio bioaktyvias savybes buvo sukurta nauja hialurono rūgštimi modifikuoto kolageno hidrogelio variacija. Į 12 % (m/m) buvo įnešamas 1 % (t/t) hialurono rūgšties vandeninis tirpalas. Galutinės CA ir HA koncentracijos hidrogelyje buvo, atitinkamai, 8.5 % (m/m) ir 0.05 % (m/m). Tirpalo susiuvimui naudojamas DMTMM reagentas DMTMM:Col-NH₂ (mol:mol) 1:1. Įvedus DMTMM reagentą tirpalas maišomas 30 sekundžių ir išpilamas tarp dviejų stiklo plokštelių, su norimo storio tarpine tarp plokštelių. Dažniausiai naudojamos tarpinės storis taip pat buvo 500 μ m. Hidrogelis yra paliekamas drėgnoje aplinkoje (≥ 85 %) per naktį ir kitą dieną gali būti išimamas.

2.5.4. CLP-PEG hidrogelio ruošimas

CLP-PEG hidrogelių gamybos protokolą buvo publikuotas [162], su optimizavimais ir pakeitimas jis naudojamas ir šiame darbe. Originali CLP seka buvo sukurta O'Leary [163], vėliau ji buvo modifikuota cisteinu, kad būtų galima reakcija su PEG-maleimidu [164].

CLP peptidas buvo konjuguotas su 8 šakų 40 kDa PEG-Maleimidu santykiu 1:2, po 2 parų reakcijos produktas dializuojamas 12-14 kDa molekulinės masės junginių atskyrimo dializės membrana tam, kad būtų galima pašalinti nesureagavusius produktus. Po reakcijos tirpalas užšaldomas skystame azote ir liofilizuojamas. Po liofilizavimo junginys saugomas 4°C inertinių dujų aplinkoje.

Ruošiant CLP-PEG hidrogelį yra iš anksto paruošiamas 12 % CLP-PEG tirpalas, nufiltruojamas per 0.22 μ m membraną ir sumaišomas su DMTMM susiuvimo agentu, naudojant molinį santykį CLP-PEG:DMTMM 1:2. Pridėjus DMTMM reagento, tirpalas maišomas 30 sekundžių ir išpilamas tarp dviejų stiklo plokštelių, su norimo storio tarpine tarp plokštelių. Dažniausiai naudojamos tarpinės storis buvo 500 μ m. Hidrogelis paliekamas drėgnoje aplinkoje (≥ 85 %) per naktį ir kitą dieną gali būti išimamas.

2.5.5. CLP hidrogelio gamyba

Ruošiant CLP hidrogelį yra iš anksto paruošiamas 12 % CLP tirpalas, filtruojamas per 0,22 μm membraną ir sumaišomas su DMTMM susiuvimo agentu, naudojant molinį santykį CLP-NH₂:DMTMM 1:2. Pridėjus DMTMM reagento, tirpalas maišomas 30 sekundžių ir išpilamas tarp dviejų stiklo plokštelių, su norimo storio tarpine tarp plokštelių. Dažniausiai naudojamos tarpinės storis buvo 500 μm . Hidrogelis paliekamas drėgnoje aplinkoje ($\geq 85\%$) per naktį ir kitą dieną gali būti išimamas.

2.5.6. Mikro- ir nanostruktūruotų hidrogelinių substratų gamyba

Mikrostruktūrų gamybai buvo naudojami iš anksto paruošti polidimetilsiloksano (PDMS) šablonai, gaminant PDMS replikas nuo fotolitografijos būdu paruoštų silicio plokštelių su SU-8 fotorezisto danga.

Kaip PDMS elastomeras buvo naudojamas Sylgard 184 rinkinys (Dow-Corning, JAV), komponentai sumaišomi santykiu 1:10 ir 4 valandas kaitinami 64°C temperatūroje. Po kaitinimo žingsnio PDMS plėvelė buvo plaunama izopropanoliu ir vandeniu.

Ruošiant nanostruktūruotus paviršius, šablono gamybai buvo naudojama koloidinė litografija [165]. Švarios stiklo plokštelės buvo sudėtos ant staliuko su nedideliu pasvirimu ($\sim 2^\circ$), tuomet ant stiklo paviršiaus buvo užpilami 2 mL dejonizuoto vandens, kad visas paviršius būtų apsemtas. Po to buvo paruošiami koloidinių polistireno dalelių tirpalai (Microparticles MmbH, Vokietija), skirtingo dydžio dalelėms (lentelė 5) buvo taikomas skirtingas tirpalo skiedimas. Skiedimui buvo naudotas 50 % etanolio tirpalas.

Formuojant koloidinį kristalą ant stiklo paviršiaus buvo uždedama 100-300 μL kiekvieno tirpalo, lėtai ir tolygiai paskirstant jį stiklo kraštu ir paliekama išdžiūti. Padengimo kokybės preliminariam vertinimui buvo naudojama optinė mikroskopija, detalesniam vertinimui buvo naudojamas atominių jėgų mikroskopas (AFM).

lentelė 5 Koloidinės litografijos tirpalų skiedimai

Sferos skersmuo, nm	Galutinė koncentracija, % (w/w)
252	2,5
488	2,5
1010	5
3030	5

Padengus stiklo plokštelę submikrometrinio dydžio sferomis, buvo gaminamos daugkartinio naudojimo replikos, tinkamas hidrogelio liejimui

jose. Šiam tikslui buvo panaudotas silikonizuotas polietileno tereftalatas Flexdym (Eden Tech, Prancūzija): 1.2 mm storio šios medžiagos lapelis, įdėtas tarp dviejų stiklo plokštelių, ant vienos iš kurių buvo suformuotos nanostruktūros. Stiklo plokštelės buvo suspaustos popieriaus spaustukais ir perkeltos į laboratorinę krosnelę (Memmert UN30, Vokietija) 7 minutėms, prie 120°C.

Po kaitinimo palaukiama, kol stiklas atvės iki kambario temperatūros ir atskiriama. Ant stiklo paviršiaus suformuotas koloidinis sferų kristalas pernešamas ant Flexdym polimero paviršiaus, kuris toliau gali būti naudojamas hidrogelio liejimo formos gamybai. Norint pagaminti neigiamą liejimo formą (su įdubusiomis sferomis) yra pagal anksčiau aprašytą metodiką atliejamas Sylgard 184 PDMS lakštas.

Norint pagaminti teigiamą liejimo formą (su iškilusiomis ant paviršiaus sferomis) 1 mm storio polistireno lakštas ir prieš tai PDMS lakšte gautos struktūros yra užspaudžiamos popieriaus tarp dviejų stiklo plokštelių. Suvožtinis kaitintas laboratorinėje krosnelėje 20 minučių prie 155°C. Po atvėsimo iki kambario temperatūros sluoksniai yra atskiriami. Struktūros ant PDMS lieka nepakitusios, o iškilusių sferų raštas yra perneštas ant polistireno plastiko paviršiaus.

Liejant mikro- ir nanostruktūruotus hidrogelius ant vieno iš stiklų yra padedama liejimo forma su iš anksto pagamintomis mikro- arba nanostruktūromis, taip pat įdedama tarpinė, nustatanti ruošiamo hidrogelio storį. Po liejimo hidrogeliai tikrinami optiniu arba atominių jėgų mikroskopu, siekiant įvertinti perkeliamų struktūrų tikslumą bei paviršiaus defektus.

2.5.7. Mikro- ir nanostruktūruotų hidrogelių stabilumo vertinimas

Pagaminus hidrogelius su mikrostruktūromis buvo atliktas medžiagos stabilumo tyrimas. Pagaminti hidrogeliai ir naudotos PDMS formos su mikrostruktūromis buvo apžiūrėtos šviesiniu mikroskopu Olympys BX51 (Olympus, Tokyo, Japonija), naudotas 10× NA 0.3 imersinis objektyvas ir Peltier elementu aušinama Fview II CCD kamera, kartu su Stream Motion programine įranga (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Vokietija).

Mikrostruktūros ant hidrogelio paviršiaus buvo apžiūrėtos šviesos lauko mikroskopija ir išmatuotos Fiji [166] programinės įrangos pagalba. Išmatuotos struktūros ant hidrogelio paviršiaus buvo lyginamos su naudotos PDMS formos struktūrų matmenimis. Hidrogelio topografiniai bandiniai buvo matuoti iš karto po liejimo bei po 7 ir 14 dienų Dulbeko modifikuotoje Eagle

terpėje (DMEM), 37°C temperatūroje. Tai buvo atliekama siekiant patikrinti ar dėl brinkimo ir terpės medžiagų poveikio nesikeičia mikrostruktūrų matmenys. Jungo modulis taip pat buvo matuojamas po bandinių pagaminimo, po 7 ir 14 dienų DMEM, 37°C temperatūroje. Tai buvo atliekama tikrinant ar nesikeičia hidrogelio mechaninės charakteristikos laike. Taip pat buvo nustatomas vandens kiekis hidrogeliuose, po išliejimo, po 7 ir 14 dienų DMEM, 37°C temperatūroje. Vertinimas buvo atliekamas juos sveriant prieš ir po džiovinimo atlikto 60°C, 24h. Vandens kiekio apskaičiavimui naudota formulė:

$$\text{Vandens kiekis, \%} = \frac{\text{Šlapio hidrogelio masė} - \text{Sauso hidrogelio masė}}{\text{Šlapio hidrogelio masė}} * 100$$

Jungo modulio matavimai atlikti atominės jėgos mikroskopijos būdu. Nanostruktūros ant PDMS, polistireno ir hidrogelio buvo ištirtos atominiu jėgų mikroskopu (NanoWizard III, JPK Instruments, Vokietija). AFM vaizdinimui hidrogelių mėginiai buvo pritvirtinti prie (3-aminopropil)trimetoksi silanu modifikuoto stiklo paviršiaus, naudojant gliutaraldehido chemiją. Matavimai buvo atlikti fosfatinio buferinio tirpalo ir druskų (PBS) mišinyje, naudojant HQ:NSC35 AFM zondo svirtelę (Micromasch, Bulgarija) su šviesą atspindinčia aukso danga.

2.6. Hidrogelio lakštų suklijavimas

Chemiškai suklijuojant du hidrogelio lakštus tarpusavyje buvo naudojamas aktyvavimas 20 % DMTMM tirpalu, po ko hidrogeliai buvo suglaudžiami vienas prie kito, laikant 10 minučių ir vėliau plaunama PBS tirpalu. Tokiu būdu buvo formuojami mikroskopiniai kanalai ląstelių įaugimui arba makroskopinės nišos ląstelių uždarymui.

2.7. Ląstelių kultūros eksperimentai

Žmogaus odos fibroblastų ląstelių linijos BJ-5ta-GFP ir BJ-5ta buvo auginamos inkubatoriuje Binder C150 (Tuttnauer, Vokietija), aukštos drėgmės, 37°C su 5 % CO₂ palaikymu. Ląstelių auginimui buvo naudojama terpė Medium 106 (ThermoFisher Scientific) su augimo priedu skirtu beseruminei terpei. Į terpę papildomai buvo pridedamas 0,1 mg/mL streptomicino ir penicilino mišinys.

Pasibaigus eksperimentui visi mėginiai buvo fiksuojami 4 % paraformaldehido PBS tirpale, tris kartus plaunami PBS tirpalu ir tiriami

Olympus BX51 arba invertuotu Olympus IX51 optiniais mikroskopais (Olympus, Japonija) arba AFM.

2.7.1. Ląstelių proliferacijos vertinimas

Ląstelių proliferacija ant hidrogelinių substratų buvo tiriama naudojant ląstelių skaičiavimo rinkinį Nr. 8 (angl., cell counting kit 8) – CCK8 (Dojindo, Japonija). Apie 5000 žmogaus odos fibroblastų buvo sėjama ant 6 mm diametro hidrogelių. Ląstelių proliferacija buvo matuojama X, Y ir Z laiko momentais. Kiekvienu laiko momentu ląstelių auginimo terpė buvo pakeičiama 300 μ L šviežios terpės ir į kiekvieną mėginį papildomai įpilama po 30 μ L CCK8 reagento, tuomet ląstelės toliau inkubuojamos 4 val. 37°C, esant 5 % CO₂ ir 100 % drėgmei. Kaip foninio signalo kontrolė buvo naudojama ląstelių kultūrų terpė kartu su CCK8 reagentu. Optinis tankis matuotas naudojant BioTek EPOCH2 spektrofotometrą (BioTek Instruments, Winooski, VT, JAV), bangos ilgiui esant ties 450 nm.

2.7.2. Nanostruktūrų poveikio ląstelių kultūrai vertinimas

Žmogaus odos fibroblastai buvo užsėti ant hidrogelinių substratų su ant paviršiaus suformuotomis nanostruktūromis, buvo vertinamas poveikis ląstelių formai ir morfologijai. Apie 5000 žmogaus odos fibroblastų buvo sėjama ant 6 mm diametro hidrogelių, po 24 valandų ląstelės buvo fiksuotos paraformaldehidu. Fiksuotos ląstelės buvo 5 minutes permeabilizuotos 0,1 % (t/t) Triton X100 tirpalu, 30 minučių blokuojant nespecifines surišimo vietas 1 % jaučio serumo albumino (BSA) tirpalu PBS kambario temperatūroje.

Ląstelių adhezija buvo vizualizuota naudojant pirminius antikūnius prieš žmogaus vinkuliną (SPM227, Abcam). Po plovimo bandiniai buvo inkubuojami su Alexa Fluor® 488 ($\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 519$ nm) konjuguotais antrinais antikūnais (a150113, Abcam). Po plovimo F-aktinas buvo vizualizuotas naudojant Alexa Fluor® 594 faloidiną ($\lambda_{\text{ex}} = 581$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 609$ nm). Ląstelių branduoliai buvo vizualizuoti DAPI ($\lambda_{\text{ex}} = 358$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 461$ nm). Mėginiai buvo plaunami 1 % (t/t) Tween PBS ir vizualizuoti naudojant Olympus BX51. Ląstelių plotas, forma ir perimetras buvo įvertinti programine įranga CellProfiler [167]. Įvertinta ne mažiau 30 ląstelių kiekvienai modifikacijai.

2.8. Vaistinių medžiagų pralaidumo matavimai

Pralaidumo eksperimentai buvo atlikti NaviCyte vertikalios kameros sistemoje (Harvard Apparatus, Holliston, MA, JAV). Tam, kad kolageno hidrogeliai galėtų būti naudojami tokioje sistemoje buvo sukurtas ir 3D spausdintuvu pagaminamas polilaktinės rūgšties laikiklis. Pastarasis buvo užpildomas hidrogeline medžiaga ir vėliau apauginamas akies ragenos keratinocitais. Palyginimui buvo naudojamos *ex vivo* triušio akies ragenos. Pralaidumo vertinimui buvo pasirinktas vaistinės ir referencinės medžiagų rinkinys (lentelė 6).

lentelė 6 Vaistinių ir referencinių medžiagų, naudotų pralaidumo matavimams, sąrašas

Medžiaga (vaistas/referencinė molekulė)	Tiekėjas	Naudota koncentracija
6-karboksifluoresceinas (6-CF)	Sigma-Aldrich	50 μ M
Rodaminas B (Rho B)	Sigma-Aldrich	50 μ M
FITC-dekstranas, 4 kDa (FD4)	Sigma-Aldrich	50 μ M
FITC-dekstranas, 70 kDa (FD70)	Sigma-Aldrich	200 μ g/mL
Rodaminas 123 (Rho 123)	Sigma-Aldrich	10 μ M
Betaksoolis (Beta)	Cayman Chemicals	10 μ M
(+)-Pilokarpinas HCl (Pilo)	Cayman Chemicals	10 μ M
Timololio maleatas (Timo)	Cayman Chemicals	10 μ M
Chloramfenikolis (Chlora)	BioChemica, AppliChem	80 μ M
Deksametazonas (Dexa)	Cayman Chemicals	100 μ M
Brinzolamidas (Brinzo)	Cayman Chemicals	89 μ M

2.9. Kardiomiogeninė diferenciacija

Prieš ląstelių auginimą visi hidrogeliniai substratai buvo du kartus plaunami 37°C PBS ir laikomi 5 % CO₂ inkubatoriuje 30 minučių. Po plovimo jie buvo 30 minučių laikomi ląstelių augimo terpėje. Vėliau terpė išsiurbta ir hidrogeliai džiovinami 10 minučių laminariname oro sraute. Užsėjus ląsteles ant substratų, jos buvo 24 valandoms perkeltos į inkubatorių. Ląstelių gyvybingumas ir kardiomiogeninė diferenciacija buvo tiriama 14 dienų vertinant genų raišką, naudojant pasirinktus žymenys (lentelė 7).

lentelė 7 Genų raiškos vertinimui pasirinkti žymenys.

Vertintas genas	Koduojamas baltymas
ACTC1	ACTC1 koduoja širdies raumens alfa aktiną. Ši izoforma skiriasi nuo alfa aktino, kuris yra aptinkamas skeleto raumenyse [168].
TNNT2	TNNT2 genas koduoja troponiną T. Šis baltymas yra atsakingas už baltymų komplekso formavimą, kuris reguliuoja raumenų susitraukimą [169].
PTK2	PTK2 genas koduoja tirozino kinazę 2, taip pat žinomą kaip adhezijos kinazę. Tai nереceptorinė kinazė, atsakinga už ląstelės fokalinės adhezijos sąveiką su TLU [170].

2.10. Smegenėlių ląstelių kultūros

Visos eksperimentinės procedūros buvo atliktos pagal Laboratorinių gyvūnų priežiūros ir naudojimo vadovą. Buvo pasirinkta Wistar žiurkių veislė, 5-7 dienų žiurkių smegenėlės buvo susmulkintos ir inkubuojamos Versene tirpale (1:5000; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, JAV) 37 °C temperatūroje 5 minutes, po to suspenduotos Pastero pipete ir centrifuguojamos 270g 5 min. Tada nusodintos ląstelės buvo pakartotinai suspenduotos DMEM terpėje su Glutamax (Thermo Fisher Scientific), papildytu 5 % arklio serumu, 5 % vaisiaus veršelio serumu, 38 mM gliukozės, 25 mM KCl ir antibiotiku/antimikotiku (Thermo Fisher Scientific). Po to ląstelės buvo išsėtos į 96 šulinėlių lėkštelę ant hidrogelio substratų, arba į tuščius šulinėlius padengtus poli-L-lizinu. Ląstelių kultūra buvo auginama 7 dienas *in vitro* sąlygomis, po to buvo vertinamas ląstelių skaičius, ląstelių kultūros ir mikroglijos morfologija, ląstelių judrumas.

CLP-PEG hidrogeliai su mikrošulinėlių topografija buvo pagaminti kaip atspaudą naudojant komercines sferoidų auginimo lėkštes AggreWell™ 400 (STEMCELL Technologies, Canada Inc., Vankuveris, Kanada), kurių piramidės formos šulinėlio kraštinės ilgis sudarė 400 μm.

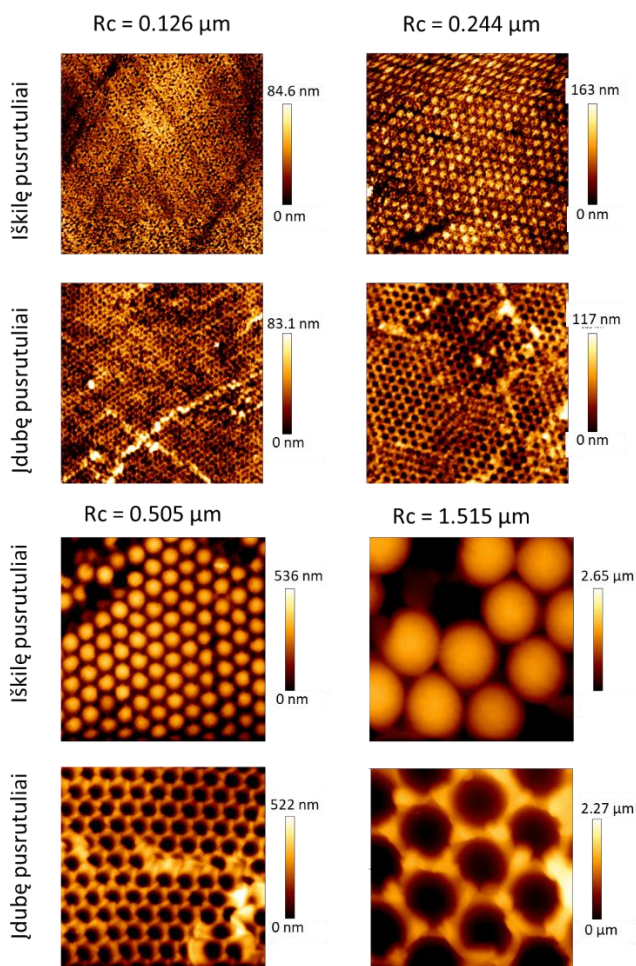
Vaizdinant ląsteles branduoliai buvo nudažyti Hoechst33342, neuronai atpažinti pagal su mikrotubulėmis susijusį baltymą MAP2, astrocitai pagal glijos fibrilinį rūgštinį baltymą GFAP. Mikroglija buvo nudažyta izolektinu GS-IB4 iš *Griffonia simplicifolia* ir AlexaFluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, JAV).

3. REZULTATAI

3.1. Kolageno hidrogelių paviršiaus nanoformavimas

Audinių inžinerijos karkaso nanoskopinė sandara yra svarbi, nes nanometriniai dydžiai gali įtakoti ląstelių adheziją, proliferaciją ir diferenciaciją, imituojant natūralias audinių sąlygas. Nanostruktūros taip pat gali pagerinti biomedžiagų efektyvumą ir paskatinti tinkamą audinių formavimąsi, todėl išlieka kaip viena iš strategijų siekiant efektyvesnių ir tikslingesnių gydymo metodų sukūrimo [171].

Siekiant įvertinti kolageno hidrogelio nanoformavimo (nanostruktūrų gamybos) galimybes, koloidinės litografijos būdu buvo sukurtos nanostruktūros ant PDMS ir polistireno paviršių, kurių išlinkimo spindulys (R_c) pasirinktas toks: 0.126, 0.244, 0.505 ir 1.515 μm . Nuo paruoštų PDMS ir polistireno paviršių buvo atlieti kolageno hidrogelio lakštai, ant kurių buvo iškilę arba įdubę submikrometriniai ir mikrometriniai pusrutuliai. Pagamintų hidrogelių paviršiai buvo įvertinti atominių jėgų mikroskopijos pagalba (pav. 22).



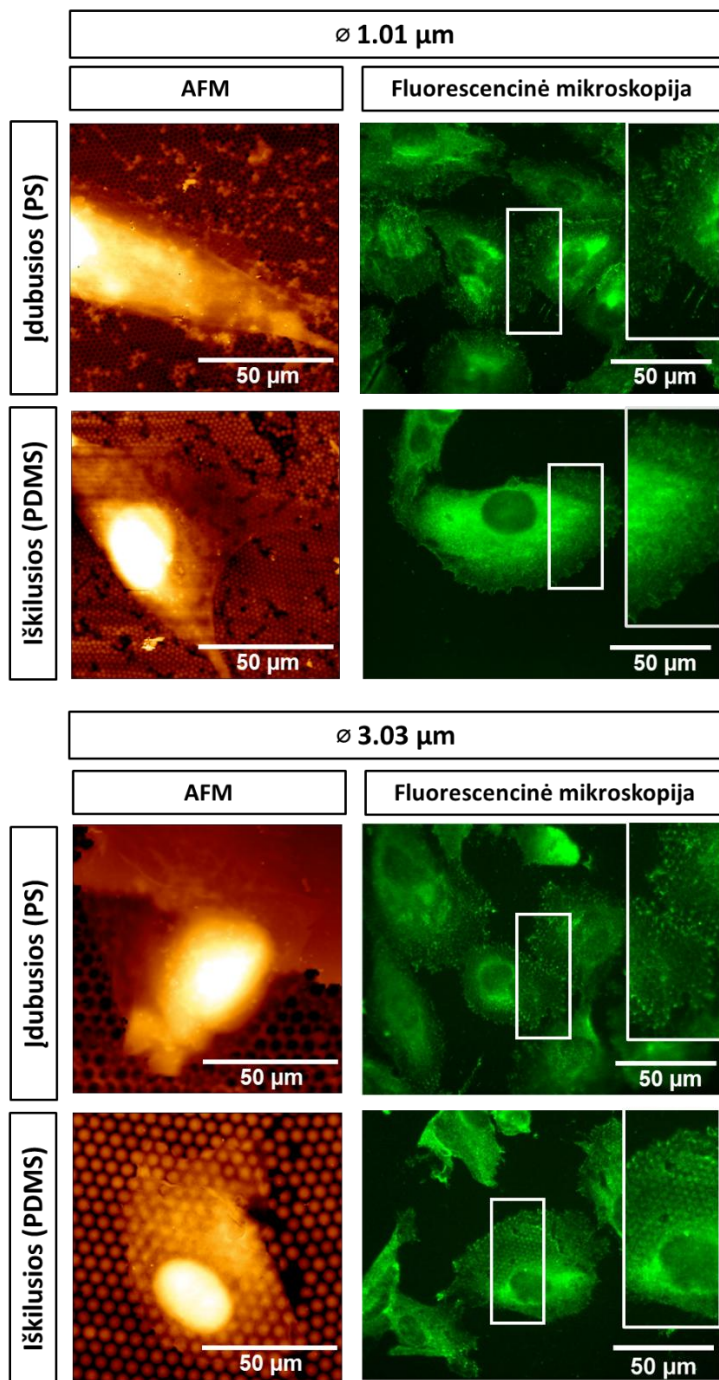
pav. 22 AFM nuskenuotas vaizdas su iškilusiomis arba įdubusiomis struktūromis. Kiekvienas gautas vaizdo laukas yra $10 \times 10 \mu\text{m}$. Vaizdas gautas naudojant QI jėgos kreivės režimą.

Paviršiaus nanostruktūros dažnai yra formuojamos ant skirtingo tipo medžiagų paviršių, tokių kaip želatina [119], silicis [172], metalai [116], [173] arba PDMS [174]. Jei tokio paviršiaus paskirtis – substratas organotipinės ląstelių kultūros formavimui, labai svarbus pasirinktos medžiagos stabilumas (bent 14 dienų ar daugiau ląstelių kultūroje, su paviršiaus topografijų išlaikymu) ir biosuderinamumas. Struktūros suformuotos ant želatinos dažnai nepasižymi stabilumu. Tuo tarpu struktūroms ant metalo ar PDMS reikia papildomų baltyminių dangų ląstelių adhezijai pagerinti ir tarpląstelinio užpildo biologiniam poveikiui atkurti. Taip pat, metalo ar PDMS karkasai

nelaidūs ir netinka, pvz., oro-skysčio sąlyčio kultūroms auginti arba uždarų ertmių formavimui.

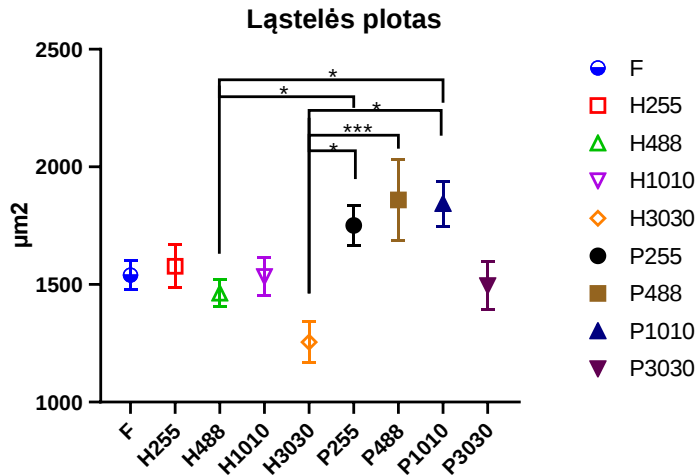
Suformuotos ant kolageno hidrogelio struktūros buvo patikrintos auginant ant jų paviršiaus žmogaus odos fibroblastus, židininės adhezijos žymėjimui buvo nudažytas vinkulino baltymas (pav. 23). Vertinant ląsteles ant struktūrų galima matyti, kad iškilusių struktūrų karkase ląstelės tvirtinasi ant sferų viršaus, įdubusių – ant suformuotos sferomis gardelės viršaus.

Vertinant AFM nuotraukas (pav. 23), galima matyti, kad ląstelės paviršius atkartoja struktūras ant substrato paviršiaus, tačiau vertinant fluorescencinės mikroskopijos nuotraukas struktūros yra matomos tik ant bandinių su didžiausiais raštais.



pav. 23 Atominės mikroskopijos ir fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, gauti auginant žmogaus odos fibroblastus ant mikrostruktūruotų paviršių. Galima matyti, kad AFM gautuose vaizduose ląstelė atkartoja paviršiaus struktūras, tačiau vaizdinant vinkuliną struktūros yra gerai matomos ant didžiausių struktūrų (Ø3,03 µm), tiek ant įdubusių, tiek ir ant iškilusių. Ant mažesnių struktūrų sąveikos nėra įžiūrimos.

Vėliau buvo analizuoti ląstelių morfologijos parametrai, siekiant įvertinti jų skirtumus priklausomai nuo paviršiaus struktūrų. Pasirinkti vertinimo parametrai buvo ląstelių užimamas paviršiaus plotas, ląstelių formos faktorius ir ląstelių perimetras.

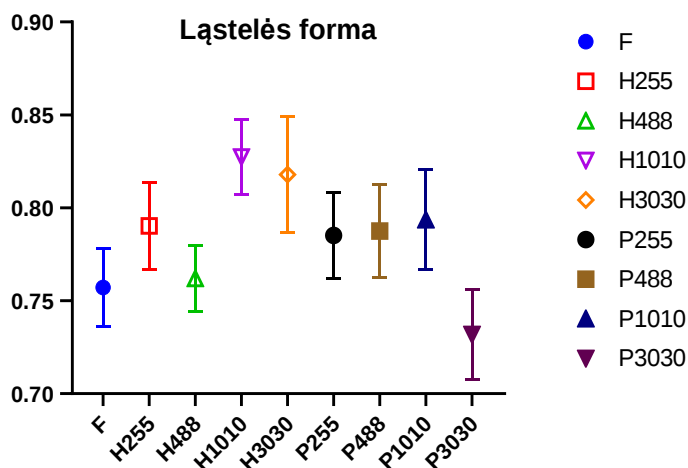


pav. 24 Ląstelės ploto vidurkis ant skirtingo tipo hidrogelio paviršiaus struktūrų. Ląstelės plotas buvo apskaičiuotas naudojant CellProfiler programinę įrangą. Ląstelės ploto vidurkis vertintas skaičiuojant taškelių kiekį ląstelėje ir konvertuojant juos į kvadratinus mikrometrus. F – plokščias hidrogelio paviršius. H – įdubusios struktūros, skaičius po raidės reiškia sferos skersmenį. P – iškilusios struktūros, skaičius po raidės reiškia sferos skersmenį nanometrais.

Analizuojant ląstelių ploto vidurkių suvestinę galima matyti, kad išsiskiria kelios pagrindinės grupės (pav. 24):

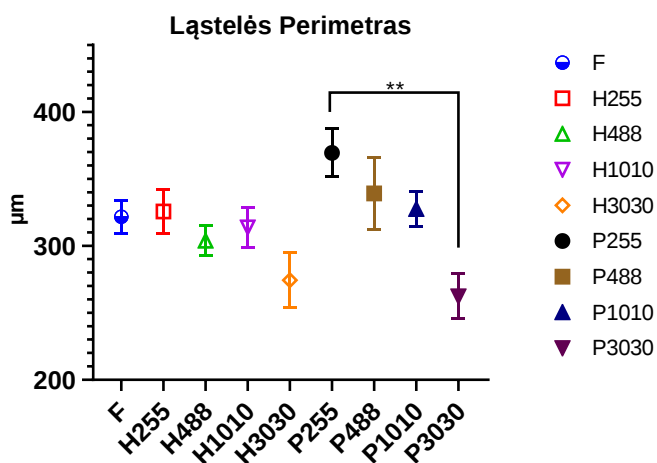
1. plokščio paviršiaus (F), H255, H488 ir H1010 bandinių grupėse fibroblastai pasiekia panašų plotą.
2. H3030 (įdubusios, didžiausios sferos) pasižymi mažiausiu ląstelių plotu.
3. P3030 (didžiausios iškilusios struktūros) paviršiuje ląstelių plotas yra artimas ląstelių plotui ant plokščių paviršių.
4. P255, P488 ir P1010 (iškilusios struktūros) nulėmė didesnę ląstelių paviršiaus plotą nei kitose bandinių grupėse.

Panašius rezultatus su panašaus dydžio struktūromis ant želatinos hidrogelių gavo Makita *et al*, kur buvo naudota Saos-2 ląstelių linija [119].



pav. 25 Ląstelės forma buvo įvertinta naudojant CellProfiler programinę įrangą. Y ašyje yra ląstelės formos koeficiento vertė, galimos vertės nuo 0 iki 1, tačiau tai kraštutiniai atvejai. Vertė 1 atitinka tiesę, o 0 yra taisyklingas apskritimas.

Buvo pastebėta, kad ląstelių forma ant struktūruotų paviršių nors ir svyruoja, tačiau išlieka artima ląstelių formai ant plokščių hidrogelių (pav. 25). Tai iš dalies gali nulemti hidrogelio paviršiaus mechaninėmis savybės-pakankamas tvirtumas.



pav. 26 Ląstelės buvo įvertintos naudojant CellProfiler programinę įrangą. Perimetras vertintas skaičiuojant taškelių kiekį ant ląstelių ribos ir perskaičiuotas į mikrometrus.

Vertinant ląstelių perimetrą buvo pastebėta, kad tarp bandinių grupių nėra statistiškai patikimų skirtumų, išskyrus P255 bandinių grupę su didžiausiu

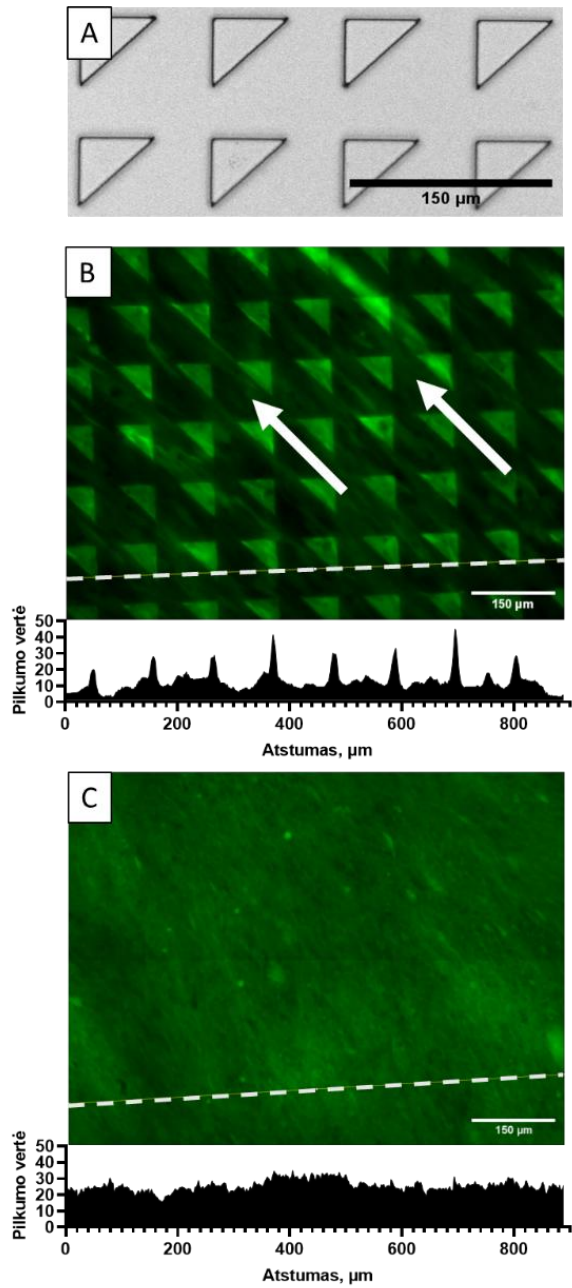
perimetro vidurkiu ir P3030 bandinių grupę su mažiausiu perimetro vidurkiu (pav. 26).

3.2. Kolageno hidrogelių paviršiaus mikroformavimas

Regeneracinės medicinos karkaso mikroformavimas yra svarbus, nes kanalų ir nišų struktūrų sukūrimas suteikia ląstelėms galimybę migruoti, jaugti, formuoti organotipinius darinius medžiagos tūryje. Tinkamai suformuotos mikrostruktūros gali būti panaudotos skatinant audinių regeneraciją, padėti atkurti natūralias jų funkcijas.

Pagamins hidrogelius su nanostruktūromis ant paviršiaus ir jas įvertinus buvo paruošti hidrogeliai su paviršinėmis mikrostruktūromis. Paviršiaus mikroformavimui taip pat buvo naudojama minkštoji litografija. Pirmajam bandymui buvo pasirinktos stačiakampių lygiašonių trikampių formos įdubusios struktūros, ant kurių vėliau buvo užsėtos žmogaus odos fibroblastų ląstelės. Po 7 dienų auginimo gauti vaizdai buvo analizuojami ImageJ programine įranga, pikselio pilkumo reikšmė buvo išmatuota trikampio kampe (matavimo linija pažymėta paveiksle). Pikselio pilkumo vertė nustatyta ant lygaus hidrogelio po 7 dienų auginimo ir palyginta su struktūruotu paviršiumi. Galima matyti, kad ląstelės noriai užpildo suformuotas trikampes ertmes. Panašius rezultatus rodė ir Yu et al[175], jų bandymuose fibroblastai užpildė duobutes suformuotas ant kolageno hidrogelio paviršiaus.

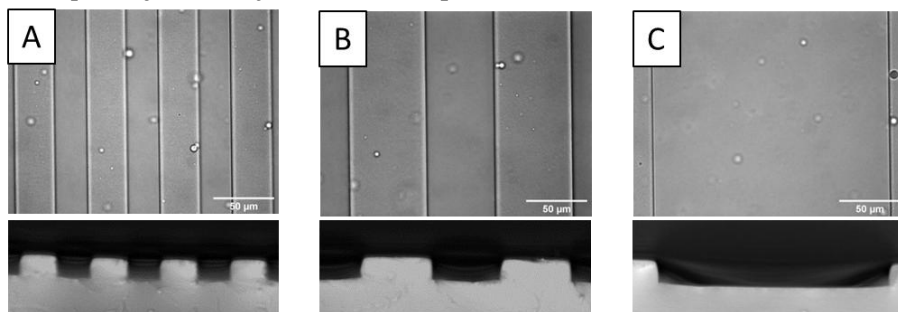
Pateiktame vaizde taip pat galima matyti, kad ląstelių kultūra lygiuojasi pagal ilgiausią trikampio kraštinę (pav. 27, rodyklės). Panašius rezultatus buvo gavęs *Vernon et al*, kai odos fibroblastai buvo auginami ant paviršiaus su grioveliais ir jie lygiavosi pagal griovelių paviršių [176].



pav. 27 Pikselio pilkumo vertės išmatuotos ant hidrogelio su mikrostruktūromis (B) ir ant plokščio hidrogelio (C), po 7 dienų žmogaus odos fibroblastų linijos auginimo. Paviršius su mikrostruktūromis buvo pagamintas minkštosios litografijos būdu, naudojant PDMS liejimo formą (A). Ant liejimo formos buvo iškilę stačiakampiai lygiašoniai trikampiai, šoninių kraštinių ilgis $50\mu\text{m}$, tarpas tarp trikampių $30\mu\text{m}$. Rodyklės parodo ląstelių lygiavimosi kryptį.

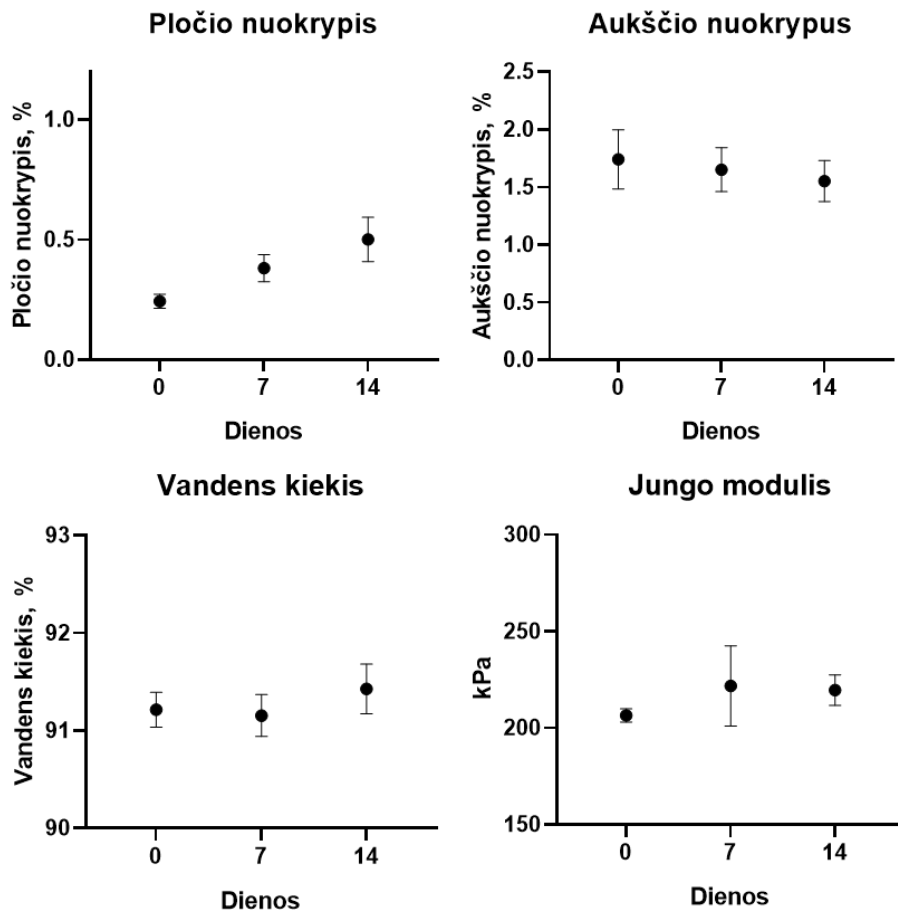
3.3. Hidrogelių stabilumo ir ląstelių proliferacijos vertinimas

Vertinant hidrogelių stabilumą ir ląstelių proliferaciją buvo pasirinkti trys skirtingi mikrostruktūrų šablonai ant kolageno hidrogelių: trijų skirtingų pločių kanalai (30, 60 ir 200 μm pločio, su tarpais tarp kanalų lygiais kanalo pločiui) (pav. 28). Hidrogelio stabilumo vertinimui buvo pasirinkta inkubacija ląstelių augimo terpėje, kurioje hidrogeliai buvo 14 dienų laikomi 37°C, 5 % CO₂ aplinkoje, imituojant ląstelių eksperimentą.



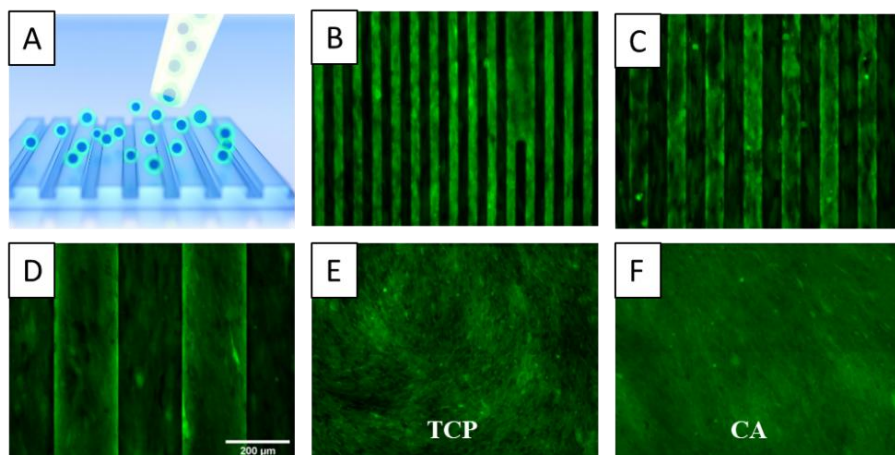
pav. 28 Pasirinktos vertinimui struktūros, su apačioje pateiktais pjūvių vaizdais. A – 30 μm pločio kanalai su 30 μm pločio tarpais. B – 60 μm pločio kanalai su 60 μm pločio tarpais. C – 200 μm pločio kanalai su 200 μm pločio tarpais.

Vertinant stabilumą, po bandinių inkubacijos buvo išmatuoti pločio ir aukščio nuokrypiai, vandens kiekis ir Jungo modulis. Aukščio arba pločio absoliutus nuokrypis visų matavimų metu buvo mažesnis nei 1 μm .



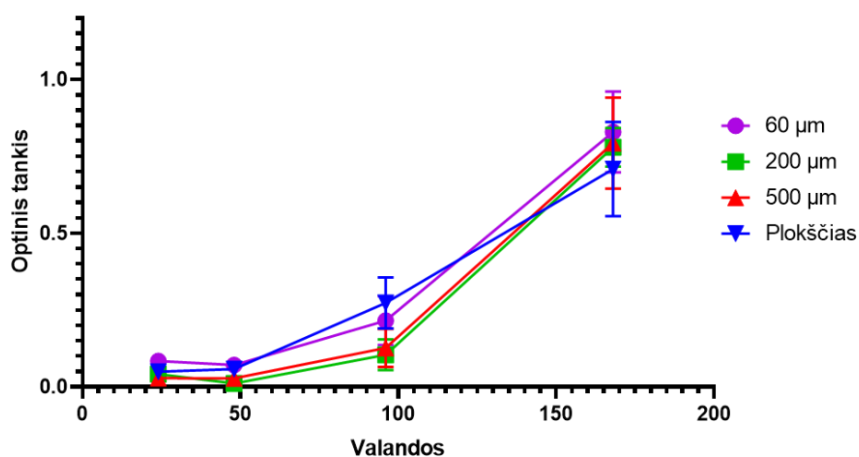
pav. 29 Kolageno hidrogelio su paviršiaus mikrostruktūromis stabilumo terpėje tyrimas. Visi parametrai buvo vertinti po inkubacijos 37°C ląstelių kultūros terpėje 14 dienų. Pločio ir aukščio nuokrypiai buvo vertinti optiniu mikroskopu. Vandens kiekis buvo nustatytas sveriant hidratuotus ir sausus bandinius. Jungo modulis nustatytas naudojant AFM.

Iš stabilumo duomenų galima matyti, kad hidrogelis išlieka stabilus mažiausiai 14 parų, be žymesnio mikrostruktūrų matmenų, standumo ar hidrogelio brinkimo pokyčio (pav. 29).



pav. 30 Žmogaus odos fibroblastų ant hidrogelių paviršiaus fluorescencinės nuotraukos. A – scheminis sėjimo proceso pavaizdavimas. Ląstelės buvo užšėtos ant skirtingus mikrošablonus panaudojant gautų hidrogelio paviršių: 30 μm (B), 60 μm (C), 200 μm (D), taip pat ant plastiko lėkštelės (E) ir ant plokščio kolageno hidrogelio paviršiaus (F).

Ląstelių proliferacija



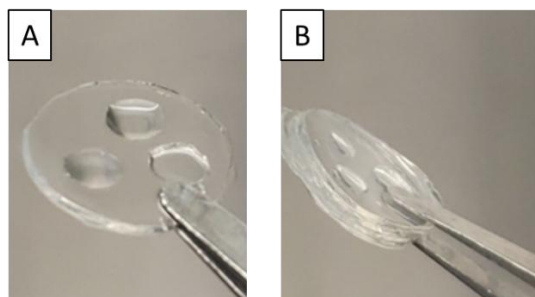
pav. 31 Ląstelių proliferacijos kreivė.

Ant mikrošablonų buvo pasėtos žmogaus odos fibroblastų ląstelės, ląstelės buvo fotografuojamos fluorescenciniu mikroskopu (pav. 30). Iš ląstelių proliferacijos grafiko galima matyti, kad paviršius su mikrostruktūromis neturi neigiamos įtakos ląstelių augimui, t.y. ląstelių proliferacijos kreivė ant struktūruotų hidrogelių yra labai panaši į augimo ant lygaus hidrogelio paviršiaus kreivę (pav. 31).

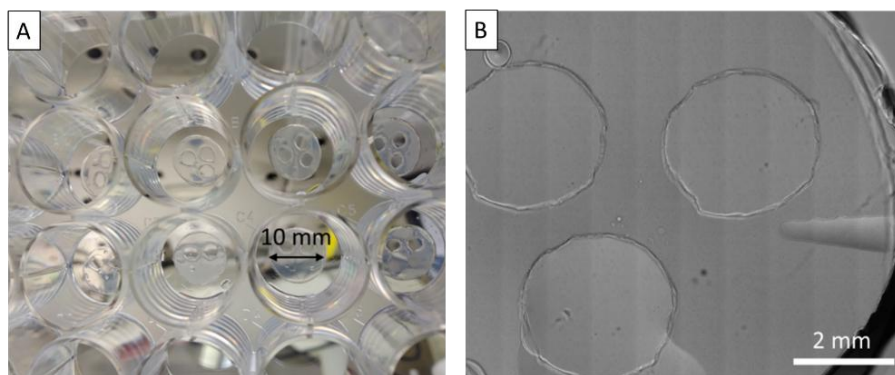
3.4. Tūrinių struktūrų formavimas kolageno hidrogelyje

Suklojant ir chemiškai susiuvant jau suformuotus kolageno hidrogelius galima gauti tūrinės struktūros- nišas ląstelių augimui. Tai buvo išnaudota gaminant uždarus makrometrinius hidrogelio šulinėlius (pav. 32, pav. 33). Hidrogelio diskelių sutvirtinimui tarpusavyje buvo naudotas 20 % DMTMM tirpalas.

Įsitikinta, kad galima pagaminti pasirinkto dydžio hidrogelinius diskus su įvairiomis ertmėmis, kurie gali būti naudojami multišulinėlių lėkštelėse.

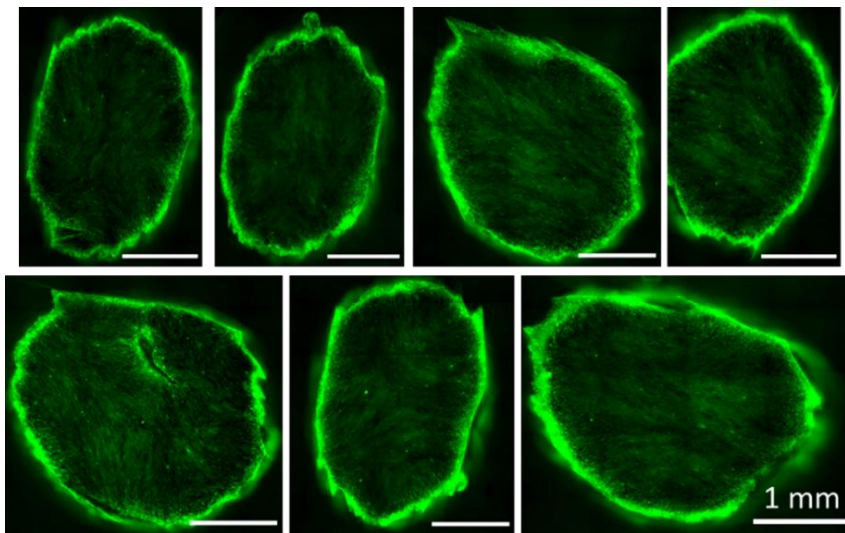


pav. 32 Hidrogelio diskelio su tūriniais šulinėliais nuotraukos. A- hidrogelio diskelis su suformuotais 3 mm skersmens tūriniais šulinėliais. B- susluoksniuotas ir susiūtas hidrogelis su uždaromis tūrinėmis ertmėmis.



pav. 33 Hidrogelis su suformuotomis apskritais šulinėliais pritaikytas multišulinėlių lėkštelės formatui. Pateikta šviesinės mikroskopijos nuotrauka (B) ir vaizdas multišulinėlių lėkštelėje (A).

Svarbu paminėti, kad viršutinis šulinėlį uždengiantis hidrogelio sluoksnis galėjo būti uždedamas tik po žmogaus odos fibroblastų ląstelių pasėjimo, o tai sukelia ląstelių kontaktą su susiuvimo agentu DMTMM. Tačiau po 7 dienų ląstelės pilnai užpildė visus šulinėlius ir neigiamo DMTMM poveikio nebuvo stebėta (pav. 34).

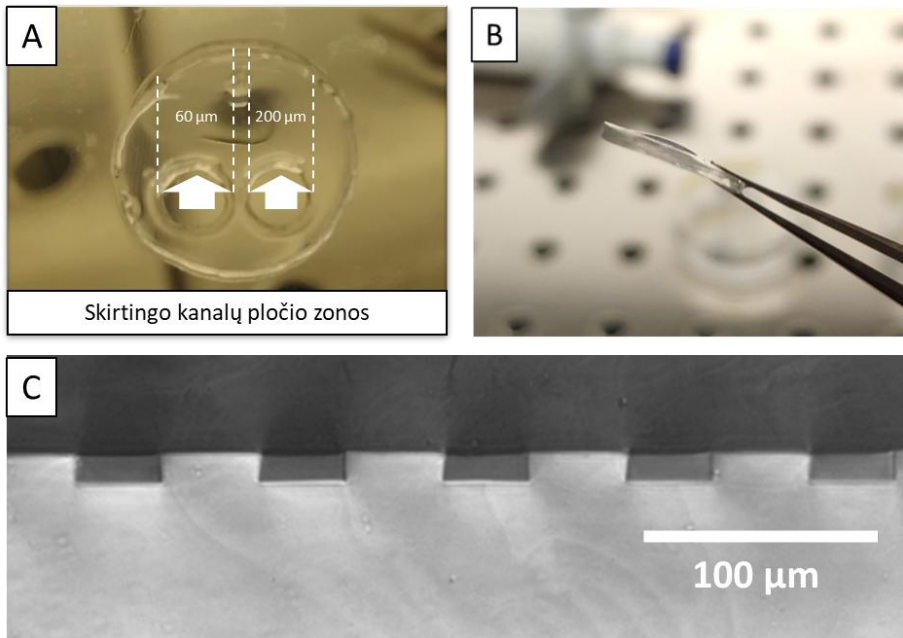


pav. 34 Fluorescencinės mikroskopijos vaizdas su makrometrinio dydžio uždaromis ertmėmis, užpildytomis žmogaus odos fibroblastais.

Hidrogelyje suformuotose ertmėse augančios ląstelės neprasiskverbė tarp hidrogelio lakštų sluoksnių, tai patvirtina efektyvų uždarų ertmių suformavimą. Ryškesni suformuotų ertmių kraštai rodo didesnę ląstelių kiekį, sankaupas kraštuose ir ląsteles augančias vertikaliai ant suformuotos sienelės.

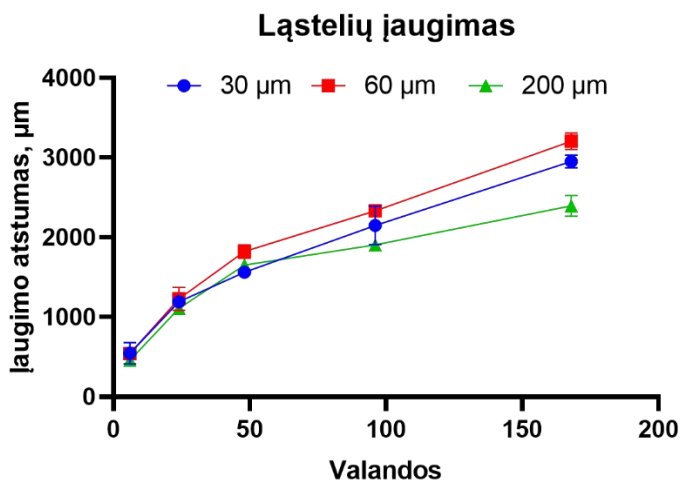
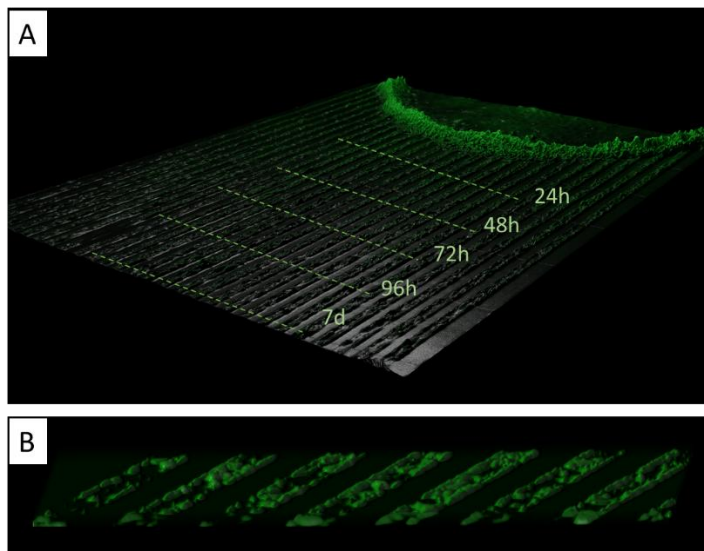
3.5. Ląstelių įaugimo modelis

Naudojant kolageno hidrogelio lakštų sluoksniavimo technologiją buvo sukurtas ląstelių įaugimo modelis. Sukurtas modelis leidžia ląsteles įsėti specialiai suformuotoje zonoje. Toliau ląstelės auga migruodamos minkštosios litografijos būdu suformuotais kanalais, esančiais kolageno hidrogelio tūryje (pav. 35). Tyrimui buvo naudotos žmogaus odos fibroblastų linijos ląstelės. Ląstelių gyvybingumas 7 dienų eksperimento eigoje nebuvo vertintas, tačiau ląstelių proliferacija kanaluose buvo panaši į gautą ant mikrogriovelių paviršiaus. Tai reikštų, kad pats hidrogelis yra pralaidus ir užtikrina maitinimo medžiagų patekimą iki ląstelių ir jų augimo metabolitų pašalinimą.



pav. 35 Ląstelių įaugimo vertinimo mikroprietaisas. Ant vieno dvisluoksnio hidrogelio konstrukto (B) gali būti skirtingo kanalų pločio zonos (A). Žemiau pateiktoje mikroskopo nuotraukoje matomas konstrukto šoninis pjūvis, vaizdinamų kanalų plotis buvo apie 60 μm, gylis apie 20 μm (C).

Atlikus 7 dienų ląstelių eksperimentą galima matyti, kad platesniais kanalais ląstelės įauga lėčiau (pav. 36). Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad didėjant atstumui tarp kanalo kampų sumažėja ir ląstelių įaugimo greitis. Panašūs rezultatai buvo gauti *Gonzalo et al*, kur ląstelės buvo auginamos ant mikrostruktūruoto PEG paviršiaus ir platesniuose kanaluose įaugimo greitis taip pat buvo mažesnis [177].

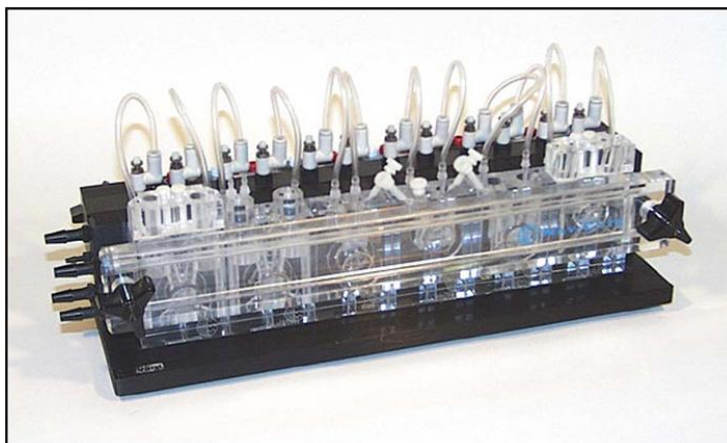


pav. 36 Iš fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos skaitmeniškai sukurtas 3D vaizdas, rodantis ląstelių jaugimą 60 μm kanaluose, su pažymėtais atstumais, kuriuos kultūra peraugo per nurodytą laiką (A). Tikras 60 μm kanalų 3D vaizdas, su ląstelių pasiskirstymu kanaluose. Žemiau pateiktas ląstelių jaugimo atstumo priklausomai nuo laiko grafikas.

Iš aukščiau pateikto grafiko galima matyti, kad jaugimas platesniuose kanaluose sulėtėja ties 96 valandomis ir 7 dienų vertinime jau matomas reikšmingas skirtumas atliekant ANOVA statistinį vertinimą (pav. 36). Akivaizdu, kad ląstelės 7 dienas gerai proliferuoja uždaruose kanaluose, o jas supantis hidrogelis užtikrina maistinių medžiagų transportą iki ląstelių kultūros bei metabolitų šalinimą. Tokio tipo jaugimo modelis gali būti naudojamas vertinant vėžinių ar imuninių ląstelių migraciją, kraujotakos sistemos formavimąsi, nervinio audinio regeneraciją ir kitus procesus [178].

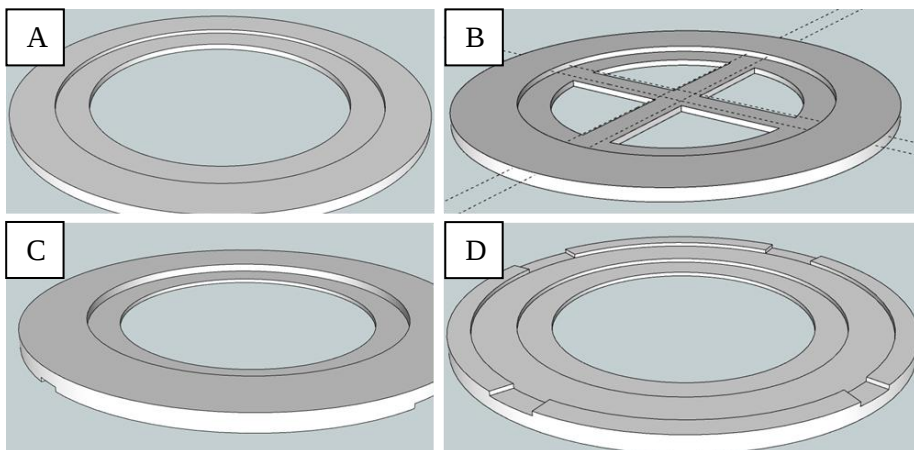
3.6. Akies ragenos pralaidumo modelis

Tyrimo, kuris vykdytas bendradarbiaujant su įmone Experimentica Ltd (Suomija), tikslas buvo sukurti dirbtinį ragenos pralaidumo tyrimų modelį. Jo pagrindiniai komponentai buvo kolageno hidrogelio membrana, su jos paviršiuje užaugintu vientisu, tankiu akies ragenos epitelio ląstelių sluoksniu. Siekta modelį patikrinti kaip galimą alternatyvą *ex vivo* triušių ragenoms vaistinių medžiagų pralaidumo matavimuose. Buvo tiriamas pralaidumas skirtingų fizikocheminių sąvybių molekulėms, tarp junginių buvo ir oftalmologijoje naudojamų vaistinių medžiagų. Hidrogelio su ląstelių sluoksniu modelio pralaidumas buvo lyginamas su triušio ragenos, kaip dabartinio standartinio tyrimų modelio, pralaidumu.

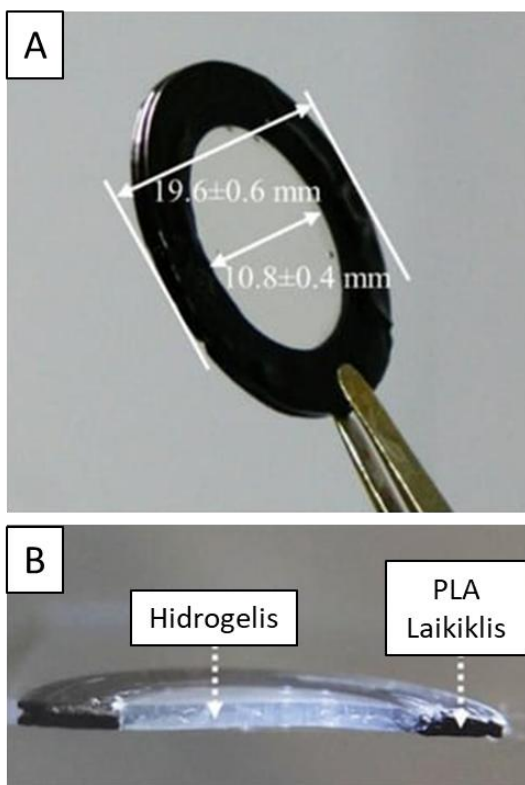


pav. 37 Naudotas pralaidumo matavimo prietaisas NaviCyte vertikalios kameros sistemoje, Harvard Apparatus, Holliston, MA, JAV.

Tam, kad kolageno hidrogeliai galėtų būti naudojami pralaidumo tyrimo kameroje (pav. 37) buvo sumaketuoti ir išbandyti specialios formos PLA laikikliai, pagaminti 3D spausdinimo būdu (pav. 38). Juose buvo suformuotas kolageno hidrogelio sluoksnis (pav. 39). Pasirenkant tinkamą laikiklį vertintas hidrogelio formavimo patogumas, bei konstrukcijos patvarumas matavimus atliekant NaviCyte sistemoje. Atlikus keletą bandymų buvo nutarta naudoti paprasčiausią laikiklio konstrukciją (pav. 38, A).



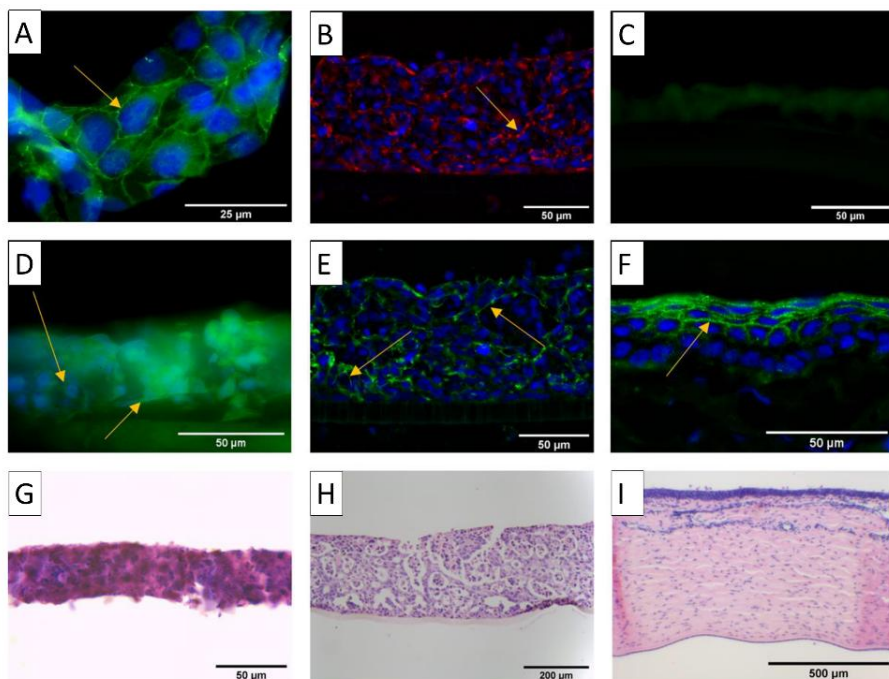
pav. 38 Išbandytos skirtingos laikiklio versijos, į kurias buvo liejami kolageno hidrogeliai.



pav. 39 Hidrogelio ir plastikinio laikiklio konstruktas (A), tinkamas ląstelių kultūrų auginimui. Hidrogelio ir laikiklio skerspjūvis (B).

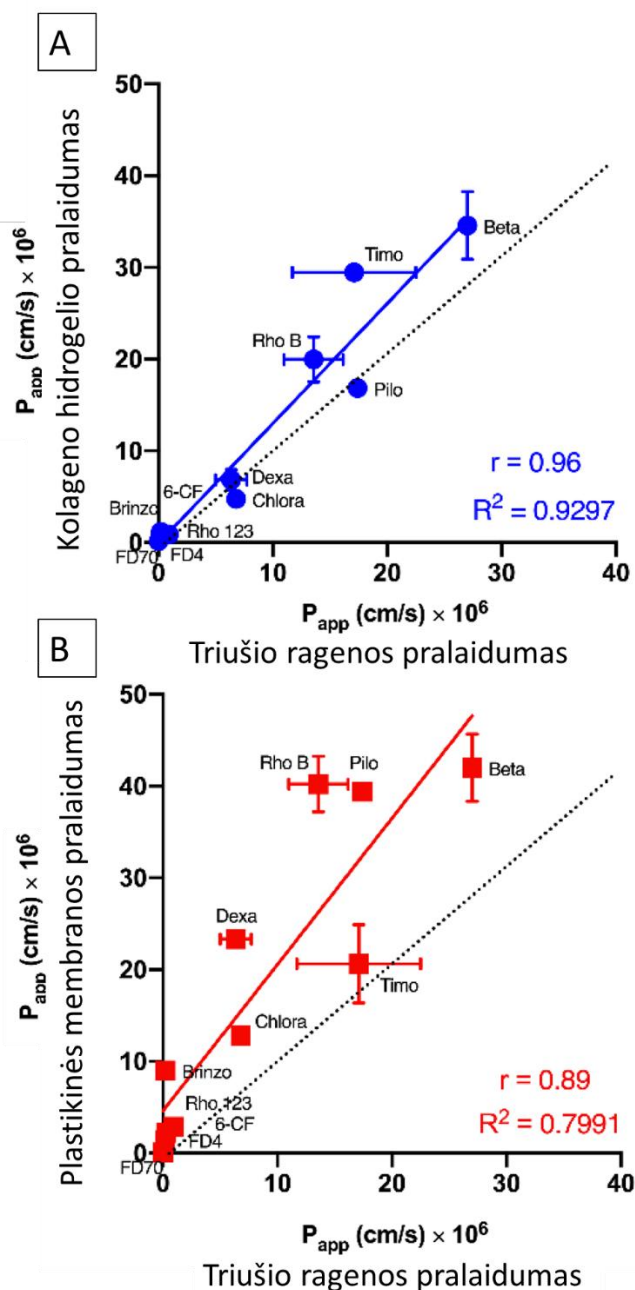
Iš žemiau pateiktų histologijos (pav. 40) nuotraukų galima matyti, kad ir ragenos ląstelės augintos ant plastikinės membranos, ir ląstelės augintos ant kolageno hidrogelio suformuoja daugiasluoksnį epitelį, bei gamina ZO-1 baltymą ir okludiną, atsakingus už glaudžiųjų jungčių tarp akies ragenos

epitelio ląstelių suformavimą. Epitelio glaudžiosios jungtys yra svarbios ragenos pralaidumui, t.y. medžiagų skvarbai per rageną [179].



pav. 40 *In vitro* ragenos modelių ir triušio ragenos histologinis ir imunohistocheminis tyrimas. Žmogaus akies ragenos epitelįje nudažytas ZO-1 baltymas (žalia spalva), auginant ant kolageno hidrogelio (A) ant plastikinės membranos ZO-1 baltymas (raudona spalva) (B), taip pat atliktas kontrolinis ZO-1 baltymo dažymas auginant ant kolageno hidrogelio (C). Imunofluorescencinis okludino dažymas (žalia spalva) ant kolageno hidrogelio (D), ląstelių augintų ant plastiko membranos (E), triušio *ex vivo* ragenoje (F). Ląstelių branduoliai nudažyti mėlyna spalva (A – F). Geltonos rodyklės nurodo glaudžiųjų jungčių formavimosi vietas. Hematoksilinu ir eozinu nudažyti žmogaus akies ragenos epitelio auginto ant kolageno hidrogelio pjūvis (G), auginto ant plastikinės membranos įdėklo (H) epitelio pjūvis, *ex vivo* triušio ragenos (I) pjūvis.

Žemiau pateikti tiriamųjų medžiagų pralaidumo per kolageno hidrogelio-ragenos epitelio ir plastikinės membranos-ragenos epitelio modelius duomenys (pav. 41). Šios vertės lyginamos su triušio ragenos, kaip standartinės sistemos, pralaidumo vertėmis.



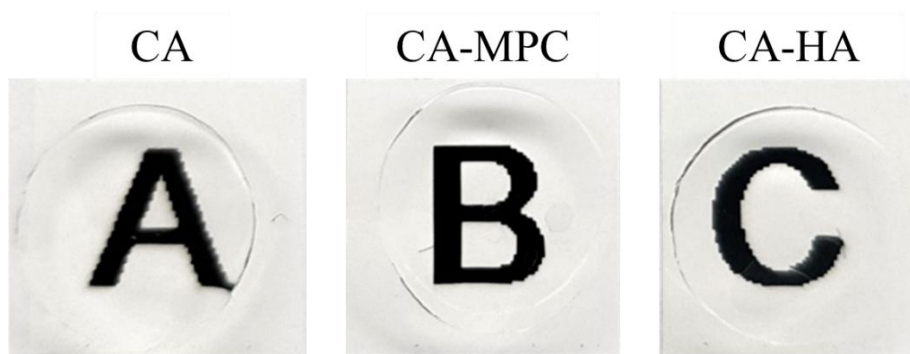
pav. 41 Sukurto akies ragenos pralaidumo modelio (A), ląstelių daugiasluoksnio užauginto ant plastikinės membranos įdėklo (B) ir triušio akies ragenos tiesinė tiriamų medžiagų pralaidumo koeficiento $P_{app} (cm/s) \times 10^6$ regresija. Pearsono koreliacijos koeficientai (r) in vitro ragenos modeliui ir ląstelių kultūros įdėkluose auginamomis ląstelėmis buvo, atitinkamai, 0,96 ir 0,89. Punktyrinės linijos paveiksluose rodo tobulą koreliaciją ($r = 1$). Determinacijos koeficientas (R^2 reikšmė) apibūdina, kaip gerai sukurta ragenos modelis atitinka triušio ragenos pralaidumo vertes.

Palyginus koreliaciją galima matyti, kad kolageno hidrogelio-ragenos epitelio sistema geriau atitinka triušio akies ragenos pralaidumo vertes, lyginant su komercinės plastikinės membranos-ragenos epitelio sistema.

3.7. Kardiomiogeninė diferenciacija ant bioimitacinių hidrogelių

Bendro tyrimo, atlikto su Inovatyvios medicinos centru ir Vilniaus Universiteto Medicinos Fakulteto, tikslas buvo įvertinti iš sveiko ir patologinio (sergančiųjų dilatacine kardiomiopatija) žmogaus širdies audinio išskirtų miokardo mezenchiminių stromos ląstelių (mMSL) kardiomiogeninę diferenciaciją. Ankstesnių studijų metu buvo nustatyta, kad ląstelės gerai auga ant I tipo kolagenu dengtų plastikinių lėkštelių, tad kaip bioimitacinis paviršius buvo pasirinkti kolageno hidrogeliai (pav. 42):

- 1) I-tipo kolageno hidrogelis (CA)
- 2) I-tipo kolageno hidrogelis modifikuotas fosforilcholinu (CA-MPC)
- 3) I-tip kolageno hidrogelis modifikuotas hialurono rūgštimi (CA-HA)



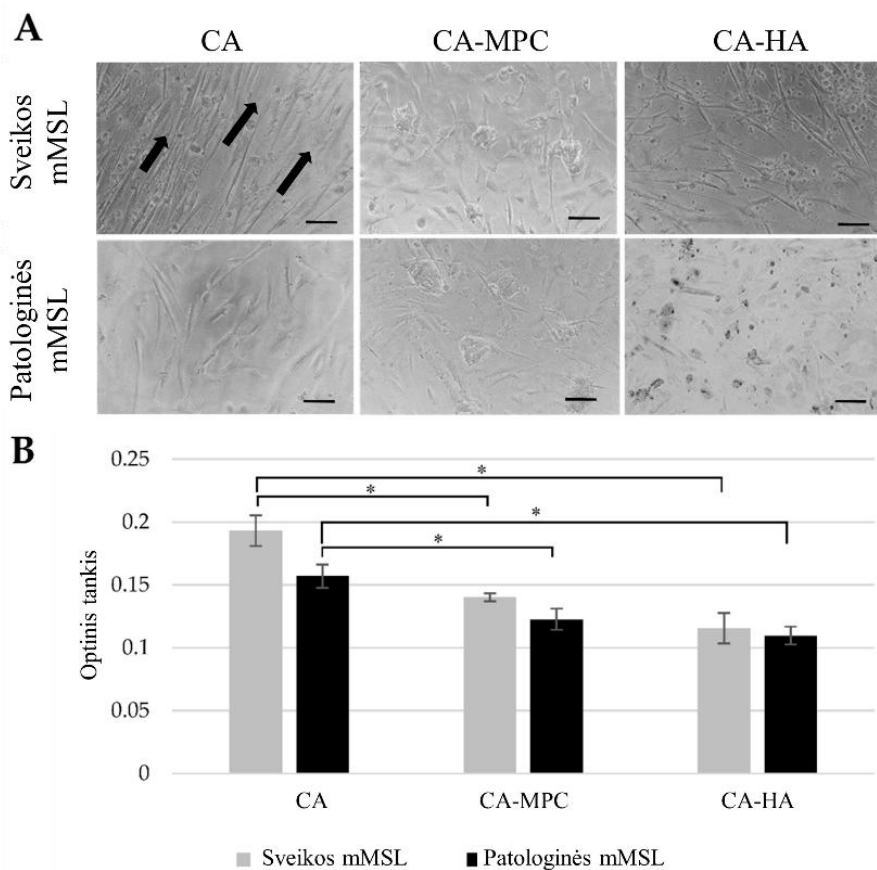
pav. 42 Pagamintų hidrogelių vizualinis skaidrumo vertinimas.

Suformuoti hidrogeliai buvo vertinti matuojant vandens kiekį, Jungo modulį (lentelė 8) ir vizualiai vertinant skaidrumą. Didžiausias Jungo modulis ($140,28 \pm 7,20$ kPa) buvo nustatytas matuojant CA hidrogelį, kurio teorinis kolageno kiekis 8,5 %. Kolageno hidrogeliai su MPC ir HA turėjo atitinkamai mažesnes vertes: $96,09 \pm 13,19$ kPa ir $113,02 \pm 35,05$ kPa. Turintis 0,05 % (m/m) HA kolageno hidrogelis išbrinko, tai buvo galima matyti iš vandens kiekio ir standumo matavimo. Vertes gautas CA-MPC hidrogeliui galima paaikškinti mažesniu kolageno kiekiu mišinyje, 6,5 % (m/m) vietoje 8,5 % (m/m).

lentelė 8 Pagamintų hidrogelių standumo ir vandens kiekio vertinimo rezultatai.

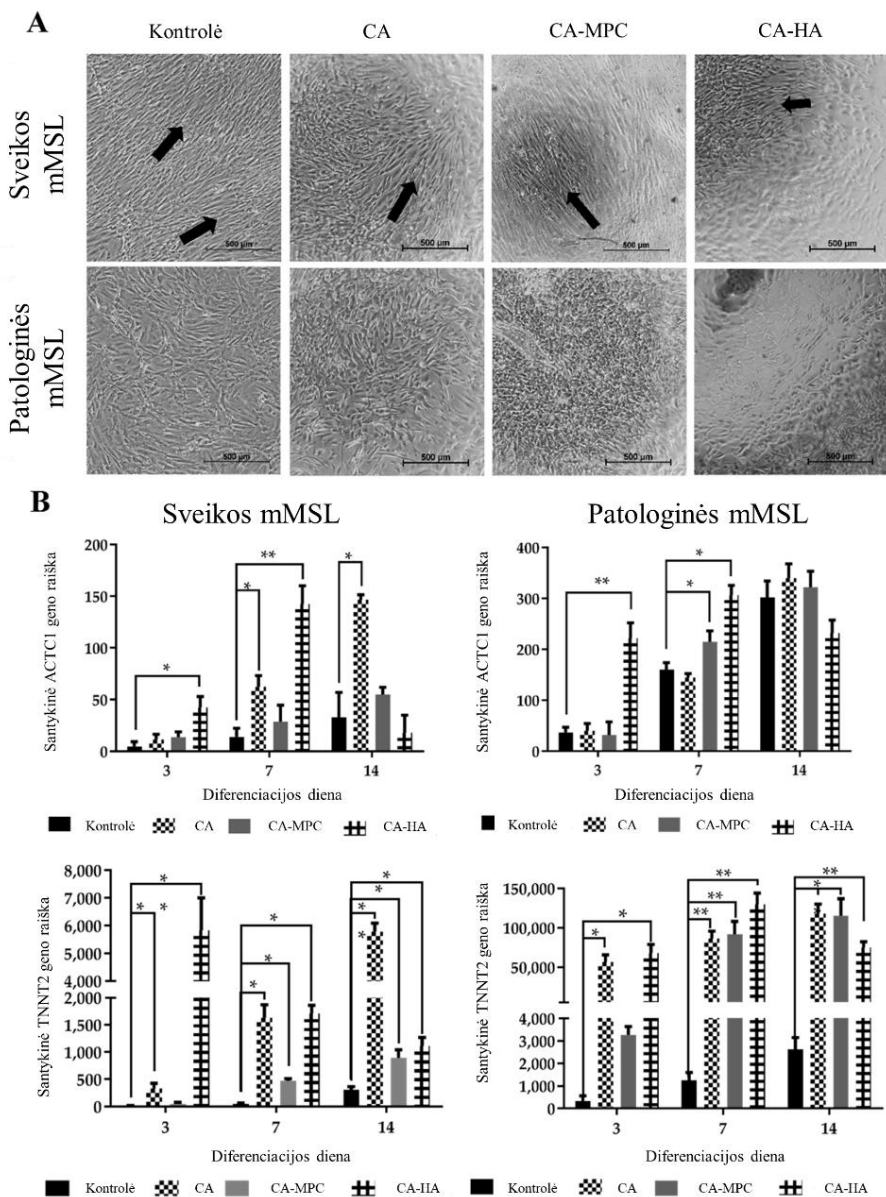
Hidrogelio tipas	CA	CA-MPC	CA-HA
Vandens kiekis, %	92,51 ± 0,12	94,71 ± 0,41	93,06 ± 0,12
Jungo modulis, kPa	140,28 ± 7,20	96,09 ± 13,19	113,02 ± 35,05

Išskirtos sveikos ir patologinės mMSL buvo augintos ant hidrogelių paviršių 24 valandas, buvo atliktas ląstelių gyvybingumo vertinimas naudojant CCK8 rinkinį (pav. 43). Buvo pastebėta, kad ant kolageno hidrogelio be modifikacijų ląstelės geriau prikibo prie paviršiaus, ir net galima buvo stebėti sveikų mMSL ląstelių išsilygiavimą (parodyta rodyklėmis). Taip pat galima pastebėti, kad sveiko audinio ląstelės rodė geresnę adheziją prie paviršiaus nei patologinio audinio ląstelės.



pav. 43 Šviesinės mikroskopijos nuotraukose matomas sveikų ir pataloginių mMSL ant skirtingų kolageno hidrogelio modifikacijų palyginimas (A). CCK8 absorbcija po 24 valandų ląstelių auginimo, su matomais ženkliais skirtumais tarp skirtingų hidrogelių grupių (B). Mastelio juostos ilgis 100 μ m.

Histonų deacetilazių (HDAC) aktyvumas pataloginėse mMSL ląstelėse yra didesnis nei sveikų ląstelių. Šių kamieninių ląstelių diferenciacijai į kardiomiocitus *in vitro*, kaip galimai dilatacinės kardiomiopatijos gydymo strategijai, buvo pasitelkti HDAC inhibitoriai, pagal kitų autorių duomenis turintys kardiomiogeninį poveikį [180]. Mūsų tyrime buvo naudotas HDAC inhibitorius suberoilanolido hidroksamo rūgštis (SAHA), o kardiomiogeninei diferenciacijos vertinimui buvo kiekybiškai matuojama alfa širdies raumens aktino (alpha Cardiac Muscle Actin - ACTC1) ir širdies troponino (cardiac troponin - TNNT2) genų raiška. Tai baltymai, kurie rodo kardiomiogeninės diferenciacijos laipsnį, t.y. jų gausėja formuojantis pilnavertiškam širdies raumeniui.



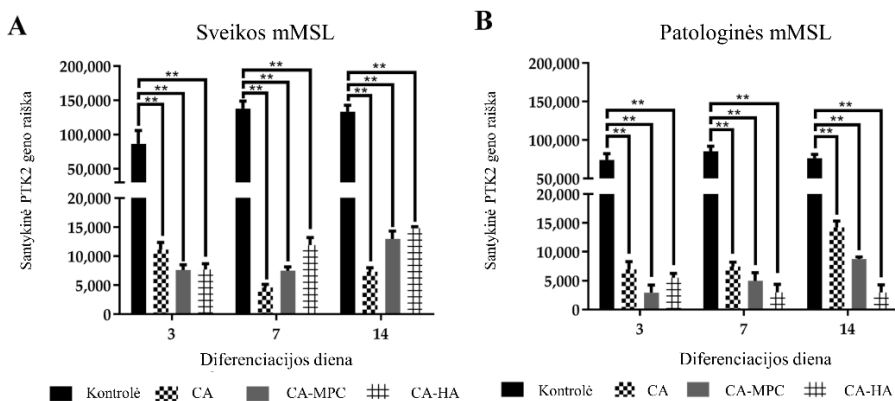
pav. 44 ACTC1 ir TNNT2 genų raiška sveikose ir pataloginėse mMSL, esant 1 μ M SAHA poveikiui, eksperimentas atliekamas 14 dienų (matavimai 3, 7 ir 14 diena). Ląstelių morfologija buvo vertinta optiniu mikroskopu 14 augimo dieną, rodyklės vaizduose pažymi zonas su susilygiavusiomis ląstelėmis (A). Genų raiškos duomenys pateikti sveikų ir pataloginių ląstelių, ACTC1 ir TNNT2 genų (viršuje ir apačioje) ant skirtingų kolageno hidrogelių ir plastiko kontrolės (B).

Ant skirtingų hidrogelių galima matyti skirtingus ACTC1 geno raiškos rezultatus, aukščiausia šio geno raiška lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis buvo stebima ant kolageno su hialurono rūgštimi (CA-HA) tiek sveikose, tiek

ir patloginėse ląstelėse 7-ą augimo dieną. ACTC1 geno raiška visais atvejais buvo didesnė patloginėse ląstelėse (pav. 44).

Panaši tendencija buvo stebima vertinant TNNT2 geno raišką, kai 3, 7 ir 14-ą dieną vertinto geno raiška buvo patikimai didesnė ant kolageno su hialurono rūgštimi hidrogelio. Kiti hidrogelio variantai irgi patikimai didino TNNT2 geno raišką priklausomai nuo poveikio trukmės ir ląstelių tipo. Abiejuose ląstelių tipuose žemiausia TNNT2 geno raiška buvo stebima kontrolinėse ląstelėse, augintose ant plastiko paviršiaus (pav. 44).

Apibendrinant, abiejų kardiomiogeninės diferenciacijos žymenų raiška yra aktyvesnė patloginio miokardo ląstelėse, kas reikštų tam tikrą regeneracijos potencialą esant tinkamai stimuliacijai.



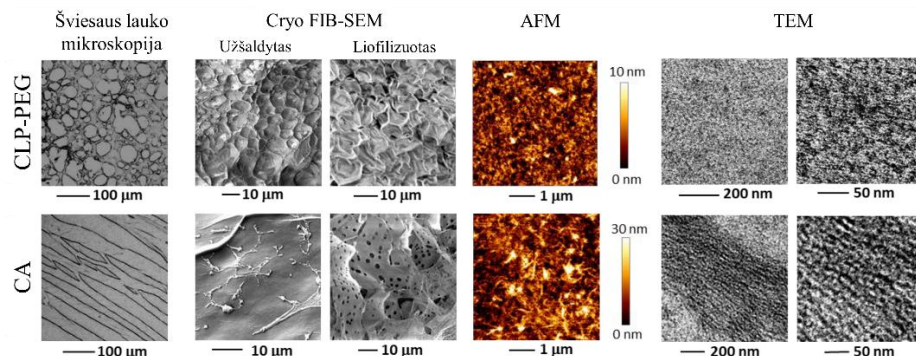
pav. 45 PTK2 geno raiška sveikose (A) ir patloginėse (B) mMSL, esant $1 \mu\text{M}$ SAHA poveikiui, eksperimentas atliekamas 14 dienų (matavimai 3, 7 ir 14 dieną).

Galima matyti, kad PTK2 geno raiška visais atvejais ant plastiko paviršiaus yra didesnė nei ant kolageno hidrogelio ir kolageno hidrogelių su modifikacijomis. Tai gali būti paaiškinta labai skirtingais mechaniniais parametrais, plastiko paviršiaus Jungo modulis yra ~ 100 didesnis. Todėl plastikas yra iš esmės kitokia medžiaga, lyginant su minkštų audinių TLU (pav. 45).

Apibendrinant galima daryti išvadą, kad naudojant kolageno ir modifikuotus kolageno hidrogelius stebima teigiama kardiomiogeninė diferenciacija, su didėjančia pasirinktų genų raiška, kai hidrogeliai yra naudojami kartu su HDACI inhibitoriumi SAHA. Taip pat galima matyti, kad patloginėse ląstelėse taip pat stebima teigiama dinamika, kas reikštų, kad tokie hidrogeliai gali būti tinkami ir kaip regeneracinės medicinos įrankis.

3.8. Smegenėlių ląstelių kultūra ant sintetinių ir natūralios kilmės bioimitacinių hidrogelių

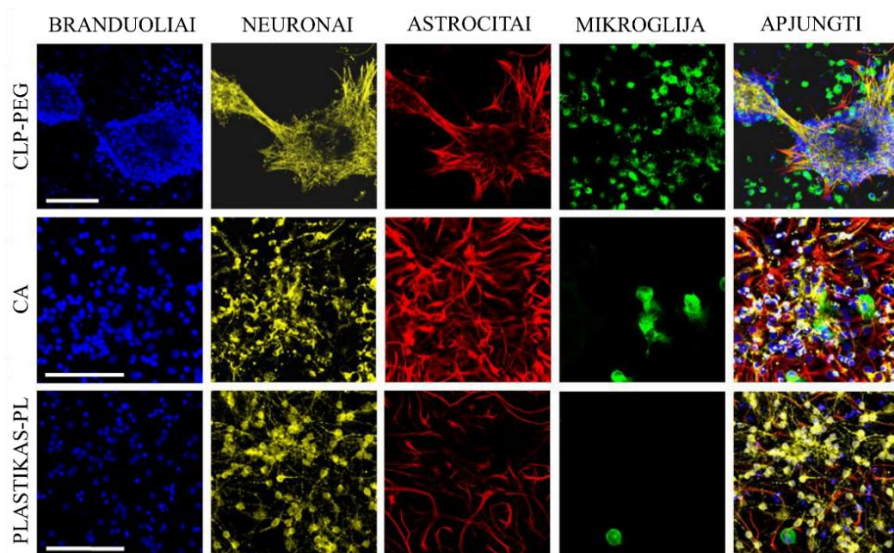
Šio tyrimo, atlikto bendradarbiaujant su Lietuvos sveikatos mokslų universitetu, metu buvo palyginti kolageno (CA) ir kolageną imituojančių peptidų konjuguotų su PEG hidrogeliai (CLP-PEG), kaip substratai pažangioms nervinio audinio kultūroms ir modeliams. Prieš pradedant ląstelių tyrimus buvo išbandyti skirtingi mikroskopavimo būdai charakterizuojant plokščią medžiagos paviršių (pav. 46).



pav. 46 CA ir CLP-PEG hidrogelių paviršiaus charakterizavimas skirtingais vaizdinimo būdais mikro ir nano skalėje.

Iš paviršiaus vaizdinimo galima matyti, kad nanometrinėje skalėje CLP-PEG paviršius yra lygesnis ir tankiau supakuotas, lyginant su kolageno gijomis kolageno hidrogelyje. Iš TEM vaizdų galima matyti, kad kolageno hidrogelyje yra keliolikos mikrometrų ilgio gijos, tuo tarpu CLP-PEG hidrogelyje gijos nesiekia šimtų nanometrų.

Ant šių hidrogelio karkasų buvo sėjama smegenėlių ląstelių suspensija ir auginama kaip aprašyta Metodų skyriuje. Buvo vertinamas augančių kultūrų panašumas į smegenų audinį *in vivo*, ieškoma tipinių neuronų ir glijos ląstelių biožymenų.

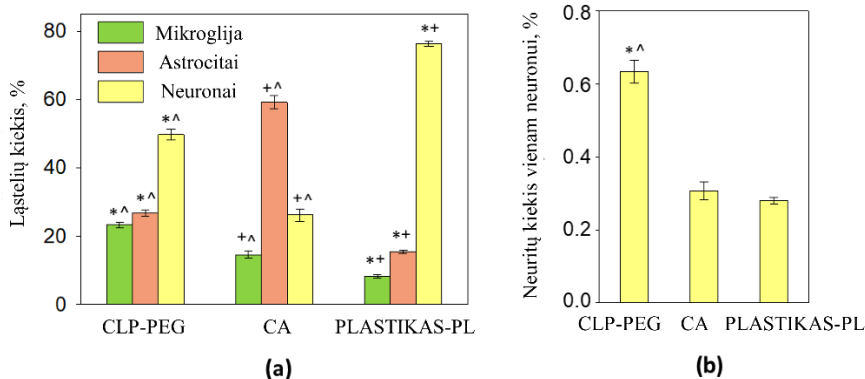


pav. 47 *Smegenėlių ląstelių kultūrų fluorescencinės mikroskopijos vaizdai po septynių dienų auginimo ant skirtingų substratų (CLP-PEG, CA ir plastikas dengtas polilizinu). Ląstelių branduoliai nudažyti mėlyna spalva (Hoechst33342 dažas), neuronai geltona (dažytas MAP2 baltymas), astrocitai raudona (GFAP baltymas), mikroglėja žalia spalva (izolektinas GS-IB₄). Mastelio juostos ilgis 100 μ m.*

Iš aukščiau pateikto vaizdo (pav. 47) galima matyti, kad ant kolageno hidrogelio neuronų tinklas yra prastai išsivystęs, neuritai yra trumpi, ląstelės atrodo susitraukusios. Priešingai, neuronai auginami ant CLP-PEG formuoja sferoidinius darinius bei ilgus aksonus.

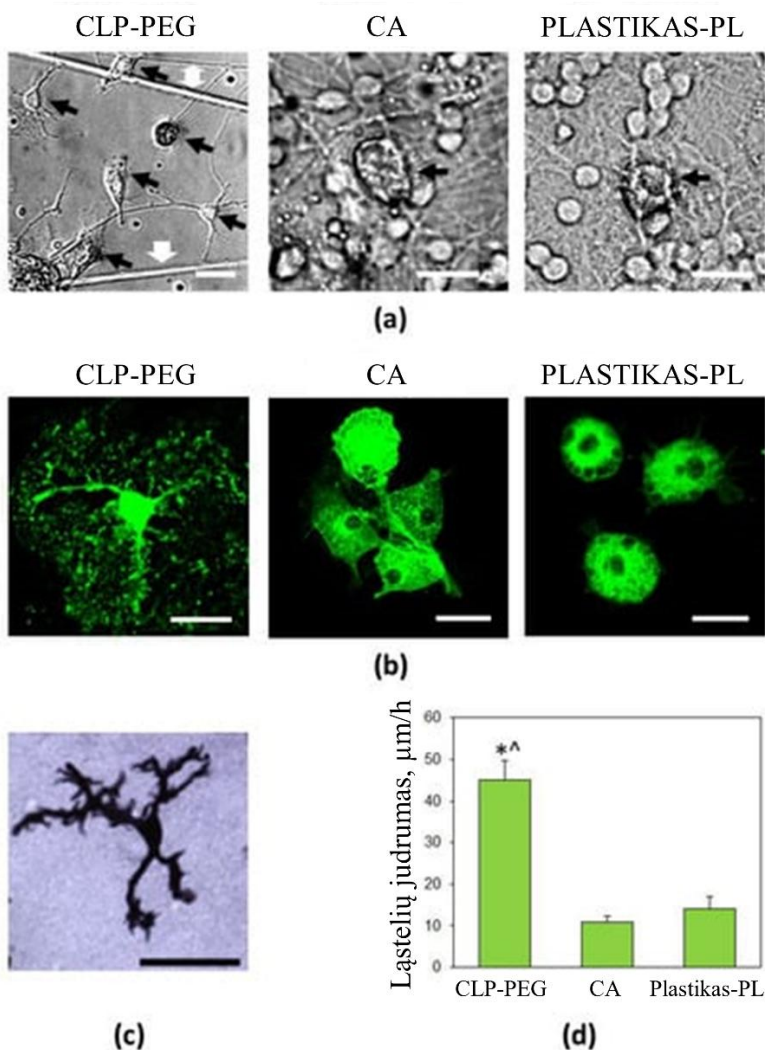
Taip pat galima matyti, kad astrocitų tinklas ant kolageno hidrogelio yra gerai išsivystęs. Astroцитai ir neuronai išsidėstę šalia, kas reikštų komunikaciją tarp ląstelių. Ant plastiko astrocitų mažiau, ir astrocitų bei neuronų kolokalizacija atrodo atsitiktinė. Mikroglijos ląstelės stambios, jų matoma labai nedaug tiek kolageno, tiek ant plastiko paviršiaus, jų forma apvali arba beveik apvali. Tuo tarpu ant CLP-PEG mikroglijos daug ir ląstelės nedidelės.

Kiekybinis ląstelių kiekio vertinimas parodė, kad neuronai sudarė beveik 50 % visų ląstelių ant CLP-PEG hidrogelio ir beveik 80 % ląstelių ant plastiko, o ant kolageno hidrogelio neuronai sudarė 30 % ląstelių. Mikroglijos ir astrocitų kiekis ant CLP-PEG buvo panašus, tačiau ant kolageno hidrogelio astrocitai sudarė 60%, kai mikroglėja sudarė tik 15 %. Ant polilizinu dengto plastiko mikroglėja ir astrocitai sudarė, atitinkamai, 16 % ir 8 %.



pav. 48 Smegenėlių kultūros ląstelių tipų sudėtis (a) ir neuritogenezė (b) ant CLP-PEG, CA hidrogelių ir plastiko dengto polilizinu.

Iš neuritogenezės, t.y. neuronų šakojimosi, duomenų (pav. 48) matyti, kad aksonų (neuritų) plotas vienam neuronui yra ženkliai didesnis ant CLP-PEG nei ant kolageno ar dengto plastiko paviršiaus. Galimai toks rezultatas buvo gautas dėl didelio neuronų tankio ant paviršiaus, tai sąlygoja nedidelį atstumą tarp neuronų ir nepalieka erdvės formuotis aksonams. Apibendrinant, smegenėlių ląstelių mišinio kultūra ant CLP-PEG formavo sferoidines struktūras sujungtas neuritų-astrocitų gijomis, apsuptas mikroglijos. Ant kolageno hidrogelio ar plastiko toks efektas nebuvo stebimas. Tokie sferoidai, kur ląstelių morfologija, santykis ir kiekis primena smegenų struktūras, gali tapti organomimetiniais *in vitro* modeliais, skirtais tyrinėti įvairias patologines situacijas, tikrinti diagnostines ir terapines strategijas.



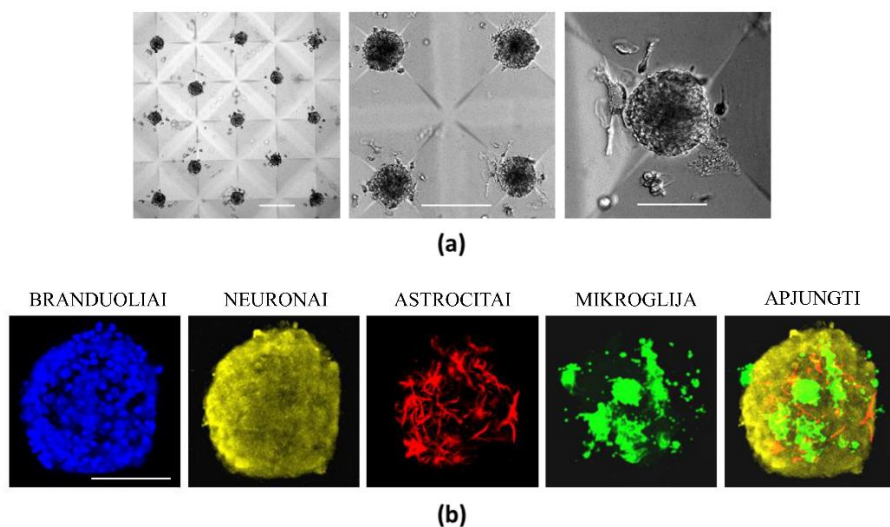
pav. 49 Mikroglijos morfologija ir judrumas ant CLP-PEG, kolageno ir plastiko dengto polilizinu. Šviesos lauko mikroskopijos nuotraukose (a) galima matyti septynias dienas augintą mikroglijų smegenėlių kultūroje. Juodos rodyklės nurodo mikrogliją, baltos rodyklės neuritų gijas. Fluorescencinėse nuotraukose (b) vizualizuota mikroglijos kultūra po 7 dienų auginimo. Palyginimui pateiktas mikroglijos ląstelės vaizdas (c) 12 postnatalinę dieną [181]. Visų mastelio juostų ilgis $25\mu\text{m}$. Grafike (d) kiekybiškai įvertintas mikroglijos ląstelių judrumas.

Stebint smegenų mikroglijos ląstelių augimą ant skirtingų paviršių (pav. 49), t.y. ant CLP-PEG ir CA hidrogelių bei plastiko, galima matyti esminius skirtumus:

- ant CLP-PEG augintos mikroglijos ląstelės buvo judresnės;
- CLP-PEG indukavo morfologijos pokyčius, t.y. išsišakojimą.

Iš anksčiau atliktų eksperimentų buvo žinoma, kad ant CLP-PEG hidrogelio smegenėlių kultūra yra linkusi formuoti sferoidus, tad buvo nuspręsta suformuoti mikrošulinėlių matricą ant CLP-PEG hidrogelio paviršiaus, kad galima būtų kontroliuoti sferoidų kiekį ir dydį ant vieno hidrogelio lakšto.

Liejimo būdu buvo pagamintas CLP-PEG hidrogelis su pasirinkto dydžio šulinėliais (piramidės formos šulinėliai, piramidės kraštinės ilgis 400 μm) (pav. 50). Po smegenėlių ląstelių kultūros užsėjimo ir 7 dienų auginimo galima matyti, kad sferoidai šulinėliuose buvo panašaus skersmens ir priklausė nuo užsėto ląstelių kiekio: $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$ ir $0,4 \times 10^6$ užsėtos ant 6mm skersmens diskelio ląstelės suformavo atitinkamai $30,45 \pm 5,59$, $70,40 \pm 6,32$, ir $115,35 \pm 7,51 \mu\text{m}$ skersmens sferoidus.



pav. 510 Smegenėlių ląstelių kultūros organoidai po 7 dienų auginimo mikrošulinėlių matricoje. Šviesos lauko mikroskopijos nuotraukose (a) galima matyti, kad sferoidų dydis yra panašus. Fluorescencinėse nuotraukose (b) galima matyti mėlynus branduolius, geltonus neuronus, raudonus astroцитus ir žalia spalva pažymėtą mikrogliją. Apjungtas vaizdas pateikiamas be branduolių. Visų mastelio juostų ilgis 50 μm .

Tyrimuose nustatyta, kad smegenėlių ląstelių kultūra ant CLP-PEG hidrogelio substrato formuoja į audinius panašius sferoidus arba organoidus. Išsišakojusi mikroglijos morfologija ir didesnis jos judrumas ant šio paviršiaus taip žymiai skiriasi nuo kitų auginimo paviršių. Šie rezultatai rodo tolimesnes šios platformos panaudojimo perspektyvas vaistinių medžiagų tyrimams, toksikologijai ar kitokiems pritaikymams. Paviršiaus mikrotechnologijų panaudojimas leidžia formuoti reikiamo dydžio organoidų sferas, kontroliuoti

jų skaičių, ir taip dar padidina hidrogelio platformos panaudojimo galimybes *in vitro* tyrimams, lustinių organų konstravimui ir regeneracinei medicinai.

3.9. Naujų bioimitacinių hidrogelių kūrimas

Anksčiau publikuotuose darbuose buvo panaudotas kolageną imituojantis peptidas, modifikuotas papildoma RGDSPG (fibronektino baltymą imituojančia) peptidine seka, kuri yra integrino $\alpha\beta 5$ prisijungimo vieta bazinėje membranoje, ant kurios tvirtinasi ląstelės [182]. PEG-CLP ir PEG-CLP-RGD hidrogeliai buvo patikrinti smegenėlių ląstelių kultūroje. Siekiant palyginti modifikuoto peptido poveikį ląstelių adhezijai buvo susintetinti du nauji peptidai su integrinų prisijungimo sekomis DGEAG ir GFOGERG. Iš pagamintų peptidų buvo paruošti hidrogeliai be PEG priedo.

Susintetinti peptidai:

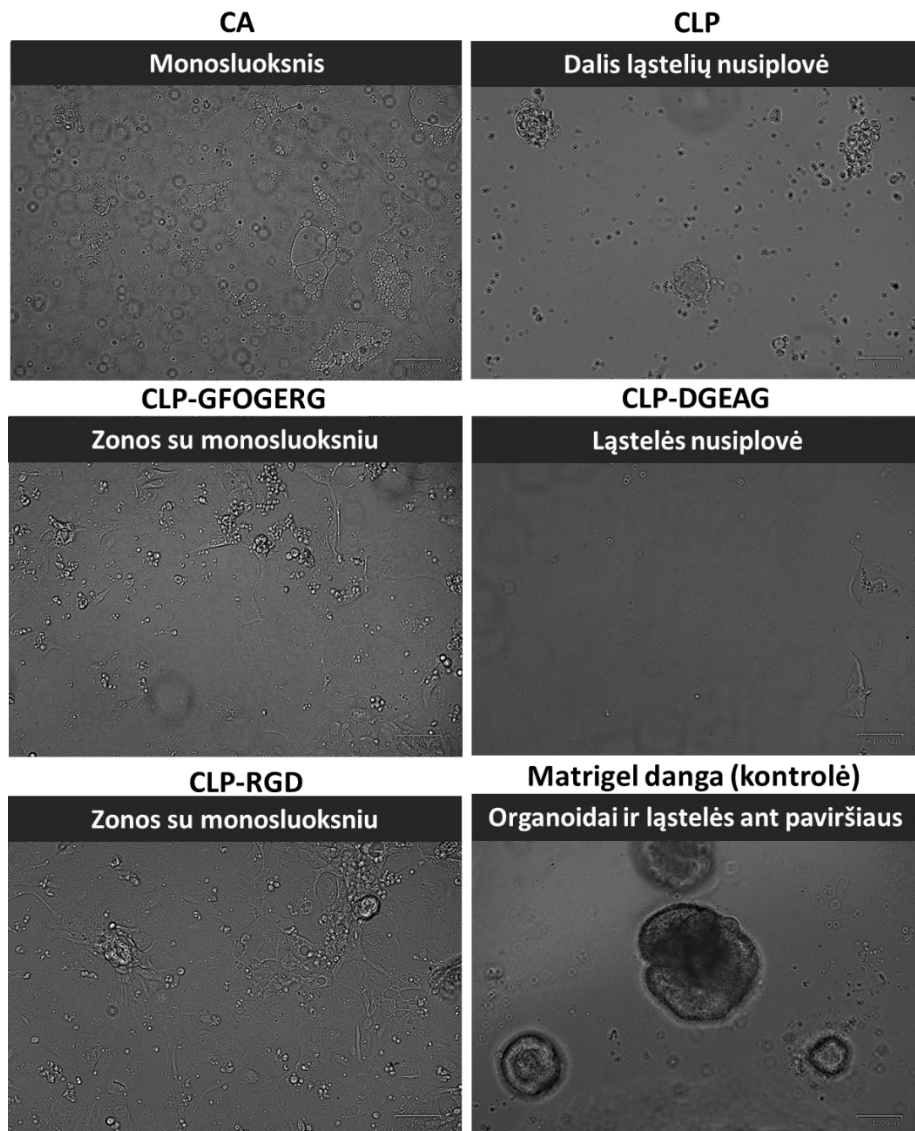
1. CLP – Kolageną imituojantis peptidas
 $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4(\text{Pro-Hyp-Gly})_4(\text{Asp-Hyp-Gly})_4\text{-COOH}$
2. CLP-RGD – Kolageną imituojantis peptidas su fibronektinui būdinga integrino prisijungimo seka
 $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4(\text{Pro-Hyp-Gly})_4(\text{Asp-Hyp-Gly})_4\text{-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-COOH}$
3. CLP-GFOGERG – Kolageną imituojantis peptidas su kolagenui būdinga integrino prisijungimo seka
 $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4(\text{Pro-Hyp-Gly})_4(\text{Asp-Hyp-Gly})_4\text{-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-COOH}$
4. CLP-DGEA – Kolageną imituojantis peptidas su kolagenui būdinga integrino prisijungimo seka
 $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4(\text{Pro-Hyp-Gly})_4(\text{Asp-Hyp-Gly})_4\text{-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-COOH}$

Peptidų sekos buvo pasirinktos analizuojant literatūrą ir norint pagerinti ląstelių kultūrų adheziją prie hidrogelio paviršiaus. Fibronektino fragmento sekos poveikis gerai žinomas, tačiau kartais ląstelės jungiasi ir prie kitų baltymų, todėl kaip taikiniai ląstelėms kuriamuose modeliuose buvo panaudotos ir I tipo kolagene aptinkamos sekos.

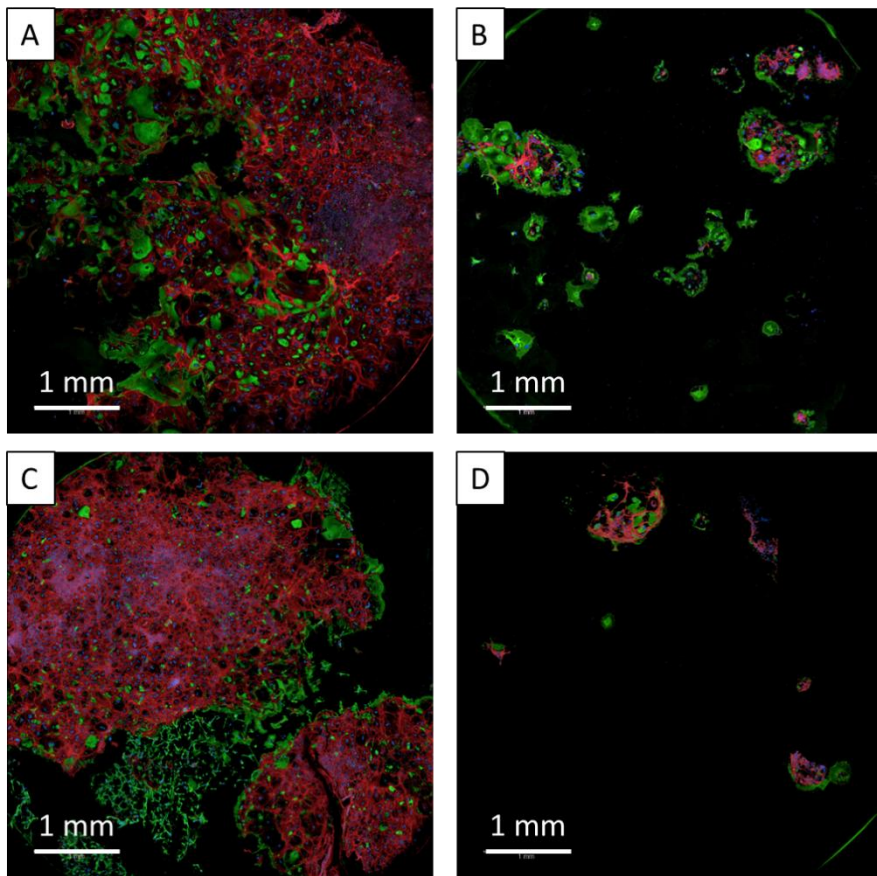
Susintetinti peptidai buvo išgryninti naudojant atvirkščių fazių HPLC, produkto masė buvo patikrinta masių spektroskopijos būdu ir atitiko teorinę molekulinę masę.

Iš visų susintetintų peptidų buvo paruošti peptidiniai hidrogeliai be jokių kitų medžiagų, ant kurių buvo užsėtas pelės plaučių ląstelių mišinys, taip

patikrinant skirtingų peptidų tinkamumą formuotis plaučių epiteliui (pav. 521). Ląstelių augimas ir morfologija and peptidinių hidrogelių buvo lyginami su ląstelių augimu ant Matrigel™ substrato, kuris istoriškai naudojamas plaučių organoidų auginimui. Gautas gana skirtingas, t.y. nesferoidinis, augimas lyginant su Matrigel™, tačiau kultūros buvo organotipiškos (pav. 532).



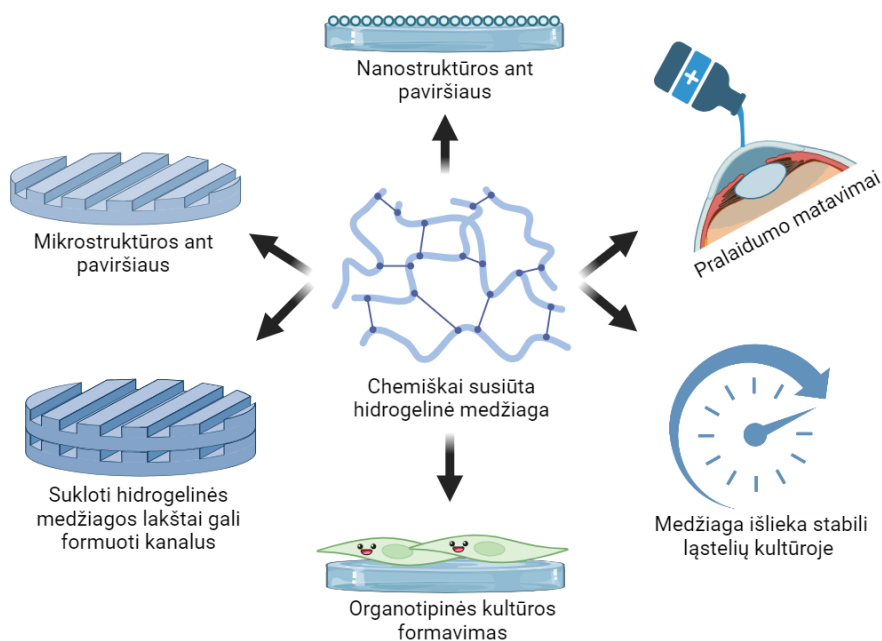
pav. 51 Plaučių epitelio ląstelės kultivuotos ant anksčiau tirtų ir naujų peptidinių hidrogelių, palyginimui- ir ant Matrigel substrato.



pav. 52 Organotipinė plaučių epitelio ląstelių kultūra ant skirtingų hidrogelių tipų. Pirmo tipo alveolių epitelio ląstelės nudažytos žalia spalva (AQP5 dažas), bazalinės ląstelės geltonai (p63 dažas), branduoliai mėlynai (DAPI dažas), aktinas raudonai (Phalloidin dažas). A – kolagenas, B – CLP, C – CLP-RGD, D – CLP-GFOGERG. Nuo CLP-DGEA ląstelės nusiplovė iš paviršius nebuvo vaizdintas.

DISKUSIJA

Visos šiame darbe naudotos bioimitacinės medžiagos priklauso chemiškai susiūtų hidrogelių klasei. Darbe pademonstruota, kad tokios medžiagos turi platų pritaikymą, nuo paviršiaus mikro- ir nanomodifikavimo kontroliuojamoms ląstelių kultūroms gauti iki vaistinių medžiagų pralaidumo ir organoidų kultūrų formavimo (pav. 53).



pav. 543 Scheminis skirtingų chemiškai susiūtų hidrogelių panaudojimo būdų apibendrinimas.

Šiame darbe buvo naudotos gyvulinės kilmės medžiagos (kolageno, modifikuoto kolageno) hidrogeliai ir pilnai sintetinių peptidų (peptidiniai ir PEG-peptidiniai) hidrogeliai. Gyvulinės kilmės medžiagų privalumas yra jų nedidelė kaina ir efektyvumas biologinėje aplinkoje, esant tinkamam paruošimui. Tačiau vienas iš esminių praktinių trūkumų yra žaliavos partijų skirtingumai, net tada, kai yra kalbama apie labai plačiai naudojamus produktus, tokius kaip Matrigel [146] arba išskirtus baltymus, tokius kaip kolagenas [183]. Todėl visi eksperimentai pristatyti šiame darbe buvo atlikti naudojant tą pačią kolageno žaliavos partiją, ir iš patirties yra žinoma, kad po naujos partijos gavimo būtų reikalingas proceso modifikavimas norint gauti panašius mechaninių parametrų ir ląstelių atsako rezultatus. Tokios problemos patvirtina visiškai sintetinių hidrogelinių medžiagų privalumą, nes tik

pasiekus pastovų ir pilnai kontroliuojamą procesą galima tikėtis vienodų rezultatų, nepriklausomai nuo sintezės partijos.

Darbe pateikti rezultatai gauti eksperimentuose su peptidiniais ir PEG-peptidiniais hidrogeliais. Reikia pasakyti, kad didelės masės PEG junginiai reikalauja papildomų pastangų, nes jų charakteristikos ir kokybė taip pat nėra pastovūs. Dažniausiai pasitaiko tam tikra molekulinės masės paklaida, arba funkcinių grupių trūkumas ant molekulės karkaso [184]. Tokiais atvejais proceso kokybės kontrolės užtikrinimas gali būti sudėtingas. Dirbant su gryno peptido hidrogeliais procesas yra paprastesnis ir labiau apibrėžtas. Taip pat, didelis peptidinių hidrogelių privalumas yra jų biologinis aktyvumas, nes peptidai kurti taip, kad imituotų gyvuose audiniuose esantį tarpląstelinį užpildą. Tai užtikrina specifinę hidrogelių sąveiką su ląstelėmis ir audiniais, ląstelių adhezijos, proliferacijos ir/ar diferenciacijos skatinimą. Modifikuojant peptidų aminorūgščių seką galima pritaikyti hidrogelio biologinį aktyvumą, kad jis atitiktų specifines paskirtis. Tai ir buvo atlikta šiame darbe, kai jau žinoma CLP seka buvo papildomai modifikuota kitais aminorūgščių motyvais, siekiant papildomų sąveikų su ląstelių paviršiumo ir receptoriais.

Be to, iš peptidų pagamintų hidrogelių mechanines savybes galima tiksliau sureguliuoti, kad būtų atkartojamos natūralių audinių savybės. Reguluojant tokius parametrus kaip peptidinių grandinių ilgis ir sudėtis, taip pat cheminio susiuvimo tankis, galima sukurti įvairaus standumo ir elastingumo hidrogelius. Šis suderinamumas yra labai svarbus audinių inžinerijos reikmėms, kur hidrogelio mechaninės savybės turi atitikti tikslinio audinio savybes, kad būtų užtikrinta tinkama atrama ir skatinama tinkama ląstelių funkcija.

Darbe yra parodyta, kad minkštosios litografijos būdu ant hidrogelių paviršiaus gali būti formuojamos mikro- ir nanostruktūros, pagal struktūrų atkartojimo tikslumą ir medžiagos patvarumą, tokie hidrogeliai gali būti prilyginami elastomerams (tokiems, kaip PDMS, kuris plačiai naudojamas audinių inžinerijoje). Tiriant preciziškai suformuotų mikrometrinių struktūrų įtaką ląstelių atsakui pasirenkamos patogesnės ir patvaresnės medžiagos, tokios kaip PDMS [185] ar kitos. Taip yra dėl to, kad atliekant ląstelių eksperimentus labai svarbu užtikrinti mikrometrinių struktūrų stabilumą viso eksperimento eigoje ir literatūroje šie parametrai yra nepakankamai aptariami. Dažniausiai siekiant hidrogelinio karkaso stabilumo kaip hidrogelio pagrindinė medžiaga yra pasirenkami organinės sintezės būdu gaunami polimerai, tokie kaip polivinilo alkoholis, kurie paviršiaus struktūras išlaiko keturių savaičių ląstelių eksperimento metu [186]. Čia aprašyti peptidiniai hidrogeliai užtikrina ir stabilumą, ir organomimetines savybes.

Sukūrus stabilias ir patvarias mikrostruktūras hidrogelių paviršiuje, jos gali būti ateityje pritaikomos ir vystomos kaip įaugimo, diferenciacijos ir ląstelių migracijos valdymo bei programavimo lustai. Galimybė sluoksniuoti ir papildomai chemiškai sutvirtinti hidrogelius leidžia formuoti konstruktus, panašius į mikrofluidikos prietaisus. Paprastai tokie mikrofluidikos prietaisai yra gaminami iš elastomerų (dažniausiai- PMMA, PDMS [187]) ir turi būti papildomai padengti tarpląstelinio užpildo baltymais juos funkcionalizuojant [188]. Elastomerai taip pat negali užtikrinti maistinių medžiagų patekimo ir ląstelių metabolitų šalinimo, tad atliekant eksperimentus yra būtina ląstelių kultūrų perfuzija augimo terpe. Chemiškai susiūti peptidiniai hidrogeliai yra laidūs ir maistinės medžiagos gali pasiekti ląsteles net mažo skersmens kapiliaruose (mažiausių tirtų kapiliarų plotas – $60 \mu\text{m}^2$).

Paviršių formavimo srityje irgi reikia naujų medžiagų ir sprendimų. Literatūroje yra pavyzdžių, kai paviršių formavimui yra naudojamos minkštos medžiagos, tokios kaip kolagenas arba želatina, tačiau taip pagamintos medžiagos su mikro- ir nanostruktūromis stokojo stabilumo. Didesnis peptidinių hidrogelių stabilumas indukuoja potencialą pritaikymui medicinoje, tokios medžiagos galėtų būti naudojamos kaip implantai arba jų dangos. Kalbant apie medžiagų stabilumą, galima išskirti keletą skirtingų aspektų, nes stabilumas apima ne tik fizinį ir mechaninį struktūros išlaikymą, bet ir pastovų biologinį tinkamumą, t.y., gebėjimą ilgesnį laiką palaikyti ląstelių adheziją, augimą ir diferenciaciją. Fizinis stabilumas reiškia, kad kolageno mikrostruktūros išlieka stabilios, išlaiko formą ir integralumą. Tai ypač svarbu audinių inžinerijoje, kai siekiama atkurti tikslus audinių fragmentus arba tiksliai užpildyti defektus. Mechaninis stabilumas reiškia, kad suformuotos struktūros taip pat turi būti pakankamai mechaniškai atsparios, kad atlaikytų kūno audinių apkrovą arba manipuliacijas laboratorijoje. Šis stabilumas gali būti pasiektas tinkamai projektuojant mikrostruktūras ir tinkamai pasirinkus hidrogelio komponentų (kolageno arba peptidų) koncentraciją bei kitus parametrus. Biologinis stabilumas - tai pastovus ląstelių gyvybinės veiklos ir funkcijų užtikrinimas. Tai apima gebėjimą palaikyti ląstelių adheziją, augimą, diferenciaciją ir metabolizmą ilgesnį laiką. Kolagenas yra natūralus baltymas organizme, todėl daugelis kolageno hidrogelių mikrostruktūrų yra biologiškai suderinamos ir palaiko ląstelių gyvybinę veiklą.

Siekiant užtikrinti kolageno bei peptidinių hidrogelių stabilumą ir savybių atkartojamumą, būtina atidžiai projektuoti gamybinį procesą, tinkamai parinkti medžiagas ir technologijas, bei atlikti išsamius fizikinių, cheminių bei biologinių savybių tyrimus. Taip pat, tinkamai įvertinus ir supratęs kolageno ir/arba peptidinių hidrogelių mikro- ir nanostruktūrų poveikio ląstelėms

mechanizmus, galima tobulinti šias struktūras ir jas sėkmingai pritaikyti įvairiose biomedicinos srityse.

Darbe yra pristatomi ragenos medžiagų pralaidumo modelio vystymo darbai. Ragenos pralaidumo modeliai gali būti naudojami įvairiais metodais tiriant vaistų patekimą į akis, bandant suprasti ragenos fiziologiją ir kuriant naujus akių ligų gydymo būdus. Ragenos pralaidumo modeliai leidžia tyrėjams kiekybiškai įvertinti kandidatinių vaistų, jų nešiklių prasiskverbimą per rageną. Šiuos modeliuose ištyrę tam tikras medžiagų grupes, mokslininkai gali nustatyti perspektyvias vaistines medžiagas, turinčias palankų pralaidumo profilį tolesniam vystymui. Taip pat tyrėjai gali naudoti ragenos pralaidumo modelius, kad įvertintų skirtingų vaistų pralaidumą. Išbandydami įvairių parametrų, tokių kaip vaisto koncentracija, klampumas, pH ir prasiskverbimą gerinančių medžiagų pridėjimas, poveikius, mokslininkai gali optimizuoti preparatus, kad pagerintų vaisto absorbciją ir biologinį prieinamumą. Pažangių modelių panaudojimas leidžia įvertinti įvairių vaistų tiekimo sistemų, įskaitant akių lašus, tepalus, gelius, įdėklus ir nanodaleles, veikimą. Lygindami skirtingų tiekimo sistemų prasiskverbimo kinetiką, galima nustatyti strategijas, kaip padidinti vaistų tiekimo efektyvumą ir nukreipti vaistus į konkrečius akių audinius. Naudojant šiuos modelius, galima pagreitinti vaistų atradimo procesą, pagerinti gydymo rezultatus ir pagerinti pacientų priežiūrą oftalmologijos srityje.

Žinomiausi komerciškai prieinami akies ragenos pralaidumo modeliai būtų MatTek korporacijos siūlomi EpiOcular ir EpiCorneal produktai[189], [190]. EpiOcular yra paprastesnė šio produkto versija, kai ląstelės yra auginamos ant pamatinės pusiau laidžios polimerinės membranos. Abu produktai pateikiami kaip galimybė atsakyti bandymų su gyvūnais, minimizuojant kaštus ir atsižvelgiant į etinę gyvūnų studijų pusę. Reikia pabrėžti, kad juose nėra ragenos stromą imituojančios dalies, t.y. hidrogelio, kuri žymiai įtakoja pralaidumą ir yra reikalinga, norint sukurti pilnai gyvos akies rageną pakeičiantį modelį.

Šiame darbe taip pat parodyta, kokios medžiagos yra tinkamos organotipinės kultūros formavimui, regeneracinės medicinos produktams ir lustinių organų kūrimui. Vienas iš pavyzdžių – smegenėlių kultūros auginimas ant pilnai sintetinių lygių ir mikrostruktūruotų kolageną imituojančio peptido hidrogelinių karkasų. Smegenėlių ląstelių auginimas organotipinėmis sąlygomis yra vertingas eksperimentinis modelis tiriant smegenėlių vystymąsi, funkciją ir patologiją *in vitro* sąlygomis. Gautos organotipinės kultūros išlaiko būdingą trimatę smegenėlių architektūrą ir ląstelių sudėtį, ir tuo pačiu leidžia tiksliai manipuluoti ir stebėti ląstelių procesus laikui bėgant.

Organotipinės smegenėlių ląstelių kultūros gali tapti universalia platforma tirti įvairius smegenėlių vystymosi aspektus, įskaitant neuronų migraciją, diferenciaciją, sinaptogenezę ir ryšių formavimąsi. Tyrėjai gali manipuliuoti eksperimentiniais kintamaisiais, tokiais kaip genetinės mutacijos, farmakologiniai agentai ar aplinkos veiksniai, kad ištirtų jų poveikį smegenėlių vystymuisi ir funkcijoms. Be to, tiriant neuronus realiuoju laiku galima naudoti elektrofiziologinius metodus. Taip pat, tokios kultūros gali būti naudojamos įvairiems smegenėlių sutrikimams ir ligoms modeliuoti, įskaitant neurologinius vystymosi sutrikimus, neurodegeneracines ligas ir navikus [191]–[195]. Sukeldami specifines patologines sąlygas, tokias kaip oksidacinis stresas, intensyvus dirginimas ar baltymų agregatų poveikis, mokslininkai gali tirti pagrindinius ligų progresavimo mechanizmus ir nustatyti galimus terapinius taikinius [196], [197]. Be to, organotipinės kultūros gali būti naudojamos vaistų atrankai ir ikiklinikiniam naujų terapinių intervencijų, skirtų smegenėlių funkcijai atkurti ir ligos simptomams sušvelninti, tyrimui. Darbe parodytas potencialas sukurti multifunkcinę eksperimentinę sistemą ląsteliniais ir molekuliniais mechanizmais, kuriais grindžiamas smegenėlių vystymasis, funkcija ir patologija, tirti. Pagrindinių smegenų audinio savybių ištyrimas *in vitro*, suteikia vertingų įžvalgų apie nervinio audinio fiziologiją ir suteikia platformą sutrikimams ir galimiems gydymo metodams tirti.

Kitas darbe pateiktas organotipinės kultūros pavyzdys – dilatacinės kardiomiopatijos modelis ant įvairios sudėties kolageno hidrogelių. Kolageno hidrogelis yra labai tinkamas karkasas raumens kilmės kamieninių ląstelių kultūroms, nes suteikia galimybių mechaniškai nukreipti ląsteles augti fibrilėmis, formuoti daugialąstelinius darinius, įterpti raumens vystymąsi modifikuojančių medžiagų, vaistinių molekulių ir kitų faktorių. Dar vienas potencialus tokio karkaso patobulinimas - mikrostruktūros, imituojančios širdies trimatę aplinką, keičiant karkaso standumą, laidumą ir kitas fizines savybes [198]. Visa tai suteikia galimybes kurti platformą, tinkamą tirti ligų atsiradimui, progresavimui ir terapinių intervencijų vertinimui.

Chemiškai susiūti bioimitaciniai hidrogeliai gali būti modifikuojami keičiant jų sudėtį ir kompozitines medžiagas. Peptidinių hidrogelių atveju – gali būti keičiama AR seka ir sudėtis, norint išgauti tinkamą biologinį efektą gali būti imituojami skirtingi tarpląstelinio užpildo baltymai, augimo faktorių fragmentai, antimikrobiniai peptidai. Taip pat chemiškai susiūti hidrogeliai gali būti naudojami biologiškai aktyviųjų komponentų (augimo faktorių, antimikrobinų junginių, vaistinių medžiagų, genų, vakcinų ir kt.) pernašai.

Visos aukščiau aprašytos savybės leidžia įvertinti bioimitacines chemiškai susiūtas hidrogelines medžiagas kaip tinkamas audinių inžinerijai, su plačiu potencialiu pritaikymu regeneracinėje medicinoje, medicininėje diagnostikoje, *in vitro* tyrimuose ir kitur, kur reikia kurti arba atkurti epitelinį, jungiamąjį, raumeninį ar nervinį audinius.

IŠVADOS

Daktaro disertacijos metu buvo pasiekti visi iškelti tikslai, ir gali būti padarytos žemiau pateiktos išvados:

- 1) Naudojant kolageno bioimitacinius hidrogelius buvo sukurtas eksperimentinis metodas audinių mikro- ir nanostruktūros imitavimui. Iš gautų duomenų galima matyti, kad hidrogelyje suformuotos mikrostruktūros terpėje išlieka stabilios mažiausiai 14 parų, be žymesnio mikrostruktūrų matmenų pasikeitimo (iki 1 % nuo vidurkio), standumo (iki 1 % nuo vidurkio) ar hidrogelio brinkimo pokyčio (iki 1 % nuo vandens kiekio vidurkio). Parodytas efektyvus mikrostruktūrų kaip šablonų panaudojimas ilgalaikėse ląstelių kultūrose.
- 2) Ant nanostruktūruotų bioimitacinių hidrogelių auginant žmogaus odos fibroblastus, buvo nustatyti reikšmingi skirtumai tarp skirtingų bandinių grupių pagal ląstelių perimetrą, formą ir užimamą plotą, patvirtinantys tam tikrą paviršiaus nanostruktūrų įtaką ląstelių morfologijai. Fibroblastų ląstelių plotas priklausė nuo hidrogelio paviršiaus struktūros – įdubios struktūros lėmė mažesnę plotą, o iškilios struktūros jį didino. Ląstelių forma išliko panaši į stebimą ant plokščių hidrogelių, galimai dėl vyraujančios paviršiaus mechaninių savybių įtakos. Reikšmingi ląstelių perimetro skirtumai nustatyti tik tarp P255 (didžiausias perimetras) ir P3030 (mažiausias perimetras) grupių. Šie rezultatai atitinka literatūroje pateikiamus duomenis, tačiau literatūroje ląstelių morfologijos pokyčiai dažniausiai vertinami ne ant bioimitacinių hidrogelinių paviršių. Tikėtina, kad dar ryškesnius ląstelių morfologijos skirtumus būtų galima išgauti keičiant bioimitacinio hidrogelio fizines savybes, tačiau tai reikalauja atskiro tyrimo.
- 3) Bioimitacinio hidrogelio mikrostruktūros buvo panaudotos sukuriant pilnos hidrogelinės aplinkos eksperimentinę sistemą ląstelių įaugimo tyrimams. Dėl hidrogelio laidumo užtikrinama metabolitų ir maistinių medžiagų difuzija ir ląstelių stabilus auginimas uždaruose kanaluose. Buvo išbandyti trijų skirtingų pločių kanalai (30, 60 ir 200 μm). Po 7 dienų ląstelių įaugimo eksperimento galima matyti, kad greičiausias ląstelių įaugimas stebimas 30 μm ir 60 μm kanaluose, kiek lėtesnis- didesnio pločio, 200 μm kanaluose.

- 4) Sukurtas kolageno hidrogelio ir plastikinio laikiklio konstruktas buvo tinkamas ragenos modelio *in vitro* pralaidumo tyrimams naudojant komercinę tyrimų sistemą. Pralaidumui matuoti buvo pasirinktas dažnai naudojamų vaistinių medžiagų ir fluorescuojančių referencinių medžiagų rinkinys. Pralaidumo rezultatai su užaugintu ant hidrogelio paviršiaus ląstelių sluoksniu buvo artimesni triušio akies ragenai, nei ląstelių užaugintų ant plastikinės (komercinės) membranos. Nustatyta, kad kolageno hidrogelis su ląstelių sluoksniu geriau tinka kaip alternatyva triušio ragenos pralaidumo modeliui.
- 5) Žmogaus pirminės sveikos ir patologinės mMSL diferencijuoja kardiomiogenine kryptimi auginant jas ant kolageno ir kolageno su modifikacijomis hidrogelių. Naudojant kolageno ir modifikuotus kolageno hidrogelius stebima teigiama kardiomiogeninė diferenciacija, su didėjančia pasirinktų genų raiška, kai hidrogeliai yra naudojami kartu su HDACI inhibitoriumi SAHA. Taip pat galima matyti, kad patologinėse ląstelėse taip pat stebima teigiama dinamika, kas reikštų, kad tokie hidrogeliai gali būti tinkami ir kaip regeneracinės medicinos įrankis. Visos kolageno hidrogelio modifikacijos turi klinikinį potencialą, bet hialurono rūgštimi praturtintas kolageno hidrogelis atrodo perspektyviausiai.
- 6) Bioimitaciniai hidrogeliai yra tinkami smegenėlių ląstelių kultūrų auginimui. Auginant jas ant CLP-PEG hidrogelio galima matyti, kad ląstelės formuoja organotipinius darinius ant paviršiaus – organoidus. Be to, stebimas didesnis mikroglijos šakotumas ir judrumas.
- 7) Ant bioimitacinio CLP-PEG hidrogelio paviršiaus buvo sukurta mikrošulinėlių matrica, tinkama organotipinių nervinio audinio sferoidų formavimui. Keičiant ląstelių sėjimo tankį ir hidrogelio matricos išmatavimus galima keisti besiformuojančių sferoidų dydį. Priklausomai nuo ląstelių kiekio buvo suformuoti $30,45 \pm 5,59$, $70,40 \pm 6,32$, ir $115,35 \pm 7,51 \mu\text{m}$ skersmens sferoidai.
- 8) Sukurtos naujos peptidinio hidrogelio modifikacijos, įterpiant bioimitacines sekas į kolageną imituojančio peptido seką. Naujai sukurti hidrogeliai palaiko organotipines plaučių epitelio ląstelių kultūras. Lyginant su Matrigel™ ant peptidinių hidrogelių buvo matomas nesferoidinis augimas, tačiau kultūros išliko organotipiškos.

Apibendrinant, šiame darbe aprašytus bioimitacinius hidrogelius galima įvertinti kaip perspektyvią platformą audinių inžinerijai ir regeneracinei medicinai, šias medžiagas derinant su cheminio modifikavimo bei mikro ir nanoformavimo metodais galima efektyviai sukurti arba atkurti epitelinį, jungiamąjį, raumeninį ar nervinį audinius.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] J. H. Kim and S. J. Lee, *A Biomimetic Strategy to Design Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration*. Elsevier Inc., 2016.
- [2] S. Tang, B. M. Richardson, and K. S. Anseth, “Dynamic covalent hydrogels as biomaterials to mimic the viscoelasticity of soft tissues,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 120, no. July, p. 100738, 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100738.
- [3] B. M. Baker, B. Trappmann, S. C. Stapleton, E. Toro, and C. S. Chen, “Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 16, pp. 3246–3252, 2013, doi: 10.1039/c3lc50493j.
- [4] A. Sarvazyan, A. Tatarinov, and N. Sarvazyan, “Ultrasonic assessment of tissue hydration status,” *Ultrasonics*, vol. 43, no. 8, pp. 661–671, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.ultras.2005.03.005.
- [5] G. Huang *et al.*, “Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 20, pp. 12764–12850, Oct. 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00094.
- [6] O. Wichterle and D. Lim, “Hydrophilic Gels for Biological Use,” *Nature*, vol. 185, no. 4706, pp. 117–118, 1960, doi: 10.1038/185117a0.
- [7] M. Bahram, N. Mohseni, and M. Moghtader, “An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications,” *Emerg. Concepts Anal. Appl. Hydrogels*, 2016, doi: 10.5772/64301.
- [8] A. K. A. Silva, C. Richard, M. Bessodes, D. Scherman, and O. W. Merten, “Growth factor delivery approaches in hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 1, pp. 9–18, 2009, doi: 10.1021/bm801103c.
- [9] H. K. S. Yadav, N. Anwar, A. Halabi, and G. A. Alsalloum, “Nanogels as Novel Drug Delivery Systems - A Review Properties of Nanogels Keywords : Introduction Advantages of Nanogels,” *Insight Pharma Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, 2017, [Online]. Available: <http://www.imedpub.com/articles/nanogels-as-novel-drug-delivery-systems--a-review.php?aid=18950>.
- [10] C. Vasile, D. Pamfil, E. Stoleru, and M. Baican, “New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers,” *Molecules*, vol. 25, no. 7, 2020, doi: 10.3390/molecules25071539.
- [11] R. Parhi, “Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 7, no. 4, pp. 515–530, 2017, doi: 10.15171/apb.2017.064.
- [12] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications ☆,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 18–23, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.

- [13] R. Singhal and K. Gupta, "A Review : Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters)," vol. 2559, 2016, doi: 10.1080/03602559.2015.1050520.
- [14] T. R. Cox and J. T. Erler, "Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer," *DMM Dis. Model. Mech.*, vol. 4, no. 2, pp. 165–178, 2011, doi: 10.1242/dmm.004077.
- [15] S. Budday, T. C. Ovaert, G. A. Holzapfel, P. Steinmann, and E. Kuhl, *Fifty Shades of Brain : A Review on the Mechanical Testing and Modeling of Brain Tissue*, no. 0123456789. Springer Netherlands, 2019.
- [16] Y. Liu *et al.*, "Properties of Porcine and Recombinant Human Collagen Matrices for Optically Clear Tissue Engineering Applications," pp. 1819–1828, 2006.
- [17] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, and D. Williams, "Key terminology in biomaterials and biocompatibility," *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 10, pp. 45–50, 2019, doi: 10.1016/j.cobme.2019.02.004.
- [18] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [19] D. F. Williams, "There is no such thing as a biocompatible material," *Biomaterials*, vol. 35, no. 38, pp. 10009–10014, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.035.
- [20] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 1869–1879, 2001, doi: 10.1021/cr000108x.
- [21] M. Tait, *Biomaterials: Novel materials from biological sources*, vol. 43, no. 1. 1993.
- [22] A. Sorushanova *et al.*, "The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development," *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–39, 2019, doi: 10.1002/adma.201801651.
- [23] S. Ricard-blum, "The Collagen Family," pp. 1–20, 2011.
- [24] M. L. S and L. G. Rodr, "Collagen : A review on its sources and potential cosmetic applications," no. October, 2017, doi: 10.1111/jocd.12450.
- [25] N. Rajan and D. Mantovani, "Macromolecular Biomaterials for Scaffold-Based Vascular Tissue Engineering," pp. 701–718, 2007, doi: 10.1002/mabi.200700002.
- [26] J. Heino, "The collagen family members as cell adhesion proteins," pp. 1001–1010, 2007, doi: 10.1002/bies.20636.
- [27] J. Jokinen *et al.*, "Integrin-mediated Cell Adhesion to Type I Collagen Fibrils *," vol. 279, no. 30, pp. 31956–31963, 2004, doi: 10.1074/jbc.M401409200.
- [28] W. Friess, "Collagen – biomaterial for drug delivery 1," vol. 45, pp.

- 113–136, 1998.
- [29] Z. Ruszczak and W. Friess, “Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 12, pp. 1679–1698, 2003, doi: 10.1016/j.addr.2003.08.007.
 - [30] D. J. M. P. M. Kaufmann, S. Heimrath, B.S. Kim, “HIGHLY POROUS POLYMER MATRICES AS A THREE-DIMENSIONAL CULTURE SYSTEM FOR HEPATOCYTES,” *Cell Transplant.*, vol. 6, no. 5, pp. 463–468, 1997.
 - [31] C. Helary and M. M. Giraud-guille, “Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing,” no. March 2011, pp. 225–237, 2012, doi: 10.1002/term.
 - [32] A. P. McGuigan and M. V Sefton, “The thrombogenicity of human umbilical vein endothelial cell seeded collagen modules,” vol. 29, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.010.
 - [33] B. Z. Waisner, J. P. Robinson, D. Ph, C. H. Lamar, and D. Ph, “Small Intestinal Submucosa: A Tissue-Derived Extracellular Matrix That Promotes Tissue-Specific Growth and Differentiation of Cells in Vitro,” *TISSUE Eng.*, vol. 4, no. 2, pp. 157–174, 1998.
 - [34] T. Yuan *et al.*, “Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 2, pp. 337–344, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33011>.
 - [35] M. S. Hahn, B. A. Teply, M. M. Stevens, S. M. Zeitels, and R. Langer, “Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1104–1109, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.022.
 - [36] A. Iwata *et al.*, “Long-Term Survival and Outgrowth of Mechanically Engineered Nervous Tissue Constructs Implanted Into Spinal Cord Lesions,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 1, pp. 101–110, 2006.
 - [37] T. C. Laurent, U. Bg, and J. R. E. Fraser-, “The structure and function of hyaluronan : An overview,” 1996.
 - [38] W. Seong *et al.*, “Biomaterials Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 27, pp. 6968–6980, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.064.
 - [39] K. S. Anseth, A. T. Metters, S. J. Bryant, P. J. Martens, J. H. Elisseeff, and C. N. Bowman, “In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery,” *J. Control. Deliv.*, vol. 78, pp. 199–209, 2002.
 - [40] J. A. Burdick, M. Ward, E. Liang, M. J. Young, and R. Langer, “Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 452–459, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.034.
 - [41] D. Baksh, L. Song, and R. S. Tuan, “Adult mesenchymal stem cells : characterization , differentiation , and application in cell and gene

- therapy,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 301–316, 2004.
- [42] S. Gerecht, J. A. Burdick, L. S. Ferreira, S. A. Townsend, R. Langer, and G. Vunjak-Novakovic, “Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 27, pp. 1–6, 2007.
- [43] I. L. Kim, R. L. Mauck, and J. A. Burdick, “Biomaterials Hydrogel design for cartilage tissue engineering : A case study with hyaluronic acid q,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 34, pp. 8771–8782, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.073.
- [44] J. L. Ifkovits, E. Tous, M. Minakawa, M. Morita, J. D. Robb, and K. J. Koomalsingh, “Injectable hydrogel properties in fl uence infarct expansion and extent of postinfarction left ventricular remodeling in an ovine model,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, pp. 1–6, 2010, doi: 10.1073/pnas.1004097107.
- [45] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides, “A Survey of Structure - Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein,” *Langmuir*, vol. 17, no. 9, pp. 5605–5620, 2001.
- [46] C. Lin and A. T. Metters, “Hydrogels in controlled release formulations : Network design and mathematical modeling ☆,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, pp. 1379–1408, 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.004.
- [47] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, “Hydrogels in pharmaceutical formulations,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, 2000.
- [48] C. Lin and K. S. Anseth, “PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine,” *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 3, pp. 631–643, 2009, doi: 10.1007/s11095-008-9801-2.
- [49] M. D. Scott and K. L. Murad, “Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers.,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 4, no. 6, pp. 423–438, Dec. 1998.
- [50] G. Csucs, R. Michel, J. W. Lussi, M. Textor, and G. Danuser, “Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 1713–1720, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00568-9.
- [51] C. M.-M. Lluís Oliver-Cervelló, Helena Martín-Gómez, “New trends in the development of multifunctional peptides to functionalize biomaterials,” *J. Pept. Sci.*, no. April, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1002/psc.3335.
- [52] M. M. C. David L. Nelson, *Principles of Biochemistry, fourth edition*. 2004.
- [53] Y. H. Ding, M. Floren, and W. Tan, “Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization,” *Biosurface and Biotribology*, vol. 2, no. 4, pp. 121–136, 2016, doi: 10.1016/j.bsbt.2016.11.001.
- [54] T. Gonzalez-fernandez, P. Sikorski, and J. K. Leach, “Bio-instructive

- materials for musculoskeletal regeneration,” *Acta Biomater.*, pp. 20–34, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.014.Bio-instructive.
- [55] X. Li, X. Liu, B. Josey, C. J. Chou, Y. Tan, and N. Zhang, “Short Laminin Peptide for Improved Neural Stem Cell Growth,” *Stem Cells Transplantational Med.*, vol. 3, pp. 662–670, 2014.
- [56] J. Ding *et al.*, “RGD-Hydrogel Improves the Therapeutic Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Phosgene-Induced Acute Lung Injury in Rats,” *Comput. Intell. NeurosciComputational Intell. Neurosci.*, vol. 2022, 2022, [Online]. Available: https://downloads.hindawi.com/journals/cin/2022/2743878.pdf?_gl=1*_49fq12*_ga*MTYwNTg3MDEExMi4xNjk3MDMxMzUx*_ga_NF5QFMJT5V*MTY5NzAzMTM1MS4xLjAuMTY5NzAzMTM1MS42MC4wLjA.&_ga=2.112748995.692870466.1697031352-1605870112.1697031351.
- [57] E. Alsberg, K. W. Anderson, A. Albeiruti, J. A. Rowley, and D. J. Mooney, “Engineering growing tissues,” *Appl. Biol. Sci.*, vol. 99, no. 19, pp. 12025–12030, 2002, doi: 10.1073/pnas.192291499.
- [58] C. Ligorio and A. Mata, “Synthetic extracellular matrices with function-encoding peptides,” *Nat. Rev.*, vol. 1, no. July, pp. 518–536, 2023, doi: 10.1038/s44222-023-00055-3.
- [59] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, “RGD modified polymers : biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4385–4415, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
- [60] H. Yin *et al.*, “Biomaterials Three-dimensional self-assembling nano fi ber matrix rejuvenates aged / degenerative human tendon stem / progenitor cells,” *Biomaterials*, vol. 236, no. January, p. 119802, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119802.
- [61] K. A. Burgess *et al.*, “Materials Science & Engineering C Functionalised peptide hydrogel for the delivery of cardiac progenitor cells,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 119, no. July 2020, p. 111539, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111539.
- [62] S. Padilla-lopategui, H. S. Azevedo, A. Mata, and C. Redondo-go, “Host – Guest-Mediated Epitope Presentation on Self-Assembled Peptide Amphiphile Hydrogels ,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, pp. 4870–4880, 2020, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c00549.
- [63] N. Huettner, T. R. Dargaville, and A. Forget, “Discovering Cell-Adhesion Peptides in Tissue Engineering : Beyond RGD,” *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 4, pp. 372–383, 2018, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.01.008.
- [64] T. T. Yu and M. S. Shoichet, “Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1507–1514, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.012.
- [65] S. Ali, J. E. Saik, D. J. Gould, M. E. Dickinson, and J. L. West,

- “Immobilization of Cell-Adhesive Laminin Peptides,” *BioResearch*, vol. 2, no. 4, 2013, doi: 10.1089/biores.2013.0021.
- [66] M. N. Barcellona *et al.*, “Biomaterials Control of adhesive ligand density for modulation of nucleus pulposus cell phenotype,” *Biomaterials*, vol. 250, no. March, p. 120057, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120057.
- [67] V. M. Tysseling *et al.*, “Self-Assembling Peptide Amphiphile Promotes Plasticity of Serotonergic Fibers Following Spinal Cord Injury,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 3170, pp. 3161–3170, 2010, doi: 10.1002/jnr.22472.
- [68] H.-W. Jun and J. L. West, “Endothelialization of Microporous YIGSR/PEG-Modified Polyurethaneurea,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 7, 2005.
- [69] E. Genové *et al.*, “Functionalized self-assembling peptide hydrogel enhance maintenance of hepatocyte activity in vitro,” *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 9, pp. 3387–3397, 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00970.x.
- [70] F. Gelain, D. Bottai, A. Vescovi, and S. Zhang, “Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures,” *PLoS One*, no. 1, 2006, doi: 10.1371/journal.pone.0000119.
- [71] L. R. Balaoing, A. D. Post, A. Y. Lin, H. Tseng, J. L. Moake, and J. Grande-allen, “Laminin Peptide-Immobilized Hydrogels Modulate Valve Endothelial Cell Hemostatic Regulation,” *PLoS One*, pp. 1–16, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130749.
- [72] C. Shen, S. Zhang, C. E. Semino, and E. Genove, “The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3341–3351, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.012.
- [73] W. R. Stauffer and X. T. Cui, “Polypyrrole doped with 2 peptide sequences from laminin,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2405–2413, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.024.
- [74] Y. Zhu, Z. Cankova, M. Iwanaszko, S. Lichtor, and M. Mrksich, “Potent laminin-inspired antioxidant regenerative dressing accelerates wound healing in diabetes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1073/pnas.1804262115.
- [75] V. A. Kumar, N. L. Taylor, A. A. Jalan, L. K. Hwang, B. K. Wang, and D. Hartgerink, “A Nanostructured Synthetic Collagen Mimic for Hemostasis,” *Biomacromolecules*, no. 15, pp. 1484–1490, 2015.
- [76] O. Uysal *et al.*, “Collagen Peptide Presenting Nanofibrous Scaffold for Intervertebral Disc Regeneration,” *Appl. Bio Mater.*, no. 2, pp. 1686–1695, 2019, doi: 10.1021/acsabm.9b00062.
- [77] J. M. Anderson, J. B. Vines, J. L. Patterson, H. Chen, A. Javed, and H. Jun, “Acta Biomaterialia Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic

- peptide amphiphiles combined with conditioned medium,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 2, pp. 675–682, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.016.
- [78] B. Derkus *et al.*, “Multicomponent hydrogels for the formation of vascularized bone-like constructs in vitro,” *Acta Biomater.*, vol. 109, pp. 82–94, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.03.025.
 - [79] A. M. Wojtowicz *et al.*, “Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 9, pp. 2574–2582, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.008.
 - [80] M. Bradshaw, D. Ho, M. Fear, and E. Al., “Designer self-assembling hydrogel scaffolds can impact skin cell proliferation and migration,” *Sci. Rev.*, vol. 4, pp. 1–6, 2014, doi: 10.1038/srep06903.
 - [81] E. Cosgriff-hernandez *et al.*, “Bioactive hydrogels based on Designer Collagens,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3969–3977, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.002.
 - [82] S. M. Becerra-bayona, V. R. Guiza-arguello, B. Russell, M. S. Hahn, and I. Studies, “Influence of collagen-based integrin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ mediated signaling on human mesenchymal stem cell osteogenesis in three dimensional contexts,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 106, no. 10, pp. 2594–2604, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36451.Influence.
 - [83] A. Mitchell, P. Briquez, I J. Hubbel, and J. Cochran, “Engineering growth factors for regenerative medicine applications,” *Acta Biomater.*, vol. 30, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1109/icphys.2018.8387681.
 - [84] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith, “Ligand binding to integrins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 29, pp. 21785–21788, 2000, doi: 10.1074/jbc.R000003200.
 - [85] M. Yebra *et al.*, “Recognition of the neural chemoattractant netrin-1 by integrins $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 3\beta 1$ regulates epithelial cell adhesion and migration,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 695–707, 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00330-7.
 - [86] M. J. Calzada *et al.*, “Identification of novel $\beta 1$ integrin binding sites in the type 1 and type 2 repeats of thrombospondin-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 40, pp. 41734–41743, 2004, doi: 10.1074/jbc.M406267200.
 - [87] C. A. Prater, J. Plotkin, D. Jaye, and W. A. Frazier, “The properdin-like type I repeats of human thrombospondin contain a cell attachment site,” *J. Cell Biol.*, vol. 112, no. 5, pp. 1031–1040, 1991, doi: 10.1083/jcb.112.5.1031.
 - [88] L. Bian, M. Guvendiren, R. L. Mauck, and J. A. Burdick, “Hydrogels that mimic developmentally relevant matrix and N-cadherin interactions enhance MSC chondrogenesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 25, pp. 10117–10122, 2013, doi: 10.1073/pnas.1214100110.
 - [89] R. Li, J. Xu, D. S. H. Wong, J. Li, P. Zhao, and L. Bian, “Self-

- assembled N-cadherin mimetic peptide hydrogels promote the chondrogenesis of mesenchymal stem cells through inhibition of canonical Wnt/ β -catenin signaling,” *Biomaterials*, vol. 145, pp. 33–43, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.08.031.
- [90] C. Eren Cimenci, G. U. Kurtulus, O. S. Caliskan, M. O. Guler, and A. B. Tekinay, “N-Cadherin Mimetic Peptide Nanofiber System Induces Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 30, no. 9, pp. 2417–2426, 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00514.
- [91] N. R. Gandavarapu, D. L. Alge, and K. S. Anseth, “Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on $\alpha 5$ integrin binding peptide hydrogels is dependent on substrate elasticity,” *Biomater. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 352–361, 2014, doi: 10.1039/C3BM60149H.Osteogenic.
- [92] A. E. Pontiroli, “Peptide hormones: Review of current and emerging uses by nasal delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 81–87, 1998, doi: 10.1016/S0169-409X(97)00062-8.
- [93] P. M. Saladin, B. D. Zhang, and J. M. Reichert, “Current trends in the clinical development of peptide therapeutics,” *IDrugs*, vol. 12, no. 12, pp. 779–784, Dec. 2009.
- [94] E. Fischer and E. Fourneau, “Ueber einige Derivate des Glykocolls,” *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 34, no. 2, pp. 2868–2877, May 1901, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.190103402249>.
- [95] R. B. Merrifield, “Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, 1963, doi: 10.1021/ja00897a025.
- [96] S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, “Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. I. Behavior of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 40, no. 9, pp. 2164–2167, 1967, doi: 10.1246/bcsj.40.2164.
- [97] L. A. Carpino and G. Y. Han, “The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, no. 19, pp. 5748–5749, 1970, doi: 10.1021/ja00722a043.
- [98] M. Stawikowski and G. B. Fields, “Introduction to peptide synthesis,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 1, no. SUPPL.69, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1002/0471140864.ps1801s69.
- [99] A. Isidro-Llobet *et al.*, “Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production,” *J. Org. Chem.*, vol. 84, no. 8, pp. 4615–4628, 2019, doi: 10.1021/acs.joc.8b03001.
- [100] N. J. Bulleid, “Disulfide Bond Formation in the Mammalian Endoplasmic Reticulum Disulfide Bond Formation in the Mammalian Endoplasmic Reticulum,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 11, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a013219.

- [101] K. J. Kramer and T. L. Hopkins, "Tyrosine Metabolism for Insect Cuticle Tanning," *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, vol. 9, pp. 279–301, 1987.
- [102] P. J. Hogg, "Disulfide bonds as switches for protein function," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 28, no. 4, pp. 210–214, 2003, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00057-4.
- [103] E. Fuentes-Iemus and M. J. Davies, "Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins : Mechanisms," *Molecules*, vol. 27, no. 1, pp. 1–31, 2022.
- [104] Z. Grabarek and J. Gergely, "Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters," *Anal. Biochem.*, vol. 185, pp. 131–135, 1990.
- [105] N. Chopin, X. Guillory, P. Weiss, J. Le Bideau, and S. Collic-jouault, "Archimer Design Polysaccharides of Marine Origin : Chemical Modifications to," *Curr. Org. Chem.*, vol. 18, no. 7, pp. 867–895, 2014.
- [106] M. Kunishima, C. Kawachi, J. Morita, S. Tani, and K. Terao, "morpholinium Chloride : An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters," vol. 55, pp. 13159–13170, 1999.
- [107] M. D. Este, D. Eglin, and M. Alini, "A systematic analysis of DMTMM vs EDC / NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water," *Carbohydr. Polym.*, vol. 108, pp. 239–246, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.070.
- [108] S. Rydergren, "Chemical Modifications of Hyaluronan using DMTMM-Activated Amidation," 2013.
- [109] L. Cui, Y. Yao, and E. K. F. Yim, "The effects of surface topography modification on hydrogel properties," *APL Bioeng.*, vol. 5, no. 3, 2021, doi: 10.1063/5.0046076.
- [110] H. Yamamoto, T. Demura, M. Morita, and S. Kono, "In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalytic decomposition of organosilane monolayers," *Biofabrication*, vol. 6, no. 035021, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035021.
- [111] A. D. Gilmour, A. J. Woolley, L. A. Poole-warren, C. E. Thomson, and R. A. Green, "Biomaterials A critical review of cell culture strategies for modelling intracortical brain implant material reactions," *Biomaterials*, vol. 91, pp. 23–43, 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.011.
- [112] M. Nikkhah, J. S. Strobl, and M. Agah, "Attachment and response of human fibroblast and breast cancer cells to three dimensional silicon microstructures of different geometries," *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 2, pp. 429–441, 2009, doi: 10.1007/s10544-008-9249-5.
- [113] E. Eisenbarth, J. Meyle, W. Nachtigall, and J. Breme, "Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts," *Biomaterials*, vol. 17, no. 14, pp. 1399–1403, 1996, doi: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87281-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87281-4).

- [114] N. Rohr, B. Zeller, L. Matthisson, and J. Fischer, "Surface structuring of zirconia to increase fibroblast viability," *Dent. Mater.*, vol. 36, no. 6, pp. 779–786, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.03.024>.
- [115] H. Zhang, C. Bian, J. K. Jackson, F. Khademolhosseini, H. M. Burt, and M. Chiao, "Fabrication of Robust Hydrogel Coatings on Polydimethylsiloxane Substrates Using Micropillar Anchor Structures with Chemical Surface Modification," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 12, pp. 9126–9133, Jun. 2014, doi: 10.1021/am501167x.
- [116] B. Nowduri, S. Schulte, D. Decker, K. H. Schäfer, and M. Saumer, "Biomimetic Nanostructures Fabricated by Nanoimprint Lithography for Improved Cell-Coupling," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 45, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1002/adfm.202004227.
- [117] T. G. Oyama *et al.*, "Elasticity and Topography-Controlled Collagen Hydrogels Mimicking Native Cellular Milieus," *bioRxiv*, p. 706952, 2019, [Online]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/706952v1?rss=1>.
- [118] S. Xiong, H. Gao, L. Qin, Y. Jia, M. Gao, and L. Ren, "Microgrooved collagen-based corneal scaffold for promoting collective cell migration and antifibrosis," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 50, pp. 29463–29473, 2019, doi: 10.1039/c9ra04009a.
- [119] R. Makita *et al.*, "Preparation of micro/nanopatterned gelatins crosslinked with genipin for biocompatible dental implants," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 1735–1754, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.165.
- [120] Amir K. Miri, Hossein Goodarzi Hosseinabadi, Berivan Cecena, Shabir Hassana, and Yu Shrike Zhang, "Permeability Mapping of Gelatin Methacryloyl Hydrogels," *Acta Biomater.*, vol. 77, no. 1, pp. 38–47, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.006.Permeability.
- [121] P. Baranowski, B. Karolewicz, M. Gajda, and J. Pluta, "Ophthalmic drug dosage forms: Characterisation and research methods," *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/861904.
- [122] F. Rafiei, H. Tabesh, and F. Farzad, "Sustained subconjunctival drug delivery systems: current trends and future perspectives," *Int. Ophthalmol.*, vol. 40, no. 9, pp. 2385–2401, 2020, doi: 10.1007/s10792-020-01391-8.
- [123] F. J. Cabrera, D. C. Wang, K. Reddy, G. Acharya, and C. S. Shin, "Challenges and opportunities for drug delivery to the posterior of the eye," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 8, pp. 1679–1684, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.05.035.
- [124] A. Urtti, "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 11, pp. 1131–1135, 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.07.027.
- [125] J. Barar, A. R. Javadzadeh, and Y. Omidi, "Ocular novel drug delivery: Impacts of membranes and barriers," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 5,

- no. 5, pp. 567–581, 2008, doi: 10.1517/17425247.5.5.567.
- [126] S. A. Molokhia, S. C. Thomas, K. J. Garff, K. J. Mandell, and B. M. Wirostko, “Anterior eye segment drug delivery systems: Current treatments and future challenges,” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 29, no. 2, pp. 92–105, 2013, doi: 10.1089/jop.2012.0241.
 - [127] K. Cholkar, S. P. Patel, A. D. Vadlapudi, and A. K. Mitra, “Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery,” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 29, no. 2, pp. 106–123, 2013, doi: 10.1089/jop.2012.0200.
 - [128] U. Ubani-Ukoma, A. Chauhan, G. Schultz, and D. J. Gibson, “An ex vivo cornea infection model,” *MethodsX*, vol. 7, 2020, doi: 10.1016/j.mex.2020.100876.
 - [129] “Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance,” 2010. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
 - [130] Y. Kaluzhny, M. W. Kinuthia, T. Truong, A. M. Lapointe, P. Hayden, and M. Klausner, “New human organotypic corneal tissue model for ophthalmic drug delivery studies,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 59, no. 7, pp. 2880–2898, 2018, doi: 10.1167/iovs.18-23944.
 - [131] S. Wang, C. E. Ghezzi, R. Gomes, R. E. Pollard, J. L. Funderburgh, and D. L. Kaplan, “In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation,” *Biomaterials*, vol. 112, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.030.
 - [132] J. E. Chang, S. K. Basu, and V. H. L. Lee, “Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies,” *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 6, pp. 670–676, 2000, doi: 10.1023/A:1007569929765.
 - [133] M. Scholz, J. E. C. Lin, V. H. L. Lee, and S. Keipert, “Pilocarpine Permeability across Ocular Tissues and Cell Cultures: Influence of Formulation Parameters,” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 18, no. 5, pp. 455–468, 2002, doi: 10.1089/10807680260362731.
 - [134] S. Reichl, C. Kölln, M. Hahne, and J. Verstraelen, “In vitro cell culture models to study the corneal drug absorption,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 7, no. 5, pp. 559–578, 2011, doi: 10.1517/17425255.2011.562195.
 - [135] M. Hahne and S. Reichl, “Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: The influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics,” *Int. J. Pharm.*, vol. 416, no. 1, pp. 268–279, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.004.
 - [136] H. Yamaguchi and T. Takezawa, “Fabrication of a corneal model composed of corneal epithelial and endothelial cells via a collagen vitrigel membrane functioned as an acellular stroma and its application to the corneal permeability test of chemicals,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 46, no. 11, pp. 1684–1691, 2018, doi: 10.1124/dmd.118.080820.

- [137] T. Ihanamäki, L. J. Pelliniemi, and E. Vuorio, "Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 403–434, 2004, doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.04.002.
- [138] J. W. Oh, T.-C. Hsi, C. F. Guerrero-Juarez, R. Ramos, and M. V Plikus, "Organotypic skin culture.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 11, pp. 1–4, Nov. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.387.
- [139] A. Luk, E. Ahn, G. S. Soor, and J. Butany, "Dilated cardiomyopathy : a review," *J. Clin. Pathol.*, vol. 51, pp. 219–225, 2009, doi: 10.1136/jcp.2008.060731.
- [140] N. K. Lakdawala, J. R. Winterfield, and B. H. Funke, "Arrhythmogenic Disorders of Genetic Origin Dilated Cardiomyopathy," *Arrhythmogenic Disord. Genet. Orig.*, vol. 6, pp. 228–237, 2013, doi: 10.1161/CIRCEP.111.962050.
- [141] O. Chioncel, S. J. Greene, and M. Vaduganathan, "The Global Health and Economic Burden of Hospitalizations for Heart Failure Lessons Learned From Hospitalized Heart Failure Registries," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 63, no. 12, pp. 1123–1133, 2014, doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.053.
- [142] D. Harding *et al.*, "Dilated cardiomyopathy and chronic cardiac inflammation : Pathogenesis , diagnosis and therapy," pp. 23–47, 2022, doi: 10.1111/joim.13556.
- [143] T. J. Cahill, R. P. Choudhury, and P. R. Riley, "Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics," *Nat. Publ. Gr.*, 2017, doi: 10.1038/nrd.2017.106.
- [144] K. S. Telukuntla, V. Y. Suncion, I. H. Schulman, and M. H. Joshua, "The Advancing Field of Cell-Based Therapy: Insights and Lessons From Clinical Trials," *J. Am. Heart Assoc.*, pp. 1–18, 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000338.
- [145] J.-N. Tang *et al.*, "Concise Review: Is Cardiac Cell Therapy Dead? Embarrassing Trial Outcomes and New Directions for the Future," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 354–359, Apr. 2018, doi: 10.1002/sctm.17-0196.
- [146] V. F. M. Segers, R. T. Lee, S. Dimmeler, and D. Losordo, "Biomaterials to Enhance Stem Cell Function in the Heart," *Circ. Res.*, vol. 109, no. 8, pp. 910–922, Sep. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.249052.
- [147] T. R. Heallen and J. F. Martin, "Heart repair via cardiomyocyte-secreted vesicles," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, no. 5, pp. 271–272, 2018, doi: 10.1038/s41551-018-0239-5.
- [148] B. Liu *et al.*, "Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, no. 5, pp. 293–303, 2018, doi: 10.1038/s41551-018-0229-7.
- [149] S. R. Caliarì and J. A. Burdick, "A practical guide to hydrogels for cell

- culture,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 5, pp. 405–414, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3839.
- [150] R. Izadpanah *et al.*, “Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 11, pp. 4229–4238, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5272.
- [151] M. L. Valencik and J. A. McDonald, “Cardiac expression of a gain-of-function $\alpha 5$ -integrin results in perinatal lethality,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 280, no. 1, pp. H361–H367, Jan. 2001, doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.1.H361.
- [152] S.-Y. Shai *et al.*, “Cardiac Myocyte-Specific Excision of the $\beta 1$ Integrin Gene Results in Myocardial Fibrosis and Cardiac Failure,” *Circ. Res.*, vol. 90, no. 4, pp. 458–464, Mar. 2002, doi: 10.1161/hh0402.105790.
- [153] M. L. Valencik, R. S. Keller, J. C. Loftus, and J. A. McDonald, “A lethal perinatal cardiac phenotype resulting from altered integrin function in cardiomyocytes,” *J. Card. Fail.*, vol. 8, no. 4, pp. 262–272, 2002, doi: <https://doi.org/10.1054/jcaf.2002.127335>.
- [154] I. Rashedi, N. Talele, X.-H. Wang, B. Hinz, M. Radisic, and A. Keating, “Collagen scaffold enhances the regenerative properties of mesenchymal stromal cells,” *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0187348, Oct. 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187348>.
- [155] R. Nazir, A. Bruyneel, C. Carr, and J. Czernuszka, “Collagen type I and hyaluronic acid based hybrid scaffolds for heart valve tissue engineering,” *Biopolymers*, no. March, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1002/bip.23278.
- [156] F. C. Simpson *et al.*, “Collagen analogs with phosphorylcholine are inflammation-suppressing scaffolds for corneal regeneration from alkali burns in mini-pigs,” *Commun. Biol.*, vol. 4, no. 1, p. 608, 2021, doi: 10.1038/s42003-021-02108-y.
- [157] J. Gordon and S. Amini, “General Overview of Neuronal Cell Culture BT - Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols,” S. Amini and M. K. White, Eds. New York, NY: Springer US, 2021, pp. 1–8.
- [158] R. Yamasaki, “Microglia in vivo and in vitro,” *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, vol. 5, no. 2, pp. 114–116, 2014, doi: <https://doi.org/10.1111/cen3.12120>.
- [159] M.-È. Tremblay, B. Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis, and A. Nimmerjahn, “The Role of Microglia in the Healthy Brain,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 45, pp. 16064 LP – 16069, Nov. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011.
- [160] J. Voogd and M. Glickstein, “The anatomy of the cerebellum,” *Trends Cogn. Sci.*, vol. 2, no. 9, pp. 307–313, 1998, doi: 10.1016/S1364-6613(98)01210-8.
- [161] Y. Liu *et al.*, “A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 47, no. 5,

- pp. 1869–1875, 2006, doi: 10.1167/iops.05-1339.
- [162] M. M. Islam *et al.*, “Self-assembled collagen-like-peptide implants as alternatives to human donor corneal transplantation,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 61, pp. 55745–55749, 2016, doi: 10.1039/c6ra08895c.
 - [163] L. E. R. O’Leary, J. A. Fallas, E. L. Bakota, M. K. Kang, and J. D. Hartgerink, “Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel,” *Nat. Chem.*, vol. 3, no. 10, pp. 821–828, 2011, doi: 10.1038/nchem.1123.
 - [164] C. Mölzer, S. P. Shankar, M. Griffith, M. M. Islam, J. V Forrester, and L. Kuffová, “Activation of dendritic cells by crosslinked collagen hydrogels (artificial corneas) varies with their composition,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 13, no. 9, pp. 1528–1543, 2019, doi: 10.1002/term.2903.
 - [165] M. A. Wood, “Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications,” *J. R. Soc. Interface.*, no. 4, pp. 1–17, 2007, doi: 10.1098/rsif.2006.0149.
 - [166] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: An open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
 - [167] D. R. Stirling, M. J. Swain-Bowden, A. M. Lucas, A. E. Carpenter, B. A. Cimini, and A. Goodman, “CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability,” *BMC Bioinformatics*, vol. 22, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1186/s12859-021-04344-9.
 - [168] D. Frank *et al.*, “Cardiac α -actin (ACTC1) gene mutation causes atrial-septal defects associated with late-onset dilated cardiomyopathy,” *Circ. Genomic Precis. Med.*, vol. 12, no. 8, pp. 345–356, 2019, doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002491.
 - [169] B. Wei and J. P. Jin, “TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships,” *Gene*, vol. 582, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1016/j.gene.2016.01.006.
 - [170] J. Popow *et al.*, “Highly Selective PTK2 Proteolysis Targeting Chimeras to Probe Focal Adhesion Kinase Scaffolding Functions,” *J. Med. Chem.*, vol. 62, no. 5, pp. 2508–2520, 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01826.
 - [171] L. Koláčná *et al.*, “Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix,” *Physiol. Res.*, vol. 56, no. SUPPL. 1, 2007, doi: 10.33549/physiolres.931302.
 - [172] A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis, and E. Stratakis, “Acta Biomaterialia Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro / nano silicon structures,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2711–2720, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.01.016.
 - [173] T. Jensen *et al.*, “and Proliferation on Nanostructured Tantalum Surfaces,” vol. 4, no. 5.
 - [174] M. Scharin-Mehlmann *et al.*, “Nano- and micro-patterned S-, H-, and

- X-PDMS for cell-based applications: Comparison of wettability, roughness, and cell-derived parameters,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. MAY, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00051.
- [175] J. Z. Yu, E. Korkmaz, M. I. Berg, P. R. LeDuc, and O. B. Ozdoganlar, “Biomimetic scaffolds with three-dimensional undulated microtopographies,” *Biomaterials*, vol. 128, pp. 109–120, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.014.
- [176] R. B. Vernon, M. D. Gooden, S. L. Lara, and T. N. Wight, “Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support and alignment,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3131–3140, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.011.
- [177] G. De Vicente and M. C. Lensen, “Topographically and elastically micropatterned PEG-based hydrogels to control cell adhesion and migration,” *Eur. Polym. J.*, vol. 78, pp. 290–301, 2016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.03.020.
- [178] S. Muehleder, A. Ovsianikov, J. Zipperle, H. Redl, and W. Holnthoner, “Connections matter: channeled hydrogels to improve vascularization,” vol. 2, no. November, pp. 1–7, 2014, doi: 10.3389/fbioe.2014.00052.
- [179] W. T. Kuo, M. A. Odenwald, J. R. Turner, and L. Zuo, “Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1514, no. 1, pp. 21–33, 2022, doi: 10.1111/nyas.14798.
- [180] X. Lyu, M. Hu, J. Peng, X. Zhang, and Y. Y. Sanders, “HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis,” *Ther. Adv. Chronic Dis.*, vol. 10, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1177/2040622319862697.
- [181] M. Perez-pouchoulen, J. W. Vanryzin, and M. M. McCarthy, “Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum 1 , 2 , 3,” vol. 2, no. August, pp. 1–15, 2015.
- [182] E. P. Hydrogels *et al.*, “Cerebellar Cells Self-Assemble into Functional Organoids on Synthetic , Chemically Crosslinked,” 2020.
- [183] Š. Rýglová, M. Braun, T. Suchý, M. Hříbal, M. Žaloudková, and L. Vištějnová, “The investigation of batch-to-batch variabilities in the composition of isolates from fish and mammalian species using different protocols,” *Food Res. Int.*, vol. 169, p. 112798, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112798>.
- [184] V. Gaberc-Porekar, I. Zore, B. Podobnik, and V. Menart, “Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins,” *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, vol. 11, no. 2, pp. 242–250, 2008.
- [185] J. Carthew *et al.*, “Precision Surface Microtopography Regulates Cell Fate via Changes to Actomyosin Contractility and Nuclear Architecture,” *Adv. Sci.*, vol. 8, no. 6, pp. 1–15, 2021, doi: 10.1002/advs.202003186.
- [186] M. F. A. Cutiongco, S. H. Goh, R. Aid-Launais, C. Le Visage, H. Y.

- Low, and E. K. F. Yim, “Planar and tubular patterning of micro and nano-topographies on poly(vinyl alcohol) hydrogel for improved endothelial cell responses,” *Biomaterials*, vol. 84, pp. 184–195, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.036>.
- [187] S. Jadalannagari and L. Ewart, “Beyond the hype and toward application: liver complex in vitro models in preclinical drug safety,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–13, 2024, doi: 10.1080/17425255.2024.2328794.
- [188] M. W. Toepke and D. J. Beebe, “PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications,” *Lab Chip*, vol. 6, no. 12, pp. 1484–1486, 2006, doi: 10.1039/B612140C.
- [189] Y. Kaluzhny, H. Kandárová, P. Hayden, J. Kubilus, L. D’Argembeau-Thornton, and M. Klausner, “Development of the epiocular™ eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation,” *Altern. to Lab. Anim.*, vol. 39, no. 4, pp. 339–364, 2011, doi: 10.1177/026119291103900409.
- [190] L. Chauchat, C. Guerin, Y. Kaluzhny, and J. P. Renard, “Comparison of In Vitro Corneal Permeation and In Vivo Ocular Bioavailability in Rabbits of Three Marketed Latanoprost Formulations,” *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 48, no. 6, pp. 633–645, 2023, doi: 10.1007/s13318-023-00853-5.
- [191] S. L. Reeber, T. S. Otis, and R. V. Sillitoe, “New roles for the cerebellum in health and disease,” *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–11, 2013, doi: 10.3389/fnsys.2013.00083.
- [192] H. I. L. Jacobs *et al.*, “The cerebellum in Alzheimer’s disease: Evaluating its role in cognitive decline,” *Brain*, vol. 141, no. 1, pp. 37–47, 2018, doi: 10.1093/brain/awx194.
- [193] T. Wu and M. Hallett, “The cerebellum in Parkinson’s disease,” *Brain*, vol. 136, no. 3, pp. 696–709, 2013, doi: 10.1093/brain/aws360.
- [194] I. Ivanov, J. W. Murrough, R. Bansal, X. Hao, and B. S. Peterson, “Cerebellar morphology and the effects of stimulant medications in youths with attention deficit-hyperactivity disorder,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 39, no. 3, pp. 718–726, 2014, doi: 10.1038/npp.2013.257.
- [195] C. Humpel, “Neuroscience forefront review organotypic brain slice cultures: A review,” *Neuroscience*, vol. 305, pp. 86–98, 2015, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.086.
- [196] H. Xin, J. A. S. Yannazzo, R. S. Duncan, E. V. Gregg, M. Singh, and P. Koulen, “A novel organotypic culture model of the postnatal mouse retina allows the study of glutamate-mediated excitotoxicity,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 159, no. 1, pp. 35–42, 2007, doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.06.013.
- [197] A. di Penta *et al.*, “Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in a Cerebellar

- Culture Model of Neuroinflammation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054722.
- [198] M. Camman, P. Joanne, O. Agbulut, and C. H  lary, “3D models of dilated cardiomyopathy: Shaping the chemical, physical and topographical properties of biomaterials to mimic the cardiac extracellular matrix,” *Bioact. Mater.*, vol. 7, no. February, pp. 275–291, 2022, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.040.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Darbo patirtis

2014.03 – 2014.09. Laborantas UAB “Sosdiagnostika”, Vilnius (Lietuva).

2014.12 – iki šios dienos. Mokslinių tyrimų ir plėtros inžinierius UAB “Ferentis”, Vilnius (Lietuva).

2016.06 – iki šios dienos. Jaunesnysis mokslo darbuotojas/vyresnysis inžinierius Fizinių ir Technologijos Mokslų Centre, Vilnius (Lietuva).

Išsilavinimas

2013 m. Bioinžinerijos bakalauro laipsnis, Vilniaus Gedimino technikos universitetas

2016 m. Bioinžinerijos magistro laipsnis, Vilniaus Gedimino technikos universitetas

SUMMARY

ABBREVIATIONS

ECM – extracellular matrix
3D – three-dimensional
AA – amino acid
PEG – polyethylene glycol
RGD – arginine-glycine-aspartic acid
IKVAV – isoleucine-lysine-valine-arginine-valine
Boc – carboxybenzyloxy
Fmoc – 9-fluorenylmethoxycarbonyl
Cys – cysteine
Tyr – tyrosine
NHS – N-hydroxysuccinimide
EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
DMTMM – 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholine chloride
PDMS – polydimethylsiloxane
MPC – 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine
AFM – atomic force microscopy
CA – Type I collagen hydrogel
CA-MPC – Type I collagen hydrogel modified with phosphorylcholine
CA-HA – Type I collagen hydrogel modified with hyaluronic acid
HDAC – histone deacetylases
SAHA – suberoylanilide hydroxamic acid
CLP-PEG – collagen-mimicking peptides conjugated with PEG
TEM – transmission electron microscopy

INTRODUCTION

The primary objective of tissue engineering is to restore and maintain the normal function of injured or damaged tissues and organs through the use of biomimetic materials. Typically, constructs employed in tissue engineering comprise biomimetic scaffolds with embedded tissue cells, forming an organotypic culture [1].

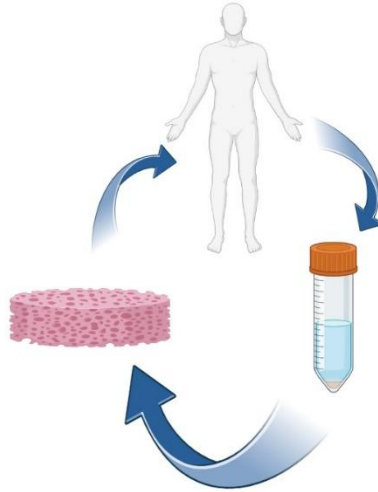


Figure 1 illustrates the fundamental scheme of tissue engineering, wherein cells isolated from the body are multiplied and combined with a biomimetic framework, forming an organotypic construct suitable for implantation into the body.

The extracellular matrix (ECM) and its mechanical properties serve not only as a physical surface for cell growth but also play a pivotal role in regulating cellular functions during tissue regeneration, wound healing, and disease progression. Current research, particularly in mechanobiology and filler biology, has been concentrating on unravelling how the mechanical environment of the ECM, both *in vitro* and *in vivo*, influences the cell behaviour and function. Synthetic materials that faithfully replicate the basic mechanical and biological properties of the native tissues are crucial for comprehending the mechanisms through which cells sense and remodel the mechanical environment around them [2], [3].

The aim of this doctoral thesis is to assess the possibilities of microfabrication, nanofabrication, and modification of biomimetic hydrogels, while testing the obtained hydrogels under organotypic cell culture conditions. To achieve this, the following dissertation tasks were outlined:

- 1) To create a platform suitable for micro and nanoforming based on collagen biomimetic hydrogel. To evaluate the durability of this platform under cell culture conditions.
- 2) To evaluate the parameters of organotypic cell culture when human skin fibroblast cells are cultivated on nanostructured surfaces.
- 3) To create a device based on collagen hydrogel in order to assess the growth of human skin fibroblast cells.
- 4) To develop an eye cornea model suitable for *in vitro* permeability experiments based on collagen hydrogel.
- 5) To modify the collagen hydrogel and test its suitability for the differentiation between healthy and pathological human cardiomyocytes.
- 6) To assess the suitability of biomimetic hydrogels for the cultivation of cerebellar cell cultures.
- 7) To create a matrix of microwells on biomimetic hydrogels suitable for the formation of cerebellar cell culture organoids.
- 8) To develop new peptide hydrogel modifications by inserting biomimetic sequences into the collagen-mimicking peptide sequence.

NOVELTY

Tissue engineering stands as a primary tool within regenerative medicine, presenting innovative approaches serving the objective to address the complexities of tissue loss, dysfunction, and organ failure. Furthermore, it proves effective in generating tissue-like organotypic constructs, while aiding in the comprehension of material permeability by exposing both healthy and pathological cells to potential drugs, thereby facilitating a deeper understanding of various stages of tissue development.

The utilization of biomimetic materials in tissue engineering involves the integration of principles from biology, materials science, and engineering. This integration aims to construct bioactive entities that emulate the intricate architecture and functionality observed *in vivo*. The development of novel biomaterials, such as hydrogels, nanostructured scaffolds, and bioactive polymers, is guided by the goal of replicating three-dimensional environments that foster cell adhesion, proliferation, differentiation, and other essential functions.

LITERATURE OVERVIEW

Biomimetic materials

Biomimetic materials refer to substances replicating specific properties of biological materials without fully duplicating them. This outcome is typically attained through chemical or surface modification techniques (Figure 2). Selection of the appropriate material involves a crucial consideration of which biological tissues are to be replicated. Given that a significant portion of soft tissues, including muscles, is composed of 70–80% water [4], hydrogels are often chosen as the foundational material. These hydrogels can be further modified by incorporating growth factors, undergoing chemical modifications, altering their structure, adjusting mechanical properties, and so forth.

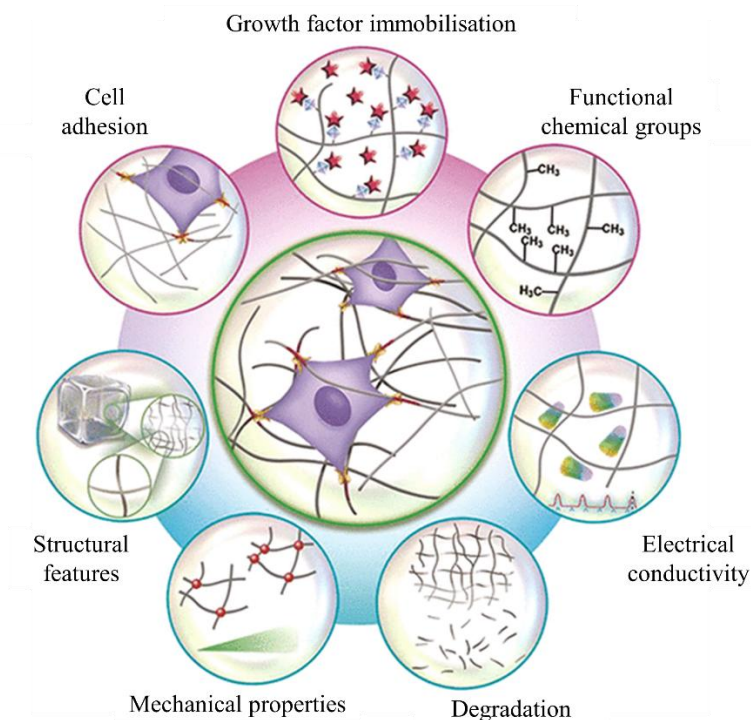


Figure 2 Possibilities of modification of biomimicking materials. Adapted from [5].

Hydrogel materials

Discussions on the impracticality of utilizing plastic components for implantation, given their impermeability to metabolites and inherent dissimilarity to the environment of soft tissues, date back to as early as 1960. This was the period when the concept of using hydrogel materials as chemically sutured, metabolite-permeable implants was first introduced [6]. A hydrogel is specifically characterized as a three-dimensional (3D) network of polymer chains capable of swelling and retaining a substantial amount of water within its structure without dissolving in water (Figure 3). Its hydrophilic properties primarily stem from functional groups, and the interactions among the polymer chains prevent dissolution in water [2]. As per the material definition, the water content must be at least 10% of the total mass (or volume) for it to be termed a hydrogel. Additionally, owing to the high water content, hydrogels typically exhibit mechanical properties closely resembling those of tissues [7].

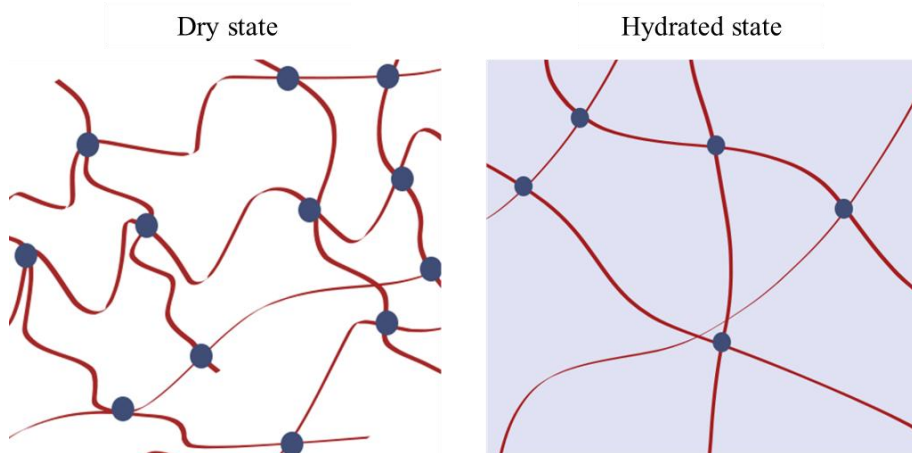


Figure 3 Schematic view of dry and hydrated states of hydrogel.

The material's hydrophilicity is influenced by the presence of hydrophilic chemical groups, examples of which include:

-NH₂, -COOH, -OH, -CONH₂, -CONH-, SO₃H [7].

Classification of hydrogel materials

The literature provides various ways to categorize hydrogels, while also offering diverse perspectives. In terms of hydrogel types, sources suggest a division between those derived from natural polymers and those derived from synthetic polymers [8]. Hydrogels can also be classified based on the ionic charges of the bound groups, leading to distinctions such as cationic, anionic, or neutral. Another classification criterion involves the types of cross-linking agents used.

Hydrogels may fall into categories such as physical, chemical, or biochemical. Physical hydrogels exhibit a transition from the liquid state to the gel state in response to changes in environmental conditions, such as the temperature, ion concentration, pH, or other factors. Chemical hydrogels, formed through covalent bond formation, offer enhanced mechanical integrity and resistance to degradation compared to weaker materials. Biochemical hydrogels involve biological substances, like enzymes or amino acids, in the solidification process [7].

Additional classifications for hydrogels include:

1. Origin of Monomers
 - a. Natural (e.g., collagen, gelatine, starch, agarose, alginate) vs.
 - b. Synthetic
2. Polymer Composition:
 - a. Homopolymers (hydrogel from one type of monomer);
 - b. Copolymers (a hydrogel of two or more types of monomers);
 - c. Multipolymers (hydrogel from two independent interwoven polymer networks).
3. Physical-Chemical Structure:
 - a. Amorphous;
 - b. Partially crystalline;
 - c. Crystalline.
4. Type of Polymerization (Cross-Linking Type):
 - a. Chemical (irreversible reaction) vs.
 - b. Physical (temporary bonds: physical interlacing, ionic bonds, hydrogen bonds, or hydrophobic interactions).
5. Electric Charges of the Network:
 - a. Non-ionic;
 - b. Ionic;
 - c. Amphoteric electrolytes;

- d. Zwitterionic (each repeating structural unit contains anionic and cationic structures).

Water content in hydrogels

Hydrogels, by virtue of being hydrophilic polymeric materials, have the capability to absorb a substantial amount of water, ranging from 10 to 20% (with the lower limit being arbitrary and subject to variation depending on the source) up to thousands of equivalents of their own weight. The quantity and characteristics of water within the hydrogel material play a critical role in both the penetration of substances into the gel and the removal of cell metabolites from it [11].

Upon absorbing water, the initial water molecules entering the matrix will hydrate the most polar and hydrophilic groups; this phenomenon is termed 'primary bound water'. As the polar groups become hydrated, the network swells, revealing hydrophobic groups that also interact with water molecules, constituting 'hydrophobically bound water' or 'secondary bound water'. The combination of primary and secondary bound water is often collectively referred to as 'total bound water'. Situated between the bound water on the surface of the polymer monomer and the free water is a layer known as semi-bound water. Following the interaction of polar and hydrophobic groups with water molecules due to the movement of osmotic water, the network absorbs additional water. Although the hydrogel has the potential to move towards infinite dilution, this is counteracted by the covalent or physical bonds holding the hydrogel. As a result, the hydrogel reaches a swelling equilibrium, and the water content ceases to increase. The water filling the volume after the hydration of hydrophilic and hydrophobic groups is termed 'water in the hydrogel structure' [12], [13] (Figure 4).

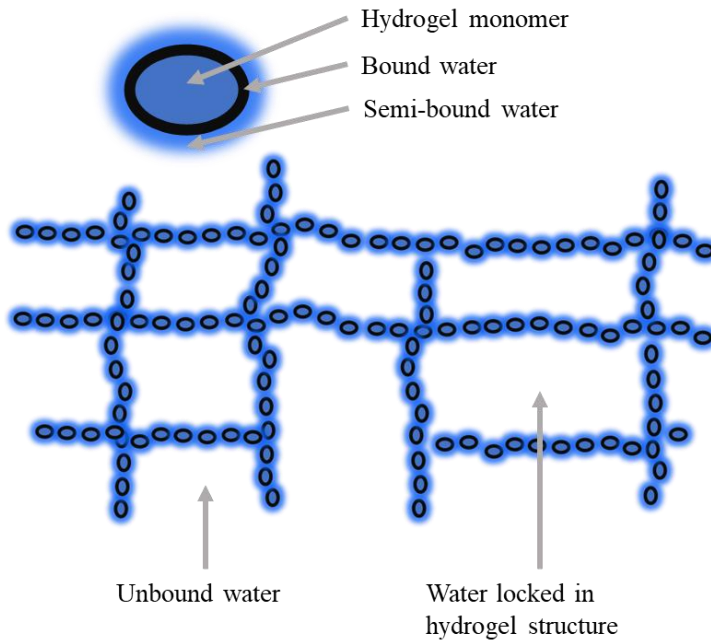


Figure 4 Schematic representation of water in hydrogel.

Mechanical properties of hydrogel

The biomechanical properties of tissues, specifically, stiffness (Jung's modulus), measured in pascals (Pa), vary significantly among different organs and tissues (Figure 5). This parameter is intricately linked to the tissue function. Tissues that are mechanically static, like the brain, or mobile, such as the lung, tend to exhibit low stiffness. On the other hand, tissues subjected to high mechanical loads, like bone or skin, display higher Young's moduli [14].

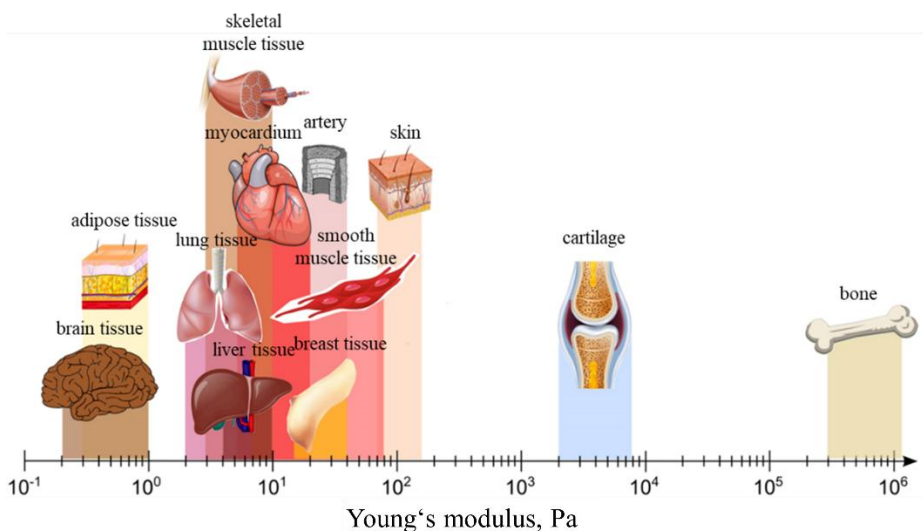


Figure 5 Distribution of stiffness in different tissues. Adapted from [15].

Biocompatibility

Biocompatibility is characterized by the substance's ability to execute its intended therapeutic functions by eliciting an appropriate response from the host or the selected living system. It is crucial that such materials should not induce harm, should exhibit no toxicity, or should pose no risk of rejection, thus ensuring the absence of any undesired local or systemic effects [17]–[19]. The universally acceptable definition of biocompatibility was established during a conference in 2018, affirming the description formulated in 1985, where such materials were defined as having the capacity to interact with an appropriate host response in a specific application (Figure 6).

The term 'biomaterial' was defined in 1986 as "material other than living tissue used in a medical device to interact with biological systems". Biomaterials find applications in an increasingly diverse and complex array of fields, including tissue engineering, invasive sensors, drug delivery and gene transfection systems, as well as in the realms of medicine-oriented nanotechnology and biotechnology in general. They are also integral to older implantable medical devices.

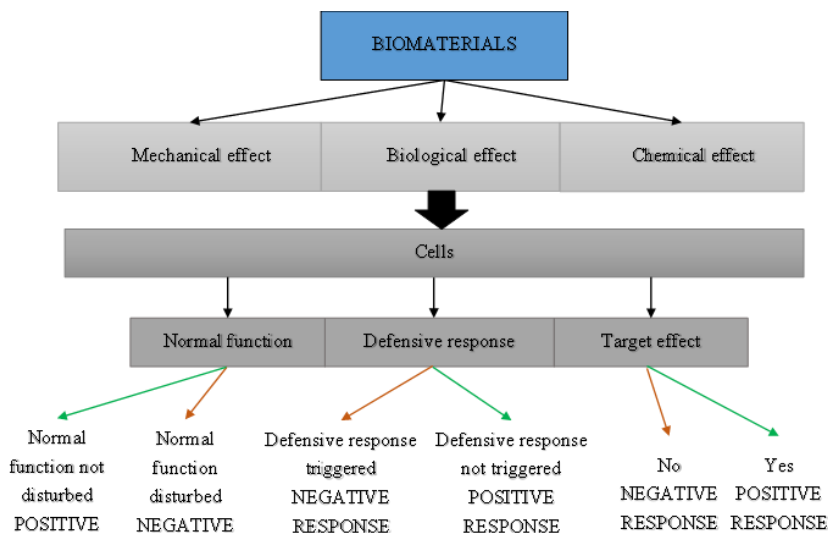


Figure 6 A schematic diagram of how biocompatible materials work in a biological system. Adapted from [19].

Polymers used for hydrogel formation

The most straightforward classification of polymers commonly employed in the formation of hydrogel materials involves categorizing them into those of the natural versus synthetic origin. Notable natural substances in this context encompass collagen, hyaluronic acid, fibrin, agarose, chitosan, gelatine, and cellulose. On the other hand, the more widely used synthetic materials encompass polyacrylic acid, polyhydroxy methacrylate, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, and silicone [20].

Materials of natural origin: collagen

Collagen stands as one of the most prevalent proteins in mammals, constituting approximately 30% of the total protein mass [21]. The term 'collagen' originates from the Greek words for 'glue' and 'to make', reflecting the historical understanding that boiling tissues could yield glue. Interestingly, the term was only officially coined in the 20th century to describe connective tissue that could be boiled to extract gelatine [22].

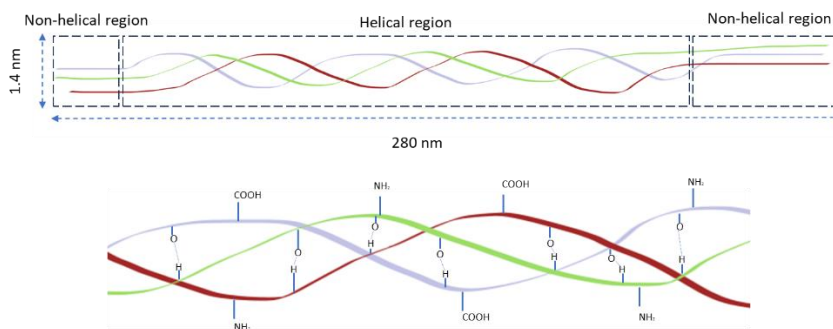


Figure 7 Schematic representation of collagen helix. Adapted from [22].

The collagen molecule exhibits a triple helix structure with two non-helical regions at each end (Figure 7). The formation of the triple helix is a defining characteristic of all collagens. The collagen structure consists of three parallel α polypeptide chains that coil around each other, thereby creating a regular helix and forming a rope-like structure. The collagen triple helix has an approximate molecular weight of 300 kDa, a filament length of 280 nm, and a diameter of 1.4 nm. Intermolecular hydrogen bonds between glycines in adjacent chains stabilize the triple helix. Hydrogen bonds are also established by the hydroxy group of hydroxyproline. Within the amino acid (AA) triplet, two hydrogen bonds are formed: one between the amino group of the glycine AR residue and the carboxy group of the AR residue in the second position of the adjacent helix chain. The Gly-Pro-Hyp sequence constitutes about 12% of the collagen molecule, while Gly-Pro-Y and Gly-X-Hyp sequences together make up around 44%. The remaining 44% is comprised of Gly-X-Y sequences.

As of now, 29 types of collagen have been identified, each possessing unique properties. While most collagens exhibit high interconnectivity, they are specific to particular tissues where they can be identified. This diversity implies a wide array of biological functions, reflected in the numerous structures that collagen molecules can assemble into. Collagens can be categorized into four groups based on various factors, such as the primary structure, the triple helix domain length, the molecular weight, the charge distribution, gaps in the triple helix, sizes and shapes of edge segments, and post-translational modifications [23].

Fibril-Forming Collagens (Group I): This group includes Collagens I, II, III, V, IX, XXIV, and XXVII. They form a triple helix with discontinuous Gly-X-Y amino acid domains measuring approximately 300 nm in length.

Collagens XXI and XXVII may have insertions in the Gly–X–Y sequence, representing short breaks in the triple helix strand. Fibrils in tissues like dermis and ligaments are typically heterotypic, composed of several different collagens (e.g., Collagens I, III, V), whereas homotypic fibrils, formed by a single collagen type (e.g., Collagen VII in dermis-epidermis connections), are also present [22].

Basement Membrane-Forming Collagens (Group II): This group includes Collagens IV, VII, and XXVIII. It can form a fine network of Collagen IV fibrils and branched anchoring fibrils of Collagen VII [22].

Short-Chain Collagens (Group III): Collagens VI, VIII, and X belong to this group, forming a braided network with varying spacing. Collagen type VI forms a granular network, while Collagens VII and X form a regular hexagonal network structure [22].

Collagens with Multiple Inclusions (Group IV): Collagens XII, XIV, XVI, XIX, and XXII belong to this group and are classified as FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices) collagens, associated with fibril formations. They can influence the width of the fibril once attached. Collagens XV and XVIII, termed MULTIPLEXIN, have the most breaks in the triple helix tertiary structure. Another subgroup includes transmembrane collagen molecules (Collagens XIII, XVII, XXIII, XXV), which can insert into the cell membrane and form a triple helix in the extracellular matrix [22].

Collagen hydrogels typically elicit minimal inflammation and a mild immune response, showcasing excellent biocompatibility. With AA sequences that promote cell adhesion to the surface [25]–[27], collagen hydrogels have found diverse applications. They have been employed as carriers for medicinal substances and proteins [28], [29], and have been utilized in tissue reconstruction for various organs including the liver [30], skin [31], blood vessels [32], small intestine [33], cartilage [34], vocal cords [35], and spine [36].

Materials of natural origin: hyaluronic acid

Hyaluronic acid, also known as hyaluronate, is a linear polymer composed of disaccharides, with its monomer comprising D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine (Figure 8). Widely distributed in all mammals, it is particularly prevalent in connective tissues where it serves as a filler, lubricant, and/or osmotic buffer. This high molecular weight polysaccharide forms braided networks at low concentrations (<1 mg/mL) and develops

polymers with molecular weights ranging from 3 to 7 MDa in the human body [37].

Hyaluronic acid hydrogels, due to being of natural origin, do not provoke an immune response and are biodegradable. Consequently, these hydrogels are utilized as carriers for cells [38] or medicinal substances [39], [40], in applications like stem cell therapy [41], [42], cartilage tissue engineering [39], [43], and cardiac muscle repair [44].

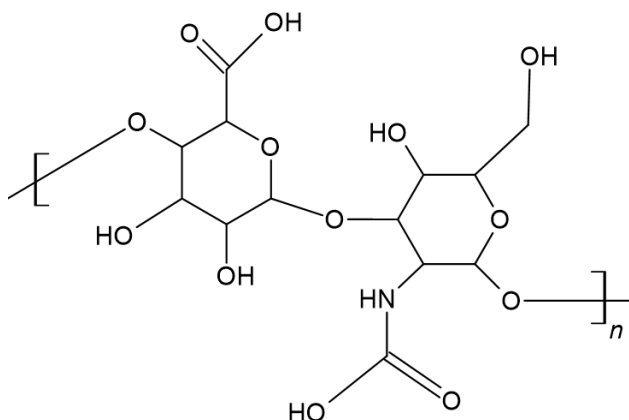


Figure 8 Hyaluronic acid polymer.

Materials of synthetic origin: Polyethylene glycol

Polyethylene glycol (PEG) is a polymer typically produced through the anionic or cationic polymerization of ethylene oxide (Figure 9). The formation of PEG hydrogels can occur through various methods. The terminal ends of the PEG chain can be modified with the necessary chemical groups, and the entire PEG chain can serve as a cross-linking agent by reacting with other monomers [45]. Additionally, hydrogels can be formed through physical interactions. The physicochemical properties of such hydrogels, including their chemical conductivity, water content, elasticity, yoke modulus, degradation rate, and others, can exhibit significant diversity [46], [47].

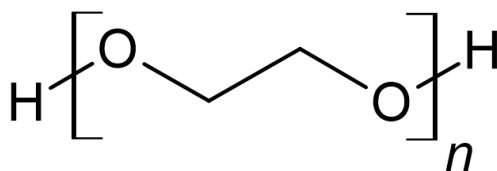


Figure 9 PEG polymer.

The hydrophilic properties of PEG polymers constitute a crucial parameter which renders PEG hydrogels highly suitable for use in regenerative medicine [47]. A PEG hydrogel possessing low cross-linking capability can retain up to 95% of its total weight in water. Materials featuring such a high water content closely mimic tissues, thereby offering an ideal environment for encapsulating cells or active substances. Utilization of such hydrogels in tissue regeneration facilitates the exchange of cell metabolites, functioning as a semi-conductive membrane [48].

Another important characteristic of PEG hydrogels is their ‘invisibility’ to cells, preventing nonspecific adhesion of proteins to the material’s surface [49], [50]. While this feature enables the decoration of the PEG polymer surface with biomolecules to elicit a desired cellular response, it has a downside as ECM proteins produced by cells do not adhere to the PEG surface. This reduction in cell viability can be addressed by incorporating bioactive moieties into the PEG hydrogel, thus ensuring cell vitality [48].

The availability of a diverse range of commercially accessible PEG polymers, featuring distinct molecular weights, branching, and functionality, is a key aspect. Various functional groups, such as amines, carboxy groups, thiols, succimides, maleimides, nitrophenyl carbonates, methacrylates, isocyanates, and others, provide a versatile toolkit. This broad spectrum of functional groups enables the application of PEG polymers in many scenarios, leveraging various chemical tools to create bioactive materials suitable for regenerative medicine.

Materials of synthetic origin: Biomimetic peptides

The cellular response to its environment and the adjacent surface is typically influenced by structural and signalling proteins within the ECM surrounding the cells. These protein segments can serve as both structural and functional elements in the development of biomimetic materials [51]. While proteins are composed of hundreds or even thousands of amino acid residues, smaller compounds consisting of two to several tens of AAs are referred to as ‘peptides’ [52].

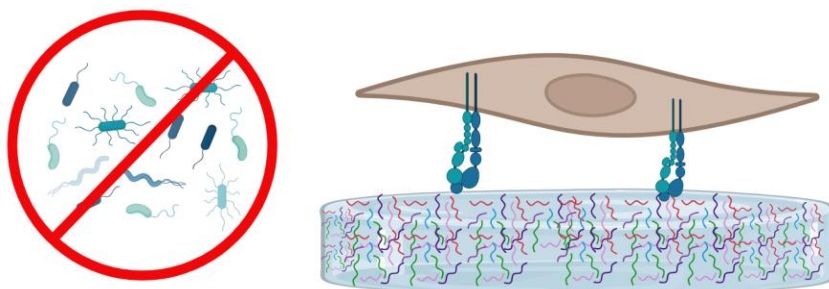


Figure 10 A cell-to-ECM-mimicking hydrogel, incorporating biomimetic peptide sequences, is designed to emulate the natural cell-ECM interactions. Ideally, these sequences not only facilitate essential cell adhesion but also deter the formation of bacterial films.

Peptide hydrogels are denoted by their capacity to mimic not only the mechanical properties but also the biochemical functions of the ECM, resulting in a more profound impact on the cell culture. The peptides released from TLU are recognized for enhancing cell adhesion to surfaces and supporting cell growth. These sequences can be integrated into the hydrogel structure by orchestrating intracellular interactions or by interacting with peptide fragments within the hydrogel [53]. Materials impregnated with such peptides facilitate tissue regeneration, contributing to their functionalization in regenerative medicine [54].

It is crucial to highlight that peptides exhibit greater stability compared to full-length proteins [55]. The arginine-glycine-aspartic acid (RGD) sequence from the extracellular matrix protein fibronectin enhances the cell surface adhesion and proliferation both *in vitro* and *in vivo* [56], [57]. Another significant extracellular matrix protein associated with neurocultures, laminin, features an isoleucine-lysine-valine-arginine-valine (IKVAV) sequence [58].

Various biomolecules which are present within the ECM volume play a pivotal role in influencing the biological response of cells. In the realm of bioengineering platforms that aspire to replicate or simulate intricate biological scenarios, effective ‘communication’ with cells is important. Peptide epitopes emerge as versatile building blocks for constructing cellular scaffolds, both *in vivo* and *in vitro*. These epitopes can be strategically designed to enhance cell adhesion or migration, foster cell differentiation, and elicit an immune response [58]. Furthermore, the ability to combine multiple epitopes on a single scaffold holds the potential for synergistic functional effects, closely resembling the functionality of a living system [39] (see Figure 10).

Solid phase peptide synthesis

A large number of synthetic peptides hold significant importance in commercial and pharmaceutical fields, spanning from the dipeptide sugar substitute aspartame to clinical hormones like oxytocin, adrenocorticotrophic hormone, calcitonin, and others [92]. The market for therapeutic peptides had already reached a multibillion-dollar level even before 2010 [93]. The efficient and accurate synthesis of peptides is crucial for both pharmaceutical and tissue engineering applications. The concept of assembling peptides from amino acid (AR) precursors was already introduced over a century ago. The underlying principle was straightforward: after the reaction between AAs, the protective groups of the reverse reaction were removed, and the term 'peptide' was coined for the first time in the same publication [94].

The process of peptide synthesis became more practical with the advent of solid-phase synthesis. Although the principle of the relevant synthesis reactions remains similar, the resulting peptide chain is attached to an insoluble polymer resin molecule. The nascent peptide undergoes extension through a series of repeated cycles, utilizing excess reagents that can be removed by washing and filtering the resin beads on which the peptide is being synthesized. Once a peptide of the desired length has been synthesized, it can be cleaved from the polymeric support, and the protecting groups are also removed.

In the early 1950s, Merrifield proposed the use of modified polystyrene-based resin beads as a solid phase for peptide synthesis. Peptides could be synthesized one amino acid at a time, from the C-terminus to the N-terminus, by using N^α-protected amino acids. The synthesis of the tetrapeptide on the solid phase involved carboxybenzyloxy (Boc) as an α -amino protecting group, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide as a reaction activator, and HBr to cleave the peptide [95]. Later, solid-phase peptide synthesis was modified to use the t-butyloxycarbonyl group for N^α protection, and hydrofluoric acid was employed to cleave the peptide from the solid phase [96].

In 1970, Carpino and Han proposed the introduction of a 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group to protect the N^α amine. The removal of the Fmoc group required a reagent with moderate basic properties, necessitating the use of a less aggressive reagent compared to what was required for the removal of the Boc group [97].

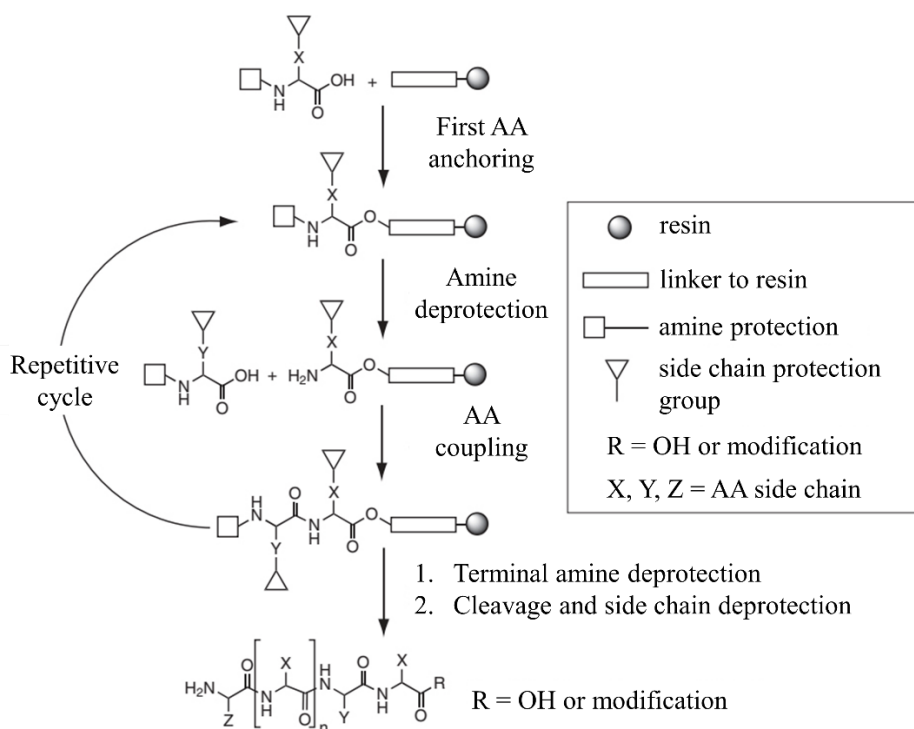


Figure 11 Peptide synthesis algorithm. Adapted from [98].

Peptide synthesis on solid phase is a readily automated process, utilizing specialized synthesis vessels with filters that facilitate easy exchange of the reaction reagents and washing of resin beads between the reaction steps (see Figure 11). When the correct synthesis reagents and conditions are chosen, the coupling of a single amino acid residue takes approximately 60–90 minutes, resulting in a 60–80% yield of the target peptide after synthesis. For the purification of such peptides, reverse-phase high-pressure liquid chromatography systems are commonly employed, with mass spectrometry used for precise determination of the peptide's mass [99].

This fast and high-yield process, enabling the rapid synthesis of grams of the desired peptide product, is particularly well-suited for the synthesis of biomimetic peptides. These biomimetic peptides, in turn, find applications in tissue engineering (see Figure 12).

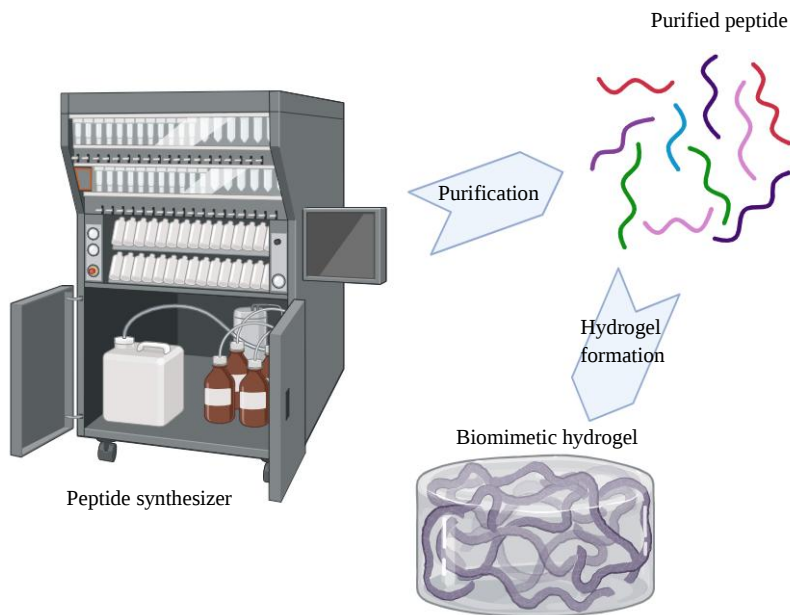


Figure 12 Use of a peptide synthesizer for the synthesis of biomimetic peptides enables further chemical manipulations to create a biomimetic hydrogel, well-suited for tissue engineering applications.

Chemical crosslinking of proteins

The covalent cross-linking of proteins and peptides facilitates the creation of stable and well-defined biomolecular structures. In this process, robust bonds are established between specific amino acid residues in peptides or protein chains. Common crosslinking techniques involve the use of reagents that selectively target functional groups, such as amines and thiols. Glutaraldehyde, formaldehyde, and succinimides are among the most commonly used crosslinking agents.

Covalently linked peptides or proteins play crucial roles in biological processes, both physiologically and pathologically. These covalent bonds can form in the endoplasmic reticulum of mammalian cells, or disulfide bonds between two cysteine (Cys) amino acid residues are formed in the Golgi apparatus [100]. Additionally, bonds can form between two tyrosines (Tyr) during the construction of the insect exoskeleton [101]. These bonds can occur between different regions of the same molecule or between different molecules, playing a vital role in stabilizing protein structures or influencing protein functionality [102].

In tissue engineering applications involving peptides or proteins, zero-length crosslinking agents play a crucial role. A prominent example is 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), which operates in the

presence of N-hydroxysuccinimide (NHS) (see Figure 13). This type of crosslinking, termed zero-length, is characterized by the absence of an additional spacer between the groups being joined [104].

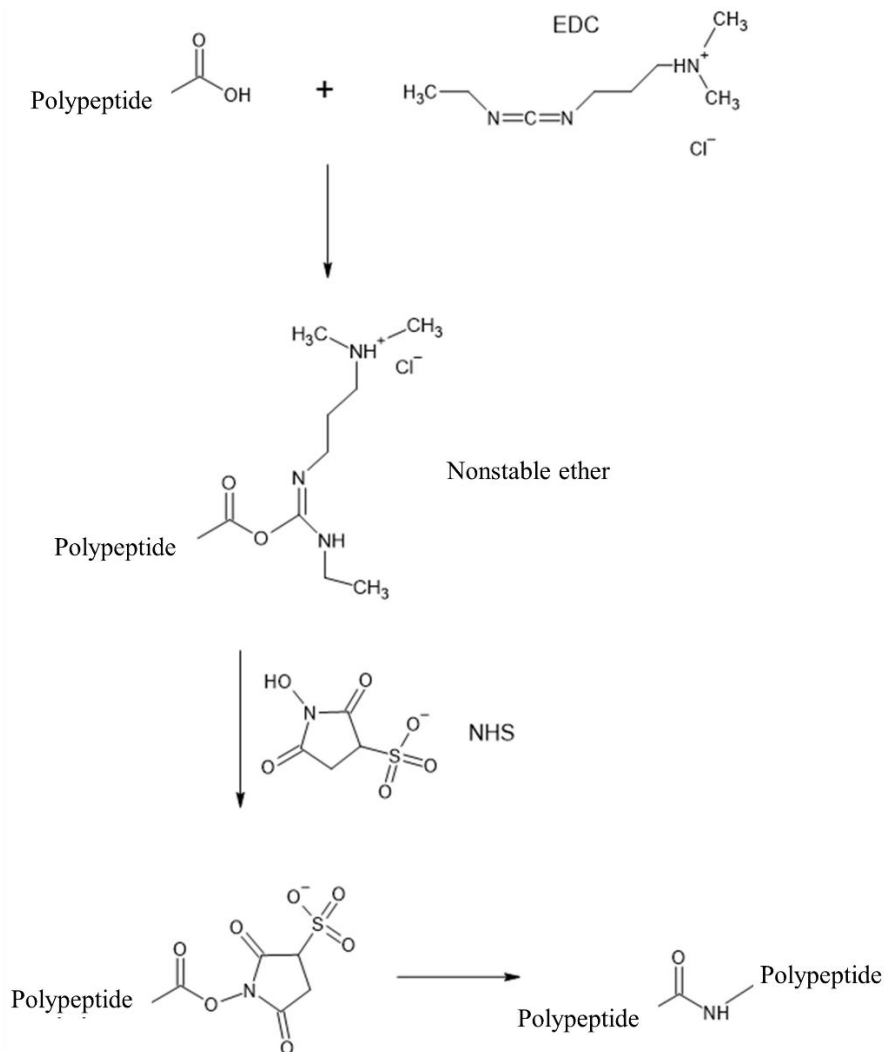


Figure 13. NHS/EDC reaction mechanism. Adapted from [105].

Another commonly employed zero-length crosslinking agent is 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholine chloride (DMTMM) (Figure 14). Originally developed for peptide synthesis applications, similar to carbodiimides, this reagent offers simplicity and operational ease [106]. In comparison to the NHS/EDC reaction, DMTMM is less sensitive to pH changes, and it functions effectively in the neutral pH range. The use of a

single reagent instead of a two-component system simplifies the reaction process [107]. Additionally, the use of DMTMM in peptide cross-linking has been noted to allow longer reaction times, thus facilitating the manipulation of the peptide solution and making it easier.

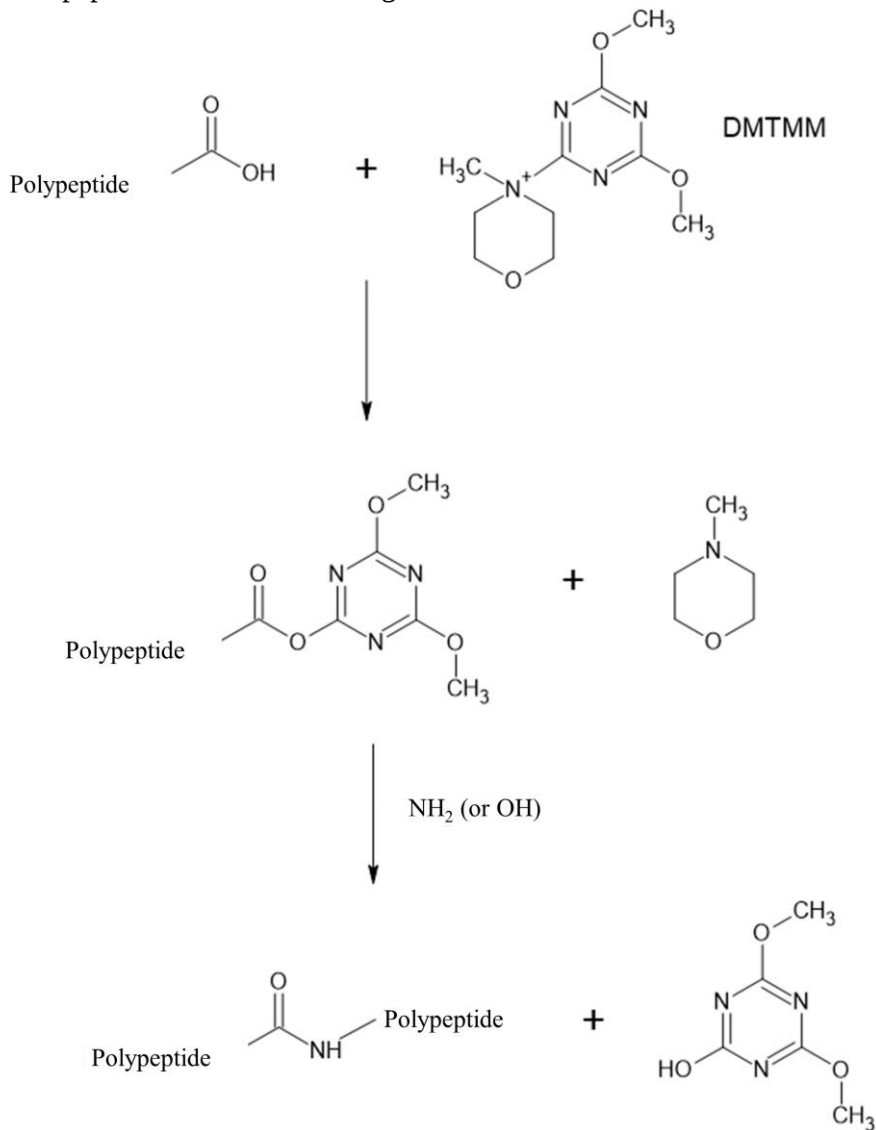


Figure 14 DMTMM reaction mechanism.

Micro- and nano-forming of hydrogel materials

Cell viability, physiology, proliferation, migration capability, and the interaction of cells with the tissue engineering framework *in vitro* or ECM *in*

vivo conditions are significantly influenced by environmental properties, including the stiffness, water content, and surface micro- and nanostructures [109]. In tissue engineering, precise control of these parameters is essential to develop a functional tissue *in vitro*. While conventional 2D substrates are commonly used for *in vitro* cell cultures due to their optimized conditions for cell adhesion and proliferation [110], it is crucial to acknowledge that such flat culture environments lack the ECM-specific characteristics provided by surface micro- and nanostructures. Consequently, experimental results obtained under flat cell culture conditions may deviate further from the *in-vivo* conditions [111].

To address this limitation, solid materials like silicon [112], titanium [113], zirconia [114], etc., are often chosen for creating tissue engineering constructs with surface structures. However, these materials pose challenges as they cannot act as semi-permeable membranes, thus hindering the diffusion of cellular metabolites and limiting applications such as cell cocultures. Moreover, their rigidity may not be suitable for all cell cultures. Some efforts have been made so far to microstructure soft materials like polydimethylsiloxane (PDMS), known for its excellent microforming properties. After additional chemical activation, PDMS can be coated with ECM proteins [115]. Nevertheless, it still falls short when attempting to ensure the transport of cellular metabolites. While there are examples of collagen or gelatine being used for nano- or micro-structuring, publications in this area often fail to provide long-term stability results.

Hydrogel materials as a permeability model

Hydrogel materials, owing to their proximity to native tissues, present a promising model for studying drug permeability. In this context, hydrogels can serve as a cell-free membrane or be employed with an organotypic layer of cells on the surface. This dual functionality allows for versatile applications in drug permeability studies, providing insights into how drugs interact with hydrogel structures in both cellular and non-cellular configurations.

Cornea permeability

The eye, with its intricate anatomy and limited contact surface (Figure 15), poses challenges for achieving therapeutic drug concentrations through local administration methods such as eye drops, ointments, or drug-releasing lenses. While intraocular injections or implants can maintain higher drug

concentrations, the topical application of medications, particularly eye drops, remains the most common and convenient self-administered approach [121]–[123].

However, this method has its drawbacks, including low penetration of drugs through the cornea, rapid clearance due to blinking and tearing, and potential leakage into the nasolacrimal duct, leading to a significant reduction in drug concentration within seconds of application [125], [126]. Despite these challenges, eye drops or ointments, although limited by the corneal permeability barrier, continue to be widely used for drug delivery [124]. The cornea's stratified keratinocyte epithelial layer acts as a crucial barrier, preventing the permeability of hydrophilic compounds, while the corneal stroma, primarily composed of water, forms the main barrier for hydrophobic compounds [127].

It is worth noting that higher concentrations of medicinal substances in solutions may lead to an increased viscosity, potentially causing discomfort, irritation, or blurred vision [121], [124].

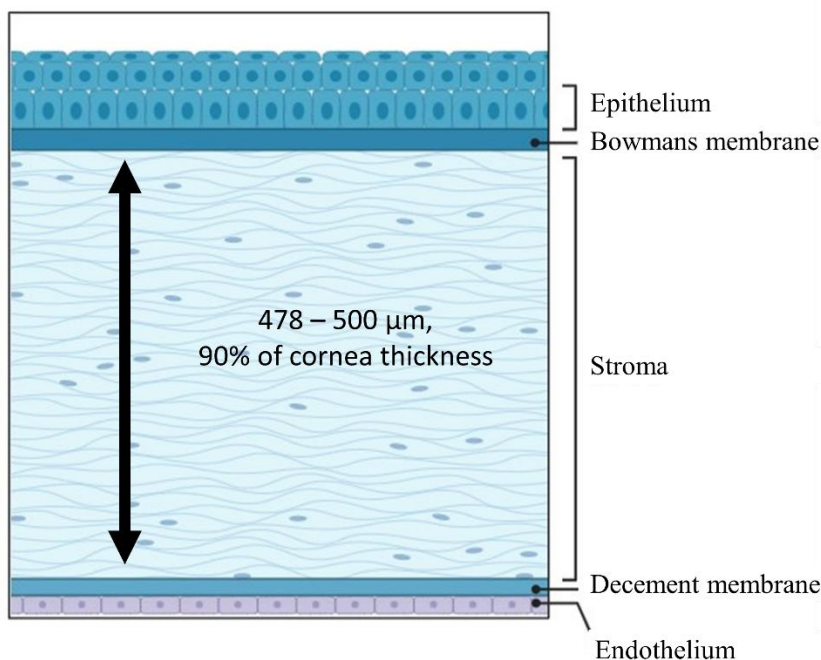


Figure 15 Schematic representation of cornea. Adapted from [126].

Assessing the permeability of substances through the cornea is crucial for the development of medications. While *ex vivo* corneas of the animal origin have traditionally been used for such assessments [128], the European

Parliament Directive 2010/63/EU recommends the use of synthetic analogues to address ethical concerns in drug validation [129].

Various corneal models exist for studying drug permeability, providing faster and more cost-effective results than *ex vivo* corneas. However, it has been observed that the published results for ophthalmic drug substances using corneal permeability models are currently insufficient [130], [131]. Although cellular models of the cornea are in the early stages of development, they show promising results and have the potential for assessing substance permeability or cytotoxicity. These models can be constructed by using only epithelial cells [132]–[134] or cultures of both epithelial and stromal cells [131], [135], [136]. In these models, collagen-based scaffolds are commonly chosen to mimic the natural stromal environment [137].

Formation of organotypic culture

Biomimetic materials, including collagen hydrogel with modifications and collagen-mimicking peptide hydrogels, are currently under development for the creation of organotypic tissue cultures. The organotypic cell culture involves growing biological tissues *in vitro* while preserving their normal physiology and functions, offering a valuable approach for research [138].

Cardiomyogenic differentiation

Dilated cardiomyopathy is a group of myocardial disorders marked by the enlargement of one or both ventricles and a diminished myocardial function (Figure 16). The condition is typified by the expansion of ventricular cavities and compromised systolic heart performance [139]. Initiated in the left ventricle, this disorder triggers the enlargement of the ventricular chamber, causing the walls to stretch and thin out. The altered volume of the left ventricle subsequently leads to the expansion of the right ventricle, followed by the atria and the entire heart [140]. In the presence of complications, dilated cardiomyopathy can result in heart failure, arrhythmia, and thrombosis, thus making it a significant contributor to human mortality [141]. The demand for tissue engineering solutions that enable the modification of cells or the extracellular matrix surrounding damaged tissues is substantial, especially as the current treatment approaches often culminate in heart transplants.

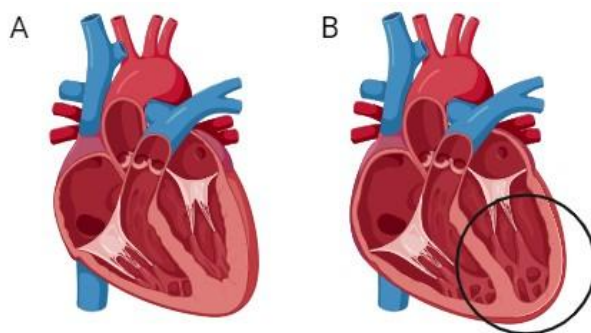


Figure 16 Schematic representation of dilated cardiomyopathy. A – cross-section of a healthy heart, B – pathological heart with an enlarged left ventricle. Adapted from [142].

Studies investigating direct injections of various stem cell types into the heart muscle or epicardium, including embryonic, induced pluripotent, hematopoietic, or mesenchymal stem cells, have been conducted both *in vitro* and *in vivo* [143]–[145]. However, these treatment strategies have encountered challenges such as immune responses, the potential tumorigenicity of the injected cells, and difficulties in accurately delivering cells to the target tissues [145]. Utilization of tissue engineering biomimetic scaffolds has shown promise in improving the viability of the transplanted cells, potentially enhancing the regenerative effects [146]–[148].

In vitro, cardiomyogenic differentiation can be induced by both intracellular and extracellular factors. Cells cultured under organotypic conditions experience less stress and exhibit better phenotypes [149]. Studies have demonstrated that mesenchymal stem cells isolated from tissues undergo changes in the cell shape and respond differently to external stimuli when cultured on plastic for extended periods [150]. Plastic surfaces cannot replicate the natural ECM environment in which cells grow *in vivo*, leading to altered intercellular interactions. Disruptions in interactions with ECM components and signalling pathways related to integrin interactions have been linked to myocardial hypertrophy, dilated cardiomyopathy, and heart failure [151]–[153].

The primary component of cardiac ECM is Type I collagen, constituting approximately 80% of the total extracellular matrix. The ability to modify the mechanical properties and incorporate additives into collagen biomimicking hydrogels makes them attractive candidates for studying cardiomyogenic differentiation [154]. Hyaluronic acid, another component of cardiac ECM, has been successfully used in rat heart tissue engineering [155]. In a recent study, a polymer of 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC),

structurally similar to cell membrane phospholipids, demonstrated anti-inflammatory properties [156].

Cerebellar cell cultures

The prevailing approaches for cultivating 2D and 3D neural tissue cultures mostly rely on adhesion-promoting substances like polylysine, polyornithine, laminin, fibronectin, collagen, and similar compounds [157]. While such cultures exhibit evenly distributed networks of neurons and glial cells and are convenient for study, the cell density and morphology in these cultures significantly differ from those observed under native tissue conditions. *In vitro* microglial cells often display a heightened inflammatory response, characterized by enlarged cells and short filaments, which contrasts with the morphology of branched microglia observed in the brain tissue. The latter consists of small cell bodies and highly branched filaments responsible for synaptic scanning and pruning [158], [159]. Although cells with strong interactions with the surface are easy to observe during experiments, they face challenges in movement and interaction with other cells, potentially hindering the formation of intercellular connections and the development of organotypic cultures.

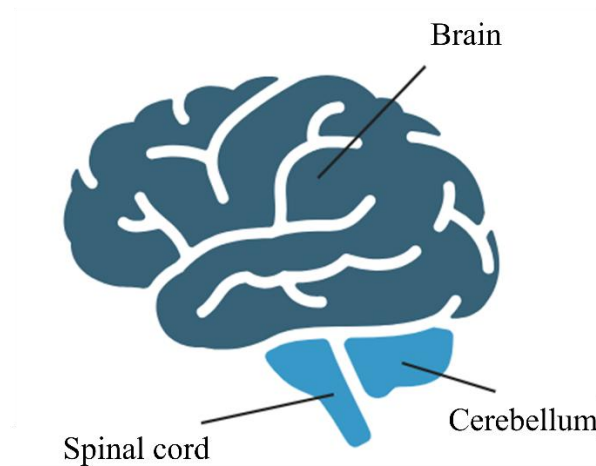


Figure 17 Schematic representation of brain, cerebellum and spinal cord. Adapted from [160].

RESULTS

Surface nanostructuring of collagen hydrogels

To assess the potential for nanostructuring collagen hydrogel, nanostructures were generated by using colloidal lithography on PDMS and polystyrene surfaces with the following radii of curvature (R_c) being selected: 126, 244, 505, 1515 nm. Collagen hydrogel sheets were then cast from these prepared PDMS and polystyrene surfaces, featuring submicrometric hemispheres, either protruding or hollow. The surfaces of the resulting hydrogels were examined by using atomic force microscopy (Figure 18).

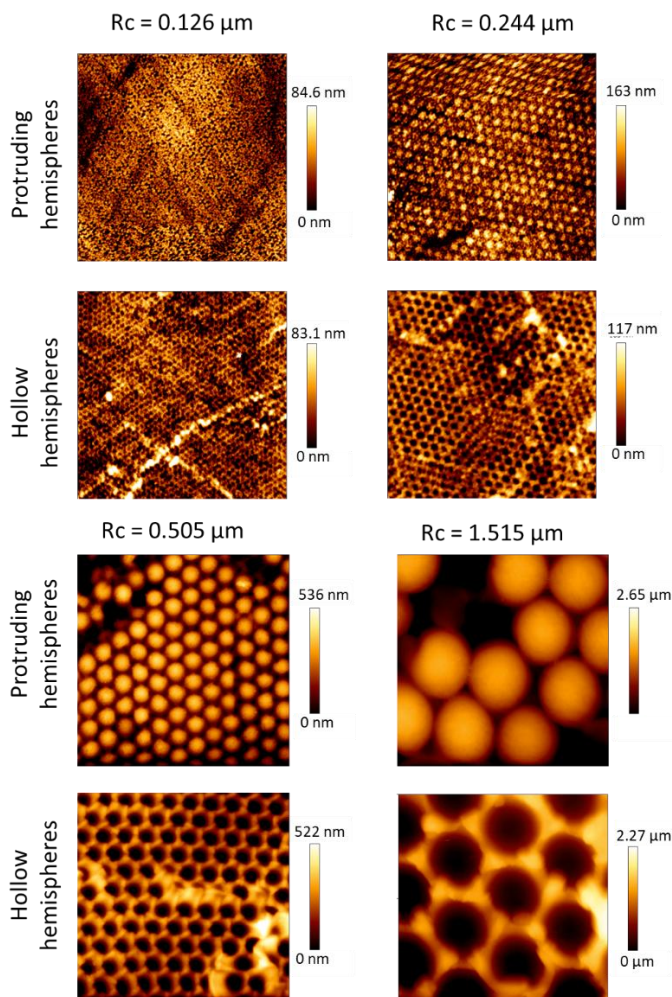


Figure 18 Atomic Force Microscopy (AFM) scanned image displaying structures, either protruding or hollow. Each captured image field measures $10 \times 10 \mu\text{m}$; the pictures were acquired by using the QITM force curve mode.

Surface nanostructures are commonly generated on various materials like gelatine [119], silicon [172], metal [116], [173], or PDMS [174]. When aiming to create an organotypic cell culture, the chosen material's stability (maintaining surface topographies for at least 14 days or more in the cell culture) and biocompatibility are crucial. Structures on gelatine often lack stability, while those on metal or PDMS need protein coatings to enhance cell adhesion and replicate the biological effect of ECM. Such surfaces may not serve as semipermeable membranes and are not suitable for air contact culture or closed cavity formation.

The structures formed on collagen hydrogel were assessed by cultivating a human skin fibroblast culture on their surface, with vinculin protein labelling to assess focal adhesion (Figure 19). Examination of cells on the structures reveals that, in the case of raised structures, cell adhesion occurs on top of the spheres, whereas, in the case of sunken structures, adhesion occurs on the lattice formed by the spheres. While AFM images show that the cell surface replicates the substrate surface structures, fluorescence microscopy images do not reveal the structures.

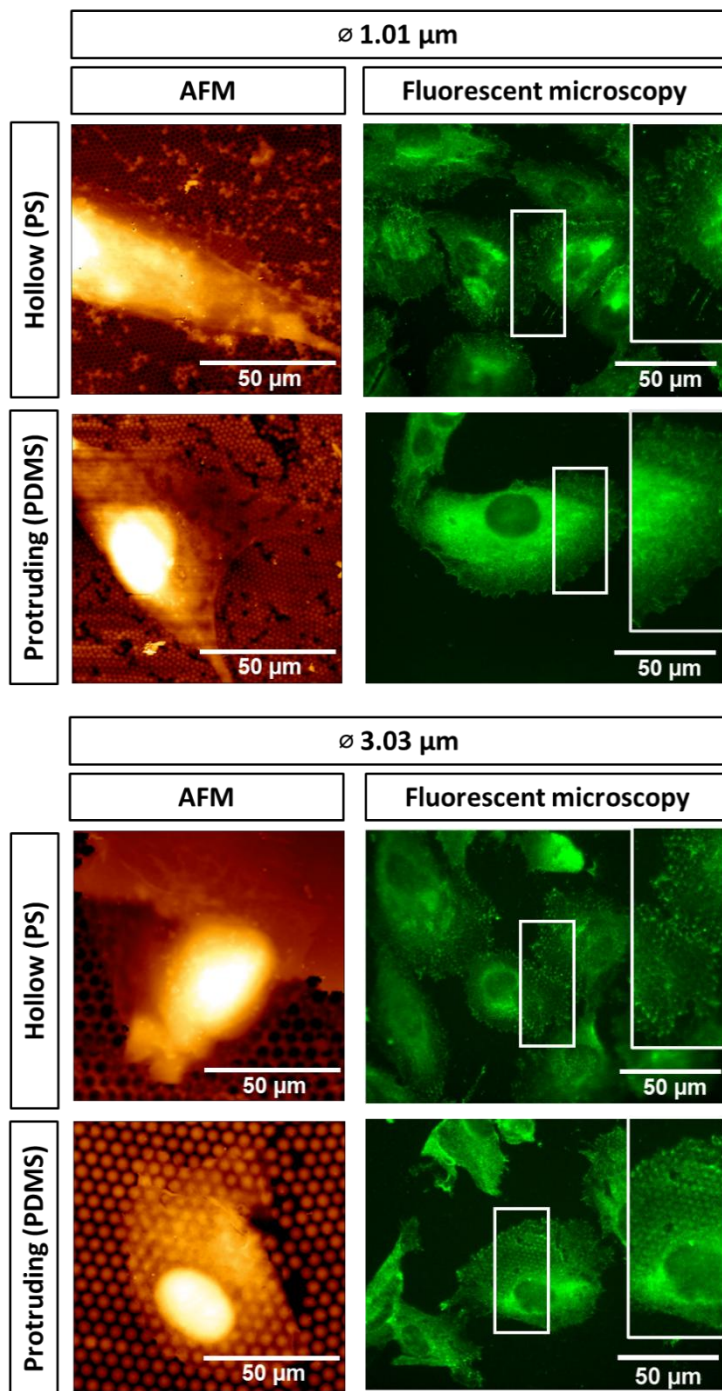


Figure 19 Images obtained through atomic force microscopy and fluorescence microscopy depict growing human skin fibroblasts on nanostructured surfaces. In the AFM images, the cells appear to replicate the surface structures. However, in vinculin imaging, the structures are only discernible on the largest structures, whether indented or raised.

Following the acquisition of images, cell morphology parameters were analyzed to evaluate potential differences based on the surface nanostructures. The selected parameters for analysis included the surface area occupied by cells, the cell shape factor, and the cell perimeter.

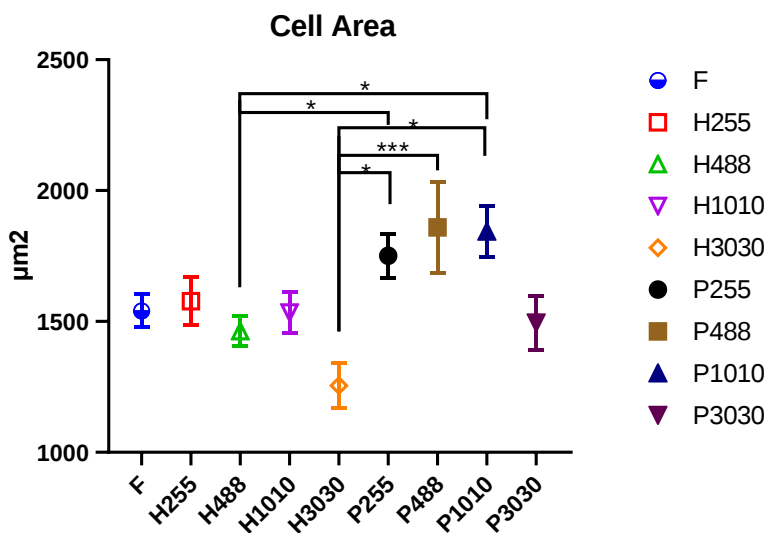


Figure 20 Average cell area on distinct types of structures. The calculation of cell area utilized the CellProfiler software, where the average cell area was determined by counting the number of dots per cell and converting the measurements to square micrometers. The labels provide information on different conditions: F – flat hydrogel surface, H – hollow structures (with the number indicating the sphere diameter), P – protruding structures (with the number indicating the sphere diameter).

The analysis of the average cell areas reveals two main tendencies (Figure 20). The flat surface, H255, H488, and H1010 sample groups exhibit similar results. The H3030 group, characterized by a larger spheroidal lattice, shows the smallest cell area. In contrast, P3030, with the largest raised structures, has a cell area close to that of a flat surface, possibly due to the relatively small gaps between structures. Cells on surfaces with raised structures in P255, P488, and P1010 exhibit a higher surface area compared to other sample groups. These findings align with results obtained by *Makita et al.*, who studied structures of a similar size on gelatine hydrogels by using the *Saos-2* cell line [119].

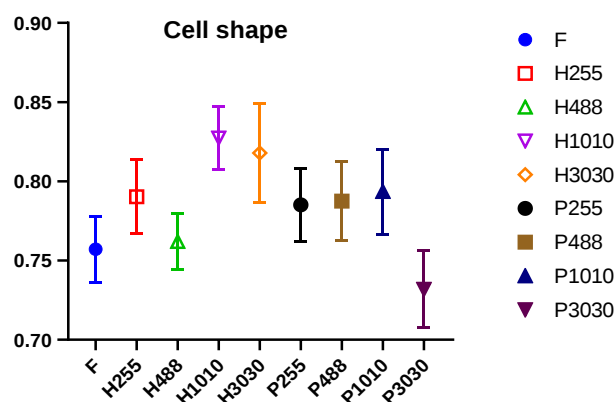


Figure 21 Assessment of cell shape was conducted by using the CellProfiler software. The y-axis represents the cell's shape factor values, ranging between 0 and 1, where 1 indicates a straight line and 0 represents a perfect circle, though these extremes are rare.

In the analysis of the cell shape, it was observed that the cell shape on structured surfaces closely resembled the cell shape on flat hydrogels (Figure 21). This observation may be attributed in part to the mechanical properties of the surface.

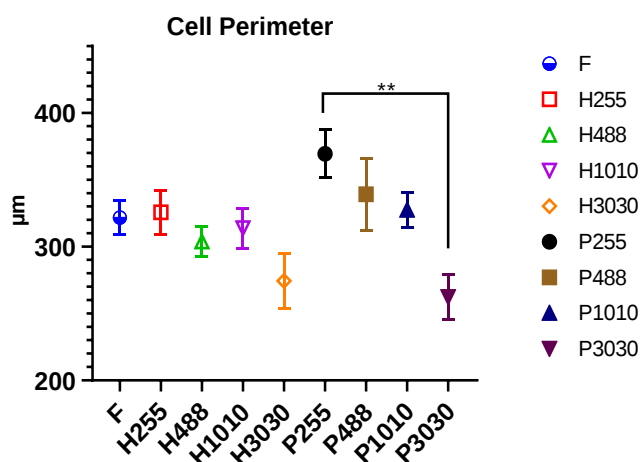


Figure 22 Cells were analysed by using the CellProfiler software to assess the perimeter, which was quantified by counting the number of dots along the cell border and converting the measurements to micrometers.

In the analysis of the cell perimeter (Figure 22), no significant differences were observed between the sample groups, except for P255, which stood out with the highest average perimeter, and P3030, which had the lowest average perimeter among the sample groups.

Surface microstructuring of collagen hydrogels

Upon creating hydrogels with nanostructures on the surface and evaluating their properties, the focus shifted to the preparation of hydrogels with microstructures on the hydrogel surface using soft lithography, akin to the process employed for nanostructure formation. For the initial experiment, right triangles were chosen as the microstructure, and human skin fibroblast cells were subsequently seeded on the surface (Figure 23). After 7 days of cultivation, images were analysed by using the *ImageJ* software, measuring the grey value of pixels at the corner of the triangle (as indicated in the figure). The grey value of pixels was compared between the smooth hydrogel and the structured surface after 7 days of cultivation, revealing that cells occupied the formed triangular cavities. This aligns with the findings of *Yu et al.*, where fibroblasts similarly filled holes on the hydrogel surface.

Additionally, the images illustrated a notable alignment of the cell culture along the longest side of the triangle. This aligning behaviour is reminiscent of the results obtained by *Vernon et al.*, who observed skin fibroblasts aligning along the surface of grooves when cultivated on a surface with such features [176]. The consistent alignment patterns across different studies underscore the reproducibility and significance of this observed phenomenon. The ability to manipulate and guide cell alignment through surface microstructuring holds promising implications for applications in tissue engineering and the development of biomimetic materials.

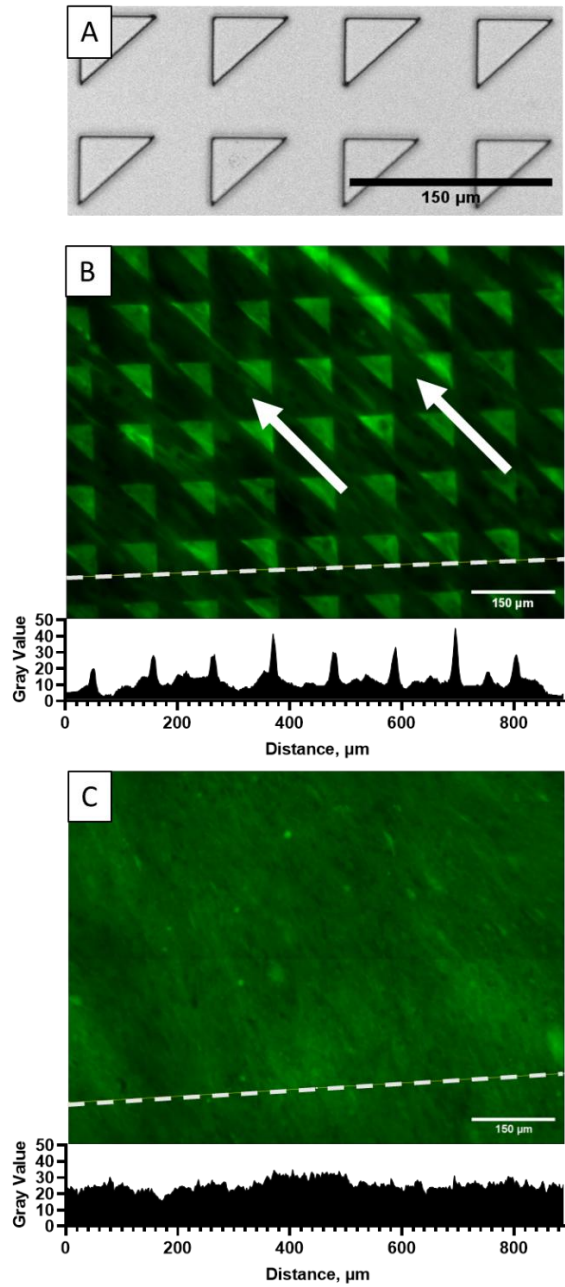


Figure 23 The pixel grey value was assessed on a hydrogel with microstructures (B) and on a flat hydrogel (C) after 7 days of cultivating human skin fibroblasts. The microstructured surface was created through soft lithography using a PDMS mold (A). The mold featured right-angled isosceles triangles with lateral sides measuring 50 μm and a distance of 30 μm between triangles. The arrows indicate the direction of cell orientation on the microstructured surface. This experimental setup allowed for the quantitative evaluation of cellular responses to the microstructured hydrogel compared to a flat hydrogel, providing insights into the cell behaviour and alignment in response to the engineered microenvironment.

Evaluation of cell proliferation and hydrogel stability

For the assessment of hydrogel stability and cell proliferation, three distinct microstructure templates were employed on collagen hydrogels. These templates consisted of channels with varying widths (30, 60, and 200 μm), and the gaps between channels were maintained equal to the channel width (Figure 24). The hydrogels were subjected to a cell growth medium, simulating the conditions of a cell experiment, and were incubated in a cell incubator at 37°C with a 5% CO_2 environment. This experimental setup aimed to investigate the impact of different microstructures on hydrogel stability and the subsequent behaviour of cell proliferation within these structures.

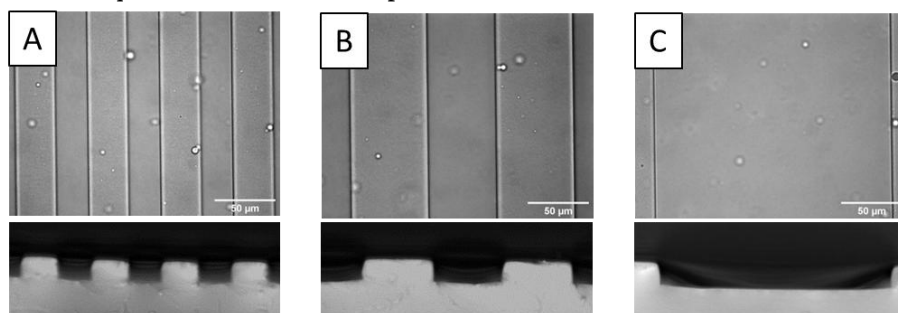


Figure 24 The structures chosen for evaluation included three variations with cross-sectional views provided below. A – 30 μm wide channels with 30 μm wide gaps. B – 60 μm wide channels with 60 μm wide gaps. C – 200 μm wide channels with 200 μm wide gaps. These distinct configurations were employed to assess the influence of the channel width and the gap dimensions on hydrogel behaviour and cell proliferation.

Stability was quantified by assessing variations in width and height, the water content, and Young's modulus. Across all measurements, the absolute deviation of height or width remained consistently below 1 μm , indicating minimal alterations in these dimensions.

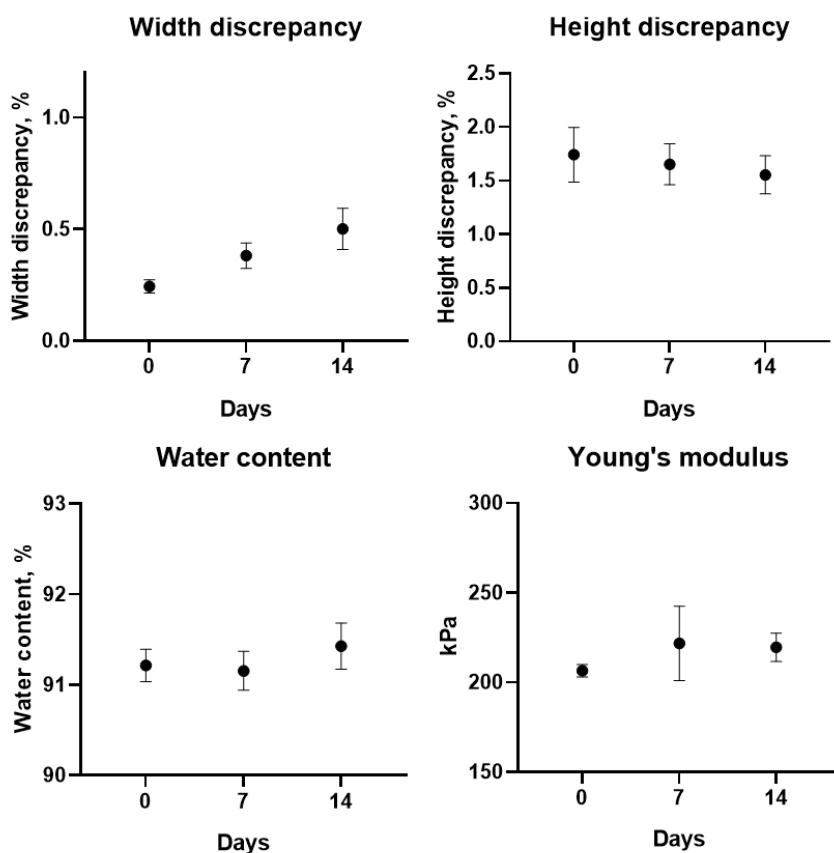
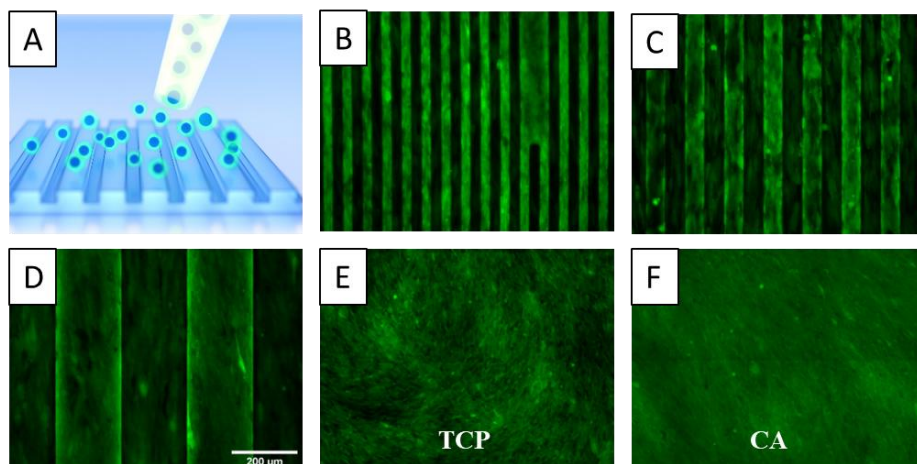


Figure 25 Parameters were evaluated in cell culture medium at 37°C for 14 days. Deviations in area and height were assessed by using optical microscopy, while the water content was determined by weighing hydrated and dry samples. Young's modulus was measured by using AFM.

The stability data indicates that the hydrogel remains unchanged for at least 14 days in terms of the dimensional structure, stiffness, and swelling (Figure 25).



Cell proliferation

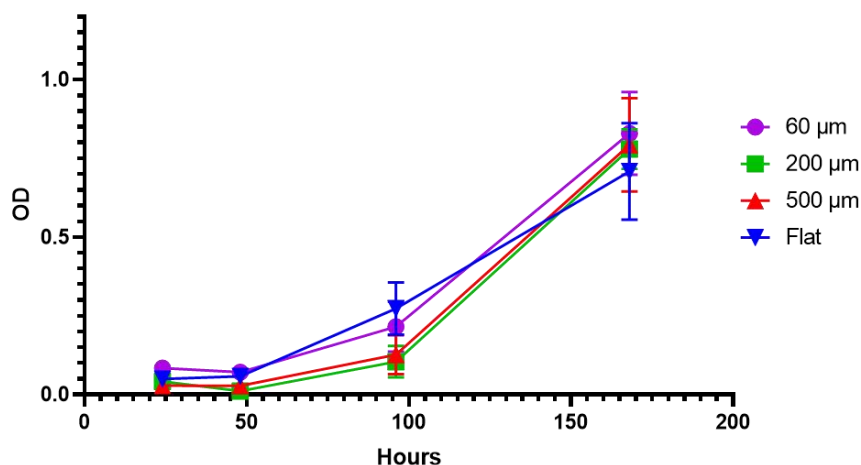


Figure 26 Fluorescence images of human skin fibroblasts on the surface of hydrogels are presented. The seeding process is schematically represented in Figure A. Cells were seeded on pre-selected microarray surfaces of 30 μm (Figure B), 60 μm (Figure C), and 200 μm (Figure D), as well as on a plastic plate (Figure E) and on a flat collagen hydrogel surface (Figure F). The graph below shows cell proliferation.

The proliferation graph shows that the surface with microstructures does not exert a negative impact on the cell growth (Figure 26). It is similar to growth on a smooth hydrogel surface.

Multilayered collagen hydrogels

The possibility of stacking and chemically crosslinking pre-formed collagen hydrogels allows for the formation of niches for cell growth. This

technique has been utilized in the production of enclosed macrometric hydrogel wells (Figure 27). A 20% DMTMM solution was used to crosslink the hydrogel disks together. Disks of the desired size can be used in a multi-well plate format (Figure 28).

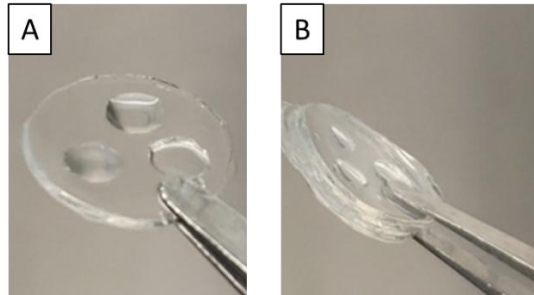


Figure 27 Photos of a hydrogel disc with volumetric wells. A – hydrogel disc with 3 mm diameter volumetric wells formed. B – layered and crosslinked hydrogel with closed volumetric wells.

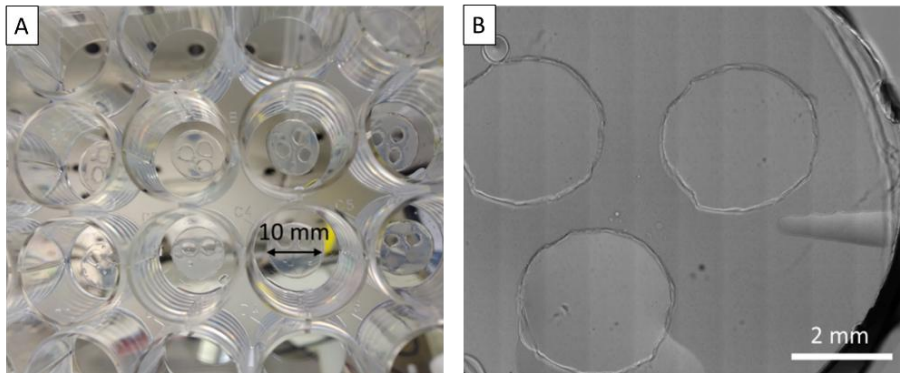


Figure 28 Hydrogel with macrometric niches is adapted to the multiwell format. A light microscopy image (B) and an image in a multiwell plate (A) are shown.

Importantly, the top layer of hydrogel covering the well could only be applied after seeding of the human dermal fibroblast cells, which would imply contact of the cell culture with the crosslinking agent DMTMM, but, after 7 days, the cells had completely outgrown all wells (Figure 29).

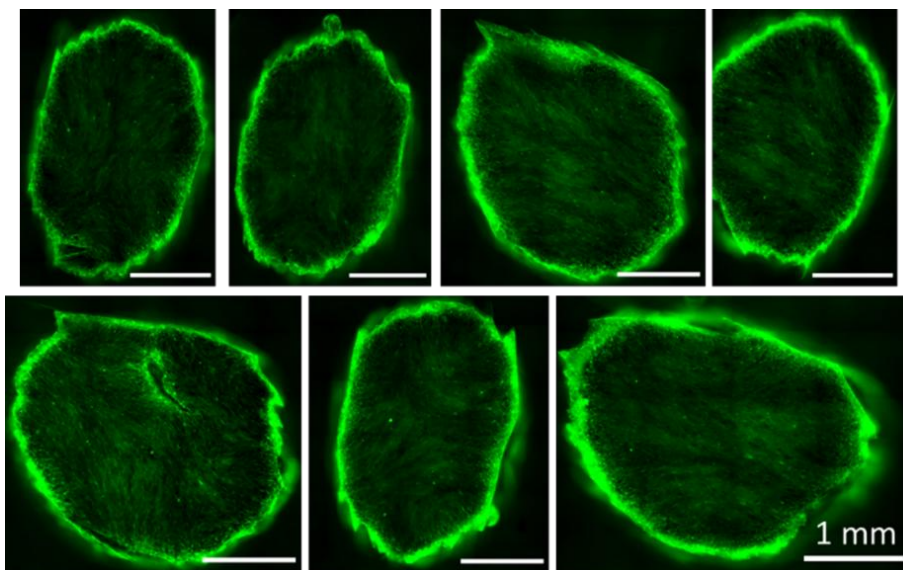


Figure 29 Fluorescence microscopy image of macrometric-sized closed cavities filled with human skin fibroblasts.

The cells growing in the formed cavities did not penetrate between the layers of the hydrogel sheet, which would imply the effective formation of closed cavities. Higher fluorescence intensity on the edges of the formed cavities would indicate a higher number of cells at the edges and cells growing vertically on the formed wall.

Cell ingrowth model

A cell ingrowth model was developed by using the collagen hydrogel sheet layering technology. The developed device allows the cells to be seeded in a specially shaped area, and further cell ingrowth occurs through channels formed by soft lithography (Figure 30). Human skin fibroblast cells were used for the study. Cell viability was not assessed during the 7-day experiment, but cell proliferation in the channels was similar to that obtained on the surface of the microscopic channels, suggesting that the hydrogel functions as a semi-permeable membrane and ensures the access of nutrients to the cells and the removal of their growth metabolites.

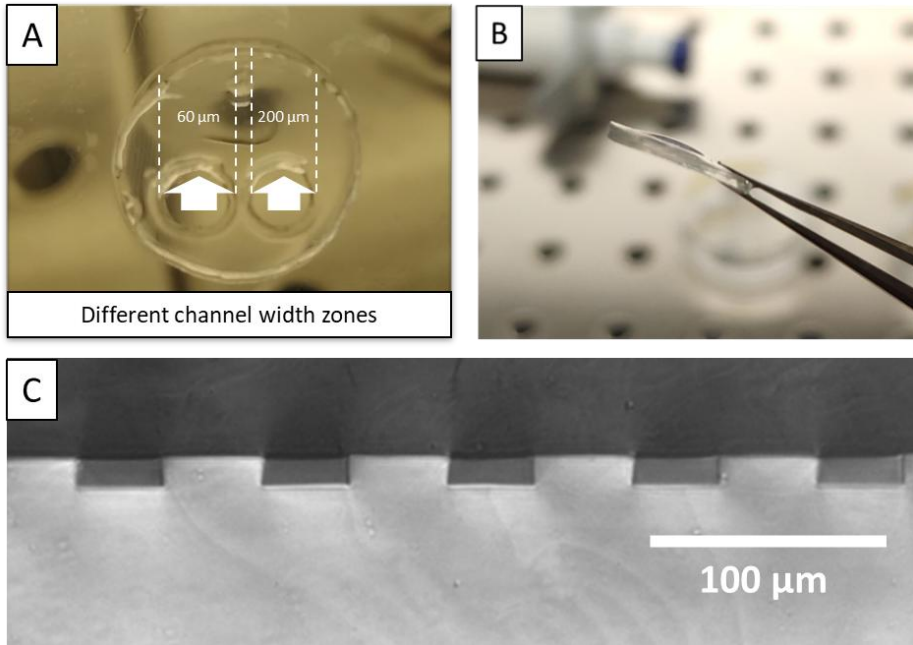


Figure 30 Construct for assessing cell ingrowth. One bilayer hydrogel construct (B) may have zones (A) with different channel widths. A side section of the construct is shown below, with a channel width of 60 μm and a depth of 20 μm (C).

The 7-day cell experiment shows that the cells grow more slowly in the wider channels. This could be explained by the fact that, as the distance between the corners of the channel increases, the rate of cell ingrowth decreases. Similar results were obtained by Gonzalo *et al.*, where cells were grown on a microstructured PEG surface and the growth rate was lower in the wider channels [177].

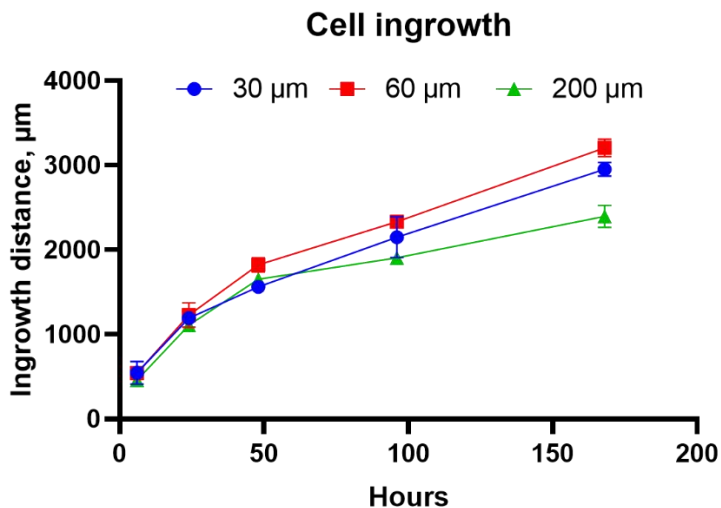
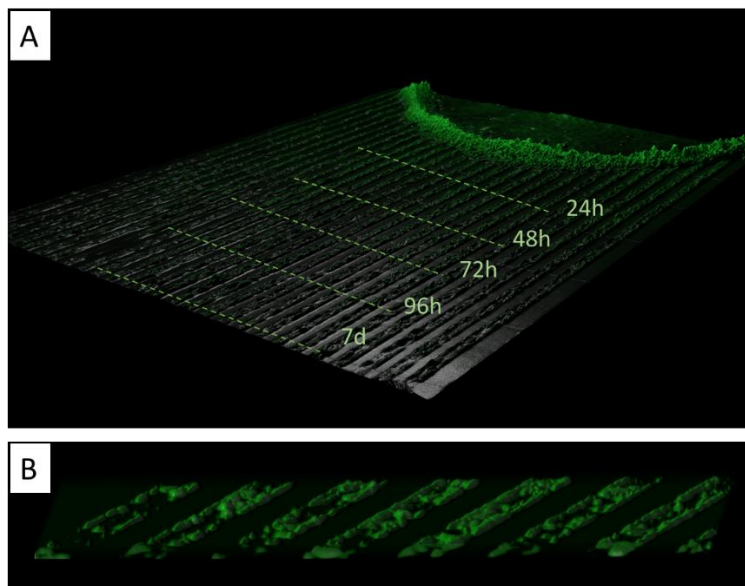


Figure 31 Pseudo 3D image of cell ingrowth in 60 μm channels, with the distances over which the culture has grown in the indicated time (A). A true 3D image of the 60 μm channels, with the distribution of cells in the channels. A plot of cell ingrowth distance versus time is shown above.

From the graph above (Figure 31), it can be seen that the growth in the wider channels slows down at 96 hours, and there is already a significant difference in the 7-day assessment. It can be seen that the cells proliferate for 7 days in the closed channels, meaning that the surrounding hydrogel ensures the transport of nutrients to the cell culture. This type of the ingrowth pattern

can be used to assess the ingrowth of cancer cells or the formation of the circulatory system [178].

Corneal permeability model

The aim of the study was to develop an artificial corneal permeability model based on a collagen hydrogel with a grown layer of stratified cells and to test it as an alternative to *ex vivo* rabbit corneas for measuring permeability. Molecules with different physicochemical properties, including ophthalmic pharmaceuticals, were tested, and the permeability was compared with rabbit corneas as the model system.

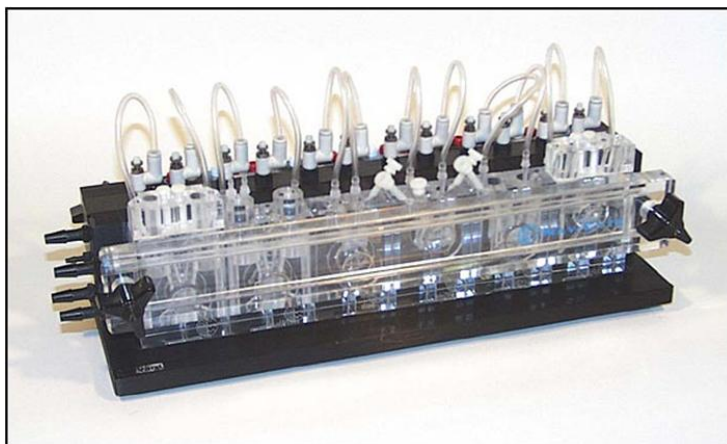


Figure 32 Throughput measurement device used in the NaviCyte vertical camera system, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA.

In order to be able to use collagen hydrogels in such a high throughput chamber (Figure 32), PLA holders were designed (Figure 33), fabricated and tested by using a 3D printer with additional collagen hydrogel coating (Figure 34).

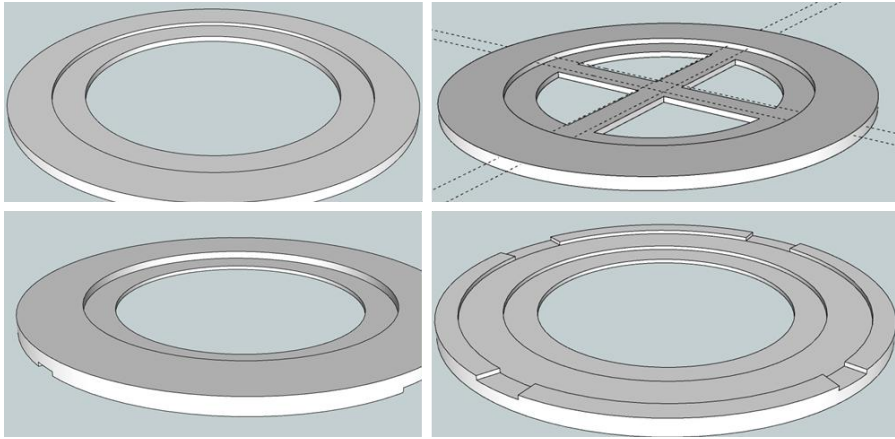


Figure 33 Different versions of the holder, into which collagen hydrogels were cast, were tested,

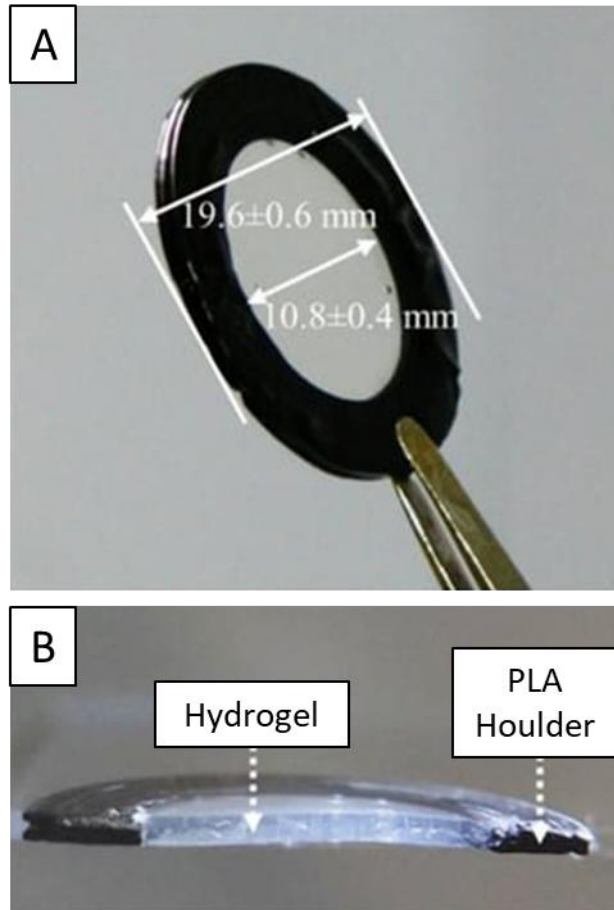


Figure 34 Hydrogel and plastic holder construct (A) suitable for cell culture. Cross-section of the hydrogel and the holder (B).

From the histological images below (Figure 35), it can be seen that just as cells grown on a plastic membrane, cells grown on a collagen hydrogel express ZO-1 protein and occludin, which are responsible for the formation of tight junctions between corneal keratinocytes, which in turn affect the penetration of substances through the formed tissue [179].

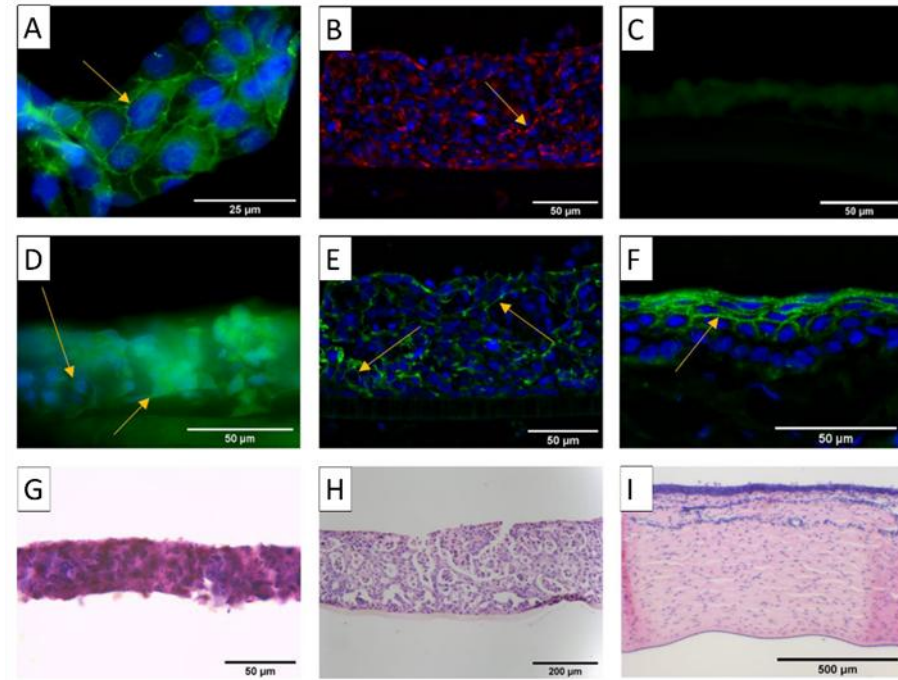


Figure 35 In vitro immunohistochemistry of corneal models and rabbit corneas. ZO-1 protein, responsible for the formation of tight junctions between cells, was stained green in the epithelium of human corneal keratinocytes (A), ZO-1 protein was stained red in the corneal model (B), and a negative control of ZO-1 protein was performed on collagen hydrogel (C). Immunofluorescence staining of occludin (green) on collagen hydrogel (D), cells grown on plastic membrane insert (E), rabbit ex vivo cornea (F). Cell nuclei stained with blue spava (A-F). Yellow arrows indicate the sites of tight junction formation. Hematoxylin and eosin-stained sections with a human corneal epithelial multilayer on collagen hydrogel (G), plastic membrane liner (H), ex vivo rabbit cornea (I).

The measured permeability values for a collagen hydrogel cell multilayer grown on a plastic membrane liner are presented below and compared to the permeability values for a rabbit cornea as a model system (Figure 36).

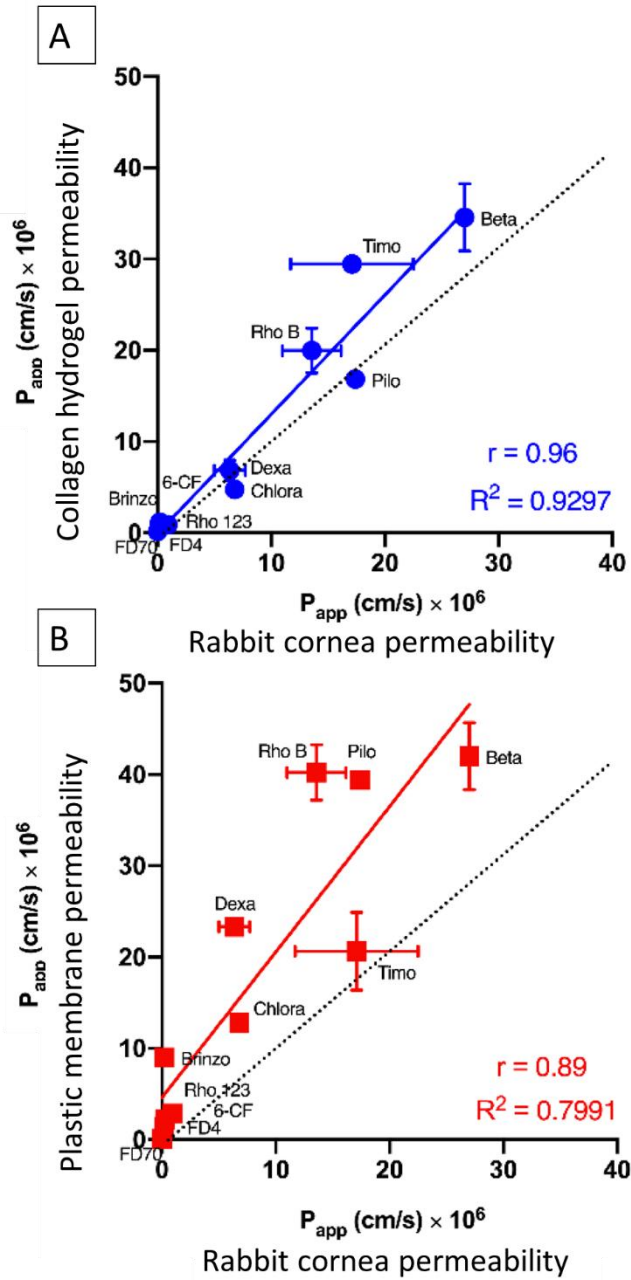


Figure 36 Linear regression of the permeability coefficient $P_{app} (cm/s) \times 10^6$ of the tested materials on a corneal permeability model based on a collagen hydrogel (A), a cellular sandwich grown on a plastic membrane liner (B) and rabbit cornea. The Pearson correlation coefficients (r) for the in-vitro corneal model with hydrogel and cells grown in cell culture inserts were $r = 0.96$ and 0.89 respectively. The dotted lines in the figures indicate perfect correlation ($r = 1$). The goodness of fit of the correlation (R^2 value) describes how well the corneal model matches the rabbit corneal permeability values.

The correlation shows that the collagen hydrogel-based system is a better match to the corneal permeability values of the rabbit eye compared to a cell grown on a plastic membrane as a corneal permeability model.

Cardiomyogenic differentiation on biomimetic hydrogels

The objective of the experiment was to assess cardiomyogenic differentiation from human myocardial mesenchymal stromal cells (mMSL) obtained from both healthy and pathological tissues. Based on prior findings, that cells exhibit robust growth on plastic plates coated with Type I collagen, collagen hydrogels were selected as the biomimetic surface. Three variations were utilized (Figure 37):

- 1) Type I collagen hydrogel (CA);
- 2) Type I collagen hydrogel modified with phosphorylcholine (CA-MPC);
- 3) Type I collagen hydrogel modified with hyaluronic acid (CA-HA).

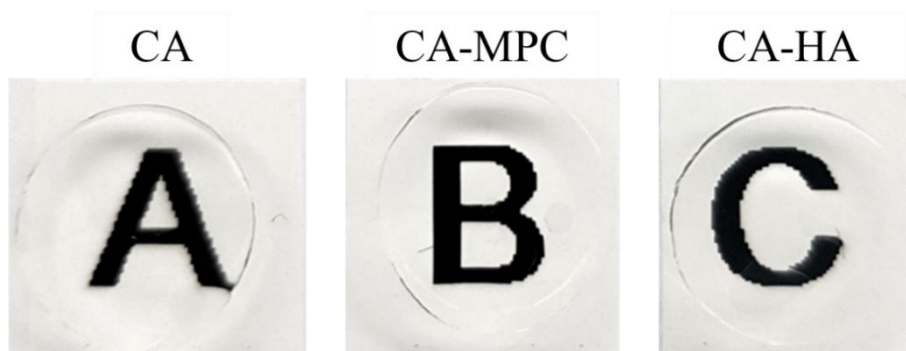


Figure 37 Visual evaluation of the transparency of the produced hydrogels.

The manufactured hydrogels underwent assessment through measurements of water content, Young's modulus, and visual inspection for transparency (Table 1). The collagen hydrogel (CA) with a theoretical collagen content of 8.5% exhibited the highest Young's modulus (140.28 ± 7.20 kPa). Hydrogels modified with MPC and HA showed lower values: 96.09 ± 13.19 kPa and 113.02 ± 35.05 kPa, respectively. The addition of 0.05% (w/w) HA led to some swelling in the collagen hydrogel, as evidenced by the water content and stiffness measurements. The lower CA-MPC values can be attributed to the reduced collagen content in the mixture, specifically, 6.5% (w/w) instead of 8.5% (w/w).

Table 1 Hydrogel stiffness and water content evaluation results.

Hydrogel type	CA	CA-MPC	CA-HA
Water content, %	95.51 ± 0.12	94.71 ± 0.41	93.06 ± 0.12
Young's modulus, kPa	140.28 ± 7.20	96.09 ± 13.19	113.02 ± 35.05

Isolated healthy and pathologic mMSLs were cultured on hydrogel surfaces for 24 h, and the cell viability was assessed by using the CCK8 kit (Figure 38). On the collagen hydrogel without modifications, cells were observed to adhere better to the surface, and even alignment of healthy mMSL cells could be observed (as indicated by arrows). It can also be observed that healthy cells showed better adhesion to the surface than pathological cells.

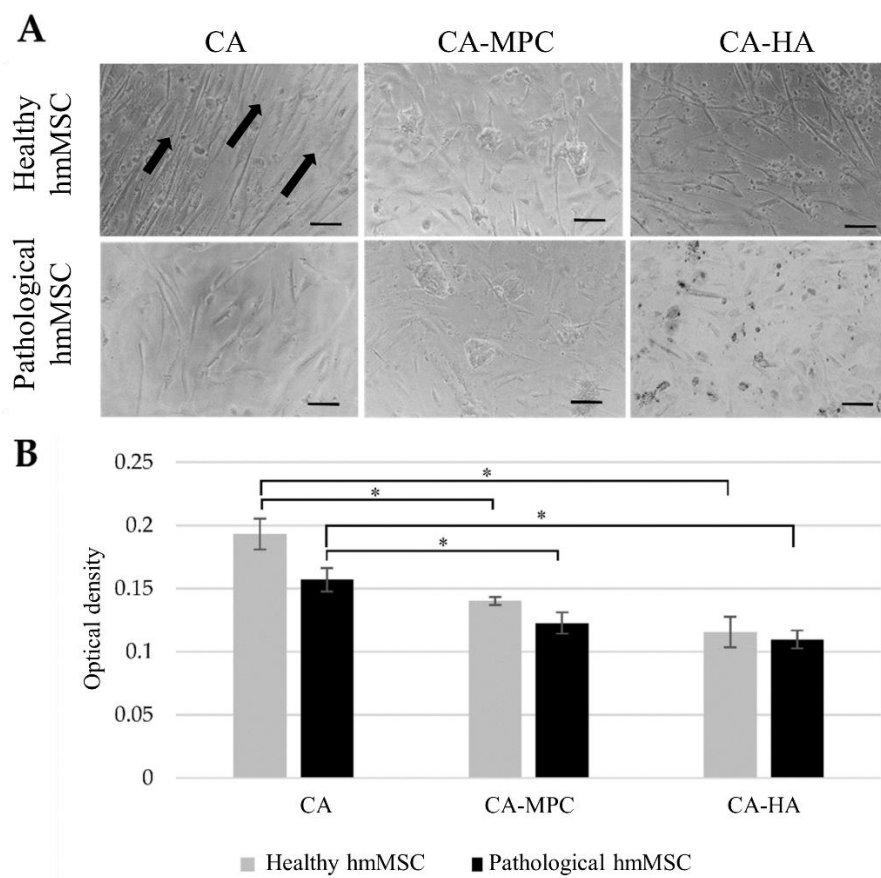


Figure 38 Bright field microscopy images depict healthy and pathological mMSLs on various collagen hydrogel modifications (A). The absorption of CCK8 after 24 hours of cell

culture reveals significant differences among different hydrogel groups. The scale bar length is 100 μm .

The activity of histone deacetylases (HDAC) in pathological mMSL cells was found to be 1.5 times higher than in healthy cells. To assess gene expression, the HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was utilized.

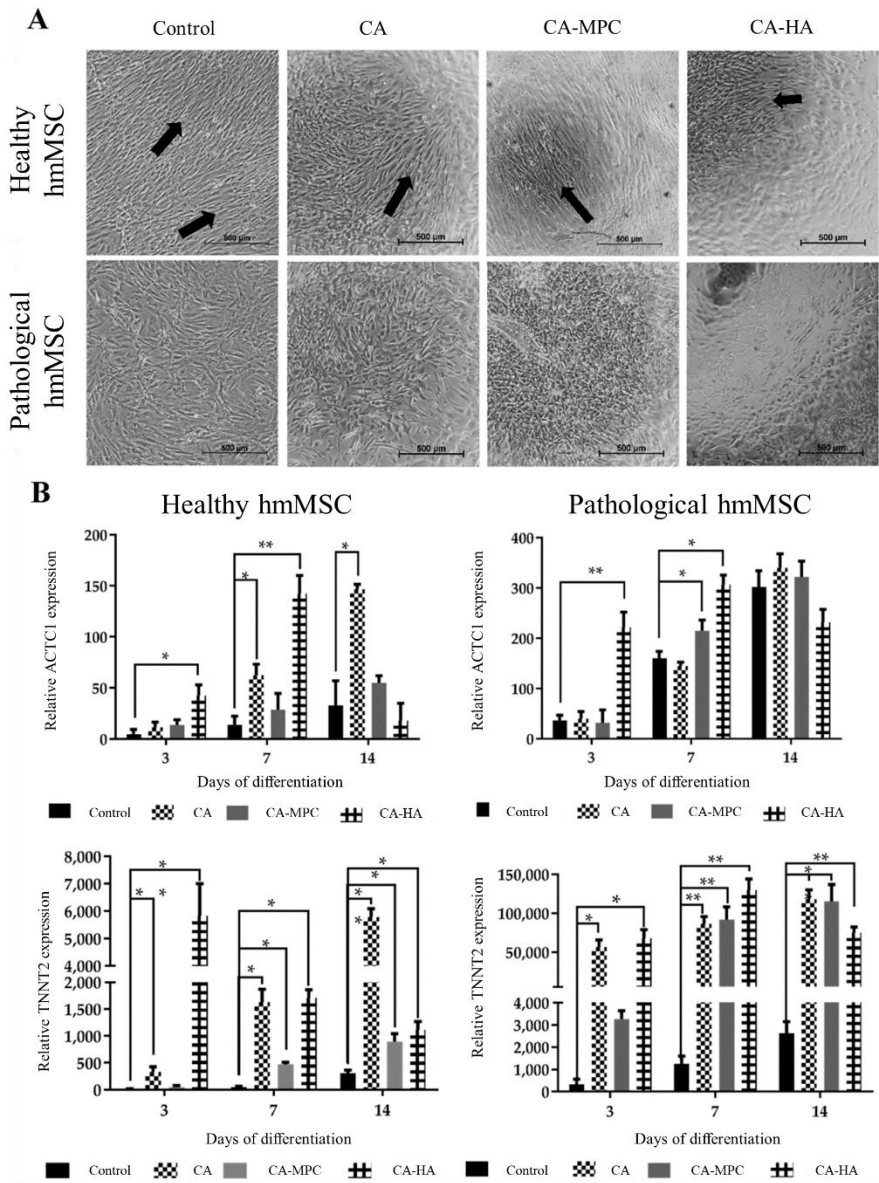


Figure 39 ACTC1 and TNNT2 gene expression in healthy and pathological mMSLs exposed to 1 μM SAHA was evaluated over a 14-day period, with measurements conducted on days 3,

7, and 14. Cell morphology was assessed by optical microscopy on day 14 of growth, with arrows indicating areas where cells aligned in the images (A). The gene expression data are presented for healthy and pathological cells, focusing on the ACTC1 and TNNT2 genes (top and bottom) across various collagen hydrogels and a plastic control (B).

Different hydrogels exhibited varied results in ACTC1 gene expression, with the highest expression observed on collagen with hyaluronic acid (CA-HA) for both healthy and pathological cells on day 7 of growth. In all cases, higher ACTC1 gene expression was noted when assessing pathological cells (Figure 39).

A similar pattern emerged in the assessment of the TNNT2 gene, where the gene's expression on days 3 and 7 was higher on the collagen hydrogel with hyaluronic acid. In both cell types, the lowest TNNT2 gene expression was observed on the plastic surface.

In summary, when examining both genes, their increased activation was evident in pathological cells, thus suggesting a certain regenerative potential under appropriate stimulation.

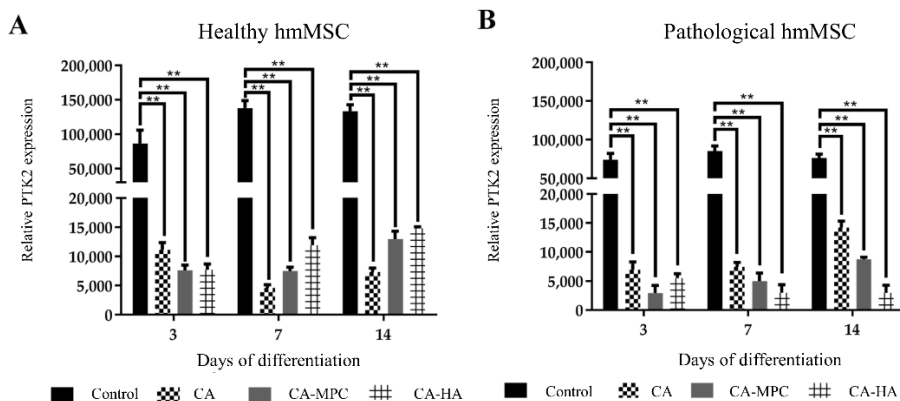


Figure 40 PTK2 gene expression in healthy (A) and pathological (B) mMSLs exposed to 1 μ M SAHA for 14 days (measurements on days 3, 7 and 14).

The expression of the PTK2 gene is noticeably higher on the plastic surface compared to collagen hydrogel and collagen hydrogels with modifications in all instances. This disparity can be attributed to significantly different mechanical parameters, with the Young's modulus of the plastic surface being approximately 100 times higher. Such rigid materials are not typically found in the soft tissue extracellular matrix (Figure 40).

In conclusion, the use of collagen and modified collagen hydrogels reveals positive cardiomyogenic differentiation with an increased expression of selected genes when combined with the HDACI inhibitor SAHA. Positive dynamics are also evident in pathological cells, indicating that these hydrogels could be explored as a tool in regenerative medicine.

Cerebellar cell culture on biomimetic hydrogels of synthetic and natural origin

In this experiment, hydrogels composed of collagen (CA) and collagen-mimicking peptides conjugated with PEG (CLP-PEG) were employed. Before conducting the cell study, various microscopy techniques were assessed to characterize the flat surface of the material (Figure 41).

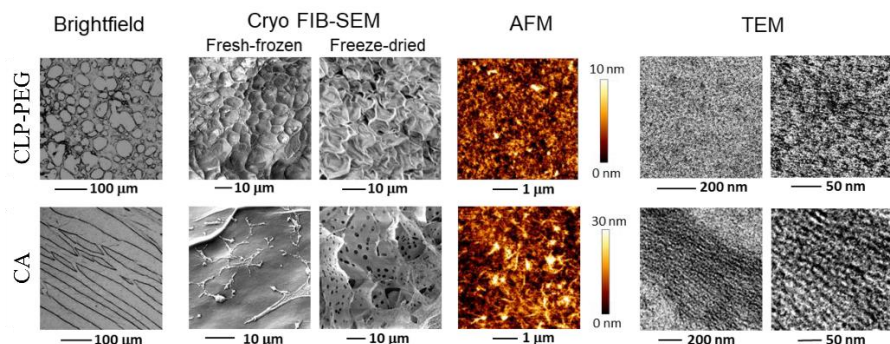


Figure 41 Surface characterization of CA and CLP-PEG hydrogels by different imaging methods at the micro and nano scales.

The surface of CLP-PEG appears smoother and more densely packed at the nanometer scale. This suggests a higher degree of organization and possibly a more uniform structure on the surface. In contrast, the collagen hydrogel surface seems to be characterized by filaments at the nanometer scale. TEM images reveal that the collagen hydrogel contains filaments that are tens of micrometers long. On the other hand, TEM images of CLP-PEG show gaps that are less than the range of hundreds of nanometers. This suggests a finer and more compact structure at the nanoscale level, possibly contributing to different mechanical and biological properties compared to collagen hydrogel.

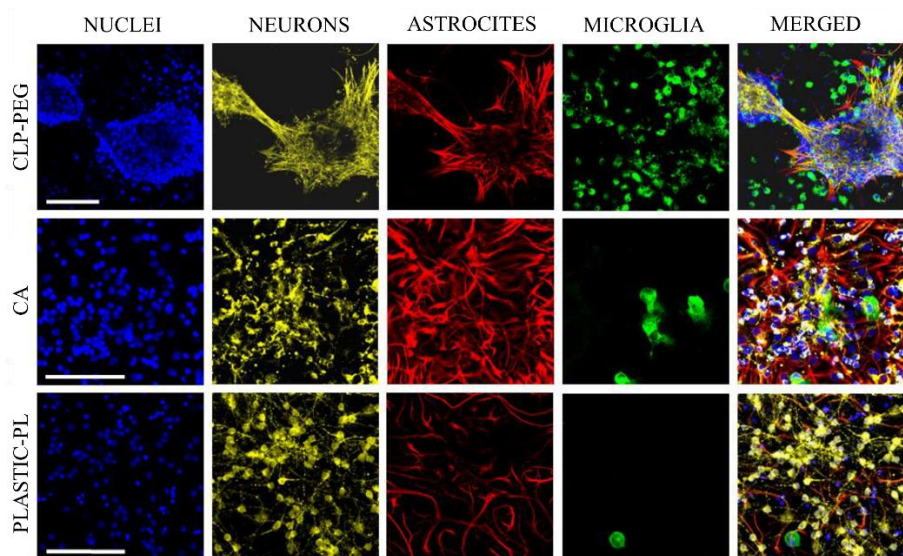


Figure 42 Fluorescence microscopy images of cerebellar cell cultures after seven days of cultivation on different substrates (CLP-PEG, CA, and polylysine-coated plastic). Cell nuclei are painted in blue, neurons in yellow, astrocytes in red, microglia in green. The scale bar length is 100 μm .

The visual analysis of the provided image reveals distinctive cellular behaviours across varied substrates (Figure 42). Specifically, the neuronal network on the collagen hydrogel exhibits limited development, characterized by shortened neurites and cellular shrinkage. In contrast, the astrocyte network on the collagen hydrogel displays robust development, with astrocytes and neurons exhibiting close proximity, thus suggesting potential intercellular communication. Conversely, on plastic substrates, such colocalization appears more randomly distributed.

Furthermore, on the surface of polylysine-coated plastic, only a sparse population of microglial cells is discernible, predominantly adopting a round or nearly round morphology. Quantitative assessment of the cellular composition underscores notable differences among the substrates. Neurons comprise nearly 50% of the total cell population on the CLP-PEG hydrogel and approximately 80% on the polylysine-coated plastic surface. In contrast, neurons constitute a lesser proportion, approximately 30%, on the collagen hydrogel.

Microglial and astrocytic distributions exhibit substrate-dependent variations. On CLP-PEG, microglia and astrocytes demonstrate comparable proportions, whereas, on the collagen hydrogel, astrocytes constitute 60%, while microglia represent only 15%. Notably, on polylysine-coated plastic, microglia and astrocytes account for 16% and 8%, respectively.

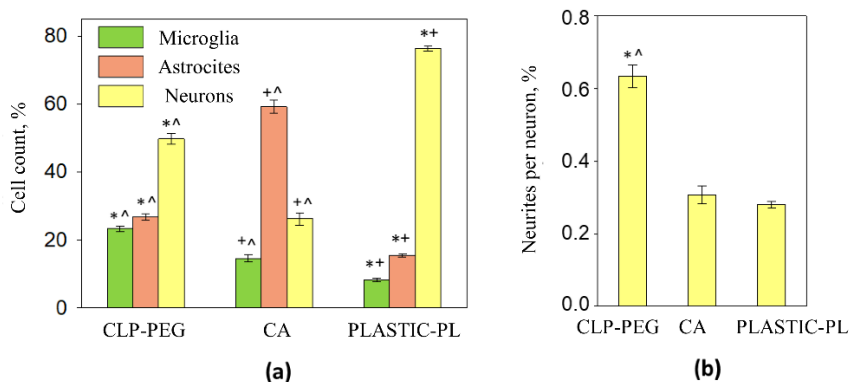


Figure 43 Composition of cerebellar cell culture (a) and neuritogenesis (b) on CLP-PEG, CA hydrogels and polylysine-coated plastic.

The analysis of the neuritogenesis data reveals a noteworthy disparity in the axonal (neuritic) area per neuron, with a markedly larger extent observed on CLP-PEG in comparison to both collagen and coated plastic surfaces. This outcome may be attributed to the elevated neuronal density on the CLP-PEG surface, resulting in minimal inter-neuronal distances that impede the formation of extensive axonal networks. The cerebellar culture on CLP-PEG manifests the formation of distinctive spheroidal structures interconnected by neurite-astrocyte filaments, and these structures are enveloped by microglia. Such architectural formations were not observed on either collagen hydrogel or plastic substrates.

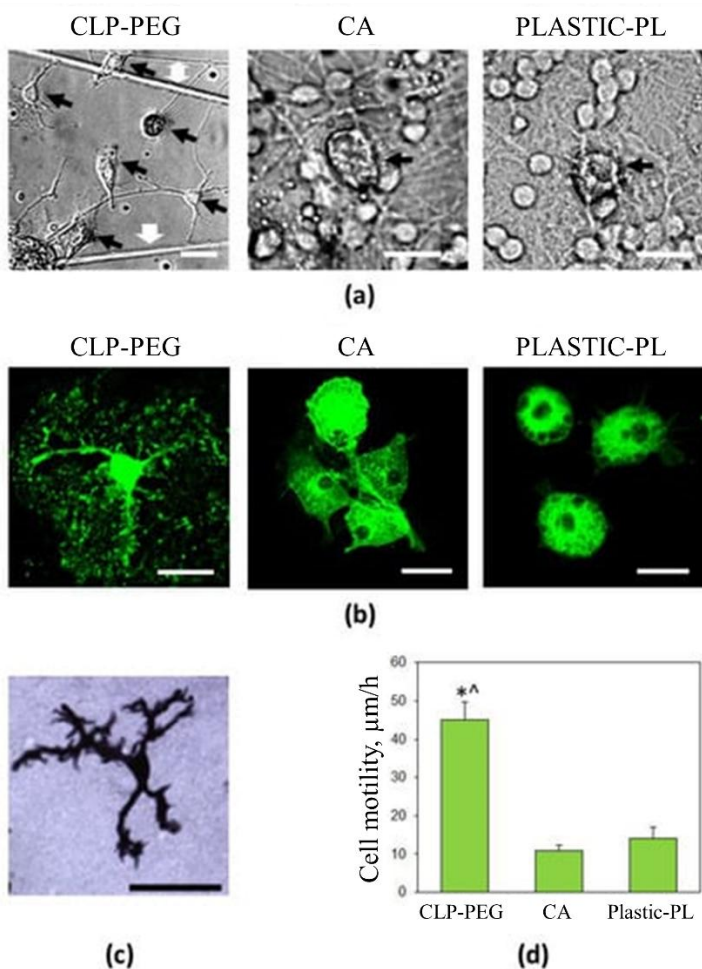


Figure 44 Microglial morphology and motility on CLP-PEG, collagen and plastic-coated polylysine. Bright-field microscopy images (a) show seven-day-grown microglia in a cerebellar culture. Black arrows indicate microglia, white arrows highlight neurite filaments. Fluorescence images (b) visualize a microglial culture after 7 days of cultivation. For comparison, an image of a microglial cell (c) at postnatal day 12 is presented [181]. All scale bars are 25 μm long. Graph (d) quantifies microglial cell motility.

Observation of microglia on different surfaces (Figure 44) (CLP-PEG and CA hydrogels, plastic surface coated with polylysine) showed significant differences between CLP-PEG and other surfaces, as the motility of microglia cells was higher on CLP-PEG, and it was also observed that cells changed their morphology from round to flat or oblong and vice versa. It is possible that this is a transformation of microglia towards a branched state, but this hypothesis still needs to be confirmed.

From previous experiments, it was known that the cerebellum culture on CLP-PEG hydrogel tends to form spheroids, and therefore it was decided to

form a microwell matrix on the surface of CLP-PEG hydrogel to control the amount and size of spheroids on one sheet of hydrogel.

A CLP-PEG hydrogel with wells of the selected size (pyramidal-shaped wells, pyramid side length 400 μm) was produced by means of soft lithography (Figure 45). After seeding the cerebellar cell culture and growing it for 7 days, it can be seen that the spheroids in the wells were of a similar diameter and depended on the seeded amount of cells: 0.1×10^6 , 0.2×10^6 and 0.4×10^6 cells seeded on a 6mm disc formed of 30.45 ± 5.59 , 70.40 ± 6.32 , and 115.35 ± 7.51 μm diameter spheroids, respectively.

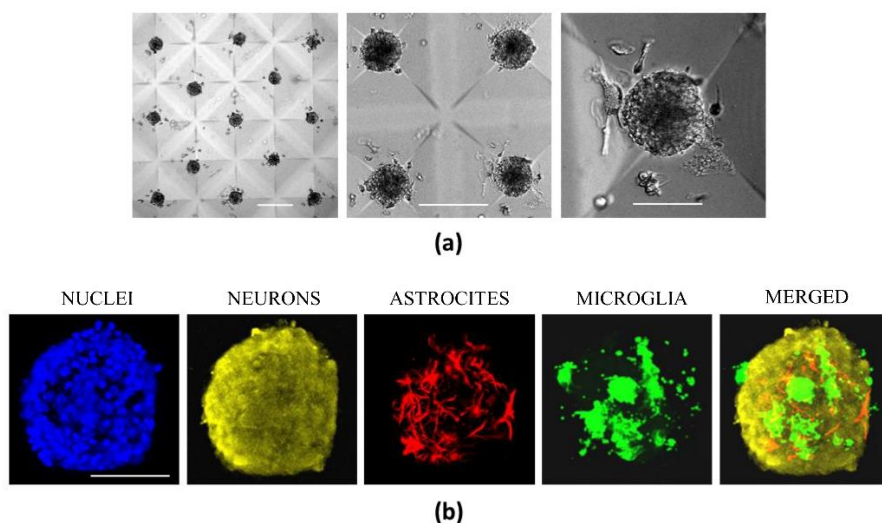


Figure 45 Cerebellar cell culture organoids after 7 days of culture in microwell matrix. The light-field microscopy images (a) show that the spheroids are similar in size. Fluorescent images show blue nuclei, yellow neurons, red astrocytes, and green microglia. The merged image is rendered without nuclei. All scale bars are 50 μm long.

After the study, it can be seen that the cerebellar cell culture forms tissue-like constructs on the CLP-PEG hydrogel substrate. The morphology and motility of microglia on this surface are greater, which would indicate the potential for further use of the platform for drug research and/or other applications. The use of surface microtechnologies makes it possible to form spheres of organoids of the required size, which can be useful for the construction of organs on a chip.

Development of novel biomimetic hydrogels

Previously published work used a collagen-mimicking peptide modified with an additional RGDSPG (fibronectin-mimicking) sequence, which is the

integrin $\alpha\beta 5$ binding site [182]. PEG-CLP and PEG-CLP-RGD hydrogels were tested in a cerebellar cell culture. In order to compare the effect of the modified peptide on cell adhesion, two new peptides with integrin binding sequences DGEAG and GFOGERG were synthesized. Hydrogels without a PEG additive were prepared from the produced peptides.

The following peptides were synthesized:

1. CLP – Collagen-like peptide

$\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4\text{(Pro-Hyp-Gly)}_4\text{(Asp-Hyp-Gly)}_4\text{-COOH}$

2. CLP-RGD – Collagen-like peptide with fibronectin mimicking sequence for integrin bonding

$\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4\text{(Pro-Hyp-Gly)}_4\text{(Asp-Hyp-Gly)}_4\text{-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-COOH}$

3. CLP-GFOGERG – Collagen-like peptide with collagen mimicking sequence for integrin bonding

$\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4\text{(Pro-Hyp-Gly)}_4\text{(Asp-Hyp-Gly)}_4\text{-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-COOH}$

4. CLP-DGEA – Collagen-like peptide with collagen mimicking sequence for integrin bonding

$\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-(Pro-Lys-Gly)}_4\text{(Pro-Hyp-Gly)}_4\text{(Asp-Hyp-Gly)}_4\text{-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-COOH}$

The selection of peptide sequences was influenced by a comprehensive analysis of existing literature. The primary objective was to enhance the adhesion of cell cultures to the hydrogel surface, while drawing inspiration from the demonstrated efficacy of incorporating the fibronectin sequence. It is noteworthy that fibronectin, while proven effective in promoting adhesion, may not consistently be present in the native ECM environment.

The synthesized peptides were purified by reverse-phase HPLC, and the molecular weight of the product was verified by mass spectroscopy and it was consistent with the theoretical molecular weight.

From all the synthesized peptides, PEG-free peptide hydrogels were prepared, on which, a mouse lung cell culture was seeded, and thus the suitability of different peptides for the lung epithelium was tested. Cell growth was compared to a Matrigel-coated surface as a control (Figure 46).

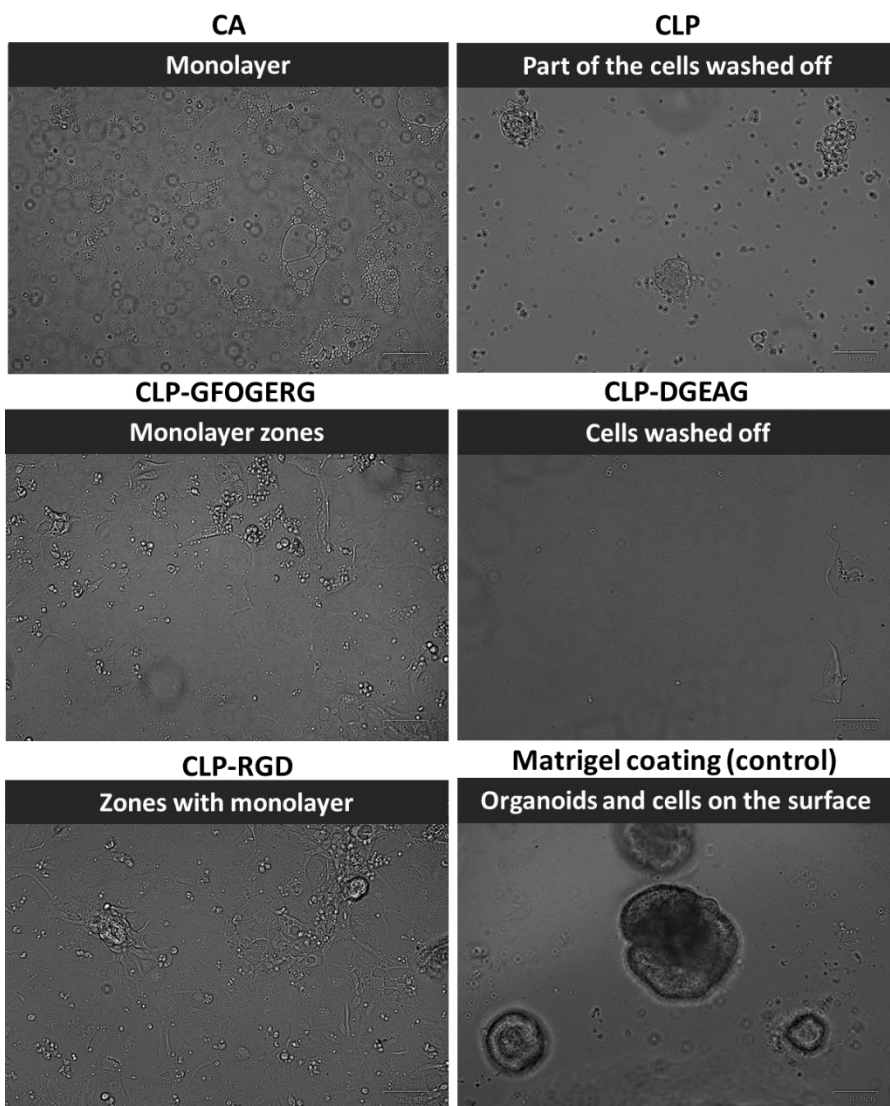


Figure 46 Lung epithelial cells were seeded on previously studied and novel peptide hydrogels.

CONCLUSIONS

In conclusion, the doctoral dissertation has successfully achieved all the predetermined objectives, leading to the following key conclusions:

- 1) A robust platform for surface micro- and nano-modifications of hydrogel surfaces was established, by utilizing a collagen biomimetic hydrogel. The durability of the resulting micro- and nanostructures was evaluated, demonstrating sustained stability without deformation or swelling over a two-week period.
- 2) Cultivation of human skin fibroblast cells on nanostructured hydrogels revealed certain variations in the cell perimeter, shape, and the occupied area across surfaces with different nanostructures. These findings align with the existing literature and suggest that further exploration of cell phenotypic differences could be achieved through modulation of the biomimetic hydrogel stiffness, thereby suggesting future investigations.
- 3) The development of a comprehensive hydrogel environment, derived from biomimicking hydrogels with microstructures, facilitated the creation of a device suitable for assessing the cell growth within channels formed in the hydrogel. The semi-permeable nature of the hydrogel membrane enabled efficient diffusion of metabolites and nutrients, supporting cell cultivation within closed channels for a duration of 7 days.
- 4) The collagen hydrogel and plastic carrier construct proved suitable for *in vitro* permeability studies, with permeability results closer to those of the rabbit eye cornea observed when cells were grown on the hydrogel surface compared to a plastic membrane.
- 5) Cultivation of human primary healthy and pathological mesenchymal stem cells on collagen and collagen-modified hydrogels demonstrated the promotion of cardiomyogenic differentiation, thereby emphasizing the medical potential of growing cells on hydrogels.
- 6) Biomimetic hydrogels exhibited suitability for growing cerebellar cell cultures, particularly evident in the formation of organotypic structures on the CLP-PEG hydrogel surface, accompanied by enhanced microglial motility.
- 7) The development of a microwell matrix on the CLP-PEG hydrogel surface facilitated the formation of organotypic spheroids. Alteration

of the cell seeding density enabled control over the resulting spheroid size.

- 8) Innovative modifications of the peptide hydrogel were achieved through the incorporation of biomimetic sequences into the collagen-mimicking peptide sequence. These newly developed hydrogels were successfully tested in a lung epithelial cell culture.

In summary, the described biomimetic hydrogels have exhibited commendable suitability for micro- and nanostructuring, display enduring stability, are amenable to chemical modification, and serve as supportive substrates for the organotypic cell culture. The collective findings underscore the versatility and potential applications of these biomimetic hydrogels in various biomedical contexts.

AUTORIAUS INDĖLIS

Romuald Eimont, konsultuodamasis su vadovu, suplanavo ir atlikto mikro ir nanostruktūravimo eksperimentus. Atliko hidrogelinių medžiagų stabilumo vertinimo eksperimentus, įdiegė hidrogelio ląstų sluoksniavimo ir cheminio sutvirtinimo technologiją. Atliko hidrogelinių medžiagų su ir be ląstelėmis vertinimą fluorescenciniais mikroskopais.

Doktorantas atliko peptidų sintezę ant kietosios fazės ir atliko visus peptidų sintezės ir gryninimo darbus, bei įdiegė peptidinių hidrogelių gaminimo metodiką. Doktorantas apdorojo ir analizavo sugeneruotus eksperimentinius duomenis.

Pateiktose publikacijose pagrindinis doktoranto indėlis buvo susijęs su hidrogelinių medžiagų ruošimu, modifikavimu, naujų hidrogelio formulių kūrimu.

KITŲ BENDRAAUTORIŲ INDĖLIS

Tadas Jelinskas atliko paviršiaus tyrimus AJM bei pagamino liejimo formas su nanostruktūromis bei padėjo analizuoti ląstelių duomenis (skyriai 3.1, 3.2).

Agnė Vailionytė ir Tadas Jelinskas padėjo pagaminti hidrogelinius bandinius publikacijoms (skyriai 3.6, 3.7, 3.8).

Airina Godienė padėjo atlikti ląstelių kultūrų eksperimentus, bei prižiūrėjo ląstelių kultūras (skyriai 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

Vytautas Cėpla ir Artūras Ulčinas padėjo finalizuoti hidrogelio ir plastikinio laikiklio konstrukta (skyrius 3.6).

Agnė Žiniauskaitė et al. atliko ląstelių eksperimentus, Jenni J. Hakkarainen atliko pralaidumo matavimus (skyrius 3.6).

Rokas Mikšiūnas ir Daiva Bironaitė et al. atliko ląstelių eksperimentus ir genų raiškos tyrimus (skyrius 3.7).

Zbignevas Balion ir Aistė Jekabsonė et al. atliko hidrogelių charakterizavimą bei ląstelių eksperimentus (skyrius 3.8).

PADĖKA

Už galimybę atlikti tiriamuosius darbus, palaikymą ir koordinavimą juos atliekant dėkoju dr. Ramūnui Valiokui.

Nuoširdžiai dėkoju FTMC Nanoinžinerijos skyriaus ir UAB „Ferentis“ kolektyvams, ypatingai norėčiau padėkoti Agnei Vailionytei ir Taduui Jelinskui už pagalbą atliktuose eksperimentuose, Airinai Godienei už bendradarbiavimą ir pagalbą ląstelių kultūrose. dr. Rūtai Aldonytei dėkoju už vertingas pastabas skaitant ir koreguojant disertacijos tekstą.

UAB „Eksperimentika“ kolektyvui dėkoju už atliktus ragenos pralaidumo matavimus ir jų interpretavimą. dr. Aistei Jekabsonei ir dr. Zbigneviui Balionui už atliktus eksperimentus su smegenėlių kultūromis. dr. Rokui Mikšiūnui ir dr. Daivai Bironaitei bei jų kolegoms dėkoju už atliktus kardiomiogeninės diferenciacijos eksperimentus. Šių partnerių dėka, ne tik pavyko išbandyti mano kurtas ir gamintas hidrogelines medžiagas bei struktūras įdomiose biologinėse sistemose, bet ir gautus tyrimų rezultatus kartu publikuoti.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Žiniauskaitė A, Cėpla V, Jelinskas T, Eimont R, Ulčinas A, Aldonytė R, Valiokas R, Kalesnykas G, Hakkarainen JJ. (2021) Introducing an Efficient In Vitro Cornea Mimetic Model for Testing Drug Permeability. Sci. 2021; 3(3):30. DOI: <https://doi.org/10.3390/sci3030030>
2. Miksiunas, R., Aldonyte, R., Vailionyte, A., Jelinskas, T., Eimont, R., Stankeviciene, G., Cepla, V., Valiokas, R., Rucinskas, K., Janusauskas, V., Labeit, S., Bironaite, D. Cardiomyogenic Differentiation Potential of Human Dilated Myocardium-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells: The Impact of HDAC Inhibitor SAHA and Biomimetic Matrices. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 12702. <https://doi.org/10.3390/ijms222312702>
3. Balion, Z., Svirskienė, N., Svirskis, G., Inokaitis, H., Cėpla, V., Ulčinas, A., Jelinskas T., Eimont R., Paužienė, N., Valiokas, R., Jekabsone, A. (2022). Comparison of Microglial Morphology and Function in Primary Cerebellar Cell Cultures on Collagen and Collagen-Mimetic Hydrogels. Biomedicines, April 2022, 10(5):1023. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051023>

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 10 egz.