

Vilniaus Universitetas
Fizikos fakultetas
Cheminės fizikos institutas

Andrius Pečiulis

**SKENUOJANČIO ZONDO IR FLUORESCENCINĖS
MIKROSKOPIJOS TAIKYMAI ORGANINIŲ DANGŲ IR BIOLOGINIŲ
OBJEKTŲ MECHANINIŲ SAVYBIŲ ANALIZEI**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Cheminės fizikos studijų programa

Studentas

Darbo vadovas

Andrius Pečiulis

dr. Martynas Gavutis

Turinys

Santrumpos	3
Įvadas	4
1 Skyrius: Literatūros apžvalga	5
1.1 Hidrogelių mechaninių savybių vertinimas skenuojančio zondo mikroskopu.....	5
1.2 Hidrogelių pritaikymas ląstelių auginimo eksperimentams	7
1.3 Hidrogelių litografija.....	9
1.4. Hidrogelių foto-polimerizacija	10
2 Skyrius: Medžiagos ir metodai	11
2.1 PAM kopolimerų paruošimas	11
2.2 PAM su fotoiniciatoriumi paruošimas.....	11
2.3 Struktūrinis PAM hidrogelio apšvietimas	11
2.4 PAM-AM amino-amino grupių sujungimas su glutaraldehidu	13
2.5 PAM-MA su FN, amino-karboksilo grupių sujungimas per EDC	13
2.6 PAM hidrogelių padengimas fibronektino baltymu	13
2.7 Hidrogelio mechaninių savybių ir topografijos tyrimas panaudojant AFM.....	13
2.8 Mezenchiminių ląstelių eksperimentai.....	14
3 Skyrius: Rezultatai	15
3.1 PAM hidrogelių kopolimerai.....	15
3.2 Fotoinicijuojama PAM polimerizacija	17
3.3 Dangos topografijos ir Jungo modulio vertinimas taikant AFM.....	19
3.4 PAM-MA bioaktyvavimas ir ląstelių adhezijos patikrinimas.....	22
3.5 PAM-AM bioaktyvavimas ir ląstelių adhezijos patikrinimas	24
3.6 Ląstelių auginimas ant PAM ir PAM-AM dangų	25
3.7 MKL ląstelių vertinimas AFM	27
Pagrindinės išvados ir rezultatai	29
Santrauka.....	30
Summary	32
Padėka	34
Literatūra.....	35

Santrumpos

μCP – mikrokontaktinis antspaudavimas (angl. *Microcontact Printing*)

AA – akrilinė rūgštis

AFM – atominės jėgos mikroskopas (angl. *Atomic Force Microscope*)

AM – aminoetil metakrilato hidrochloridas

APS – amonio persulfatas

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *Bovine Serum Albumin*)

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimido hidrochloridas

FN – fibronektinas

GA – glutaraldehidas

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonrūgštis

MA – metakrilinė rūgštis

MES - 2-morfolinetanosulfoninės rūgšties buferis

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

PAM – poliakrilamidas

PB – fosfatinis buferis

PBS – fosfatinis buferinis druskų tirpalas

PDMS – polidimetilsiloksanas

QI – kiekybinis vaizdinimas (angl. *Quantitative Imaging*)

rbPAM – poliakrilamidas su riboflavinu

sulfo-SANPAH – N-sulfosukcinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenylamino) heksanoatas

TEMED – tetrametiletilendiaminas

Įvadas

Mechanobiologija – sritis tirianti mechanizmus, kuriais ląstelės jaučia ir ląstelių atsakus į mechaninius aplinkos ar vidinius stimulus. Mechaninės aplinkos poveikis ląstelių augimui vis dar tėra menkai suprantamas, tačiau parodyta, kad ląstelinės aplinkos standumas atsakingas už signalus, veikiančius ląstelių proliferaciją, migraciją, diferenciaciją [1], [2], [3], [4]. Stebint gyvas sistemas nesudėtinga pamatyti audinių lygmenyje veikiančias jėgas, kaulai dėl patiriamos apkrovos formuojasi pagal Wolffo dėsnį (angl. *Wolff's law*), kraujagyslių sienelės patiria skysčio spaudimą ir tėkmę [5]. Audinių lygmenyje šios jėgos atrodo ganėtinai paprastai suvokiamos, bet nėra aišku kaip jos jaučiamos ir paveikia pavienės ląstelės. Yra žinoma, kad mechaninės mikroaplinkos savybės pasikeičia esant įvairioms patologijoms [5], [6], [7], [8]. Siekiant įvertinti mechaninės aplinkos įtaką ląstelėms, reikia būdų ją kontroliuoti ir registruoti ląstelinius pokyčius [9]. Tai gali būti pasiekama naudojant minkštus ląstelių augimo substratus ir juos atitinkamai modifikuojant. Labai populiarūs yra hidrogeliai, ypač sintetinis poliakrilamido hidrogelis dėl savo biosuderinamumo, paprasto modifikavimo ir gerai aprašytų mechaninių savybių, bei mažos kainos. Tyrimai, kuomet įvairios ląstelės yra auginamos ant hidrogelių, parodė, kad pavienių ląstelių orientacija ir diferenciacija gali būti kryptingai valdomos, esant atitinkamai mechaninei aplinkai [10], [11], [12]. Svarbūs veiksniai tokiose sistemose: substrato elastingumas, substrato topografija, ląstelių adhezijos ploto apribojimai [13]. Šiuo metu dauguma naudojamų platformų leidžia tik vieno iš šių stimulų kontrolę, o platformos apjungiančios kelis mechaninius parametrus yra sudėtingos ir naudojamos rečiau. Dėl greitos mechanobiologinių tyrimų raidos ir didelės svarbos, kyla poreikis ieškoti naujų būdų, kaip lengvai paruošti paprastas, pigias ląstelių auginimo platformas, kurios leistų preciziškai kontroliuoti, bei įvertinti ląstelių ir jų aplinkos mechanines savybes.

Šio darbo tikslas – suformuoti Jungo modulio mikro-raštus ant poliakrilamido hidrogelio, ir juos pritaikyti ląstelių adhezijai ir mechaniniam stimuliavimui. Darbo uždaviniai:

- 1) Išrinkti fotopolimerizacijai ir aktyvavimui tinkamą poliakrilamido formuliaciją.
- 2) Ištirti suformuotų hidrogelių mechanines savybes skenuojančio zondo mikroskopu.
- 3) Išrinkti tinkamą būdą kovalentiniam baltymo prijungimui prie hidrogelio.
- 4) Pademonstruoti aktyvuotų hidrogelių tinkamumą adhezinių ląstelių tyrimams.
- 5) Palyginti ant hidrogelių adhezavusių mezenchiminių kamieninių ląstelių mechanines savybes.

1 Skyrius: Literatūros apžvalga

1.1 Hidrogelių mechaninių savybių vertinimas skenuojančio zondo mikroskopu

Hidrogeliai pasižymi savybėmis išlaikyti didelius kiekius vandens, gali skirtingai reaguoti į aplinkos pH, turėti platų spektrą Jungo modulio verčių, sutampančių su didele dalimi minkštųjų audinių. Hidrogeliai yra elastiški, dažniausiai tamprumo modulio (E') vertė smarkiai viršija klampos modulio (E'') vertę [14]. Dauguma hidrogelio savybių apsprendžia jo cheminis paruošimas – monomerų santykis, papildomi reagentai, iniciatorius ir jo koncentracija, stabilizatoriai. Siekiant kontroliuoti standumą (Jungo modulį) – svarbiausias parametras monomerų santykis [15], [16], tačiau galima kontroliuoti ir viskoelastines savybes į hidrogelį įmaišant linijinio monomero [14].

Hidrogelio mechaninių savybių registravimas yra ganėtinai sudėtingas. Dažniausiai taikoma reologijos arba nanoįspaudimo eksperimentai, kuomet atominės jėgos mikroskopo (AFM) adata įspaudžia mažą bandinio plotą ir užregistruojama įspaudimui naudota jėga ir įspaudimo gylis [16], [17], [18]. Tokie AFM eksperimentai siekiant nustatyti medžiagos Jungo modulį dažnai kliaujasi Hertzo modeliu, kuriam reikalingos prielaidos: mažas įspaudimo gylis, izotropinis bandinys, tiesinis atsakas ir kuris remiasi kietiems substratams aprašytu adatos įspaudimo profiliu [19], [20], [21], [22]. Nepaistant šių trūkumų, Hertzo modelis yra populiariausias būdas įvertinti Jungo modulį minkštuose bandiniuose pasitelkiant AFM. Didelis AFM privalumas vertinant medžiagos mechanines savybes ląstelių eksperimentams yra tai, kad jėgos-atstumo kreivės reikalingas Jungo modulio nustatymui galima registruoti didesniuose plotuose pasitelkiant QI (angl. *quantitative imaging*) modą, o dėl mažo kontakto ploto gaunamos vertės tiksliau atspindi lokalią ląstelių jaučiamą aplinką [21].

Jungo modulis (E) yra aprašomas kaip medžiagos savybė priešintis spaudimui ar tempimui. Šis dydis, pagal Huko dėsnį aprašomas formule:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (1)$$

čia σ – įtempis, ε – santykinis pailgėjimas [18]. Atliekant AFM eksperimentus ši išraiška turi būti modifikuojama siekiant suskaičiuoti Jungo modulio vertes iš jėgos-atstumo kreivių. Tokia išraiška vadinama Hertzo modeliu:

$$E_{Hertz} = \frac{3(1 - \nu^2)}{\sqrt{2} R_0^2} \cdot \left(\frac{F}{\varepsilon \sqrt{3}} \right) \quad (2)$$

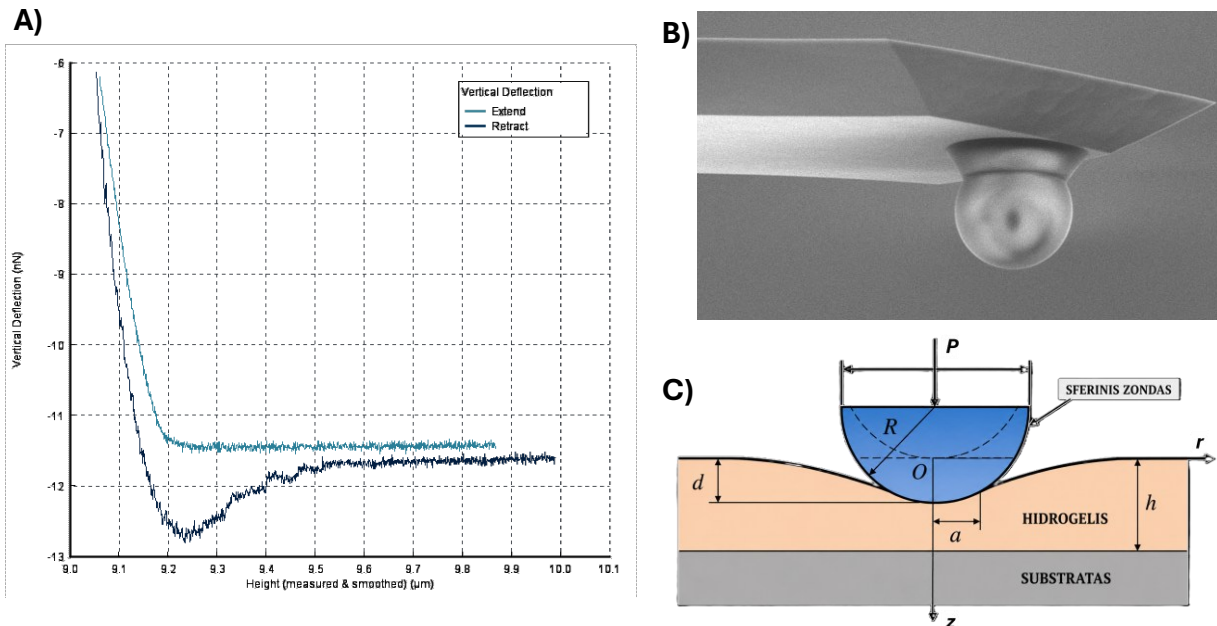
čia E – jungo modulis, ν – Puasono santykis, ε – santykinė deformacija, F – įspaudimo jėga, R_0 – spaudžiamos sferos spindulys [22]. Šis modelis pritaikytas matuoti mažo spindulio minkštos sferos Jungo modulį, ją spaudžiant plokščia AFM adata. Modifikuota išraiška, taikoma įvairių formų adatoms, spaudžiant didelių matmenų bandinį vadinama Oliverio Pharro modeliu atrodo taip:

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} (1 - \nu^2) \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (3)$$

čia S – kontakto standumas (gaunamas eksperimentiškai iš jėgos-atstumo kreivės), A – zondo ir paviršiaus kontakto plotas [23]. Jėgos atstumo kreivės (žr. 1 pav. a) registruojamos su AFM zonu įspaudžiant hidrogelio paviršių ir registruojant įspaudimo gylį (pjezo variklių eigą) ir adatos išlinkimą (lazerio atspindžio padėties kitimas detektoriuje), šiems parametrams įtakos turi konkreti adatos geometrija ir jos sąveikos su paviršiumi [24], [25]. Sferinės formos adatos ir hidrogelio paviršiaus įspaudimo geometrija paremta teoriniais skaičiavimais ir nėra tiesiogiai stebima eksperimento metu (žr. 1 pav. b, c). Dažniausiai AFM eksperimentuose pasitelkiamos sferinės adatos, tuomet jų bandinio įspaudimo kreivė yra aprašoma pagal formulę:

$$P = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \sqrt{Rh^3} \quad (4)$$

čia P – slėgis, R – adatos sferos spindulys, h – įspaudimo gylis, E ir ν atitinkamai Jungo modulis ir Puasono santykis [23].



1 pav. (A) AFM jėgos kreivė. X – ašis, pjezo koordinatė (μm), Y – ašis, zondą veikianti jėga (nN). (B) AFM sferinis zondas, vaizdas iš: nanoandmore.com. (C) Sferos kontakto su hidrogeiliu schema ir svarbūs parametrai Jungo modulio skaičiavimams. P – įspaudimo jėga, R – sferos spindulys, a – kontakto spindulys, d – įspaudimo gylis, h – hidrogelio storis. Schema adaptuota iš: Ding et al., 2018.

1.2 Hidrogelių pritaikymas ląstelių auginimo eksperimentams

Ląstelės ciklas yra apsprendžiamas daugelio ją veikiančių veiksnių, taip pat ir mechaninių. Augimo aplinkos standumas, lokalūs jo pokyčiai ar topografija veikia ląstelių proliferaciją, migraciją, diferenciaciją [26], [27], [28], [29], [30]. Hidrogeliai yra tinkami replikuoti ląstelių augimo aplinką, jų mechanines savybes lengva kontroliuoti chemiškai ir jie gali būti paruošiami įvairiomis formomis ir lengvai suderinami su biologiniais bandiniais [31]. Šios ir kitos savybės lėmė tai, kad hidrogeliai dažnai taikomi ląstelių kultūrų bandymuose, stebint kaip šios reaguoja į augimo platformos standumą ar topografiją [14], [32], [33], [34], [35].

Bandymams kuomet stebima augimo platformos standumo, įtaka ląstelėms, dažnai pasirenkami sintetiniai hidrogeliai. Tokie sintetiniai hidrogeliai, kaip poliakrilamidas (PAM) yra labai patogūs siekiant kontroliuoti standumą, nes hidrogelio mechanines savybes apsprendžia jo sintezei panaudotas akrilamido ir bisakrilamido monomerų santykis [26]. Tai leidžia lengvai ir greitai paruošti skirtingo Jungo modulio platformas ląstelių auginimui.

Dauguma hidrogelių yra bioinertiški, todėl juos reikia biofunkcionalizuoti siekiant juos pritaikyti ląstelių auginimui [36]. Dažniausiai bioaktyvus paviršius pasiekiamas prie hidrogelio prijungiant tarpląstelinio užpildo baltymus, tokius kaip – albuminą, lamininą, kolageną ar fibronektiną. Šis prijungimas gali būti atliekamas kontroliuojant biofunkcionalizuotų zonų

rašta mikrometriniu tikslumu, taikant mikrokontaktinio antspaudavimo (μ CP, angl. *microcontact printing*) metodiką [26], [37]. Tokia rašto kontrolė apriboja ląstelėms prikibti tinkamą adhezinę zoną, ir leidžia orientuoti ląsteles eksperimentatoriaus pasirinktomis kryptimis.

Didelis hidrogelių pranašumas yra tai, kad juos galima paruošti įvairiomis formomis. Dažnai hidrogeliai taikomi kaip substratas kuris pakeičia plastiką ar stiklą 2D ląstelių eksperimentuose [28]. Jeigu tokie hidrogeliai yra paruošiami kartu su topografija – gaunamos 2,5D platformos [26], [38]. Šios sistemos leidžia kontroliuoti, kaip ląstelės augs eksperimento metu, apriboti jų augimui skirtą plotą, orientuoti ląsteles. Hidrogeliai, taip pat, gali būti panaudojami ir kuriant mikrofluidikos sistemas [27]. Tokios sistemos sukuria 3D ląstelių aplinką ir leidžia kontroliuoti ne vien mechaninius, bet ir biocheminius stimulus, kuriuos patiria ląstelės.

Įvairiais būdais paruoštos poliakrilamido platformos dažnai naudojamos siekiant parodyti ląstelių gebėjimą orientuotis ir fenotipinius ląstelių pokyčius auginant šias skirtingose mechaninėse aplinkose. Tokios ląstelės kaip, fibroblastai, epitelis, miocitai dažnai tampa šių tyrimų objektais, dėl aiškių morfologinių skirtumų esant mechaniniams stimulams [14], [32], [35], [38]. Įdomu tai, jog šie tyrimai parodo, kad ląstelės reaguoja ne vien į substrato standumą ar topografiją, bet ir į viskoelastines medžiagos savybes, o mechaniniai stimulai gali paveikti: ląstelines funkcijas, citoskeleto išsidėstymą, bei ląstelių adheziją.

1.3 Hidrogelių litografija

Siekiant paruošti hidrogelius, turinčius netolygias chemines, mechanines savybes, ar tikslines formas gali būti pasitelkiamos įvairios sistemos. Vienas populiariesnių būdų yra naudoti fotolitografiją. Tokiu atveju yra paruošiami foto-reaktyvūs hidrogeliai, šie gali būti skersaryšinami apšvietus, naudojant šviesą prie hidrogelio gali būti prijungiami papildomi reagentai keičiantys jo savybes arba šviesa gali nutraukti hidrogelyje suformuotus cheminius ryšius [39], [40], [41], [42], [43]. Šie metodai leidžia sukurti sudėtingų formų platformas ar kontroliuoti jų mechanines savybes, tačiau tokios sistemos yra sudėtingai paruošiamos, jų gamyba užtrunka ilgai ir trūksta standartizuotų protokolų jų naudojimui.

Vienas paprasčiausių būdų sukurti platformą su skirtingomis standumo zonomis – yra sukurti ją iš skirtingų medžiagų. Metodas sukuriant minkštą PDMS substratą su didesnio standumo zona iš KMPR fotopolimero aprašytas Tseng & Di Carlo, 2014. Nors tokia sistema leidžia lengvai kontroliuoti platformas standumą, tačiau jos paruošimas sudėtingas, platforma nevienalytė, sudėtinga sukurti ląstelinio dydžio standumo raštus.

Huang et al., 2021 aprašo šviesa kontroliuojamas hidrogelių sistemas, kurios leidžia sukurti standumo raštus hidrogelyje, su UV šviesa nutraukiant į hidrogelį įmaišytą fotochemiškai skylantį reagentą. Naudojant tokį hidrogelį ir struktūrinį apšvietimą, gaunamos platformos su mikrometrų eilės standumo raštais. Tokia sistema turi daug privalumų, tačiau jos paruošimas yra sudėtingas. Didžiausias tokios sistemos privalumas yra tai, kad ją galima modifikuoti įvairiais šviesai reaktyviais reagentais, kurie gali padėti ją vaizdinti ar prijungti papildomas medžiagas. Panaši platforma aprašyta ir Lee et al., 2018, šiame tyrime naudotas azoreagentas reaguojantis į mėlyną šviesą. Hidrogelis paruoštas su šiuo reagentu pakeisdavo savo standumą po apšvietimo mėlyna šviesa, dėl azoreagento izomerizacijos. Šio metodo privalumas – standumo valdymas eksperimento metu.

Šviesa valdomos platformos tampa pačiu patraukliausiu hidrogelių litografijos metodu. Išvystytos mikroskopijos ir struktūruoto apšvietimo metodikos užtikrina gerą raštų rezoliuciją ir metodinį prieinamumą, o platus foto-aktyvių cheminių reagentų pasirinkimas užtikrina platų platformų pritaikomumą.

1.4. Hidrogelių foto-polimerizacija

Egzistuoja skirtingi hidrogelių polimerizacijos mechanizmai. Dvi pagrindinės polimerizacijos kategorijos apima grandininį augimą (angl. *chain growth*) ir žingsninį augimą (angl. *step growth*). Kalbant apie minkštus hidrogelius dažniausiai galvojame apie grandininį augimą, kuris įtraukia radikalinę, joninę ir koordinacinę polimerizacijas. Šie reakcijų mechanizmai pasireiškia skirtingiems hidrogeliams pvz.: radikalinė poliakrilamido (PAM), joninė polietilenglikolio (PEG) ar koordinacinė polilaktinės rūgšties (PLA) polimerizacija [40], [44], [45]. Žingsninis augimas dažniau pasitaiko tarp epoksidų ar siloksanų. Siekiant kuo tiksliau valdyti hidrogelio polimerizaciją, parankiausia, kad ši vyktų radikaliu būdu. Radikalinė polimerizacija prasideda, kuomet monomerų sistemoje pradeda generuotis laisvieji radikalai. Radikalus generuoti sistemoje galima naudojant: fotoiniciatorius, termoiniciatorius ar 2-iejų komponentų sistemas. 2-iejų komponentų sistemos ir termoiniciatoriai paprastai generuoja radikalus visame tirpalo tūryje, tačiau fotoiniciatorių veikimas gali būti erdviškai valdomas, kontroliuojant bandinio apšvietimą [42]. Šis efektas dažnai išnaudojamas siekiant sukurti trimates struktūras stereolitografijos būdu, nors hidrogeliai tokiose 3D spausdinimo sistemose naudojami retai ir dažniau pasitelkiami kiti fotopolimerai.

Poliakrilamidas yra vienas dažniausiai naudojamų sintetinių hidrogelių, kurio polimerizacijos reakcija yra radikalinė. Labai populiari poliakrilamido tirpaluose, kaip radikalų generatorių naudoti amonio persulfatą (APS) ir tetrametiletilendiaminą (TEMED), tačiau yra platus pasirinkimas ir kitų reakcijos iniciatorių (žr. 1 lentelę). Priklausomai nuo taikymo gali būti paranku polimerizaciją valdyti šviesa ar temperatūra. Dauguma komercinių fotoiniciatorių veikia UV ar mėlynoje šviesoje, tačiau populiarėja sistemos leidžiančios polimerus paruošti naudojant ir didesnio bangos ilgio apšvietimą [48]. Naudojamo iniciatoriaus sugertis yra kritinis faktorius siekiant pritaikyti hidrogelius jau egzistuojančioms sistemoms.

1 lentelė. Dažnesni polimerizacijos reakcijų iniciatoriai.

Iniciatorius	Tipas	Didžiausias sugeriamas bangos ilgis
APS ir TEMED	2-iejų komponentų sistema	-
Azobisisobutyronitrile	Termoiniciatorius	-
Irgacure 2959	Fotoiniciatorius	405 nm *
Irgacure 819	Fotoiniciatorius	430 nm **
LAP (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate)	Fotoiniciatorius	380 nm *
Riboflavin (Vitaminas B2)	Fotoiniciatorius	444 nm *

*(Tomal & Ortyl, 2020), **[47]

2 Skyrius: Medžiagos ir metodai

2.1 PAM kopolimerų paruošimas

PAM kopolimerai ruošiami naudojant didelės monomerinės koncentracijos PAM mišinį iš 150 μL akrilamido (75% w/v), 150 μL (2,3 % w/v) bisakrilamido, 255 μL HEPES buferio (35 mM 7.4 pH) reakcijos iniciacijai naudojant 0.9 μL TEMED ir 90 μL APS (2,3% v/w), kaip radikalų generatorius. Pradiniai poliakrilamido mišiniai paruošti pagal [15], vėliau optimizuojant iki aprašomos receptūros. Į šį mišinį, papildomai pridedama atitinkamo monomero, taip kad šio kiekis sudarytų 5% bendro monomerų kiekio tirpale. Naudoti funkciniai reagentai: 2-Aminoetil metakrilato hidrochloridas (AM), 3-(Acriloyloksi)-2-hidroksipropil metakrilatas, 2,3-Epoksipropil metakrilatas, akrilinė rūgštis (AA), metakrilinė rūgštis (MA).

2.2 PAM su fotoiniciatoriumi paruošimas

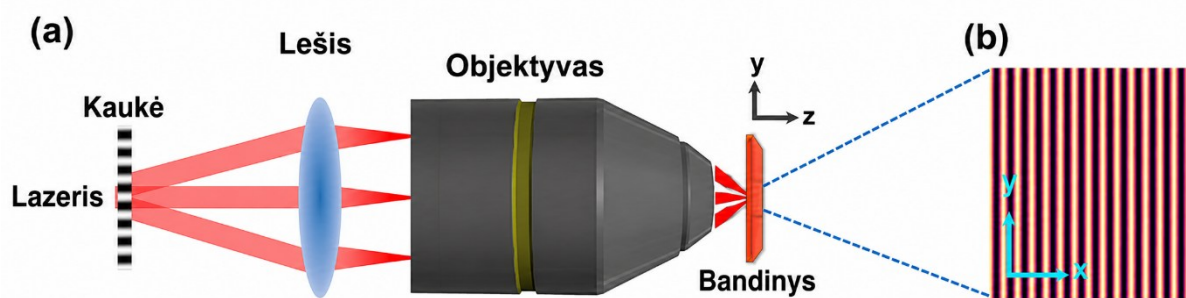
PAM ruošiamas taip kaip aprašyta ankstesnėje 2.1 sekcijoje, kaip kopolimerą pridedant 6,3 μL metakrilinės rūgšties (PAM-MA) arba aminoetil metakrilato hidrochlorido (PAM-AM), tačiau vietoje TEMED ir APS, naudojama 180 μL 7,6 mg/ml fotoiniciatoriaus Irgacure 2959. Taip paruošto mišinio polimerizacija vykdoma $\lambda = 365$ nm šviesoje.

PAM su riboflavinu kaip iniciatoriumi (rbPAM) paruošiamas tirpinant akrilamidą ir biskrilamidą sočiame riboflavino PBS tirpale. Sotus riboflavino tirpalas paruošiamas tirpinant riboflavina 0,2 g/ml koncentracija PBS buferyje ultragarsinėje vonelėje 10 min, vėliau tirpalą filtruojant. Akrilamidas 0,4 g/ml ir bisakrilamidas 0,06 g/ml yra tirpinami sočiame riboflavino tirpale, ultragarsinėje vonelėje ~20 min. Prieš naudojant rbPAM mišinį į jį įmaišoma 3,6 μL /ml TEMED.

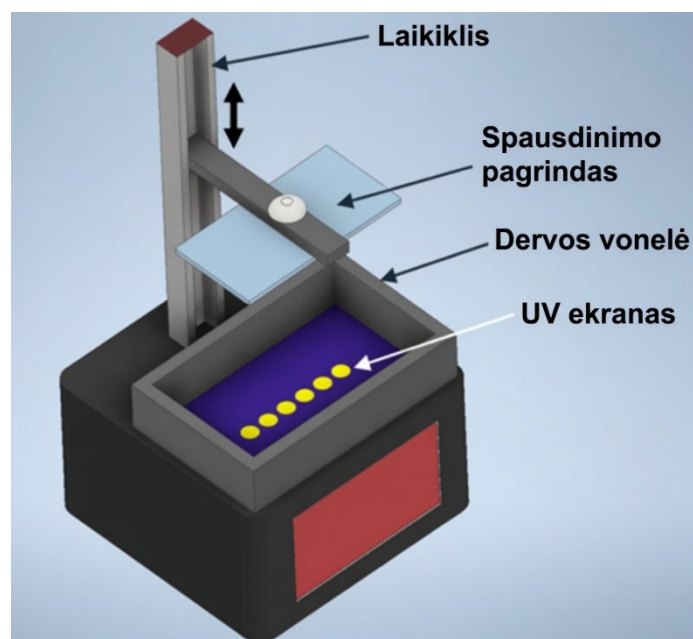
2.3 Struktūrinis PAM hidrogelio apšvietimas

7 μL fotoinicijuojamo PAM-AM ar PAM-MA hidrogelio mišinio yra išliejama petri lėkštutėje ir naudojant 170 μm aukščio tarpines pridengiama aminosilanizuotu 2,5 cm diametro stikliuku. Taip išliejamas skystas hidrogelis yra suspaustas tarp 2-iejų skaidrių paviršių, tačiau niekur neišteka. Išlietas hidrogelis yra apšviečiamas su invertuotu Olympus IX81 mikroskopu su Optigrid moduliu (žr. 2 pav.), kuriame įstatyta kaukė su raštais 15min, vėliau hidrogelis perkeliamas po $\lambda = 365\text{nm}$ diodu ir ten apšviečiamas dar 45min (PAM mišiniui šie laikai trumpesni). Pabaigus apšvietimą aminosilanizuotas stikliukas kartu su prikibusiu hidrogeliu, pincetu nuimamas nuo petri lėkštutės ir perkeliamas į PBS buferį laikymui.

Alternatyviai, naudojant rbPAM pasitelkiamas 3D spausdintuvas. Pasirinktas kiekis rbPAM mišinio išpilamas į spausdintuvo vonelę, ir paleidžiama spausdinimo programa. Spausdinant topografines struktūras, vonelėje esantis mišinys prispaudžiamas spausdintuvo platformos, kuri pakyla kartu su susipolimerizavusiu mišiniu, atspausdinus kiekvieną sluoksnį (žr. 3 pav.). Norint kontroliuoti apšvietimo laiką nesukuriant topografijos, rbPAM išliejamas į vonelę tarp tarpinių ir pridengiamas aminosilanizuotu stikliuku, spausdinimo metu nenaudojama judanti platforma. Taip išlaikomas tolygus hidrogelio storis, kontroliuojant šviesos sukuriamą raštą.



2 pav. Tipinė struktūruoto apšvietimo schema, realizuota Optigrid modulyje (a), plokštumoje suformuojamas kaukės vaizdas (b). Schema adaptuota iš: [49]



3 pav. Stereolitografijos schema pritaikoma 3D spausdintuvuose. Schema adaptuota iš: [50]

2.4 PAM-AM amino-amino grupių sujungimas su glutaraldehidu

PAM-AM diskelis purtomas ultragarsinėje vonelėje 0.1M HCl tirpale 10min. Po purtymo diskelis dedamas į petri lėkštutę ir ant jo užpilama 50 μ L GA 25% vandeninio tirpalo, diskelis su GA aktyvuojamas 15 min. Po aktyvacijos diskelis 3 min purtomas 0.1M HCl tirpale ir 1 min PBS buferyje. Tuomet diskelis nudžiovinamas ir ant jo užnešamas baltymas (0.1 mg/ml FN tirpalas) ir baltymas inkubuojamas 30min. Po inkubacijos diskelis 2min papurtomas PBS.

2.5 PAM-MA su FN, amino-karboksilo grupių sujungimas per EDC

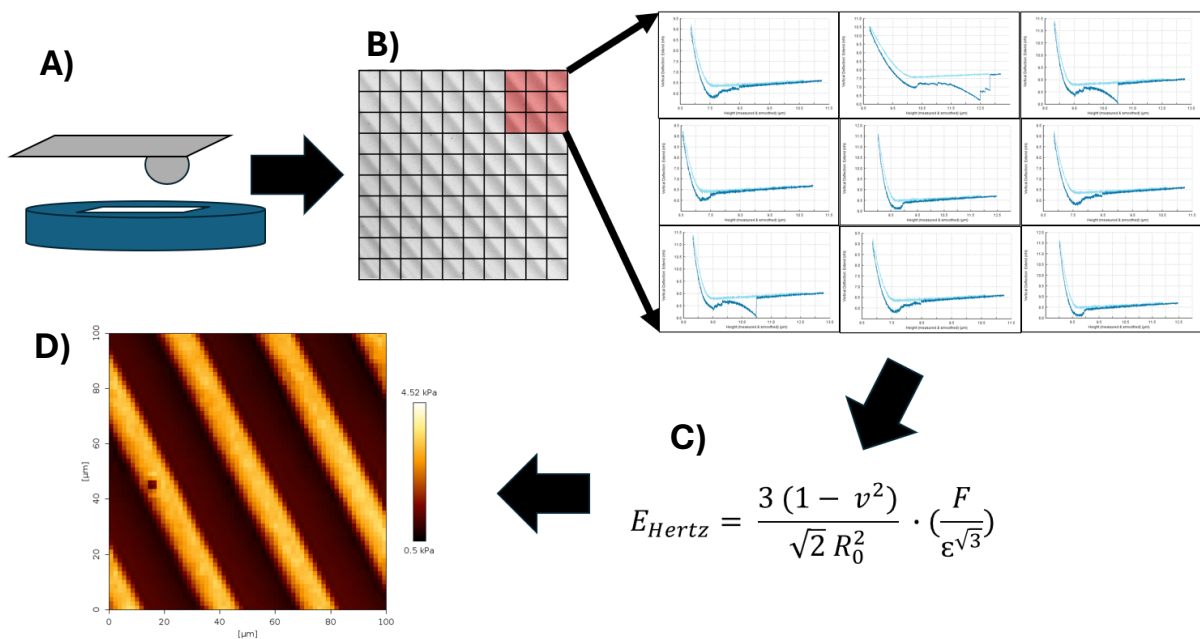
Paruošiamas baltymo/EDC tirpalas. Jam paruošti naudojamas 20 μ L EDC (19 mg/ml) tirpalas, EDC tirpinant MES 0.1M 6pH buferyje ir 10 μ L baltymo tirpalo (0.1 mg/ml FN) 6pH PB buferyje. Paruoštas baltymo/EDC tirpalas užnešamas ant PAM diskelio ir inkubuojamas 3h. Po inkubacijos diskelis pernešamas į PBS buferį ir 2min papurtomas ultragarsinėje vonelėje. Alternatyviai galima naudoti BSA ar kitus baltymus esant didesnėms baltymo koncentracijoms užtenka trumpesnės inkubacijos (darant su BSA naudota 10 μ L 10mg/ml BSA ir 20 μ L EDC).

2.6 PAM hidrogelių padengimas fibronektino baltymu

PAM hidrogeliai dengti naudojant sulfo-SANPAH reagentą. Pasiruošiamas sulfo-SANPAH tirpalas (2 mg/ml) 7,4 pH MES buferyje. Išsyk pasiruošus tirpalą, PAM bandiniai inkubuojami su 20 μ L tirpalo 365nm UV šviesoje 10 min. Po inkubacijos, nedelsiant bandiniai praplaunami PBS buferiu, lengvai nudžiovinami pučiant azotu ir ant bandinių užlašinami 7 μ L FN tirpalo (0,5 mg/ml). Bandiniai su FN inkubuojami per naktį, šaldytuve.

2.7 Hidrogelio mechaninių savybių ir topografijos tyrimas panaudojant AFM

Struktūrizuoti hidrogeliai buvo tyrinėjamas su JPK Nanowizard 3 bio-AFM, naudojant HQ:NSC 36 tipless adatą su priklijuota $d = 4 \mu$ m silicio sfera. Hidrogeliai tirti kontaktiniu režimu, naudojant QI modą. Jungo modulio vertės hidrogeliams programiškai apskaičiuojamas taikant Hertzo modelį (žr. 4 pav.). Konkretūs matavimo parametrai buvo atskirai parenkami kiekvienam eksperimentui, siekiant išgauti aiškius topografijos vaizdus ir tinkamas jėgos-atstumo kreives, tolimesnei analizei.



4 pav. Schema vaizduojanti bandinio Jungo modulio vaizdinimą naudojant AFM-QI modą. Su AFM zondų (A), kiekvienam nagrinėjamos zonos pikseliui užregistruojama jėgos kreivė (B), vėliau šioms kreivėms pritaikomas Hertzio modelis (C) ir taip gaunamos Jungo modulio vertės kiekviename pikselėje, šios vertės galiausiai pavaizduojamos spalviniu vaizdu (D).

2.8 Mezenchiminių ląstelių eksperimentai

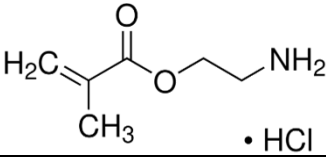
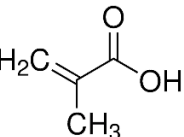
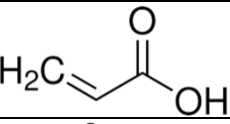
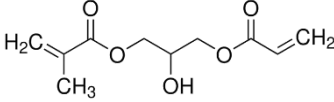
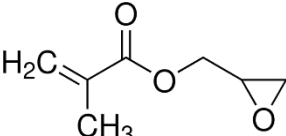
Nuo šulinėliuose laikomų hidrogelių nusiurbiamas PBS ir šulinėliai užpilami mitybine terpė, taip hidrogeliai palaikomi 4,5 h. kambario temperatūroje. Vėliau, mitybinė terpė nusiurbiamą nuo šulinėlių ir hidrogeliai sausai laikomi apie 10min. Tuomet po 2×10^4 mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) užsėta į visus šulinėlius su hidrogeliais, bei tuščią šulinėlį (TCP kontrolė). MKL prieš užsėjimą buvo nudažytos su 32,5 μM Hoechst 33342 branduolių ir 10 μM CellTracker Green CMFDA dažais. Ląstelių sėjimui naudojama 30 μL ląstelių suspensijos, užsėjus laukiama 30 min, po to papildant šulinėlį mitybine terpe iki 1ml tūrio. Plokštelė perkeliama į inkubatorių, ląstelės vaizdinamos po 4h ir 24h nuo užsėjimo. Praėjus 24h ląstelės 15 min fiksuotos su 4 % paraformaldehidu kambario temperatūroje. Po fiksavimo šulinėliai 3 kartus atsargiai nuplaunami su PBS.

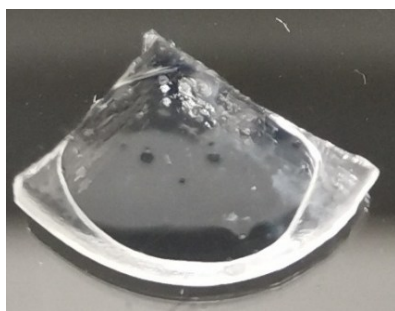
3 Skyrius: Rezultatai

3.1 PAM hidrogelių kopolimerai

Žvalgant poliakrilamido gelio funkcionalizavimo galimybes, buvo paruošti skirtingas funkcines grupes inkorporuojantys PAM mišiniai (žr. 2 lentelę). Iš šių mėginių, 2 nebuvo permatomi, kas apsunkintų tolimesnius bandymus, todėl tolimesni šių PAM tyrimai nebuvo vykdomi (žr. 5 pav.). Iš likusių, PAM su akriline rūgštimi polimerizavosi kiek keistai, diskelis buvo smarkiai susitraukęs, stipriai brinko, o ankstesni tyrimai su metakriline rūgštimi jau leidžia turėti karboksilo grupę dangos paviršiuje, išvengiant šių sunkumų. PAM su aminoetil metakrilatu buvo pats perspektyviausias, nes savo fizikinėmis savybėmis mažai skyrėsi nuo paprasto PAM hidrogelio, bet leido turėti PAM su amino grupėmis. Bandant sujungti amino grupę iš baltymo su PAM-AM buvo pasitelktas glutaraldehidas, tačiau toks PAM įgaudavo ryškiai oranžinę spalvą ir smarkiai padidėdavo tokio PAM standumas nepriklausomai nuo paveikimo laiko (žr. 6, 7 pav.), tačiau baltymą prie hidrogelio prijungti galima ir kitais metodais. Galiausiai pasirinkta tolimesniems bandymams naudoti PAM ir metakrilinės rūgšties kopolimerą (PAM-MA), bei PAM ir amino metakrilato kopolimerą (PAM-AM).

2 lentelė. PAM kopolimerai ir jų savybės.

PAM kopolimeras (angl.)	Cheminė formulė	Skaidrumas	Jungo modulis
2-Aminoethyl methacrylate hydrochloride (AM)		Skaidrus	46 ± 4 kPa
Methacrylic acid (MA)		Skaidrus	35 ± 5 kPa
Acrylic acid (AA)		Skaidrus	22 ± 9 kPa
3-(Acryloyloxy)-2-hydroxypropyl methacrylate		Matinis baltas	-
2,3-Epoxypropyl methacrylate		Matinis baltas	3 ± 1 kPa



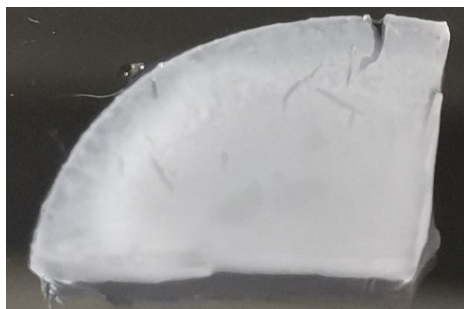
2-Aminoethyl methacrylate hydrochloride



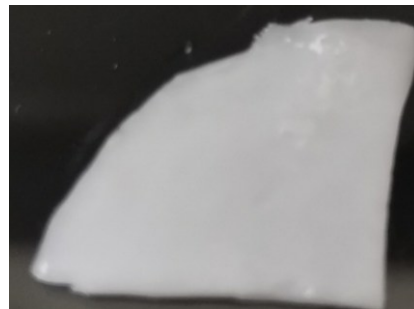
Methacrylic acid



Acrylic acid

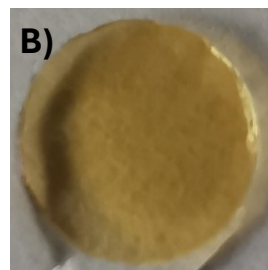
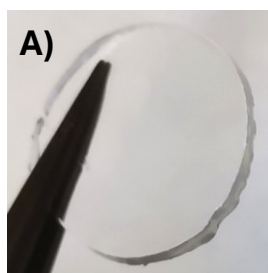


2,3-Epoxypropyl methacrylate

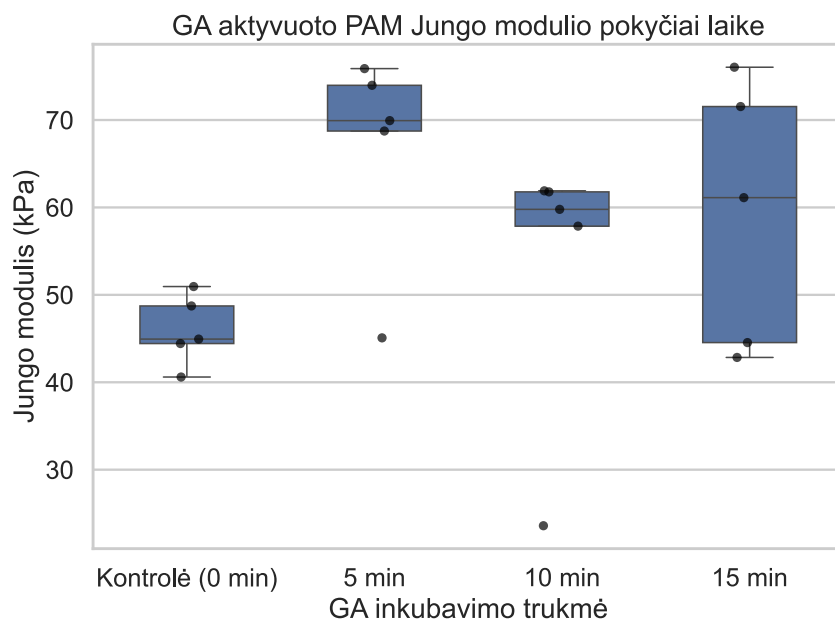


3-(Acryloyloxy)-2-hydroxypropyl

5 pav. PAM hidrogeliai su skirtingų kopolimerų priedais. Visi PAM hidrogeliai paruošti pridodant 5% kopolimero, polimerizaciją inicijuojant TEMED ir APS junginiais.



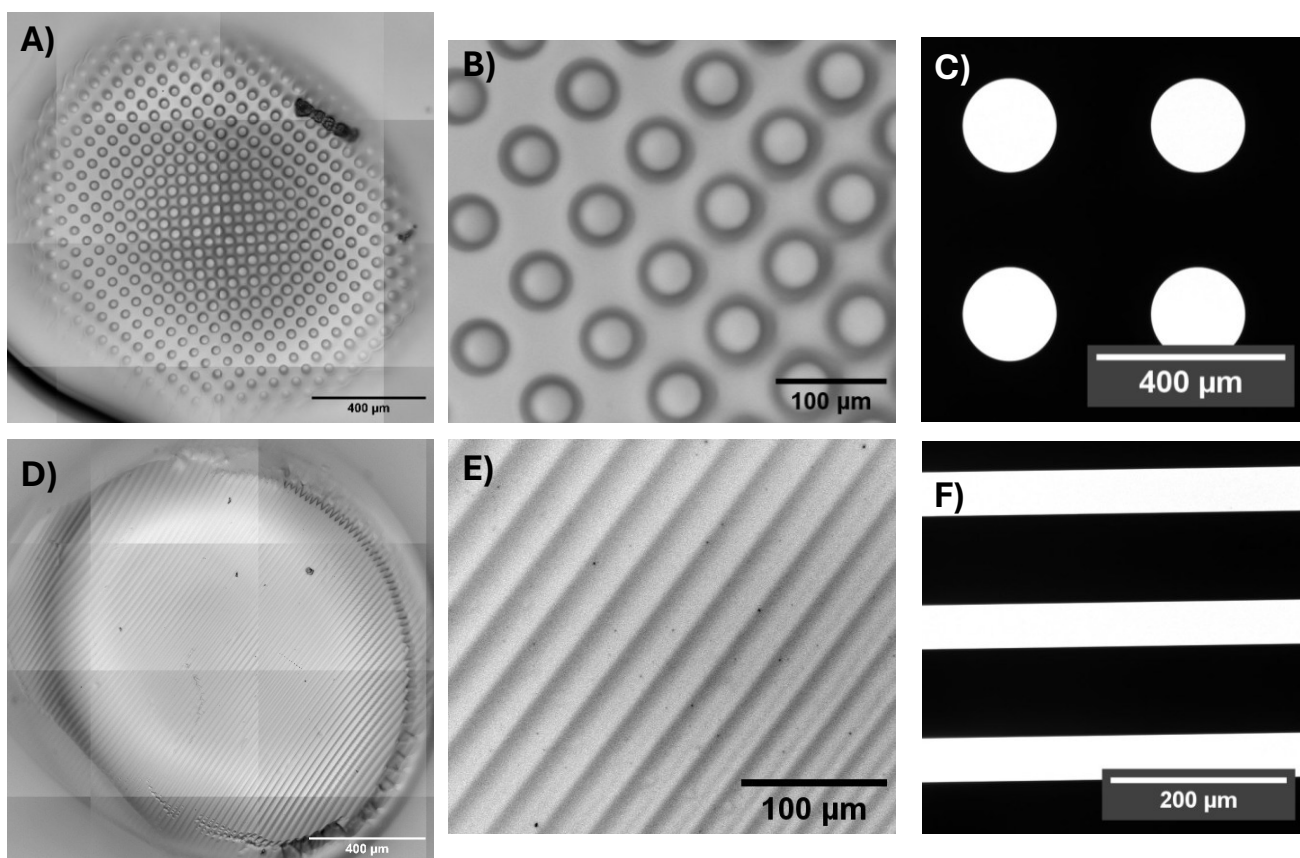
6 pav. PAM – AM hidrogelis prieš (a) ir po 15min (b) inkubacijos vandeniniame 25% glutaraldehido tirpale.



7 pav. Glutaraldehidu paveiktų PAM-AM, Jungo modulio vertės priklausomai nuo inkubavimo trukmės. Kiekvieno taško jungo modulio vertė gauta suvidurkinus vertes gautas 30 μm x 30 μm bandinio plote. Dėžutės žymi IQR regioną (Q2, Q3 režius), atkarpos už dėžučių, visų duomenų pasiskirstymo režius, brūkšnys – medianą.

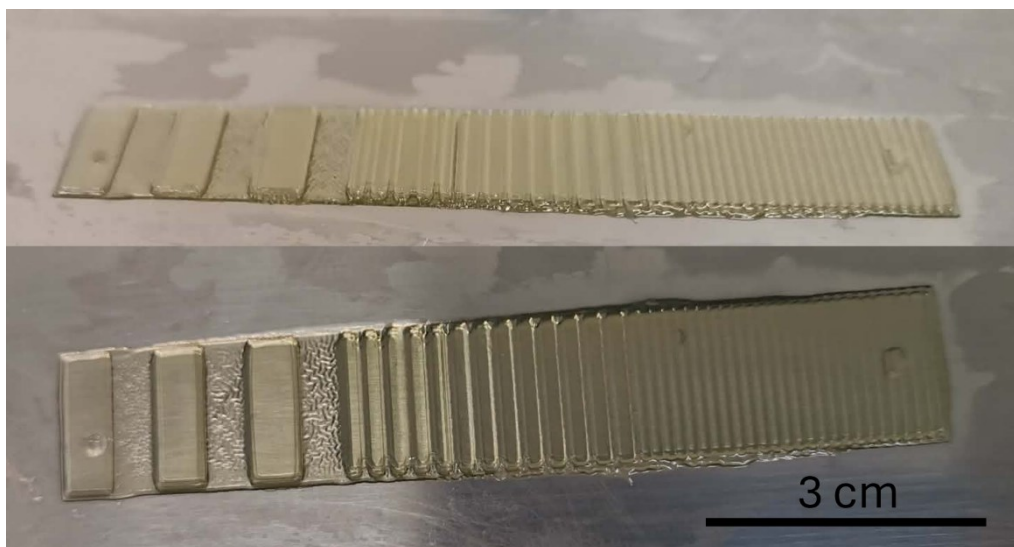
3.2 Fotoinicijuojama PAM polimerizacija

PAM polimerizacija gali būti inicijuojama pasitelkiant fotoiniciatorius, vienas populiariausių komerciškai prieinamų fotoiniciatorių polimerizacijos reakcijoms – Irgacure 2959 (2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone). Irgacure molekulė UV šviesoje (efektyviausiai ties $\lambda = 320 - 390$ nm) skyla į radikalus, reikalingus vykdyti polimerizacijos reakciją. Su šiuo iniciatoriumi paruoštas monomerų mišinys buvo selektyviai skersaryšinamas lokaliai apšviečiant skirtingas mišinio dalis. Šia savybe buvo pasinaudota siekiant sukurti lokaliai skirtingas standumo zonas vieno bandinio paviršiuje. Toks metodas leidžia hidrogelio paviršiuje sukurti pasirinktos formos raštus, kontroliuoti jų standumą reguliuojant UV ekspozicijos trukmę, bei apšvietos intensyvumą. Šiame darbe naudoti 2-iejų tipų raštai: diskai ir juostos (žr. 8 pav.). Darbe pritaikyta optinė sistema, kuomet UV pluoštas eidavo per Olympus IX81 mikroskope įtaisyta kaukę su pasirinktais raštais, dėl fokusavimo kaukės raštai buvo sumažinami iki 5-kartų, taip hidrogelį per objektyvą apšviečiant kaukę atkartojančiais raštais.



8 pav. Standumo raštai suformuoti PAM-MA hidrogeliuose naudojant strukturuotą apšvietimą (žr. pav. 2). Diskinių raštų (A) skersmuo ant hidrogelio $d \approx 40 \mu\text{m}$ (B) ant kaukės $d = 200 \mu\text{m}$ (C), juostinių raštų (D) plotis ant hidrogelio $d \approx 10 \mu\text{m}$ (E) ant kaukės $d = 50 \mu\text{m}$ (F).

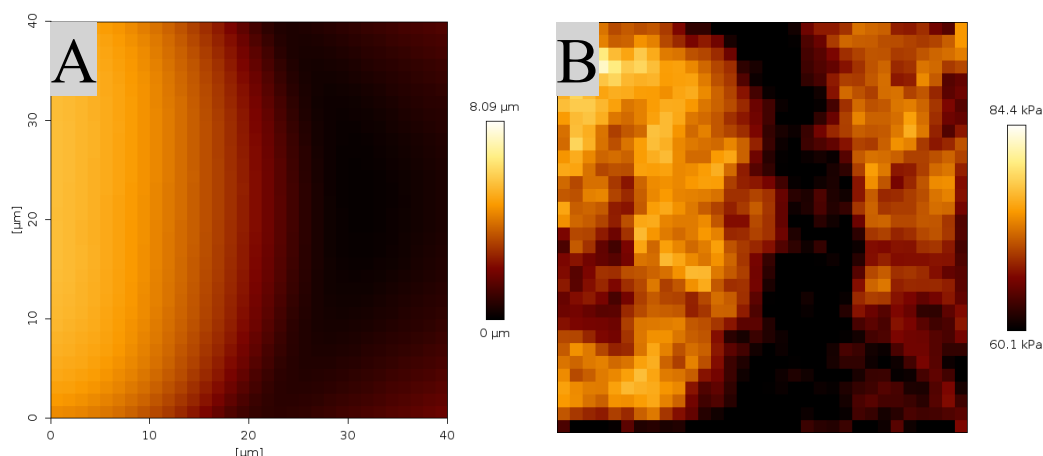
Stebint sėkmingą raštų formavimą pasitelkiant selektyvų apšvietimą, buvo nuspręsta išmėginti raštų formavimui pritaikyti stereolitografijos metodiką. Raštų formavimui šiuo būdu buvo pasitelktas komercinis 3D spausdintuvas, naudojantis $\lambda = 405\text{nm}$ bangos ilgio apšvietimą. Irgacure 2959 nėra tinkamas iniciatorius šiam bangos ilgiui, todėl buvo pakeista poliakrilamido formuliacija į riboflavino inicijuojamą poliakrilamido mišinį (rbPAM). Ši formuliacija turėjo skaidrią gelsvą spalvą, tačiau sėkmingai polimerizavosi apšviečiama 3D spausdintuvo diodu. Optimizuojant rbPAM mišinį pasiekta formuliacija, kuriai užtekdamo 30 sekundžių apšvietos $50\text{ }\mu\text{m}$ aukščio sluoksniui skersaryšinti. Šiuo metodu galima hidrogelį paruošti polimerizuojant sluoksniais, taip gaunant trimates hidrogelio struktūras. Tokiu būdu paruoštos skirtingo pločio topografinės juostos hidrogelio paviršiuje (žr. 9 pav.). Vėliau šis metodas pritaikytas tam kad būtų paruošti bandiniai, kurie neturėtų topografijos tačiau skirtingos bandinio zonos, būtų eksponuojamos šviesoje skirtingą laiko periodą tikintis, jog tai sukurs skirtingo standumo zonas.



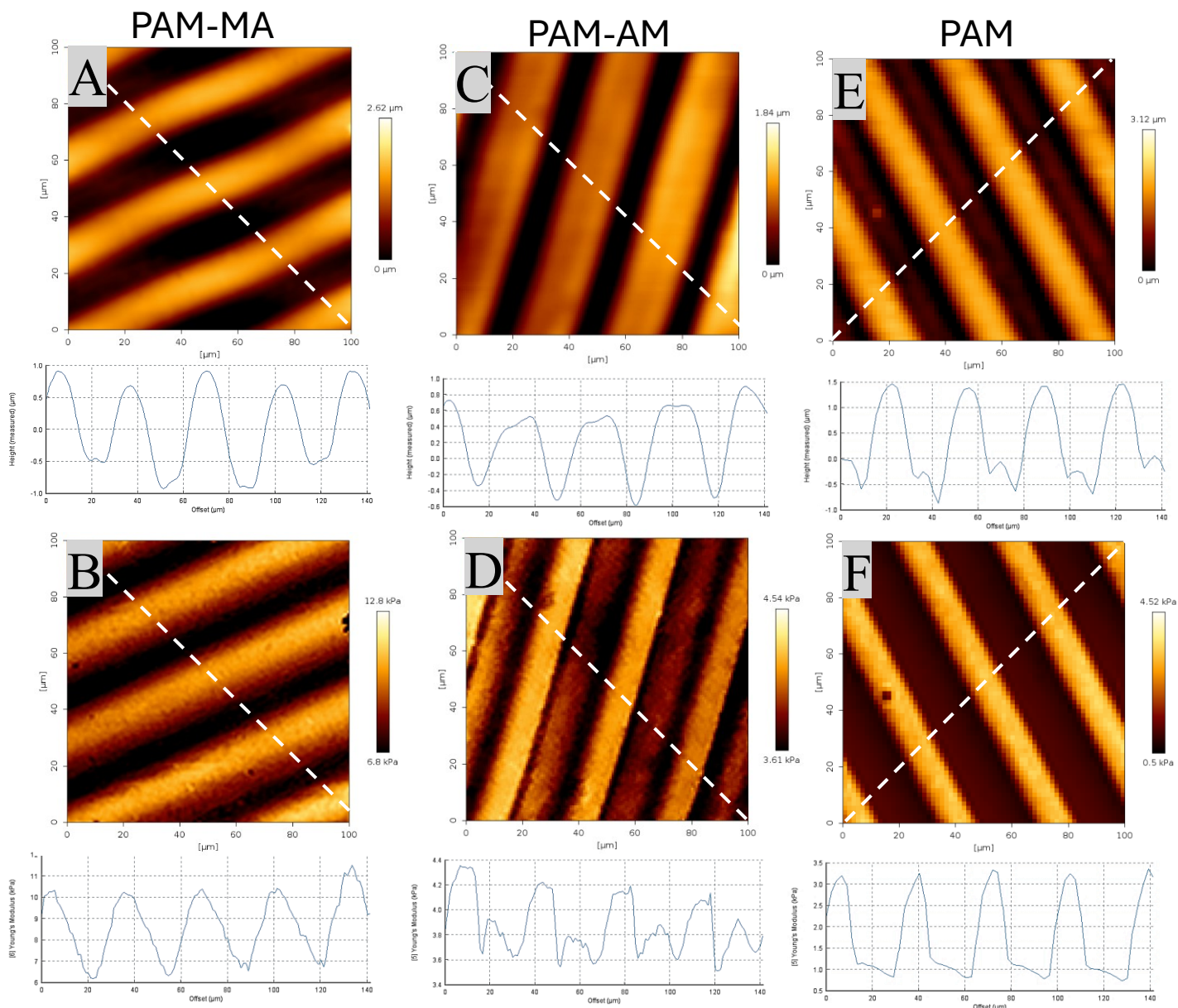
9 pav. PAM hidrogelis su riboflavino fotoiniciatoriumi (rbPAM) paruoštas stereolitografijos būdu (3D spausdintuvu), bandinys turi 3-jų skirtingų pločių iškilusias juostas (pločiai: 5 mm; 1mm; 0,5mm).

3.3 Dangos topografijos ir Jungo modulio vertinimas taikant AFM

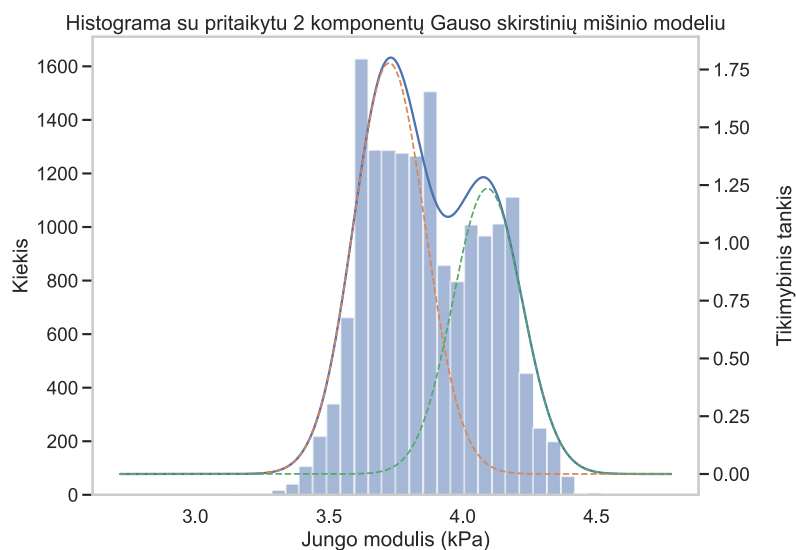
PAM dangos buvo tirtos atominių jėgų mikroskopu (AFM) siekiant įvertinti dangos paviršiuje atsiradusią topografiją ir standumo raštus. Naudotas kontaktinis matavimo režimas ir QI moda, tai reiškia, kad eksperimento metu, apibrėžtas dangos paviršiaus plotas buvo suskirstytas į zonas (pikselius) ir kiekvienoje iš šių zonų užregistruota jėgos kreivė. Tiriant juostinę topografiją ant PAM-MA nustatyta, kad ši siekė 2-4 μm aukštį (žr. 11 pav. A) ir buvo kietesnės iškilusiose vietose (žr. 11 pav. B). Siekiant atskirti Jungo modulio vertes ant ir tarp standumo juostų, bendrai, abiejų zonų Jungo modulio histogramai pritaikomi 2 Gauso skirstiniai (žr. 12, 13 pav.). Jungo modulis ties iškilimais buvo apytiksliai 20% didesnis $\sim 9\text{kPa}$, nei tarp iškilimų $\sim 6\text{kPa}$ (žr. 13 pav.). Tyrinėjant diskus, užregistruotos visiškai kitos vertės. Diskų aukštis siekia 10 μm ir daugiau, kas viršija AFM matavimo galimybes, todėl vaizdai gaunami su artefaktais, o Jungo modulio vertės gali būti netikslios. Šioms dangoms Jungo modulis registruojamas tarp 10 kPa ir 90 kPa, (žr. 10 pav.) dangoms užregistruota daugiau kaip 60 QI matavimų ant 8 bandinių. PAM-AM dangos buvo paruoštos naudojant tik juostinę kaukę, dėl jau žinomų diskinių raštų keliamų iššūkių. Naudojant fotoinicijuojamą PAM-AM gautos Jungo modulio vertės gautos gerokai mažesnės ir siekė 3 – 4 kPa (žr. 13 pav.), negu atliekant žvalgomuosius eksperimentus su APS ir TEMED iniciatoriais ($\sim 46\text{kPa}$, žr. 2 lentelę). PAM-AM skirtumas lyginant su PAM-MA mišiniu, tai kad didesnio Jungo modulio zonos yra topografiškai žemiau, nei minkštesnės mažesnio Jungo modulio zonos. Topografija ant šių bandinių siekia 2 μm aukštį nuo žemiausios iki aukščiausios zonų, šis perėjimas įvyksta $\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ ilgio atkarpoje (žr. 11 pav. C, D). Paruoštų PAM dangų Jungo modulio vertės papuola į biologiškai reikšmingas 1-50 kPa ribas [38].



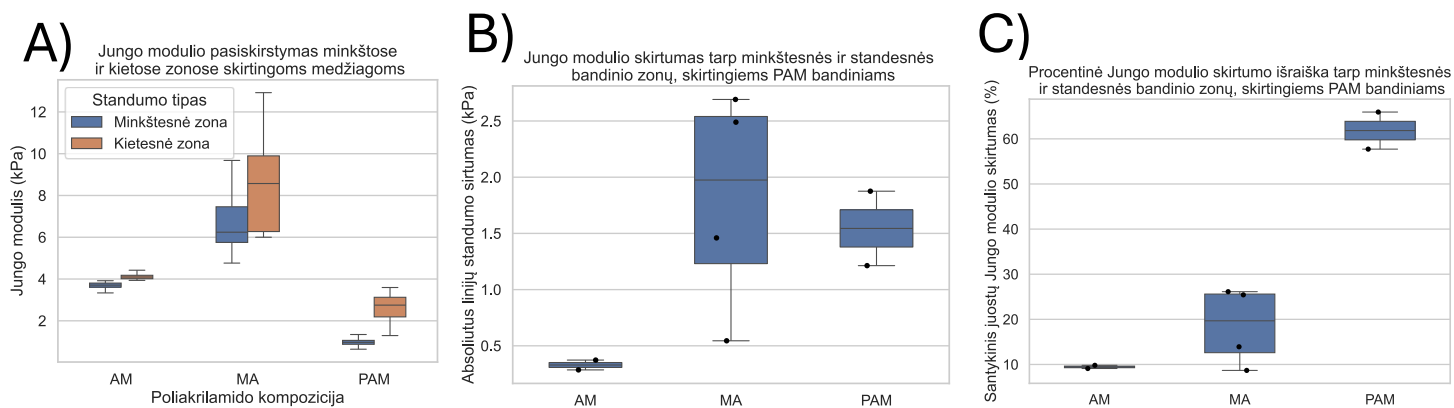
10 pav. PAM-MA dangų su disko formos standumo raštais topografijos (A) ir Jungo modulio (B) vaizdai išmatuotas AFM - QI režimu. Diskas iškilęs ir turi didesnę Jungo modulį, nei fonas.



11 pav. Hidrogelių dangų su juostiniais standumo raštais, paruoštais naudojant strukturuotą apšvietimą, Jungo modulis ir topografija išmatuoti AFM - QI režimu. Pateikiami 2-jų hidrogelių su skirtingais kopolimerais PAM-MA topografija (A) ir Jungo modulis (B), PAM-AM topografija (C) ir Jungo modulis (D), bei kontrolinio poliakrilamido hidrogelio be kopolimerų topografija (E) ir Jungo modulis (F). Po vaizdais pateikiamas matuoto vaizdo įstrižainės (balta punktyrinė linija) profilis. A – dalyje matomas juostų kreivumas yra duomenų analizės programos artefaktas.



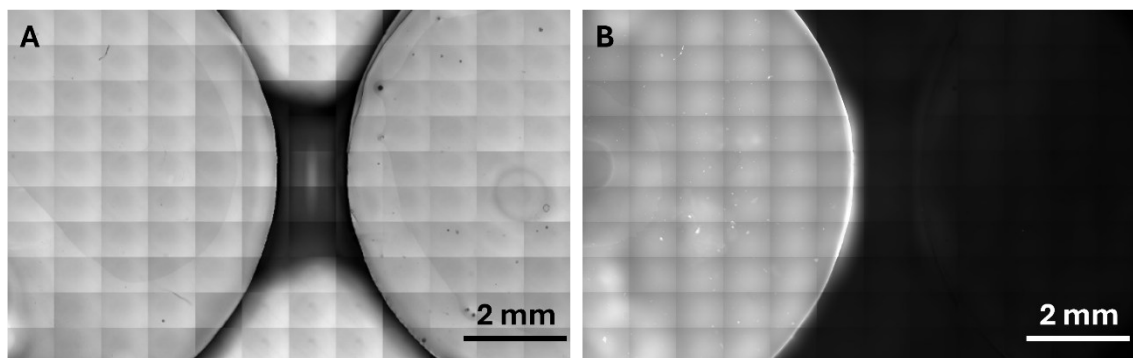
12 pav. AFM-QI būdu PAM-AM bandiniui užregistruotos Jungo modulio vertės atvaizduotos histograma. Duomenims pritaikytas 2-jų komponentų Gauso skirstinių mišinio modelis skirtingo Jungo modulio zonoms išskirti. Gauso skirstiniai atskiria ilgiau apšviestos zonos (standumo juostos) Jungo modulį nuo mažesnės, tarpo tarp juostų vertės.



13 pav. Jungo modulio verčių ant ir už standumo juostų palyginimas tarp skirtingų poliakrilamido kompozicijų (PAM – poliakrilamidas be kopolimerų) (A). Absoliutūs Jungo modulio verčių skirtumai tarp minkštesnių ir kietesnių bandinio zonų, skirtingoms poliakrilamido kompozicijoms (B). Santykiniai Jungo modulio verčių skirtumai tarp minkštesnių ir kietesnių bandinio zonų (C). Iš skirtingų QI matavimų sudarytos standumo verčių histogramos ir šioms pritaikyti 2-iejų komponentų Gauso skirstiniai, taip išskiriant minkštesnę ir standesnę zonas. PAM-AM duomenys iš 2 QI vaizdų, PAM-MA iš 4 QI vaizdų, PAM iš 2 QI vaizdų. Dėžutės žymi IQR regioną (Q2, Q3 režius), atkarpos už dėžučių, visų duomenų pasiskirstymo režius, brūkšnys – medianą.

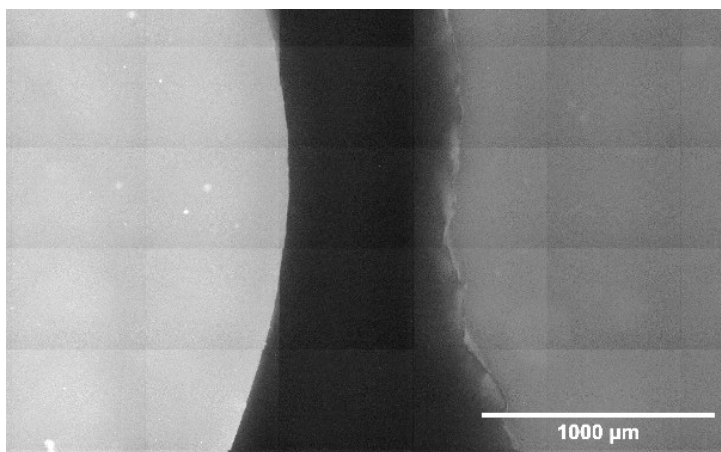
3.4 PAM-MA bioaktyvavimas ir ląstelių adhezijos patikrinimas

Norint PAM-MA hidrogelį paversti biosuderinamu ląstelių eksperimentams, hidrogelį reikia dengti tarpląstelinio užpildo baltymais. Vienas iš šių baltymų yra fibronektinas, kuris skatina ląstelių adheziją. Dažnas protokolas siekiant padengti didelį plotą baltymu yra mikroantspaudavimas, tačiau dėl paviršiuje esančių struktūrų, mikroantspaudavimo neišsina taikyte šiame darbe aprašytoms dangoms, todėl buvo reikalinga ieškoti metodikų, kaip fibronektino baltymą prie hidrogelio prijungti iš tirpalo. Baltymo prijungimui buvo nuspręsta panaudoti EDC reagentą (prijungimo protokolas aprašytas 2.5 skyriuje). Pirmieji bandymai šiam naujam protokolui buvo atliekami naudojant BSA baltymą, nes šis yra pigus ir jį galima naudoti didelėmis koncentracijomis (10mg/ml). Fluorescuojantis Texas Red žyme žymėtas BSA buvo sėkmingai prijungtas prie hidrogelio, tai patvirtinta hidrogelį purtant ultragarsinėje vonelėje ir vėliau vaizdinant šio fluorescenciją šalia kontrolinio bandinio (žr. 14 pav.). Vėliau protokolas buvo pritaikytas fluorescuojančio fibronektino prijungimui prie tokių pat dangų, fibronektino koncentracijos tirpale gerokai mažesnės (0.1 mg/ml), nei BSA, todėl lyginant šių bandinių fluorescenciją su kontrolėmis buvo numanoma, kad skirtumai nebus tokie ryškūs kaip BSA bandinių. Ši prielaida buvo teisinga, bet skirtumai tarp kontrolinio bandinio ir bandinio dengto fibronektino baltymų buvo matomi, todėl nuspręsta, kad fibronektinas bent dalinai prisijungė prie hidrogelio (žr. 15 pav.). Ant taip paruoštų PAM-MA dangų buvo auginamos mezenchiminės kamieninės ląstelės. Buvo atlikti 2 ląstelių auginimo eksperimentai, vienas naudojant dangas su diskais, kitas – dangas su juostomis. Kiekvieno iš šių eksperimentų metu naudoti 4 bandiniai su struktūromis, 1 kontrolinis bandinys be struktūrų ir plastiko kontrolė. Abiejų eksperimentų metu pastebėta, kad labai mažai ląstelių linkusios prikibti ir išsilaikyti dangos paviršiuje (žr. 16 pav.), tačiau ląstelės augo ant šulinėlio paviršiaus už bandinio. Ląstelėms augant ant dangų su diskais, ląstelės morfologija smarkiai skyrėsi priklausomai nuo

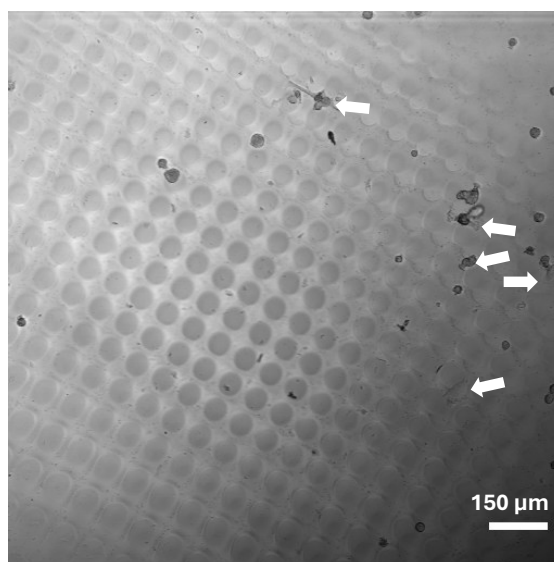
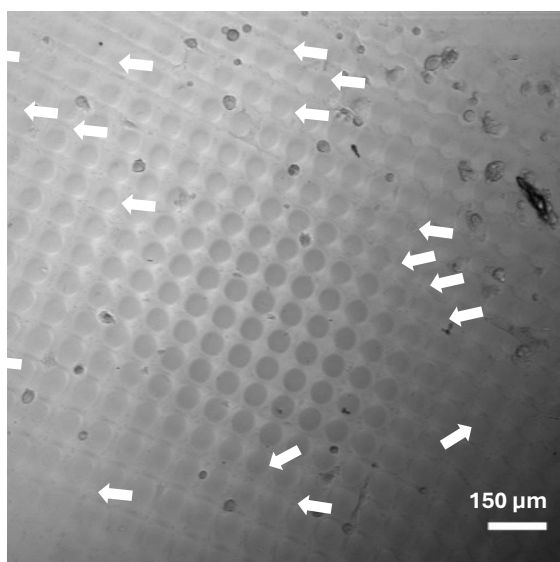


14 pav. PAM-MA hidrogelio aktyvavimas EDC reagentu ir Texas Red BSA baltymo prijungimas iš buferio. Šviesiame lauke (A) matomas aktyvuotas (kairėje) ir neaktyvuotas (dešinėje) hidrogeliai. Fluorescenciniame vaizde (B), matomas tik aktyvuotas hidrogelis.

to ar ši augdavo ant disko ar tarp diskų. Ant diskų augusios ląstelės buvo linkusios užimti visą disko plotą ir toliau nesiplėsti, tarpuose augusios ląstelės orientuodavosi tarp diskų. Ląstelės augusios ant paviršių su juostomis irgi išsiskyrė į 2 tipus, dalis ląstelių orientavosi išilgai juostų ir įgavo pailgą formą, o kita dalis išplito per keletą juostų įgydamos apvalią formą.



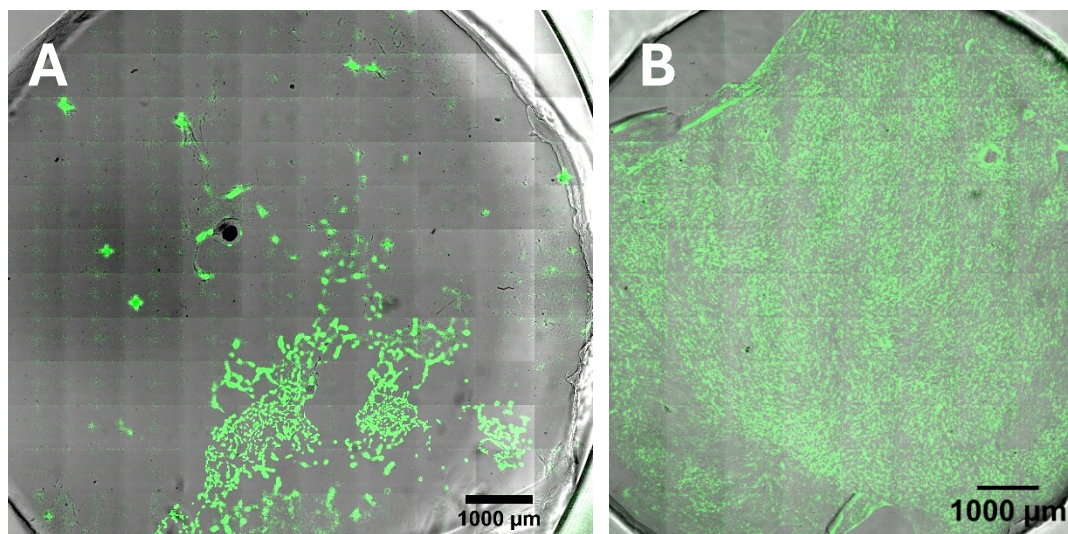
15 pav. PAM-MA hidrogelio aktyvavimas EDC reagentu ir kovalentinis HiLite 488 žyme žymėto fibronektino baltymo prijungimas. Fluorescenciniame vaizde matyti stipresnis aktyvuoto hidrogelio signalas (kairėje), negu neaktyvuoto (dešinėje). Prijungimui naudota 100 kartų mažesnė baltymo koncentracija negu 14 pav.



16 pav. Mezenchiminių kamieninių ląstelių adhezija ant PAM-MA dangų su disko formos standumo ir topografijos raštais. Kairėje – vaizdas po 4h nuo ląstelių užsėjimo, dešinėje – 24h. Rodyklėmis pažymėtos prikibusios ląstelės.

3.5 PAM-AM bioaktyvavimas ir ląstelių adhezijos patikrinimas

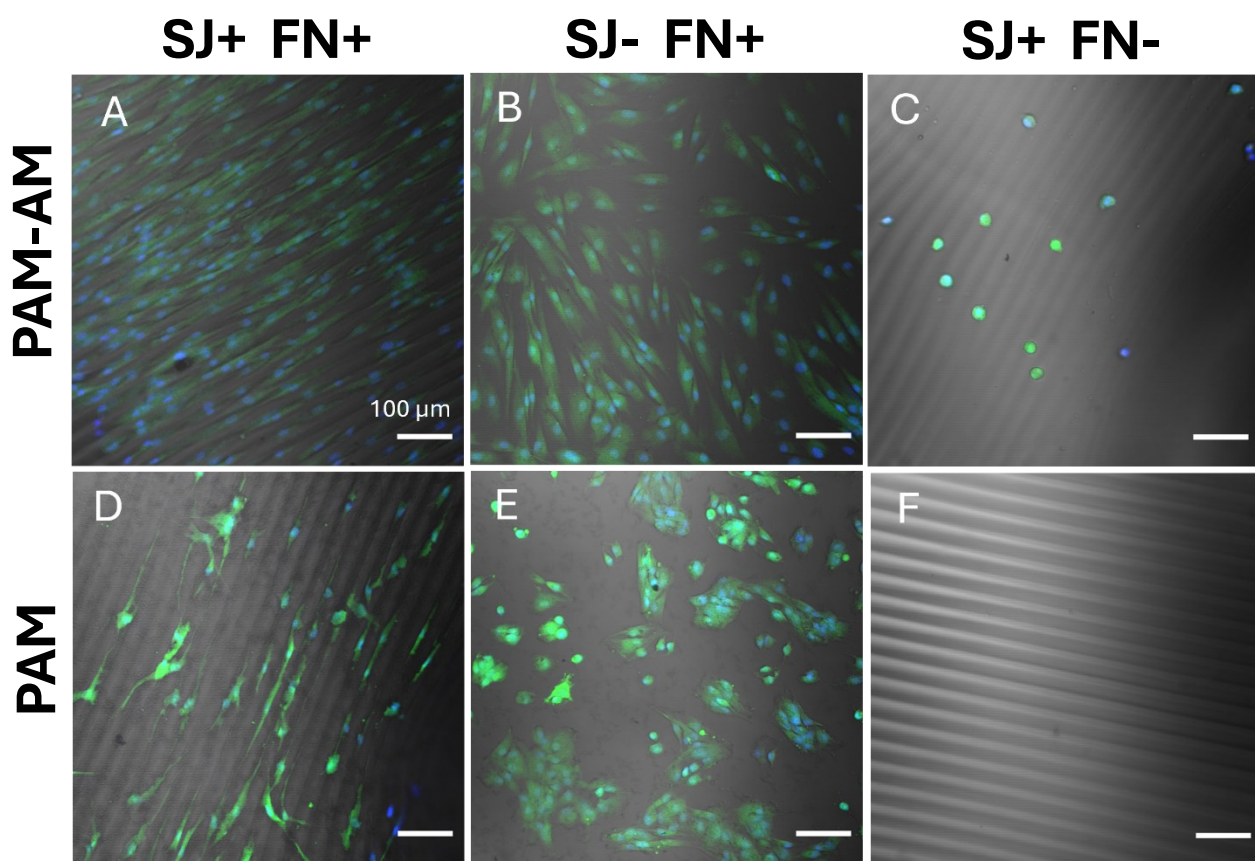
Fibronektino prijungimui prie PAM-AM, kuris neturi karboksilo grupės buvo pasitelktas sulfo-SANPAH reagentas, (protokolas aprašytas 2.6 skyriuje). Sulfo-SANPAH reagentas turi ryškiai raudoną spalvą, kuria nudažo hidrogelį, po aktyvacijos. Fibronektino žymėto HiLyte 488 žyme fluorescencija nėra matoma ant tokių bandinių. Tam kad būtų galima patvirtinti, jog fibronektino baltymas buvo sėkmingai prijungtas, nuspręsta ant bandinio užauginti GFP ekspresuojančius fibroblastus, kurie kimba prie fibronektino ir nekimba prie PAM. Lyginant PAM-AM bandinį paveiktą sulfo-SANPAH reagentu ir inkubuotą su FN baltymų ir kontrolinį bandinį, kuris nebuvo inkubuotas su FN baltymu, matome aiškų skirtumą tarp paviršiaus pasidengimo fibroblastais (žr. 17 pav.). Eksperimentas patvirtino sėkmingą fibronektino prijungimą prie PAM-AM hidrogelio, todėl toliau nuspręsta šiuos hidrogelius panaudoti MKL eksperimentams.



17 pav. PAM-AM hidrogelio aktyvavimas sulfo-SANPAH reagentu ir kovalentinis fibronektino baltymo prijungimas. Sukloti hidrogelių šviesaus lauko ir žaliai fluorescuojančių fibroblastų fluorescencijos vaizdai. Žymi fibroblastų adhezija ant aktyvuoto (B) bandinio, lyginant su neaktyvuotu (A) bandiniu, patvirtina sėkmingą fibronektino baltymo prijungimą.

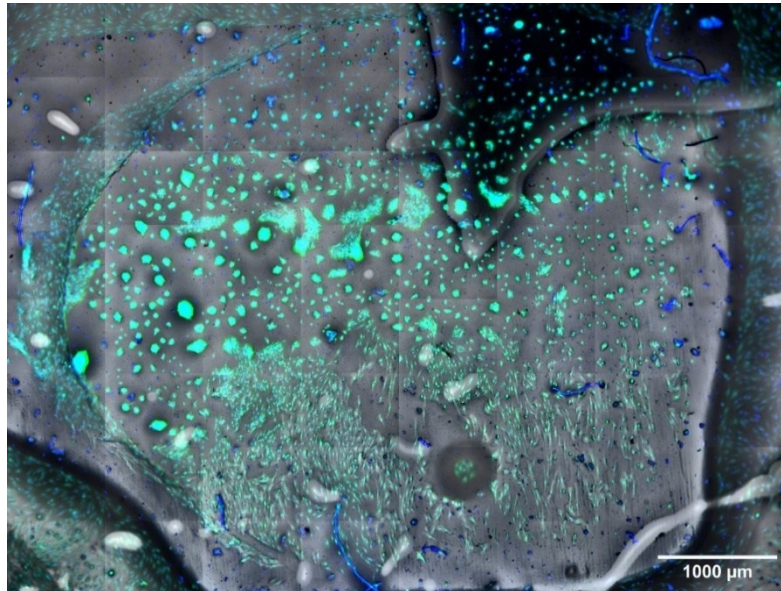
3.6 Ląstelių auginimas ant PAM ir PAM-AM dangų

Matant prastą ląstelių prisitvirtinimą prie PAM-MA dangų, eksperimentai buvo pakartoti naudojant PAM ir PAM-AM dangas, prie kurių fibronektino baltymas buvo jungtas per sulfo-SANPAH reagentą. Eksperimento metu naudoti bandiniai su standumo juostomis ir be standumo juostų ir kontrolės be fibronektino (žr. 18 pav.). Ant bandinių matoma kad MKL sėkmingai nusėdo ir prikibo prie hidrogelių dengtų fibronektino baltymu paviršiaus. Ląstelės orientavosi išilgai suformuotų standumo juostų (SJ). Ląstelės neaugo ant kontrolinių bandinių, be fibronektino baltymo ir nebuvo orientuotos ant bandinių be standumo juostų. Lyginant paprastą PAM mišinį su PAM-AM, daugiau ląstelių prikibo ant PAM-AM paviršių, negu paprasto PAM. Ląstelės augintos ir ant hidrogelių su riboflavinu (rbPAM), kuriame

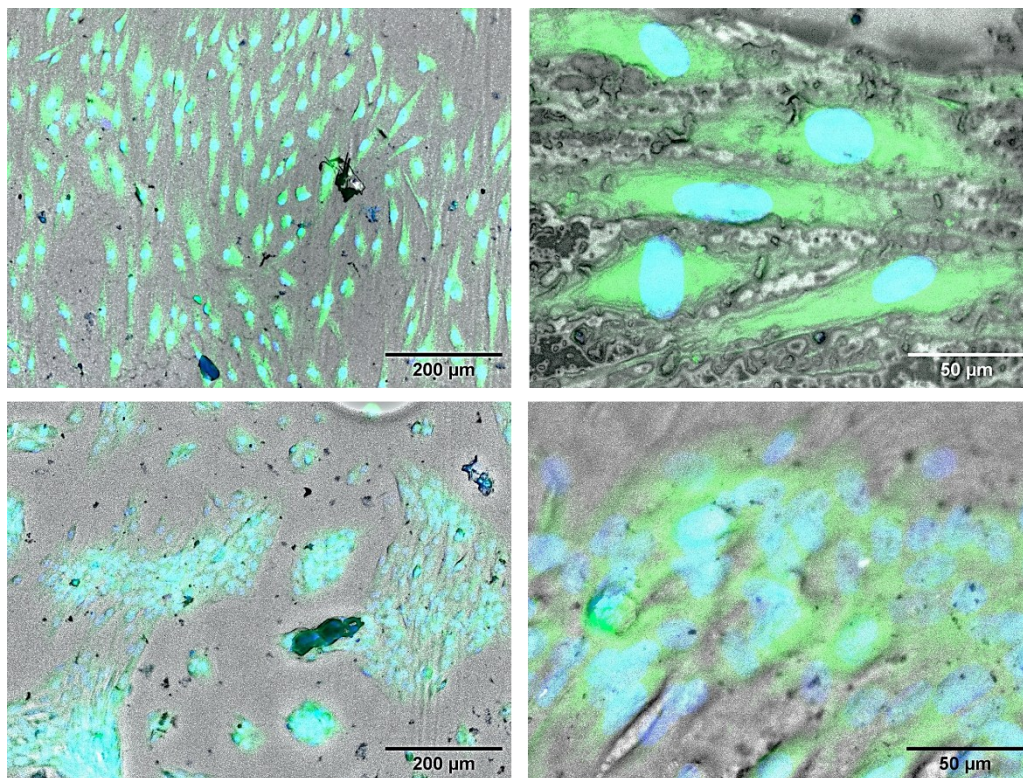


18 pav. MKL adhezija ant PAM ir PAM-AM hidrogelių. Paveiksle matomi bandiniui charakteringi sukloti hidrogelio šviesaus lauko mikroskopijos, žaliai fluorescuojančio citozolio ir mėlynai fluorescuojančių branduolių vaizdai, po 24h nuo ląstelių sėjimo. SJ – standumo juostos, FN – fibronektinas. PAM-AM su standumo juostomis (A), PAM-AM lygus paviršius (B), PAM-AM su standumo juostomis nedengtas baltymu (C), PAM su standumo juostomis (D), PAM lygus paviršius (E), PAM su standumo juostomis nedengtas baltymu (F), TCP (angl. *tissue culture plate*) plastiko kontrolė (G).

stereolitografijos būdu suformuotas standumo gradientas, ant šio bandinio matomi ryškūs ląstelių fenotipiniai skirtumai (žr. 19 pav.). Ant šio bandinio ląstelės auga tiek pavienės tiek ir sankaupomis ir šių morfologijos atsiskiria skirtingose bandinio zonose (žr. 20 pav.).



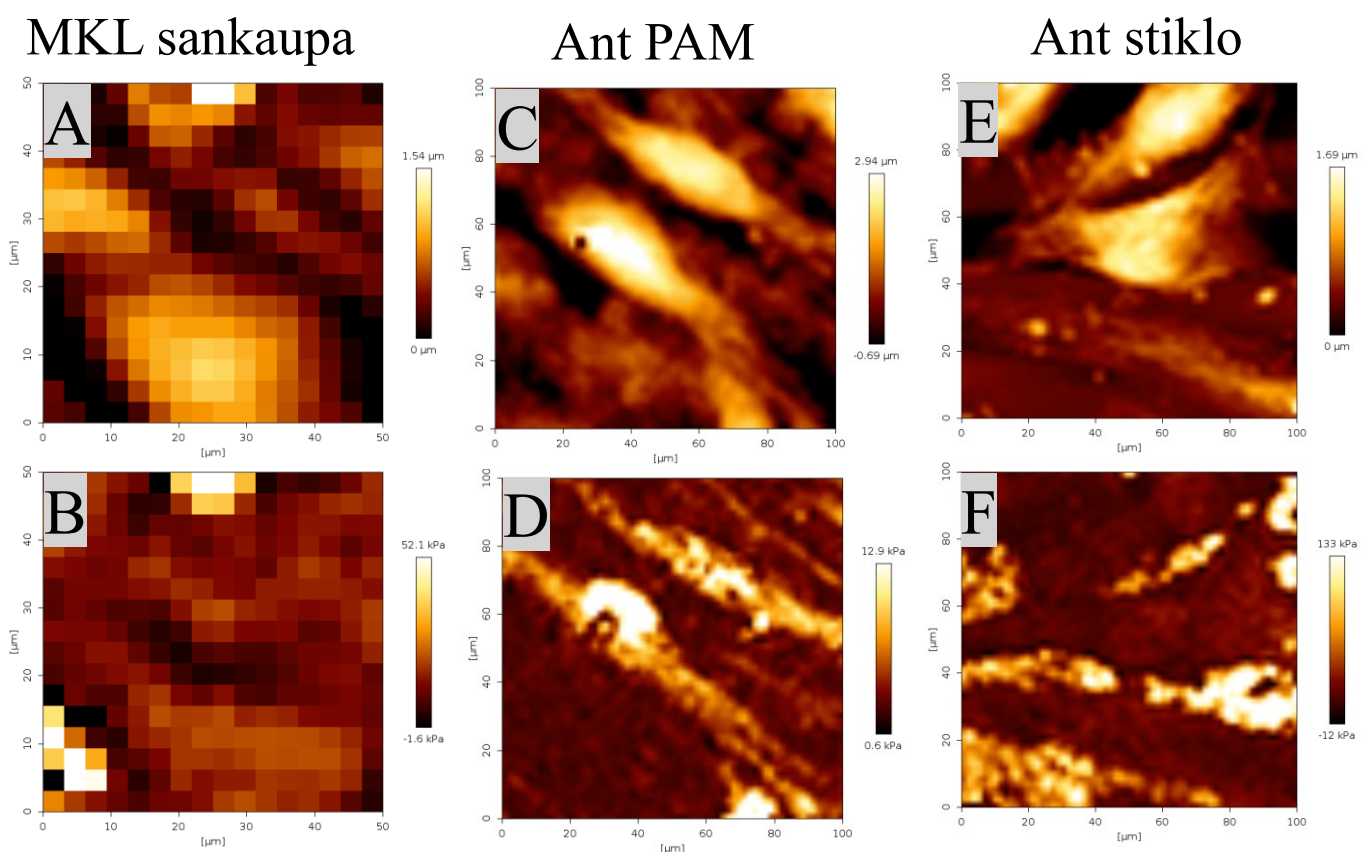
19 pav. MKL adhezija ant fibronektinu bioaktyvuoto rbPAM hidrogelio, kuriame suformuotas Jungo modulio gradientas. Sukloti hidrogelio šviesaus lauko ir ląstelių fluorescencijos (žaliai fluorescuojantis citozolis, mėlynai – branduoliai) vaizdai. Hidrogelio Jungo modulis didėja iš vaizdo viršaus į apačią.



20 pav. Priartintos įvairios 19 pav. zonos.

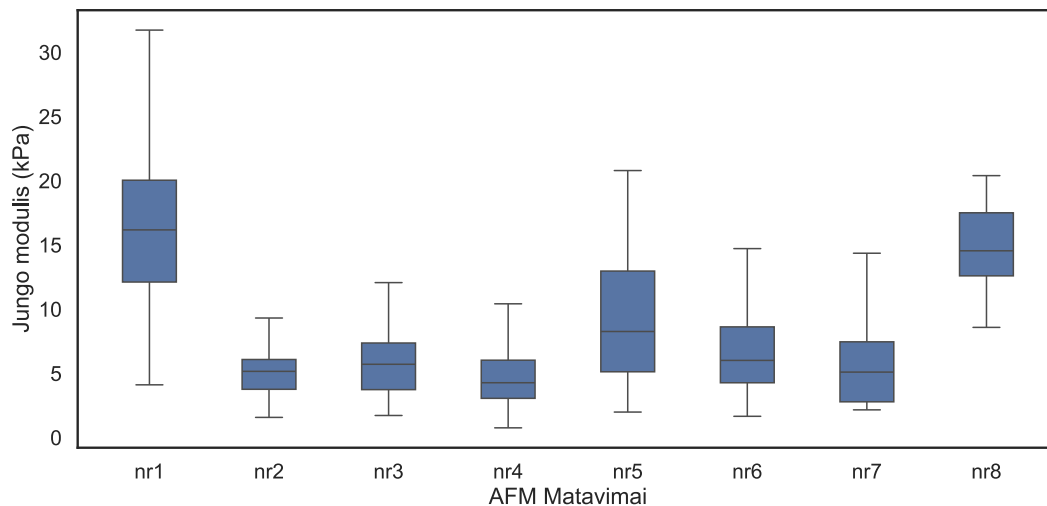
3.7 MKL ląstelių vertinimas AFM

Skirtingos ląstelinės morfologijos stebėtos ant rbPAM bandinio fluorescencinės mikroskopijos metodais, buvo matuotos AFM atlikus ląstelių fiksavimą. Matuotos ląstelės augusios ant stiklo už bandinio, didelės ląstelinės sankaupos matomos ant bandinio, bei pavienės ląstelės ar maži ląstelinės sankaupos randamos skirtingose bandinio zonose. Matuojant pavienes ląsteles nesunku registruoti didesnio ploto vaizdus (100 μm x 100 μm) dėl ganėtinai nedidelio ląstelių aukščio (iki 4-5 μm), tačiau matuojant dideles ląstelines sankaupas šių aukštis gali siekti 10 μm ir daugiau, todėl sunku registruoti didelio ploto vaizdus (žr. 21 pav.). Vertinant ląstelių Jungo modulį pastebėta, kad jis panašus pavienėms ląstelėms ar mažoms ląstelinėms sankaupoms randamoms hidrogelio paviršiuje, nesvarbu kurioje bandinio vietoje jos randasi ir siekia ~5 kPa, tačiau skiriasi nuo Jungo modulio užregistruoto ant didelių ląstelinų sankaupų ir ląstelių augusių ant stiklo, kurių Jungo modulio vertės siekia ~15 kPa ir yra labai panašios tarpusavyje (žr. 22 pav.). Kadangi kiekvienas matavimas turėjo bent po keletą ląstelių ar

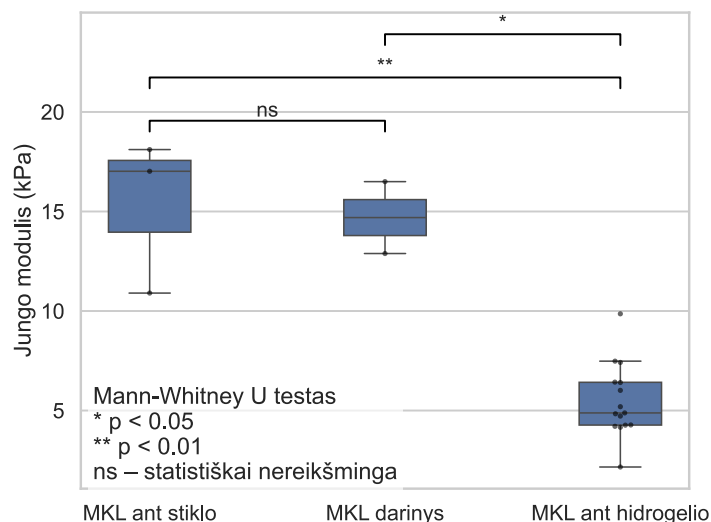


21 pav. Fiksuotų MKL topografijos ir Jungo modulio vaizdai užregistruoti AFM-QI režimu. Visos ląstelės priklauso tam pačiam bandiniui tačiau buvo skirtingose zonose ir išreiškė skirtingą morfologiją (žr. 21 pav.), užregistruota ląstelių sankaupos augusios ant hidrogelio topografija (A) ir Jungo modulis (B), pavienių ląstelių augusių ant hidrogelio topografija (C) ir Jungo modulis (D), bei ląstelių augusių ant stiklo, už PAM hidrogelio topografija (E) ir Jungo modulis (F).

darinių, buvo nuspręsta panaudoti kiekvienos ląstelės vidutinę Jungo modulio vertę ir pagal šias įvertinti matuoto regiono ląstelių Jungo modulio medianą ir atlikti statistinius palyginimus tarp ląstelių augusių ant stiklo, didelės MKL sandaupos ir bendrai visų kitų registruotų ląstelių. Matyti, kad didelės MKL sandaupos Jungo modulio vertės buvo panašios į ant stiklo augusių MKL Jungo modulio vertes ir abiejų šių zonų ląstelių Jungo modulio vertės reikšmingai skyrėsi nuo kitų ląstelių Jungo modulio verčių (žr. 23 pav.).



22 pav. Ląstelių esančių skirtingose rbPAM bandinio zonose Jungo modulio vertės, iš viso matuotos 8 zonos: nr1, ląstelės ant stiklo; nr 2-7, pavienės ląstelės ar mažos ląstelių sandaupos atsitiktinėse bandinio vietose; nr8, didelė ląstelių sandaupa. Dėžutės žymi IQR regioną (Q2,Q3 režius), atkarpos už dėžučių, visų duomenų pasiskirstymo režius, brūkšnys - mediana. Matome, kad ląstelių augusių ant stiklo, ir didelės ląstelinės sandaupos Jungo modulio vertės kiek didesnės, nei kitų matavimų.



23 pav. Jungo modulio vertės užregistruotos skirtingoms ląstelėms ar ląsteliniams dariniams ant ir už bandinio paviršiaus. Vietoj visų užregistruotų jėgos kreivių, analizei buvo naudojama vidutinė vienos ląstelės Jungo modulio vertė, grafike visų pavienių ląstelių ar mažų ląstelių darinių vertės atspindimos bendroje (MKL ant hidrogelio) grupėje ir statistškai reikšmingai skiriasi nuo didelių ląstelių sandaupų, bei ląstelių ant stiklo Jungo modulio verčių. Dėžutės žymi IQR regioną (Q2,Q3 režius), atkarpos už dėžučių, visų duomenų pasiskirstymo režius, brūkšnys - mediana. Statistiniam reikšmingumui įvertinti atliktas Mann-Whitney U testas.

Pagrindinės išvados ir rezultatai

- 1) Darbe paruošti 6-ių skirtingų kompozicijų poliakrilamido hidrogeliai. Tyrimai buvo tęsiami tik su 3-jų kompozicijų skaidriais hidrogeliais su karboksilo (PAM-MA), amino (PAM-AM) grupėmis ir kontroliniu hidrogeliu be priedų (PAM).
- 2) 2-iem skirtingais fotopolimerizacijos metodais suformuoti standumo mikro-raštai ir atominės jėgos mikroskopu (AFM) atlikta Jungo modulio analizė. Nustatyta, kad PAM-MA Jungo modulis siekė nuo 6 kPa iki 9kPa, PAM-AM nuo 3 kPa iki 4 kPa, kontrolinis PAM nuo 1 kPa iki 3 kPa.
- 3) Hidrogeliai buvo bioaktyvuoti, kovalentiškai prijungiant fibronektino baltymą 3-is skirtingais būdais. Geriausi rezultatai gauti fibronektiną jungiant prie PAM-AM hidrogelių naudojant sulfo-SANPAH bifunkcinį reagentą.
- 4) Ant bioaktyvuotų PAM-AM ir PAM hidrogelių stebėta sėkminga mezenchiminių kamieninių ląstelių adhezija. Nustatyta, kad ląstelės orientuojasi išilgai standumo mikro-raštų ir keičia morfologiją priklausomai nuo hidrogelio Jungo modulio.
- 5) Skirtingų morfologijų ląstelių Jungo modulis įvertintas AFM metodu. Skirtingoms morfologijoms nustatyti statistiškai reikšmingi ląstelių Jungo modulio skirtumai 5 – 15 kPa intervalų ribose.

Santrauka

Vilniaus Universitetas
Fizikos fakultetas
Cheminės fizikos institutas

Andrius Pečiulis

Magistro baigiamasis darbas

SKENUOJANČIO ZONDO IR FLUORESCENCINĖS MIKROSKOPIJOS TAIKYMAI ORGANINIŲ DANGŲ IR BIOLOGINIŲ OBJEKTŲ MECHANINIŲ SAVYBIŲ ANALIZEI

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo suformuoti Jungo modulio mikro-raštus ant poliakrilamido hidrogelio, ir juos pritaikyti ląstelių adhezijai ir mechaniniam stimuliavimui.

Ieškant tinkamų poliakrilamido formuliacijų, buvo pasirinkta naudoti fotoinicijuojama hidrogelį su fotoinciatoriais Irgacure 2959 ar riboflavinu, taip sukuriant galimybes hidrogelio polimerizaciją kontroliuoti šviesa. Šis hidrogelis buvo praturtintas MA (metakriline rūgštimi) arba AM (aminoetil metakrilato hidrochlorido), tai leido išbandyti skirtingus metodus kovalentiniam fibronektino baltymo prijungimui prie hidrogelio.

Formuojant standumo raštus, monomerų mišinys buvo skersaryšinamas 2-iejų žingsnių fotopolimerizacijos būdu. Pirmiausia mišinys per kaukę eksponuotas UV šviesoje, tam pritaikant invertuotą mikroskopą, vėliau bendrai eksponuotas po 365 nm UV šviesos diodu. Standumo raštų formavimui buvo pasitelktas ir kitas, stereolitografijos – 3D spausdinimo metodas. Formuojant raštus šiuo būdu, hidrogelio mišinys buvo apšviečiamas skirtingais šviesos raštais trumpais intervalais, nekeičiant bandinio aukščio.

Registruojant standumo vertes AFM, buvo pastebėta, kad didesnis standumas PAM-MA hidrogeliams registruojamas 1-ame polimerizacijos žingsnyje apšviestose vietose, tačiau tose pačiose zonose registruojama ir iškilusi topografija. PAM-AM hidrogeliams efektas buvo atvirkščias, didesnio standumo zonos registruotos topografiškai žemiau. Naudojant juostinius raštus PAM-MA bandiniams, išmatuota kad juostų aukštis siekė 2-4 μm ir juostos ir aplinkos Jungo modulis atitinkamai siekė 9 kPa ir 6 kPa. Naudojant diskus nepavyko užregistruoti didelės raiškos QI vaizdų, be artefaktų, išmatavus 8 bandinius ir užregistravus daugiau, nei 60 QI. Registravimų metu nustatyta, kad struktūrų aukštis gali siekti 10 μm ir daugiau, o Jungo

modulio vertės skirtingiems matavimas skyrėsi iki 9-ių kartų, nuo 10 kPa iki 90kPa. PAM-AM bandinių standumas ir topografija buvo kiek mažesni, juostų topografija siekė iki 2 μ m, o Jungo modulio vertės ant juostų ir už jų skyrėsi ~10% ir vyravo 3-4 kPa režiuose.

Ląstelės ant paruoštų PAM-MA mėginių, prie kurių fibronektino baltymas jungtas per EDC reagentą augo ganėtinai prastai, mažai ląstelių prikibdavo prie bandinio po užsėjimo ir dar mažiau išsilaikydavo pirmas 24h. Ląstelės išlikusios eksperimento metu įgydavo skirtingas formas priklausomai nuo savo padėties bandinyje (ant topografijų arba tarp jų). Ant PAM ir PAM-AM bandinių, prie kurių fibronektinas jungtas per sulfo-SANPAH reagentą ląstelės augo daug geriau, daug ląstelių nusėdo ir prikibo prie bandinių ir šios orientavosi išilgai paruoštų standumo raštų.

Atliekant ląstelių mechaninius matavimus skenuojančio zondo mikroskopu, nustatyta kad susiformavę didelės ląstelių sankaupos savo Jungo modulio vertėmis reikšmingai skiriasi nuo aplinkinių ląstelių ir jų vertės panašesnės į ant stiklo augančių ląstelių.

Darbo metu paruoštos hidrogelių platformos gali būti pritaikomas mechanobiologiniams tyrimams. Didžiausias platformos privalumas – pritaikytas fotopolimerizacijos protokolas, leidžiantis paprastai paruošti platformas su įvairiais standumo raštais ir topografijomis. Ląstelės išreiškė skirtingas morfologijas augdamos ant šių hidrogelių.

Summary

Vilnius University
Faculty of Physics
Institute of Chemical Physics

Andrius Pečiulis

Master 's Thesis

SCANNING PROBE AND FLUORESCENCE MICROSCOPY APPLICATIONS IN MECHANICAL CHARACTERIZATION OF ORGANIC FILMS AND BIOLOGICAL OBJECTS

SUMMARY

Aim of this work was to form Young 's modulus micropatterns on polyacrylamide hydrogel and adapt these hydrogels for adhesion and mechanical stimulation of cells.

Polyacrylamide formulation used in this work involved photoinitiators such as Irgacure 2959 or riboflavin, allowing for control of hydrogel crosslinking via light. Hydrogel was copolymerised with methacrylic acid (MA) or aminoethyl methacrylate hydrochloride (AM), allowing for various protocols of covalent attachment of extracellular matrix protein – fibronectin, to hydrogel surface.

While forming stiffness patterns, hydrogel mixture was polymerised in 2-step approach. Firstly, hydrogel mixture was exposed to patterned UV light through inverted microscope with photomask. Secondly, sample was exposed to uniform UV light. Another method employed was stereolithography – 3D printing. When forming stiffness patterns with 3D printer, sample height was kept constant, and only the light pattern from printer was changing.

When evaluating these patterns with scanning probe microscopy, it was observed that for PAM-MA hydrogels, higher Young's modulus values are obtained from areas exposed to UV light in 1st polymerisation step, however these areas also exhibited higher topography. For PAM-AM hydrogels we observed inverse effect, with areas of higher Young's modulus values forming lower. When measuring PAM-MA samples, height of line topography was estimated to be between 2-4 μm and Young's modulus values of lines to be around 9 kPa, while gaps between them had 6 kPa. When trying to evaluate same composition samples with disk patterns, it was impossible to get high resolution QI images. 8 samples with over 60 QI measurements were taken, to establish that height of disk patterns exceeds measuring range, and could be over 10 μm in height, Young's modulus values for these disks varied wildly, ranging from 10 kPa to 90

kPa, across samples. For PAM-AM samples with line patterns, line topography only reached up to 2 μm , and Young's modulus of gaps was 10% larger than modulus of lines and ranged somewhere between 3-4 kPa.

Cells on prepared PAM-MA samples, to which the fibronectin protein was bound via the EDC reagent, grew rather poorly, few cells adhered to the sample after seeding, and even fewer survived the first 24 hours. The cells that survived during the experiment differentiated into various shapes, either on the topography or between them. On PAM and PAM-AM samples to which fibronectin was bound via the sulfo-SANPAH reagent, cells grew much better, many cells adhered to the samples, and these oriented themselves along the prepared stiffness patterns.

Mechanical measurements of the cells performed using a scanning probe microscope revealed that the large cellular structures that formed differed significantly in their Young's modulus values from the surrounding cells, and their Young's modulus was more similar to that of cells growing on glass.

The hydrogel platforms prepared during this work can be adapted for mechanobiological studies. The greatest advantage of the platform is the applied photopolymerization protocol, which allows for the simple preparation of platforms with various stiffness patterns and topographies. Cells exhibited different morphologies when growing on these platforms.

Padėka

Dėkoju VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro, Nanoinžinerijos skyriaus darbuotojams: Tomui Rakickui ir Tadiui Jelinskui už pagalbą įrangos pritaikyme fotopolimerizacijos eksperimentams, bei pagalbą analizuojant hidrogelių ir ląstelių Jungo modulį, Tomui Javorskiui už pagalbą ruošiant bandinius ir renkantis tinkamą biofunkcionalizavimo metodiką, Agnei Vailionytei už atliktus fibroblastų adhezijos eksperimentus, bei bandinių citotoksiškumo vertinimą, bei Gintarei Stankevičienei už pagalbą interpretuojant ląstelių adhezijos eksperimentus.

Dėkoju NVI (Nacionalinis vėžio institutas) darbuotojams Džiugui Jurgučiui ir prof. dr. Vitalijui Karabanovui, už ląstelių adhezijos eksperimentus ir gautų rezultatų aptarimą.

Literatūra

- [1] P. Tseng and D. Di Carlo, “Substrates with patterned extracellular matrix and subcellular stiffness gradients reveal local biomechanical responses,” *Advanced Materials*, vol. 26, no. 8, pp. 1242–1247, Feb. 2014, doi: 10.1002/adma.201304607.
- [2] V. K. Gupta and O. Chaudhuri, “Mechanical regulation of cell-cycle progression and division,” Sep. 01, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.tcb.2022.03.010.
- [3] A. D. Rape, W. H. Guo, and Y. L. Wang, “The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 8, pp. 2043–2051, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.044.
- [4] Z. Balion *et al.*, “Cerebellar cells self-assemble into functional organoids on synthetic, chemically crosslinked ECM-mimicking peptide hydrogels,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/biom10050754.
- [5] P. A. Janmey, D. A. Fletcher, and C. A. Reinhart-King, “Stiffness sensing by cells,” *Physiol. Rev.*, vol. 100, no. 2, pp. 695–724, Apr. 2020, doi: 10.1152/physrev.00013.2019.
- [6] J. Zhang *et al.*, “Micropatterned soft hydrogels to study the interplay of receptors and forces in T cell activation,” *Acta Biomater.*, vol. 119, pp. 234–246, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.028.
- [7] M. Notari *et al.*, “CELL BIOLOGY The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart,” 2018. [Online]. Available: <https://www.science.org>
- [8] J. Mei *et al.*, “Increased perfluorooctanoic acid accumulation facilitates the migration and invasion of lung cancer cells via remodeling cell mechanics,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 121, no. 51, Dec. 2024, doi: 10.1073/pnas.2408575121.
- [9] K. Molnar and J.-B. Manneville, “Emerging mechanobiology techniques to probe intracellular mechanics,” *npj Biological Physics and Mechanics*, vol. 2, no. 1, Apr. 2025, doi: 10.1038/s44341-025-00016-4.
- [10] N. Gjorevski *et al.*, “Tissue geometry drives deterministic organoid patterning,” *Science (1979).*, vol. 375, no. 6576, Jan. 2022, doi: 10.1126/science.aaw9021.
- [11] J. Nguyen *et al.*, “Culture substrate stiffness impacts human myoblast contractility-dependent proliferation and nuclear envelope wrinkling,” *J. Cell Sci.*, vol. 137, no. 6, 2024, doi: 10.1242/jcs.261666.
- [12] E. D. Tabdanov, V. Puram, A. Zhovmer, and P. P. Provenzano, “Microtubule-Actomyosin Mechanical Cooperation during Contact Guidance Sensing,” *Cell Rep.*, vol. 25, no. 2, pp. 328–338.e6, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.030.
- [13] C. A. Deforest and K. S. Anseth, “Advances in bioactive hydrogels to probe and direct cell fate,” Jul. 2012. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-062011-080945.
- [14] E. E. Charrier, K. Pogoda, R. Li, C. Y. Park, J. J. Fredberg, and P. A. Janmey, “A novel method to make viscoelastic polyacrylamide gels for cell culture and traction force microscopy,” *APL Bioeng.*, vol. 4, no. 3, Sep. 2020, doi: 10.1063/5.0002750.

- [15] A. K. Denisin and B. L. Pruitt, “Tuning the Range of Polyacrylamide Gel Stiffness for Mechanobiology Applications,” Aug. 31, 2016, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsami.5b09344.
- [16] A. Gandin *et al.*, “Simple yet effective methods to probe hydrogel stiffness for mechanobiology,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-01036-5.
- [17] D. T. N. Chen, Q. Wen, P. A. Janmey, J. C. Crocker, and A. G. Yodh, “Rheology of soft materials,” *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, vol. 1, pp. 301–322, Jul. 2010, doi: 10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120.
- [18] Meyers Marc Andr’e and Chawla Krishan Kumar, “Mechanical Behavior of Materials,” 2008. doi: 10.1017/CBO9780511810947.
- [19] P. C. Nalam, N. N. Gosvami, M. A. Caporizzo, R. J. Composto, and R. W. Carpick, “Nano-rheology of hydrogels using direct drive force modulation atomic force microscopy,” *Soft Matter*, vol. 11, no. 41, pp. 8165–8178, 2015, doi: 10.1039/c5sm01143d.
- [20] L. Striska *et al.*, “Analysis of the Hertz Contact Model for Evaluating Mechanical Properties of Polymers Using the Finite Element Method,” *Polymers (Basel)*, vol. 17, no. 22, Nov. 2025, doi: 10.3390/polym17223018.
- [21] C. D. Lam and S. Park, “Nanomechanical characterization of soft nanomaterial using atomic force microscopy,” Apr. 01, 2025, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.mtbio.2025.101506.
- [22] D. Drabik, M. Gavutis, R. N. Valiokas, and A. R. Ulčinas, “Determination of the Mechanical Properties of Model Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy Indentation,” *Langmuir*, vol. 36, no. 44, pp. 13251–13262, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.langmuir.0c02181.
- [23] S. V. Kontomaris and A. Malamou, “Hertz model or Oliver & Pharr analysis? Tutorial regarding AFM nanoindentation experiments on biological samples,” *Mater. Res. Express*, vol. 7, no. 3, 2020, doi: 10.1088/2053-1591/ab79ce.
- [24] Y. Ding, W. K. Yuan, and G. F. Wang, “Spherical indentation on biological films with surface energy,” *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. 51, no. 29, Jun. 2018, doi: 10.1088/1361-6463/aacaec.
- [25] D. Xu *et al.*, “Measuring the elastic modulus of soft biomaterials using nanoindentation,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 133, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.jmbbm.2022.105329.
- [26] F. Milos and A. del Campo, “Polyacrylamide Hydrogels as Versatile Biomimetic Platforms to Study Cell-Materials Interactions,” Dec. 03, 2024, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/admi.202400404.
- [27] A. Aung *et al.*, “3D cardiac tissues within a microfluidic device with real-time contractile stress readout,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 1, pp. 153–162, 2016, doi: 10.1039/c5lc00820d.

- [28] C. E. Kadow, P. C. Georges, P. A. Janmey, and K. A. Beningo, “Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics: Steps Toward Optimization and Alternative Uses,” 2007. doi: 10.1016/S0091-679X(07)83002-0.
- [29] J. Comelles, V. Fernández-Majada, N. Berlanga-Navarro, V. Acevedo, K. Paszkowska, and E. Martínez, “Microfabrication of poly(acrylamide) hydrogels with independently controlled topography and stiffness,” *Biofabrication*, vol. 12, no. 2, 2020, doi: 10.1088/1758-5090/ab7552.
- [30] N. R. Ariyasinghe *et al.*, “Engineering micromyocardium to delineate cellular and extracellular regulation of myocardial tissue contractility,” *Integrative Biology (United Kingdom)*, vol. 9, no. 9, pp. 730–741, Sep. 2017, doi: 10.1039/c7ib00081b.
- [31] A. D. Lantada *et al.*, “Soft-lithography of polyacrylamide hydrogels using microstructured templates: Towards controlled cell populations on biointerfaces,” *Materials*, vol. 13, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/ma13071586.
- [32] J. Comelles, V. Fernández-Majada, V. Acevedo, B. Rebollo-Calderon, and E. Martínez, “Soft topographical patterns trigger a stiffness-dependent cellular response to contact guidance,” *Mater. Today Bio*, vol. 19, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100593.
- [33] Z. Balion *et al.*, “Comparison of Microglial Morphology and Function in Primary Cerebellar Cell Cultures on Collagen and Collagen-Mimetic Hydrogels,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 5, May 2022, doi: 10.3390/biomedicines10051023.
- [34] R. Miksiunas *et al.*, “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.*, vol. 22, no. 23, Dec. 2021, doi: 10.3390/ijms222312702.
- [35] A. J. S. Ribeiro *et al.*, “Multi-imaging method to assay the contractile mechanical output of micropatterned human iPSC-derived cardiac myocytes,” *Circ. Res.*, vol. 120, no. 10, pp. 1572–1583, May 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310363.
- [36] A. Wolfel, M. Jin, and J. I. Paez, “Current strategies for ligand bioconjugation to poly(acrylamide) gels for 2D cell culture: Balancing chemo-selectivity, biofunctionality, and user-friendliness,” Sep. 20, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fchem.2022.1012443.
- [37] M. Gavutis *et al.*, “Biochip Surfaces Containing Recombinant Cell-Binding Domains of Fibronectin,” *Coatings*, vol. 12, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/coatings12070880.
- [38] I. Sanzari, E. J. Humphrey, F. Dinelli, C. M. Terracciano, and T. Prodromakis, “Effect of patterned polyacrylamide hydrogel on morphology and orientation of cultured NRVMs,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30360-6.
- [39] F. Huang, M. Chen, Z. Zhou, R. Duan, F. Xia, and I. Willner, “Spatiotemporal patterning of photoresponsive DNA-based hydrogels to tune local cell responses,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22645-8.
- [40] E. Geisler, M. Lecomère, and O. Soppera, “3D printing of optical materials by processes based on photopolymerization: materials, technologies, and recent advances,” *Photonics Res.*, vol. 10, no. 6, p. 1344, Jun. 2022, doi: 10.1364/prj.453338.

- [41] I. N. Lee *et al.*, “Photoresponsive Hydrogels with Photoswitchable Mechanical Properties Allow Time-Resolved Analysis of Cellular Responses to Matrix Stiffening,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 9, pp. 7765–7776, Mar. 2018, doi: 10.1021/acsami.7b18302.
- [42] S. Sheth, E. Jain, A. Karadaghy, S. Syed, H. Stevenson, and S. P. Zustiak, “UV Dose Governs UV-Polymerized Polyacrylamide Hydrogel Modulus,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/5147482.
- [43] T. Javorskis, T. Rakickas, A. Jankūnaitė, Š. Vaitekūnis, A. Ulčinas, and E. Orentas, “Maskless, Reusable Visible-Light Direct-Write Stamp for Microscale Surface Patterning,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 15, no. 8, pp. 11259–11267, Mar. 2023, doi: 10.1021/acsami.2c20568.
- [44] A. Deb and S. Nath Choudhury, “Polymerization Mechanisms: A Comprehensive Review of Step-Growth and Chain-Growth Pathways”, doi: 10.51584/IJRIAS.
- [45] Y. Yagci, S. Jockusch, and N. J. Turro, “Photoinitiated polymerization: Advances, challenges, and opportunities,” Aug. 10, 2010. doi: 10.1021/ma1007545.
- [46] W. Tomal and J. Ortyl, “Water-soluble photoinitiators in biomedical applications,” May 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/POLYM12051073.
- [47] S. Jradi *et al.*, “Spatially controlled synthesis of silver nanoparticles and nanowires by photosensitized reduction,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 9, Mar. 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/9/095605.
- [48] V. S. Luc *et al.*, “Red-Light-Induced PET-RAFT Polymerization to Afford (Meth)acrylamide-Based Poly(N-oxide) and Other Hydrophilic Polymers Featuring Neutral, Cationic, and Zwitterionic Groups as Solubilizing Side Chains,” *Macromolecules*, vol. 59, no. 4, pp. 2412–2425, Feb. 2026, doi: 10.1021/acs.macromol.5c03186.
- [49] K. Samanta and J. Joseph, “An overview of structured illumination microscopy: Recent advances and perspectives,” Dec. 01, 2021, *IOP Publishing Ltd*. doi: 10.1088/2040-8986/ac3675.
- [50] F. K. Protick *et al.*, “Additive Manufacturing of Viscoelastic Polyacrylamide Substrates for Mechanosensing Studies,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 28, pp. 24384–24395, Jul. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c01817.