

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS FIZINIŲ
IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Vytautas
CÉPLA

Hidrogeliai bioformavimui: sintezė, cheminiai ir fizikiniai tyrimai

DAKTARO DISERTACIJA

Fiziniai mokslai
Fizika 02P

VILNIUS 2018

Disertacija rengta 2010–2018 metais Fizinių ir technologijos mokslų centro Fizikos institute, Nanoinžinerijos skyriuje.

Disertacija ginama eksternu.

Moksliniai konsultantai:

dr. Ramūnas Valiokas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

prof. dr. May Griffith (Monrealio universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Valdas Šablinskas** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02 P).

Nariai:

dr. Svajus Asadauskas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03P);

prof. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02 P);

prof. habil. dr. Juozas Vidas Gražulevičius (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P);

dr. Šarūnas Petronis (Švedijos mokslinių tyrimų institutas, Geteburgas, Švedija, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. spalio 29 d. 10.00 val. Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Fizinių ir technologijos mokslų centro Fizikos instituto posėdžių salėje. Adresas: Savanorių 231, LT-02300 Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 266 1640; el. paštas info@ftmc.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Fizinių ir technologijos mokslų centro, Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY
STATE RESEARCH INSTITUTE CENTER
FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

Vytautas
CÉPLA

Hydrogels for Biofabrication: Synthesis, Chemical and Physical Characterization

DOCTORAL DISSERTATION

Physical Sciences
Physics 02P

VILNIUS 2018

This dissertation was written between 2010 and 2018 at the State Research Institute Center for Physical Sciences and Technology.

The dissertation is being defended on an external basis.

Academic consultants:

Dr. **Ramūnas Valiokas** (State Research Institute Center for Physical Sciences and Technology, Physical Sciences, Physics – 02P).

Prof. Dr. **May Griffith** (The University of Montréal, Biomedical Sciences, Medicine – 06B).

Chairman:

Prof. Dr. Valdas Šablinskas (Vilnius University, Physical Sciences, Physics – 02P).

Members:

Dr. **Svajus Asadauskas** (State Research Institute Center for Physical Sciences and Technology, Physical Sciences, Chemistry - 03P);

Prof. Dr. **Saulius Bagdonas** (Vilnius University, Physical Sciences, Physics – 02P);

Prof. Habil. Dr. **Juozas Vidas Gražulevičius** (Kaunas Technological University, Physical Sciences, Chemistry – 03P);

Dr. **Šarūnas Petronis** (Research Institutes of Sweden, Gothenburg, Sweden, Physical Sciences, Physics – 02P).

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10:00 on October 29, 2018 in the Conference Room of the State Research Institute Center for Physical Sciences and Technology at the Institute of Physics.

Address: 231 Savanorių Ave., LT-02300 Vilnius, Lithuania.

Phone No.: +370 5 266 1640; email: info@ftmc.lt.

The text of this dissertation can be accessed through the libraries of the State Research Institute Center for Physical Sciences and Technology, Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

Sutrumpinimų sąvadas	9
ĮVADAS	10
Aktualumas.....	11
Darbo tikslai ir uždaviniai	13
Darbo naujumas ir jo reikšmė	13
Ginamieji disertacijos teiginiai.....	14
Autoriaus indėlis	15
Kitų bendraautorių indėlis	15
Autoriaus publikacijos.....	16
Autoriaus mokslinių pranešimų sąrašas	16
Moksliniai pranešimai, pristatyti ne autoriaus:	17
Autoriaus stažuotės užsienio mokslo ir studijų institucijose:	18
1. LITERATŪROS APŽVALGA	19
1.1. Modeliniai paviršiai ir karkasai audiniams konstruoti.....	19
1.1.1. Savitvarkiai monosluoksniai.....	19
1.1.2. Oligo (etilenglikolio) savitvarkiai monosluoksniai	22
1.1.3. Ultraplonos polietilenglikolio dangos	22
1.1.4. Hidrogeliai. Fizinės ir cheminės hidrogelių savybės.....	24
1.2. Tarpląstelinis užpildas ir jo imitavimas.....	25
1.2.1. Kolagenas	26
1.2.2. Fibronektinas	28
1.2.3. Sudėtingesni karkasai ląstelėms auginti	29
1.2.4. Biosintetiniai akies ragenos implantai	31
1.3. Hidrogelių formavimas.....	35
1.3.1. Funkcinių struktūrų formavimas hidrogelio paviršiuje	35
1.3.2. Hidrogelių paviršiaus 3D topografijų formavimas	39

1.4. Minkštų medžiagų tyrimo metodai.....	43
1.4.1. Atominių jėgų mikroskopija.....	43
1.4.2. Adatinis profilometras	47
1.4.3. Drėkinimo kampo matavimas.....	47
1.4.4. Elipsometrija.....	49
1.4.5. Ramano spektrometrija.....	50
2. DARBO METODIKOS	52
2.1. Medžiagos ir reagentai	52
2.2. Paviršių paruošimas ir cheminis modifikavimas	53
2.3. Topografiniai šablonai, jų paruošimas	54
2.4. PDMS topografinės formos paruošimas.....	55
2.5. Poli(etilenglikol)metakrilato polimerizacija ant stiklinių substratų ..	55
2.6. Baltyminių hidrogelių formavimas	56
2.7. Baltyminių hidrogelių, naudojamų ragenos implantams, tyrimas	57
2.8. Fibronektino mikrostruktūrų formavimas ant HPMAA hidrogelio paviršiaus.....	58
2.9. Baltyminių mikrostruktūrų formavimas ant implanto paviršiaus.....	59
2.10. Baltyminių hidrogelių 3D struktūrų formavimas	60
2.11. Suformuotų struktūrų tyrimas mikroskopu	61
2.12. Hidrogelio storio matavimai.....	62
2.13. Paviršių nanoskopinės topografijos ir jėgos spektroskopijos tyrimai	63
2.14. Hidrogelio brinkimo laipsnio matavimai.....	64
2.15. Elipsometrinis hidrogelio storio ir biolustų topografijos tyrimas....	65
2.16. Biolusto stabilumo tyrimas elipsometru.....	65
2.17. Paviršiaus drėkinimo kampo matavimai	66
2.18. Ramano spektrometrijos matavimai	66
2.19. Baltyminių hidrogelių elastomechaninių savybių matavimas AJM.....	68
2.20. Ląstelių kultivavimas	68

2.20.1. Ląstelių auginimas ant HPMAA paviršių su FN struktūromis.....	69
2.20.2. Ląstelių kultūros ant baltyminių hidrogelių.....	69
2.20.3. Ląstelių auginimas ant 3D baltyminių hidrogelių	70
3. SINTETINIŲ PEG HIDROGELIŲ DANGŲ TYRIMAI IR PRITAIKYMAS BIOLUSTŲ TECHNOLOGIJOMS	73
3.1. Hidrogelio polimerizavimas ant stiklo paviršiaus	73
3.2. Nanometrinių storių PEG hidrogelio dangų savybės	80
3.3. Fibronektino mikrostruktūrų formavimas ant HPMAA hidrogelio... ..	85
3.4. Fibronektino-HPMAA mikrostruktūrų sąveikos baltyminėse terpėse.....	88
3.5. Suformuoto biolusto sąveika su ląstelėmis.....	91
3.6. Išvados.....	95
4. BALTYMINIŲ HIDROGELIŲ IR JŲ PAVIRŠIAUS MODIFIKACIJŲ TYRIMAI	96
4.1. Baltyminių hidrogelių sintezė, sandara ir fizikinės savybės.....	96
4.2. Mikrolustinių struktūrų formavimas ant baltyminio hidrogelio paviršiaus.....	100
4.3. Baltyminių hidrogelių paviršiaus tyrimai AJM.....	101
4.4. FN mikroformuotų baltyminių hidrogelių įtaka ląstelių elgsenai ...	102
4.5. Išvados.....	105
5. CHEMIŠKAI SUSIŪTO KOLAGENO HIDROGELIŲ SAVYBĖS IR JŲ PRITAIKYMAS MIKROTOPOGRAFIJOMS FORMUOTI.....	106
5.1. Natyvaus kolageno hidrogelių sudėties ir elastomechaninių savybių registravimas	106
5.2. Kolageno hidrogelio topografijų mikroformavimas.....	109
5.3. Ląstelių sąveika su kolageno hidrogelio mikrotopografijomis.....	112
5.4. Ląstelių elgsenos kolageninio hidrogelio mikrokanaluose tyrimas	114
5.5. Ląstelių sąveika su submikroskopinėmis kolageno hidrogelių topografijomis	116
5.6. Išvados.....	117

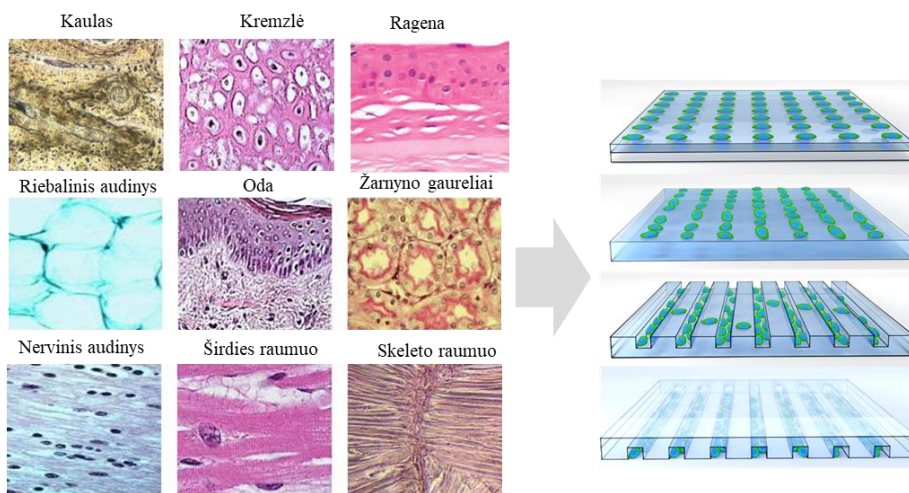
6. IŠVADOS.....	118
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	119
8. SANTRAUKA	139
Introduction	140
Chapter 1. Literature Survey	145
Chapter 2. Materials and Experimental Techniques.....	145
Chapter 3. The Characterization and Application of Synthetic Peg Hydrogels on Glass	149
Chapter 4. The Surface Modifications of Biosynthetic Hydrogels	160
Chapter 5. Biosynthetic Hydrogels as 3D Scaffolds	164
Conclusions	172
CURRICULUM VITAE	173
PADĖKA.....	174
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS.....	175

Sutrumpinimų sąvadas

AJM	atominės jėgos mikroskopija (angl. <i>Atomic Force Microscopy</i>)
APTMS	3-aminopropiltrimetoksisilanas (angl. <i>3-aminopropyltrimethoxysilane</i>)
BSA	jaučio serumo albuminas (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
HEMA	2-hidroksietil metakrilatas
PEGMA	poli(etilenglikol) metakrilatas ($M_n = 500$)
PEGDA	poli(etilenglikol) diakrilatas ($M_n = 500$)
MAA	metakrilinė rūgštis
RHCIII	rekombinantinis žmogaus III tipo kolagenas
RHCIII-MPC	rekombinantinio žmogaus III tipo kolageno ir 2-metakriloilksietil fosforilcholino hidrogelis
FAK	žiedinės adhezijos kinazė (angl. <i>Focal adhesion kinase</i>)
HP	HEMA ir PEGMA kopolimeras
HPMAA	HEMA, PEGMA ir MAA kopolimeras
HDF-GFP	žmogaus odos fibroblastai (angl. <i>human dermal fibroblast</i>), gaminantys žaliai fluorescuojantį baltymą (angl. GFP).
HF-GFP	žmogaus fibroblastai (angl. <i>human fibroblast</i>), gaminantys žaliai fluorescuojantį baltymą
HCEC	žmogaus ragenos epitelio ląstelės (angl. <i>human cornea epithelium cells</i>)
ECM	tarpląstelinis užpildas (angl. <i>extracellular matrix</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimido hidrochloridas
FN	fibronektinas
GA	gliutaraldehidas
NHS	N-hidroksisukcinimidas
OEG	oligo (etilenglikolis)
PC	kiaulės kolagenas, I tipo (angl. <i>Porcine collagen</i>)
PB	fosfatinis buferis (angl. <i>phosphate buffer</i>)
PBS	fosfatinis NaCl buferis (angl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PDMS	poli(dimetilsiloksanas)
SC-1	standartinio valymo procedūra, kurios metu pašalinamos organinės dalelės 1 (angl. <i>standard clean 1</i>)
SEM	skenuojanti elektronų mikroskopija (angl. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SM	savitvarkiai monosluoksniai
TCP	plastikinės ląstelių auginimo lėkštutės (angl. <i>tissue culture plate</i>)
UV	ultravioletinė spinduliuotė

ĮVADAS

Viena iš esminių sąlygų sėkmingiems biologiniams bei medicininiam tyrimams ir taikymams yra biologiškai suderinamos (biosuderinamos) medžiagos, kurios turi būti netoksiškos, atlikti numatytą funkciją bei nesukelti žalingų pokyčių audiniuose. Tik tokios medžiagos gali būti naudojamos inžinieriškai kuo tiksliau atkuriant natūralių audinių savybes. Kuriant naujausios kartos regeneracinės medicinos įrankius ir metodus taip pat reikia, kad šios medžiagos veiktų ne tik kaip fizinis karkasas ląstelėms auginti ir audiniams susidaryti, bet ir interaktyviai skatintų ar koreguotų gyvybinius procesus bei pažeistų organų regeneraciją. Molekuliniu lygmeniu ląstelės pirmiausia sąlytį su medžiaga patiria per fizikines ir molekulinio atpažinimo sąveikas, atsirandančias tarp ląstelės ir medžiagos paviršiaus. Todėl, kuriant biofizikinius ir biologinius modelius, šių mechanizmų tyrimams yra svarbu turėti tinkamus modelinius paviršius, kurie tiksliai ir interaktyviai, per valdomas sąveikas bei funkcines struktūras ir topografijas veiktų ląstelių biocheminius ir mechanobiologinius procesus, sandarą, augimą, migraciją, diferenciaciją bei formuotų ląstelių struktūras, artimas audiniams ir organams.



1 pav. Schema, vaizduojanti koncepciją, kaip būtų galima pakeisti audinius įvairiomis techninėmis in vitro tyrimo sistemomis

Tokioms *in vitro* sistemoms skirti paviršiai taip pat turi būti biologiškai suderinami, stabilūs esant kompleksinei (ląstelių, baltymų, metabolitų ir kt.) terpei, netoksiški ilgalaikiuose ląstelių kultūrų bandymuose.

Šiame darbe buvo sukurtos ir ištirtos organinės paviršiaus dangos ir medžiagos, kurios pasižymi valdoma sudėtimi, cheminėmis ir fizikinėmis

savybėmis bei biologiniu suderinamumu. Pirmą kartą pavyko susintetinti ir fizikiniais metodais ištirti PEG hidrogelio dangas ant pramoninio stiklo paviršiaus nenaudojant cheminių ir fotocheminių iniciatorių. Pademonstruotos galimybės jas modifikuoti ląstelių adheziją skatinančio baltymo mikrostruktūromis, kuriomis galima kontroliuoti ląstelių mechanobiologinius atsakus. Baltyminių mikrostruktūrų formavimas buvo svarbi technologinė šio darbo dalis: taip pat pirmą kartą pavyko sukurti lustinio tipo ląstelių adhezinio baltymo mikrostruktūras ant akies ragenos implantams naudojamo biosintetinio hidrogelio paviršiaus, nors pastaroji medžiaga sudaryta iš 85 % vandens. Kita disertacijos dalis buvo biologiškai suderinamų dangų ir medžiagų, ypač jų paviršiaus nanometrinių lygmens sandaros, fizikiniai tyrimai. Galiausiai, derinant cheminės sintezės metodus ir mikroformavimo technologijas, buvo suformuotos baltymų hidrogelio mikrokarkasinės struktūros, skirtos trimačių ląstelių ir audinio architektūroms kurti. Eksperimentinis darbas apėmė visą biomedžiagoms kurti reikalingų tyrimų spektrą – nuo cheminės sintezės, fizikinių tyrimų iki technologinių metodikų sukūrimo ir išbandymo biomedicininėse ląstelių kultūrų sistemose. Sukurtos dangos, biolustų struktūros ir trimačiai karkasai yra perspektyvios biologijos, vaistų tyrimų ir regeneracinės medicinos srityse.

Aktualumas

Stiklo modifikavimas ultraplonais organiniais sluoksniais, kurie suteikia jo paviršiui tiksliai apibrėžtą cheminę sudėtį ir kontroliuojamas fizikines savybes, yra technologinis procesas, svarbus daugelyje gyvybės mokslo tyrimų ir medicininuose taikymuose. Nepaisant plataus borosilikatinio stiklo naudojimo mikroskopijoje, vaistų atrankumo ir ląstelių tyrimuose, fizikinių savybių atsikartojamumas ir cheminių savybių kitimas vis dar išlieka techninis iššūkis [1][2]. Tikslios sudėties ir valdomų savybių biosuderinamų sluoksnių sintezė ir gamyba yra dar aktualesnė dėl jų taikymo naujose lustinio formato sistemose su interaktyviomis mikro- ir nanostruktūromis. Tokiuose taikymuose, paviršiaus sandaros ir topografijų tikslumas turi būti suprastas ir apibrėžtas nanometrų ir molekulinio lygmeniu. Todėl šiame darbe buvo atlikta PEG hidrogelių dangos ant stiklo sintezė ir fizikiniai tyrimai teikia galimybę sukurti naujus technologinius sprendimus.

Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, pasaulyje 253 milijonai žmonių turi regėjimo sutrikimų: 217 milijonų turi vidutinį ar sunkų regėjimo sutrikimą, 36 milijonai žmonių yra akli [3]. Ligos, susijusios su akies ragenos pažeidimais, yra viena iš didžiausių aklumo priežasčių pasaulyje [4]. Visame pasaulyje, o ypač besivystančiose šalyse, yra didžiulis ragenų donorų trūkumas [5]. Tačiau net ir esant ragenos donorui, po operacijos visada išlieka imuniteto atmetimo rizika, be to, dabartinės chirurginės

metodikos yra sudėtingos. Ragenų donorystę riboja ir tai, kad galima pernešti sveikatai pavojingus virusus (ŽIV, Herpes, hepatito virusus) bei dar nežinomus patogenus [6]. Šiuolaikinėje medicinoje išbandoma gana daug ragenos regeneracijos metodų: nuo kamieninių ląstelių [7] iki sintetinių medžiagų panaudojimo. Naujos kartos biomedžiagų, kurios pamažu pradeda keisti įprastai naudojamus plastikus, sukūrimas išplečia ragenos atkūrimo ir terapijų galimybes. Tokių biomedžiagų – biosintetinių baltyminių hidrogelių tyrimai ir jų paviršiaus inžinerija taip pat buvo šio darbo dalis. Baltyminiai hidrogeliai yra sudaryti iš tarpląstelinio užpildo baltymų, dažniausiai kolageno, ir vandens. Jie yra optiškai skaidrūs ir pasižymi implantui tinkamomis mechaninėmis savybėmis ir gali pakeisti natūralią rageną [8][9][10]. Nors baltyminio hidrogelio implantai yra tinkami pakeisti pažeistą rageną, bet išlieka užkrėtimo, organizmo atmetimo rizika, ilgas gijimo ir implanto integracijos procesas. Todėl darbe buvo ištirtas tokių hidrogelinių implantų paviršiaus modifikavimas ECM imituojančiomis funkcinėmis mikrostruktūromis, tikintis sumažinti minėtą riziką bei paspartinti greitesnį gijimą ir implanto integraciją. Tai leistų pacientams greičiau grąžinti regėjimą ir pagerinti gyvenimo kokybę.

Kuriant sudėtingesnes regeneracinės medicinos bei biofizikinių ir kitų *in vitro* tyrimų sistemas, reikalingi trimačiai mikro- ir nanokomponentai. Šiuolaikiniai 3D audinių ir organų modeliai yra techniškai sudėtingi integruoti mikroįrenginiai (analogija su elektronikos integrinėmis grandinėmis ir mikroprocesoriais). Jie leidžia pasiekti tiriamų vyksmų masyvumą, integruoti skysčių mechaniką ir medžiagos pernašos dinamiką, valdyti ląstelių adheziją, migraciją, fenotipus, topografinį išdėstymą. Ši daugiadisciplininė inžinerijos kryptis itin perspektyvi, nes galima atskirus audinių blokus sujungti į vieną konstrukta, kuris geriau atkartoja natūralių audinių ir organų fiziologiją [11][12][13]. Vėlgi tokie įrenginiai gali būti naudojami ateities regeneracinėje ir personalizuotoje medicinoje, didelio našumo vaistų ir kitų cheminių junginių tyrimuose. Esminė sąlyga, kad medžiaga, iš kurios yra gaminami 3D audinio modelio karkasai (šablonai), būtų biologiškai suderinama, netoksiška, skatintų audinių regeneracijos procesus bei būtų pakankamai tvirta, kad išlaikytų suformuotą 3D formą. Šiuos kriterijus atitinka baltyminiai hidrogeliai [8][14][9]. Jau parodyta, kad kolageno, kolageno-MPC sudėties baltyminiai hidrogeliai yra optiškai skaidrūs ir pakankamai mechaniškai tvirti, kad tiktų implantų gamybai. Tačiau galimybė formuoti mikro-, submikroskopinių matmenų topografijas šio tipo medžiagose bei tokių topografijų galima įtaka ląstelėms, mūsų žiniomis, nebuvo tirta. Iki šiol literatūroje skelbiami darbai, kuriuose tiriama kietakūnių medžiagų, pvz., silicio, titano, bei sintetinių elastomerų ir plastikų mikro/nanostruktūrų įtaka ląstelių ir audinių augimui bei savybėms. Todėl biosintetinės elastomerinio pobūdžio medžiagos mikrostruktūrų sukūrimas ir ištyrimas yra aktualus biomedžiagų ir audinių inžinerijos pažangai.

Darbo tikslai ir uždaviniai

Darbo tikslai: rasti efektyvų būdą susintetinti chemiškai ir fiziškai stabilią, bioinertišką, funkcionalizuojamą polimerinę dangą ant borosilikatinio stiklo paviršiaus, ištirti jos fizikochemines savybes, išbandyti tokias dangas kaip pagrindą biolustams kurti. Biolusto tipo baltymines mikrostruktūras suformuoti ant dideliu surišto vandens kiekiu pasižyminčių baltyminių hidrogelių, naudojamų akies ragenos implantų gamybai. Pademonstruoti mechaniškai integralių biosintetinių hidrogelių 3D mikrostruktūrų kaip 3D audinių modelių karkasų perspektyvumą.

Darbo tikslams pasiekti išsikelti uždaviniai:

1. Parinkti cheminę strategiją šviesa valdomai, beiniciatorinei bioinertinės, funkcionalizuojamos dangos sintezei ant borosilikatinio stiklo.
2. Ištirti suformuotą bioinertinę dangą ant stiklo paviršiaus fizikiniais metodais.
3. Suformuoti ir ištirti lusto tipo baltymines mikrostruktūras ant bioinertinės dangos.
4. Suformuoti ir ištirti baltymines mikrostruktūras ant biosintetinių baltyminių hidrogelių, naudojamų akies ragenos implantų gamybai.
5. Suformuoti baltyminio hidrogelio topografinės struktūras ir įvertinti technologinių galimybių ribas.
6. Išbandyti suformuotų struktūrų, baltyminių ir topografinių, sąveikas su imortalizuotomis žmogaus ląstelėmis.

Darbo naujumas ir jo reikšmė

Pirmą kartą susintetinta funkcinė polimerinė danga ant stiklo paviršiaus nenaudojant polimerizacijos reakcijos iniciatorių. Literatūroje anksčiau buvo parodyta, kad tokio tipo polimerinės dangos sintezė efektyviai vyksta tik ant silicio, aukso ir plastiko paviršių. Atominių jėgų mikroskopijos ir spektroskopijos metodais nustatyta susintetintos dangos elgsena (sąveikos ir elastomechaninės savybės) dešimčių nanometrų eilės ribiniuose sluoksniuose vandenyje. Ant stiklo paviršiaus susintetintos dangos buvo sėkmingai suformuotos fibronektino mikrostruktūros, kurios išbandytos su ląstelėmis. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad susintetinta polimerinė danga maskuoja stiklo funkcinius netolygumus, leidžia standartizuoti stiklo paviršius, o pati danga yra bioinertiška ir yra tinkama biolustams kurti.

Pirmą kartą pademonstruota, kad mikrokontaktinis antspaudavimas yra tinkamas metodas fibronektino mikrostruktūroms ant akies ragenos implanto paviršiaus, kurio pagrindą sudaro kolageno baltymas ir ne mažiau kaip 85 % vandens, formuoti. Atominių jėgų ir fluorescencinės mikroskopijos metodais

ištirta šių mikrostruktūrų morfologija. Ši technologija leidžia papildomai funkcionalizuoti ragenos implanto paviršių jau po implanto pagaminimo bei kontroliuoti ląstelių elgseną ir augimą ant implanto paviršiaus. Tai pat pirmą kartą buvo pagamintos mikrometrinės ir submikrometrinės topografijos iš chemiškai susiūto baltyminio hidrogelio, analogiško implantams naudojamoms medžiagos. Šios žinios ir tyrimo rezultatai gali būti pritaikomi bioanalitinėse technologijose, taip pat regeneracinėje medicinoje – geresniems ir efektyvesniems implantams bei sudėtinėms organotipinėms sistemoms, kurios gali būti naudojamos vaistų tyrimams, kurti.

Mokslinis naujumas ir praktinė nauda

1. Nustatytos sąlygos, kurioms esant galima susintetinti bioinertiškas, funkcionalizuotas dangas ant stiklo paviršiaus, nenaudojant cheminių, dažniausiai toksiškų, iniciatorių.
2. Parodyta, kad lustinio tipo baltymines mikrostruktūras galima formuoti ant biosintetinio baltyminio hidrogelio paviršiaus, nors ši medžiaga savo sudėtyje turi apie 85 % vandens.
3. Nustatytos PEG hidrogelių ant stiklo elastomechaninės savybės ir nanoskopinė biomolekulinių mikrostruktūrų sandara.
4. Baltyminių hidrogelių mikro/nano 3D topografijos formavimas atveria naujų galimybių sukurti naujos kartos audinių inžinerijos sistemas ir „audinys ant lusto“ tipo įrenginius.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Stiklo paviršiaus modifikavimo APTMS, GA ir HPMMA monomerų derinys leidžia pasiekti našiausią šviesa valdomą PEG hidrogelio dangos *in situ* sintezę.
2. Dešimčių nanometrų storio PEG MA danga ant stiklo pasižymi hidrogeliui būdingomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis bei cheminiu aktyvumu.
3. Suformuotos fibronektino mikrostruktūros ant PEG hidrogelio taip pat yra hidrogelinio būvio, tačiau pasižymi valdoma morfologija ir stabilumu, yra tinkamos pavienėms ląstelėms ir jų grupėms mikroformuoti.
4. Nepaisant didelio surišto vandens kiekio ir sąlyginai nedidelio susiuvimo laipsnio, kolageno hidrogeliai turi fiziškai apibrėžtą paviršių, kuris yra tinkamas biolusto tipo struktūroms formuoti kontaktinės litografijos metodais.
5. Baltyminiai hidrogeliai sugeba įgyti ir išlaikyti reikiamą formą nanometrų tikslumu, t. y. biosintetinis elastomerų analogas.

Autoriaus indėlis

Vytautas Cėpla, konsultuodamasis su vadovu, atliko eksperimentų planavimą. Pats vykdė bioinertinės dangos sintezės darbus, suprojektavo ir pagamino stiklo paviršiaus cheminio modifikavimo dujinėje fazėje stendą. Atliko bioinertinės dangos storio matavimus adatiniu profilometru ir vaizdinančiu elipsometru. Projektavo ir fotolitografiškai pagamino mikrotopografijų gamybos šablonus. Atliko baltyminių mikrostruktūrų formavimą ant bioinertinės dangos ir akies implantų paviršių. Įdiegė mikroliejimo technologiją baltyminių hidrogelių paviršiaus topografijoms formuoti. Dalyvavo atliekant ląstelių kultūrų bandymus. Fluorescenciniais mikroskopais matavo ir analizavo suformuotus paviršius, topografijas, baltymines ir ląstelių mikrostruktūras. Paruošė Ramano spektroskopijos eksperimentus. Apdorojo ir analizavo eksperimentinius duomenis. Disertacijos tema publikavo vieną mokslinį straipsnį ir yra dvejų pasaulinių patentinių paraiškų bendraautoris.

Kitų bendra autorių indėlis

Tomas Rakickas atliko paviršių tyrimus AJM, aprašytus 3 ir 4 skyriuose.

Gintarė Garbenčiūtė padėjo paruošti PEG hidrogelių tyrimams reikalingus bandinius chemiškai modifikuoti stiklo paviršių bei atliko paviršiaus vandens drėkinimo kampo matavimus, pristatomus 3 skyriuje.

Aušra Baradokė atliko kinetinius matavimus vaizdinančiu elipsometru, duomenys pateikiami 3 skyriuje.

Airina Mazėtytė atliko ląstelių priežiūros darbus ir prisidėjo prie ląstelių eksperimentų, aprašytų 5 skyriuje. Dalis 5 skyriuje pristatomų rezultatų yra publikuota Airinos Mazėtytės magistro darbe [15].

Mirazul Islam M. atliko akies implantų gamybą ir tyrimus, kartu atliko ląstelių tyrimus, jų duomenys pateikiami 4 skyriuje.

Dr. Artūras Ulčinas parengė metodiką ir atliko AJM matavimus ir mechaninių savybių tyrimus naudojant AJM, duomenys pateikiami 5 skyriuje.

Romuald Eimont atliko baltyminių hidrogelių su topografinėmis struktūromis gamybą, vertino topografinių struktūrų dydį optiniu mikroskopu, prisidėjo prie ląstelių eksperimentų, duomenys pateikiami 5 skyriuje. Dalis 5 skyriuje pristatomų rezultatų yra publikuota Romuald Eimont magistro darbe [16].

Dr. Ilja Ignatjev atliko matavimus Ramano spektrometru, aprašytus 5 skyriuje.

Autoriaus publikacijos

Disertacijos tema:

1. Mirazul Islam, M.; Cèpla, V.; He, C.; Edin, J.; Rakickas, T.; Kobuch, K.; Ruželė, Ž.; Jackson, W. B.; Rafat, M.; Lohmann, C. P.; et al. Functional Fabrication of Recombinant Human Collagen-Phosphorylcholine Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *Acta Biomater.* **2015**, *12*, 70–80.

Patentai:

1. J. Phophase, M. Griffith, M. M. Islam, R. Valiokas, R. Ravichandran, V. Cèpla, Ž. Ruželė, T. Rakickas, Regenerative prostheses as alternatives to donor corneas for transplantation, patent application, patent granted EPO 14784228.0-1455, **2018**.
2. M. Griffith, J. Phophase, R. Ravichandran, Ž. Ruželė, V. Cèpla, R. Valiokas, M. M. Islam, T. Rakickas, Surface modifications of collagen hydrogels, patent application, Publication number WO2015/055661; balandžio 23 d., **2015**.

Kitos publikacijos:

1. V. Jakubkiene, V. Cepla, M. M. Burbuliene, and P. Vainilavicius, *Synthesis and Functionalization of 8-Methyl-2h-pyrimido[2,1-c][1,2,4]triazine-3,6(1h,4h)-dione*, Journal of Heterocyclic Chemistry, Vol. 49, p. 737–741, **2012**.
2. H. Erfle, R. Valiokas, V. Cèpla, V. Starkuvienė, Bioactive compound delivery assembly, patent application, publication number: WO / 2017/140429, rugpjūčio 24 d., **2017**.

Autoriaus mokslinių pranešimų sąrašas

1. Vytautas Cèpla, Živilė Ruželė, Jaywant Phopase, Naresh Poliseti, May Koh, Ramūnas Valiokas, May Griffith. “Micro- and nanopatterning of collagen-based biomaterials for corneal implant applications“. EuroNanoMed, lapkričio 15 d., 2011. Bernas, Šveicarija.
2. Vytautas Cèpla, Živilė Ruželė, Naresh Poliseti, May Koh, Ramūnas Valiokas ir May Griffith. Akies ragenos implantų tobulimas mikro- ir nanoformavimo metodais. FizTech 2011, lapkričio 24–25 d., Vilnius.

3. Vytautas Cėpla, Živilė Ruželė, Ramūnas Valiokas. „CLICK“ reakcijų panaudojimas biofunkcionalių lustų gamyboje. FizTech 2012, rugsėjo 25–26 d., Vilnius.
4. Vytautas Cėpla, dr. Gvidas Astromskas, dr. Ramūnas Valiokas, dr. Gediminas Račiukaitis. Technet_Nano workshop „Cutting edge technologies: microfluidics, lab-on-a-chip-technologies and robotic high-throughput screening“ 2013 03 20 Flensburgas, Vokietija.
5. Vytautas Cėpla, M. Mirazul Islam, Chaoliang He, Joel Edin, Živilė Ruželė, Tomas Rakickas, Ramūnas Valiokas and May Griffith. Functional Fabrication of Corneal Tissue-on-a-Chip Devices. NanoBioEurope 2014, Miunsteris, Vokietija.

Moksliniai pranešimai, pristatyti ne autoriaus:

1. Vytautas Cėpla, Živilė Ruželė, Jaywant Phopase, Naresh Poliseti, Ramūnas Valiokas, May Griffith. „Micro- and nanopatterned collagen surface for corneal implant applications“. 7th NanoBioEurope, birželio 21–23 d. 2011, Korkas, Airija.
2. Živilė Ruželė, Vytautas Cėpla, Ringailė Lapinskaitė, Jurgis Sūdžius, Linas Labanauskas, Ramūnas Valiokas. „Synthesis of bifunctional „click“ compounds and their application for fabrication and replication of micro/nanostructured molecular assemblies“. 14th Tetrahedron Symposium. 2013 06 25–28 Viena, Austrija.
3. Daiva Baltrikienė, Egidijus Šimoliūnas, Vytautas Cėpla, Jaroslav Burinskij, Ramūnas Valiokas, Evaldas Liutkevičius, Virginija Bukelskienė. The impact of oxidative stress on endothelial progenitor cell functions. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Meeting -2014, Genuja, Italija.
4. Mazėtytė, V. Cėpla, G. Lukinavičius, I. Masilionis, G. Garbenčiūtė, T. Rakickas, M. Gavutis, K. Johnsson, R. Valiokas. Cell Shaping Structural-Functional Profiling on Hydrogel-Supported Micropatterns of Extracellular Matrix Proteins. Lietuvos biochemikų draugijos konferencija 2016 m. Birštonas.
5. Mazėtytė, R. Eimont, A. Vailionytė, G. Garbenčiūtė, V. Cėpla, R. Aldonytė, R. Valiokas. Microfabricated collagenous hydrogels as scaffolds for 3D cell culture. Open Readings 2017. Vilnius.
6. Eimont R., Mazėtytė A., Vailionytė A., Garbenčiūtė G., Navikas V., Masilionis I., Cėpla V., Aldonytė R., Gavutis M., Valiokas R. Getting cells in order: microfabricated protein patterns and 3D hydrogel scaffolds for single-cell and artificial tissue technologies. An Integrative Action for Multidisciplinary Studies on Cellular Structural Networks, COST Action CA15214. 2017, Vokietija.

Autorialaus stažuotės užsienio mokslo
ir studijų institucijose:

1. Stažuotė Linköpingo universitete, Švedija, 2011 08 – 2011 11.
2. Stažuotė Heidelbergo universitete, Vokietija. LMT konkursinis trumpalaikių mokslininkų vizitų finansavimas, 2014 11 24 – 2014 12 04.
3. Stažuotė Heidelbergo universitete, Vokietija. LMT parama mokslinėms išvykoms, 2015 07 20 – 2015 07 30.

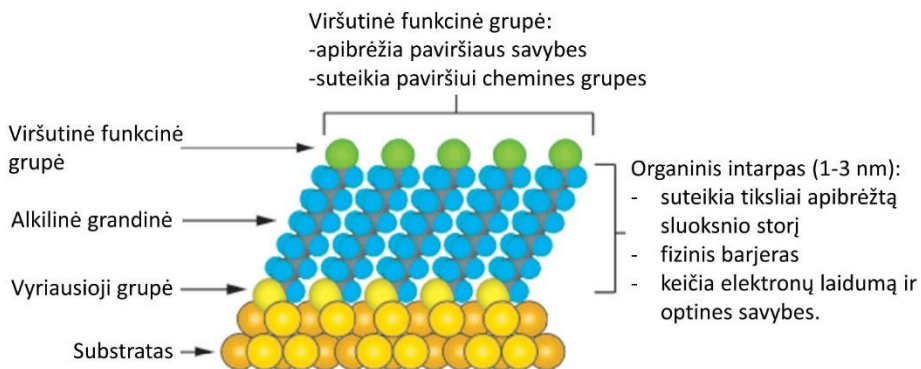
1. LITERATŪROS APŽVALGA

Šiuolaikinis biomedžiagų mokslas siekia sukurti medžiagas ir modelinius paviršius, kurių savybės būtų kuo artimesnės natūraliuose audiniuose esančioms savybėms. Šios naujos kartos biomedžiagos turi sugebėti atlikti savo funkcijas (struktūrines, regeneracines ir kitas) labai kompleksinėmis sąlygomis, t. y. vienu metu veikiant daugeliui kintamų veiksnių: fermentams, ląstelėms, ląstelių metabolitams, fiziologinei terpei, mechaniniam poveikiui ir kt. Šioje apžvalgoje aptarsiu pagrindinius naudojamus modelinius paviršius (2D sistemas), taip pat 3D karkasus, naudojamus audiniams konstruoti, ir struktūrinius audinių elementus, daugiau dėmesio skirdamas akies ragenai ir jos pakaitalams, su kurių tyrimais šis darbas buvo glaudžiai susijęs. Taip pat pristatysiu šiuo metu dažniausiai naudojamus paviršių mikro- ir nanostruktūrų bei ląstelių auginimo „minkštųjų“ karkasų formavimo metodus. Galiausiai apžvelgsiu fizikinius metodus, kurie tinkami šio tipo medžiagoms ir paviršiams tirti.

1.1. Modeliniai paviršiai ir karkasai audiniams konstruoti

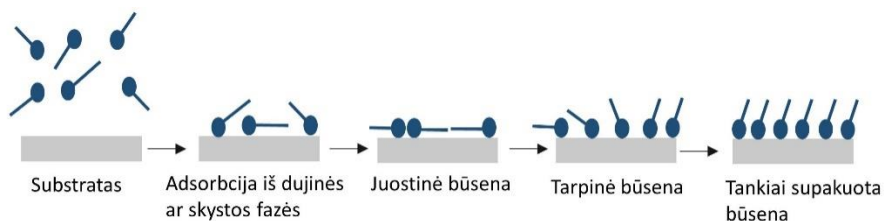
1.1.1. Savitvarkiai monosluoksniai

Savitvarkiai monosluoksniai (SM) yra tvarkingos, orientuotos molekulinės struktūros ant kietųjų paviršių, dažniausiai susidedančios iš amfifilinių molekulių, turinčių vyriausiąją grupę, alkilinę arba etilenglikolio grandinę ir galinę funkcinę grupę (2 pav.). Vyriausioji grupė pasižymi cheminiu atrankumu substrato paviršiui, taip užduodama apibrėžtą SM orientaciją. Būdingas tokios sistemos pavyzdys – sieros atomą turinčios vyriausios grupės (-SH, -SS-) ir (poli)kristalinio Au paviršiaus derinys. Tiolio junginiai taip pat formuoja tvarkingus SM ir su kitų metalų, tokių kaip antai Ag, Cu, Ni, Pd [17][18][19][20], paviršiais. Aukso paviršių populiarumą SM tyrimuose lemia jo cheminis inertiškumas, jis nesioksiduoja deguonies turinčioje atmosferoje, taip pat formuoja stiprų (~184kJ/mol) ryšį su tiolio funkcinę grupę [21] bei yra geras substratas naudojant paviršiaus spektroskopijos ir cheminės analizės metodus [22][23]. Alkiltiolato SM sudaro molekulės, kurių alkilinės grandinėleje yra 4–18 anglies atomų. Galima paminėti, kad SM molekulės su trumpesnėmis grandinėlėmis greičiau adsorbuojasi ant paviršių ir suformuoja tvarkingus sluoksnius [24]. SM sudarančios molekulės gale esanti funkcinė grupė nulemia taip modifikuoto paviršiaus fizikines ir chemines savybes ir sąveikauja su aplinka. Dažnai naudojamos grupės -CH₃, -COOH, -OH ir -(OEG)_n-OH, [22].



2 pav. Scheminė savitvarkio monosluoksnio sandara. Adaptuota iš [22]

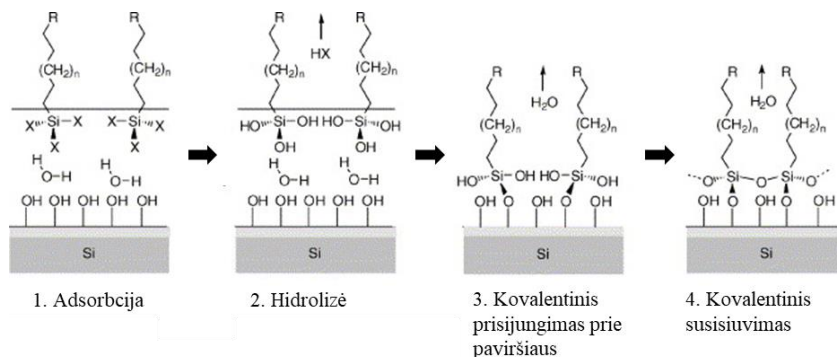
Pastarųjų dviejų dešimtmečių tyrimai rodo, kad SM formavimosi procesas susideda iš kelių stadijų. Pirmiausia paviršiui atrankią vyriausiąją grupę turinčios molekulės adsorbuojasi (fizisorbuojasi) ant substrato paviršiaus iš dujinės ar skystos fazės per Van der Waalso, vandenilinius ryšius. Paskui vyriausioji grupė pradeda sąveikauti su paviršiumi ir susidaro cheminis ryšys – vyksta chemisorbcija. Likusi molekulės dalis, kuri dažniausiai pasižymi hidrofobinėmis savybėmis, siekdama laisvosios energijos minimumo, stengiasi maksimizuoti tarpmolekulinės Van der Waalso sąveikas, todėl atsitraukia nuo substrato. Tokiu būdu prasideda monosluoksnio savitvarkos procesas, kol galiausiai monosluoksnis tampa daugmaž išilgai paviršiaus normalės orientuotu, pagal substrato gardelę išdėstytu, apibrėžtos konformacijos tvarkingu molekulių dariniu (3 pav.). Funkcinės SM grupės tampa orientuotomis į išorę ir stipriai keičia taip modifikuoto paviršiaus fizikines ir chemines savybes.



3 pav. Pagrindinės savitvarkio monosluoksnio formavimosi stadijos [25]

Adsorbcija ant substrato įvyksta sąlygiškai greitai, nuo keleto minučių iki valandos [21], nes taip sumažinama substrato paviršiaus laisvoji energija. Minėta, kad suformuotas vyriausios grupės ir substrato ryšys yra pakankamai stiprus, todėl SM yra stabilūs aukštoje temperatūroje. Pavyzdžiui, heksadecildisulfito sluoksnyje pažeidimų atsiranda tik esant 180–200 °C temperatūrai [18].

Norint gauti SM ant optiškai skaidrių paviršių, pvz., stiklo (SiO_x), SM formuoti yra naudojami silanai RSiX_3 , čia dažniausiai $X = -\text{H}; -\text{Cl}; -\text{OCH}_3; -\text{OCH}_2\text{CH}_3$. *In situ* susidaro polisiloksanas $(-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-)_n$, kuris su paviršiumi sujungtas per substrato silanolio grupes $(-\text{Si}-\text{OH})$ (4 pav.). Sluoksniai ant paviršių formuojami naudojant tirpiklius (vandenį, etanolį, tolueną ir kt.) arba iš garų fazės padengiant silanais stiklo arba kitą SiO_x paviršių. Tam, kad susiformuotų visavertis SM, reikalingas silano molekulių tarpusavio susisiuvimas. Silano molekulės yra linkusios migruoti ir formuoti sankaupas ant paviršiaus pradinėse SM formavimosi stadijose [26]. Be to, SM, susidarantis iš silanų su alkilinėmis grandinėmis C10-C18, neturi ilgosios grandinių tvarkos, skirtingai nuo SM ant Au paviršių [27]. Lyginant su aukso ir tiolių SM, paviršių dengimo procedūra alkilsilanais yra eksperimentiškai ir technologiškai sudėtingesnė, sunkiau pakartojama. Gaunami monosluoksniai nėra tokie tvarkingi, nes sunku kontroliuoti išsiskiriantį vandens kiekį sluoksnio formavimosi metu ir vandens kiekį, esantį aplinkoje, tirpalo pH ir temperatūrą [27][28].



4 pav. Silanų savitvarkio monosluoksnio formavimas ant hidrosido grupių turinčio silicio oksido paviršiaus. Adaptuota iš [29]

Nors gamybos protokolams ir pramoniniams procesams optimizuoti skiriama daug dėmesio, paviršių, ypač stiklo, silanizavimo procesas iš tirpalų ar garų fazės vis dėlto išlieka sudėtingas dėl sunkiai kontroliuojamo daugiasluoksnių formavimo, sluoksnių defektų, pvz., kiaurymių ar daugiasluoksnių sankaupų, kurie gadina dangos homogeniškumą ir paviršiaus funkcines savybes [30]. Taip pat tokie sluoksniai nėra stabilūs vandeninėse terpėse, yra publikuotų tyrimų, kurie parodė, kad silanų monosluoksniai nestabilūs vandenyje dėl vykstančios siloksano ryšio hidrolizės [31][32]. Nepaisant silanų SM formavimo sunkumų, funkciškai modifikuoti silanų SM substratai ypač patrauklūs biojutikliams [33] ir įvairioms biologinėms sistemoms tirti [34], nes suderinami su biologijoje ir medicinoje plačiai naudojamais fluorescenciniais mikroskopais. Biologiniuose taikymuose tokie silanizuoti paviršiai gali būti panaudoti

cheminiam poli(etileno glikolio) (PEG) sluoksniui formuoti, kuris suteikia paviršiui bioinertiškumo [35][36][37] biosuderinamumo[38][39][40], yra tinkami įvairiems ligandams prijungti [41].

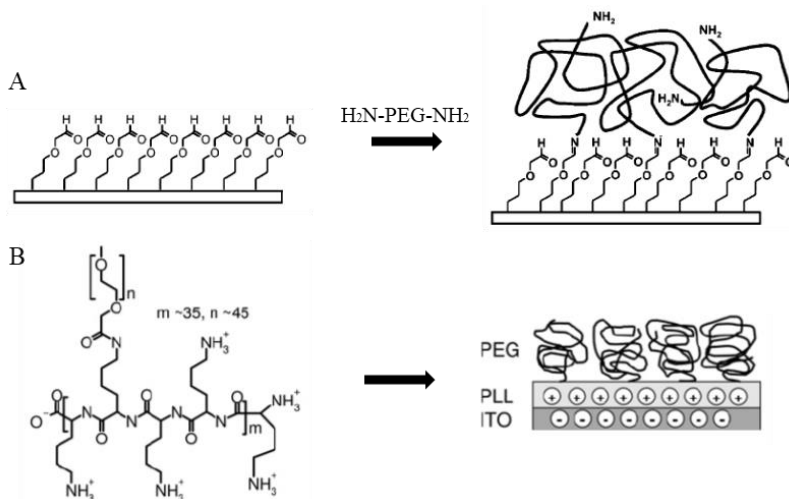
1.1.2. Oligo (etilenglikolio) savitvarkiai monosluoksniai

Polimerai, turintys PEG grupes, plačiai naudojami kuriant neatrankiai baltymų adsorbicijai, ląstelėms ir bakterijoms kibti atsparius paviršius [42][43]. SM su išorinėmis OEG funkcinėmis grupėmis taip pat pasižymi inertiškumu baltymų neatrankiam kibimui [44][45]. Dėl tvarkingo SM-OEG sluoksniu susiformavimo paviršiaus inertiškumo efektui gauti užtenka net ir trumpų $-(O-CH_2-CH_2)_m-$ grandinėlių ($m = 3-7$). Taip pat OEG grandinės yra tirpios vandenyje, todėl derinant SM ir SM-EOG galima sukurti paviršius atlikti atrankų biomolekulių imobilizavimą [46] arba panaudoti lipidinių membranų tyrimams [47].

1.1.3. Ultraplonos polietilenglikolio dangos

Kadangi tvarkių, apibrėžtos sudėties ir sandaros SM su dioknerviškėmis OEG grandinėlėmis paruošimas *in situ* ant stiklo paviršių yra sudėtingas, alternatyvi paviršių chemijos strategija yra kovalentinis PEG šepetinių polimerų prijungimas. Dažnai šie monosluoksniai yra formuojami jau ant silanizuotų stiklo paviršių, prie taip įvestų funkcinių grupių kovalentiškai prijungiant PEG polimerus (5A pav.) [37][48][49], bet galima silano junginius maišyti su funkciniais PEG polimerais ir jais tiesiogiai dengti stiklo paviršius [50]. Gana populiarus ir nekovalentinis būdas – elektrostatiškai prijungiant PEG molekules tiesiogiai ant paviršiaus, tam dažniausiai naudojamas poli-L-lizino (PLL) ir PEG polimeras (PLL-PEG) [51][52][53]. Polimero PLL dalis yra teigiamai įkrauta ir elektrostatiškai prilimpa prie neigiamai įkrautų paviršių, o PEG dalis yra orientuota į išorę (5B pav.).

Dar vienas stiklo paviršiaus funkcionalizavimo stabilia ir biosuderinama danga būdas yra *in-situ* monomerų, turinčių PEG grupių, polimerizacija ant paviršiaus. PEG kopolimerai polimerizuojami vykdant akrilato ar metakrilato monomerų, turinčių savo sudėtyje PEG intarpų, iniciatorių skatinamą laisvųjų radikalų skiepijimo polimerizaciją [54][55]. Taip sukuriamą tinklinę, susipynusių PEG grandinių struktūrą, kuri netgi yra atsparesnė nepageidaujamai baltymų adsorbicijai už PEG grandinių monosluoksnių dangą [56][38]. Tačiau ląstelės biologijoje ir ypač klini-

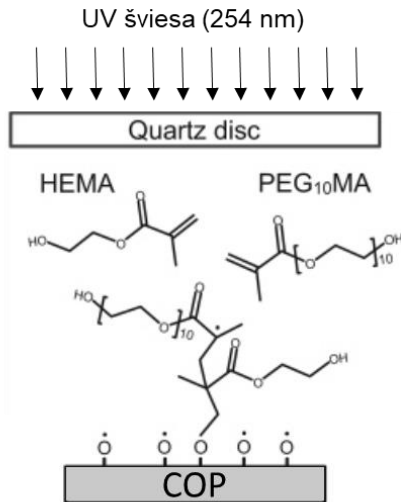


5 pav. Funkcinių PEG polimerų kovalentinis prijungimas prie savitvarkio monosluoksnio, adaptuota iš [48], bei elektrostatinis prijungimas prie neigiamai įkrauto indžio-alavo oksido (ITO) paviršiaus naudojant PLL-PEG polimerus (B), adaptuota iš [51]

kiniuose taikymuose naudoti toksinius junginius (reakcijos iniciatorius), tokius kaip antai amoniako persulfatą (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilenodiaminą (TEMED), fotoiniciatorių 2-hidroksi-1-[4-(hidroksietoksi)fenil]-2-metil-1-propanoną (Irgacure 2959) nepageidaujama. Net ir labai mažas kiekis tokių iniciatorių gali sukelti susintetintos dangos citotoksiškumą [57][58].

Atsižvelgiant į polimerizacijos iniciatorių toksiškumo problemą, tinkamas sprendimas yra savaime inicijuojamos fotoprisiuvimo ir fotopolimerizacijos procesas (angl. *Self-Initiated Photografting and Photo polymerization*) (SIPGP) [59]. Šiame procese metakrilato/akrilato monomerai su PEG grupėmis polimerizuojami be jokių pridėtinių iniciatorių. Polimerizacija inicijuojama tiesiogiai veikiant akrilato/metakrilato funkcinę grupę UV šviesa (6 pav.).

Literatūroje yra pavyzdžių, kaip SIPGP reakcija naudojama polimerinėms dangoms gauti ant silanizuoto silicio [60], plastiko [35][61][62][63], nerūdijančio plieno [64] ir aukso [65][61] paviršių. Dažnai suformuotų polimerinių plėvelių storis siekia iki 0,1 μm. Tačiau mums nepavyko rasti duomenų literatūroje apie poli(etilenglikolio) metakrilato pagrindo sudarytų polimerų formavimą ant stiklo paviršių, naudojant savaime inicijuojamos fotoprisiuvimo ir fotopolimerizacijos reakciją.



6 pav. PEG metakrilato (PEGMA) ir hidroksietilmetakrilato (HEMA) savaiame inicijuojamos fotoprisiuvimo ir fotopolimerizacijos proceso ant cikloolefino plastiko paviršiaus (COP) schema, adaptuota [35]

1.1.4. Hidrogeliai. Fizinės ir cheminės hidrogelių savybės

Viena iš pastaraisiais metais ypač tiriamų biomedžiagų yra hidrogeliai. Hidrogelis –vandenyje netirpių hidrofilinių polimerų tinklas, kuris geba sugerti ir surišti vandenį ar biologinius skysčius. Hidrogelyje polimero tinklo grandinės gali būti surištos dėl cheminių ir fizikinių sąveikų. Kovalentinės jungtys hidrogelyje palaiko mechaninį medžiagos stabilumą ir neleidžia jam iširti, o fizikinės sąveikos (vandeniliniai ryšiai, joninės jėgos, hidrofobinė sąveika ir kt.) leidžia hidrogeliui brinkti. Atsižvelgiant į monomerų sudėtį, hidrogelius galima suskirstyti šitaip [66]: homopolimeriniai hidrogeliai, kurie sudaryti iš vienodų monomerų; kopolimeriniai hidrogeliai, jie sudaryti iš skirtingų monomerų; sudėtiniai tarpusavyje susipinantys polimeriniai hidrogeliai, sudaryti iš skirtingų nepriklausomai susiūtų polimerinių tinklų.

Hidrogeliai priklausomai nuo pasirinktų monomerų ar polimerų yra natūralūs, sintetiniai arba hibridai. Taip pat hidrogeliai gali būti neutralūs arba joniniai, priklausomai nuo polimerinių grandinėlių šoninių grupių jonizacijos, bei būti pasyvūs arba aktyvūs, t. y. reaguoti į aplinkos fizikinius ar cheminius dirgiklius [67].

Trys svarbūs parametrai apibrėžia hidrogelių struktūrą: tai polimero tūrio dalis išbrinkusio būvio hidrogelyje ($v_{2,s}$), vidutinė molekulinė polimerinės grandinės masė tarp susiuvimo taškų (\overline{M}_c) ir tinklo (porų) dydis (ξ) [68]. Supratimas apie molekulinę hidrogelio struktūrą (\overline{M}_c , $v_{2,s}$ ir ξ) leidžia įvertinti ir valdyti jo elastomechanines ir difuzijos savybes. Šie parametrai

yra susiję ir gali būti apskaičiuojami teoriškai arba nustatomi naudojant eksperimentines metodikas. Hidrogelio struktūros tyrimams dažniausiai naudojamos pusiausvyrinio brinkimo ir gumos elastingumo teorijos [69]. Polimero tūrio dalis ($v_{2,s}$) yra polimero tūrio V_p ir išbrinkusio hidrogelio tūrio V_h santykis:

$$v_{2,s} = \frac{V_p}{V_h} \quad (1)$$

Šis dydis ($v_{2,s}$) leidžia įvertinti, kiek polimero arba kiek vandens yra hidrogelyje. Įprastai hidrogeliais laikomi polimerai, kurių polimerų tūrio dalis yra mažesnė už vandens tūrio dalį, t. y. $v_{2,s} < 1$ [66]. Neutralaus hidrogelio vidutinę polimerinės grandinės molekulinę masę tarp susiuvimo taškų \overline{M}_c , vykdant susiuvimą vandenyje, galima apskaičiuoti iš lygties:

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{\overline{M}_n} - \frac{\left(\frac{\bar{v}}{V_1}\right) [\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,r} \left(\left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{2}{\phi}\right) \frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)} \quad (2)$$

Čia \overline{M}_n – linijinės polimero grandinės molekulinė masė be susiuvimo, V_1 – molinis vandens tūris, \bar{v} – specifinis polimero tūris, $v_{2,r}$ – polimero tūrio dalis atpalaiduotos būsenos, po susiuvimo, bet prieš brinkimą/susitraukimą, ϕ – siuvimo reagento efektyvumas [68].

Labai svarbi hidrogelio savybė yra medžiagų laidumas, difuzija. Ją užtikrina porėta hidrogelio struktūra. Hidrogelio polimerų tinklo (porų) dydį (ξ) galima apskaičiuoti naudojant formulę:

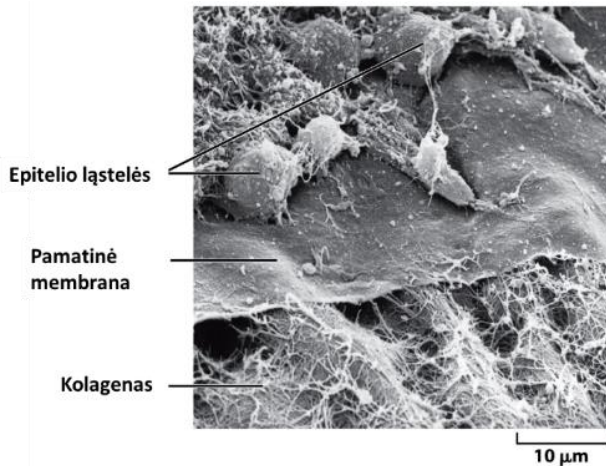
$$\xi = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} \left(\frac{2C_n \overline{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} l \quad (3)$$

Čia C_n yra Flory būdingas santykis, kuris leidžia įvertinti realios polimero grandinės dydžio nuokrypį tirpiklyje nuo laisvai susuktos grandinės dydžio [70], PEG polimerų šis santykis yra 4,1 [71]. O l yra ryšio ilgis polimero grandinėje (vinilo ir PEG polimerų šis dydis lygus 1,54 Å) [69][71], o M_r – molekulinė masė atsikartojančio fragmento polimerinėje grandinėje.

1.2. Tarpląstelinis užpildas ir jo imitavimas

Audiniai yra sudaryti iš struktūrinių ląstelių ir tarpląstelinio užpildo (angl. *extracellular matrix* (ECM)), kurį sudaro fibriliniai baltymai, proteinglikanai ir kitos polimerinės medžiagos. Tarpląstelinio užpildo molekulės sintetina ir egzocitozės būdu išskiria audinių ląstelės. Šios molekulės sąveikauja

sudarydamos tinklą, kuris veikia kaip atrama arba karkasas jį supančioms ląstelėms [72] (7 pav.).

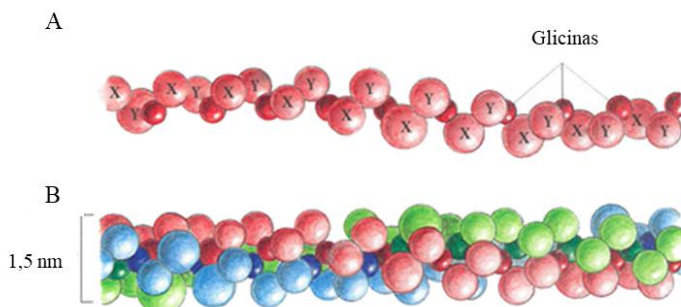


7 pav. *Viščiuko embriono ragenos SEM nuotrauka, adaptuota iš [72] (Molecular Biology of the Cell, Figure 19–40, p. 1165 (© Garland Science 2008))*

Tarpląstelinis užpildas atlieka ne tik ląstelių mechaninės atramos funkciją. Jame yra biologiškai aktyvių molekulių, kurios lemia ląstelių elgseną, komunikaciją ir raidą. Dvi pagrindinės ECM formuojančios biomolekulių klasės yra glikozaminoglikanai, kurie kovalentiškai jungiasi prie baltymų sudarydami proteoglikanus, ir kolageno, elastino, fibronektino, laminino baltymai. Adhezinėms ląstelėms labai svarbi ir būtina yra adhezija ant bazinės ECM membranos. Adheziją užtikrina integrinų šeimos baltymai. Integrinai – ląstelės paviršiaus receptoriai, kurie dalyvauja atpažįstant ECM baltymus ir formuojant jungtis su ląstelės citoskeletu. Integrinams susijungus su tarpląstelinio užpildo baltymais, įsitraukia signalinės kaskados, formuojančios ląstelės morfologiją ir elgseną [72][73].

1.2.1. Kolagenas

Gausiausi ir svarbiausi iš fibrilinių baltymų tarpląsteliniam užpilde yra kolagenų šeimos baltymai, kurių randama visų daugialąsčių gyvūnų audiniuose. Kolageną gamina jungiamojo audinio ląstelės ir negausiai kitų rūšių ląstelės. Žinduolių organizmuose kolagenų šeimos baltymai sudaro 25 % visų baltymų masės.



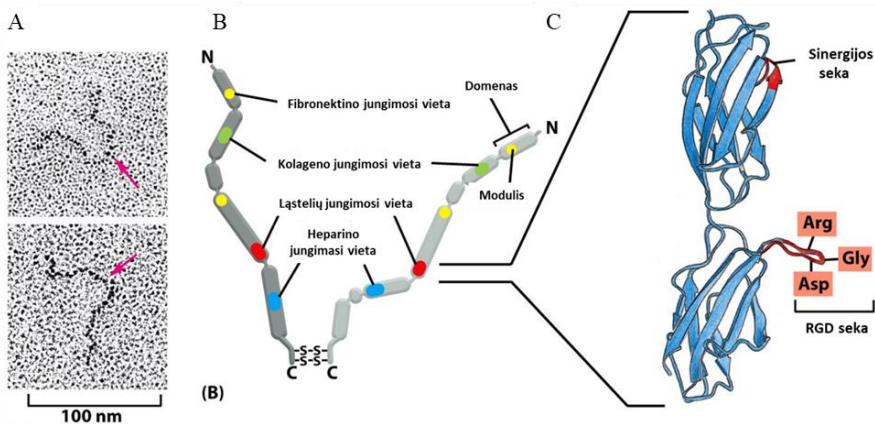
8 pav. Būdinga kolageno molekūlės struktūra. Vienos α -grandinės dalies modelis, aminorūgštys pavaizduotos sferomis, kur dažnu atveju X – tai prolino, Y – hidroksiprolino amino rūgštys (A). Trijų α -grandinių (pažymėtų skirtingomis spalvomis), susijungusių į trigubos spiralės giją, fragmentas (300 nm ilgio molekūlė) (B). Adaptuota iš [72]

Dabar yra žinomi 28 skirtingi kolageno tipai. Priklausomai nuo tipo kolageno molekules sudaro homo- ar heterotrimerai iš 3 polipeptidinių α -grandinių. Vieną α -grandinę sudaro apie 1 000 aminorūgščių. Šiuo metu žinoma daugiau nei 40 skirtingų α -grandinių. Kolageno molekūlėje yra daug prolino, hidroksiprolino ir glicino aminorūgščių, kurios sudaro pasikartojantį motyvą ir yra svarbios trigubos spiralės formavimuisi (8 pav.). Prolinas dėl savo žiedinės struktūros stabilizuoja spiralines konformacijas. Glicinas – vienintelė aminorūgštis, šoninėje grupėje turinti tik vandenilio atomą ir todėl atliekanti tarpinės funkciją α -grandinėje. Trys α -grandinės kompaktiškai susisuka į ilgą, standžią dešinio sukimosi trigubą spiralę, kurios skersmuo yra 1–2 nm, o ilgis siekia 300 nm [72]. Hidroksiprolinas dalyvauja stabilizuojant trigubos spiralės struktūrą. Žmogaus organizme skirtingas kolageno α -grandinės koduoja 42 genai. Skirtinguose audiniuose yra skirtingos šių genų kombinacijos. I tipo kolagenas yra dažniausiai aptinkamas kolageno tipas, tai pagrindinis odos ir kaulų kolagenas. Jis priklauso fibriles (skaidulas) formuojančių kolagenų klasei. Šios klasės kolagenai turi ilgą, panašią į virvę struktūrą (skaidulėles): 67 nm periodiškumo ir nuo 10–500 nm iki kelių mikrometrų ilgio [74] su nedideliu kiekiu intarpų. Kolageno skaidulėlės dažnai agreguojasi į didesnes, kelių mikrometrų skersmens struktūras, jos gali būti matomos šviesiniu mikroskopu ir yra vadinamos kolageno skaidulomis. IX ir XII kolagenų tipai vadinami su skaidulomis susijusiais, nes, manoma, kad jie jungia kolageno skaidulas tarpusavyje bei su kitais tarpląstelinio užpildo komponentais. IV tipo kolagenas – tai tinklą formuojantis kolagenas, sudarantis didžiąją bazinės membranos dalį [75]. V tipo kolagenas dalyvauja sudarant ląstelės sienelę, plaukų struktūroje.

Reikia paminėti, kad skirtingos kolageno struktūros pasižymi skirtingomis mechaninėmis savybėmis, priklausomai nuo kolageno formuojamų darinių. Kolageno trigubos spirалės plyšimo jėga yra 11 GPa, o kolageno skaidulų ji yra tik 0,5 GPa [74]. Šis skirtumas atsiranda dėl to, kad, norint nutraukti kolageno trigubą spiralę, reikia nutraukti kovalentinius ryšius, o norint perplėsti kolageno skaidulą nutraukti kovalentinių ryšių nėra būtina. Tai pat buvo atlikti kolageno trigubos spirалės matematiniai modeliavimai, kurie patvirtino, kad kolageno trigubos spirалės ilgis ~300 nm leidžia pasiekti geriausią energijos išsklaidymą kolageno skaidulose ir gauti didžiausią skaidulos tvirtumą [76].

1.2.2. Fibronektinas

Fibronektinas yra didelės molekulinės masės (~450 kDa) glikoproteinas, sudarytas iš dviejų panašių, bet nevienodų grandinių. Kiekviena iš šių grandinių sudaryta iš 2500 aminorūgščių. Grandines jungia disulfidiniai tilteliai grandinių C galuose (9 pav.). Ląstelės fibronektiną sintetina nuolatos: tiek embriogenezės metu, tiek susiformavusiuose audiniuose.



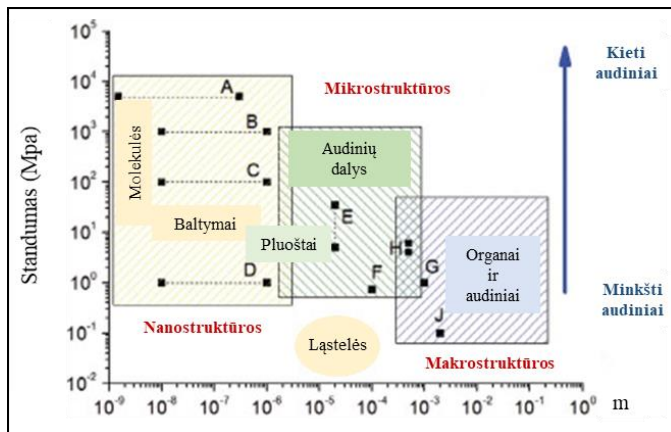
9 pav. Fibronektino dimero struktūra. Fibronektino dimero SEM nuotrauka, kur rodyklėmis pažymėtas C grandinės galas (A). Scheminis fibronektino dimero vaizdas (B) su pažymėtomis aktyviomis jungimosi vietomis. III tipo fibronektino trimatis modelis, kur raudona spalva pažymėtos pagrindinės ląstelių jungimosi vietos (C). *Adaptuota iš [72]*

Tirpų kraujo plazmos fibronektiną (koncentracija 300 µg/ml) gamina ir į kraują išskiria hepatocitai. Netirpų fibronektiną gamina fibroblastai ir kitos ląstelės, jo gausu tarpląsteliniam užpilde [77]. Fibronektinas yra būtinas organų formavimuisi ir dalyvauja ląstelių adhezijoje ir migracijoje. Ląstelės sąveikauja su ECM fibronektinu per integrinų receptorius ir šiame procese

dalyvauja fibronektino III tipo modulis, t. y. maždaug 90 aminorūgščių ilgio fragmentas, kuriame bent 15 kartų pasikartoja arginino-glicino-asparto (Arg-Gly-Asp; dar vadinamo RGD) aminorūgščių tripletas, reikalingas ląstelių adhezijai.

1.2.3. Sudėtingesni karkasai ląstelėms auginti

Organų donorystės problema išlieka labai aktuali, donorinių organų ir audinių trūkumas vis didėja senėjant visuomenei ir gerėjant transplantologijos paslaugų kokybei ir pajėgumams. Deja, daug pacientų vis dar miršta nesulaukę transplantacijos, be to, ir, sulaukus transplantacijos, lieka transplantato atmetimo galimybė [78][79]. Organai, audiniai ir jų sudedamosios dalys yra sudėtingos ir kompleksinės sistemos, sudarytos iš nano-, mikro- ir makrostruktūrinių vienetų su skirtingomis fizikinėmis, cheminėmis ir biologinėmis savybėmis (10 pav.).

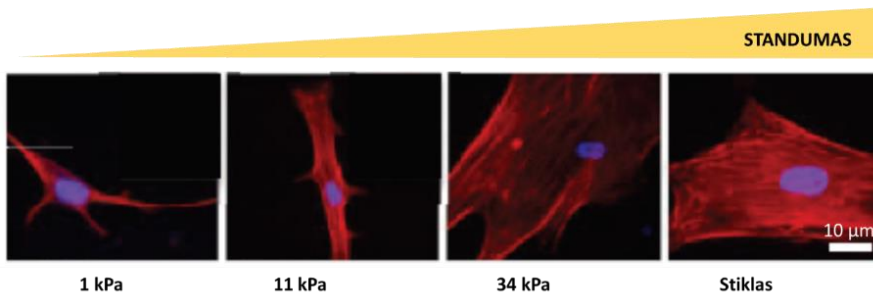


10 pav. Minkštų audinių ir jų struktūrinių elementų pasiskirstymas dydžių ir standumo skalėje. Aortos standumo duomenys matuoti makroskopiniuose, mikroskopiniuose ir molekulinuose dariniuose: A: pavienės kolageno skaidulėlės, B: kolageno skaidulos, C: fibrilino mikroskaidulos, D: elastinas, E: šeškų aortos dalys, F: kiaulės aortos dalys, G: žmogaus radialinė arterija, H: žiurkės aorta, J: žmogaus aorta. Adaptuota iš [80]

Šias problemas bandoma spręsti pasitelkiant medžiagų ir audinių inžineriją – tarpdisciplininę mokslo sritį, kuri, sujungdama fizikos, chemijos, biologijos, medicinos ir kitų sričių žinias, stengiasi sukurti kuo tikslesnius ir geriau su organizmu derančius organus ir audinius. Naujos audinių inžinerijos technologijos leidžia gaminti gyvus ir funkcionalius audinius, kurie dažnai kuriami auginant ląsteles specifiniuose karkasuose. Naudojant tokius inžinerinius karkasus galima pakreipti ląstelių vystymąsi norima

kryptimi. Ypač daug žadantis ir tiriamas kamieninių ląstelių panaudojimas audinių inžinerijoje [79][81]. Dažniausiai aptinkami karkasai ląstelėms auginti yra porėti 3D substratai [82][83]. Ląstelių elgesį ant karkaso nulemia ne tik cheminės ir biologinės medžiagos savybės, bet ir mechanika, paviršiaus topografija (poros, kanalai, šulinėliai, briaunos ir kt.) [84][85][86]. Karkasų pagrindui audinių inžinerijoje dažnai pasirenkamos hidrogelio tipo medžiagos [82][87], kurių masės didžiąją dalį sudaro vanduo. Ląstelėms auginti skirti karkasai gali būti natūralios prigimties, sintetiniai ir hibridai. Labai svarbi hidrogelio savybė yra laidumas maisto ir metabolinėms medžiagoms, mat žmogaus organizme deguonis ir maisto medžiagos difunduoja labai nedidelius atstumus [88] ir ląstelės nenutolsta toli nuo kapiliarų tinklo, iš kurio yra aprūpinamos reikalingomis medžiagomis bei pašalinami susidarę metabolitai. Norint maisto medžiagomis aprūpinti ląsteles, augančias dirbtiniame karkase, ir pašalinti susidarančius metabolitus, karkaso struktūra turi būti laidi maisto medžiagoms, t. y. turėti porėtą struktūrą, kad būtų užtikrinta laisva maitinimo terpės difuzija.

2D



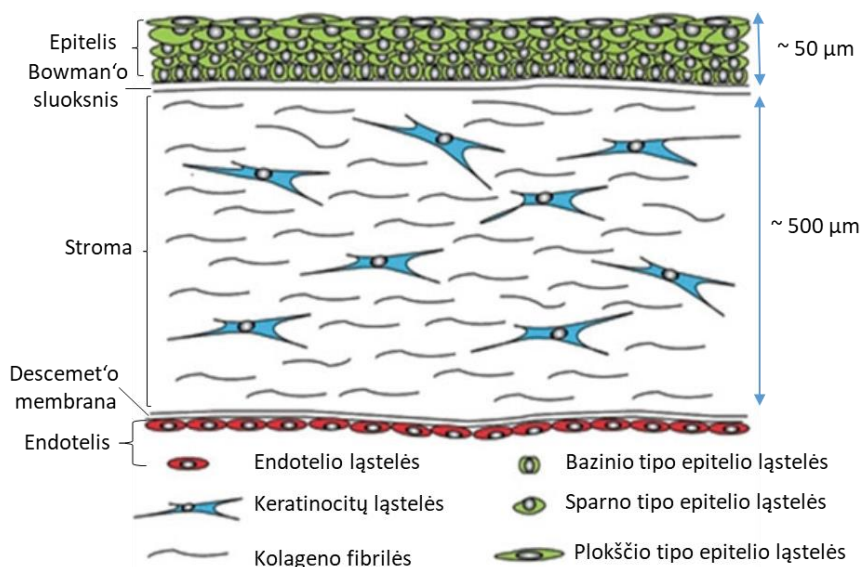
11 pav. Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės auginamos ant skirtingo standumo 2D paviršių, kur priklausomai nuo poliakrilamido paviršiaus standumo skiriasi ląstelės išsiskleidimo plotas. *Adaptuota iš [89]*

Taip pat labai svarbios ir karkaso mechaninės savybės bei fizinis patvarumas (11 pav.). Ląstelių karkasas turi būti pakankamai standus, kad ląstelės galėtų prie jo prisitvirtinti, o mechaninės savybės turi būti kuo artimesnės natūralaus audinio charakteristikoms, kurios gali paveikti ląstelių organizavimąsi norimo audinio linkme [90][91][92][93]. Karkaso morfologija ir paviršiaus topografija, karkaso kraštai, paviršiaus šiurkštumas turi įtakos ląstelių adhezijai, orientacijai ir migracijai [84][94][95][96][97]. Karkaso irimo greitis ir produktai, išsiskiriantys jam yrant, taip pat yra labai svarbūs [96]. Svarbu užtikrinti, kad šalutiniai produktai būtų neutralūs ir nedarytų įtakos ląstelėms augti.

1.2.4. Biosintetiniai akies ragenos implantai

Ragena yra skaidrus, kupolo formos akies išorinis paviršinis audinys, kurio pagrindinė funkcija yra praleisti ir sufokusuoti įeinančią šviesą į akies tinklainę. Ragenos skaidrumas yra būtinas veiksnys šiai funkcijai atlikti. Žmogaus ragenos šviesos laidumas siekia apie 87 % [98]. Didžiausią jos masės dalį sudaro vanduo – 78 % [99]. Nepaisant didelio vandens kiekio audinyje, ragena yra mechaniškai tvirta, jos standumas yra 3–13 MPa [100].

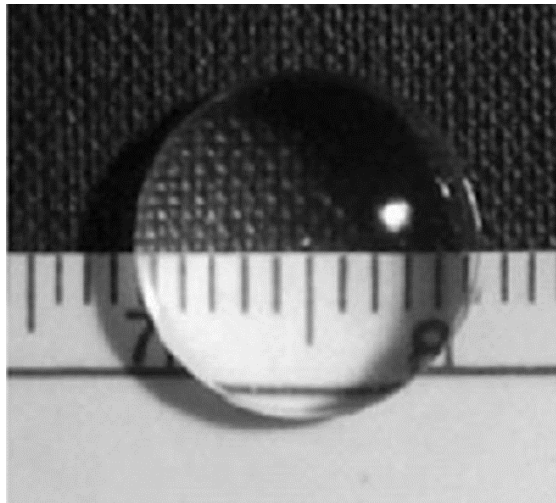
Ragena sudaryta iš penkių sluoksnių. Trys sluoksniai yra su ląstelėmis – tai epitelio, stromos ir endotelio sluoksniai; kiti du sluoksniai neturi ląstelių – tai Bowman'o ir Descemet'o membranos (12 pav.). Išorinį epitelį sudaro 5–6 sluoksniai stratifikuotų žmogaus ragenos epitelio ląstelių (HCEC), šis sluoksnis sudaro apie 10 % viso ragenos storio (~ 50 μm). Jis apsaugo akį nuo pašalinių medžiagų ir išorinių patogenų. Epitelio ląstelėms maisto medžiagas ir deguonį teikia jas dengianti akies ašarų plėvelė. Ragenos vientisumas ir funkcijos priklauso nuo ragenos epitelio sluoksnio nuolatinio atsinaujinimo, kurį užtikrina limbo kamieninės ląstelės, esančios limbo regione (žiedinė zona ties ragenos – junginės jungtimi, po akies voku). Šios limbo kamieninės ląstelės gali dalytis simetriškai, t. y. atnaujinti savo populiaciją, arba asimetriškai, vienai dukterinei ląstelei išlaikant kamieniškumą, o kitai migruojant link centro ir diferencijuojantis [6].



12 pav. Žmogaus akies ragenos scheminis vaizdas – pagrindiniai struktūros elementai ir ląstelės, adaptuota iš [6]

Po epitelio sluoksniu yra Bowman'o membranų sluoksnis, jis yra 8–14 μm storio ir neturi ląstelių. Šis sluoksnis sudarytas iš tankaus atsitiktinai orientuotų kolageno fibrilių tinklo. Tai epitelio ląstelių augimo pagrindas, pats sluoksnis neatsinaujina [101]. Po Bowman'o membranų sluoksniu yra ne toks tankus, bet geriau orientuotas stromos sluoksnis, kurio storis suaugusio žmogaus ragenoje yra apie 500 μm . Stromos tarpląstelinį užpildą sudaro hidratuotos I/V tipo kolageno fibrilės, glikozaminoglikanai, proteoglikanai ir fibronektinas, lamininas, VI tipo kolageno baltymas [6] bei sluoksnyje įsiterpę keratinocitai [102]. Keratinocitai sveikos ragenos stromoje nesidalija ir atlieka maitinimo bei ECM sintezės funkcijas. Descemet'o membrana – antras beląstelinis sluoksnis, kuris atskiria stromą nuo endotelio, ir yra sudaryta iš IV ir VIII tipo kolagenų. Endotelis – paskutinis ragenos sluoksnis, kurio funkcija – užtikrinti tinkamą stromos hidrataciją, dėl kurios stroma yra skaidri.

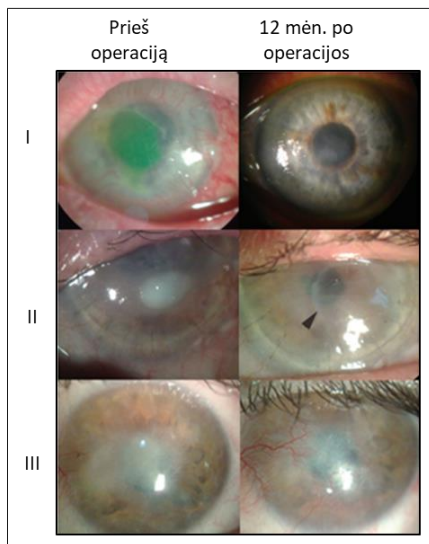
Dėl mechaninių, cheminių, bakterinių ar virusinių pažeidimų ragena gali prarasti savo skaidrumą, atsirasti dalinis arba visiškas aklumas. Taip pat šie procesai sukelia akies dirginimą, uždegimą ir skausmą. Tada vienintelė išeitis – ragenos transplantacija, pakeičiant pažeistą ragena donoro ragena arba implantu. Pirmieji biosintetiniai baltyminio hidrogelio ragenos implantai buvo pagaminti naudojant medicininės paskirties I tipo kolageną (angl. *porcine collagen type I*, PC) (13 pav.). Šio tipo implantai buvo išbandyti studijose su gyvūnais ir per 6 mėnesių laikotarpį implantai išliko optiškai skaidrūs, išlaikė savo formą, paskatino ragenos epitelio ląstelių ir nervų regeneraciją [8].



13 pav. Ragenos formos implantas, 500 μm storio, pagamintas iš I tipo kolageno, adaptuota iš [8]

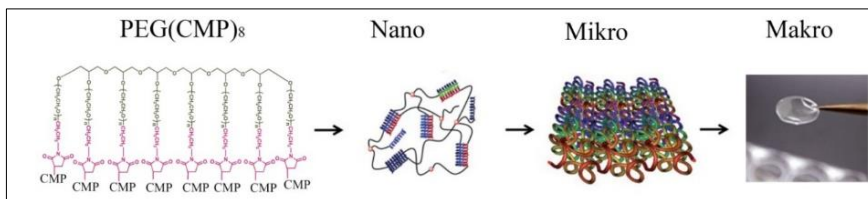
Tačiau šie pirmos kartos implantai buvo pagaminti iš gyvulinės kilmės kolageno, dėl to išlieka didesnė autoimuninės sistemos atmetimo rizika. Antros kartos implantai buvo pagaminti naudojant rekombinantinį žmogaus I ir III tipo kolageną (angl. *recombinant human collagen type I/III*, RHCI ir RHCIII). Šie implantai pasižymėjo mechaninėmis ir optinėmis savybėmis, artimomis toms, kurias turėjo ir pirmieji baltyminio hidrogelio implantai. Atliktos 12 mėnesių *in vivo* studijos su mini kiaulytėmis parodė gerus rezultatus, implantai iš RHCI ir RHCIII padėjo regeneruoti epitelio ląstelių sluoksnį, nervus [103]. Reikia pažymėti, kad iš RHCIII pagaminti implantai išliko optiškai skaidresni, palyginti su RHCI implantais. Todėl iš RHCIII pagaminti implantai buvo pasirinkti I stadijos klinikinei studijai su 10 pacientų, turinčių dalinį aklumą. Praėjus 24 mėnesiams visiems pacientams susiformavo epitelio sluoksnis, atsirado ašarų sluoksnis, ragenos liečiamasis jautrumas bei implanto viduje pradėjo augti stromos ląstelės. Regėjimas labai pagerėjo 6 pacientų [104]. Norint padaryti baltyminio hidrogelio implantus ilgaamžius ir atsparesnius organizmo fermentų ardymui, hidrogeliai buvo papildyti 2-metakriloksietilfosforilcholinu (MPC) [14]. MPC yra fosfobetainas, imituojantis ląstelės plazminės membranos fosfolipidus. Trečios kartos kolageno MPC hidrogeliai buvo sukurti kaip biosuderinama medžiaga, atsparesnė fermentų ardymui ir slopinanti ląstelių jaugimą į implantą, be to, šie hidrogeliai pasižymėjo mažesne ląstelių adhezija ir neigiamai veikė ląstelių proliferaciją. Kolageno hidrogelio implantai su fosforilcholinu (RHCIII-MPC) išbandyti klinikiniuose tyrimuose. Tyrimų dalyviai buvo sunkios būklės ligoniniai ir implanto atmetimo tikimybės būta labai didelės. RHCIII-MPC implantai sumažino skausmą ir nepatogumą, atkūrė ragenos vientisumą, paskatino regeneraciją ir pagerino 2 iš 3 pacientų regėjimą (14 pav.)[10].

Baltyminiai hidrogeliai, naudojami ragenos implantų gamybai, yra sudaryti iš didelių tarpląstelinio užpildo baltymų, kuriuos sunku modifikuoti, kontroliuoti jų tirpumą ir užtikrinti hidrogelio skaidrumą, kuris būtinas ragenos funkcijoms. Siekiant susintetinti norimų savybių hidrogelį, ne visada reikia turėti visą baltymą, pakanka turėti sintetines trumpas aminorūgščių sekas, analogiškas baltymo aminorūgščių sekai. Tokie kolageną imituojantys peptidai (angl. *collagen mimetic peptide*, *CMP/collagen-like peptide CLP*) geba formuoti trigubos spiralės nanofibriles [105][106]. Peptidą sudaro 38 aminorūgštys (Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄-Gly-Cys. Ši seka imituoja natyvaus kolageno polipeptidinėje grandinėje pasikartojantį - Gly-X-Y- fragmentą, kur X dažnai yra prolinas (Pro), o Y – hidroksiprolinas (Hyp). Natyvioje kolageno molekulėje trys polipeptidinės grandinės formuoja trigubą superspiralę. Šią trigubą spiralę papildomai stabilizuoja hidroksiprolino OH grupės. Siekiant gauti formą išlaikantį, bet ir plastišką



14 pav. Trijų pacientų akių ragenų vaizdas prieš ir po RHCIII-MPC implantacijos. Po operacijos praėjo 12 mėn., adaptuota iš [10]

hidrogelį, kuris galėtų būti formuojamas kaip įsiuvas implantas, CMP konjuguojamas su 8 funkcinėmis maleimido grupėmis turinčiu polietilenglikoliu (PEG), gaunant PEG(CMP)₈ konjugatą [107]. CMP peptidai kovalentiškai prisijungia prie 8 šakų PEG-maleimido karkaso per galines cisteino tiolio grupes. PEG(CMP)₈ molekulių CMP peptidams sąveikaujant tarpusavyje ir susisukant į trigubą superspiralę, susiformuoja natyvų kolageno tinklą imituojantis PEG(CMP)₈ molekulių tinklas (15 pav.). PEG-maleimido karkasas ne tik suteikia hidrogeliui standumo, bet ir pagerina CMP molekulių savaiminį susirinkimą į trigubą superspiralę [107]. Naudojant karbodiimido reakciją, CMP peptido molekulės yra sujungiamos negrįžtamai tarpusavyje per lizino ir asparto rūgšties amidinius ryšius. Panašūs skersiniai ryšiai, tik nulemti elektrostatiinių jėgų tarp neigiamai įkrautų karboksilo ir teigiamų įkrautų amino grupių, susidaro ir natyviose kolageno molekulėse. Šie PEG(CMP)₈ peptidiniai hidrogeliai jau buvo sėkmingai išbandyti *in vivo* eksperimentuose su kiaulėmis. Kolageno baltymo pakeitimas trumpais peptidais nesutrukdė panaudoti hidrogelį ragenai atkurti ir tyrimas buvo sėkmingas. Be to, tokie peptidiniai hidrogeliai yra patogūs tolesnėms modifikacijoms, nes CMP peptido seką galima papildyti įvairiais funkciniais peptidais, pvz., RGD (*Arg-Gly-Asp*) ar IKVAV (*Ile-Lys-Val-Ala-Val*) [108], kurie atitinkamai imituoja fibronektino ir laminino baltymų fragmentus. RGD motyvas naudojamas siekiant pagerinti ląstelių adheziją ir proliferaciją, IKVAV – pagerinti neuronų adheziją.



15 pav. PEG(CMP)₈ molekulių sąveikos nano-makro skalėje scheminis vaizdas, adaptuota iš [107]

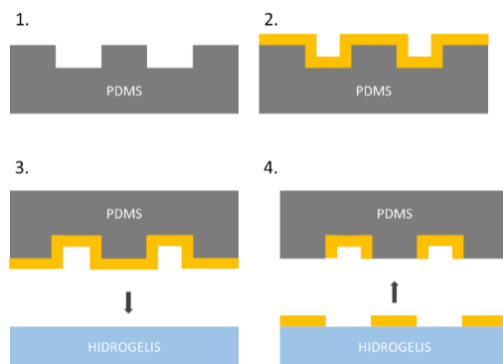
1.3. Hidrogelių formavimas

Sintetiniai PEG pagrindu sukurti hidrogeliai ir baltyminiai hidrogeliai jau pasižymi minėtomis naudingomis savybėmis, tokiomis kaip paviršiaus fizikinių ir cheminių savybių standartizavimas, atrankumas, gebėjimas imituoti tarpląstelinį užpildą, skatinti ląstelių adheziją ir kt. Tačiau yra metodų, kuriais galima šiuos hidrogelius ar jų paviršius patobulinti. Mikroliejimo, mikroskysčių, įvairūs litografinio struktūrinimo ir panašūs mikro- ir nanogamybos procesai buvo panaudoti tikslingai kuriant griovelius, kanalus ar kitas topografijas, skatinančias ląstelių adheziją [109][110][111][112][113]. Taip pat yra naudojami peptidų [114], augimo faktorių ir bioaktyvių medžiagų cheminio prijungimo prie paviršiaus metodai, taip veikiant ląstelių adheziją ir augimą [110][115][116][117]. Šiame skyrelyje apžvelgsiu pagrindinius mikro- ir nano- struktūrinimo metodus, kurie yra naudojami arba turi potencialo formuojant hidrogelius.

1.3.1. Funkcinių struktūrų formavimas hidrogelio paviršiuje

Funcinių struktūrų 2D formavimas tai yra cheminis paviršiaus struktūrinimas, kai sukurtos struktūros pasižymi tam tikrais lateraliniais matmenimis ir skirtinga chemine sudėtimi, pvz., baltymais, peptidais ar kitomis funkcinėmis grupėmis, negu likęs paviršiaus plotas. Analogiškai mikroelektronikoje naudojamam metalų ir puslaidininkių formavimui ant hidrogelio paviršiaus pagamintos funkcinės (cheminės) struktūros turi apibrėžtą dydį, formą ir periodą. Vienas iš pagrindinių eksperimentinių cheminių struktūrų formavimo metodų yra minkštoji kontaktinė litografija.

Mikrokontaktinis antspaudavimas yra minkštosios kontaktinės litografijos metodas, pagrįstas topografiją turinčio elastomerinio antspaudo panaudojimu cheminio „rašalo“, kuriuo gali būti baltymai, peptidai, tiolių junginiai ir kitos medžiagos, pernešimu ant paviršiaus ten, kur buvo sąlytis su modifikuojamu paviršiumi (16 pav.).

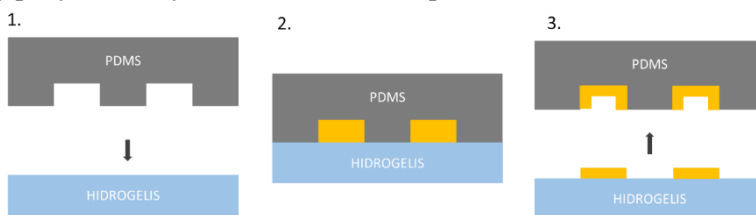


16 pav. Mikrokontaktinio spausdinimo schema. PDMS spaudas su topografijomis yra padengiamas spausdinamomis molekulėmis – rašalu. Tada spaudas su molekulėmis padengtomis topografijomis perkeliamas į fizinį kontaktą su paviršiumi ir spaudas atitraukiamas

Mikrokontaktinio antspaudavimo procesas buvo ištobulintas tiolio molekulių pernašai ant aukso paviršiaus [118]. Viso proceso galima išskirti o du pagrindinius žingsnius – struktūrizuoto elastomerinio antspaudu paruošimą ir antspaudavimą [119]. Elastomerinio antspaudu struktūros ant antspaudu yra gaunamos liejant elastomerų mišinį ant šablono, kuris paprastai gaunamas fotolitografijos metodu pagaminant topografinės struktūras ant silicio padėklo ar panašios kietos medžiagos [120]. Antspaudu gamybai dažniausiai naudojamas polidimetilsiloksano monomerų mišinys (Sylgard 184), nes jį paprasta paruošti ir dėl elastomechaninių savybių, tinkamų antspauduoti [121]. Suformuotas spaudas prieš spausdinimą padengiamas molekulių sluoksniu – rašalu – iš vandeninių arba organinių tirpiklių. Tirpiklis išgarinamas, kad ant antspaudu liktų sausas molekulių sluoksniu [120]. Kontaktas tarp antspaudu su molekulių rašalu ir antspauduojamo paviršiaus yra užtikrinamas adhezijos ir išorinio spaudimo jėgų [122]. Spaudas elastingas, todėl tiksliai prisitaiko prie paviršiaus formos [121]. Daugiausia mikrokontaktinis antspaudavimas naudotas funkcinėms mikrostruktūroms ant kietų aukso [22][123], silicio [124], stiklo [124][125][126] ir plastiko [124][127][128] paviršių formuoti. Antspaudavimas ant hidrogelių paviršių yra nepopuliarus dėl to, kad procesas tampa sudėtingesnis: reikia kontroliuoti paviršiaus drėgmę, kuri skatina naudojamo rašalo difuziją už struktūrų ribų, todėl reikia atrankių ir greitų cheminių reakcijų ar sąveikų. Dažnai ant hidrogelių paviršių funkcinės struktūros formuojamas nekovalentiškai, per streptavidino, avidino ir biotino sąveiką [129]. Antspauduojami akrilamido [130] ir akrilamido-PEG [114] pagrindu hidrogeliai, savo sudėtyje turintys streptavidino baltymų, rašalu naudojant biotino grupę ženklintus fibronektino, laminino baltymus. Arba polilaktatiniai-PEG-biotin (PLA-PEG-biotin) hidrogeliai yra antspauduojami

streptavidinu, prie kurio struktūrų vėliau prijungiamas biotinu žymėtas peptidas [131]. Poliakrilamido hidrogeliai gali būti išdžiovinami ir tada antspauduojant kovalentiškai prijungiami baltymai [132]. Arba tarpląstelinio užpildo baltymai gali būti antspauduojami ant stiklo paviršiaus, ant kurio vėliau liejamas ir polimerizuojamas poliakrilamido hidrogelis, kurį nuėmus nuo baltymais antspauduoto stikliuko, baltymų struktūros lieka ant hidrogelio paviršiaus [133].

Mikrokanalų naudojimas funkciniam struktūrinimui. Šis metodas pagrįstas tuščių elastomerinio antspaudo su topografijomis panaudojimu struktūroms formuoti. Panaudojant jas kaip mikrokanalus cheminio „rašalo“ sklidimo kontrolei (17 pav.). Formuojamų struktūrų dydį apibrėžia kanalo matmenys, kurie dažniausiai būna 1–100 μm . Šiuo metodu galima struktūrizuoti paviršių tarpląstelinio užpildo baltymais, jų inhibitoriais, augimo faktoriais ar net ląstelėmis auginimo terpėje [134]. Naudojant šį metodą svarbu išgauti tirpalo sklidimą išvengiant turbulencinio maišymosi, tik taip pavyksta kokybiškai struktūrizuoti paviršius [135].



17 pav. Mikrokanalų naudojimo funkciniam struktūrinimui schema.

PDMS spaudas su topografijomis yra perkeliamas į kontaktą su paviršiumi, mikrokanalai užpildomi pasirinktomis „rašalo“ molekulėmis. Tada spaudas su topografijomis atitraukiamas

Nors mikroskysčių naudojimas yra kompleksinis ir leidžia vienu metu struktūrizuoti paviršius skirtingais molekuliniais junginiais, bet yra ribojimų pasirenkant struktūras. Struktūros turi būti vientisų linijų ar susijungiančių mikrokanalų rašto, šiam metodui netinka antspaudai su atskirtomis, pavienėmis struktūromis ant paviršiaus. Šis metodas yra sunkiai naudojamas hidrogelių paviršiams struktūrinti, bet leidžia formuoti hidrogelio struktūras kanaluose su ląstelėmis 3D aplinkoje [136].

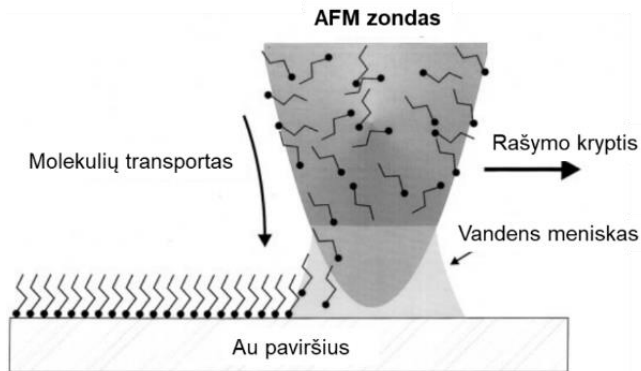
Rašalinio spausdinimo metodas taip pat gali būti naudojamas funkcinėms struktūroms formuoti. Komercinius rašalinius spausdintuvus taip pat galima panaudoti biomolekulių struktūroms formuoti be didesnių pakeitimų, tiesiog vietoj įprasto spausdintuvo rašalo naudojami baltymų, biomolekulių tirpalai ar tirpalai su ląstelėmis formuojant struktūras ant popieriaus, biomedžiagų, stiklo ir panašių paviršių [137][138]. Šio metodo

pranašumas yra visiškas struktūrų šablono skaitmeninimas, kuris leidžia greitai prototipuoti norimas struktūras, padengti didelius paviršiaus plotus. Taip pat nereikia brangios fotolitografijos įrangos bei ilgai trunkančio kaukių gaminimo proceso. Šio metodo trūkumas yra formuojamų struktūrų matmenys, jie yra gan dideli ir ribota raiška, kuri siekia apie 100–400 μm spausdinant biomolekulių struktūras [139][138].

Šviesos inicijuojamas cheminis struktūrinimas yra naudingas metodas biomolekulėms prijungti ant paviršiaus, kuriam nereikia elastomerinio antspaudu ir jo kontakto su paviršiumi. Šis metodas yra grindžiamas fotolitografinės kaukės naudojimu mikrostruktūroms formuoti iš šviesai jautrių molekulių ant lygaus paviršiaus, panaudojant šviesą reakcijoms inicijuoti. Mikrostruktūros sudaromos tik ant šviesa apšviestų paviršiaus plotų, kurie gaunami per kaukėje suformuotą raštą. Šio metodo pranašumas tas, kad chemines struktūras galima formuoti vandeniniuose tirpaluose, nedžiovinant struktūrinamų paviršių ir išvengiant baltymų galimos denatūracijos [140]. Šviesos inicijuojamoms reakcijoms dažniausiai naudojami feniloazido, diazirino, 2-nitrobenzilo ir benzofenono funkcines grupes turintys junginiai. Paveikus šviesa, šios grupės neatrankiai formuoja kovalentinius ryšius su paviršiumi per radikalinę reakciją. Šis metodas leidžia formuoti funkcines struktūras ne tik ant hidrogelio paviršiaus, bet ir hidrogelio tūryje [141][142].

Submikroninėms ir nanostruktūroms formuoti yra tinkamas **rašalinės plunksnos nanolitografijos metodas** (angl. *Dip-Pen-Nanolithigraphy* (DPN)). Šiam metodui naudojamas AJM zondas, litografijai dengtas pasirinktu cheminiu ar biomolekulių rašalu [143] ir leidžia struktūrinti paviršių tiesiogiai „piešiant“ (18 pav.). DPN galima formuoti paviršiaus struktūras su skirtingais rašalais, paeiliui arba vienu metu, nanometrų tikslumu valdant jų padėtį ant paviršiaus. Šiam metodui nereikia paviršiaus apdoroti UV šviesa, jonų ar elektronų pluoštu. DPN metodas pirmą kartą panaudotas alkiliolių SM struktūroms formuoti ant aukso paviršiaus ir geriausia linijų skyra siekė 30 nm [144].

Šis metodas leidžia formuoti struktūras iš mažų organinių molekulių, polimerų [145], DNR, baltymų, peptidų, koloidinių nanodalelių ir metalų jonų ant įvairių paviršių, o pačių struktūrų dydis siekia 1–100 nm skyrą [146][147].

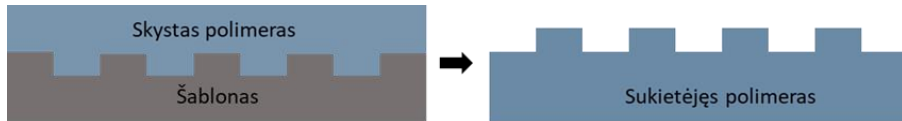


18 pav. Rašalinės plunksnos nanolitografijos metodo schema. Vandens meniskas, susidaręs tarp AJM zondo ir Au paviršiaus, kurio dydį galima kontroliuoti keičiant aplinkos drėgmę, lemia molekulių pernašą nuo adatos ant paviršiaus bei adatos ir Au paviršiaus kontakto plotą, struktūrų skyrą. Adaptuota iš [144]

1.3.2. Hidrogelių paviršiaus 3D topografijų formavimas

Hidrogelių paviršių struktūrinimas suformuojant 3D topografijas, skirtingai nuo funkcinio struktūrinimo, gaunamos struktūros dažniausiai būna homogeniškos cheminės sudėties. Visi efektai ląstelių, bakterijų elgsenai yra gaunami iš topografinių paviršiaus skirtumų [148][149][150]. Šiame skyrelyje apžvelgsiu populiariausius metodus 3D paviršiaus topografijoms formuoti.

Mikroliejimas, mikropernešamas liejimas [151] ar kapiliarinės jėgos litografija [152] priklauso vadinamųjų minkštosios litografijos metodų grupei ir šiuos metodus galima naudoti plačiai, priklausomai nuo medžiagų, liejimo formos ir naudojamos liejimo technikos. Šio metodo esmė – monomerų mišinys arba skystas polimeras yra liejamas ant elastomerinio šablono su topografijomis, tada polimeras, sintetinis ar natūralus, termiškai ar fotochemiškai polimerizuojamas ir nuimamas nuo šablono (19 pav.). Nuimtas sukietėjęs polimeras atkartoja šablono paviršiaus topografijas. Liejimo forma, kaip ir mikrokontaktinio antspaudavimo metodui, paruošiama fotolitografiškai arba liejama nuo jau topografinės struktūros turinčių paviršių [153].

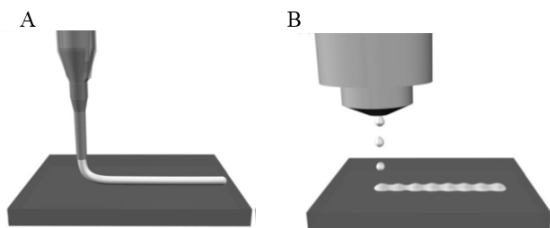


19 pav. Scheminis mikroliejimo metodo pavaizdavimas. Ant elastomerinio šablono su topografinėmis struktūromis užpilamas skystas polimeras, tada jis polimerizuojamas arba kitaip kietinamas ir nuimamas nuo šablono

Mikroliejimo metodo pranašumas tas, kad galima struktūrinti didelius paviršiaus plotus, dirbti su lenktos formos topografijas turinčiais paviršiais. Topografinių struktūrų dydžiai apima mikrometrų ir submikrometrų dydžių skalę, kurią lemia šablono struktūrų dydžiai ir polimero mechaninės savybės, kiek jis yra tvirtas ir sugeba išlaikyti struktūras. Mechaniškai silpniems polimerams naudojamas **minkšto įspaudimo metodas**, kai skystas polimeras yra dedamas ant palaikančio paviršiaus, o topografinis šablonas dedamas iš viršaus ir polimeras tada kietinamas [154]. Nuėmus šabloną, polimeras su struktūromis lieka ant palaikančio paviršiaus. Taip pat minkštiems polimerams formuoti tinka **mikrokanalų topografinio struktūrinimo** metodas. Tada naudojami elastomerinio šablono mikrokanalai polimero topografijoms formuoti. Skystas polimeras vakuomo arba kapiliarinių jėgų pagalba yra įtraukiamas į mikrokanalus, ten yra kietinamas ir šablonas nuimamas, o polimerinės struktūros lieka ant paviršiaus [155].

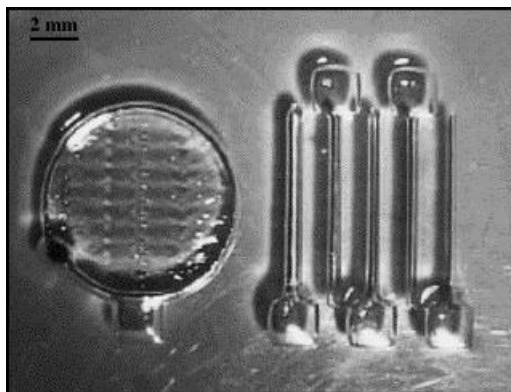
Pasitelkus **tiesioginio 3D spausdinimo** metodą naudojama kompiuterio valdoma platforma su topografinės struktūros formuojančiu ir rašalą dozuojančiu purkštuku (20 pav.). Kaip ir rašalinio spausdinimo metodu, šiuo metodu tiesiogiai formuojamos topografinės struktūros, kurių dydis svyruoja nuo milimetrinių iki submikrometrinių dydžių skalės [156]. Yra pagrindinės tiesioginio spausdinimo technikos, tai nenutrūkstamos gijos ir atskirų pavienių lašelių. Pirmoje iš vienos nenutrūkstamos polimero gijos yra formuojama struktūra, o kita technika išpurškiami atskiri lašeliai, taip sudėliojama norima struktūra (20 pav.).

Šis metodas leidžia lengvai ir greitai formuoti įvairias topografines struktūras, nes jos spausdinamos tiesiogiai, o visas spausdinimo procesas dažnai yra automatizuotas ir valdomas atitinkamų kompiuterių programų. Išspausdintos struktūros sukietinamos UV šviesoje, termiškai arba atitinkamais cheminiais rišikliais [156][157]. Taip pat šis metodas leidžia spausdinti skirtingo medžiagų hidrogelio struktūras, naudojant tą patį purkštuką [158].



20 pav. Scheminis tiesioginio 3 D struktūrų spausdinimo metodo, naudojant pastovios polimero gijos (A) ir atskirų polimerų lašų (B) spausdinimo technikas, principo paaiškinimas. Adaptuota iš [156]

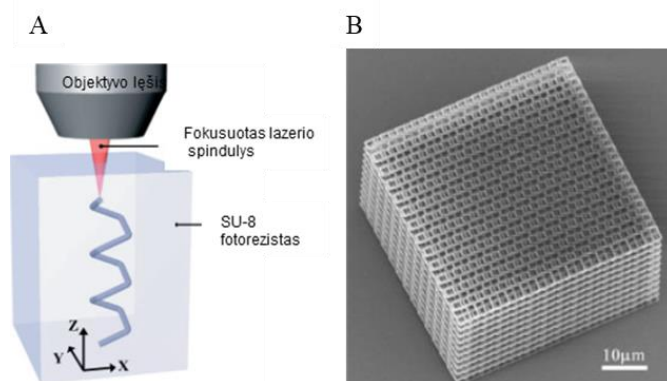
Fotoabliacinis topografijų formavimo metodas skirtas jau suformuotiems polimerams / hidrogeliams struktūrinti. Polimerų fotoabliacija atsirado tobulėjant eksimeriniams lazeriams, kurie spinduliuoja didelio intensyvumo trumpus UV šviesos impulsus [159]. Lazerinė abliacija leidžia kontroliuojamai pašalinti medžiagą nuo beveik visų organinių polimerų. Svarbūs parametrai abliacijai yra stipri polimero sugertis ties lazerio spinduliuojamos šviesos bangos ilgiu, egzoterminis polimero grandinės suirimas ir dujinės fazės abliacijos produktų pašalinimas [160]. Šis metodas tinkamas ne tik kanalų tipo struktūroms hidrogelių paviršiuje, bet ir hidrogelio tūryje formuoti (21 pav.) [159][161][162].



21 pav. Fotoabliacijos metodu 1 % agarozės hidrogelyje suformuotų kanalų optinis vaizdas. Naudotas eksimerinis lazeris (193 nm, ArF), dėmės dydis 30 μm , impulso energija 1,0 μJ esant 10 Hz impulsų pasikartojimo dažniui. Adaptuota iš [161]

Skirtingai nei fotoabliacijos metodu, **dvifotonei litografijai (polimerizacijai)** naudojama lazerio šviesa polimerizacijai inicijuoti. Šis metodas tinkamas ne tik paviršiaus topografijoms formuoti, bet ir tūrinių 3D

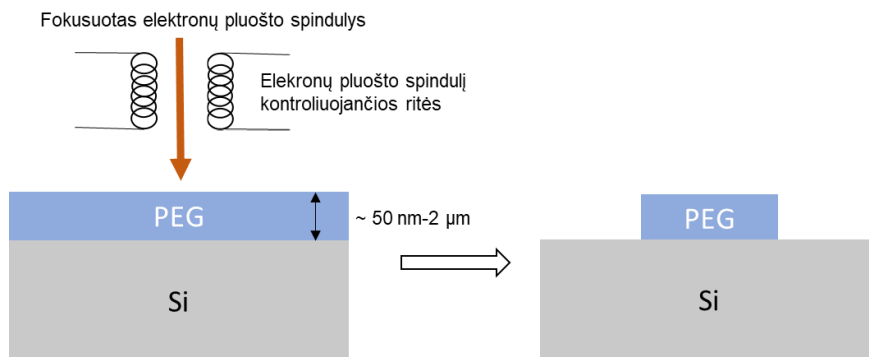
mikrostruktūrų gamybai (22 pav.). Jis grindžiamas netiesiniu dvifotoniniu lazerio spinduliuotės sugerties reiškiniu. Fokusuojant ultratrumpųjų impulsų lazerio šviesą monomerų tirpalo viduje, fotonų erdvinis tankis tampa labai didelis. Esant pakankamai dideliame fotonų tankiui (arba dideliame intensyvumui), kai bendras dviejų fotonų energijos kiekis atitinka arba viršija perėjimo energiją tarp pagrindinės ir sužadintos iniciatoriaus molekulės būsenos, juos vienu metu gali sugerti fotoiniciatorius ir pereiti į sužadintą būseną. Įprastai jis sugeria UV fotoną ir neturi sugerties juostos ties lazerio bangos ilgiu [163][164]. Apšvitos metu susidaręs iniciatoriaus radikalas atakuoja dvigubą anglies atomų ryšį monomere ir pradeda grandininę polimerizaciją. Taip pat, naudojant šį metodą, galima chemiškai formuoti bioaktyvių molekulių struktūras hidrogelio viduje [165]. Šis metodas patogus, nes struktūros formuojamos tiesiogiai, valdant pozicionavimo ir lazerio parametrus, o pagaminamų struktūrų matmenys siekia arti 100 nm [163]. Metodo trūkumas yra sudėtinga ir brangi aparatūra bei reikalingi fotoiniciatoriai, kurie dažnai yra toksiški ląstelėms [57][58].



22 pav. Principinė dvifotonės litografijos schema (A), SEM nuotrauka spiralinės struktūros, pagamintos iš SU-8 fotorezisto. Adaptuota iš [166]

Elektronų pluošto litografijos metodas. Juo dirbant naudojamas SEM mikroskopas atlikti PEG hidrogelių topografinį struktūrinimą [167]. Veikimo principas panašus kaip ir fotorezisto struktūrinimas naudojant elektronų pluoštą (e-beam). Sausas PEG hidrogelis apšviečiamas elektronų pluoštu, o neapšviestos PEG hidrogelio vietos vėliau nuplaunamos (23 pav.). Struktūrų dydžiai gali siekti mikrometrų ir submikrometrų dydžių skalę. Skirtingai nei fotoreziste, sausame PEG hidrogelyje nėra reaktyvių grupių, kurios polimerizuotųsi. PEG hidrogelių susiuvimas apšvietus elektronų pluoštu aiškinamas radikalo susidarymu PEG alkino grandinėje ir vandenilio išsiskyrimu [168]. Hidrogelio susiuvimą arba jo gebėjimą išbrinkti galima reguliuoti apšvietimo doze. Elektronų pluošto pozicija ir apšvitos laikas yra

kontroliuojami SEM mikroskopo programinės įrangos ir leidžia formuoti taškines ir linijines struktūras [167].



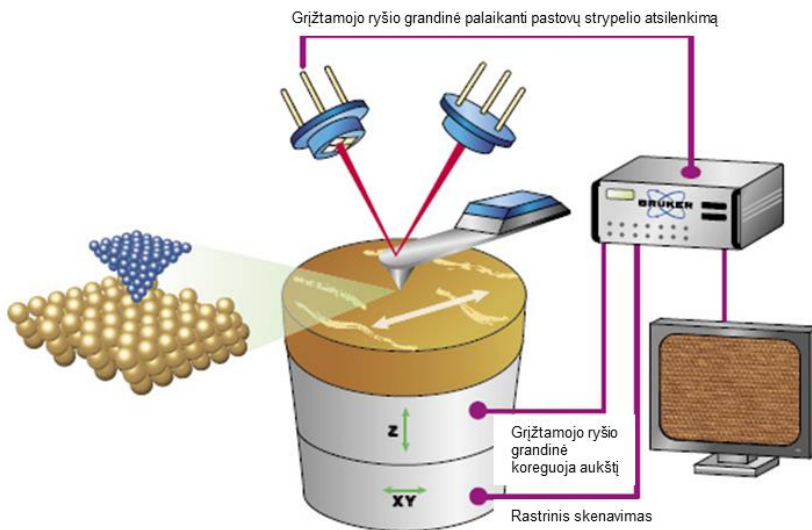
23 pav. Principinė hidrogelių formavimo schema naudojant SEM. Ploni PEG hidrogelio sluoksniai gali būti struktūrinami fokusuotu elektronų pluoštu (SEM) inicijuojant polimerų susisuvimą. Susisuvimo laipsnis valdomas reguliuojant apšvitos dozę. Po apšvitos struktūros išryškinaamos naudojant tirpiklius. Adaptuota iš[168]

1.4. Minkštų medžiagų tyrimo metodai

1.4.1. Atominių jėgų mikroskopija

Atominių jėgų mikroskopija (AJM) yra vienas iš pagrindinių paviršiaus nanoskopinės sandaros tyrimų metodų, tinkamas tirti tiek laidžius, tiek ir izoliuojančius paviršius. Šio metodo principas – paviršiaus sąveikų registravimas ir paviršiaus skenavimas specialiu zondų. Zondą sudaro adata, pagaminta ant specialios formos lankstaus strypelio, jos smaigalio kreivumo spindulys paprastai yra 5–20 nm. Adatai esant pakankamai arti paviršiaus, tarp jos ir paviršiaus priklausomai nuo atstumo vyksta įvairios prigimties fizikinės sąveikos (Pauli stūmos, Van der Waalso, kapiliarinės jėgos ir kt.). Pjezoelektriniu XYZ skeneriu tiriamasis paviršius zondų skenuojamas X–Y plokštumoje, o grįžtamojo ryšio grandinė reguliuoja atstumą nuo paviršiaus. Taip palaikoma vienoda adatos spaudimo jėga paviršiui (24 pav.) [169]. Sąveikos jėga lemia strypelio atsilenkimą. Strypelio atsilenkimas registruojamas lazerio šviesos spinduliu, sufokusuotu strypelio gale, virš adatos. Atsispindėjusi šviesa registruojama segmentuotu fotodetektoriumi (24 pav.). Kai strypelis būna atsilenkęs, atspindėto lazerio pluoštelio „dėmė“ detektoriuje pasislenka ir šį poslinkį galima išmatuoti. AJM zondai gaminami litografiškai su skirtingais strypeliais ir kartu skirtingomis jų charakteristikomis – rezonansiniu dažniu ir spyruoklės konstanta (0,01–

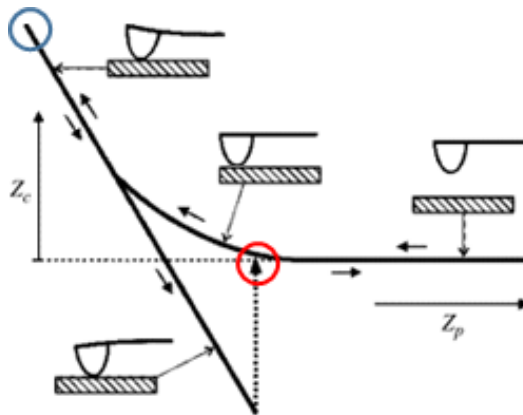
100 N/m). Spyruoklės konstanta daugiausia lemia AJM zondo spaudimo jėgą matavimo metu. Zondai su mažesne spyruoklės konstanta naudojami pastovaus kontakto, o didesnio – periodinio kontakto AJM režimams. AJM turi du bazinius režimus (režimų grupes): pastovaus kontakto ir dinaminio kontakto. Istoriskai pirmasis atsirado pastovaus kontakto režimas, kuriame adatos galiukas yra nuolatiniame kontakte su paviršiumi, ir vyrauja paviršiaus stūmos jėgos. Skenuojant paviršių, reaguojant į paviršiaus netolygumą šios jėgos pasikeičia labai greitai, grįžtamojo ryšio grandinė reaguoja į adatos sąveikos jėgos (arba strypelio atsilenkimo) pasikeitimą ir pakoreguoja Z skenerio aukštį, todėl paviršiaus morfologijos pasikeitimai aiškiai aptinkami ir rekonstruojami topografinėje nuotraukoje. Įprastai skenuojant paviršių ore kontaktiniu režimu, tarp adatos ir paviršiaus susidaro vandens meniskas, kuris nuolat kontaktuoja su adata ir paviršiumi bei sukuria papildomą ir santykinai stiprią traukos jėgą. Atsiradusios papildomos adhezijos ir šlyties jėgos veikia didesnius plotus ir gali sugadinti ar paveikti bandinius, turinčius minkštesnius paviršius ar struktūras. Todėl šis režimas dažniau naudojamas santykinai kietiems paviršiams analizuoti ore.



24 pav. AJM prietaiso principinis scheminis vaizdas. AJM zondas – strypelis su aštria adata. Adata ir bandinio paviršius yra nuolatiniame kontakte rastrinio skenavimo metu (kontaktinis režimas). Detektorius matuoja strypelio vertikalius atsilenkimus. Grįžtamojo ryšio grandinė palaiko nustatytą zondo ir paviršiaus sąveikos jėgą, reguliuodama vertikalią atstumą tarp jų. Adaptuota iš (<https://blog.brukerafmprobes.com/guide-to-spm-and-afm-modes/contact-mode-afm/>)

Periodinio kontakto režime AJM zondas virpinamas ties savo rezonansiniu dažniu. Adata artėjant prie paviršiaus, dėl adatos ir paviršiaus sąveikos zondo osciliacijos amplitudė sumažėja. Grįžtamojo ryšio grandinė stengiasi išlaikyti pastovią, nustatytą zondo virpesių amplitudę, todėl pakoreguoja Z skenerio aukštį ir kartu užregistruoja paviršiaus morfologiją. Šiame režime AJM adata kontaktuoja su paviršiumi ne nuolat, bet kiekviename taške adata liečia ir atsitraukia nuo paviršiaus savo rezonansiniu dažniu. Tai leidžia gerokai sumažinti adhezijos ir šlyties jėgas, palyginti su pastovaus kontakto režimu. Periodinio kontakto režimas tinkamas tyrimams ore ir skystyje. Sumažėjęs tiesioginis kontaktas leidžia skenuoti minkštus darinius, tokius kaip baltymai ar biologinės membranos natūralioje skysčio aplinkoje [170][171].

Kita AFM atmaina – AJM jėgų spektroskopija [172]. Šiuo atveju adatos priartinimo-atitraukimo ciklo metu yra registruojamos AJM zondo strypelio atsilenkimas ir Z pjezo-skenerio koordinatė (25 pav.). Pjezo-skenerio koordinatę galima kontroliuojamai keisti, o strypelio atsilenkimas priklauso nuo AJM adatos ir paviršiaus sąveikos. Iš tokios kreivės galima nustatyti kontaktinio aukščio tašką (25 pav., raudonas apskritimas), t. y. aukštį, kuriame adata pradeda jausti paviršių. Iš strypelio atsilenkimo kreivės galima spręsti apie adatos ir paviršiaus sąveikas, paviršiaus standumą, deformaciją ir kt. Taip pat iš šitos kreivės gaunamas aukštis, ties kuriuo pasiekama reikiama zondo spaudimo jėga (25 pav., mėlynas apskritimas). Strypelio standumas (spyruoklės konstanta) prieš matavimą ar po jo yra papildomai kalibruojamas. Tokias kreives galima gauti pasirinktame skai-



25 pav. AJM jėgos spektroskopijos kreivės gavimo paaiškinimas. Grafike atidėta AJM zondo strypelio atsilenkimo (Z_c) priklausomybė nuo pjezo-skenerio reguliuojamo aukščio (Z_p). Mėlynu apskritimu pažymėtas pasiektas reikiamas spaudimo jėgos (angl. setpoint) aukštis, raudonu – kontakto aukščio taškas. Rodyklėmis pažymėta zondo priartinimas ir atsitraukimas. Adaptuota iš [172]

čiuje paviršiaus taškų, tuo būdu gaunant ne vien paviršiaus morfologijos žemėlapi, bet ir įvertinant arba matuojant paviršiaus mechanines savybes, tokias kaip antai standumą (Jungo modulį), adhezijos energiją, įvairias sąveikos jėgas.

Standumo matavimas AJM. Esant kietiems (nedeformuojamiems) paviršiams AJM strypelio atsilenkimą (d) galima prilyginti skenerio aukščiui $d = Z_p$, bet minkštus paviršius AJM zondas deformuotų, ir ši deformacija (δ) sumažins AJM strypelio atsilenkimą $d = Z_p - \delta$. Paviršiaus spaudimo jėgą galima apskaičiuoti remiantis Hooke dėsnium, žinant AJM strypelio atsilenkimą ir pastovią nustatytą spaudimo jėgą:

$$F = kd = k(Z_p - \delta) \quad (4)$$

Hertzo modelis nusako elastingo paviršiaus deformacijos nedeformuojama sfera ir spaudimo jėgos ryšį, neatsižvelgiant į adheziją:

$$F = 4/3E^*R^{1/2}\delta^{3/2} \quad (5)$$

R – spaudžiančios sferos spindulys. Spaudimo jėga yra žinoma (nustatyta). Paviršiaus deformacija (δ) apskaičiuojama iš AJM jėgos spektroskopijos kreivės, žinant kontaktinį aukštį, reikiamos spaudimo jėgos aukštį ir išmatuotą strypelio išsilenkimą. Tokiu būdu galima nesunkiai apskaičiuoti paviršiaus redukuotą standumo modulį (E^*). Redukuotas standumo modulis (Jungo modulis) priklauso nuo paviršiaus (E_1) ir adatos standumo (Jungo) modulių (E_2):

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \quad (6)$$

Čia ν_1 yra paviršiaus, o ν_2 – sferos Poisson'o santykis, kuris daugumai medžiagų yra 0,5. Paviršiaus standumo modulį nesunkiai galima apskaičiuoti, žinant redukuotą standumą. Kadangi sferos standumo modulis daug didesnis, todėl sferos dėmuo tampa nykstamai mažas:

$$E = E^*(1 - \nu_1^2) \quad (7)$$

Paviršiaus šiurkštumo matavimas AJM. Analizuojant AJM gautą trimatę topografinę informaciją, galima įvertinti paviršiaus šiurkštumą. Vienas iš dažniausiai naudojamų paviršiaus šiurkštumo parametrų – vidutinis kvadratinis nuokrypis (angl. *root mean square*), kuris nusako aukščio verčių pasiskirstymą nuo vidutinės vertės atkarpoje (R_q) arba plote (S_q):

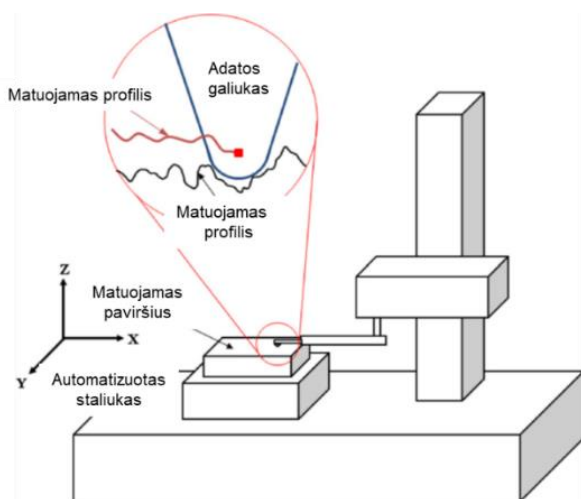
$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (r_j - \bar{r})^2} \quad (8)$$

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{N_x N_y} \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_y} (r_{i,j} - \bar{r})^2} \quad (9)$$

Čia $r_{i,j}$ – aukščio vertė; \bar{r} – vidutinė aukščio vertė; N_x ir N_y – atitinkamai stulpelių ir eilučių skaičius.

1.4.2. Adatinis profilometras

Adatinis profilometras taip pat yra paviršiaus analizės zondų instrumentas, kuris registruoja paviršiaus topografijos profilio ir struktūrų aukščio pokyčius. Matavimo metu profilometro adata fiziškai liečia paviršių, kuris juda automatizuotu staliuku tik viena kryptimi (26 pav.). Skirtingai nuo AJM, kur skenuojamas paviršiaus plotas, profilometrijoje gaunamas vienos skenavimo linijos profilis. Pagal gautą profilį galima įvertinti paviršiaus šiurkštumą, nelygumą nanometriniame skalėje. Prietaisų aukščio profilio atsikartojimo riba siekia 0,4 nm (<https://www.bruker.com/products/surface-and-dimensional-analysis/stylus-profilometers/dektak-xt/overview.html>). Profilometrai naudojami žinomo kreivumo spindulio adatos, kurių galiuko matmuo būna μm dydžio eilės, t. y. jos paprastai nėra tokios aštrios kaip AJM, kad gebėtų stebėti smulkesnius už savo spindulį paviršiaus nelygumus (26 pav.). Todėl atsiranda profilio iškraipymas [173]. Adatinio profilometro pranašumas, palyginti su AJM, yra nesudėtinga prietaisą valdyti ir greitai gauti duomenis apie profilio aukščio pokyčius, galima tirti plonesnius nei 1 nm storio sluoksnius.



26 pav. Adatinio profilometro ir paviršiaus topografijos duomenų rinkimo schema. Adaptuota iš [173]

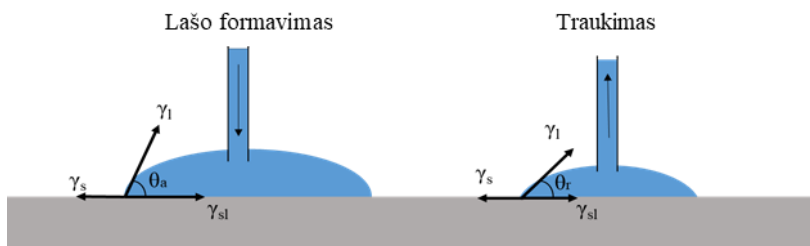
1.4.3. Drėkinimo kampo matavimas

Laisvoji energija tai darbas, kuris reikalingas, norint padidinti medžiagos paviršiaus plotą vienetiniu dydžiu. Paviršiaus energija nulemia, kaip makroskopiniai skysčio lašai deformuosis prikibę prie paviršiaus [174]. Skystis drėkina paviršių, kai skysčio molekulių sąveikos jėga yra silpnesnė

už skysčio ir paviršiaus molekulių sąveikos jėgą. Paviršiaus drėkinimo savybės yra labai jautrios mažiems paviršiaus sudėties, funkcinių grupių ir morfologijos pokyčiams. Todėl skysčio (pvz., vandens, organinio tirpiklio) drėkinimo kampas padeda suprasti paviršiaus sandarą ir cheminę sudėtį molekulinio lygmeniu [175]. Paviršiaus drėkinimo kampo matavimai atliekami kontaktinio kampo goniometru ir nėra techniškai sudėtingi. Skysčio lašas kapiliaru padedamas ant paviršiaus, mikroskopu arba fotokamera registruojamas šoninis lašo vaizdas, kuris vėliau yra analizuojamas ir matuojami kampai (27 pav.). Žinant drėkinimo kampą, galima apskaičiuoti paviršiaus laisvąją energiją pritaikant Young-Laplace lygtį:

$$\gamma_s = \gamma_l \cos \theta + \gamma_{sl} \quad (10)$$

Visiškai drėkinantys yra paviršiai, kurių drėkinimo kampas $\theta < 10^\circ$. Hidrofiliniai paviršiai turi vandens drėkinimo kampą $\theta < 45^\circ$ ir pasižymi didele paviršiaus laisvąja energija. Gerai drėkinančių paviršių kampas $45^\circ < \theta < 90^\circ$, o hidrofobiniai yra paviršiai, kurių $\theta > 90^\circ$. Hidrofobiniai paviršiai turi mažiausia laisvąją paviršiaus energiją.



27 pav. Skysčio drėkinimo kampo matavimo ant kieto paviršiaus schema. Matuojamas kampas yra θ , o γ_s – kieto paviršiaus, γ_l – skysčio paviršiaus ir γ_{sl} – kieto/skysčio sąlyčio laisvosios energijos. Kai kampas matuojamas formuojant skysčio lašą, jo vertė θ_a , o lašą traukiant gaunama θ_r .

Periodinio kontaktinio kampo matavimai sujungia dviejų matavimų: formuojamo (θ_a) ir traukiamo (θ_r) lašo kampų rezultatus. Skaičiuojama histerezė:

$$H = \theta_a - \theta_r \quad (11)$$

Šis dydis suteikia daug informacijos apie paviršių: jo šiurkštumą, cheminį reaktingumą, heterogeniškumą, molekulinę orientaciją, paviršiaus deformacijas ir kt. [176][177].

1.4.4. Elipsometrija

Elipsometrija yra optinis metodas tirti paviršių, ant jų esančių plonų dangų optines savybes naudojant šviesos poliarizacijos analizę. Šis metodas tinkamas tiriamų dangų dielektrinėms savybėms, kompleksiniam lūžio rodikliui arba dielektrinei skvarbai nustatyti, išmatuoti sluoksnių storį ant paviršių [178]. Jis pagrįstas šviesos, atsispindėjusios nuo paviršiaus, poliarizacijos pokyčiu. Matuojama šviesos poliarizacija prieš atsispindint ir po atsispindėjimo bei vertinamas poliarizacijos skirtumas. Šiuo metodu galima išmatuoti 0,1 nm storio pokyčius ir nanoskopinę sandarą. Įprastai matavimams naudojama nulinė elipsometrija su poliarizatoriumi, kompensatoriumi, analizatoriumi bei foto-jutikliu arba kamera (28 pav.). Monochromatinė šviesa keliaudama poliarizatoriumi tiesiškai poliarizuojama. Kompensatorius, kuris yra ketvirčio bangos ilgio plokštelė, įprastai fiksuota 45° kampu, suteikia fazės poslinkį tarp s ir p poliarizacijos komponentų, sukurdamą eliptiškai poliarizuotą šviesą. Atsispindėjusi nuo paviršiaus šviesa gauna papildomą fazės vėlinimą (Δ) bei s ir p komponentų amplitudžių santykio pokytį ($\tan\Psi$).

$$\tan\Psi e^{i\Delta} = R_p/R_s \quad (12)$$

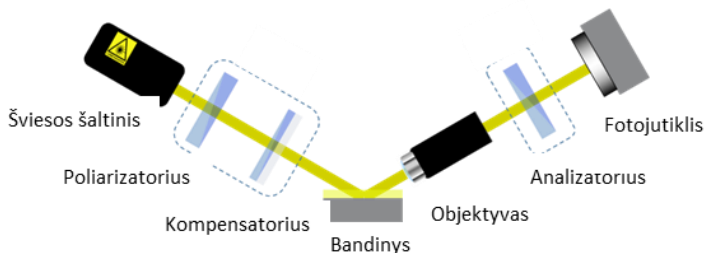
Toliau šviesa keliauja analizatoriumi (kitas poliarizatorius) į detektorių, kuriame registruojamas šviesos intensyvumas. Matavimo metu pirmo poliarizatoriaus kampas yra koreguojamas iki elipsinės šviesos, kuri tampa tiesiškai poliarizuota po atsispindėjimo nuo bandinio. Analizatorius sukamas, kol pradeda gesinti atsispindėjusią tiesiškai poliarizuotą šviesą. Ties apibrėžtu kampu, pasiekus visišką šviesos gesinimą, yra patenkinama vadinamoji nulinė sąlyga. Esant nulinei sąlygai, vertės Δ ir Ψ apibrėžiamos kaip kompensatoriaus, poliarizatoriaus ir analizatoriaus kampai.

$$c = 45^\circ \quad (\text{kompensatoriaus kampas})$$

$$\Delta = 2p + \pi/2 \quad (13) \quad (\text{p – poliarizatoriaus kampas esant silpniausiam signalui})$$

$$\Psi = |a| \quad (\text{analizatoriaus kampas, kai signalas silpniausias})$$

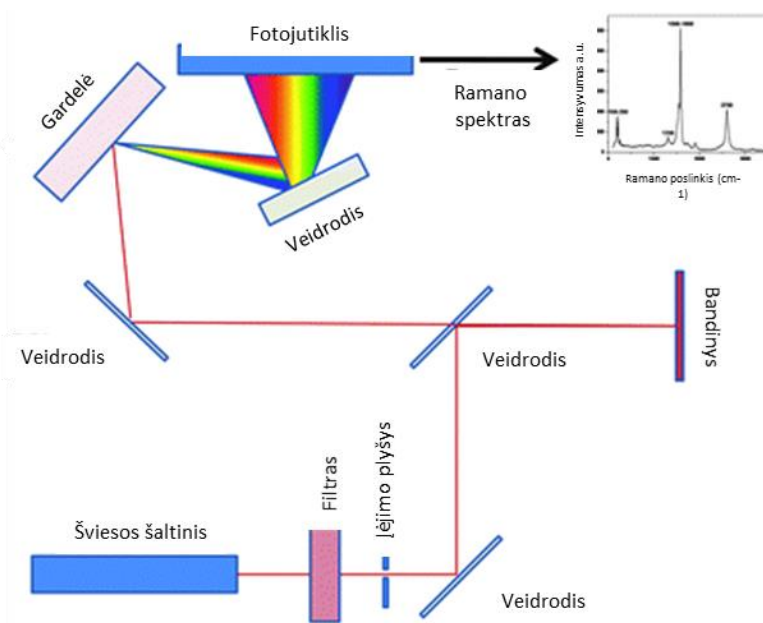
Žinant Δ ir Ψ parametrus bei dangų ir paviršiaus lūžio rodiklius, galima apskaičiuoti sluoksnio storį naudojant Fresnel lygtis [179]. Matavimo lateralinę skyrą lemia krintančio spindulio kampas ir skerspjūvis, įprastai šis dydis siekia apie 1 mm. Elipsometre pakeitus paprastą fotodetektorių kamera (pvz., CCD) ir pridėjus objektyvą (28 pav.) prieš analizatorių galima gauti topografinius vaizdus, žemėlapius, su mažų (μm) lateraliųjų struktūrų aukščiais [180].



28 pav. Principinė vaizdinančio elipsometro schema. Adaptuota iš gamintojo informacinės medžiagos (www accurion.com)

1.4.5. Ramano spektrometrija

Ramano spektrometrija – virpesinės spektroskopijos metodas, naudojamas junginiams ir funkcinėms grupėms nustatyti, taip pat teikia informacijos apie medžiagos sandarą, struktūrą, molekulių sąveiką (29 pav.) [178][181].



29 pav. Principinė optinė Ramano spektrometro schema. Adaptuota iš [181]

Ramano sklaida atsiranda sąveikaujant fotonams su tiriamos medžiagos elektronais. Vykstant sąveikai, fotonai gali netekti (vadinamosios Stokso

Ramano linijos) arba įgyti (antistoksinės Ramano linijos) energijos, kuri atitinka tam tikro virpesio šuolio energiją $E = h\nu_{\text{vib}}$. Tada sužadintos molekulės atomų virpesių energija padidėja arba sumažėja, atitinkamai keitimasis energija efektyviai vyksta tarp tokių virpesių, kurie keičia molekulės poliarizuotumą. Todėl intensyviausios Ramano juostos atitinka nepolinių, ypač aromatinių žiedų virpesius, kuriems vykstant gerokai kinta molekulės poliarizuotumas. Ramano sklaidos reiškinys yra neefektyvus, nes tik vienas iš $\sim 10^8$ fotonų virsta Ramano fotonu. Skirtingai nuo infraraudonosios spektroskopijos (IR), Ramano spektroskopijoje molekulės virpesiai matomi ne tiesiogiai, o per elektronų debesėlį [178]. Vienas iš Ramano spektrometrijos pranašumų yra tai, kad galima registruoti medžiagų spektrus vandeniniuose tirpaluose, tai ypač svarbu dirbant su hidrogelio tipo medžiagomis, kur vanduo sudaro daugiau nei pusę hidrogelio masės.

2. DARBO METODIKOS

2.1. Medžiagos ir reagentai

Darbe buvo naudotos analitiškai grynos ir be papildomo paruošimo, jei nenurodyta kitaip, medžiagos, tirpikliai ir tirpalai: NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 2-propanolis, acetonas, heksanas (Carl Roth, GmbH). 25 % NH_4OH , 30 % H_2O_2 ir 25 % glutraldehido (GA) vandeniniai tirpalai, 2-(N-morfolino)etansulfoninės rūgšties hidratas (MES), etanolis 99,9 % , N-hidroksisukcinimidas (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidis (EDC), 3-aminopropiltrietoksisilanas (APTMS), polietileno glikolio diakrilatas (PEGDA), N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas (TEMED), 2-metakriloilksietil fosforilcholinis (MPC), amonio persulfatas (APS), 2-hidroksietil metakrilatas (HEMA), poli(etilenglikol) metakrilatas (PEGMA, $M_n = 500$, vidutiniškai turi 10 etilenglikolio vienetų), metakrilinė rūgštis (MAA) (Sigma-Aldrich). $(\text{PEG})_3\text{NH}_2$ (Molecular Biosciences, Boulder, CO, JAV).

Jaučio serumo albuminas (BSA) (angl. *bovine serum albumins*) (Sigma-Aldrich), jaučio serumo albuminas žymėtas fluorescenciniu dažikliu Texas Red[®] (BSA-TR[®]; Invitrogen, Eugene, OR, JAV), medicininio grynumo kiaulės I tipo kolagenas (PC) (Nippon Ham, Japonija), rekombinantinis žmogaus III tipo kolagenas (RHCI) (FibroGen Inc., San Franciskas, CA), žmogaus kraujo fibronektinas (FN) (Yo Proteins AB, Hudingė, Švedija), pirminis polikloninis triušio FN antikūnas (Abcam, Kembridžas, JK), antrinis asilo antikūnas žymėtas kvantiniais taškais Qdot655 (H+L) prieš triušio pirminį IgG (Life Technologies, JAV).

Tween-20 (Laboratoriums Reagenzen); Triton X-100 (Sigma Aldrich); fetalinis veršiuko serumas (angl. *fetal bovine serum* (FBS)) (Biochrom); TrypLE Select Enzyme (1X), be fenolio raudono (ThermoFisher Scientific); Medium 106 terpė (ThermoFisher Scientific); LSGS (angl. *low serum growth supplement*) (ThermoFisher Scientific); DMEM terpė (ThermoFisher Scientific).

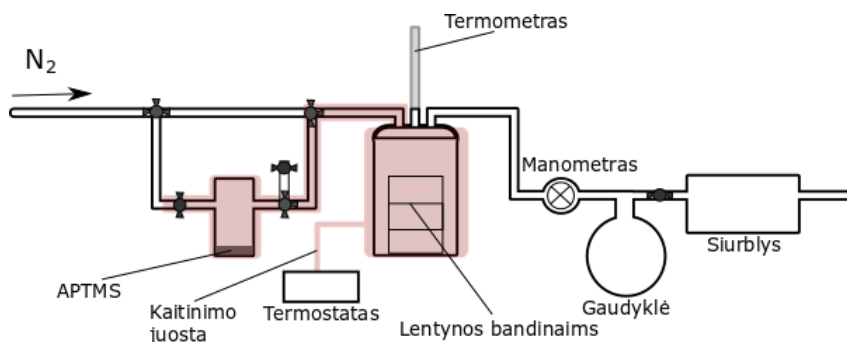
SYLGARD[®] 184 silikono elastomerų rinkinys (Dow Corning, JAV), dejonizuotas vanduo, $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^2$ (Synergy 185 UV, Millipore), 5,0 klasės azotas (Aga, Lietuva). Borosilikatiniai stikliukai $20 \times 20 \times 0,175 \text{ mm}^2$ (D263 TECO, AG Schott, Malaizija) buvo naudoti hidrogelių dangoms auginti. Vaizdinančios elipsometrijos matavimams naudoti komerciniai SiO_2 substratai (OptiSlide, $10 \times 10 \times 0,5 \text{ mm}$, Accurion GmbH, Vokietija) su jautrinančiu pasluoksniu, skirtu elipsometrijos matavimams.

2.2. Paviršių paruošimas ir cheminis modifikavimas

Borosilikatinio stiklo substratai, supjaustyti į $20 \times 20 \times 0,175 \text{ mm}^2$ bandinius (tekste taip pat – stikliukai), ir komerciniai vaizdinančios elipsometrijos Optislide substratai buvo purtomi etanolyje 1 min ultragarso vandens vonelėje ir išdžiovinti N_2 dujų srove. Toliau buvo valoma SC-1 tirpalu, (H_2O , 30 % H_2O_2 ir 25 % NH_4OH (5:1:1)), $85 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 10 min. Paskui bandiniai plaunami dejonizuotu vandeniu ir išdžiovinami N_2 dujų srove. Kitas žingsnis – bandinių paviršius buvo aktyvinamas deguonies plazma, naudojant 100 W energiją, 3 min (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausenas, Vokietija). Aktyvinti bandiniai buvo silanizuoti iš garų fazės funkcinium APTMS silanu savadarbiame aparate (30 pav.), kuris buvo surinktas pagal publikuotą schemą [182]. Silanizavimo procedūros seka:

1. Sistema prapučiama N_2 dujomis ir įjungiamas šildymas.
2. Bandiniai sudedami į silanizavimo indą ant lentynų.
3. Sistema užsandarinama, prapučiama N_2 dujomis ir vakuumuojama iki 50 mbar slėgio.
4. Sklendė uždaroma ties siurbliu ir atidaromos APTMS talpos sklendės, kad silanų garai patektų į silanizavimo indą. Laikas 20 min.
5. Uždaroma APTMS talpos sklendė ir į silanizavimo indą prileidžiama N_2 dujų. Sistema prapučiama N_2 dujomis, kad pašalintų silanų garų likučius iš sistemos.
6. Atidaromas silanizavimo indas ir išimami bandiniai.
7. Bandiniai kaitinimo krosnelėje kaitinami 2 val. $120 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

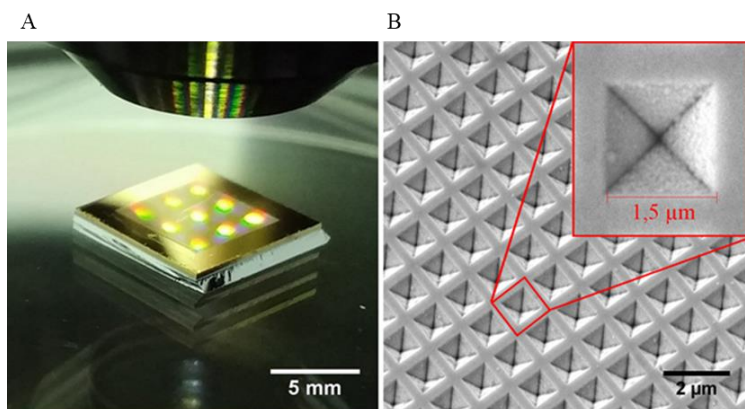
Silanizuoti bandiniai saugomi tamsoje $4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje nuo kelių dienų iki 6 mėnesių, nepraranda savo funkcinių savybių.



30 pav. Stiklinių substratų cheminio aktyvinimo silano junginiais dujinėje fazėje įrangos schema

2.3. Topografiniai šablonai, jų paruošimas

Šablonų gamyba buvo atlikta Linköpingo universitete, ISO 3 klasės švaros kambaryje. Pasirinkti raštai buvo projektuojami naudojant CleWin programą (WieWeb (www.wieweb.com)) 3 colių skersmens dydžio silicio lakštui. Pagal suprojektuotus raštus pagaminta fotolitografinė kaukė (naudojant litografijos mašiną (DWL66, Heidelberg Instruments). 4 colių skersmens silicio lakštas buvo valytas SC-1 10 min, plaunamas vandeniu, džiovinamas N₂ srove bei išdžiovinamas ant kaitlentės 110 °C temperatūroje, 15 min. Apie 3 ml SU-8 neigiamo fotorezisto (MicroChem Corp, JAV) buvo užpilama ant 4 colių silicio lakšto vidurio ir paskleidžiama sukant 500 apsukų/min, 15 s, 2000 apsukų/min, 15 s. Po dengimo silicio lakštas kaitintas ant kaitlentės 100 °C temperatūroje 4 min. Po kaitinimo vėsintas kambaryje mažiausiai 5 min. Fotorezistu padengtas lakštas per fotolitografinę kaukę apšviečiamas UV (356 ir 405 nm) šviesa (6mW/cm²) naudojant lygiavimo mašiną (Karl Süss, Vokietija) ir kaitinamas 100 °C temperatūroje 15 min. Paskutiniame žingsnyje struktūros išryškinamos naudojant SU-8 rezistui skirtą ryškumą (etilenoglikolio-monometileterio acetatą), dengtas ir apšviestas silicio diskas laikomas tirpale, kol išryškėja struktūros. Išryškintas šablonas galutinai sutvirtinamas kaitinant krosnelėje 120 °C temperatūroje 30 min.



31 pav. Nanotopografijų gamybai naudotas šablonas. A – auksu dengtas silicio paviršius su įdubusių tetraedrų struktūromis. B – šablono nuotrauka gauta skenuojančiu elektronų mikroskopu

Nanostruktūroms formuoti buvo pasirinktas auksu dengtas komercinis šablonas (Klarite®, Renishaw Diagnostics, Glasgow, United Kingdom) su įdubusiais tetraedrais (31 pav.), tetraedro kraštinė ~1,5 μm. Šablonų aukso

paviršius plautas SC-1 10 min bei pasyvintas hidrofobiniu HS-(CH₂)₁₁-O-(CH₂)₂-(CF₂)₅-CF₃ tioliu (ProChimia Surfaces, Sopot, Poland) 40 nM etanolio tirpale 24 val. Šablonai plauti etanolyje, išdžiovinti N₂ dujų srove.

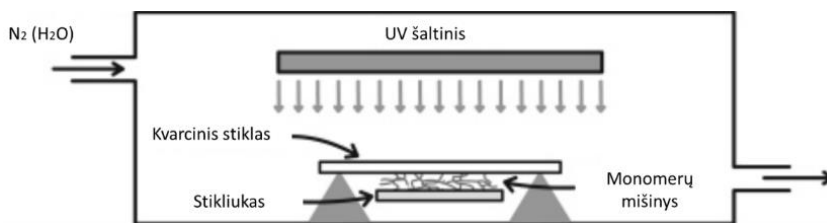
2.4. PDMS topografinės formos paruošimas

PDMS spaudai buvo ruošiami remiantis SYLGARD® 184 elastomero gamintojo aprašu. Sumaišoma elastomero bazė ir kietiklis santykiu 10:1, gautas mišinys degazuojamas vakuume, siekiant pašalinti susidariusius oro burbuliukus. Toliau skaidrus elastomero ir kietiklio mišinys užliejamas ant šablono ir kaitinamas krosnelėje 2 val. 65 °C temperatūroje, kol PDMS sustingsta. Sustingęs PDMS atsargiai nulupamas nuo šablono paviršiaus ir dedamas į plastikinę Petri lėkštelę struktūromis į viršų iki tolesnio naudojimo. PDMS spaudos kokybė įvertinama optiniu mikroskopu.

2.5. Poli(etilenglikol)metakrilato polimerizacija ant stiklinių substratų

APTMS silanizuoti stikliukai buvo plaunami vandeniu 20 s, ultragarso vonelėje ir džiovinami N₂ dujų srove. Tada ant silanizuoto paviršiaus dedamas lašas 5 % (m/m) glutraldehido (GA) tirpalo PBS 0,1 M buferyje, 20 x 20 mm stikliukui apie 1 ml tirpalo, ir laikoma 10 min paviršiaus amino cheminėms grupėms pakeisti į aldehido funkcines grupes. Monomerų HEMA, PEGMA ir MAA tirpalai buvo paruošti vandenyje 360 mM arba 240 mM koncentracijos. Monomerų tirpalai buvo sumaišyti maišykle (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, JAV) santykiu 1:1:1 (HEMA:PEGMA:MAA, HPMMA) ir 1:1 (HEMA:PEGMA, HP). Suminė monomerų koncentracija 360 mM arba 240 mM. Hidrogelių fotopolimerizacija vyko be iniciatorių kaip aprašyta literatūroje [35]. Trumpai lašas monomerų mišinio apie 2 μL/cm² dedamas ant silanizuoto ir / arba GA aktyvinto stikliuko, tada lašas paskleidžiamas ant stikliuko jį uždengiant UV laidžia kvarcine plokštele. Stikliuką po kvarcine plokštele laiko skysto monomerų mišinio sukuriama kapiliarinė jėga. Toks sumuštinis dedamas į dėžę, kur tiekiamos drėgnos N₂ dujos, neleidžiančios monomerų mišiniui išdžiūti ir oksiduotis (32 pav.). Fotopolimerizuojama 254 nm UV šviesa (TUV PL-S 11 W) 6 min (svarbu: būtini apsauginiai akiniai).

Hidrogelio gradientai [183] su 3, 6, 9, 12, 15 min UV šviesos apšvitos zonomis buvo gauti naudojant žingsninę sklendę, kurios judėjimo žingsnis yra 3 mm. Po UV apšvitos stikliukai su hidrogelio sluoksniu plaunami dejonizuoto vandens indelyje 1 min ultragarsinėje vonelėje, išdžiovinami N₂ dujų srove ir laikomi tamsoje 4 °C temperatūroje iki 6 mėnesių. Kontroliniuose eksperimentuose fotopolimerizacija pakartota praleidžiant atitinkamai APTMS silanizavimo, GA aktyvinimo žingsnius.



32 pav. Metakrilato hidrogelių sintezės ant kietų substratų schema, adaptuota iš [35]

Poli(etilenglikol)metakrilatinio hidrogelio fotopolimerizacija esant kontroliuojamam monomerų tirpalo pH buvo atliekama tokia seka: pirma išmatuota 240 mM HPMMA ir 240 mM HP monomerų tirpalų, paruoštų vandenyje, pH matuokliu pH-211 (Hanna instruments, Kanada), atitinkamai gautos pH vertės buvo 2,5 ir 6,0. Tada paruoštas naujas 240 mM HP monomerų tirpalas vandenyje ir jo pH pakoreguotas 3M HCl tirpalu nuo 6,0 iki 2,5. Visi kiti hidrogelio polimerizacijos žingsniai atlikti kaip aprašyta anksčiau.

2.6. Baltyminių hidrogelių formavimas

Rekombinantinio žmogaus kolageno III tipo su 2-metakriloksietilfosforilcholinu (RHCIII–MPC), I tipo kolageno su 2-metakriloksietilfosforilcholinu (PC–MPC) ir I tipo kolageno (PC) baltyminių hidrogelių gamyba aprašyta literatūroje [184]. Trumpai, 450–500 mg RHCIII ar PC tirpalo iš pasirinktos pradinio tirpalo koncentracijos (12, 13,7, 18 arba 20 % (m:m)) buvo sumaišyta su 150 μ l 0,625 M MES buferio naudojant dviejų švirkštų, sujungtų 90° kampu, sistemą, nuolat šaldant sistemą ledo ir vandens vonioje. Toliau 200 μ l MPC tirpalo 0,625 M MES buferyje buvo pridėta į maišymo sistemą. MPC:RHCIII (m:m) santykis buvo 1:4, 1:2 arba 1:1. PEGDA pridėta naudojant mikrošvirkštą (PEGDA:MPC (m:m) = 1:3). Apskaičiuoti tūriai 4 % (m/t) APS tirpalo MES buferyje ir 2 % (t/t) TEMED tirpalo MES buferyje buvo pridėta paeiliui (APS/MPC (m:m) = 0,015:1, APS:TEMED (m/m) 1:0,77). Išmaišius pridėdamas apskaičiuotas kiekis NHS (10 % (m/t) MES buferyje) ir EDC (5 % (m/t) MES buferyje) tirpalų ir kruopščiai išmaišoma esant apie 0 °C temperatūrai (EDC:RHCIII–NH₂ (mol:mol) = 0,3–1,5:1, EDC:NHS (mol:mol) = 1:1). Galutinai išmaišytas tirpalas kuo skubiau išliejamas į akies ragenos formos šabloną (12 mm skersmens, 500 μ m storio) arba tarp dviejų stiklo plokštelių su 500 μ m storio tarpine. Baltyminis hidrogelis paliekamas stingti 18 val., 100 % santykinėje drėgmėje, kambario temperatūroje. Išimti baltyminiai hidrogeliai plaunami 10 mM PBS tirpalu ir laikomi PBS buferyje su 1 % CH₃Cl

sterilumui užtikrinti. Ramano spektroskopijos ir mechaninių savybių AJM tyrimams naudoti PC (PC-12/EDC0,7) ir PC-MPC (PC-12/MPC(2/1)-EDC0,7) hidrogelis pagamintas iš 12 % pradinės PC tirpalo koncentracijos, o EDC:PC-NH₂ (mol:mol) santykis buvo = 0,7-1.

2.7. Baltyminių hidrogelių, naudojamų ragenos implantams, tyrimas

Visi matavimai atlikti tris kartus. Vandens kiekio nustatymas RHCIII-MPC hidrogeliuose buvo atliekamas, pasveriant nusausintus hidrogelio bandinius (W_0), tada jie toliau džiovinti vakuume kambario temperatūroje iki pastovaus svorio ir sveriami (W). Vandens kiekis hidrogelyje ($W_t\%$) apskaičiuotas pagal formulę:

$$W_t\% = (W_0 - W)/W_0 \times 100\%. \quad (14)$$

Optinės hidrogelių savybės įvertintos matuojant šviesos lūžio rodiklį, laidumą ir sklaidą. Matavimams naudotos 500 μm storio hidratuotos PBS buferiniame tirpale hidrogelio plėvelės. Lūžio rodiklis buvo matuojamas su Abbe refraktometru (Model C10, VEE GEE Scientific Inc., Washington, JAV). Matavimai atlikti esant 21 °C temperatūrai ir kalibruoti naudojant bromonaftaleną. Šviesos laidumas ir sklaida buvo matuoti esant 21 °C temperatūrai, pirmiau aprašytu instrumentu [185] su kvarcine halogenine lempa, naudojama kaip šviesos šaltinis. Procentinis šviesos laidumas per hidrogelį buvo palygintas su neuždengto šviesos spindulio intensyvumu. Kiekvieno bandinio šviesos sklaida (%) pamatuota ratu išdėliotais 8 fotodiodais, pakreiptais 30° kampu.

Mechaninės RHCIII-MPC hidrogelio lakštų savybės yra aprašomos šiais parametrais: tempiamuoju stipriu (jėga, reikalinga hidrogeliui perplėsti), standumo moduliui (matuotas tempiant) ir pailgėjimu iki nutrūkimo (santykinis hidrogelio pailgėjimas iki nutrūkimo). Šie parametrai buvo išmatuoti *Instron* mechaniniu universaliu prietaisu (Model 3342, Instron, Canton, MA), turinčiu 10 N svarelį ir *Instron Series IX/S* programinę įrangą. Matavimai atlikti kambario temperatūroje, matuoti plokšti hidrogelio lakštai (12 mm × 5 mm × 440 μm), hidrogelio matavimo ilgis 5 mm. Kryžminis greitis 10 mm/min ir signalo įrašymo dažnis 10 taškų/s.

RHCIII-MPC hidrogelių morfologijos palyginimas su žmogaus ragena (gauta iš ragenų donorų banko) ir su RCHIII hidrogeliu buvo atliktas skenuojančiu elektronų pluošto mikroskopu (SEM) (Model S-2250N, Hitachi, Japan). Visi bandiniai hidratuoti PBS buferiniame tirpale, buvo šaldyti per naktį -80 °C temperatūroje ir džiovinti vakuume esant -40 °C temperatūrai 7 val. Bandiniai džiovinimo metu nesubyrejo, bet susitraukė: žmogaus ragena apie 40 %, hidrogeliai apie 50 %. Bandiniai buvo perpjauti

skalpeliumi ir pritvirtinti dvipuse lipnia juosta prie padėklo, padengti auksu magnetroniniu metodu, 60 s esant 0,1 bar vakuumui (Cressington Sputter Coater 108) prieš apžiūrėjimą SEM.

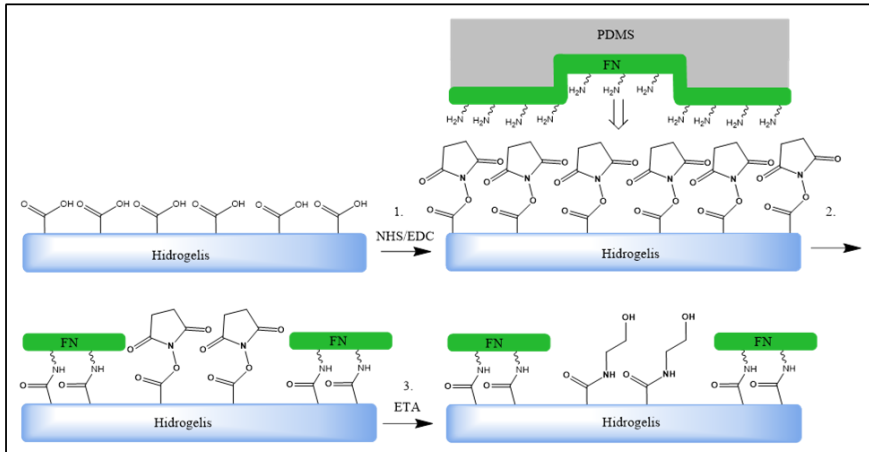
2.8. Fibronektino mikrostruktūrų formavimas ant HPMMA hidrogelio paviršiaus

Skalpeliumi išpjauamas 10 mm × 10 mm PDMS spaudas su topografijomis. Pavienėms ląstelėms ir ląstelių grupėms tirti parenkamas dvejetainis spaudos raštas, atitinkamai periodiškai išdėstytų paviršiuje $25,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ skersmens pavienių diskų ir $191,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$ pločio vientisų linijų raštai. Prieš spausdinimą PDMS spaudas kruopščiai plaunamas etanolyje, ultragarsinėje vonelėje 1 min, džiovinamas N_2 dujų srove ir tada veikiamas oro plazma (20 W, 30 s), kad PDMS polimero paviršius taptų hidrofiliškas ir naudojamas rašalo tirpalas tolygiai padengtų spaudos paviršių. Spaudai buvo dengiami 30 μl rašalo tirpalu (10 x 10 mm² dydžio spaudui), susidedančiu iš 0,1 mg/ml fibronektino (FN) ir 10 $\mu\text{g/ml}$ jaučio serumo fibronektino, žymėto HiLyte FluorTM 488 fluorescenciniu dažikliu 0,1 M PB buferiniame tirpale, pH 8,0. Eksperimentuose su ląstelėmis žymėtas fibronektinas nebuvo naudojamas, stengiantis išvengti jas žyminčių fluorescencinių dažų spektrinio persiklojimo. Po 10 min laikymo su rašalu nuo spaudos rašalo perteklius pašalinamas pipete, spaudas švelniai plaunamas vandeniu, įmerkiant visa spaudą į indelį su vandeniu. Toliau spaudas džiovinamas N_2 dujų srove apie 20 s, kol spaudos paviršius tampa vizualiai sausas.

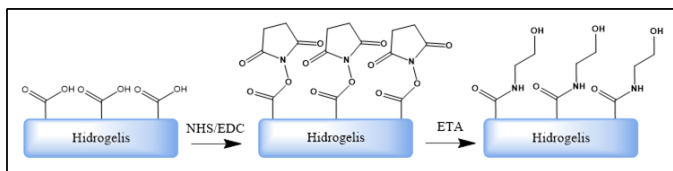
Rengiantis atlikti mikrokontaktinį antspaudavimą, karboksilo grupės, esančios HPMMA hidrogelyje, buvo chemiškai aktyvintos (33A (2) pav.) uždedant 1 ml tirpalo, susidedančio iš 10 mM EDC ir 2,5 mM NHS etanolyje, ant stikliuko su HPMMA danga ir laikoma 15 min. Paskui aktyvinti bandiniai plaunami 30 s etanolyje ir 10 s vandenyje, ultragarsinėje vonelėje ir džiovinami N_2 dujų srove. Tada stikliukas su NHS/EDC aktyvintu HPMMA hidrogeliu dedamas į Petri lėkštelę ir HPMMA paviršius spausdinamas prieš tai paruoštu spaudu (33A(2) pav.). Spausdinimas vykdomas rankiniu būdu, naudojant pincetus, be papildomo paspaudimo, tik naudojant silpną N_2 dujų srovę fiziniam sąlyčiui tarp spaudos ir substrato užtikrinti. Spaudas paliekamas 5 min, paskui nuimamas pincetais. Stikliukas su HPMMA danga ir spausdintomis fibronektino struktūromis laikomas 40 min blokavimo tirpale, susidedančiame iš 100 mM monoetanolamino 0,1 M PB buferijoje, pH 8,0, kad būtų blokuojami nesureagavę karboksil-NHS esteriai (33A(3) pav.). Tada bandiniai plaunami kelis kartus po 30 s keičiant vandenį ultragarsinėje vonelėje, džiovinami N_2 srove. Paruošti HPMMA hidrogeliai su FN struktūromis (biolustai) laikomi tamsoje 4 °C temperatūroje. Laikymo trukmė iki eksperimentų – nuo 1 dienos iki kelių mėnesių, jos įtakos nebuvo nustatyta. Kontroliniuose eksperimentuose

fibronectino mikrostruktūrų formavimas ant HPMAA hidrogelių paviršių buvo atliekamas analogiškai, tik praleistas NHS/EDC aktyvinimo žingsnis.

A



B



33 pav. Fibronectino mikrostruktūrų formavimo ant HPMAA hidrogelio schema su paviršiaus aktyvinimo NHS/EDC (1.), mikrokontaktinio antspaudavimo FN (2.), aktyvių grupių blokavimo ETA (3.) žingsniais (A). Kontroliniuose eksperimentuose buvo atliekami tik NHS/EDC aktyvinimo ir ETA blokavimo žingsniai (B)

2.9. Baltyminių mikrostruktūrų formavimas ant implanto paviršiaus

RHCIII-MPC hidrogelis pagamintas iš 18 % (m/m) RHCIII pradinio tirpalo, su RHCIII:MPC = 2:1 santykiu ir EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,4:1 susiuvimo laipsniu (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0.4), buvo antspauduotas fibronectino mikrostruktūromis. Lygūs hidrogelio lakštai supjaustyti skalpeliu 2 cm × 2 cm × 500 μm dydžio bandiniais, paskui plauti 0,1 M PBS, pH 5,7 buferiniu tirpalu ir jų paviršius džiovintas N₂ dujų srove prieš tolesnius žingsnius. Baltyminiame hidrogelyje esančio kolageno natūralios laisvos karboksilo grupės buvo aktyvintos įmerkiant bandinius į 2 ml PB buferio (pH 5,7) tirpalą, susidedantį iš 10 mM EDC ir 2,5 mM

NHS, 15 min. Bandiniai toliau po 30 s plauti švariose PB (pH 5,7) ir PB (pH 8,0) buferiuose ir džiovinti N₂ srove prieš pat spausdinimą.

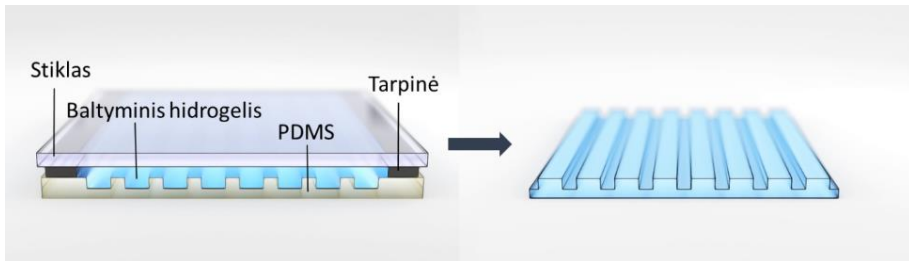
Išpjaunamas 1,5 cm × 1,5 cm PDMS spaudas su 26,8 ± 0,5 μm pločio nutrūkstamomis linijomis, atskirtomis 60 μm pločio tarpais arba 190,6 ± 1,7 μm pločio ištisomis linijomis, atskirtomis 200 μm pločio tarpais. Plonesnės linijos buvo naudojamos, norint stebėti pavienių žmogaus ragenos epitelio ląstelių plėtimąsi ir proliferaciją, platesnės linijos pasirinktos ląstelių kolonijos plėtimuisi stebėti. PDMS spaudas kruopščiai plaunamas etanolyje, ultragarsinėje vonelėje 1 min, džiovinamas N₂ dujų srove ir tada veikiamas oro plazma (20 W, 60 s), kad PDMS polimero paviršius taptų hidrofilinis. Spaudai buvo dengiami 30 μl rašalo tirpalu (10 x 10 mm² dydžio spaudui), susidedančiu iš 0,5 mg/ml fibronektino (FN) su 2 μg/ml jaučio serumo albuminu, žymėtu fluorescenciniu dažikliu (BSA-TR[®]) priemaiša struktūroms vizualizuoti, 0,1 M PB buferyje, pH 8,0. Ląstelių kultūrų eksperimentuose BSA-TR[®] nenaudotas dėl nenorimų BSA-TR[®] ir ląstelių sąveikų bei persiklojančių fluorescencinių signalų. Po 10 min spaudas plaunamas švariame vandenyje 20 s ir džiovinamas 1 min N₂ dujų srove.

Mikroantspaudavimas buvo atliekamas panašiai kaip pavaizduota (32A pav.), bet blokuoti naudotas PEG₃NH₂ vietoj ETA. Trumpai aktyvinti RHCIII-MPC bandiniai buvo dedami į Petri lėkšteles ir tada jų viršutinis paviršius atsargiai džiovinamas N₂ srove prieš pat spausdinimą, bet vienas bandinio kampas paliekamas sąlytyje su vandens lašu, skirtu apsaugoti bandinį nuo džiūvimo. Bandinio paviršius spausdinamas dedant prieš tai paruoštą spaudą su pincetais, be papildomos prispaudimo jėgos. Spaudas ir bandinys susilietę laikomi 5 min, po to spaudas atsargiai nuimamas ir ant bandinio užpilama 2 ml 10 mM (PEG)₃NH₂ PB buferyje, pH 8,0 blokavimo tirpalo, laikoma 40 min, siekiant blokuoti likusias nesureagavusias karboksil-NHS esterių grupes. Toliau bandiniai plaunami keletą kartų šviežiu PBS buferiniu tirpalu, pH 7,3, ir laikomi PBS buferyje iki tolesnio naudojimo.

2.10. Baltyminių hidrogelių 3D struktūrų formavimas

Baltyminių hidrogelių gamybos principas aprašytas 2.6 skyriuje. Baltyminių hidrogelių 3D struktūroms formuoti pasirinktas PC-MPC hidrogelis, pagamintas iš 12 % pradinės tirpalo koncentracijos kiaulės kolageno tirpalo (PC 12 %), su PC:MPC = 2:1 santykiu ir EDC:PC-NH₂ (mol:mol) = 0,7:1 susiuvimo laipsniu (PC-12/MPC(2/1)-EDC0,7). Hidrogelis buvo liejamas ant paruošto PDMS šablono su 30, 60, 200 μm grioveliais arba ant nanostruktūrų šablono (Klarite[®], Renishaw Diagnostics, Glasgas, JK), iš viršaus prispaudžiamas stikliuku (34 pav.). Papildomai auksu dengtas silicio nanostruktūrų šablonas buvo modifikuojamas HS-(CH₂)₁₁-O-(CH₂)₂-(CF₂)₅-CF₃ SM (ProChimia Surfaces, Sopot, Poland)

sluoksniu, kad būtų gautas vandenį atstumiantis paviršius. Tarp stikliuko ir formos įdedama tarpinė, kuria galima reguliuoti hidrogelio storį. Standartiškai storis buvo apie 500 μm. Atliekant baltyminių hidrogelių su nanometrinėmis smailėmis topografija, hidrogelis lietas tiesiai ant nanostruktūrų šablono, o nanoduobučių – hidrogelis lietas į PDMS šablona, atlietą nuo nanostruktūrų formos. Praėjus 24 val. hidrogelis atsargiai išimtas iš formos ir sukarpytas 6 mm skersmens diskais. Diskeliai buvo saugomi PBS, pH 7,3, buferyje. Vėliau eksperimentams su ląstelėmis pincetais sudedami į plokšteles su šulinėliais.



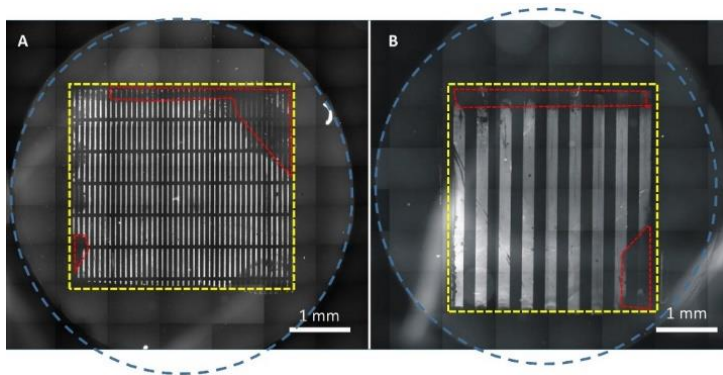
34 pav. Principinė mikrotopografijų ant hidrogelio formavimo schema

2.11. Suformuotų struktūrų tyrimas mikroskopu

Tyrimams naudoti įvairūs fluorescenciniai mikroskopai atsižvelgiant į bandinio tipą. Mikroskopas *Olympus BX51* (Olympus, Tokijas, Japonija) buvo su 10×, 40×, 100× NA 0,3 vandens imersiniais objektyvais ir *Peltier* elementu šaldoma *Fview II CCD* kamera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Miunsteris, Vokietija). Vaizdai registruoti ir analizuoti *analySIS* programine įranga (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Miunsteris, Vokietija). Invertuotas mikroskopas *Olympus IX81* (Olympus, Tokijas, Japonija) skaitmeninė kamera (*U-CMAD3*, *Olympus*), 10×, 40× oriniais objektyvais.

Fibronektino struktūrų kokybė įvertinta rankiniu būdu, analizuojant antspauduotų vietų sujungtas fluorescencines nuotraukas. Skaičiuoti plotai su kokybiškais struktūromis (atitinka reikiamus dydžius, tolygus baltymo pasiskirstymas), visas antspauduotas plotas ir fibronektino struktūrų neturinčios vietos, vietos, kur struktūros nekokybiškos. Fibronektino struktūrų kokybė rodo gerų struktūrų ploto ir viso antspauduoto ploto santykį (35 pav.):

$$W = \text{geros struktūros} / \text{visas antspauduotas plotas} * 100\% \quad (15)$$

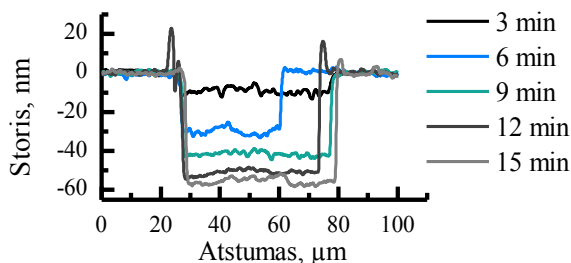


35 pav. Sujungtos fluorescencinės fibronektino struktūrų ant baltyminio hidrogelio nuotraukos, A – 30 μm , B – 200 μm pločio linijos. Mėlynu punktyru pažymėtas viso bandinio plotas, geltonu – visas antspaudootas plotas, raudonu – vietos su tyrimui netinkamomis struktūromis

Baltyminių hidrogelių 3D struktūrų dydžio vertinimas buvo atliktas matuojant struktūrų dydį nuotraukose ir lyginant jas su PDMS šablono dydžiais. Kiekvienos struktūros įvertinto dydžio matavimų skaičius $N = 100$. Prieš analizę mikroskopas kalibruotas naudojant gamintojo kalibracinę liniuotę.

2.12. Hidrogelio storio matavimai

HPMAA ir HP hidrogelių, susintetintų ant stiklo bandinių, ir OptiSlide substratų storio matavimai buvo atliekami adatiniu profilometru (Dektak 150, Veeco, JAV) matuojant ore, naudojant 5 μm spindulio aštrumo adatą, 3 mg spaudimo jėgą ir 0,044 μm skyrą (36 pav.). Prieš matavimą bandiniai su hidrogelių danga buvo švelniai įrėžti, nubraukiant hidrogelio dangą pincetų galiukais, taip padarant 3–6 skirtingas linijas per visą stikliuko ilgį, per 15, 12, 9, 6 ir 3 min UV apšvitos laiko zonas. Tada bandiniai plaunami vandenyje 20 s ultragarsinėje vonelėje, siekiant pašalinti pažeisto hidrogelio likučius, džiovinama N_2 dujų srove. Trys matavimai daromi kiekvienai UV apšvitos laiko zonai. Pamatuota po tris bandinius iš keturių skirtingų partijų.



36 pav. Adatinių profilometru registruotų topografijos profilio kreivių pavyzdys, rodomi 360 mM HPMMA hidrogelio dangos ant stiklo storiai, gauti esant skirtingam UV apšvitos laikui.

2.13. Paviršių nanoskopinės topografijos ir jėgos spektroskopijos tyrimai

Standartinio (360 mM, 6 min UV) HPMMA hidrogelio ant stiklo paviršiaus topografijos ir brinkimo matavimai buvo atliekami NanoWizard® 3 (JPK Instruments AG, Berlynas, Vokietija) AJM, sumontuoti ant *Olympus IX81* (Olympus, Tokijas, Japonija) invertuoto optinio mikroskopo. Naudoti CSC21/Si3N4/AIBS (gamintojo deklaruojamas standumas $2,0 \text{ Nm}^{-1}$, MikroMasch, Talinas, Estija) arba Multi75GD-G (gamintojo deklaruojamas spyruoklės konstanta $3,0 \text{ Nm}^{-1}$, BudgetSensors, Sofija, Bulgarija) AJM zondai, kreivumo spindulys $<10 \text{ nm}$. Bandiniai buvo įtvirtinti į ECCell™ (JPK Instruments AG, Berlynas, Vokietija) skysčio ceļę su pratekėjimo kanalais. Bufėris ar kiti tirpalai buvo pumpuojami peristaltiniu siurbliu (Ismatec, Wertheimas, Vokietija) apytiksliai 1 ml min^{-1} tėkmės greičiu. AJM matavimai ore buvo atliekami periodinio kontakto režimu. Matavimams skystyje naudotas jėgos kreivių spektroskopijos režimas. Matuojant šiuo režimu jėgos spektroskopijos kreivės yra registruojamos kiekviename AJM nuotraukos taške. Vėliau šios kreivės apdorojamos ir randami du aukščio taškai – reikiamos spaudimo jėgos aukštis (angl. *setpoint height*) ir zondo kontakto aukštis (angl. *contact point height*). Reikiama spaudimo jėga (tai yra tikroji, išmatuota adatos spaudimo jėga) mūsų eksperimentuose pasirinkta 11 nN ir naudojamos artėjimo prie paviršiaus jėgos kreivių dalys. Kontakto aukštis taip pat nustatomas iš artėjimo prie paviršiaus jėgos kreivių dalių, nustatant aukštį, ties kuriuo yra pradedamos registruoti zondą atstumiančios sąveikos. Šie duomenys vėliau sujungiami į bendrą AJM nuotrauką. Zondo jautrumas nustatomas / kalibruojamas kiekvienam zondui atskirai matuojant jėgos ir atstumo kreivę ant kieto (stiklo) paviršiaus. Zondo strypelio spyruoklės konstanta buvo apskaičiuota iš jo terminio spektro osciliacijų naudojant standartinę AJM programinę įrangą.

Matuojant FN struktūras ant HPMMA hidrogelio paviršiaus, AJM matavimai buvo atlikti bandinius visiškai panardinus 0,1 M PBS buferyje, pH 7,3.

Tiriant mikrokontaktinio antspaudavimo įtaką mikro- ir nanotopografijai visiškai hidratuotiems baltyminiams RCHIII-MPC hidrogeliams, AJM matavimai atlikti tuo pačiu NanoWizard® 3 AJM, sumontuotu ant invertuoto *Olympus IX81* mikroskopo, bandiniams esant PBS 0,1 M buferyje, pH 7,3. Bandinių topografija skenuota kontaktiniu režimu naudojant SNL-10 (Bruker, Billerica, MA, JAV) zondus. Paviršiaus plotai AJM analizei buvo pasirenkami naudojant fluorescencinę mikroskopiją, įtraukiant antspauduotus ir neantspauduotus plotus į vieną skenavimo lauką (70 x 70 μm^2).

Kolageno hidrogelio topografijų matavimai atlikti NanoWizard® 3 (JPK Instruments AG, Berlynas, Vokietija) AJM PBS pH = 7,4 buferiniame tirpale, naudojant jėgos kreivių spektroskopijos matavimo režimą. Naudoti HQ:NSC35 AJM zondai (Mikromasch, Sofija, Bulgarija).

Visų AJM nuotraukų apdorojimas ir struktūrų dydžio, šiurkštumo skaičiavimai atlikti JPK duomenų apdorojimo programa (JPK Instruments AG, Berlynas, Vokietija).

2.14. Hidrogelio brinkimo laipsnio matavimai

Standartinio HPMMA hidrogelio bandinių storio matavimai esant skirtingiems buferio pH buvo atliekami NanoWizard® 3 AJM. Prieš matavimą bandiniai su hidrogelių dangą švelniai įrėžti pincetų galiukais, nubraukiant hidrogelių dangą ir paskui plaunami vandenyje 20 s purtant ultragarsinėje vonelėje, pašalinant pažeisto hidrogelio likučius, tada džiovinami N_2 dujų srove. Bandiniai įtvirtinti ECCell™ skysčio celėje su pratekėjimo kanalais. Bandiniai visiškai panardinti žinomo pH buferyje, apie 1,3 ml. Prieš pakeičiant buferius, bandinys ir celė 10 min plauti vandeniui (apie 7 ml vandens). Tirpalai ir buferiai buvo pumpuojami peristaltiniu siurbliu. Bandinys naujame buferyje prieš kiekvieną matavimą laikomas 20 min. HPMMA hidrogelio brinkimas esant skirtingiems buferių pH matuojamas naudojant 0,1 M pH 4,5, pH 5,0 acetato ir 0,1 M pH 6,0, 7,0, 8,0 PB buferius. Pirmiau buvo matuotas neaktyvintų HPMMA hidrogelių storis visuose buferiuose, tada bandiniai buvo džiovinami, aktyvinami NHS/EDC ir blokuojami ETA tirpalu laikantis mikrokontaktinio antspaudavimo proceso sąlygų ir tirpalų koncentracijos. Paskui bandiniai matuoti tokiomis pačiomis sąlygomis su žinomo pH buferiniais tirpalais. Hidrogelio brinkimo laipsnis (S_r) HPMMA dangai įvertintas naudojant formulę:

$$S_r = (h_h - h_s)/h_h \quad (16)$$

Čia h_h – hidratuoto, h_s – sauso hidrogelio storis. Buvo tirti keturi skirtingi bandiniai iš keturių skirtingų partijų.

2.15. Elipsometrinis hidrogelio storio ir biolustų topografijos tyrimas

Organinių sluoksnių storio matavimai ant *OptiSlide* plokštelių buvo atliekami vaizdinančiu nuliniu elipsometru (Nanofilm_ep3, Accurion GmbH, Goettingen, Vokietija) naudojant 658 nm bangos ilgio lazerį ir 10× didinimo objektyvą. Matavimai atlikti esant 60° šviesos kritimo kampui, nebent parašyta kitaip. Storio modeliavimas buvo vykdomas su Nanofilm_ep4 Model programine įranga (Accurion GmbH, Goettingen, Vokietija). Naudotas keturių sluoksnių modelis. *OptiSlide* plokštelių sluoksnių lūžio rodikliai paimti iš gamintojo duomenų bazės. Realūs pagrindo plokštelės sluoksnių storiai buvo sumodeliuoti iš šviesos kritimo kampo spektro, išmatuoto ant šviežiai nuplautos *OptiSlide* plokštelės. HPMMA hidrogelio ir / ar baltymų sluoksnio ore lūžio rodikliai buvo pasirinkti $n = 1,5$ ir $k = 0$.

Organinio sluoksnio storio padidėjimas pamatuotas elipsometriškai po kiekvieno hidrogelio gamybos žingsnio – švaraus stiklo, APMTS silanizavimo, GA prijungimo ir HPMMA hidrogelio. Storis kiekviename bandinyje buvo matuojamas 6 skirtingose pozicijose perstumiant tarp pozicijų motorizuotu staliuku pagal iš anksto suprogramuotą trajektoriją ir tada apskaičiuojamas storio vidurkis. Matavimų statistikai surinkti buvo matuojama po keturis bandinius iš trijų skirtingų partijų (iš viso 12 bandinių).

HPMAA hidrogelio bandiniai su mikrokontaktiniu antspaudavimu gautomis FN struktūromis buvo matuoti vykdant elipsometrinio dydžio Δ matavimą visame regėjimo lauke ir skaičiuojant sluoksnių storio žemėlapi naudojant minėtą modelį, laikant dydį Ψ konstanta.

2.16. Biolusto stabilumo tyrimas elipsometru

Fibronektino struktūrų stabilumas ir nespecifinis baltymų kibimas prie HPMMA hidrogelio dangos buvo tirtas vaizdinančiu elipsometru (Accurion GmbH, Giotingenas, Vokietija), matuojant bandinio parametrų kitimą per tam tikrą laiką – kinetiką. Bandiniai sumontuoti į kinetikų registravimo SPR (angl. *Surface plasmon resonance*) celę su 60° BK7 prizme (Accurion GmbH, Giotingenas, Vokietija).

Matavimai atlikti esant 56° spindulio kritimo kampui. Tirpalams ir plauti naudotas 0,1 M pH = 7,3 PB buferinis tirpalas, tekėjimo greitis 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Norint įvertinti hidrogelio brinkimo laipsnį, matuoti šviesos kritimo kampo spektrai. Hidrogelio sluoksnio storis, įskaitant brinkimą, buvo modeliuojamas naudojant Bruggemann efektyvios terpės artinį. Geriausia išmatuotų ir

sumodeliuotų parametų atitiktis buvo pasiekta esant 0,69 buferio daliai, ir šis dydis buvo laikomas pastoviu tolesniems modeliavimams tirpale. Kinetiniams matavimams signalas registruotas iš pasirinktų bandinio zonų (ROI – angl. *region of interest*), kurias sudarė fibronektino mikrostruktūros ir fibronektinu neantspauduotos (blokuotos) zonos. Duomenys buvo registruojami 30 s intervalu. Per pirmas 3 val. matuojamas sistemos stabilumas leidžiant tik PB 0,1 M buferinį tirpalą. Nespecifiniam baltymų prisijungimui vertinti į sistemą 30 min leista BSA 0,5 mg/ml ir 30 min FN 50 µg/ml tirpalai 0,1 M PB pH = 7,3 buferiniame tirpale, įterpiant 30 min plovimą buferiniu tirpalu.

Vertinant temperatūros poveikį vaizdinančios elipsometrijos matavimams, buvo atliekamas matavimas ant švaraus SC-1 plovimo procedūra plauto *OptiSlide* paviršiaus naudojant tą pačią aparatūrą ir tuos pačius nustatymus, kaip ir hidrogelio dangos tyrimams. Buvo naudojamas 0,1 M PB, pH 7,3 buferinis tirpalas, tėkmės celėje greitis buvo 30 µl/min. Duomenys Δ buvo renkami kas 30 s ir kas 20 min keliant temperatūrą nuo 20 °C iki 30 °C po 1 °C. Nuo 320 min temperatūros valdiklis išjungtas ir matavimas tęstas kambario temperatūroje.

2.17. Paviršiaus drėkinimo kampo matavimai

Stikliukai su standartine HPMAA danga buvo plauti vandenyje ultragarsinėje vonelėje 1 min ir džiovinami N₂ dujų srove prieš pat matavimą. Paviršiaus drėkinimo kampo matavimai buvo atliekami lašo formos analizatoriumi Drop Shape DSA25 (KRÜSS GmbH, Hamburgas, Vokietija) su Advance 1.5.1.0 programine įranga. Vandens lašas, 2–5 µL tūrio, buvo padedamas ant bandinio paviršiaus. Vandens lašo forma buvo registruojama iškart padėjus lašą ir po 2 min, kai ji tapo nusistovėjusi. Gauti duomenys analizuoti naudojant Young-Laplace metodą. Išmatuota skirtingos trys partijos bandinių po keturis bandinius kiekviena, iš viso 12 bandinių.

2.18. Ramano spektrometrijos matavimai

Hidrogelių matavimams naudota savadarbė celė. Jos pagrindą sudaro išpjauta iš Si disko stačiakampė plokštelė (2 cm x 2 cm²), padengta 2 (3) nm Ti sluoksniu, ant kurio buvo 200 nm storio Au sluoksnis. Palei pagrindo perimetrą dedamas 1,5–2 mm storio plastilinas (jo sluoksnio aukštis didesnis už hidrogelio disko aukštį (500 µm)). Jis naudojamas kaip tarpinė. Ant plastilino tarpinės prispaudžiamas kvarcinio stiklo langelis (skersmuo 2,45 cm, storis 1 mm). Į surinktos celės centrą, pakėlus kvarcinio stiklo langelį – dangtelį, dedamas baltymino PC arba PC-MPC hidrogelio diskas taip, kad jis nesiliestų su tarpine (plastilinu) ir kvarciniu dangteliu. Tokia celė apsaugo nuo hidrogelio disko išsausėjimo, dėl kurio jis galėtų

deformuotis ir dėl to pasunkėtų Ramano sklaidos registracija. Ramano sklaidos spektrai registruojami Echelle tipo spektrometru *RamanFlex 400* (Perkin Elmer Inc., JAV) su Peltjė elementu šaldomu ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) CCD detektoriumi. Lazeris generuoja 785 nm bangos ilgio šviesą. Ramano sklaidai sužadinti ir surinkti naudojamas šviesolaidinis kabelis. Eksperimentai atlikti su 180° geometrija. Lazerinės spinduliuotės galia 50 mW. Spindulys fokusuojamas ant bandinio paviršiaus į 200 μm skersmens apskritimą. Kadangi hidrogelio diskai pakankamai skaidrūs, galimas ir tūrinis Ramano sklaidos indėlis. Ramano spektrų bangos skaičius kalibruojamas pagal polistireno plėvelės standarto (ASTM E 1840) Ramano spektrą. Spektrų ir fono kaupimo laikas yra 300 s. Bendra vieno hidrogelio disko Ramano sklaidos spektro rašymo trukmė apie 12 min. Ramano spektrai analizuojami naudojant Grams /AI 8,0 (Thermo Scientific Inc., JAV) programinę įrangą. Spektrai dalijami iš kaupimo laiko, brėžiama bazinė linija ir spektrai padalijami į tolimą ir artimą sritis. Iš kiekvieno spektro atimamas kvarcinio langelio spektras. Ramano sklaidos virpesių juostų dažniai gaunami aprašant spektrus Lorenz-Gauge komponentėmis. Matavimai buvo atliekami tokiu eiliškumu: visų pirma įjungiamas Ramano spektrometras ir paleidžiama įdiegta programinė įranga (po 20 min galima matuoti). Prieš pradėdant Ramano sklaidos matavimą, kvarcinis langelis valomas rifliuotu, tampriu popieriniu rankšluosčiu. Taip pašalinama dauguma nešvarumų, esančių ant langelio paviršiaus. Tada kvarcinis langelis dedamas į plastikinį mėgintuvėlį su etanolio ir vandens (1:1 pagal tūrį) tirpalu ir apie 10 min veikiamas ultragarsu. Ištrauktas kvarcinis langelis nuplaunamas grynu etanoliumi (apie 96 %) ir nusausinamas N_2 dujomis. Surenkama pirmiau aprašyta savadarbė celė, nuimamas kvarcinis dangtelis ir ištraukiamas hidrogelio diskas iš tirpalo, kuriame jis laikomas. Hidrogelio diskas dedamas į celės centrą ant Au paviršiaus ir uždengiamas kvarciniu langeliu. Surinkta celė dedama ant stalo. Iš viršaus pritvirtinamas Ramano spektrometro šviesolaidis specialiaje laikiklyje, kuris leidžia reguliuoti pastarojo padėtį Z ašimi (pakelti arba nuleisti). Atstumas nuo bandinio iki šviesolaidžio turi būti apie 7 mm (darbinis fokuso atstumas). Paleidžiamas RamanFlex 400 spektrometro Ramano spektro registravimas realiaame laike ir fokusuojamas lazerio spindulys į mėginį pagal hidrogelio disko spektrinių juostų padidėjimą. Programinėje įrangoje nurodomi matavimo parametrai (nurodyti prie prietaiso aprašymo: galia, kaupimo laikas), išjungiamas laboratorijos šviesa ir paleidžiamas Ramano sklaidos spektro registravimas. Užregistravus hidrogelio disko Ramano sklaidos spektrą, diskas išimamas iš celės, padedamas atgal į jo indelį. Au paviršius nusausinamas popieriniu rankšluosčiu ir tinka kitam mėginiui matuoti.

2.19. Baltyminių hidrogelių elastomechaninių savybių matavimas AJM

Hidrogelio elastingumo matavimai buvo atliekami AJM pagal literatūroje aprašytą metodiką [186][187]. 500 μm storio ir 0,3 x 0,5 mm dydžio PC-MPC ir PC hidrogelio bandiniai buvo tvirtinami ant APTMS silanizuoto ir GA aktyvinto stikliuko paviršiaus. APTMS dengtas stikliukas laikomas 5 % GA PB 0,1 M pH = 8,0 tirpale 15 min. Paskui stikliukas plaunamas vandeniu ir džiovinamas N_2 dujų srove. Hidrogelio bandiniai nusausinami ir dedami ant stikliuko, paskui ant jų užpilamas PBS buferinis tirpalas, pH = 7,3. Bandiniai matuojami NanoWizard® 3 AJM su specialiu zondų, kurio strypelių (NSC36-B, MicroMasch, Sofija, Bulgarija) be adatų spyruoklės konstantos buvo kalibruotos naudojant terminio triukšmo metodą [188], tada UV klizais (NOA68, Norland, Kranburis, JAV) priklijuojamos silicio dioksido $6,65 \pm 0,15 \mu\text{m}$ skersmens sferos (Microparticles GmbH, Vokietija). Stikliukas su hidrogelio bandiniais montuojamas po AJM mikroskopu, įdedant į Petri lėkštutę ir užpilant PBS pH = 7,3 buferiniu tirpalu. Matavimo zondas nuleidžiamas ant stiklo ir nustatomas detekcijos jautris iš spaudimo jėgos ir zondo strypelio atsilenkimo. Įprastai detekcijos jautris kito 10–20 nm/V. Matuojant hidrogelių standumo (Jungo) modulį, duomenys buvo gaunami skenuojant 50 x 50 μm plotą, registruojant 1024 jėgų kreives, naudojant Quantitative Imaging™ (JPK) režimą. Nustatyta zondo spaudimo jėga buvo 120 nN ir spaudimo greitis 50 $\mu\text{m/s}$. Kiekvienam bandiniui pamatuotos 4 skirtingos zonos. Bandinių elastingumas įvertinamas aproksimuojant gautas jėgų kreives taikant Hertzo sferos ir plokštumos elastingo kontakto modelį, naudojant JPK programinę įrangą.

2.20. Ląstelių kultivavimas

Visų ląstelių eksperimentų metu ląstelės buvo auginamos Binder C150 (Tuttingenas, Vokietija) inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje esant 5 % CO_2 dujų koncentracijai. Žmogaus ragenos epitelio ląstelės (HCEC, angl. *Human corneal epithelial cells*) augintos beseruminėje keratinocitų terpėje (SFM, Gibco®, ThermoFisher Scientific), kuri savo sudėtyje turi 30 $\mu\text{g/ml}$ jaučio hipofizės ekstrakto, 5 ng/ml epidermio augimo faktoriaus ir 0,1 mg/ml streptomicino/penicilino. Žaliai fluorescuojantys žmogaus odos fibroblastai – HDF-GFP (angl. *human foreskin dermal fibroblasts*, ląstelių linija Bj-5ta-GFP) ir ne fluorescuojantys žmogaus odos fibroblastai – HF (angl. *human foreskin fibroblasts*) buvo auginami Medium 106 (ThermoFisher Scientific) terpėje kartu su LSGS priedu (angl. *Low Serum Growth Supplement*) bei 0,1 mg/ml streptomicino/penicilino mišiniu. Jei neparašyta kitaip, kultūros eksperimento pabaigoje ląstelės fiksuotos 4 %

paraformaldehido ir PBS 10 mM, pH 7,3, tirpalu 10 min, plautos tris kartus PBS buferiniu tirpalu ir patikrintos optiniu mikroskopu.

2.20.1. Ląstelių auginimas ant HPMAA paviršių su FN struktūromis

Pavienėms ląstelėms skirti biolustai (26 µm skersmens FN disko formos struktūros ant HPMAA hidrogelio dangos ant stiklo) buvo dedami į ląstelėms auginti skirtas lėkštutes (d = 40mm, TPP, Trasadingenas, Šveicarija) ir ant bandinių užsėta 5 000 žmogaus ragenos ląstelių. Bandiniai su ląstelėmis po 4 val. auginimo buvo fiksuojami. Norint padidinti ląstelių membranos laidumą, bandiniai 5 min buvo inkubuojami 0,1 % Triton X-100 PBS tirpalu. Tada mėginiai 30 min inkubuoti 1 % BSA tirpalu PBS buferyje siekiant sumažinti nespecifinį jungimąsi. Ląstelių citoskeleto baltymo aktino tinklas buvo dažomas Texas Red-X Phalloidin (ThermoFisher Scientific) dažikliu (20 min), po to bandiniai plauti PBS buferiu du kartus. Ląstelių branduoliai buvo dažyti SYTO® 9 (0,1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific) 10 min.

Biolustai (191 µm pločio FN linijų struktūros ant HPMAA hidrogelio), skirti ilgesniam ląstelių kultivavimui, buvo apsėti su maždaug 40 000 žaliai fluorescuojančių žmogaus ragenos epitelio ląstelių (GFP-HCEC). Ląstelės augintos 96 val. (4 dienas), paskui bandiniai nuplauti ir dažyti gyvoms/negyvoms ląstelėms žymėti skirtu 0,2 % Trypan blue tirpalu (Sigma-Aldrich, Steinheimas, Vokietija) 15 min, tada vėl plauti ir fiksuoti. Fiksuoti bandiniai (trys partijos po keturis bandinius) apžiūrėti mikroskopu, registruotos šviesinės ir fluorescencinės viso bandinio ploto nuotraukos. Fluorescuojančios ląstelės gyvos (žalios fluorescencinėse nuotraukose) ir negyvos ląstelės (mėlynos – šviesinėse nuotraukose, raudonos – fluorescencinėse nuotraukose), buvo suskaičiuotos rankiniu būdu naudojant *Zen lite* (Carl Zeiss, Oberkochenas, Vokietija) programinę įrangą. Buvo skaičiuojama 0,1 mm² dydžio plotuose, penkiuose skirtinguose regionuose kiekviename bandinyje. Ląstelių gyvybingumas apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Ląstelių gyvybingumas} = \text{gyvos ląstelės} / \text{visos ląstelės} * 100 \%. \quad (17)$$

Ląstelės augo ir todėl skaičiuotos tik ant FN linijų (ant HPMAA hidrogelio ląstelės neauga).

2.20.2. Ląstelių kultūros ant baltyminių hidrogelių

Naudoti baltyminio hidrogelio diskai (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0.4) buvo 15 mm skersmens ir 500 µm storio su FN 30 ir 200 µm linijų struktūromis. Jie ir kontroliniai bandiniai – chemiškai blokuoti ir

nemodifikuoti hidrogeliai – buvo įdėti į 24 šulinėlių lėkštutes, skirtas ląstelėms auginti. Žmogaus ragenos epitelio ląstelės buvo užsėtos ant bandinių po 20 000 ląstelių į kiekvieną šulinėlį. Ląstelės augintos 48 val. Ląstelių gyvybingumas nustatytas naudojant gyvų/negyvų ląstelių dažymo rinkinį (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, JK), kur ląstelės buvo dvigubai dažomos kalceino acetoksimetilo esteriu (Calcein AM) ir etidžio homodimero-1 (EthD-1) dažais. Bandiniai apžiūrimi fluorescenciniu mikroskopu, daromos nuotraukos. Gyvos ląstelės fluorescuoja žalia, negyvos – raudona spalva.

Ląstelių proliferacijai stebėti ant 6 mm skersmens ir 500 μm storio hidrogelio (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0.4) su FN 30 ir 200 μm linijų struktūromis, blokuotų ir nemodifikuotų diskų, sudėtų 96 šulinėlių lėkštelės šulinėliuose, buvo užsėta po 5 000 GFP-HCEC ląstelių. Papildomai kontrolei GFP-HCEC ląstelės sėtos ir į tuščius šulinėlius. Fluorescencinės nuotraukos darytos praėjus 2, 6, 24, 48 ir 96 val. nuo užsėjimo momento (Mikroskopas – AxioVert A1, Carl Zeiss, Gotingenas, Vokietija). Ląstelės skaičiuotos kiekviename bandinyje, skaičiuojant trijose skirtingose $1290 \times 965 \mu\text{m}^2$ dydžio paviršiaus plotuose. Iš viso buvo tirta po keturis skirtingų rūšių bandinius trijose atskirose partijose. Po keturių dienų, kai GFP-HCEC ląstelės visiškai padengė hidrogelių bandinių paviršių ir beveik iki galo bandinius su FN struktūromis. Bandiniai buvo nuplauti, fiksuoti ir uždažyti imunocitochemiškai. Ląstelės permeabilizuojamos 0,25 % Triton X-100 tirpalu 1 val. Tada bandiniai 1 val. blokuojami 5 % BSA su 0,05 % Tween-20 detergentu. Paskui bandiniai per naktį inkubuoti PBS su 0,05 % Tween-20 tirpale ir su pagal gamintojo instrukcijas praskiestais pirminiais antikūnais +4 °C temperatūroje. Naudoti antikūnai: antikūnas prieš proliferacijos žymenį Ki67 (1:600; Sigma–Aldrich, MO, JAV), antikūnas prieš fokalinės adhezijos kinazę FAK (angl. *focal adhesion kinase*)(1:500; Abcam, Kembridžas, JK) bei antikūnas prieš integriną $\beta 1$ (1:200; Abcam). Išplovus PBS buferiu, bandiniai buvo inkubuoti kambario temperatūroje su antriniu antikūnu, žymėtu Alexa Fluor-594 (1:400; Invitrogen, Oregonas, JAV) žyme 1 val. tamsoje. Ląstelių branduoliai dažyti 4',6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochlorido (DAPI) (PromoKine, Heidelbergas, Vokietija) tirpalu 1 min. Visi bandiniai gausiai plauti PBS buferiu ir apžiūrėti konfokoliniu mikroskopu (LSM700, Carl Zeiss, Gotingenas, Vokietija). Teigiamos (švytinčios) ląstelės skaičiuotos 50,000 μm^2 plote, kiekviename bandinyje.

2.20.3. Ląstelių auginimas ant 3D baltyminių hidrogelių

Po 5 000 HDF-GFP ląstelių buvo pasėta ir auginta ant PC-MPC hidrogelių su 30, 60 ir 200 μm pločio grioveliais ir lygiu paviršiumi (kiekvieno tipo naudoti 6 mm skersmens ir 500 μm storio diskai, n = 4).

Užsėtos ląstelės paliktos 4 val. prikibti prie bandinių paviršiaus, tada auginimo terpė su neprikibusiomis ląstelėmis buvo nusiurbta ir užpilamos naujos terpės, ląstelės fotografuotos praėjus 4, 24, 48, 72, 96 valandoms po užsėjimo fluorescenciniu mikroskopu (trys reprezentatyvūs stebėjimo laukai kiekviename bandinyje, kiekviename laiko taške). Po 96 val. bandiniai buvo fiksuoti. Gautose nuotraukose matomos ląstelės buvo suskaičiuotos naudojant atviros prieigos programinę įrangą *CellProfiler Analyst* [189], ląstelių skaičius standartizuotas 1 cm^2 paviršiaus plotui, apskaičiuotas vidurkis ir standartinis nuokrypis. Eksperimentas kartotas tris kartus. Naudojant atviros prieigos programinę įrangą *ImageJ* buvo įvertinta ląstelių elongacija, skaičiuojant ilgosios ir trumposios ašies santykį, rankiniu būdu aproksimuojant elipsę, kuri geriausiai atkartoja ląstelės vaizdą. Tokioje formoje programa *ImageJ* apskaičiuodavo ašių santykį. Statistinė analizė atlikta Analysis of Variance (ANOVA) testu.

Kanalų formavimo eksperimentuose buvo naudoti 15 mm skersmens ir $500\ \mu\text{m}$ storio PC-MPC hidrogelio diskai su 30, 60, $200\ \mu\text{m}$ pločio grioveliais, po tris bandinius kiekvienam griovelių tipui. Diskų kraštai buvo nupjauti ties griovelių galais apie 3 mm, taip suformuojant nišą ląstelėms sėti. Bandiniai grioveliais žemyn buvo sudėti į 24 šulinėlių lėkštelės šulinėlius (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgija) taip, kad susiformuotų kanalas tarp lėkštelės plastiko (TCP) ir PC-MPC hidrogelio. Po 20 000 HDF-GFP ląstelių buvo užsėta į suformuotas nišas, tikintis, kad ląstelės prikibs prie plastiko ir pradės migruoti į PC-MPC kanalus. Ląstelės augo ir migravo 120 val. Tada jos buvo nudažytos gyvų/negyvų ląstelių žymėjimo rinkiniu (Life technologies Corporation, OR, JAV), bandiniai du kartus išplauti PBS buferiniu tirpalu, fiksuoti. Bandiniai fotografuojami mikroskopu, darant per visą kanalo ilgį sujungtas nuotraukas. Analizei pasirinktos reprezentatyvios 3 mm kanalų ilgio fragmentų nuotraukos, jos padalytos į $200\ \mu\text{m}$ ilgio dalis, kuriose, naudojant *CellProfiler Analyst* programinę įrangą, suskaičiuotos ląstelės, įvertinta ląstelių elongacija. Apskaičiuotas vidutinis ląstelių pasiskirstymas kanaluose. Eksperimentas kartotas tris kartus, iš viso tirta po 9 bandinius kiekvienam griovelių tipui.

Po 4 PC-MPC hidrogelio bandinius su duobučių ir smailių formos nanostruktūromis paviršiuje buvo sukarpyta į 6 mm skersmens ir $500\ \mu\text{m}$ storio diskus. Ant jų užsėta po 5 000 žmogaus odos fibroblastų. Praėjus 4 val. bandiniai plauti PBS buferiniu tirpalu (pašalinamos neprilipusios ląstelės) ir fiksuoti. Ląstelės 5 min permeabilizuotos 0,1 % Triton X-100 PBS tirpalu, 30 min inkubuotos 1 % BSA tirpale. Ląstelių adhezija vizualizuota dažant vinkuliną (antikūnas ab18058, Abcam). Antikūnas skiestas 1:1000 laikantis gamintojo instrukcijų, po 2 val. bandiniai buvo plauti PBS buferiu ir 30 min tamsoje inkubuojami su Alexa Fluor® 488 žyme žymėtu antriniu, pagal gamintojo rekomendacijas skiestu antikūnu prieš pelės baltymus (a150113, Abcam). F-aktinas vizualizuotas Alexa

Fluor® 594 žyme žymėtu faloidinu, dažą laikant ant ląstelių 15 min tamsoje, ląstelių branduoliai buvo dažyti DAPI (Sigma-Aldrich, Vokietija) 5 min, paskui bandiniai nuplauti ir vizualizuoti fluorescenciniu mikroskopu. Vertinta ląstelių elongacija, statistinė analizė daryta ANOVA metodu.

3. SINTETINIŲ PEG HIDROGELIŲ DANGŲ TYRIMAI IR PRITAIKYMAS BIOLUSTŲ TECHNOLOGIJOMS

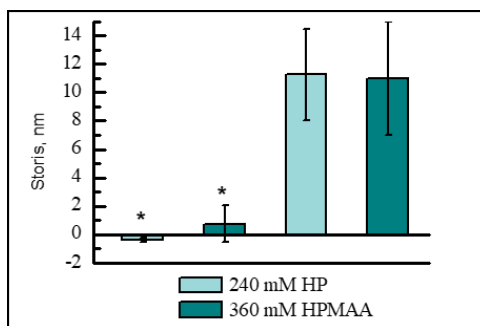
Šiame darbe pirmiausia buvo ištirta savaime inicijuojamo fotoprisiuvimo prie kietos medžiagos paviršiaus ir fotopolimerizacijos (SIPGP) būdu vykdoma kopolimero HPMAA sintezė. Kaip minėta, lig šiol literatūroje nebuvo paskelbta *in situ* sintezės metodikos, kuri tikėtų efektyviai pagaminti kovalentiškai susiūto PEG hidrogelio dangą ant pramoninės kokybės stiklo (borosilikato) paviršiaus, nors toks substratas yra neabejotinai svarbus biolustų technologijų plėtrai. Siekiant gauti chemiškai funkcionalių nanoskopinių storių sluoksnius ant standartinio laboratorinio (mikroskopavimo) stiklo paviršiaus, išbandyta polimerizacija naudojant 2-hidroksietil metakrilato (HEMA), poli(etilenglikol) metakrilato (PEGMA) ir metakrilinės rūgšties (MAA) monomerus. Šios polimerizacijos reakcijos buvo tiriamos naudojant paviršiaus analizės metodus, galiausiai optimizuojant sąlygas ir paruošiant protokolą efektyviai HPMAA sintezei. Taip pat ištirtos gauto hidrogelio fizikinės ir cheminės savybės, daugiausiai dėmesio skiriant elastomechaninėms savybėms ir neatrankioms sąveikoms su baltymais.

Antroji šio etapo darbo dalis susijusi su susintetintų HPMAA substratų išbandymu biolustų technologijose: ECM primenančioms mikrostruktūroms formuoti iš kovalentiškai prijungiamo FN. Buvo įvertinti minkštosios litografijos būdu suformuotų FN mikroskopinių domenų ant HPMAA struktūriniai parametrai ore ir fiziologiniame tirpale, stabilumas ir atsparumas neatrankiam baltymų jungimuisi. Taip pat įvertinta pagaminto biolusto prototipo sąveika su žmogaus ląstelių modeline linija, įtaka ląstelių architektūrai formuoti ir pritaikymas ilgalaikiuose ląstelių eksperimentuose. Iš literatūros yra žinoma, kad biolustai, skirti ląstelių mechanikai valdyti ir architektūrai programuoti, dažniausiai turi trūkumą dėl adhezinių baltyminių struktūrų nestabilumo ir sintetinio substrato citotoksiškumo [126]. Todėl pagrindinis šio etapo tikslas buvo derinant cheminės sintezės ir paviršių fizikinės analizės metodus rasti minėtų trūkumų pašalinimo sprendimus.

3.1. Hidrogelio polimerizavimas ant stiklo paviršiaus

Kitų autorių buvo parodyta, kad UV šviesa (emisijos smailė ties 254 nm) inicijuojama hidrogelio HP polimerizacija ant cikloalkeno polimeru dengto silicio lakšto paviršiaus yra efektyvi [35]. Nustatyta, kad gali būti naudojamas 240 mM bendros monomerų koncentracijos mišinys, sudarytas iš lygiomis molinėmis dalimis sumaišytų poli(etilenglikolio)metakrilato (PEGMA) ir 2-hidroksietil metakrilato (HEMA) monomerų. Tačiau,

atliekant tokią sintezę ant borosilikatinio stiklo, įsitikinta, kad ji nėra efektyvi nei ant natyvaus, nei ant padengto silanolinėmis grupėmis (SiO_x) paviršiaus. Pavyzdžiui, bandymas polimerizuoti HP hidrogelį iš 240 mM tirpalo ant chemiškai nuvalyto stiklo paviršiaus veikiant 6 min UV spinduliuote (254 nm) neleido gauti pakankamo storio hidrogelio sluoksnio (37 pav.). Palyginti – ant cikloalkenu dengto silicio paviršiaus tomis pačiomis sąlygomis ir naudojant tuos pačius reagentus gautas HP 240 mM hidrogelio storis buvo 40 nm [35]. Tiksliai įvertinti dangos storį naudota nulinė elipsometrija, kuriai reikalingi specialūs modeliniai substratai (OptiSlide) su atspindinčiu didelio lūžio rodiklio pasluoksniu ir viršutine SiO_2 danga, kuri atstoja įprasto stiklo paviršių. Sprendžiant iš elipsometrijos matavimų, ant nemodifikuoto, chemiškai nuvalyto stiklo paviršiaus HP dangos gauti nepavyko. Galimas paaiškinimas, kad nesusidaro pakankamas kiekis kovalentinių jungčių tarp stiklo paviršiaus –OH grupių bei hidrogelio ir/arba jo monomerų ir po polimerizavimo procedūros hidrogelis galimai atskyla nuo paviršiaus. Savo ruožtu tai susiję su pramoninės kokybės stiklo cheminiu nevienalytiškumu, o tai yra gerai žinoma techninė problema [1][2]. Esant silanolo grupėms (APTMS) ant paviršiaus, pavyko susintetinti HP, tačiau reakcijos našumas buvo prastas – gautas dangos storis buvo 10 ± 2 nm, t. y. 4 kartus mažesnis negu ant cikloalkeno-silicio paviršiaus. Taip pat buvo bandoma padidinti HP hidrogelio bendrą monomerų koncentraciją nuo 240 mM iki 360 mM tikintis gauti storesnį HP hidrogelio sluoksnį ant APTMS silanizuoto paviršiaus, bet suformuota danga buvo netolygi ir nehomogeniška.

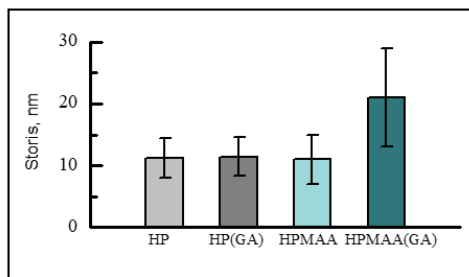


37 pav. Nulinės elipsometrijos metodu išmatuotų hidrogelių dangų, susintetintų ant OptiSlide paviršiaus, storio palyginimas. Sintezė atlikta esant skirtingai reagentų sudėčiai ir skirtingai paruoštam paviršiui: 240 mM HP ir 360 mM HPMAA bendros monomerų koncentracijos hidrogeliai sintetinti ant chemiškai nuvalytų (*) ir APTMS dengtų OptiSlide paviršių. UV apšvitos laikas 6 min.

Norint gauti funkciškai aktyvų hidrogelį, t. y. su cheminėmis grupėmis, per kurias toliau būtų galima kovalentiškai prijungti ligandus, paprastai naudojamas HP hidrogelio modifikavimas bromacto rūgštimi (BrCH_2COOH) NaOH tirpale [190]. Tada pasyvios hidroksilo grupės pakeičiamos chemiškai aktyvesnėmis karboksilo grupėmis. Minėtas pakeitimo protokolas gerai tiko HP hidrogeliui, susintetintam ant cikloalkenų polimeru dengto silicio paviršiaus [35]. Bet paaiškėjo, kad jis yra netinkamas HP hidrogeliams modifikuoti ant stiklo substrato, nes NaOH reaguoja su stiklu formuodamas vandenyje tirpius silikatus, taip pašalindamas HP hidrogelio dangą.

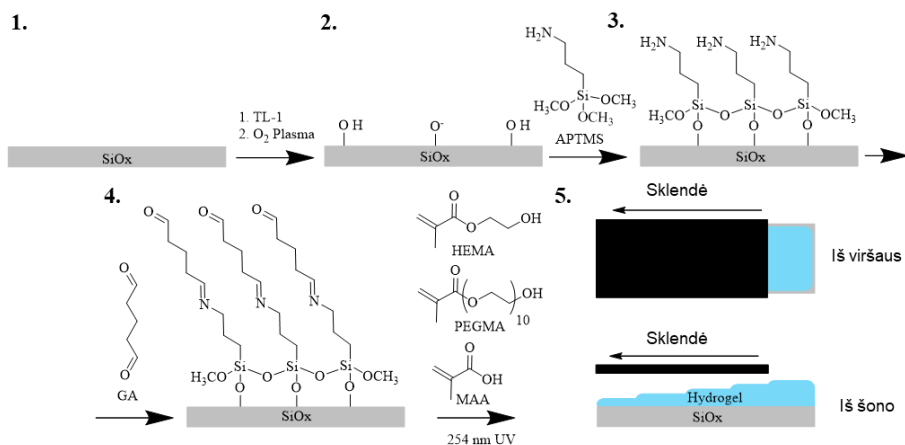
Toliesniuose bandymuose buvo pasirinkta papildyti hidrogelio sudėtį karboksilo grupių turinčiais metilmetakrilatinės rūgšties (MAA) monomerais, taip *in situ* įtraukiant chemiškai aktyvias grupes. Taip susintetintas HPMAA hidrogelis ant APTMS silanizuoto stiklo paviršiaus, susidedantis iš lygiomis dalimis sumaišytų PEGMA, HEMA ir MAA monomerų. Palyginti sintetintos HPMAA hidrogelio dangos tiek iš 240 mM, tiek ir iš 360 mM bendros monomerų koncentracijos tirpalų. Abiem atvejais jos gautos tolygios ir homogeniškos, bet geresnės reakcijos išėigos, t. y. storesnio nei 20 nm hidrogelio sluoksnio, deja, nepavyko pasiekti (37, 38 pav.). Detalesniems hidrogelių sintezės tyrimams buvo pasirinkti APTMS modifikuoti stiklo substratai. Cheminėje sintezėje ant stiklo paviršiaus numatytas papildomas žingsnis – APTMS sluoksnio funkcinų amino grupių modifikavimas glutaraldehidu (GA). Dažniausiai su GA funkciškai aktyvinti paviršiai (su aldehydine grupe) yra naudojami biologinių ligandų imobilizacijai [191][192], polimerams prijungti prie stiklo paviršių [193][194]. Tačiau apie aldehydinės grupės panaudojimą savaime inicijuojamos fotoprisiuvimo ir fotopolimerizacijos reakcijose (SIPGP) duomenų nepavyko rasti. Todėl palyginti buvo tiriami HP ir HPMAA hidrogeliai, susintetinti ant APTMS silanizuotų, GA veiktų ir neveiktų stiklo substratų, nekeičiant UV apšvitos laiko (6 min). Adatiniu profilometru išmatavus suformuotas hidrogelio dangas ant stiklo paviršiaus, nustatyta, kad HPMAA hidrogelio storis buvo du kartus didesnis (20 ± 6 nm) ant APTMS ir GA veiktų stikliukų nei tik ant APTMS silanizuotų stikliukų (38 pav.). Tačiau panašaus storio padidėjimo efekto HP hidrogelio dangose nebuvo nustatyta.

Buvo nuspręsta detaliau ištirti GA įtaką hidrogelio polimerizacijai ant APTMS silanizuoto stiklo. 39 paveiksle parodyti pagrindiniai PEG hidrogelio auginimo ant stiklo paviršiaus žingsniai, kurie buvo tirti nuliniu elipsometru. Pirmiausia stiklo paviršius yra chemiškai valomas ir aktyvinamas plazma, paskui veikiamas APTMS silanu. Elipsometru išmatuotas gauto APTMS sluoksnio ant stiklo paviršiaus storis $h = 0,6 \pm 0,1$ nm. Jis yra artimas sumodeliuotam APTMS savaime susi-



38 pav. Adatos profilometrijos metodu išmatuotų HPMAA ir HP hidrogelių dangų, susintetintų ant stiklo paviršiaus, storio palyginimas. Bendra monomerų koncentracija 240 mM, UV apšvitos laikas 6 min.

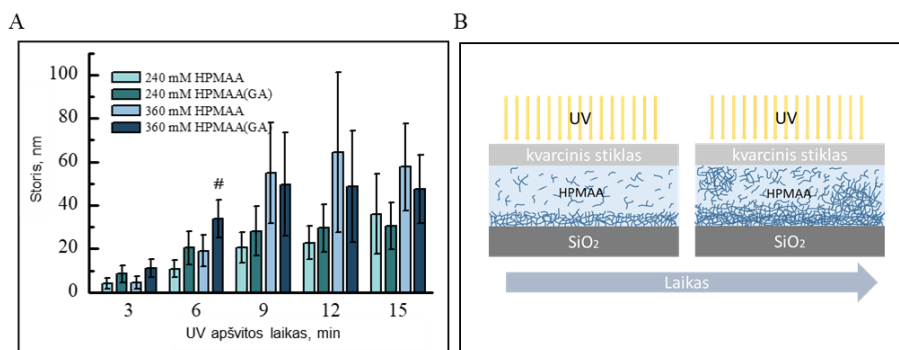
renkančio monosluoksnio storiui – 0,66 nm [195]. Papildomai APTMS sluoksnio amino grupės buvo konvertuotos į aldehido grupę sudarant Schiff'o bazes, panaudojant bifunkcinį GA reagentą. Prijungus GA molekules prie APTMS silanizuoto Optislide paviršiaus, buvo registruojamas $\Delta h = 0,2 \pm 0,1$ nm storio pokytis.



39 pav. HPMAA hidrogelio sintezės schema. Pagrindiniai žingsniai: paviršiaus cheminio valymo/aktyvinimo (1–2), APTMS silanizavimo (3), GA prijungimo (4) ir hidrogelio gradiento formavimo naudojant UV apšvitos ekspozicinę sklendę (5)

Ant taip modifikuotų substratų toliau atlikta UV valdoma HEMA, PEGMA ir MAA monomerų polimerizacija. Iš literatūros yra žinoma, kad bendra monomerų koncentracija (pvz., 240 arba 360 mM) ir UV apšvitos laikas turi įtakos hidrogelio storiui [35]. Siekiant įvertinti šių veiksmų įtaką monomerų mišinio polimerizacijai, buvo sintetinami hidrogelio sluoksnio

gradientai naudojant motorizuotą sklendę, kuria galima gauti skirtingo UV apšvitos laiko zonas ant to paties bandinio (39(5) pav.). Susintetinto hidrogelio storis buvo išmatuotas išilgai hidrogelio gradiento. Profilometru išmatuoti gradientų storio duomenys patvirtino, kad papildomai GA paveiktas APTMS silanizuotas stiklo paviršius turi įtakos HPMAA hidrogelio sluoksnio storiui (40A pav.), ypač kai trumpesnis apšvitos laikas.



40 pav. Adatos profilometrijos metodu išmatuotų HPMAA hidrogelių ant stiklo storio palyginimas esant skirtingai bendrai monomerų koncentracijai ir UV apšvitos laikui (A). Bandiniai su gautu HPMAA hidrogelio gradientu matuoti 3, 6, 9, 12 ir 15 min UV apšvitos laiko zonose. Monomerų polimerizacijos schema (B). Paklaidų juostos žymi bendrą kiekvienos variacijos matavimų standartinį nuokrypį. # – žymi pasirinktą optimalią hidrogelio sudėtį ir optimalias polimerizavimo sąlygas

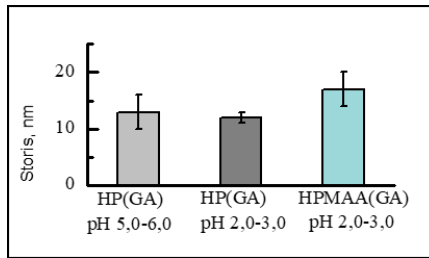
Pavyzdžiui, HPMAA susintetinus esant 360 mM monomerų tirpalo bendrai koncentracijai ir 3 min UV apšvitos laikui, hidrogelio storis $h = 11 \pm 4$ nm, ir $h = 5 \pm 3$ nm, atitinkamai veikiant GA ir neveikiant. Kai UV apšvitos trukmė 6 min, hidrogelio storis buvo atitinkamai 34 ± 9 nm ir 19 ± 7 nm. Akivaizdu, kad didesnė monomerų koncentracija leidžia pasiekti didesnę hidrogelio dangos storį, ypač kai UV apšvitos laikas ilgesnis nei 6 min. Tačiau nuo 9-os minutės HPMAA dangos storis pasikeičia nežymiai, o kartu atsiranda didelis bandinių storio skirtumas. Esant 15 min UV apšvitai HPMAA storis netgi pradeda mažėti. Galimas paaiškinimas, kad reakcijos metu polimerizacijos centrai susidaro ne ant paviršiaus, o monomerų tirpale. Susidarę polimeriniai dariniai kartu su monomerais pernešami ir prijungiami prie paviršiaus. Tokį procesą yra sunku kontroliuoti, ir tai galimai paaiškina atsirandantį didelį standartinį dangos storio matavimo nuokrypį esant ilgesnei nei 6 min UV apšvitai. Taip pat iš ankstesnių publikacijų [35] yra žinoma, kad, trūkstant monomerų, HP hidrogelio irimo laipsnis tiesiogiai priklauso nuo UV apšvitos laiko. Remiantis gautais dangos storio matavimo rezultatais galima teigti, kad optimalios sąlygos HPMAA hidrogeliams

auginti ant stiklo yra GA aktyvintas APTMS pasluoksnis, 360 mM galutinė monomerų tirpalo koncentracija ir 6 min UV apšvitos laikas.

Taip pat palyginome hidrogelio storio vertes, gautas naudojant nulinę elipsometriją su išmatuotomis adatiniais profilometru. Nustatyta, kad HPMMA hidrogelio (360 mM, UV 6 min) storis ant OptiSlide paviršiaus, išmatuotas šiais dviem metodais, sutapo beveik idealiai, atitinkamai $25,8 \pm 5,1$ nm ir $25,5 \pm 9,2$ nm. Tačiau buvo nustatytas HPMMA hidrogelio, polimerizuoto ant mikroskopavimo stiklo ir OptiSlide paviršių, sluoksnio storių skirtumas. Storis, matuotas adatiniais profilometru, buvo atitinkamai 34 ± 9 nm (stiklas) ir $25,5 \pm 9,2$ nm (OptiSlide) esant toms pačioms optimizuotoms sąlygoms.

Tokiu būdu, kaip substratą naudojant APTMS silanizuotą borosilikatinį stiklą, paveiktą GA ir vykdant HEMA, PEGMA, MAA monomerų mišinio fotopolimerizaciją, be pridėtinių iniciatorių, gaunamas storas, vientisas ir stabilus HPMMA hidrogelio sluoksnis (38, 40A pav.). Reakcijos našumas (hidrogelio storis) sumažėja trūkstant bent vienos iš išvardytų sudedamųjų dalių. Literatūroje nepavyko rasti duomenų apie hidrogelio sintezę naudojant panašias sudedamųjų dalių kombinacijas ir jų pritaikymą efektyviam stiklo paviršiaus funkciniam modifikavimui. Nors daugėja publikacijų apie SIPGP metodo naudojimą, polimerizacijos mechanizmas nėra iki galo aiškus ir tyrimai šioje srityje vyksta toliau. Pagrindinis SIPGP polimerizacijos proceso paaiškinimas, randamas literatūroje, kad radikalai ant paviršiaus susiformuoja, kai UV šviesos sužadinti metakrilato monomerai atplėšia vandenilio atomus nuo paviršiaus. Ant paviršiaus susiformavę radikalai toliau sudaro sąlygas vyksti paviršiaus inicijuotai polimerizacijai [63].

Vienas iš galimų paaiškinimų, kodėl HPMMA hidrogelio storis padidėja ant GA paveikto APTMS paviršiaus, yra dėl paviršiuje esančio aldehido funkcinės grupės, kuri gali reaguoti su hidroksilo funkicine grupe, esančia HEMA ir PEGMA monomeruose, ir formuoti acetalus esant rūgštiniam tirpalo pH. Šiuo atveju MAA pasireiškia ne tik kaip monomerai, bet ir veikia kaip rūgštis, padedanti inicijuoti acetalinimo reakciją ir taip prijungti monomerus prie paviršiaus, vėliau monomerai tampa radikalinais paviršiaus centrais. Remiantis šia galimybe, buvo atliktas kontrolinis eksperimentas naudojant 240 mM HP monomerų tirpalą su HCl rūgštinti – tokiu pat pH kaip ir standartiniame 240 mM HPMMA tirpale (pH 2,0 – 3,0). Tačiau storesnio HP hidrogelio sluoksnio su rūgštesniu 240 mM HP monomerų tirpalu, lyginant su standartiniu 240 mM HP tirpalu, nepavyko gauti (41 pav.).



41 pav. Adatos profilometrijos metodu išmatuotų HP ir HPMAA hidrogelių ant stiklo storių palyginimas. Hidrogeliai sintetinti iš 240 mM bendros monomerų koncentracijos tirpalų esant skirtingam pH. UV apšvitos laikas 6 min.

Kitas galimas GA įtakos HPMAA hidrogelio storiui padidėti paaiškinimas yra aldehido grupės radikalo susidarymas. Iš literatūros žinoma, kad aldehidai veikia kaip iniciatoriai esant UV spinduliutei [196] ar net gali formuoti acilo radikalus esant aerobinei aplinkai ir vykstant aldehido grupės oksidacijos procesui [197]. Dar vienas galimas paaiškinimas, kad APTMS ir GA kombinacija ant stiklo paviršiaus duoda storesnį organinį sluoksnį, iš kur UV šviesos sužadinti metakrilato monomerai gali lengviau paimti vandenilio atomą nuo paviršiaus ir palikti paviršiuje esantį radikalą. Pavyzdžiui, HPMAA hidrogelio, gauto iš 360 mM bendros monomerų koncentracijos tirpalo, be APTMS dangos storis buvo $0,7 \pm 1,3$ nm (danga buvo netolygi, matomos atskiros hidrogelio salos, 37 pav.). Su APTMS danga hidrogelio storis buvo 19 ± 7 nm, ir, APTMS modifikavus GA, gauta danga, kurios storis 34 ± 9 nm, esant 6 min UV apšvitai (40A pav.). Tačiau šie du galimi paaiškinimai, kodėl esant APTMS, GA ir HPMAA hidrogelio sudėčiai gaunamas storio padidėjimas, netinka esant HP (240 mM) polimero sudėčiai. HP hidrogelio sudėties atveju GA įtakos hidrogelio storiui nenustatyta (38 pav.). Panašu, kad hidrogelio fotopolimerizacijos efektyvumui padidėti turi įtakos pats MAA monomerai, kuris ne tik hidrogeliui duoda karboksilo funkcines grupes, bet yra aktyvesnis fotopolimerizacijos procese ant paviršių, palyginti su HEMA ir PEGMA monomerais [63]. MAA monomerų panaudojimas HPMAA hidrogelyje ir teigiamas GA naudojimo efektas išryškėja esant trumpam, 3 min ir 6 min UV apšvitos laikui (40A pav.), kai abi monomerų koncentracijos (240 mM ir 360 mM) rodo storio padidėjimą, palyginti su APTMS paviršiumi, nepaveiktu GA. Po 9 min UV apšvitos storio padidėjimo efektas esant GA yra dar matomas esant 240 mM HPMAA monomerų koncentracijai, bet išnyksta, kai monomerų koncentracija 360 mM HPMAA. Kaip minėta, esant didesnei HPMAA monomerų koncentracijai po 6 min UV apšvitos, polimerizacija galimai pradeda sparčiau vykti tūryje, tarp paviršiaus ir kvarcinio dengiamojo stikliuko, o tada susidariusios didelės molekulinės masės polimero grandinės jungiasi

prie paviršiaus (40B pav.). Tuo būtų galima paaiškinti ženklų HPMAA hidrogelio storio padidėjimą esant 360 mM monomerų koncentracijai bei didelę storio variaciją ant APTMS dangą turinčio stiklo paviršiaus, esant 9, 12 ir 15 min UV apšvitos laikui. HPMAA hidrogelio storio sumažėjimą esant ilgesniam UV apšvitos laikui, 15 min, ir didesnės koncentracijos monomerų koncentracijai, 360 mM, būtų galima paaiškinti hidrogelio ardymu nuo per didelės UV apšvitos dozės. Iš literatūros yra žinoma, kad polimerai, turintys HEMA monomero, yra jautrūs UV poveikiui [35]. Nors reakcijos mechanizmui iki galo suprasti, kaip kiekvienas junginys ir proceso žingsnis veikia reakcijos efektyvumą, reikia tolesnių studijų naudojant pažangius paviršiaus analizės metodus ir teorinių skaičiavimų, mūsų tyrimuose surasta monomerų kompozicija ir tinkamas paviršiaus paruošimas leidžia efektyviai susintetinti aukštos kokybės hidrogelio dangas ant stiklo paviršiaus.

3.2. Nanometrinių storių PEG hidrogelio dangų savybės

Brinkimas skystose terpėse yra esminė hidrogelių savybė. Jis apibrėžiamas kaip osmosinio streso (susijusio su fiksuotų polimerų dalių jonizavimu ir su paskesniu kontrastiniu jonų padidėjimu polimerų plėvelėje), polimerinių grandinių elastingumo bei polimero grandinių susiuvimo laipsnio pusiausvyra [60]. Brinkimas parodo galimybę pritraukti ir išlaikyti vandens molekules, taip pat yra susijęs su hidrogelio paviršiaus gebėjimu atstumti biologines molekules nuo savo paviršiaus. Makroskopiniuose medžiagos kiekiuose jis dažniausiai yra nustatomas kaip sausų ir visiškai hidratuotų polimerų svorio santykis. Tačiau tiriant nanometrinių storių (1–100 nm eilės), chemiškai prie kieto paviršiaus prisiūtas hidrogelio dangas, tokie matavimai techniškai sudėtingi. Todėl šiame darbe įvertinti HPMAA dangų ant stiklo brinkimą buvo pasirinkta metodika, kurioje, naudojant AJM, registruojamas ir lyginamas sauso ir visiškai hidratuoto hidrogelio storis [198]. Mus domino brinkimo savybės esant skirtingam terpės pH.

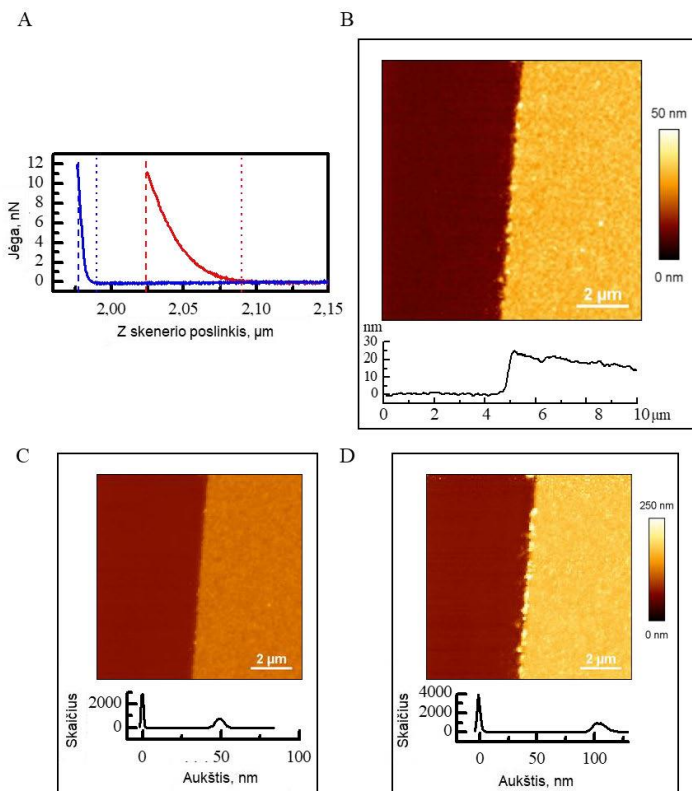
AJM pagal savo veikimo principą yra kontaktinis paviršiaus savybių matavimo metodas, todėl AJM zondas turi sąveikauti su paviršiumi esant tam tikrai, dažniausiai apibrėžtos ir kontroliuojamos vertės jėgai. Įprastu kontaktiniu režimu ši jėga apibrėžiama kaip reikiama spaudimo jėga (angl. *setpoint*). Šios jėgos konkreti vertė nėra kritiškai svarbi, tiriant kietų paviršių, tokių kaip stiklas ar metalas, morfologines arba elastomechanines savybes, nes zondo ir kieto paviršiaus sąveika mažai turi įtakos gaunamiems rezultatams. Tačiau, tiriant minkštus organinius paviršius, pavyzdžiui, polimerus, išbrinkusius buferiniame tirpale, matavimai yra sudėtingesni. Dėl baigtinės, kad ir labai mažos, nustatytos sąveikos jėgos AJM zondas dažniausiai gali mechaniškai keisti (deformuoti) paviršių, taip iškraipydamas

storio ir topografijos matavimų rezultatus. Ypač yra sudėtinga apibrėžti/nustatyti paviršiaus ribą labai minkštų bandinių, pavyzdžiui, išbrinkusių hidrogelių, kurių išorėje yra pasiskirsčiusios ypač „minkštos“ (konformaciškai laisvos) PEG grandinė. Tokiu atveju mažesnės spyruoklės konstantos AJM zondų naudoti nėra prasmės, nes juos ima virpinti aplinkos molekulės, t. y. atsiranda terminis triukšmas, kuris skystyje būna netgi stipresnis nei ore ir dėl to prarandama jėgos ir aukščio raiška.

Atsižvelgiant į tiriamos sistemos ypatumus, buvo panaudotas techniškai sudėtingesnis ir naujesnis kiekybinio vaizdinimo (QI – angl. *quantitative imaging*) režimas, kuris užtikrina tikslesnį zondo spaudimo jėgos valdymą ir taip pat leidžia įvertinti aukštį be jokių deformacijų, esant minimaliai zondo ir paviršius sąveikai. Skirtumas tarp įprastinio reikiamos spaudimo jėgos ir QI matavimo režimų parodytas 42A paveiksle. Palyginti buvo matuoti du HPMAA hidratuoto hidrogelio (ant stiklo substrato) aukščiai – 11 nN jėga veikiamo hidrogelio aukštis ir nesuspausto hidrogelio aukštis, apibrėžiamas kaip kontakto taško aukštis ir nustatomas iš AJM jėgų kreivių. Pirma, prieš matuojant aukštį AJM zonu, buvo mechaniškai pašalintas (atsargiai nubrauktas) hidrogelio sluoksnis nuo bandinio paviršiaus ir gautas hidrogelio sluoksnio kraštas. Nustatyta, kad HPMAA hidrogelio aukštis matuojant ore buvo 21 nm (42B pav.). Tada buvo atliekamas tos pačios bandinio vietos skenavimas AJM QI režimu 0,1 M PB pH = 7,0 buferiniame tirpale ir iš gautų duomenų buvo apskaičiuoti du duomenų rinkiniai – nustatytos spaudimo jėgos aukščio (11 nN) (42C pav.) ir kontakto taško aukštis (42D pav.).

Kontakto taško aukštis yra skenerio poslinkio vieta, kai registruojama atstumiančios sąveikos tarp AJM zondo ir analizuojamo paviršiaus pradžia. Nustatytos spaudimo jėgos aukštis atitinka aukštį, gaunamą standartiniu AJM kontaktiniu režimu, bet yra apibrėžiamas kaip skenerio poslinkio vieta, kai yra pasiekama reikiama sąveikos jėga. 42A paveiksle parodyta būdinga atstūmimo jėgos kreivė, gauta ant nemodifikuoto stiklo (mėlyna kreivė) ir HPMAA hidrogelio (raudona kreivė) paviršių, su pažymėta nustatytos spaudimo jėgos aukščio (brūkšninė linija) ir kontakto taško aukščio (taškinė linija) pozicijomis. Kaip ir tikėtasi, jėgos kreivės nuolydis, registruotas ant hidrogelio paviršiaus, buvo mažesnis, rodo minkštesnį, deformuojamą paviršių. Taip pat skirtumas tarp nustatytos spaudimo jėgos aukščio ir kontakto taško aukščio buvo skirtingas abiem tiriamiems paviršiams. Šis skirtumas buvo didesnis HPMAA hidrogelio paviršiui, rodo, kad hidrogelis buvo deformuojamas (suspaudžiamas). O šis skirtumas ant kieto stiklo paviršiaus rodo tik AJM zondo strypelio lenkimąsi. 42C, D paveiksluose rodomos dvi nuotraukos, kuriose pavaizduota ta pati tiriamą visiškai hidratuoto HPMAA hidrogelio paviršiaus vieta. 42C paveiksle pavaizduotas 11 nN jėga suspausto hidrogelio aukštis, o 42D paveiksle – minimaliai

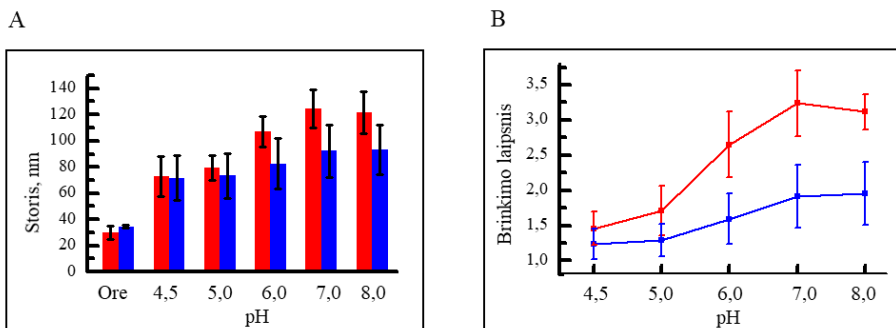
deformuoto/paveikto hidrogelio aukštis. Po paveikslais esančiose histogramose matomos dvi smailės – pirma ties 0 nm atitinka kietą stiklo paviršių, o antra – hidrogelio storį. Šiuo atveju nustatyta, kad nesuspausto HPMAA hidrogelio storis vandenyje buvo apie 105 nm, suspausto hidrogelio storis atitinkamai apie 49,5 nm.



42 pav. Ant stiklo paviršiaus susintetintos HPMAA hidrogelio dangos storio matavimas AJM. Būdingos AJM jėgos kreivės ant stiklo (mėlyna kreivė) ir ant HPMAA hidrogelio (raudona kreivė) (A). Taškinė linija žymi ribą, kada zondas pradeda aptikti paviršių, taip nustatomas kontakto aukščio taškas. Brūkšninė linija žymi ribą, kai pasiekama numatyta spaudimo jėga, šiuo atveju 11 nN. Pasiekus šią jėgą, fiksuojamas reikiamos spaudimo jėgos aukštis. Tos pačios tiriamos bandinio vietos AJM nuotraukos gautos skirtingais režimais: kontaktiniu režimu ore (B) ir 0,1 M PB pH = 7,0 buferiniame tirpale naudojant numatyto spaudimo jėgos aukščio (11 nN)(C) ir QI kontakto taško aukščio (D) režimus. Stiklo paviršius buvo prilygintas 0 nm aukščiui

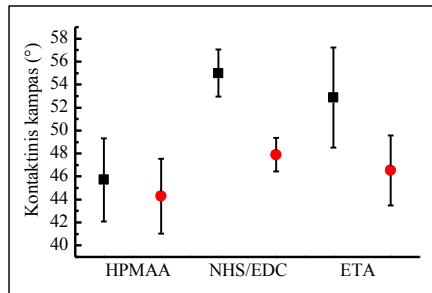
Yra žinoma, kad karboksilo grupių turinčių hidrogelių brinkimas priklauso nuo tirpalo pH [199] ir savo elgsena yra panašus į anijoninių

polimerų. Esant aukštam tirpalo pH, karboksilo grupės jonizuojasi [200] ir elektrostatiškai stumdamos viena kitą padidina hidrogelio brinkimo laipsnį bei vandens sugėrimo talpą. Kadangi mūsų susintetintas HPMAA hidrogelis ant stiklo paviršiaus yra nauja medžiaga, norėjome įvertinti jos brinkimą. Iš literatūros yra žinoma, kad panašios sudėties hidrogeliai, storose plėvelėse, jautriai reaguoja į tirpalo pH pokyčius, t. y. brinksta arba susitraukia [201].



43 pav. Ant stiklo paviršiaus susintetintos HPMAA hidrogelio dangos storio (A) ir brinkimo laipsnio (B) priklausomybė nuo skirtingo buferinio tirpalo pH, išmatuota atominių jėgų mikroskopu. HPMAA – raudoni stulpeliai ir kreivė. NHS/EDC ir po to ETA paveiktas HPMAA hidrogelis (blokuotas) – mėlyni stulpeliai ir kreivė. AJM duomenys buvo surinkti toje pačioje bandinio vietoje naudojant kontakto taško aukščio duomenis. Buferinių tirpalų pH vertės buvo 4,5; 5,0; 6,0; 7,0 ir 8,0. Buvo tiriami keturi skirtingi bandiniai, paklaidų juostos rodo standartinę nuokrypį tarp jų

Naudojant AJM buvo matuotas natyvių ir chemiškai blokuotų (su NHS/EDC, ETA reakcijomis) HPMAA hidrogelių dangų storis esant skirtingiems tirpalų pH. Atsižvelgiant į galimus biologinius taikymus, buferinio tirpalo pH ruožas pasirinktas nuo 4,5 iki 8,0. Siekdami maksimalaus jautrumo ir tikslumo, hidrogelio aukštį matavome AJM kontakto taško aukščio režimu (43A pav.). Brinkimo laipsnio skaičiavimai atlikti lyginant su sauso HPMAA hidrogelio storiu, išmatuotu ore. Iš gautų duomenų matyti, kad, didinant buferinio tirpalo pH nuo 5,0 iki 7,0, hidrogelio storis padidėjo. Kaip ir tikėtasi, didesnis brinkimas buvo būdingas HPMAA hidrogeliui, turinčiam daugiau laisvų karboksilų grupių, ypač kai didesnis tirpalų pH (43B pav.). Sumažėjusių chemiškai blokuotų hidrogelių brinkimą galima sieti su sumažėjusiu karboksilo grupių (krūvių) tankiu hidrogelyje, nes dėl reakcijos su etanolaminu jos virto nesijonizuojančiomis hidroksilo grupėmis. Paviršiaus vandens drėkinimo kampo matavimų rezultatai taip pat rodo laisvų karboksilo grupių sumažėjimą ant HPMAA hidrogelio paviršiaus po atlikto cheminio blokavimo. Pradinio HPMAA paviršiaus vandens drėkinimo kampas buvo $45,7 \pm 3,6^\circ$, blokuoto HPMAA hidrogelio paviršiaus – $52,9 \pm 4,4^\circ$ (44 pav.).



44 pav. Ant stiklo paviršiaus susintetintos HPMAA hidrogelio dangos vandens lašo drėkinimo kampo matavimo duomenys: natyvaus HPMAA hidrogelio, aktyvinto NHS/EDC bei chemiškai blokuoto ETA. Juodu kvadratu pažymėti duomenys pradinio laiko momentu (adatos laikomam vandens lašui iš karto palietus paviršiu), raudonu tašku – praėjus 2 min ir nusistovėjus vandens lašo formai. Ištirta 12 bandinių, paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą tarp jų.

Kaip minėta, tikslus hidrogelio storio matavimas yra sudėtingas arba net neįmanomas AJM įprastiniais režimais, todėl buvo naudotas AJM QI vaizdinimo režimas. Todėl įdomūs ir aktualūs yra kontakto taško aukščio duomenys, kurie parodo aukštį pačioje zondo kontakto su hidrogelio paviršiumi pradžioje. Remiantis šiais matavimais, pavyko parodyti, kad HPMAA hidrogelis buferiniame tirpale priklausomai nuo pH išbrinksta iki 2–5 kartų, palyginti su ore esančiu hidrogeliu. Taip pat parodyta, kad hidratuotas HPMAA hidrogelis yra labai elastingas ir lengvai suspaudžiamas AJM zondų, bet kartu sugeba grįžti į savo pradinę būseną (atlikti HPMAA hidrogelio tos pačios zonos matavimai AJM nerodė jokios deformacijos). Pritaikyta QI metodika gali suteikti ir kiekybinę informaciją apie paviršių, pavyzdžiui, jo deformaciją ir elastingumą, tačiau, norint matyti detalią topografinį hidrogelio paviršiaus paveikslą, buvo naudotas aštrus AJM zondas, kreivumo spindulys <math><10\text{ nm}</math>. Naudoto AJM zondo adatos galiuko tikslūs matmenys yra labai svarbus parametras plono hidrogelio sluoksnio mechaninėms savybėms skaičiuoti. Kita vertus, aštrūs AJM zondai matavimo metu giliai deformuodavo hidrogelį, palyginti su bendru jo storiumi (įsiskverbdami apie 50 % viso plėvelės storio, žr. 42 pav.), o žinomi elastingumo skaičiavimo modeliai tinka, kai matavimui reikalingos deformacijos sudaro iki 10–20 % tiriamo sluoksnio storio. Todėl, nors gautuose duomenyse ir yra informacijos apie polimero elastomechanines savybes, be papildomo modeliavimo ir teorinių skaičiavimų nepavyko kiekybiškai įvertinti HPMAA hidrogelio elastingumo.

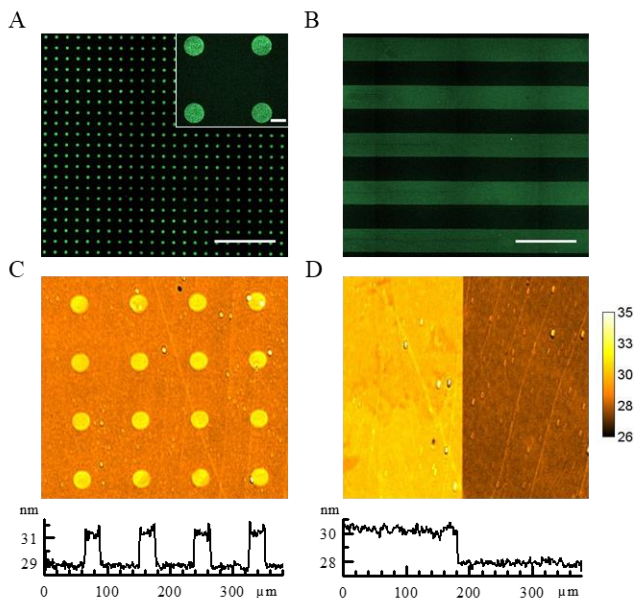
Hidrogelio brinkimo priklausomybė nuo skirtingo tirpalo pH gali būti panaudota hidrogelio mechaninėms savybėms valdyti ar kuriant pH reguliuojamų vaistų paleidimo sistemas. Sumažėjęs chemiškai blokuoto HPMAA hidrogelio brinkimo laipsnis pokytis esant skirtingam tirpalo pH,

rodo, kad ne visos karboksilo grupės sureagavo su etanolaminu. Tikriausiai ne visos karboksilo grupės hidrogelyje yra steriškai prieinamos NHS/EDC reagentams reakcijos metu, ypač tai turėtų galioti karboksilo grupėms, kurios yra arčiau stiklo paviršiaus. Minėta, kad MAA monomerai yra efektyvesni fotoprisiuvimo procesuose [63], nei HEMA, PEGMA, todėl karboksilo grupių koncentracija tikėtina yra didesnė arčiau stiklo nei hidrogelio paviršiuje. Be to, dėl mažo porų dydžio ir PEG grandinių NHS/EDC ir ETA galimai sunkiai difunduoja į hidrogelio dangos gilesnius sluoksnius. Tiksliniai šių nuo medžiagos pernašos priklausomų reakcijų tyrimai nebuvo atlikti dėl matavimų sudėtingumo ir laiko trūkumo, tikintis juos tęsti ateityje.

3.3. Fibronektino mikrostruktūrų formavimas ant HPMMA hidrogelio

Struktūriškai stabili, tačiau mechaniškai lanksti ir brinkstanti HPMMA hidrogelio danga su chemiškai reakingomis karboksilo grupėmis yra tinkama platforma į ECM panašioms mikrostruktūroms formuoti. Tolesniam darbui pasirinktas ląstelių lusto formatas, kurį sudaro mikroskopavimo stiklo bandiniai su susintetinta HPMMA hidrogelio danga ir suformuotos ECM baltymų mikrostruktūros, skatinančios adhezinių ląstelių prisijungimą. Tiesioginiam kovalentiniam FN prijungimui prie HPMMA hidrogelio ir mikrostruktūroms formuoti buvo pasirinktas mikrokontaktinio antspaudavimo metodas. Taip formavimas atliekamas hidrogelio paviršiuje tiesiogiai, nenaudojant fotoaktyvių junginių, kurie dažnai būna toksiški ląstelėms, todėl nenaudojami kuriant biolustus. Mikrokontaktiniam antspaudavimui buvo naudoti PDMS spaudai su disku (skersmuo $\varnothing = 25,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$) ir linijų (plotis $p = 191,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$) formų struktūromis. Kaip rašalas panaudotas FN baltymas, kuris yra su ląstelės integriniais sąveikaujantis baltymas, skatina ląstelių adheziją ir migraciją [202]. Suformuotų FN struktūrų ant hidrogelio patikrinimas fluorescenciniu mikroskopu patvirtino gerą formos ir matmenų išlaikymą: gautos disko pavidalo FN struktūros buvo $\varnothing = 26,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$, o FN linijos plotis $p = 191,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (45A, B pav.), t. y. FN mikrostruktūrų santykinis matmenų nuokrypis nuo spaudu ne didesnis nei 3 %. Toks geras formos atkartojimas rodo, kad buvo suvaldyta FN baltymų difuzija ant HPMMA hidrogelio paviršiaus mikrokonto su PDMS spaudu metu, o perkeltas baltymų kiekis optimalus. Apie 95 % viso suformuotų FN struktūrų ploto buvo geros kokybės, t. y. išlaikoma struktūros forma ir homogeniškas struktūros ploto užpildymas baltymu. Vaizdinančio elipsometro matavimai parodė, kad FN sluoksnio storis ore buvo $3,0 \pm 0,5 \text{ nm}$ diskų ir $2,5 \pm 0,2 \text{ nm}$ linijų struktūrose (45C,D pav.). Toks FN sluoksnio storis yra palyginamas su vidutiniu FN baltymo grandinės skersmeniu, kuris yra 2 nm [203]. Tai

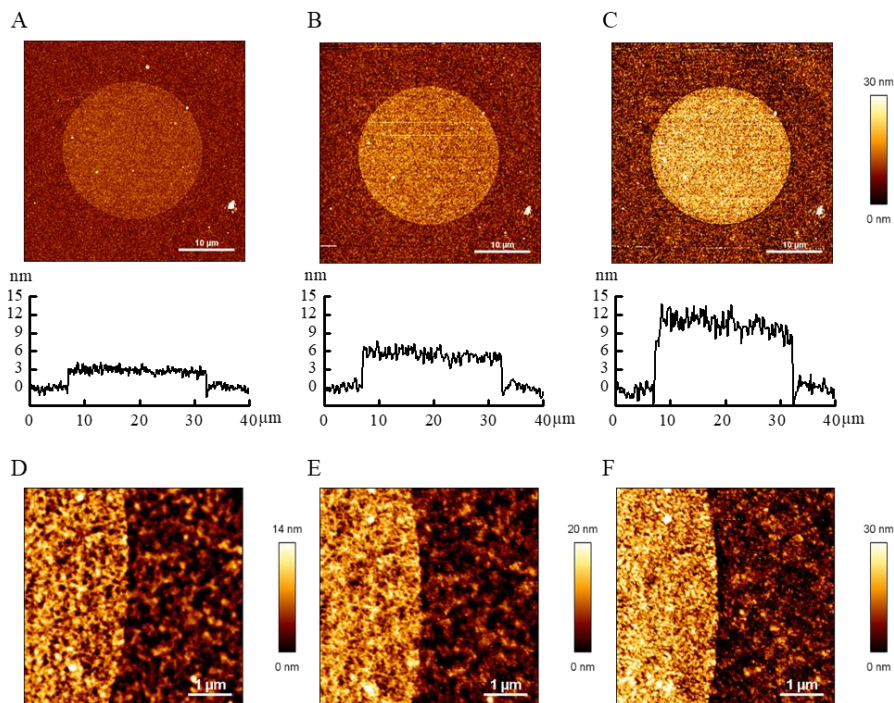
parodo, kad naudojant mikrokontaktinio antspaudavimo metodą pavyksta ant HPMAA hidrogelio paviršiaus perkelti ECM baltymo monosluoksnį.



45 pav. Fibronectino mikrostruktūrų, suformuotų ant HPMAA hidrogelio, fluorescencinės nuotraukos: 26 μm skersmens diskai (A) ir 192 μm pločio linijos (B). Tokių pačių fibronectino struktūrų storį žemėlapiu ir pjūviai, išmatuoti vaizdinančiu elipsometru (C, D). Skalės 20 μm (A pav. intarpe) ir 500 μm (A, B)

Suformuotų FN struktūrų ant HPMAA hidrogelio morfologija papildomai buvo tiriama AJM (46 pav.). Buvo atlikti tų pačių bandinių skenavimai ore ir 0,1 M PBS (pH = 7,4) buferiniame tirpale, kuris pasirinktas kaip fiziologinės terpės atitinkmuo. FN struktūrų topografijos ore analizė parodė $3,2 \pm 1,2$ nm struktūrų storį (46A pav.), kuris puikiai sutapo su vaizdinančio elipsometro duomenimis. Antspauduotos baltyminės struktūros ore turėjo aiškiai apibrėžtas laterales ribas ir buvo tolygiai užpildytos FN baltymu, buvo tolygios ir atkartojė HPMAA hidrogelio paviršiaus (naudoto kaip substratas) topografiją (46D pav.). Paviršiaus šiurkštumas (S_q), matuotas ore, FN struktūroje buvo $2,6 \pm 0,4$ nm, o ant hidrogelio paviršiaus $2,1 \pm 0,3$ nm. Tie patys bandiniai toliau buvo analizuojami PBS buferiniame tirpale naudojant AJM QI skenavimo režimą ir registruojant numatytos spaudimo jėgos aukščio (46B, E pav.) ir kontakto taško aukščio (46C, F pav.) žemėlapius. Buferiniame tirpale hidratavus hidrogelį ir tiriamą baltymą, iš jo molekulių sudarytų struktūrų topografija ir aukštis pasikeitė. Suspaustame hidrogelyje su FN struktūromis, nustatytos jėgos aukščio žemėlapis parodė tarpusavyje

sujungtus siūlinio tipo darinius tiek ant FN struktūros, tiek ir ant HPMMA hidrogelio paviršiaus (46E pav.). Tačiau tokios struktūros buvo mažiau matomos ant nesuspausto hidrogelio – kontakto aukščio paveiksle (46F pav),



46 pav. Fibronektino struktūrų, suformuotų ant HPMMA hidrogeliu dengto stiklo, AJM tyrimai. Visas topografinis vaizdas su struktūros aukščio pjūviu pateikiamas nuotraukose (A, B, C). Priartinti topografinis vaizdai pateikiami apatinėje eilėje (D, E, F). Skenavimai buvo atlikti ore, periodinio kontakto AJM režimu (A ir D) ir QI režimu 0,1 M PBS pH = 7,4 buferiniame tirpale: 11 nN nustatytos spaudimo jėgos paveikslai (B ir E) ir kontakto aukščio taško paveikslai (C ir F)

o vietoje jų paviršiuje dominavo grūdėto tipo dariniai. FN struktūrų aukštis išmatuotas spaudžiant, t. y. deformuotų, buvo $4,7 \pm 1,8$ nm, o kontakto taško aukščio paveiksle, t. y. nedeformuotų paviršių, aukštis siekė net $12,0 \pm 3,0$ nm. Abu vaizdinimo metodai parodė padidėjusį paviršiaus šiurkštumą ant FN struktūrų ir ant substrato esančio hidrogelio: atitinkamai S_q vertės buvo $4,3 \pm 0,3$ nm ir $3,5 \pm 0,7$ nm deformuotiems bei $7,2 \pm 1,3$ nm ir $5,5 \pm 1,3$ nm nedeformuotiems paviršiams. Taigi PBS buferiniame tirpale matomas ne tik HPMMA hidrogelio, bet ir suformuotų FN mikrostruktūrų brinkimas. Vadinasi, galima teigti, kad ant HPMMA pavyko gauti ECM primenančius biosintetinius darinius. Nepaisant šios FN mikro-

struktūrų elgsenos, vandeninėje terpėje jos išliko stabilios ant paviršiaus ir išlaikė savo formą.

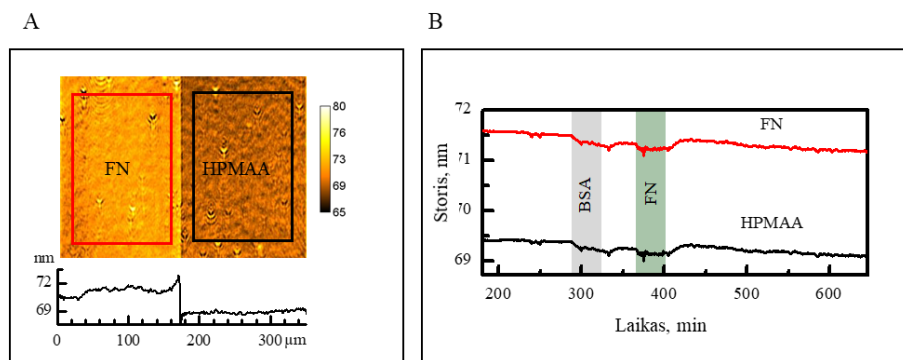
3.4. Fibronektino-HPMAA mikrostruktūrų sąveikos baltyminėse terpėse

Siekdami įvertinti susintetintus HPMAA hidrogelius kaip platformą biomedžiagoms ir biolustams konstruoti, pirmiausiai atlikome kinetinius baltymų neatrankių sąveikų su suformuotomis FN baltymo struktūromis *in situ* tyrimus tirpaluose. Tam naudojome vaizdinančios elipsometrijos metodą. Tyrimams buvo naudojami biolustai su HPMAA hidrogeliu ir FN struktūromis, kurie suformuoti ant OptiSlide plokštelių, su lūžio rodiklio kontrastą didinančia danga. Sąveikoms tirti į skysčių celę buvo įleista dviejų baltymų tirpalų, kurie imitavo dvi skirtingas fiziologines aplinkas: BSA – kraujo plazmos baltymas pasirinktas dėl jo neatrankaus fizesorbcinio kibimo prie daugelio paviršių, ir FN – tarpląstelinio užpildo baltymas, kuris yra sintetinamas pačių ląstelių joms formuojant audinius [204]. Norint turėti patikimus ląstelių architektūrai valdyti skirtus biolustus, pagamintos FN mikrostruktūros ir jų substratas hidrogelis neturėtų sąveikauti nė su vienu iš minėtų baltymų.

Pasirinktame matuoti lauke, naudojant elipsometro 10× objektyvą (47 pav.), matomi FN linijos fragmentai ir HPMAA hidrogelio substrato paviršius. Pastarasis yra visiškai hidratuotos būsenos, 0,1 M PB pH = 7,3 buferiniame tirpale. Kadangi hidrogelis brinksta, paprasto vienkomponenčio sluoksnio lūžio rodiklio taikyti negalima. Todėl buvo pasirinktas Bruggemann efektyvios terpės artinys [178], kuris leidžia įvertinti dvikomponenčio sluoksnio lūžio rodiklį ir kiekybiškai įvertinti komponentų santykį. Mūsų matavimuose, sumodeliavus gautus eksperimentinius rezultatus, geriausiai atitiko Bruggemann efektyvios terpės artinys, atitinkantis 0,69 vandens dalį matuojamame sluoksnyje. Gauta storio žemėlapiu duomenys rodo gerą FN sluoksnio storio sutapimą su anksčiau aptartais elipsometro ir AJM matavimų duomenimis: išmatuotas hidrogelio storis buvo apie 69 nm, o FN mikrostruktūros – 71 nm.

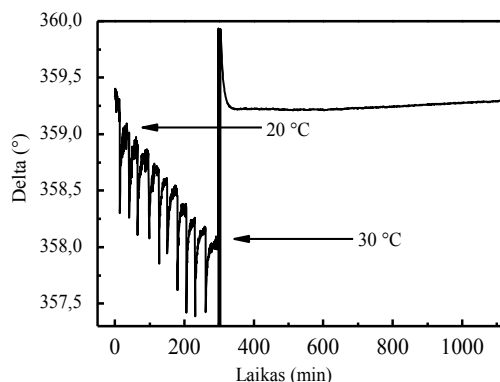
Vėliau buvo registruojamos elipsometrinių parametrų kinetikos (47B pav.), taip zonduojant mikrostruktūrų sąveiką su baltymais realiame laike, skysčių tėkmės sąlygomis. Pirma buvo leidžiamas 0,1 M PB pH = 7,3 buferinis tirpalas, esant nuolatinei tėkmei (50 μL/min), kol nusistovi pusiausvyra matavimo laukuose, toliau 4 val. stebint, ar nesikeičia FN ir HPMAA hidrogelio storis. Po stabilumo testo į celę buvo 30 min leista BSA 0,5 mg/ml (pilka spalva 47B pav.) ir 30 min FN 50 μg/ml (žalia spalva 47B pav.) tirpalai 0,1 M PB pH = 7,3 buferiniame tirpale, įterpiant 30 min plovimą buferiniu tirpalu. Įleidus minėtus baltymų tirpalus į skysčių celę, pasikeitė matuojamų paviršių storis (pilka ir žalia zona 47B pav.), bet

išplovus bandinius buferiniu tirpalu, FN struktūrų ir HPMAA hidrogelio storis atsinaujino. Atsiradęs storio sumažėjimas, leidžiant baltymų tirpalus, susijęs su matavimo terpės lūžio rodiklio pasikeitimu. Vertinant biolusto sąveiką su baltymais iš tirpalo aplinkos, galima teigti, kad tiriami baltymai neatrankiai nesijungė prie bandinio paviršiaus arba jungėsi tiek nedaug, kad naudota matavimo sistema jų neaptiko. Šios sistemos jautris yra geresnis už 0,2 nm.



47 pav. HPMAA hidrogelio su FN struktūromis stabilumo ir inertiškumo tirpale esantiems baltymams tyrimas, naudojant vaizdinančio elipsometro kinetinius matavimus. Aukščių žemėlapis su pažymėtomis HPMAA hidrogelio (juodas stačiakampis) ir FN (raudonas stačiakampis) matuojamomis zonomis bei aukščių žemėlapio skerspjūviu (A). Grafike (B) raudona kreivė rodo FN, juoda kreivė – HPMAA zonų aukščio pokyčius per tam tikrą laiką. Spalvotos zonos grafike žymi BSA ir FN tirpalų įleidimo į kinetinę skysčių celę laiką

Atlikti kinetiniai matavimai ir gauti rezultatai patvirtina, kad esant eksperimentuose naudotai buferinio tirpalo tėkmei, FN struktūros ant HPMAA hidrogelio išlieka stabilios mažiausiai 12 valandų. Matomas nedidelis abiejų FN ir HPMAA kreivių mažėjimas aiškintinas aplinkos temperatūros pokyčių laboratorijoje ilgų kinetinių matavimų metu. Todėl papildomai buvo atlikti kontroliniai matavimai, norint suprasti, ar mūsų prielaida buvo teisinga. Buvo matuotas chemiškai švarus Optislide substratas keičiant celės temperatūrą, o paskui sistemą paliekant kambario temperatūroje (48 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad, keičiantis temperatūrai, iš tiesų pasikeičia bandinio ir aplinkos (tirpalo) savybės, t. y. keičiasi lūžio rodiklis, kuris ir turi įtakos vieno iš esminių elipsometrijos parametru Δ pokyčiams.



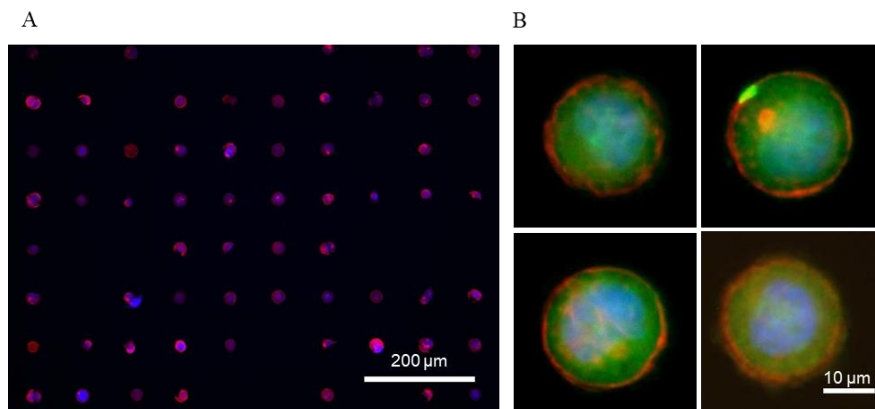
48 pav. *Elipsometrinio parametro Δ kitimas per tam tikrą laiką keičiant celės temperatūrą. Matavimai atlikti vaizdinančiu elipsometru ant chemiškai švaraus Optislide substrato skysčių celėje, užpildytoje PB buferiu. Nuo 320 min Δ registruojamas kambario temperatūroje*

Šiuose eksperimentuose nustatyta, kad HPMAA hidrogelio paviršiaus atsparumas neatrankiam baltymų jungimuisi buvo panašus kaip ir neutralių HEMA:PEGMA hidrogelių [35]. Palyginti – panašios sudėties ir storio hidrogelis, turintis savo sudėtyje 2-karboksietil metakrilato (CEA) ant polistireno plokštelės, pasižymėjo apie 2 nm storio kraujo plazmos baltymų neatrankiu prisijungimu [205]. Tikriausiai dėl karboksilo grupių aktyvinimo NHS/EDC ir blokavimo etanolaminu HPMAA hidrogelyje neigiamą krūvį turinčių karboksilų skaičius hidrogelio paviršiuje yra sumažinamas, todėl hidrogelio paviršius elgiasi kaip elektrostatiškai/chemiškai neutralios sudėties hidrogeliai.

Prie HPMAA hidrogelio paviršiaus kovalentiškai prijungtos (naudojant NHS/EDC reakciją) FN mikrostruktūros yra stabilios. Tai yra nenustatyta FN struktūrų storio ar morfologijos pokyčių per 11 val. elipsometrinius matavimus celėje su nuolatine buferinio tirpalo tėkme. Tai yra geras techninis rezultatas, turint galvoje gana didelį iš skirtingų komponentų susidedančios sistemos integravimo lygį. Pats HPMAA hidrogelis (po NHS/EDC reakcijos, ETA cheminio blokavimo) brinksta PBS buferiniame tirpale, jo storis yra apie 3 kartus didesnis, palyginti su sauso hidrogelio storiu (43 pav.). Tačiau dar papildomai brinksta ir FN struktūros, nuo 2 nm iki 12 nm (46 pav.), atitinkamai sauso ir hidratuoto būvio. Gauta „minkštoji“ biolusto sandara turėtų būti itin palanki ląstelių receptoriams, atsakingiems už adheziją, greičiau aptikti adhezinius ruožus ir suformuoti specifines bioatpažinimo jungtis.

3.5. Suformuoto biolusto sąveika su ląstelėmis

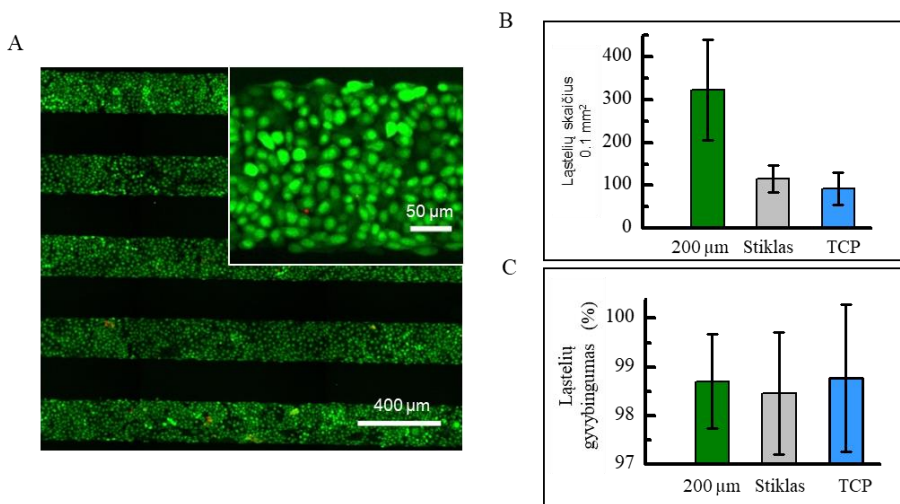
HPMAA hidrogelio paviršiai su FN mikrostruktūromis buvo išbandomi kaip biolusto, kuris skirtas eukariotinėms ląstelėms valdyti, maketas. Buvo įvertintas pagamintų „minkštųjų“ mikrostruktūrų pritaikymas ląstelių morfologijai moduluoti bei ląstelių augimo valdymo eksperimentams. Maketui, skirtam pavienėms ląstelėms, buvo pasirinktos $\varnothing = 26 \mu\text{m}$ disko formos periodinės FN mikrostruktūros. Ant $20 \times 20 \text{ mm}^2$ ploto bandinio paviršiaus buvo užsėta apie 4 000 žmogaus ragenos epitelio ląstelių ir leista joms augti 4 val. Tokiomis ląstelių sėjimo sąlygomis $64 \pm 12 \%$ visų disko formos struktūrų buvo užimtos atrankiai prisijungusių ląstelių, iš jų $88 \pm 7 \%$ struktūrų buvo užimtos vienos ląstelės. Nė viename bandinyje nebuvo matoma neatrankaus ląstelių jungimosi prie HPMAA hidrogelio už FN struktūrų ribų (49 pav.). Analizuojant šviesiniu mikroskopu registruotas nuotraukas, patvirtinta, kad ląstelės visiškai pasiskleidė ir prisijungė ant disko formos FN struktūrų per 4 valandas. Suformuotos disko formos FN struktūra yra $540 \pm 50 \mu\text{m}^2$ ploto, jis yra beveik du kartus mažesnis už įprastai vienos HCEC užimamą paviršiaus plotą, kuris siekia $1052 \pm 94 \mu\text{m}^2$ [206]. Analizuojamose nuotraukose nematyti ląstelių, užimtų FN struktūrų, irimo ar deformacijos ženklų. Konstatuotina, kad FN struktūrų forma lemia ląstelių formą. Nudažius ląstelių aktino sudaromą citoskeletą ir branduolius matyti, kad HCEC ląstelės yra atrankiai sukibusios su FN struktūromis, jos įgijusios apvalią formą, su nepoliarizuoto aktino tinklais (49B pav.). Tokios pavienių ląstelių struktūros išliko stabilios 4 valandas. Šis



49 pav. Būdingi fluorescencinės mikroskopijos vaizdai su HCEC ląstelėmis ant disko formos FN mikrostruktūrų. Ląstelės po 4 val. nuo užsėjimo buvo fiksuotos, imunocitochemiškai nudažyti aktinas (raudonas), vinkulinas (žalias) ir ląstelių branduoliai (mėlyna). Didelio lauko (A) ir pavienių ląstelių fluorescencinės nuotraukos (B)

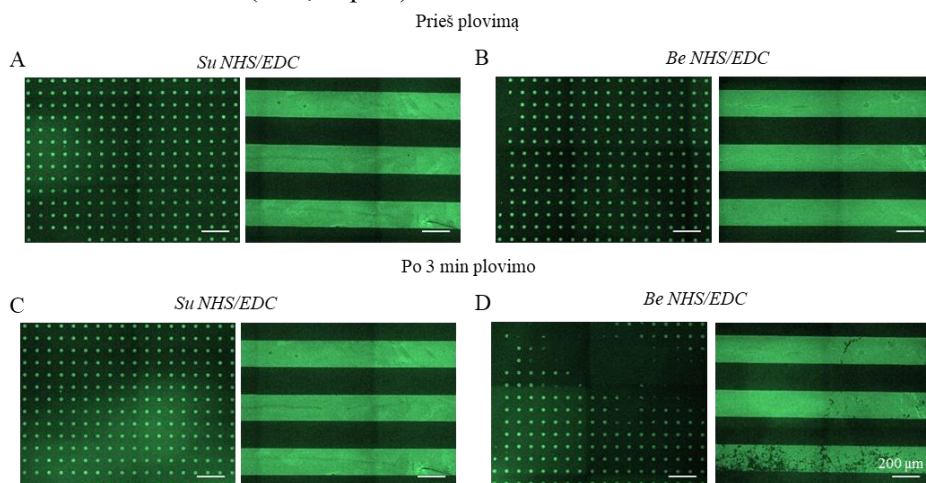
sąlygiškai trumpas ląstelių kultūros eksperimento laikas buvo parinktas, norint išvengti ląstelių proliferacijos.

Toliau FN struktūrų ant HPMAA hidrogelio stabilumas ir biosuderinamumas buvo įvertinti ilgalaikiuose, 96 val. ląstelių kultūrų eksperimentuose. Tam tikslui ant $20 \times 20 \text{ mm}^2$ ploto HPMAA hidrogelio bandinių su suformuotomis $192 \mu\text{m}$ pločio linijinėmis FN struktūromis buvo užsėta po 40 000 HCEC–GFP ląstelių. Kontrolei pasirinktas FN nestruktūrizuotas HPMAA hidrogelio paviršius, chemiškai švarus mikroskopavimo stikliukas ir standartinės plastikinės ląstelių auginimo lėkštutės (TCP). Ląstelės visiškai nekibo ir neaugo ant HPMAA hidrogelio paviršiaus (duomenys nepateikiami). Ant bandinių su FN linijų struktūromis ląstelės prikibo ir augo tik ant atskirų FN linijų, nesiskverbdamos į tarpus tarp linijų, t. y. vengdamos HPMAA (50A pav.). Vidutinis prikibusių ląstelių skaičius ant bandinių su FN linijomis, ant stiklo ir ant TCP buvo panašus. Tačiau bandiniuose su FN linijomis ląstelės augo tik ant FN linijų, todėl ląstelių tankis augimo vietose buvo beveik tris kartus didesnis, palyginti su kontrole (50B pav.). Įdomu, kad ant FN struktūrų ląstelės pasiekus didelį tankį, jos buvo linkusios augti daugiasluoksniu, o ne migruoti ar augti ant HPMAA hidrogelio paviršiaus. Nepaisant beveik tris kartus didesnio už kontrolinius bandinius ląstelių tankio, ant FN struktūrų ląstelės išliko visiškai gyvybingos po 96 eksperimento valandų (50C pav.).



50 pav. HCEC ląstelės ant $192 \mu\text{m}$ pločio FN linijų. Didelio lauko fluorescencinėje nuotraukoje HCEC–GFP ląstelės rodomos po 96 val. po užsėjimo ir po gyvų (žalios)/mirusių (raudonos) ląstelių dažymo (A). HCEC–GFP ląstelių tankis (B) ir gyvybingumas (C) po 96 val. po užsėjimo ant $192 \mu\text{m}$ fibronektino linijų, stiklo ir plastikinių ląstelių kultūrų indų dugno (TCP) paviršių. Paklaidos intervalas rodo standartinį nuokrypį tarp 3 bandinių iš trijų skirtingų partijų

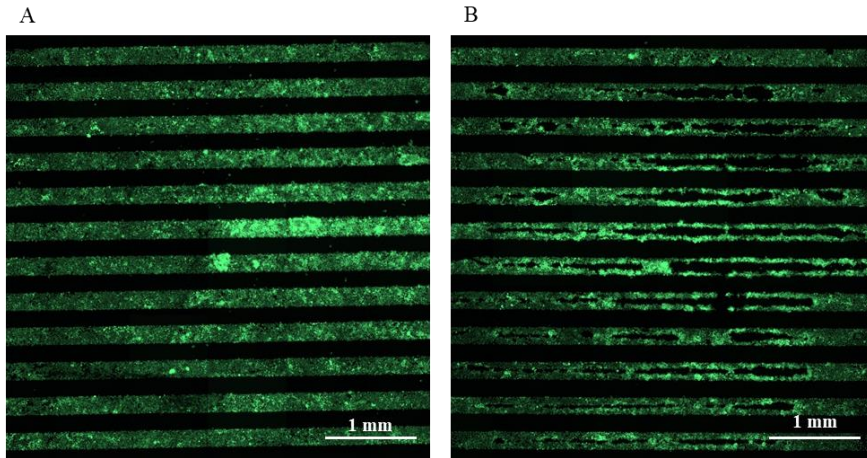
Pažymėtina, kad esant ir tokiam dideliame ląstelių tankiui FN struktūros išlieka mechaniškai stabilios ir nėra matomų FN atsikabinimo nuo paviršiaus ar irimo ženklų. Tai netiesiogiai patvirtina efektyvų kovalentinį FN baltymo prijungimą prie HPMAA hidrogelio paviršiaus. Šiam teiginiui patikrinti buvo atlikti papildomi kontroliniai eksperimentai, kur gamybos metu daliai bandinių nebuvo atliktas karboksilo grupės aktyvinimo NHS/EDC žingsnis. Visi kiti gamybos žingsniai buvo atlikti analogiškai kaip pirmiau šiame skyrelyje aptartuose eksperimentuose. FN struktūrų stabilumas buvo tikrinamas plaunant bandinius ultragarsinėje vonelėje ir auginant ląsteles 96 val. Galima paminėti, kad pavyko sėkmingai suformuoti FN struktūras ant HPMAA hidrogelio paviršiaus net ir praleidus NHS/EDC žingsnį. Pirminiais duomenimis, FN struktūrų kokybė nesiskyrė nuo standartiškai (su NHS/EDC) ruoštų bandinių kokybės (51A, B pav.). Tačiau atliktus 3 min bandinių veikimo ultragarsu (plaunant vonelėje) testą, pastebėta, kad FN struktūros bandiniuose be NHS/EDC aktyvinimo žingsnio, pradėjo atkibti nuo HPMAA hidrogelio paviršiaus, o standartinių bandinių FN struktūros ir toliau išliko stabilios (51C, D pav.).



51 pav. FN struktūrų stabilumo testas veikiant skirtingai pagamintus bandinius ultragarsu. Fluorescencinės standartinio bandinio (A) ir bandinio su praleistu HPMAA hidrogelio NHS/EDC aktyvinimo žingsniu (B) prieš ir po 3 min plovimo procedūros (C)(D) nuotraukos. Skalės dydis 200 μm .

Ilgalaikiai ląstelių kultūros auginimo eksperimentai taip pat patvirtino, kad FN struktūros ant HPMAA hidrogelio, kur buvo praleistas NHS/EDC aktyvinimo žingsnis, yra nestabilios, t. y. ląstelės neformuoja aiškios formos kolonijų (52 pav.). Gauti rezultatai patvirtino, kad HPMAA hidrogelio karboksilo grupės aktyvinimas NHS/EDC bei atrankus ir efektyvus

kovalentinis FN prijungimas yra būtinas stabiliems ir patikimiems biolustams konstruoti.



52 pav. 96 val. pagamintos FN struktūros stabilumo testas atliktas kultūrose su GFP-HCEC ląstelėmis, fluorescencinės mikroskopijos (ląstelių fluorescencijos) vaizdai. Standartiškai paruoštų bandinių (A) bei bandinių, paruoštų praleidus NHS/EDC aktyvinimo žingsnį (B), vaizdai praėjus 96 val. po ląstelių užsėjimo

Susumuojant ląstelių kultūrų eksperimentus, galima teigti, kad daugiau nei pusę ($64 \pm 12\%$) visų $26\ \mu\text{m}$ skersmens disko formos FN struktūrų buvo užimtos ląstelių per 4 val. po užsėjimo. Iš visų ląstelių užimtų FN struktūrų, didžiąją dalį sudarė ($88 \pm 7\%$) pavienės ląstelės. Ląstelės visiškai dengė FN struktūras neišplisdamos už jų ribų. Šios $26\ \mu\text{m}$ skersmens struktūros buvo per mažos, kad HCEC ląstelės visiškai išsiskleistų, todėl ląstelės buvo priverstos būti joms nepatogioje – mechanškai įtemptoje būsenoje. Tokia ląstelių būseną leido patikrinti FN struktūrų stabilumą ir HPMAA hidrogelio paviršiaus atsparumą ląstelių kibimui. Ląstelių citoskeletas buvo apvalios, kupolo formos. Aktino gijos daugelyje ląstelių buvo žiedo formos ir ląstelių periferijoje. Kadangi šiam eksperimentui ląstelės buvo auginamos tik 4 val., greičiausiai buvo matoma jau kitų autorių aprašyta ankstyvoji aktino gijų tinklo savi-organizacija į žiedinę, ląstelės kraštus apimančią pluoštinę struktūrą [207]. Pavienių ląstelių struktūros moduliavimas ir mechanobiologiniai tyrimai yra aktualūs ir svarbūs, nes, kontroliuodami paviršiaus geometriją ir užtikrindami geras bioadhezijos sąlygas, t. y. mūsų atveju FN struktūros formą ir dydį bei kovalentiškai prijungto FN paviršiaus tankį, galime veikti ląstelės citoskeleto architektūros formavimąsi, lemti viduląstelinį signalo perdavimo kelius [208]. Keturių dienų ląstelių gyvybingumo ir struktūrų atsparumo eksperimentuose, kur HCEC ląstelės buvo užsėtos ant $192\ \mu\text{m}$ pločio linijinių FN struktūrų ir auginamos 96 val.,

kad visiškai išsiplėstų ir spėtų pasidalyti keletą kartų, ląstelės išliko gyvybingos ir nesijungė kitur, tik prie FN struktūrų. Buvo nustatyta, kad nepaisant tris kartus didesnio ląstelių tankio (ląstelių skaičius/0,1 mm²) ant HPMAA FN struktūrų, palyginti su kontroliniais stiklo ir plastiko paviršiais, ląstelių gyvybingumas nesiskyrė nuo kontrolinių bandinių. Šie duomenys leidžia teigti, kad keturių dienų kultūrose ląstelių gyvybingumas, auginant jas ant FN dengto HPMAA hidrogelio, nemažėja, o FN nedengtas HPMAA hidrogelio paviršius ląsteles atstumia, t. y. pasižymi ląstelių atstūmimo savybėmis. Esant dideliame ląstelių tankiui ant FN struktūros, ląstelės yra linkusios formuoti daugiasluoksnes kultūras, o ne migruoti ant HPMAA hidrogelio paviršiaus. Įvairiems eksperimentams prireikus gauti daugiasluoksnes ląstelių kultūras reikia turėti nemažai ląstelių ir auginti jas tenka ilgai. Tokiais atvejais pasirinktinai suformuoti ir aktyvinti auginimo plotai, pvz., įvairios FN struktūros, gali labai padėti. Tokiu būdu, pavyzdžiui, nedidelis skaičius žinduolių kamieninių ląstelių gali būti auginamos glaustai [209], kad kontaktuotų viena su kita. O jų augimo pagrindas, t. y. FN struktūros ar kitokie dariniai, gali dalyvauti nulemiant tolesnę ląstelių vystymąsi ir likimą [210][211].

3.6. Išvados

1. *In situ* HPMAA hidrogelio polimerizacija ant borosilikatinio stiklo paviršiaus efektyviai vyksta esant aldehido funkcinėms grupėms, tikėtina dėl ribiniame sluoksnyje atsirandančios efektyvesnės sąveikos su MAA.
2. Susintetintos 34 ± 9 nm storio HPMAA hidrogelio dangos ant borosilikatinio stiklo keičia savo brinkimo laipsnį nuo $1,5 \pm 0,3$ iki $3,0 \pm 0,1$, vandeninio tirpalo pH atitinkamai kintant nuo 4,0 iki 8,0.
3. Prie HPMAA hidrogelio dangos ant stiklo chemiškai prisiūtos fibronektino mikrostruktūros suformuoja vientisą baltymų sluoksnį, pasižymintį nanometrinių skaidulų morfologija, tiksliai atkartoja spaudu rašto matmenis 26–192 μm ruože išlaikydamos ne didesnę nei 3 % santykinę nuokrypį ir išlieka ilgalaikių ląstelių kultūrų sąlygomis.

4. BALTYMINIŲ HIDROGELIŲ IR JŲ PAVIRŠIAUS MODIFIKACIJŲ TYRIMAI

Ankstesniuose darbuose pademonstruota, kad žmogaus akies ragenos implantams sukurtą baltyminių RHCIII hidrogelį galima mechaniškai sustiprinti, papildant jį antriniu susipinančiu 2-metakriloiloksietil fosforilcholino (MPC) tinklu, gaunant kompozitinį RHCIII-MPC [212] hidrogelį. Toks RHCIII-MPC hidrogelis triušio ragenos šarminio nudeginimo tyrimuose stimuliavo audinių regeneraciją ir neleido implante susidaryti kraujagyslėms, kurios čia nepageidaujamos [213]. Paviršiaus modifikavimo metodai, skirti ląstelių adhezijai pagerinti ir implanto padengimui ląstelėmis pagreitinti, jau sukurti ir naudojami. Tai apima metodus nuo paties baltyminio hidrogelio organizavimo į sulygiuotas struktūras [214] iki įvairių litografinių metodų, kurių dauguma įprastai yra naudojami ir atliekant mikroformavimą ant įvairių kietų paviršių [215]. Dauguma šių metodų negali būti naudojama ant minkštų ir visiškai hidratuotų hidrogelių, kurių sudėtyje yra apie 85 % vandens.

Šiame tyrimų etape pasirinkta strategija: pirmiausia buvo pagerintos RHCIII-MPC baltyminio hidrogelio mechaninės savybės, leidžiančios atlikti tolesnes modifikacijas ant jau pagamintų hidrogelių, o tada išbandytas mikrokontaktinis antspaudavimas (μ CP) [120], t. y. paviršiaus struktūros buvo suformuotos ant hidratuoto RHCIII-MPC hidrogelio. Iš literatūros yra žinoma, kad fibronektinas skatina ląstelių adheziją ir migraciją akies ragenos epitelio ląstelių žaizdos gijimo metu [216][217]. Šis baltymas buvo sėkmingai išbandytas gydant nuolatinis epitelio sluoksnio defektus žmogaus akies ragenoje [218]. Šiame darbe buvo suformuotos ir iširtos fibronektino mikrostruktūros RHCIII-MPC hidrogelio paviršiuje pasitelkiant optinę ir atominių jėgų mikroskopiją. Taip pat buvo kiekybiškai įvertintas FN mikrostruktūrų poveikis žmogaus ragenos epitelio ląstelėms augti.

4.1. Baltyminių hidrogelių sintezė, sandara ir fizikinės savybės

Ankstesniuose darbuose buvo aprašytas baltyminis hidrogelis, skirtas akies ragenos implantų gamybai iš 13,7 % pradinio RHCIII tirpalo, maišant jį su MPC:PEGDA sintetiniu polimeriniu tinklu, kur RHCIII ir MPC masės santykis buvo 2:1, EDC:RHCIII-NH₂ santykis 0,3:1 (santykis parodo ir hidrogelio susiuvimo laipsnį [184]). Nors sukurtas hidrogelis buvo optiškai skaidrus, mechaniškai integralus ir biosuderinamas, tačiau buvo nepakankamo mechaninio elastingumo (siuvimo metu skildavo), o jis yra svarbus implantui pritaikyti chirurgijoje. Todėl mūsų bendradarbiavimo partneriai (prof. dr. May Griffith grupė iš Linkopingo universiteto)

patobulino RHCIII-MPC hidrogelius, siekdami juos padaryti mechaniškai stipresnius, nekeičiant esminių sintezės metodo žingsnių bei stengiantis išlaikyti optines savybes, artimas natūraliai žmogaus ragenai. Buvo išbandytos didesnės nei įprasta [184] RHCIII tirpalo koncentracijos, atitinkamai 13,7; 18 ir 20 %. Didesnės negu 20 % koncentracijos kolageno tirpalas buvo pernelyg tirštas membranoms ir lakštams formuoti. Taip pat buvo keičiamas RHCIII/MPC (m:m) santykis, atitinkamai 4:1, 2:1, 1:1, 1:0 ir vertinama MPC polimerinio tinklo įtaka hidrogelio savybėms. Hidrogelių susiuvimo laipsnis buvo keičiamas, keičiant EDC:RHCIII-NH₂ santykį (mol:mol), atitinkamai 0,3:1, 0,4:1, 0,6:1, 1:1, 1,5:1. Gautų hidrogelių savybių įvertinimo rezultatai pateikiami publikacijoje [219]. Trumpai galima paminėti, kad dvi skirtingos fazės – vandeninė su baltymu ir polimerinė – išryškėja didinant RHCIII pradinio tirpalo koncentraciją ir MPC dalį. Pastarąją padidinus iki 1:1 (mol:mol) RHCIII:MPC santykio, hidrogelis tapo silpnas ir trapus. Tai galėjo nutikti dėl to, kad didelis MPC kiekis trukdė hidrogelio sintezės metu vykstantiems savaiminio susirinkimo procesams, t. y. MPC tinklas galimai trikdė baltyminių mikrofibrilų susirinkimą ir jų susiuvimą. Didinant RHCIII pradinio tirpalo koncentraciją nuo 18 iki 20 %, susintetinti hidrogeliai buvo mechaniškai silpni, nes dėl per didelės tirpalo klampos buvo sunku gerai homogenizuoti tirpalus ir atitinkamus komponentus tolygiai kovalentiškai susiūti į hidrogelį. Didinamas sausos medžiagos kiekis padarė hidrogelius standesnius, bet ne stipresnius. Didinant santykinę EDC koncentraciją RHCIII-NH₂ grupių atžvilgiu, t. y. susiuvimo laipsnį, ypač viršijus 0,4:1 santykį, nepavyko gauti didesnio mechaninio hidrogelio tvirtumo. Geriausiu optinių ir mechaninių savybių deriniu, taip pat ir dėl technologinio optimalumo pasižymėjo hidrogelis, pagamintas iš 18 % RHCIII pradinio tirpalo, kur RHCIII/MPC santykis buvo 2:1 ir EDC:RHCIII-NH₂ susiuvimo santykis buvo 0,4:1 (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0.4). 1 lentelėje pateikiamas hidrogelių pagrindinių savybių palyginimas tarpusavyje ir su žmogaus akies rageną. Padidinus bendrą kolageno kiekį nuo 13,7 iki 18 %, vandens kiekis hidrogelyje sumažėjo nuo 90,1 ± 2,4 iki 86 % (85,5 ± 0,2 % RHCIII-MPC ir 86,0 ± 0,2% RHCIII). Lūžio rodikliai atitinkamai buvo 1,35 ir 1,36 ir išliko didesni už vandens (1,33), bet truputį mažesni už žmogaus akies ragenos (1,373 – 1,380 [28])). Apibendrinant reikia pažymėti, kad didesnės koncentracijos RHCIII hidrogeliai turėjo didžiausią, o mažesnės – mažiausią lūžio rodiklį.

Regimos šviesos laidumas mažėja didinant RHCIII kiekį RHCIII-MPC hidrogelio sudėtyje. Be to, RHCIII-MPC hidrogeliai, palyginti su žmogaus akies rageną ir RHCIII hidrogeliais, pasižymi geresniu šviesos laidumu ir mažesne sklaida.

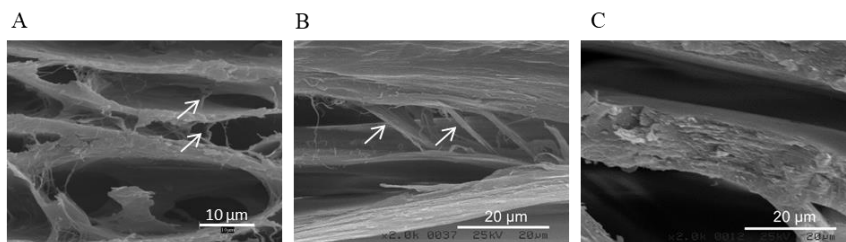
1 lentelė. Pagrindinių tiriamų hidrogelio sudėties variantų fizikinių savybių palyginimas su literatūroje randamomis žmogaus akies ragenos savybėmis. Anksiesniuose tyrimuose naudoto 13,7 % pradinio RHCIII tirpalo koncentracijos RHCIII-MPC (RHCIII:MPC (w/w) = 2:1; EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,3:1), 18 % RHCIII-MPC (RHCIII:MPC (m/m) = 2:1; EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,4:1) ir 18 % RHCIII, be (MPC) (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,4:1) baltyminių hidrogelių savybių palyginimas su žmogaus akies ragenos savybėmis

Savybės	13,7 % RHCIII-MPC[184]	18 % RHCIII-MPC	18 % RHCIII	Žmogaus ragena
Vandens kiekis (%)	90,1 ± 2,4	85,5 ± 0,2	86,0 ± 0,2	78 [99]
Lūžio rodiklis	1,35	1,36	1,35	1,37-1,38[220]
Šviesos laidumas (%)	98,3 ± 1,5	91,6 ± 0,5	87,4 ± 0,9	87[98]
Šviesos sklaida (%)	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,2	1,3 ± 0,4	3[221]
Atsparumas tempimui (MPa)	1,3 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,4	3,8 ± 0,4[222]
Pailgėjimas iki trūkimo (%)	37,9 ± 10,3	33,3 ± 3,9	28,2 ± 2,0	
Standumas (MPa)	5,3 ± 1,5	9,5 ± 3,6	15,3 ± 2,7	3–13[100]

Padidinus kolageno koncentraciją RHCIII-MPC hidrogelyje nuo 13,7 iki 18 %, RHCIII-MPC hidrogelių atsparumas tempimui padidėja nuo 1,3 ± 0,3 iki 2,1 ± 0,2 MPa (1 lentelė). 18 % RHCIII hidrogelio atsparumas tempimui buvo panašus į 18 % RHCIII-MPC hidrogelio, atitinkamai 2,4 ± 0,4 MPa ir 2,1 ± 0,4. Tačiau RHCIII be MPC hidrogelis buvo standesnis (elastingumas 15,3 ± 2,7 MPa) ir mažiau tamprus (pailgėjimas iki nutrūkimo 28,2 ± 2 %). Taip pat 18 % RHCIII-MPC hidrogelis buvo minkštesnis už RHCIII be MPC ir savo elastingumu (9,5 ± 3,6 MPa) panašesnis į žmogaus akies rageną (3–13 MPa).

RHCIII-MPC, RHCIII hidrogelių ir žmogaus ragenos sandara (morfologija) buvo palyginta pasitelkus skenuojančio elektronų pluošto mikroskopiją (SEM). Aiški kolageno sluoksninė struktūra matoma tiek žmogaus ragenos, tiek hidrogelių pjūviuose (53 pav.), per visą pjūvio ilgį. Žmogaus akies ragenos bandinyje ši struktūra buvo smulkesnė ir kompleksiškesnė, palyginti su hidrogelių struktūra. Reikia atkreipti dėmesį, kad RHCIII-MPC hidrogeliai, skirtingai nei RHCIII hidrogeliai, pasižymėjo sluoksninio tipo struktūromis, sujungtomis plonomis skersinėmis skaidulomis (53B pav.). Tokia struktūra tiksliau pakartoja žmogaus ragenos struktūrą (53A pav.). RHCIII hidrogelius sudaro vientisos sluoksninės

struktūros be skersinių jungčių (53C pav.). Tačiau vidinė natūralaus audinio sandara skiriasi nuo baltyminių hidrogelių struktūros sluoksnių skaičiumi ir tarpais tarp sluoksnių. Pavyzdžiui, sluoksniai dirbtiniuose hidrogeliuose buvo storesni ir jų buvo mažiau, palyginti su žmogaus ragena, taip pat atstumai tarp struktūrų ragenoje buvo mažesni (~15 μm) negu hidrogeliuose (~150 μm). Atstumai tarp sluoksnių struktūrų žmogaus ragenoje gali būti nuo 2 iki 40 μm. Apibendrinant reikia pasakyti, kad, nepaisant panašumų, žmogaus ragenos vidinės sandaros struktūra yra sudėtingesnė nei šiame darbe susintetintų baltyminių hidrogelių.



53 pav. Žmogaus ragenos ir susintetintų kolageno hidrogelių vidinė morfologija, SEM nuotraukos. Bandinių pjūviuose matomos (A) žmogaus ragenos; (B) 18 % RHCIII-MPC hidrogelio, sutvirtinto EDC (RHCIII:MPC (m:m) = 2:1 ir EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,4:1), ir (C) 18 % RHCIII hidrogelio, sutvirtinto EDC (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0,4:1), sluoksninė struktūra. Rodyklės žymi skersines skaidulas

Priežastys, kodėl sintezės metu sluoksninės struktūros formuojasi RHCIII ir RHCIII-MPC hidrogeliuose, nėra aiškios. Vienas galimas paaiškinimas, kad dėl didelės kolageno koncentracijos ir uždaros maišymo sistemos kolagenas persisluoksniuoja dėl šlyties jėgų, veikiančių maišymo metu. Mūsų atveju prieš išliejimą į formą kolagenas su priedais yra maišomas sistemoje iš švirkštų, sujungtų kampu [8], dėl to bandinyje kyla šlyties jėgos. Taip pat liejimo metu išmaišytas kolagenas su priedais yra suspaudžiamas formoje, kur susidaro papildoma suspaudimo ir šlyties jėga. Daugiau apie šiuos mechanizmus rašoma Ruberto grupės publikacijose [214][223].

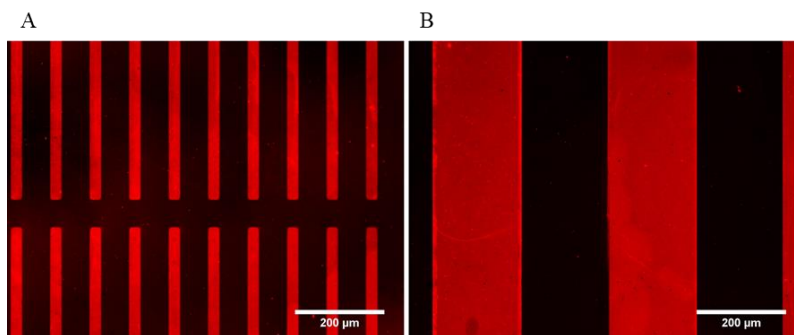
Antro tinklo (MPC) įterpimas į RHCIII-MPC hidrogelį pildomai suformavo skersines siūlinio tipo skaidulas tarp kolageno sluoksnių. Šios skaidulos susidaro dėl radikalinės polimerizacijos tarp MPC monomerų ir PEGDA, kaip kolageno makromolekulių rišiklis, naudojant APS/TEMED iniciatorių sistemą. Šios smulkios tarp sluoksninės skaidulos matomos tik RHCIII-MPC hidrogelių bandiniuose ir žmogaus ragenoje. Nors tarp sluoksnių struktūrų RHCIII-MPC hidrogeliuose ir buvo, žmogaus akies ragenos struktūra vis dėlto labai skiriasi ir joje matyti daugiau ir smulkesnių sluoksnių bei juos rišančių skaidulų.

4.2. Mikrolustinių struktūrų formavimas ant baltyminio hidrogelio paviršiaus

Mikrokontaktinis antspaudavimo metodas dažniausiai naudojamas baltymams arba kitoms biologinėms makromolekulėms ant fiziškai tvirto paviršiaus pernešti, formuojant lustinio (masyvų) tipo darinius ir atliekant funkcines modifikacijas dėl išlaikyto pernešamų molekulių biologinio aktyvumo [124][224]. Daugeliu mikrokontaktinio antspaudavimo taikymo atvejų, randamų literatūroje, kaip substratai buvo naudoti stiklas, silicis, auksas, įvairūs polimerai: PDMS, polistireno, PMMA (polimetilmetakrilatas) paviršiai [124][224][225]. Šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad mikrokontaktinis antspaudavimas gali būti sėkmingai naudojamas atkartojamam ECM imituojančių lustinio tipo struktūrų formavimui ant visiškai hidratuoto, baltyminio hidrogelio lakštų, savo matmenimis atitinkančių chirurgiškai pritaikomus implantus.

Optimizuotos sudėties RHCIII-MPC (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0,4) baltyminis hidrogelis buvo tinkamas mikrokontaktinio antspaudavimo procesui dėl jo gerų mechaninių savybių, aptartų prieš tai. Mikrokontaktinis antspaudavimas ir FN bei RHCIII molekulių *in situ* konjugavimas buvo atliekamas visiškai hidratuoto RHCIII-MPC hidrogelio paviršiuje, prieš tai hidrogelyje konvertavus karboksilo grupes į chemiškai aktyvesnes N-hidroksisuksiimido esterio grupes, panaudojus NHS/EDC reagentus (33A pav.). FN baltymų raštas ant tiriamo hidrogelio paviršiaus buvo suformuotas PDMS spaudu su paviršiaus topografijomis prieš tai padengtu FN tirpalu ir išdžiovintu azoto srove. Nuėmus spaudą, laisvos N-hidroksisuksiimido esterio grupės buvo blokuojamos PEG₃NH₂. FN struktūros ir FN aktyvumas buvo patikrinti anti-FN antikūnais, kurie atrankiai jungėsi būtent prie FN baltymų struktūrų (54A, B pav.). Optiniu mikroskopu išmatuoti gautų FN struktūrų matmenys ir palyginti su PDMS spaudu matmenimis. Gauti duomenys patvirtino efektyvią FN molekulių pernašą ir atsikartojimą ant hidrogelio paviršiaus. Standartinis FN struktūrų pločio nuokrypis nuo PDMS struktūrų buvo $\pm 0,8 \mu\text{m} - 30 \mu\text{m}$ struktūroms ir $\pm 2,6 \mu\text{m} - 200 \mu\text{m}$ struktūroms, t. y. FN mikrostruktūrų santykinis matmenų nuokrypis nuo spaudu ne didesnis nei 4 %. Geras spaudu formos atkartojimas parodė, kad nekontroliuojama FN molekulių difuzija ribiniame sluoksnyje ant iš dalies išdžiovinto kolageno hidrogelio paviršiaus buvo minimali. Bandiniuose su 30 μm FN struktūromis antspauduotas paviršiaus plotas buvo apie 37 % viso bandinio paviršiaus ploto, o 32 % viso paviršiaus ploto sudarė kokybiškos struktūros. Bandiniuose su 200 μm FN linijomis antspauduotas plotas buvo apie 40 %, atitinkamai 26 % viso bandinio ploto dengė kokybiškos struktūros. Sprendžiant iš fluorescencinės mikroskopijos vaizdų,

kokybiškose FN struktūrose baltymo pasiskirstymas buvo tolygus, be didesnių struktūrinių defektų.



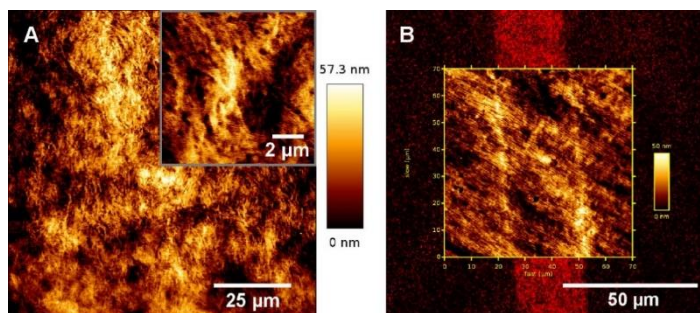
54 pav. Mikrokontaktinio antspaudavimo metodu suformuotos FN mikrostruktūros ant RHCIII–MPC hidrogelio paviršiaus. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos 30 µm (A) ir 200 µm (B) FN struktūrų vizualizuotų naudojant anti-FN antikūną

Taip pat verta paminėti, kad antspauduoti pasirinktas RHCIII–MPC (RHCIII–18/MPC(2/1)-EDC0,4) hidrogelis, turintis $85,5 \pm 0,2$ % vandens, kurio atsparumas tempimui ($2,12 \pm 0,18$ MPa) ir elastingumas ($9,46 \pm 3,58$ MPa) yra panašūs į PDMS atsparumą tempimui (2,24 MPa) ir elastingumą ($0,360 - 0,870$ MPa) [226].

4.3. Baltyminių hidrogelių paviršiaus tyrimai AJM

Mikrokontaktinio antspaudavimo įtaka visiškai hidratuotam RHCIII–MPC (RHCIII–18/MPC(2/1)-EDC0,4) hidrogeliui buvo tiriama AJM. Natyvūs ir chemiškai blokuotų baltyminių hidrogelių paviršiai pasižymėjo netolygumu, paviršiuje buvo matomos netolygiai orientuotos klostės/gijos (55A pav.). Paviršiaus šiurkštumas (S_q) 2×2 µm skenavimo plote siekė 3,5 nm. Skenavimo laukai ant bandinių su fibronektino struktūromis (FN ir BSA-TR[®]) pasirinkti pasinaudojant AJM sistemoje integruotu fluorescenciniu mikroskopu taip, kad viename skenavimo lauke būtų ir FN struktūra, ir chemiškai blokuoto hidrogelio paviršiaus fragmentas. Topografinėse nuotraukose, darytose po antspaudavimo ir blokavimo žingsnių, kolageno skaidulos hidrogelio paviršiuje atrodė labiau orientuotos (55B pav.), palyginti su pradiniu hidrogelio paviršiumi (55A pav.). Tačiau detalesnė kolagenų skaidulų analizė nebuvo atlikta dėl AJM skiriamosios gebos apribojimų. Nebuvo nustatyta ir didesnio aukščio skirtumo tarp FN antspauduoto ir neantspauduoto paviršiaus ploto, tikriausiai dėl didelio pradinio paviršiaus šiurkštumo ir tikėtina plono, artimo molekulių monosluoksniui, FN sluoksniui. Tačiau buvo matomas nežymus paviršiaus

topografinis iškilimas (aukščio padidėjimas) antspaudavimo vietos kraštuose, riboje tarp antspauduotos ir neantspauduotos zonos. Paviršiaus šiurkštumas (S_q) FN antspauduotame ir nepaveiktame laukuose buvo panašus, atitinkamai 1,3 nm ir 1,4 nm. Gautose AJM nuotraukose matyti, kad mikrokontaktinis antspaudavimas tik šiek tiek pakeitė hidrogelio topografiją, tačiau kiti duomenys (fluorescencinė mikroskopija, ląstelių adhezija) patvirtino, kad atliktos modifikacijos visiškai užtenka gauti biologinių ląstelių atsaką.

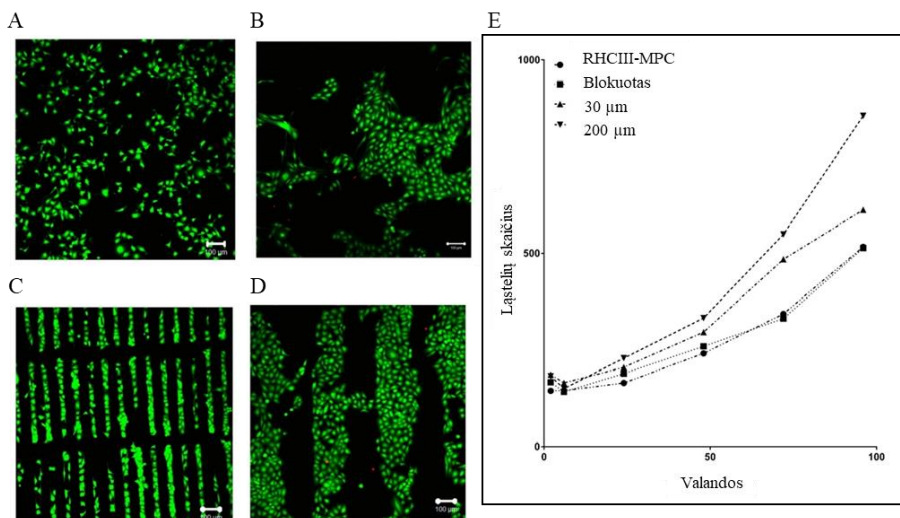


55 pav. RHCIII–MPC hidrogelio paviršiaus AJM tyrimai prieš mikrokontaktinį antspaudavimą ir po jo. Kontaktinio režimo AJM topografinės nuotraukos: pradinio hidrogelio paviršiaus (A), rodanti netolygią kolageno skaidulų orientaciją, ir FN struktūros ant hidrogelio paviršiaus (B) nuotrauka, suklotą su fluorescencine nuotrauka. Paviršiaus kolageno skaidulos atrodo labiau orientuotos

4.4. FN mikroformuotų baltyminių hidrogelių įtaka ląstelių elgsenai

Mikrokontaktinio antspaudavimo metodu suformuotos FN mikrostruktūros ant RHCIII-MPC (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0,4) hidrogelio buvo ištirtos su žmogaus akies ragenos epitelio ląstelėmis (HCEC). Kartu su 30 ir 200 μm FN linijų struktūromis ant RHCIII–MPC hidrogelio buvo tirta RHCIII–MPC hidrogelis ir RHCIII–MPC hidrogelis su PEG_3NH_2 blokuotomis karboksilo grupėmis kaip lyginamieji paviršiai. Standartinis gyvų/negyvų ląstelių dažymas buvo atliktas, norint įvertinti, ar hidrogelio paviršiaus struktūrizavimas FN neturi neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui. Negyvų ląstelių (fluorescuoja raudonai) bandiniuose nebuvo (arba tik pavieniai atvejai) (56A–D pav.). Žmogaus akies ragenos epitelio ląstelių proliferacijos ant skirtingų hidrogelio paviršių tyrimas parodė esant skirtumų tarp paviršių (56E pav.). Vienintelės dvi grupės, kur ląstelių augimo tempas nesiskyrė ($P > 0,05$), buvo pradinis ir PEG_3NH_2 blokuotas

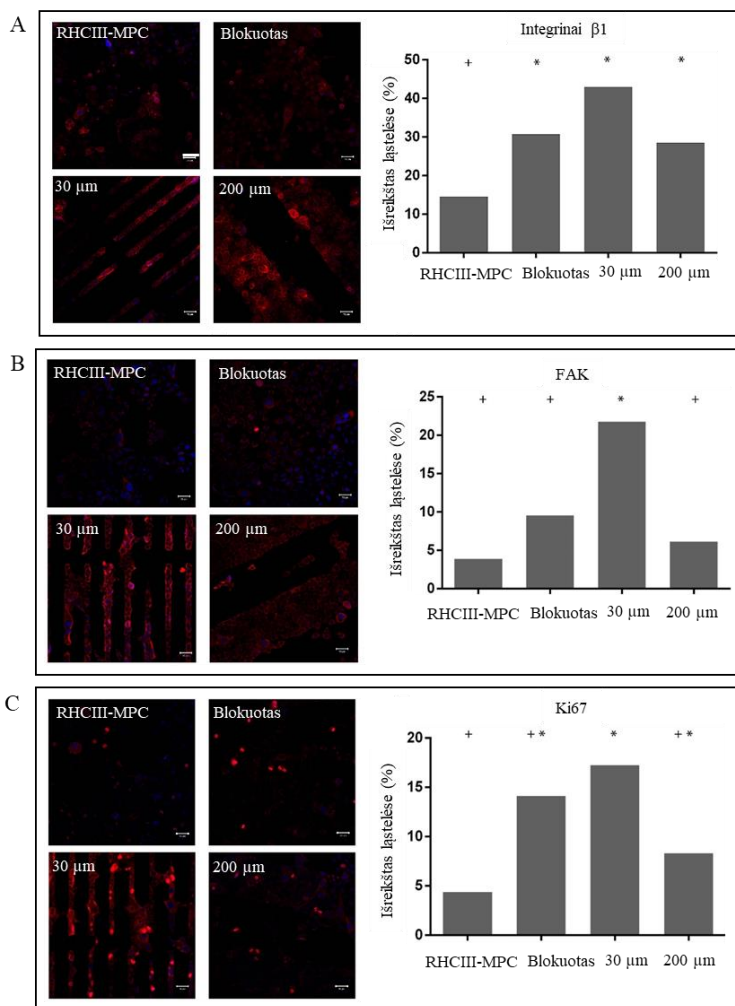
RHCIII–MPC hidrogelio paviršius. Greičiausiai ląstelės proliferavo ant paviršiaus su 200 μm pločio FN linijomis (56E pav.).



56 pav. Ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos palyginimas ant įvairių RHCIII–MPC hidrogelių: (A) natyvaus, (B) chemiškai blokuoto, modifikuoto su FN (C) 30 μm ir (D) 200 μm pločio linijų struktūromis. Ląstelės dažytos gyvų/negyvų ląstelių dažais, žaliai fluorescuoja gyvos, raudonai – negyvos ląstelės. Skalė 100 μm . (E) Kelių dienų ląstelių proliferacija ant skirtingų hidrogelio paviršių parodyta grafike

Ląstelių elgsena ant skirtingai modifikuotų hidrogelio paviršių buvo tirama, vertinant integrinų (integrin $\beta 1$) šeimos receptorių raišką. Integrinai dalyvauja ląstelių jungimosi prie tarpląstelinio užpildo baltymų, tokių kaip kolagenas ir FN, procese. Žaizdos gijimas yra susijęs su $\beta 1$ integrinų ir FN sąveika. Ragenos epitelio ląstelės gamina $\beta 1$ integrinus ir su jų pagalba migruoja per žaizdoje išskirtą fibronektiną. Po sugijimo integrinų ir fibronektino išskyrimas sumažėja [190].

Mūsų eksperimente HCEC ląstelės gamino integriną $\beta 1$ visų tiriamų tipų bandinių grupėse. Integrino $\beta 1$ kiekis ląstelėse ant PEG₃NH₂ blokuotų bandinių ir bandinių su 30 μm ir 200 μm pločio FN linijų struktūromis buvo didesnis negu ląstelėse, augusiose ant nemodifikuotų pradinių RHCIII-MPC hidrogelio paviršių (57A pav.). Didžiausiu integrino $\beta 1$ kiekiu pasižymėjo ląstelės ant 30 μm pločio FN linijų, bet skirtumas, palyginti su ląstelių, augusių ant 200 μm pločio FN linijų ir ant blokuoto paviršiaus, integrino kiekiu, nebuvo patikimas ($P > 0,05$).



57 pav. Imunocitocheminė analizė. HCEC ląstelių gaminamų (A) integrinų $\beta 1$, (B) FAK ir (C) Ki67 žymenų dažymas imunocitochemiškai (raudona fluorescencija), ląstelių branduoliai nudažyti DAPI (mėlynai). Fluorescencinėse nuotraukose ląstelės ant hidrogelio paviršių, kairėje pusėje viršuje – pradinis, dešinėje – blokuotas, pačioje kairėje pusėje – su 30 μm FN struktūromis, dešinėje su 200 μm FN struktūromis. Skalė 50 μm . Grafikuose pavaizduotas ląstelių, kurios turi žymenų arba ženklų jų padidėjimą, santykis su bendru ląstelių skaičiumi: (D) integrino $\beta 1$, (E) FAK and (F) Ki67. Stulpeliai, pažymėti vienodais simboliais (* ar +), rodo, kad nėra patikimo skirtumo tarp bandinių ($p > 0,05$, Tukey testas). Stulpelių, pažymėtų skirtingais simboliais, skirtumas tarp bandinių patikimas ($p \leq 0,05$). Skalė 50 μm .

Baltymo FAK raiška labai skyrėsi bandiniuose su 30 μm FN linijomis ($P \leq 0,05$), palyginti su kitų bandinių grupėmis (57B pav.). Iš literatūros žinoma, kad $\beta 1$ integrino FAK signalas inicijuoja plaučių vėžio ir kitų ląstelių, mūsų atveju ragenos epitelio ląstelių, proliferaciją [227].

Imunocitocheminis baltymo Ki67, susijusio su ląstelių proliferacija, tyrimas parodė, kad grupėje su 30 μm FN struktūromis ši žymenį turinčių ląstelių santykis su visomis ląstelėmis yra daug didesnis nei kitose grupėse (57C pav.).

Mūsų tiriamuosiuose hidrogelio bandiniuose su 30 μm pločio FN struktūromis ląstelės pasižymėjo didesne $\beta 1$ integrino, FAK ir Ki67 (57 pav.) baltymų raiška, palyginti su kitais bandiniais. Tai rodo, kad FN struktūros geometrija daro įtaką ląstelių elgsenai. Mūsų eksperimente ląstelės gausiausiai augo ir proliferacijos žymens Ki67 raiška buvo didžiausia ant 30 μm pločio FN struktūrų (57 pav.). Vis dėlto, skaičiuojant ląsteles ploto vienetą, t. y. ląstelių tankį, didžiausias tankis nustatytas 200 μm FN linijų struktūrų. Tokius rezultatus galėjo lemti plačių 200 μm FN linijų struktūrų aplinka, kur ląstelės geriau organizuoja savo kolonijas. O ant 30 μm pločio FN struktūrų ląstelės teturėjo dvi gretimas ląsteles, be to, dalis jų galėjo migruoti. Panašu, kad skirtingos adhezijos sąlygos, FN struktūrų apibrėžta ląstelių kolonijų ir pačių ląstelių forma bei tolesnė ląstelių saviorganizacija lemia skirtingą ragenos epitelio ląstelių morfologiją, funkcionalumą ir proliferaciją ant skirtingo paviršiaus baltyminių hidrogelių.

Rezultatai rodo, kad RHCIII-MPC hidrogelis yra gera platforma ląstelėms auginti ir ląstelių morfologija ir elgsena gali būti valdomos panaudojant FN struktūras. Anksčiau buvo parodyta, kad mikrostruktūros gali būti naudojamos ląstelių architektūrai kontroliuoti ir diferenciacijai, o nanometrinių matmenų topografijos yra svarbios ląstelių migracijai [228] bei turi įtakos mitozei [208]. Šie tyrimai rodo, kad baltyminiai hidrogeliai, susidedantys iš biosintetinio žmogaus kolageno ir sintetinio fosforilcholino, nepaisant net 85 % jo sudėties sudarančio vandens, tinka atlikti tolesnę hidrogelių funkcinių modifikavimą naudojant mikrokontaktinį antspaudavimą.

4.5. Išvados

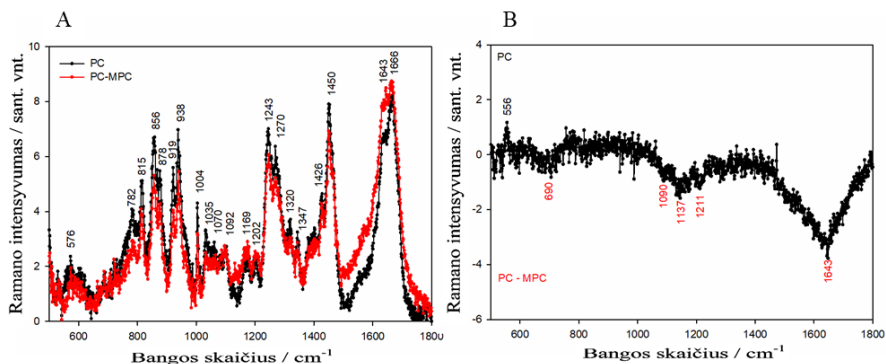
1. Akies ragenos implantų gamybai optimizuotas RHCIII-MPC (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0,4) baltyminis hidrogelis, nepaisant savo skaidulinės struktūros ir $85,5 \pm 0,2$ % vandens kiekio, gali būti modifikuojamas kontaktinės litografijos būdu, sukuriant netopografines fibronektino mikrostruktūras, kurios atkartoja spaudo rašto matmenis 27–192 μm ruože su ne didesniu nei 4 % santykiu nuokrypiu.

5. CHEMIŠKAI SUSIŪTO KOLAGENO HIDROGELIŲ SAVYBĖS IR JŲ PRITAIKYMAS MIKROTOPOGRAFIJOMS FORMUOTI

Paskutinė šio darbo dalis buvo susijusi su trimačių (toliau – 3D) hidrogelio struktūrų pagaminimu ir elastomechaninių savybių ištyrimu, siekiant sukurti naujos kartos karkasus audinių inžinerijai, mikroskysčių ir mikroelektromechaninėms sistemoms (MEMS). Kaip modelinė medžiaga struktūroms formuoti buvo pasirinktas PC-MPC (PC-12/MPC(2/1)-EDC0,7) [229] baltyminis hidrogelis, turintis savo sudėtyje medicininio grynumo I tipo kolageno. Klinikiniuose taikymuose jau išbandytas RHCIII kolagenas šiame darbe nebuvo naudotas dėl didelės kainos ir sudėtingos jo įsigijimo procedūros (intelektualinės nuosavybės). Savybėms palyginti taip pat buvo pagaminti ir tirti PC (PC-12-EDC0,7) baltyminiai hidrogeliai. Pasirinkta 12 % pradinio PC tirpalo koncentracija, tai palengvino paties baltyminio hidrogelio gamybą ir leido sėkmingai formuoti PC-MPC baltyminio hidrogelio topografines struktūras. Šiame darbe PC-MPC ir PC hidrogeliai buvo ištirti Ramano spektrometrija, taip pat nustatytos hidrogelių paviršiaus mechaninės savybės naudojant AJM. Išbandytos PC-MPC hidrogelio galimybės formuoti mikrotopografijas sintezės šablonuose būdu. Suformuotos ir įvertintos mikroskopinės ir submikroskopinės hidrogelio topografijos. Buvo parodyta, kad PC-MPC hidrogeliai gali būti panaudoti kaip 3D karkasai ląstelėms auginti su nanometrų tikslumu pagaminamomis topografijomis. Taip pat išbandyta suformuotų mikrotopografijų įtaka žmogaus odos fibroblastams augti.

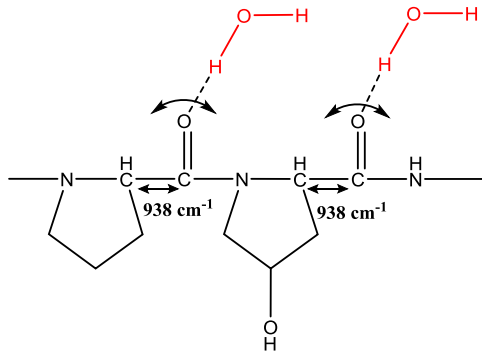
5.1. Natyvaus kolageno hidrogelių sudėties ir elastomechaninių savybių registravimas

Dirbant su baltyminiais hidrogeliais yra svarbu užtikrinti tinkamą cheminę sudėtį, vidinę ir paviršiaus struktūrą bei mechanines savybes. Visi šie sudedamieji elementai yra svarbūs, norint sukurti tinkamus mikroskysčių ir MEMS ląstelių tyrimams ar audinių modelius, nes ląstelės yra jautrios visiems paminėtiems cheminiams ir fizikiniams parametrams. Todėl svarbu turėti tyrimų sistemas, kurios leistų analizuoti ir parametrizuoti baltyminius hidrogelius darbinės, t. y. visiškai hidratuotos, būsenos. Tuo tikslu tiriami hidrogeliai analizuoti Ramano spektrometrijos metodu. Skirtingai nei IR spektroskopija, Ramano spektrometrijos metodas leidžia užrašyti PC-MPC hidrogelio spektrus esant jam įprasto, visiškai hidratuoto būvio. Buvo užrašyti ir palyginti dviejų hidrogelio formuliacijų, PC ir PC-MPC, Ramano spektrai.



58 pav. Sukloti (A) ir skirtuminis (B) PC ir PC-MPC hidrogelių Ramano sklaidos spektrai

Paveiksle (58 pav.) pateikti tipiniai PC ir PC-MPC hidrogelio Ramano spektrai po bazinės linijos korekcijos. Kaip ir tikėtasi, abiejų hidrogelių intensyviausi yra kolageno amido I ryšio signalai ties 1666 cm^{-1} , atitinkantys $\text{C} = \text{O}$ valentinius virpesius iš atsikartojančio peptidinio tripleto Gly-X-Y, čia dažniausiai X vietą užima prolinas, Y – hidroksiprolinas. Priklausomai nuo X ir Y pakaitų ir jų santykio šio ryšio smailės gali pasislinkti. Pavyzdžiui, I tipo kolageno, išskirto iš žiurkės uodegos, šis signalas yra ties 1666 cm^{-1} , o gryno IV tipo kolageno – ties 1673 cm^{-1} [230]. Du virpesiai, ties 1244 cm^{-1} ir 1270 cm^{-1} , yra amido III ryšio regione ir yra susiję su dvifaze trigubos spiralės struktūros prigimtimi, pvz., prolino turinčių ir prolino neturinčių grandinės fragmentų sąveikų [231]. Prolino ir hidroksiprolino žiedų virpesiai nustatyti $820\text{--}985\text{ cm}^{-1}$ regione. Hidroksiprolino žiedo virpesys yra ties 878 cm^{-1} . 856 ir 919 cm^{-1} vibracijos kyla iš prolino žiedo [232]. Skirtuminiame spektre matomas hidroksiprolino virpesys ties 1211 cm^{-1} . Prisimintina, kad pagal sudėtį PC hidrogelyje kolageno yra apie $10 \pm 2\%$ daugiau negu PC-MPC hidrogelyje. Kolageno kiekį tiesiogiai galima susieti su hidroksiprolino ir prolino kiekiu, o tai atitinkamai tiesiogiai paveikia Ramano sklaidos intensyvumo padidėjimą. Tačiau spektruose matome priešingą efektą. Tai galima paaiškinti tuo, kad PC-MPC yra stipresnė vandenilinė hidroksiprolino sąveika su kitomis hidrogelio funkcinėmis grupėmis, pvz.: PEG ar fosforilcholino grupėmis. Todėl medžiaga pasižymi sąlygiškai tankesne sandara, su mažiau defektų, dėl to virpesio pozicija pasislenka į didesnių bangos skaičių pusę (nuo 1202 cm^{-1} iki 1211 cm^{-1}). Todėl PC-MPC hidrogelyje hidroksiprolino virpesio indėlis į Ramano sklaidą yra didesnis. Matomą 938 cm^{-1} modą galima priskirti prie C-C grupės valentinio virpesio Gly-X-Y grandinėje (59 pav.) [232].



59 pav. Schema, iliustruojanti galimą santykinio drėgnumo hidrogelio disko viduje įtaką 938 cm^{-1} virpesio modai

Šis virpesys yra jautrus santykinėi drėgmei hidrogelio viduje ir gali būti panaudotas medžiagoje įterptam vandens kiekiui nustatyti. Skirtuminiame spektre (58B pav.) 938 cm^{-1} virpesio modos nematoma. Galima teigti, kad abiejų hidrogelių viduje įterpto vandens kiekis yra labai panašus. Virpesiai ties 1001 ir 1031 cm^{-1} priskiriami fenilalanino žiedo vibracijoms. Signalas ties 815 cm^{-1} yra C-O-C valentinis virpesys, kuris galimai yra susijęs su sąveikomis kolageno triguboje spiralėje [230]. Lyginant PC ir PC-MPC Ramano sklaidos spektrus, aiškiai matyti kolageno struktūros elementų signalai abiejuose hidrogeliuose. Atėmus iš PC hidrogelio spektro PC-MPC hidrogelio spektrą, išryškėjo keli nauji signalai. PC hidrogelyje dominuoja 556 cm^{-1} signalas, kurį galima priskirti (COO^-) grupei (58B pav.). PC-MPC hidrogelyje dominuoja keletas signalų. Vienas iš jų yra deformacinė O-C-O moda ties 690 cm^{-1} . Signalas ties 1090 cm^{-1} yra susijęs su O-P-O fragmento virpesiais grandinėje. Virpesys ties 1137 cm^{-1} priskiriamas C-C valentiniam virpesiui grandinėje. 1643 cm^{-1} yra amido I virpesys (C = O fragmento), kai struktūra yra netvarkinga. PC-MPC hidrogelio dominuojantys virpesiai atsiranda dėl esančių funkcinių grupių MPC struktūroje ir jo įtraukimo į hidrogelio sudėtį.

Hidratuotų PC-MPC ir PC hidrogelių elastomechaninės savybės buvo ištirtos AJM, registruojant paviršiaus atsaką į mechaninį spaudimą modifikuotu AJM zonu (žinomo skersmens SiO_2 mikrosfera). Kiek žinoma, tokių PC ir PC-MPC hidrogelių paviršiaus nanoskopinių savybių tyrimų anksčiau nebuvo atlikta. Jie yra įdomūs, nes parodo, kokį elastingumą, tikėtina, jaučia ląstelės adhezijos ir augimo metu. PC-MPC hidrogelio standumo (Jungo) modulis E buvo $0,195 \pm 0,027\text{ MPa}$, mažesnis nei PC hidrogelio, kurio E $0,367 \pm 0,063\text{ MPa}$ (2 lentelė). Paminėtina, kad šie duomenys skyrėsi nuo tempimo metodu makroskopiškai matuotų hidratuotų PC-MPC ir PC hidrogelių mechaninių savybių, kur standumo modulis atitinkamai buvo $0,87$ ir $2,09\text{ MPa}$ [229]. Lyginant šiuos duomenis matoma tendencija, kad PC-MPC hidrogeliai pasižymi apie du kartus mažesniu

standumu nei PC hidrogeliai. Reikia paminėti, kad dermio sluoksnio žmogaus odoje standumo modulis yra nuo 150 iki 320 kPa [233], tad PC-MPC hidrogelio mechaninės savybės yra tinkamos dirbtinei odai formuoti.

2 lentelė. PC ir PC-MPC hidrogelių standumas (E), nustatytas AJM, bei jo palyginimas su literatūros duomenimis [229]

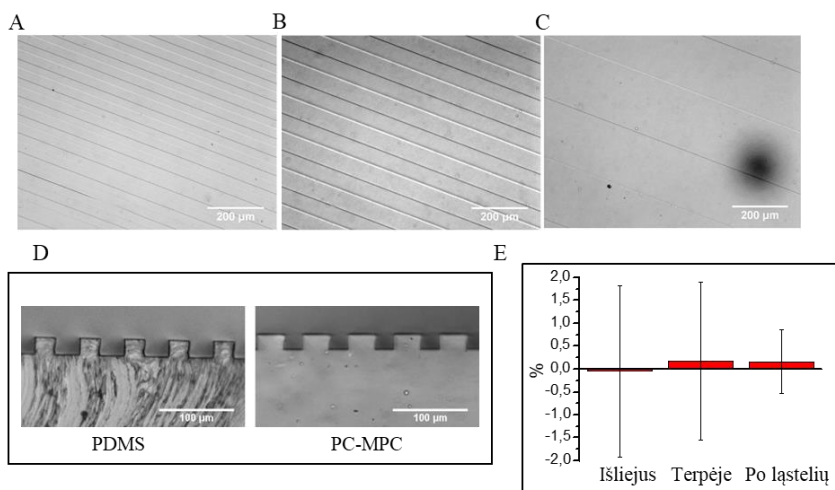
	E matuotas AJM (MPa)	E (MPa) [229]
PC	0,367 ± 0,063	2,09
PC-MPC	0,195 ± 0,027	0,87

5.2. Kolageno hidrogelio topografijų

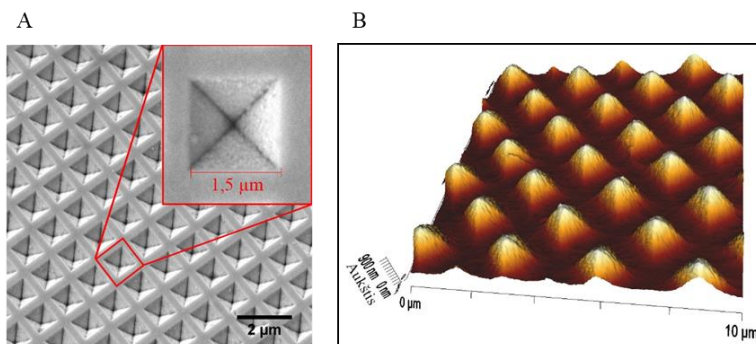
mikroformavimas

Liejimo ir sintezės formai buvo pasirinkti įvairūs šablonai iš PDMS medžiagos, o nanostruktūrų topografijoms lieti – auksu dengtas silicio substratas. Pasirinktus mikrometrinių dydžių PDMS šablonus sudarė 200, 60, 30 μm pločio ir 20 μm gylio formos. Hidrogelis buvo liejamas ant formų su topografijomis, vėliau atliekamas cheminis susiuvimas. PC-MPC hidrogelis po liejimo ir susiuvimo procedūros buvo mechaniškai tvirtas ir beveik idealiai atkartojė šablono formą (60 pav.). Hidrogelio topografijų matmenys ir stabilumas palyginti matuojant iškart po sintezės, po 24 val. laikymo ląstelių augimo terpėje 37 °C temperatūroje inkubatoriuje ir praėjus 24 val. po ląstelių užsėjimo ir tripsinizavimo (fermentinio veikimo). Medžiagos apžiūrėtos optiniu mikroskopu ir buvo vertinamas struktūrų dydis. Gauti duomenys pateikiami (60 pav.). Grafike (60E pav.) pateikiami struktūrų dydžio santykiniai (%) nuokrypiai nuo šablono dydžių. Iš matavimo rezultatų matyti, kad hidrogelis inkubatoriuje ir su ląstelėmis šiek tiek išbrinksta, bet mikrotopografijų matmenų pokytis yra minimalus ir nesiekia 2 % nuo šablono dydžių

Technologiniu požiūriu yra svarbus hidrogelio gebėjimas išlaikyti formą ne tik mikrometrų, bet ir mažesnių matmenų. Todėl toliau buvo bandoma įvertinti PC-MPC hidrogelio gebėjimą atkartoti kietakūnio šablono geometriją, turinčią dešimčių nanometrų eilės elementus. Pasirinktas spektroskopijoje naudojamas auksu dengtas silicio šablonas su piramidžių pavidalo duobutėmis, kur piramidės pagrindo kraštinė yra apie 1,5 μm ir smailėja iki nm dydžio (tikslų dydį sunku įvertinti mūsų turima matavimo įranga)(61A pav.). Naudojant šį šabloną liejimo/polimerizavimo būdu buvo pagamintas antrinis elastomerinis PDMS šablonas, kurio paviršiaus geometrija buvo tirta AJM (61B pav.).



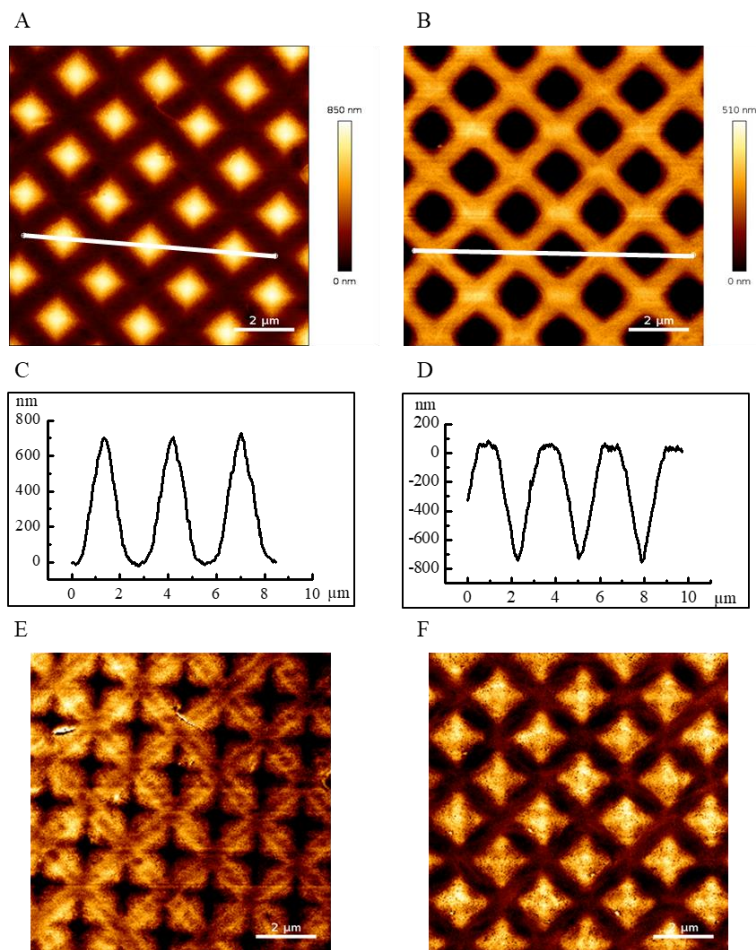
60 pav. Skirtingų mikrostruktūrų, pagamintų ant hidrogelio paviršiaus, pavyzdžiai, vaizdinti šviesiame lauke. A – 30 μm pločio, B – 60 μm , C – 200 μm grioveliai. D – PDMS šablono skersiniai pjūviai su 30 μm pločio grioveliais, palyginti su nuo jo lieto PC-MPC hidrogelio pjūviais. E – santykinis hidrogelio struktūrų matmenų nuokrypis nuo šablono matmenų



61 pav. Mažiausių šablonų, išbandytų kolageno hidrogelio sintezėje, topografinė analizė. A – auksu dengto silicio šablono SEM nuotrauka, B – iš (A) liejimo-polimerizavimo būdu pagaminto PDMS šablono AJM nuotrauka

Ant šių šablonų buvo vykdoma PC-MPC hidrogelio polimerizacija, naudojant 2.6 skyrelyje aprašytą įprastinę metodiką. Gautos PC-MPC hidrogelio paviršiaus topografijos – smailių ir grotelių pavidalo struktūros (62 pav.). Tokių hidratuotų bandinių topografija buvo tiriama AJM. Nustatyta, kad hidrogelis pakankamai gerai atkartoją pasirinkto šablono

matmenis, nepaisant to, kad medžiaga turi apie 90 % vandens. Nanosmailių galiukų vidutinis kreivumo spindulys (angl. *Radius of curvature*) RoC siekė 242,4 nm, o nanoduobutėse šis dydis buvo 253,4 nm. Toks nedidelis skirtingų struktūrų kreivumo spindulio skirtumas parodo, kad abu ypač mažomis paviršiaus topografijomis pasižymintys šablonai, kietakūnis auksu dengtas ir elastomerinis PDMS, yra tinkami PC-MPC hidrogelio nanotopo grafinių struktūrų *in situ* cheminiam susiuvimui ir formavimui. Literatūroje nepavyko rasti iš kolageno ar kitų ECM baltymų susintetinto hidrogelio,



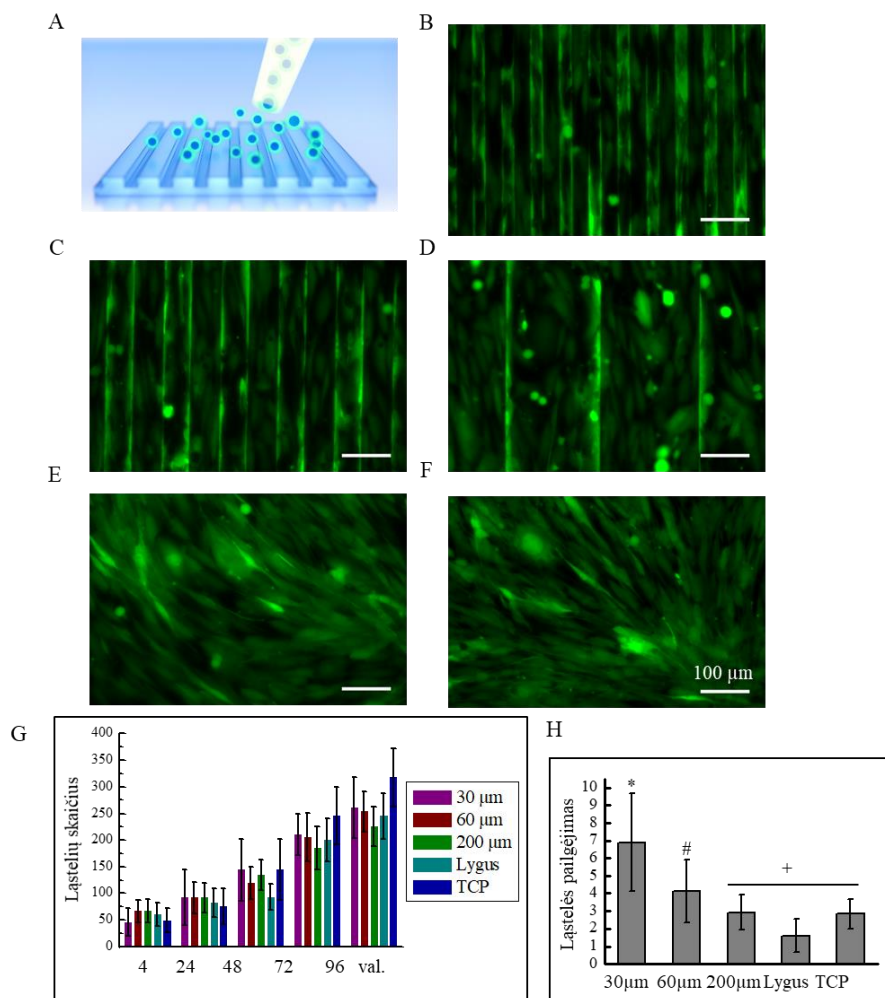
62 pav. Detalesnės mažesnių topografijų turinčio PC-MPC hidrogelio paviršiaus AFM analizė: nanosmailės (A) ir nanoduobutės (B). Suformuotų hidrogelio struktūrų skerspjūviai: (C) nanoskylių ir (D) nanoduobelių. Kokybinės standumo nuotraukos taip pat rodo hidrogelį su nanosmailėmis (E) ir nanoduobutėmis (F) (tamsi spalva žymi mažesnę standumą)

kuris demonstruotų tokias geras submikrometrinio formavimo galimybes. Dažniausiai aptinkamos medžiagos tokio dydžio topografijoms formuoti yra kietos medžiagos [85][234][148] arba sintetinės polimerinės medžiagos [94][235][236]. Siekiant įvertinti pirmiau aprašytų struktūrų nanoelastomechanines savybes, buvo atlikti AJM tyrimai skystyje naudojant jėgos kreivių spektroskopija pagrįstą matavimo režimą. Paveiksluose (62E, F pav.) pateikti duomenys rodo kokybinius paviršiaus standumo vaizdus, kurie atskleidžia, kad gautos nanosmailės pasižymi mažesniu standumu nei pats hidrogelinis pagrindas. Nanoduobučių (invertuotų piramidžių) topografijos atveju, jų dugnas yra kietesnis, palyginti su paviršiuje esančiomis grotelių struktūromis. Pažymėtina, kad šis nanomechaninių savybių pasiskirstymas atsiranda ne dėl medžiagos savybių, bet dėl struktūrų geometrijos.

5.3. Ląstelių sąveika su kolageno hidrogelio mikrotopografijomis

Gautos PC-MPC hidrogelio mikrotopografijos yra patrauklios biofizikiniams žinduolių ląstelių tyrimams imituojant natyvias audinių sąlygas, taip pat audinių inžinerijai. Todėl jų įtaka žmogaus odos fibroblastų ląstelių proliferacijai ir formai buvo vertinama ląstelių kultūrose ant 30 μm , 60 μm , 200 μm pločio ir 25 μm gylio linijų pavidalo topografijų bei lygaus paviršiaus PC-MPC hidrogelio bandinių. Ląstelės ant bandinių buvo auginamos 96 val., vėliau vertinama ląstelių proliferacija. Nustatyta, kad ląstelės po užsėjimo ir adhezijos prigludo išilgai linijinių hidrogelio struktūrų, dažniausiai ties struktūrų briaunomis (63 pav.). Ant lygių hidrogelių ir 200 μm pločio linijų hidrogelio struktūrų ląstelės skleidėsi laisvai, įprastinėms ląstelių kultūroms būdinga atsitiktine forma. Iš literatūros yra žinoma, kad paviršiaus topografija turi įtakos ląstelės citoskeleto architektūrai ir augimui [237]. Iš tiesų, ant topografinių struktūrų briaunų augančios ląstelės pasižymėjo didesne GFP baltymo raiška (patvirtinta registruojant fluorescenciją) negu lygiuose plotuose esančios ląstelės. Tai galima paaiškinti tuo, kad trimatėje erdvėje ląstelės tūris yra labiau koncentruotas negu plokštumoje augančių ląstelių. Dauguma ląstelių ant 30 μm ir 60 μm pločio linijų struktūrų auga struktūrų apačioje, nemigruodamos, o užimdamos struktūrų briaunas. Kitų tyrėjų duomenys rodo, kad toks elgesys gali būti būdingas normalioms, nevėžinėms ląstelėms [238].

Supratimas apie ląstelės ir aplinkos sąveiką yra ypač svarbus praktinei gyvų audinių inžinerijai. Įprastas kiekybinis metodas ląstelės formos pasikeitimams vertinti yra ilgosios/trumposios ašies santykis (AR)[239]. Sukurtuose modeliuose taip pat buvo matuotas šis santykis ir fenomeno-



63 pav. *Imortalizuotų ląstelių (HDF-GFP) kultūros ant lygaus ir topografiškai pakeisto PC-MPC hidrogelio. A – eksperimento schema. Hidrogeliai su 30 μm (B), 60 μm (C) ir 200 μm (D) pločio grioveliais, lygaus paviršiaus hidrogelis (E) ir kontrolinis TCP eksperimentas (F) su ląstelėmis po 96 val. nuo užsėjimo. G – ląstelių proliferacijos duomenys, kur lyginamos naudotos topografijos ir paviršiai. H – ląstelių formos (pailgėjimo) skirtinguose grioveliuose analizės duomenys. Tarp stulpelių pažymėtais skirtingais simboliais statistiškai įvertintas skirtumas tarp bandinių patikimas ($p < 0,01$, ANOVA), o tarp stulpelių, pažymėtų „+“, statistiškai patikimo skirtumo nebuvo*

logiškai vertinta ląstelės forma. Ant 30 μm pločio linijų topografijų daugiau ląstelių buvo pailgos formos (63H pav.), o linijoms plėtėjant (ant 60 ir 200 μm pločio struktūrų) pailgų ląstelių skaičius mažėjo. Mažiausiai pailgėjusių

ląstelių buvo ant lygaus PC-MPC hidrogelio paviršiaus. Įdomu, kad ląstelių formos auginant ant 200 μm pločio linijų yra panašios į ląstelių, įprastai auginamų ant TCP paviršiaus.

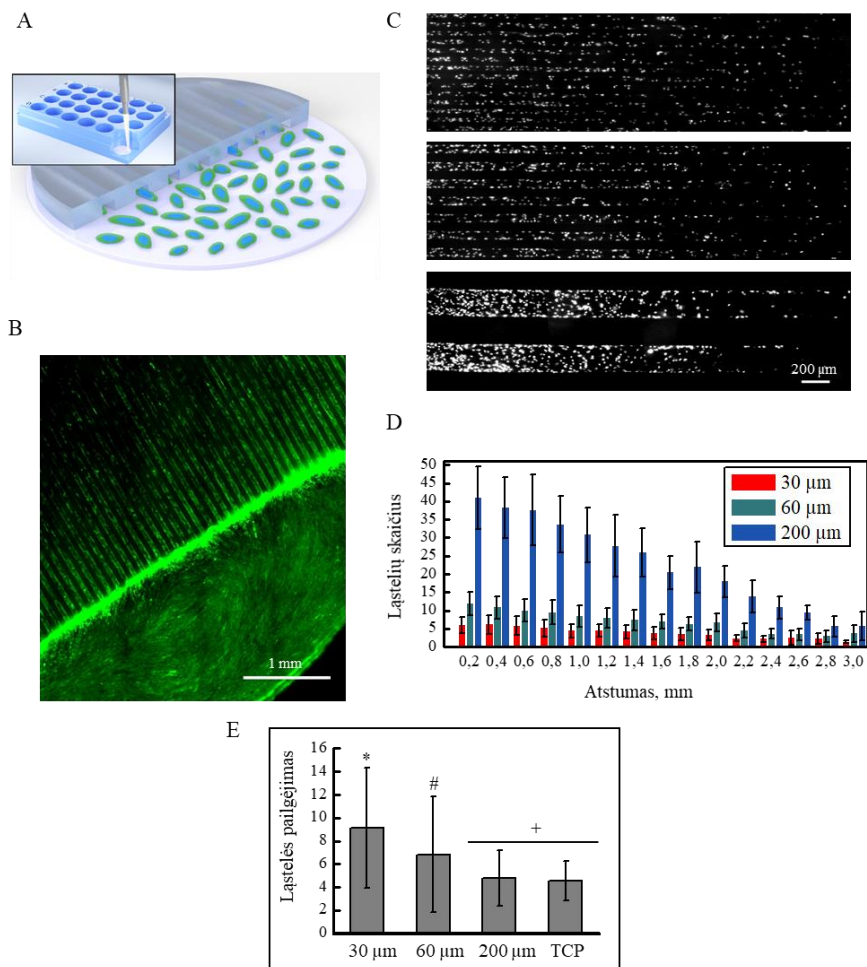
Gauti pirminio tyrimo rezultatai rodo, kad elastomechaniškai stabilus kolageninio hidrogelio mikrotopografijos moduliavimas leidžia orientuoti ląsteles, nustatyti augimo kryptį, kontroliuoti morfologiją, o tai labai reikalinga audinių inžinerijoje. Naudojant tokias medžiagas klinikoje labai svarbu, kad hidrogelio sudedamosios medžiagos būtų biologiškai tinkamos, nekeltų imuninių ir citotoksinių reakcijų, neturėtų nežinomų priedų.

5.4. Ląstelių elgsenos kolageninio hidrogelio mikrokanaluose tyrimas

PC-MPC hidrogelio bandiniai su 30 μm , 60 μm ir 200 μm pločio grioveliais buvo įvertinti dėl jų tinkamumo mikroskysčių sistemos gamybai – kaip kanalai ląstelių migracijos ir ląstelės morfologijos pokyčiui vertinti. Bandiniai su grioveliais buvo apversti grioveliais į apačią ir suguldyti į ląstelių auginimo šulinėlius (TCP). Tokiu būdu suformuoti 30 μm , 60 μm ir 200 μm pločio ir 25 μm aukščio mikrokanalai, kuriuose ląstelėms būtų sudaryta konkrečios 3D geometrinės formos, biochemiškai ir fiziškai (elastomechaniškai) optimizuota aplinka. Tokiose struktūrose jos gali sukibti su PC-MPC hidrogeliu, su TCP paviršiumi, viena su kita arba migruoti. Ląstelės buvo sėtos į prieš tai suformuotą specialią „parkavimo“ kišenę (64A pav.), tiesiai ant TCP paviršiaus, tikintis laipsniško migravimo gilyn į mikrokanalus. Migracijos efektyvumas po 120 val. buvo vertinamas skaičiuojant DAPI dažu nudažytus ląstelių branduolius 200 μm ilgio atkarpose, pasirinktose iš 3 mm ilgio mikrokanalų (64C pav.). Buvo apskaičiuotas statistinis ląstelių pasiskirstymas viename kanale. Nustatyta, kad 30, 60 ir 200 μm pločio mikrokanaluose ląstelių skaičius tolstant nuo sėjimo zonos atitinkamai mažėjo nuo 6 iki 1, nuo 12 iki 4, nuo 41 iki 6 ląstelių per 3 mm kanalų ilgį (64D pav.). Tai rodo, kad platesniais kanalais ląstelės migruoja toliau ir lengviau. Be to, naudojant gyvų/negyvų ląstelių dažymą, buvo vertintas ląstelių gyvybingumas mikrokanaluose. Jis visuose bandiniuose buvo labai panašus (duomenys nerodomi). Gauti rezultatai leidžia teigti, kad ląstelių gyvybingumas kanaluose yra toks pats didelis kaip ir įprastoje 2D ląstelių kultūroje. Tai netiesiogiai rodo, kad maisto medžiagos ir metabolitai gerai difunduoja per PC-MPC hidrogelį bei suformuota mikroskysčių sistema – kanalais. Ląstelių morfologijos pokyčiai, t. y. pailgėjimas, gausiausiai matomas 30 ir 60 μm pločio kanaluose, o 200 μm pločio kanaluose ir ant TCP ląstelės atrodė panašiai (64E pav.).

Pagaminti hidrogeliniai kontroliuojamo pločio kanalai ne tik leidžia stebėti ląstelių migraciją, bet ir, pasirenkant atitinkamą kanalų plotį, reguliuoti ląstelių tankį kanale. Todėl tokiuose biosintetiniuose modeliuose

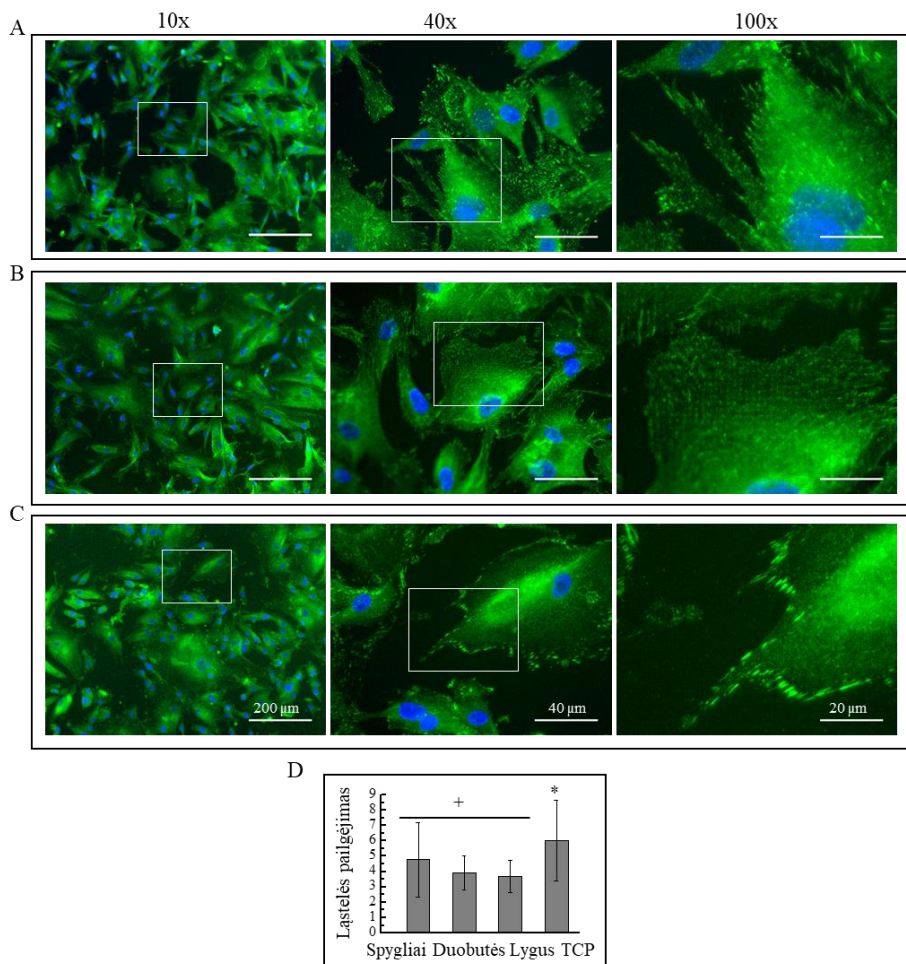
artimomis natyvioms sąlygomis galima tirti ląstelių atsaką į tiriamąsias medžiagas ar kitokius dirgiklius, atsivėlgiant į ląstelių tankį.



64 pav. Imortalizuotų ląstelių (HDF-GFP) kultūros PC-MPC hidrogelio mikrokanaluose. *A* – ląstelių sėjimo ir bandinių schema. *B* – jungtinė fluorescencinė ląstelių, imigravusių į PC-MPC hidrogelio mikrokanalus po 120 val. nuo užsėjimo, nuotrauka. *C* – ląstelių pasiskirstymas 30, 60, 200 μm pločio ir 3 mm ilgio mikrokanaluose, ląstelių branduoliai dažyti DAPI. *D* – statistinis ląstelių skaičiaus pasiskirstymas 30, 60, 200 μm pločio ir 3 mm ilgio mikrokanale, skaičiuojant ląsteles 200 μm ilgio atkarpose. *E* – ląstelių formos (pailgėjimo) analizės duomenys skirtinguose kanaluose. Tarp stulpelių pažymėtais skirtingais simboliiais skirtumas tarp bandinių patikimas ($p < 0,01$, ANOVA), o stulpeliai pažymėti + rodo, kad nėra patikimo skirtumo tarp bandinių ($p > 0,01$)

5.5. Ląstelių sąveika su submikroskopinėmis kolageno hidrogelių topografijomis

Taip pat įvertinome PC-MPC hidrogelio smailių ir duobučių nanotopografijų įtaką ląstelių adhezijai, palyginti su lygios topografijos hidrogelio paviršiumi ir TCP. Po 4 val. nuo užsėjimo daugiau ląstelių buvo



65 pav. Imortalizuotos ląstelės (HF) ant PC-MPC hidrogelio su nanotopografijomis po 4 val. nuo užsėjimo. Skirtingo didinimo fluorescencinėse nuotraukose matomas vinkulinas (žalia), branduoliai (mėlyna) ant smailių (A), duobučių (B) nanotopografijų ir lygaus (C) hidrogelio. Ląstelių formos (pailgėjimo) ant skirtingų paviršių analizės duomenys pateikiami grafike (D). Tarp stulpelių pažymėti skirtingais simboliais skirtumas tarp bandinių patikimas ($p < 0,01$, ANOVA), o stulpeliai, pažymėti +, rodo, kad nėra patikimo skirtumo tarp bandinių ($p > 0,01$)

prikibusių ant nanostruktūrizuoto hidrogelio paviršiaus, palyginti su lygiu ir TCP paviršiumi, bet skirtumas tarp skirtingų nanostruktūrų, t.y. smailių ir duobučių, buvo nedidelis. Ląstelės prisitaikė prie hidrogelio paviršiaus nanostruktūrų ir su jomis kontaktavo. (65 pav.) matoma, kaip ląstelių vinkulino baltymas, randamas fokalines adhezijos židiniuose, išsidėsto priklausomai nuo topografijos: tarp smailių struktūrų (65A pav.) arba duobutėse (64B pav.). O ant lygaus hidrogelio paviršiaus ląstelių vinkulino turinys pasiskirsto kaip įprasta, ląstelės atramos taškuose (65C pav.). Ląstelių formos analizė parodė, kad ląstelių pailgėjimas ant lygaus ar nanostruktūrizuoto hidrogelio yra mažesnis nei ląstelių, augančių ant TCP (65D pav.), t. y. ant plastiko ląstelės labiau išsitempia. AR santykio vidurkis odos fibroblastus auginant ant TCP yra $6 \pm 2,6$, o ant lygaus PC-MPC – $3,7 \pm 1,0$, paviršiaus su skylučių nanostruktūromis – $3,9 \pm 1,1$ ir su smailėmis – $4,8 \pm 2,4$. Šis skirtumas tarp TCP ir PC-MPC hidrogelių (su nanostruktūromis ir be jų) yra statistiškai patikimas (65D pav.). Toks AR santykio skirtumas atsiranda galimai dėl labai skirtingo paviršių elastingumo, t. y. PC-MPC jis yra apie 0,87 MPa, polistireno – apie 3000 MPa. O žymaus formos pokyčio tarp lygaus ir nanostruktūrizuoto PC-MPC hidrogelių nėra. Lyginant skirtingų struktūrų rezultatus pastebima, kad ant smailių nanostruktūrų ląstelės yra šiek tiek „šakotesnės“ ir labiau morfologiškai skirtingos (didesnis ląstelių pailgėjimo duomenų išsibarstymas). Literatūroje yra duomenų, kad AR santykis fibroblastuose tiesiogiai susijęs su fokaline adhezija [240].

Analizei pasirinkta po 50 individualių ląstelių nuo trijų skirtingų bandinių. Beveik visos ląstelės ant nanostruktūrizuotų paviršių pasižymėjo anksčiau aptartomis savybėmis.

Gauti rezultatai rodo, kad ląstelės stipriai reaguoja į PC-MPC hidrogelio nanotopografinį paviršių, ant jo pasiskleidžia sparčiau negu ant lygaus hidrogelio ar TCP. Tai rodo, kad ląstelės savo adheziniais baltymais sąveikauja su nanosmailių ir nanoduobučių struktūromis, tačiau sąveikos mechanizmui nustatyti reikia tolesnių tyrimų.

5.6. Išvados

1. PC-MPC baltyminis hidrogelis pasižymi valdoma chemine sudėtimi ir elastomechaninėmis savybėmis, kurios atitinkamai gali būti registruojamos Ramano spektroskopijos ir AJM metodais hidratuotame būvyje. Panašiai kaip ir sintetiniai elastomerai, PC-MPC hidrogelis yra technologiškai tinkamas mikrometrinėms ir mažesnių matmenų topografijoms bei įrenginiams formuoti liejimo-polimerizacijos būdu.

6. IŠVADOS

1. *In situ* HPMAA hidrogelio polimerizacija ant borosilikatinio stiklo paviršiaus efektyviai vyksta esant aldehido funkcinėms grupėms, tikėtina dėl ribiniame sluoksnyje atsirandančios efektyvesnės sąveikos su MAA.
2. Susintetintos 34 ± 9 nm storio HPMAA hidrogelio dangos ant borosilikatinio stiklo keičia savo brinkimo laipsnį nuo $1,5 \pm 0,3$ iki $3,0 \pm 0,1$, vandeninio tirpalo pH atitinkamai kintant nuo 4,0 iki 8,0.
3. Prie HPMAA hidrogelio dangos ant stiklo chemiškai prisiūtos fibronektino mikrostruktūros suformuoja vientisą baltymų sluoksnį, pasižymintį nanometrinių skaidulų morfologija, tiksliai atkartoja spaudo rašto matmenis 26–192 μm ruože išlaikydamos ne didesnę nei 3 % santykinę nuokrypį bei išlieka ilgalaikių ląstelių kultūrų sąlygomis.
4. Akies ragenos implantų gamybai optimizuotas RHCIII-MPC (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0,4) baltyminis hidrogelis, nepaisant savo skaidulinės struktūros ir $85,5 \pm 0,2\%$ vandens kiekio, gali būti modifikuojamas kontaktinės litografijos būdu, sukuriant netopografines fibronektino mikrostruktūras, kurios atkartoja spaudo rašto matmenis 27–192 μm ruože su ne didesniu nei 4 % santykinu nuokrypiu.
5. PC-MPC baltyminis hidrogelis pasižymi valdoma chemine sudėtimi ir elastomechaninėmis savybėmis, kurios atitinkamai gali būti registruojamos Ramano spektroskopijos ir AJM metodais hidratuotame būvyje. Panašiai kaip ir sintetiniai elastomerai, PC-MPC hidrogelis yra technologiškai tinkamas mikrometrinėms ir mažesnių matmenų topografijoms bei įrenginiams formuoti liejimo-polimerizacijos būdu.

7. LITERATŪROS ŠARAŠAS

- [1] S.H. North, E.H. Lock, T.R. King, J.B. Franek, S.G. Walton, C.R. Taitt, Effect of physicochemical anomalies of soda-lime silicate slides on biomolecule immobilization, *Anal. Chem.* 82, p. 406–412. (2010)
- [2] Y. Zong, Y. Wang, J. Shi, S. Zhang, The Application of Novel Multi-Functional Microarray Slides for Immobilization Biomolecules, in: *Front. Biochip Technol.*, 157-166 (2006).
- [3] Bourne, R. R. A., Flaxman, S. R., Braithwaite, T., Cicinelli, M. V., Das, et all. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob. Heal.* 5 e888–e897 (2017). doi:10.1016/S2214-109X(17)30293-0.
- [4] J.P. Whitcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhyay, Corneal blindness: a global perspective., *Bull. World Health Organ.* 79, 214–21 (2001).
- [5] V.S. Sangwan, U. Gopinathan, P. Garg , G.N. Rao, Current Supply of Donor Corneas in India, *JIMSA*, 23, 197-200 (2010). <http://medind.nic.in/jav/t10/i3/javt10i3p197.pdf>.
- [6] T. Edition, *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient*, (2016). doi:10.1007/978-3-319-27583-3.
- [7] J. James Thimons, *Stem Cells: The Future of Corneal Rehabilitation, Review of Optometry*, (2017). <https://www.reviewofoptometry.com/article/stem-cells-the-future-of-corneal-rehabilitation#footnotes>.
- [8] Y. Liu, L. Gan, D.J. Carlsson, P. Fagerholm, N. Lagali, M.A. Watsky, et al., A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1869–1875 (2006). doi:10.1167/iov.05-1339.
- [9] P. Fagerholm, N.S. Lagali, J.A. Ong, K. Merrett, W.B. Jackson, J.W. Polarek, et al., Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold., *Biomaterials.* 35, 2420–7 (2014). doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.079.
- [10] O. Buznyk, N. Pasychnikova, M.M. Islam, S. Iakymenko, P. Fagerholm, M. Griffith, Bioengineered Corneas Grafted as Alternatives to Human Donor Corneas in Three High-Risk Patients, *Clin. Transl. Sci.* 8, 558–562 (2015). doi:10.1111/cts.12293.
- [11] E. Prina, P. Mistry, L.E. Sidney, J. Yang, R.D. Wildman, M. Bertolin, et al., 3D Microfabricated Scaffolds and Microfluidic Devices for Ocular Surface Replacement: a Review, *Stem Cell Rev. Reports.* 13, 430–441 (2017). doi:10.1007/s12015-017-9740-6.
- [12] F. Yanagawa, S. Sugiura, T. Kanamori, Hydrogel microfabrication

- technology toward three dimensional tissue engineering, *Regen. Ther.* 3, 45–57 (2016). doi:10.1016/j.reth.2016.02.007.
- [13] J. Leijten, J. Rouwkema, Y.S. Zhang, A. Nasajpour, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Advancing Tissue Engineering: A Tale of Nano-, Micro-, and Macroscale Integration*, *Small*. 12, 2130–2145 (2016). doi:10.1002/smll.201501798.
- [14] W. Liu, C. Deng, C.R. McLaughlin, P. Fagerholm, N.S. Lagali, B. Heyne, et al., *Collagen–phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes*, *Biomaterials*. 30, 1551–1559 (2009). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.022.
- [15] A. Mazėtytė, *Fabrication of 2d and 3d tissue models by biosynthetic hydrogel and micro-technologies*, (2017). <https://epublications.vu.lt/object/elaba:24072234/>
- [16] R. Eimont, *Tarplastelinį užpildą imituojančių mikrostruktūrų taikymas audinių inžinerijai*, VGTU, (2016).
- [17] P.E. Laibinis, G.M. Whitesides, D.L. Allara, Y.T. Tao, A.N. Parikh, R.G. Nuzzo, *Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold*, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 7152–7167 (1991). doi:10.1021/ja00019a011.
- [18] R.G. Nuzzo, F. a. Fusco, D.L. Allara, *Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2358–2368 (1987). doi:10.1021/ja00242a020.
- [19] Z. Mekhalif, F. Laffineur, and N. Couturier, J. Delhalle, *Elaboration of Self-Assembled Monolayers of n-Alkanethiols on Nickel Polycrystalline Substrates: Time, Concentration, and Solvent Effects*, (2003). doi:10.1021/LA020332C.
- [20] J.C. Love, D.B. Wolfe, R. Haasch, M.L. Chabinye, K.E. Paul, G.M. Whitesides, et al., *Formation and structure of self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 2597–609 (2003). doi:10.1021/ja028692+.
- [21] L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces*, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43, 437–463 (1992). doi:10.1146/annurev.pc.43.100192.002253.
- [22] J.C. Love, L. a Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology.*, 2005. doi:10.1021/cr0300789.
- [23] D.L. Allara, R.G. Nuzzo, *The application of reflection infrared and surface enhanced Raman spectroscopy to the characterization of chemisorbed organic disulfides on Au*, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*. 30, 11 (1983). doi:10.1016/0368-2048(83)85024-5.
- [24] T. Ishida, N. Nishida, S. Tsuneda, M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll,

- Alkyl Chain Length Effect on Growth Kinetics of n-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Studied by X-Ray Photoelectron Spectroscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* 35, L1710–L1713 (1996). doi:10.1143/JJAP.35.L1710.
- [25] G.E. Poirier, E.D. Pylant, The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111), *Science*. 272, 1145–8 (1996). doi:10.1126/SCIENCE.272.5265.1145.
- [26] Myung M. Sung, Carlo Carraro, Oranna W. Yauw, Yunsoo Kim, Roya Maboudian, Reversible Liquid–Liquid Transitions in the Early Stages of Monolayer Self-Assembly, (2000). doi:10.1021/JP993288R.
- [27] D.K. Schwartz, Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52, 107–137 (2001). doi:10.1146/annurev.physchem.52.1.107.
- [28] A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem. Rev.* 96, 1533–1554 (1996). doi:10.1021/cr9502357.
- [29] D.K. Aswal, S. Lenfant, D. Guerin, J.V. Yakhmi, D. Vuillaume, Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics, *Anal. Chim. Acta.* 568, 84–108(2006). doi:10.1016/J.ACA.2005.10.027.
- [30] G.C. Allen, F. Sorbello, C. Altavilla, A. Castorina, E. Ciliberto, Macro-, micro- and nano-investigations on 3-aminopropyltrimethoxysilane self-assembly-monolayers, *Thin Solid Films.* 483, 306–311 (2005). doi:10.1016/j.tsf.2004.12.062.
- [31] E.A. Smith, W. Chen, How to prevent the loss of surface functionality derived from aminosilanes., *Langmuir.* 24, 12405–9 (2008). doi:10.1021/la802234x.
- [32] K.C. Popat, R.W. Johnson, T.A. Desai, Characterization of vapor deposited thin silane films on silicon substrates for biomedical microdevices, *Surf. Coatings Technol.* 154, 253–261 (2002).
- [33] J.J. Cras, C. a. Rowe-Taitt, D. a. Nivens, F.S. Ligler, Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization, *Biosens. Bioelectron.* 14, 683–688 (1999). doi:10.1016/S0956-5663(99)00043-3.
- [34] A.D. Doyle, F.W. Wang, K. Matsumoto, K.M. Yamada, O[1] A.D. Doyle, F.W. Wang, K. Matsumoto, K.M. Yamada, One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration, *J. Cell Biol.* 184, 481–490 (2009). doi:10.1083/jcb.200810041.
- [35] A. Larsson, T. Ekblad, O. Andersson, B. Liedberg, Photografted poly(ethylene glycol) matrix for affinity interaction studies., *Biomacromolecules.* 8, 287–95 (2007). doi:10.1021/bm060685g.
- [36] N.A. Alcantar, E.S. Aydil, J.N. Israelachvili, Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces., *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 343–51 (2000).
- [37] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, A high-

- density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens. Bioelectron.* 15, 473–481 (2000). doi:10.1016/S0956-5663(00)00104-4.
- [38] P. Krsko, M. Libera, Biointeractive hydrogels, *Mater. Today.* 8, 36–44 (2005). doi:10.1016/S1369-7021(05)71223-2.
- [39] R. Webster, V. Elliot, K.B. Park, D. Walker, M. Hankin, P. Taupin, PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals, *PEGylated Protein Drugs Basic Sci. Clin. Appl.* 127–146 (2009). doi:10.1007/978-3-7643-8679-5.
- [40] J.H. Lee, H. Bang Lee, J.D. Andrade, Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces, *Prog. Polym. Sci.* 20, 1043–1079 (1995).
- [41] Z. Lei, J. Gao, X. Liu, D. Liu, Z. Wang, Poly(glycidyl methacrylate-co -2-hydroxyethyl methacrylate) Brushes as Peptide/Protein Microarray Substrate for Improving Protein Binding and Functionality, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8, 10174–10182 (2016). doi:10.1021/acsami.6b01156.
- [42] J.H. Lee, P. Kopeckova, J. Kopecek, J.D. Andrade, Surface properties of copolymers of alkyl methacrylates with, methoxy (polyethylene oxide) metiiaacrylates and their application as protein-resistant coatings, *Biomaterials.* 11, 455–464 (1990). doi:10.1016/0142-9612(90)90058-X.
- [43] M.C. Lensen, V.A. Schulte, M. Diez, Cell Adhesion and Spreading on an Intrinsically, *Biomaterials - Physics and Chemistry,* 20, 297-414 (2011). doi: 10.5772/24273.
- [44] C. Pale-Grosdemange, E.S. Simon, K.L. Prime, G.M. Whitesides, Formation of self-assembled monolayers by chemisorption of derivatives of oligo(ethylene glycol) of structure HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)mOH on gold, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 12–20 (1991). doi:10.1021/ja00001a002.
- [45] Lingyan Li, Shengfu Chen, Jie Zheng, Buddy D. Ratner, S. Jiang, Protein Adsorption on Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: The Molecular Basis for Nonfouling Behavior, (2005). doi:10.1021/JP0473321.
- [46] M. Mrksich, J.R. Grunwell, G.M. Whitesides, Biospecific Adsorption of Carbonic Anhydrase to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates That Present Benzenesulfonamide Groups on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12009–12010 (1995) . doi:10.1021/ja00153-a029.
- [47] L.M. Williams, S.D. Evans, T.M. Flynn, A. Marsh, P.F. Knowles, R.J. Bushby, et al., Kinetics of formation of single phospholipid bilayers on self-assembled monolayer supports, as monitored by surface plasmon resonance, *Supramol. Sci.* 4 513–517 (1997). doi:10.1016/S0968-5677(97)00036-9.

- [48] R. Schlapak, P. Pammer, D. Armitage, R. Zhu, P. Hinterdorfer, M. Vaupel, et al., Glass Surfaces Grafted with High-Density Poly(ethylene glycol) as Substrates for DNA Oligonucleotide Microarrays, *Langmuir*. 22, 277–285(2006). doi:10.1021/la0521793.
- [49] J. Wan, M.S. Thomas, S. Guthrie, V.I. Vullev, Surface-Bound Proteins with Preserved Functionality, *Ann. Biomed. Eng.* 37, 1190–1205 (2009). doi:10.1007/s10439-009-9673-6.
- [50] G.M. Harbers, K. Emoto, C. Greef, S.W. Metzger, H.N. Woodward, J.J. Mascali, et al., A functionalized poly(ethylene glycol)-based bioassay surface chemistry that facilitates bio-immobilization and inhibits non-specific protein, bacterial, and mammalian cell adhesion., *Chem. Mater.* 19, 4405–4414 (2007). doi:10.1021/cm070509u.
- [51] R. Schlapak, D. Armitage, N. Saucedo-Zeni, W. Chrzanowski, M. Hohage, D. Caruana, et al., Selective protein and DNA adsorption on PLL-PEG films modulated by ionic strength, *Soft Matter*. 5, 613–621 (2009). doi:10.1039/B815065F.
- [52] F.F. Rossetti, I. Reviakine, G. Csúcs, F. Assi, J. Vörös, M. Textor, Interaction of poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) with supported phospholipid bilayers., *Biophys. J.* 87, 1711–21 (2004). doi:10.1529/biophysj.104.041780.
- [53] L. Ionov, A. Synytska, E. Kaul, S. Diez, Protein-Resistant Polymer Coatings Based on Surface-Adsorbed Poly(aminoethyl methacrylate)/Poly(ethylene glycol) Copolymers, *Biomacromolecules*, 11, 233–237 (2010). doi:10.1021/bm901082y.
- [54] J. Deng, L. Wang, L. Liu, W. Yang, Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations, *Prog. Polym. Sci.* 34, 156–193 (2009). doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.06.002.
- [55] T.N. Myers, T.N. Myers, Initiators, Free-Radical, in: *Encycl. Polym. Sci. Technol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, (2002). doi:10.1002/0471440264.pst425.
- [56] R.G. Chapman, E. Ostuni, M.N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, et al., Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria, *Langmuir*, 17, 1225-1233 (2001). doi:10.1021/la001222d.
- [57] E.S. Desai, M.Y. Tang, A.E. Ross, R.A. Gemeinhart, Critical factors affecting cell encapsulation in superporous hydrogels., *Biomed. Mater.* 7, 024108 (2012). doi:10.1088/1748-6041/7/2/024108.
- [58] J. Jung, J. Oh, Influence of photo-initiator concentration on the viability of cells encapsulated in photo-crosslinked microgels fabricated by microfluidics, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*. 9, 503–509 (2014).
- [59] M. Steenackers, A. Küller, S.Stoycheva, M. Grunze and R. Jordan,

- Structured and Gradient Polymer Brushes from Biphenylthiol Self-Assembled Monolayers by Self-Initiated Photografting and Photopolymerization (SIPGP), *Langmuir*, 25 (4), 2225–2231 (2009). doi:10.1021/la803386c.
- [60] F.-I. Tai, O. Sterner, O. Andersson, T. Ekblad, T. Ederth, pH-control of the protein resistance of thin hydrogel gradient films, *Soft Matter*. 10, 5955–5964 (2014). doi:10.1039/C4SM00833B.
- [61] T. Ekblad, L. Faxälv, O. Andersson, N. Wallmark, A. Larsson, T.L. Lindahl, et al., Patterned Hydrogels for Controlled Platelet Adhesion from Whole Blood and Plasma, *Adv. Funct. Mater.* 20, 2396–2403 (2010). doi:10.1002/adfm.201000083.
- [62] L. Faxälv, T. Ekblad, B. Liedberg, T.L. Lindahl, HCEC ECM productions, *Acta Biomater.* 6, 2599–2608 (2010). doi:10.1016/j.actbio.2009.12.046.
- [63] H. Wang, H.R. Brown, Self-initiated photopolymerization and photografting of acrylic monomers, *Macromol. Rapid Commun.* 25, 1095–1099 (2004). doi:10.1002/marc.200400010.
- [64] F. Zhang, E.T. Kang, K.G. Neoh, P. Wang, K.L. Tan, Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption, *Biomaterials*. 22, 1541–1548 (2001). doi:10.1016/S0142-9612(00)00310-0.
- [65] O. Andersson, A. Larsson, T. Ekblad, B. Liedberg, Gradient hydrogel matrix for microarray and biosensor applications: an imaging SPR study., *Biomacromolecules*. 10, 142–8 (2009). doi:10.1021/bm8010-29b.
- [66] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6, 105–121 (2015). doi:10.1016/J.JARE.2013.07.006.
- [67] I. Willner, Stimuli-Controlled Hydrogels and Their Applications, *Acc. Chem. Res.* 50, 657–658 (2017). doi:10.1021/acs.accounts.7b00142.
- [68] N.A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J.H. Ward, J. Zhang, Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 9–29 (2000). doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.9.
- [69] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology, *Adv. Mater.* 18, 1345–1360 (2006). doi:10.1002/adma.200501612.
- [70] Gaussian Statistics of Linear Chain Molecules and Crosslinked Elastomers, in: *Phys. Prop. Macromol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 547–607 (2010). doi:10.1002/9780470551592.-ch13.
- [71] R. Wong, M. Ashton, K. Dodou, Effect of Crosslinking Agent

- Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels, *Pharmaceutics*. 7, 305–319 (2015). doi:10.3390/pharmaceutics-7030305.
- [72] J. Boyle, *Molecular biology of the cell*, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 36, 317–318 (2008). doi:10.1002/bmb.20192.
- [73] E.F. Plow, T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J.W. Smith, Ligand binding to integrins., *J. Biol. Chem.* 275, 21785–8 (2000). doi:10.1074/jbc.R000003200.
- [74] M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen Structure and Stability, *Annu Rev Biochem.* 78, 929–958 (2010). doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.COLLAGEN.
- [75] E.J. Miller, R. Kent Rhodes, Preparation and characterization of the different types of collagen, 33–64 (1982). doi:10.1016/0076-6879(82)82059-4.
- [76] M.J. Buehler, Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 12285–90 (2006). doi:10.1073/pnas.0603216103.
- [77] J. Xu, D. Mosher, Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins, in: *Extracell. Matrix an Overv.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 41–75 (2011). doi:10.1007/978-3-642-16555-9_2.
- [78] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering., *Science*. 260, 920–6 (1993).
- [79] C.K. Chua, W.Y. Yeong, *Bioprinting*, WORLD SCIENTIFIC, (2015). doi:10.1142/9193.
- [80] R. Akhtar, M.J. Sherratt, J.K. Cruickshank, B. Derby, Characterizing the elastic properties of tissues, *Mater. Today*. 14, 96–105 (2011). doi:10.1016/S1369-7021(11)70059-1.
- [81] D. Howard, L.D. Buttery, K.M. Shakesheff, S.J. Roberts, Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds., *J. Anat.* 213, 66–72 (2008). doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [82] I.M. El-Sherbiny, M.H. Yacoub, Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges., *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013, 316–42 (2013). doi:10.5339/gcsp.2013.38.
- [83] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, C.-K. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Eng.* 7, 679–689 (2001). doi:10.1089/107632701753337645.
- [84] J. Bourget, M. Guillemette, T. Veres, F. a Auger, L. Germain, Alignment of Cells and Extracellular Matrix Within Tissue-Engineered Substitutes, *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl. Ref.* 365–390 (2013). doi:10.5772/54142.
- [85] C.H. Choi, S.H. Hagvall, B.M. Wu, J.C.Y. Dunn, R.E. Beygui, C.J. CJ Kim, Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography, *Biomaterials*. 28, 1672–1679 (2007). doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.031.

- [86] I.A. Janson, A.J. Putnam, Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 103, 1246–58 (2015). doi:10.1002/jbm.a.35254.
- [87] K.Y.L. and, D.J. Mooney, *Hydrogels for Tissue Engineering*, (2001). doi:10.1021/CR000108X.
- [88] C.K. Griffith, C. Miller, R.C.A. Sainson, J.W. Calvert, N.L. Jeon, C.C.W. Hughes, et al., Diffusion Limits of an *in Vitro* Thick Prevascularized Tissue, *Tissue Eng.* 11, 257–266 (2005). doi:10.1089/ten.2005.11.257.
- [89] S.R. Caliari, J.A. Burdick, A practical guide to hydrogels for cell culture, *Nat. Methods.* 13, 405–414 (2016). doi:10.1038/nmeth.3839.
- [90] S. Even-Ram, V. Artym, K.M. Yamada, Matrix control of stem cell fate., *Cell.* 126, 645–647 (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.08.008.
- [91] M.M. Nava, M.T. Raimondi, R. Pietrabissa, Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues, *J. Biomed. Biotechnol.*, (2012). doi:10.1155/2012/797410.
- [92] F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges*, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 403–430 (2011). doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- [93] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, et al., Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures, *Biomaterials.* 27, 5259–5267 (2006). doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.044.
- [94] M.N. Dickson, E.I. Liang, L. Rodriguez, N. Vollereaux, A.F. Yee, Nanopatterned polymer surfaces with bactericidal properties., *Biointerphases.* 10 (2015) 021010. doi:10.1116/1.4922157.
- [95] L. Yin, H. Bien, E. Entcheva, Scaffold topography alters intracellular calcium dynamics in cultured cardiomyocyte networks, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 287 (2004).
- [96] H.-J. Sung, C. Meredith, C. Johnson, Z.S. Galis, The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis, *Biomaterials.* 25, 5735–5742 (2004). doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.066.
- [97] W.-Y. Yeong, C.-K. Chua, K.-F. Leong, M. Chandrasekaran, Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, *Trends Biotechnol.* 22, 643–652 (2004). doi:10.1016/j.tibtech.2004.10.004.
- [98] T.J. van den Berg, K.E. Tan, Light transmittance of the human cornea from 320 to 700 nm for different ages., *Vision Res.* 34, 1453–1456 (1994).
- [99] D.M. Maurice, *The Eye*, Vol. 4, Academic Press, New York, (1962).
- [100] R.A.B. Crabb, E.P. Chau, M.C. Evans, V.H. Barocas, A. Hubel,

- Biomechanical and Microstructural Characteristics of a Collagen Film-Based Corneal Stroma Equivalent, *Tissue Eng.* 12, 1565–1575 (2006). doi:10.1089/ten.2006.12.1565.
- [101] S.E. Wilson, J.W. Hong, Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis., *Cornea*. 19, 417–20 (2000).
- [102] C.A. Poole, N.H. Brookes, Clover, Confocal imaging of the keratocyte network in porcine cornea using the fixable vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate., *Curr. Eye Res.* 15, 165–74 (1996).
- [103] K. Merrett, P. Fagerholm, C.R. McLaughlin, S. Dravida, N. Lagali, N. Shinozaki, et al., Tissue-Engineered Recombinant Human Collagen-Based Corneal Substitutes for Implantation: Performance of Type I versus Type III Collagen, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 49, 3887 (2008). doi:10.1167/iovs.07-1348.
- [104] P. Fagerholm, N.S. Lagali, K. Merrett, W.B. Jackson, R. Munger, Y. Liu, et al., A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study., *Sci. Transl. Med.* 2, 46-61 (2010). doi:10.1126/scitranslmed.3001022.
- [105] L.E.R. O'Leary, J.A. Fallas, E.L. Bakota, M.K. Kang, J.D. Hartgerink, Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel, *Nat. Chem.* 3, 821–828 (2011). doi:10.1038/nchem.1123.
- [106] J.A. Fallas, L.E.R. O'Leary, J.D. Hartgerink, Synthetic collagen mimics: self-assembly of homotrimers, heterotrimers and higher order structures, *Chem. Soc. Rev.* 39, 3510–3527 (2010). doi:10.1039/B919455J.
- [107] M. Islam, R. Ravichandran, D. Olsen, M.K. Ljunggren, P. Fagerholm, C.-J. Lee, et al., Self-assembled collagen-like-peptide implants as alternatives to human donor corneal transplantation, *RSC Adv.* 6, 55745 (2016). doi:10.1039/C6RA08895C.
- [108] J. Phopase, Collagen mimetic peptide, 2015. <https://encrypted.google.com/patents/WO2016165788A1?cl=en&hl=lt> (accessed October 31, 2017).
- [109] J. Fink, M. Théry, A. Azioune, R. Dupont, F. Chatelain, M. Bornens, et al., Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques, *Lab Chip.* 7, 672–680 (2007). doi:10.1039/B618545B.
- [110] B.G. Chung, K.-H. Lee, A. Khademhosseini, S.-H. Lee, Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering., *Lab Chip.* 12, 45–59 (2012). doi:10.1039/c1lc20859d.

- [111] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, Surface chemistry influences implant biocompatibility., *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 270–80 (2008).
- [112] H. Jeon, C.G. Simon, G. Kim, A mini-review: Cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 102, 1580–1594 (2014). doi:10.1002/jbm.b.33158.
- [113] R.K. Singh, D. Seliktar, A.J. Putnam, Capillary morphogenesis in PEG-collagen hydrogels, *Biomaterials.* 34, 9331–9340 (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.016.
- [114] M.R. Hynd, J.P. Frampton, N. Dowell-Mesfin, J.N. Turner, W. Shain, Directed cell growth on protein-functionalized hydrogel surfaces., *J. Neurosci. Methods.* 162, 255–63 (2007). doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.024.
- [115] B.J. Klenkler, M. Griffith, C. Becerril, J.A. West-Mays, H. Sheardown, EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications, *Biomaterials.* 26, 7286–7296 (2005). doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.045.
- [116] J.Y. Lim, H.J. Donahue, Cell Sensing and Response to Micro- and Nanostructured Surfaces Produced by Chemical and Topographic Patterning, *Tissue Eng.* 13, 1879–1891 (2007). doi:10.1089/ten.2006.0154.
- [117] N. Coq, T. van Bommel, R.A. Hikmet, H.R. Stapert, W.U. Dittmer, Self-Supporting Hydrogel Stamps for the Microcontact Printing of Proteins, *Langmuir.* 23, 5154–5160 (2007). doi:10.1021/la0700321.
- [118] A. Kumar, G.M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching, *Appl. Phys. Lett.* 63, 2002–2004 (1993). doi:10.1063/1.110628.
- [119] J. Tien, Y. Xia, G. Whitesides, Microcontact Printing of SAMs, *Thin Film.* 24, 228–250 (1998).
- [120] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography for micro- and nanoscale patterning., *Nat. Protoc.* 5, 491–502 (2010). doi:10.1038/nprot.2009.234.
- [121] A. Bietsch, B. Michel, Conformal contact and pattern stability of stamps used for soft lithography, *J. Appl. Phys.* 88, 4310 (2000). doi:10.1063/1.1289816.
- [122] John L. Tan, and Joe Tien, C.S. Chen, Microcontact Printing of Proteins on Mixed Self-Assembled Monolayers, (2001). doi:10.1021/LA011351+.
- [123] A. Brock, E. Chang, Chia-Chi Ho, P. LeDuc, X. Jiang, and George M. Whitesides, et al., Geometric Determinants of Directional Cell Motility Revealed Using Microcontact Printing, (2003). doi:10.1021/LA026394K.

- [124] A. Bernard, E. Delamarche, Heinz Schmid, Bruno Michel, and H. R. Bosshard, H. Biebuyck, *Printing Patterns of Proteins*, (1998). doi:10.1021/LA980037L.
- [125] M. Théry, A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen, M. Bornens, *Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment*, *Cell Motil. Cytoskeleton*. 63, 341–355 (2006). doi:10.1002/cm.20126.
- [126] J. Fink, M. Théry, A. Azioune, R. Dupont, F. Chatelain, M. Bornens, et al., *Comparative study and improvement of current cell micropatterning techniques*, *Lab Chip*. 7, 672 (2007). doi:10.1039/b618545b.
- [127] M. Dettin, M.T. Conconi, R. Gambaretto, A. Pasquato, M. Folin, C.D. Bello, et al., *In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces*, *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 472–479 (2002). doi:10.1002/jbm.1292.
- [128] B. Chen, G. Kumar, C.C. Co, C.-C. Ho, *Geometric control of cell migration.*, *Sci. Rep.* 3, 2827 (2013). doi:10.1038/srep02827.
- [129] J.L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.*, *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1131–1139 (1979). doi:10.1177/27.8.90074.
- [130] M.R. Hynd, J.P. Frampton, M.-R. Burnham, D.L. Martin, N.M. Dowell-Mesfin, J.N. Turner, et al., *Functionalized hydrogel surfaces for the patterning of multiple biomolecules*, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 81A, 347–354 (2007). doi:10.1002/jbm.a.31002.
- [131] N. Patel, R. Bhandari, K.M. Shakesheff, S.M. Cannizzaro, M.C. Davies, R. Langer, et al., *Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11, 319–31 (2000).
- [132] V. Damljanović, B.C. Lagerholm, K. Jacobson, *Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays.*, *Biotechniques*. 39, 847–51 (2005).
- [133] X. Tang, M.Y. Ali, M.T. a Saif, *A Novel Technique for Micropatterning Proteins and Cells on Polyacrylamide Gels.*, *Soft Matter*. 8, 7197–7206 (2012). doi:10.1039/C2SM25533B.
- [134] S. Takayama, J.C. McDonald, E. Ostuni, M.N. Liang, P.J. Kenis, R.F. Ismagilov, et al., *Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5545–8 (1999). doi:10.1073/PNAS.96.10.5545.
- [135] Emmanuel Delamarche, ‡ André Bernard, Heinz Schmid, Alexander Bietsch, and Bruno Michel, H. Biebuyck, *Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates: Design and Application to Bioassays*, (1998). doi:10.1021/JA973071F.
- [136] *Micropatterning neural cell cultures in 3D with a multi-layered*

- scaffold, *Biomaterials*. 32, 2088–2098 (2011). doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.11.047.
- [137] W.C. Wilson, T. Boland, Cell and organ printing 1: Protein and cell printers, *Anat. Rec.* 272A, 491–496 (2003). doi:10.1002/ar.a.10057.
- [138] N.E. Sanjana, S.B. Fuller, A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture, *J. Neurosci. Methods*. 136, 151–163 (2004). doi:10.1016/j.jneumeth.2004.01.011.
- [139] Inkjet printing for high-throughput cell patterning, *Biomaterials*. 25 3707–3715 (2004). doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.10.052.
- [140] C.B. Herbert, T.L. McLernon, C.L. Hypolite, D.N. Adams, L. Pikus, C.C. Huang, et al., Micropatterning gradients and controlling surface densities of photoactivatable biomolecules on self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol) alkanethiolates., *Chem. Biol.* 4, 731–737 (1997).
- [141] Y. Luo, M.S. Shoichet, A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration, *Nat. Mater.* 3, 249–253 (2004). doi:10.1038/nmat1092.
- [142] P. Musoke-Zawedde, M.S. Shoichet, Anisotropic three-dimensional peptide channels guide neurite outgrowth within a biodegradable hydrogel matrix, *Biomed. Mater.* 1, 162–169 (2006). doi:10.1088/1748-6041/1/3/011.
- [143] D.S. Engstrom, B. Porter, M. Pacios, H. Bhaskaran, Additive nanomanufacturing – A review, *J. Mater. Res.* 29, 1792–1816 (2014). doi:10.1557/jmr.2014.159.
- [144] Piner, Zhu, Xu, Hong, Mirkin, "Dip-Pen" nanolithography, *Science*. 283, 661–663 (1999).
- [145] T. Rakickas, E.M. Ericsson, Ž. Ruželė, B. Liedberg, R. Valiokas, Functional Hydrogel Density Patterns Fabricated by Dip-Pen Nanolithography and Photografting, *Small*. 7, 2153–2157 (2011). doi:10.1002/sml.201002278.
- [146] K. Salaita, Y. Wang, C.A. Mirkin, Applications of dip-pen nanolithography, *Nat. Nanotechnol.* 2, 145–155 (2007). doi:10.1038/nnano.2007.39.
- [147] D.S. Ginger, H. Zhang, C.A. Mirkin, The Evolution of Dip-Pen Nanolithography, *Angew. Chemie Int. Ed.* 43, 30–45 (2004). doi:10.1002/anie.200300608.
- [148] P. Vandrangi, S.C. Gott, R. Kozaka, V.G.J. Rodgers, M.P. Rao, Comparative Endothelial Cell Response on Topographically Patterned Titanium and Silicon Substrates with Micrometer to Sub-Micrometer Feature Sizes, *PLoS One*. 9, e111465 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0111465.
- [149] M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini, Engineering microscale topographies to control the cell-substrate

- interface, *Biomaterials*, 33, 5230-5246 (2012) doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.079.
- [150] E.P. Ivanova, J. Hasan, H.K. Webb, V.K. Truong, G.S. Watson, J.A. Watson, et al., Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Cicada Wings, *Small*, 8, 2489–2494 (2012). doi:10.1002/sml.201200528.
- [151] X.-M. Zhao, Y. Xia, G.M. Whitesides, Fabrication of three-dimensional micro-structures: Microtransfer molding, *Adv. Mater.* 8, 837–840 (1996). doi:10.1002/adma.19960081016.
- [152] K.Y. Suh, Y.S. Kim, H.H. Lee, Capillary Force Lithography, *Adv. Mater.* 13, 1386–1389 (2001). doi:10.1002/1521-4095(200109)13:18<1386::AID-ADMA1386>3.0.CO;2-X.
- [153] J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials., *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 295–304. doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.017.
- [154] S. Kobel, M. Limacher, S. Gobaa, T. Laroche, M.P. Lutolf, Micropatterning of Hydrogels by Soft Embossing †, *Langmuir*, 25, 8774–8779 (2009). doi:10.1021/la9002115.
- [155] H. Takano, Jai-Yoon Sul, Mary L. Mazzanti, Robert T. Doyle, Philip G. Haydon, Marc D. Porter, Micropatterned Substrates: Approach to Probing Intercellular Communication Pathways, (2002). doi:10.1021/AC0257400.
- [156] J.A. Lewis, Direct Ink Writing of 3D Functional Materials, *Adv. Funct. Mater.* 16, 2193–2204 (2006). doi:10.1002/adfm.200600434.
- [157] J.N. Hanson Shepherd, S.T. Parker, R.F. Shepherd, M.U. Gillette, J.A. Lewis, R.G. Nuzzo, 3D Microperiodic Hydrogel Scaffolds for Robust Neuronal Cultures., *Adv. Funct. Mater.* 21, 47–54 (2011). doi:10.1002/adfm.201001746.
- [158] A. Nadernezhad, N. Khani, G.A. Skvortsov, B. Toprakhisar, E. Bakirci, Y. Menceloglu, et al., Multifunctional 3D printing of heterogeneous hydrogel structures, *Sci. Rep.* 6, 33178 (2016). doi:10.1038/srep33178.
- [159] P.E. Dyer, Excimer laser polymer ablation: twenty years on, *Appl. Phys. A*, 77, 167–173 (2003). doi:10.1007/s00339-003-2137-1.
- [160] T. Lippert, M. Hauer, C.R. Phipps, A. Wokaun, Applied Physics A Fundamentals and applications of polymers designed for laser ablation, 77, 259–264 (2003). doi:10.1007/s00339-003-2111-y.
- [161] Two-dimensional differential adherence of neuroblasts in laser micromachined CAD/CAM agarose channels, *Appl. Surf. Sci.* 252, 4748–4753 (2006). doi:10.1016/J.APSUSC.2005.07.158.
- [162] N. Livnat, O. Sarig-Nadir, R. Zajdman, D. Seliktar, S. Shoham, A Hydrogel-Based Nerve Regeneration Conduit with Sub-Micrometer Feature Control, in: 2007 3rd Int. IEEE/EMBS Conf. Neural Eng., IEEE, 101–103 (2007). doi:10.1109/CNE.2007.369622.
- [163] Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated

- polymerization, *Prog. Polym. Sci.* 33, 631–681 (2008). doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2008.01.001.
- [164] S. Turunen, A.-M. Haaparanta, R. Äänismaa, M. Kellomäki, Chemical and topographical patterning of hydrogels for neural cell guidance *in vitro*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7, 253–270 (2013). doi:10.1002/term.520.
- [165] S.K. Seidlits, C.E. Schmidt, J.B. Shear, High-Resolution Patterning of Hydrogels in Three Dimensions using Direct-Write Photofabrication for Cell Guidance, *Adv. Funct. Mater.* 19, 3543–3551 (2009). doi:10.1002/adfm.200901115.
- [166] K.K. Seet, V. Mizeikis, S. Matsuo, S. Juodkazis, H. Misawa, Three-Dimensional Spiral-Architecture Photonic Crystals Obtained By Direct Laser Writing, *Adv. Mater.* 17, 541–545 (2005). doi:10.1002/adma.200401527.
- [167] P. Krsko, S. Sukhishvili, M. Mansfield, R. Clancy, M. Libera, Electron-Beam Surface-Patterned Poly(ethylene glycol) Microhydrogels, (2003). doi:10.1021/LA034157R.
- [168] P. Krsko, I. Saaem, R. Clancy, H. Geller, P. Soteropoulos, M. Libera, E-beam-patterned hydrogels to control nanoscale surface bioactivity, in: W.Y. Lai, L.E. Ocola, S. Pau (Eds.), *International Society for Optics and Photonics*, 600201 (2005). doi:10.1117/12.631709.
- [169] E. Casero, L. Vázquez, A.M. Parra-Alfambra, E. Lorenzo, AFM, SECM and QCM as useful analytical tools in the characterization of enzyme-based bioanalytical platforms, *Analyst.* 135, 1878 (2010). doi:10.1039/c0an00120a.
- [170] M. Fritz, M. Radmacher, J.P. Cleveland, M.W. Allersma, R.J. Stewart, R. Gieselmann, et al., Imaging Globular and Filamentous Proteins in Physiological Buffer Solutions with Tapping Mode Atomic Force Microscopy, *Langmuir.* 11, 3529–3535 (1995). doi:10.1021/la00009a040.
- [171] Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces, *Biophys. J.* 77, 1150–1158 (1999). doi:10.1016/S0006-3495(99)76966-3.
- [172] Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surf. Sci. Rep.* 59, 1–152 (2005). doi:10.1016/J.SURFREP.2005.08.003.
- [173] D.-H. Lee, N.-G. Cho, Assessment of surface profile data acquired by a stylus profilometer, *Meas. Sci. Technol.* 23, 105601 (2012). doi:10.1088/0957-0233/23/10/105601.
- [174] J.N. Israelachvili, J.N. Israelachvili, 17 – Adhesion and Wetting Phenomena, in: *Intermol. Surf. Forces*, 415–467, (2011). doi:10.1016/B978-0-12-375182-9.10017-X.
- [175] J. Chen, Z. Wang, S. Oyola-Reynoso, M.M. Thuo, Properties of Self-

- Assembled Monolayers Revealed via Inverse Tensiometry, *Langmuir*. (2017). doi:10.1021/acs.langmuir.7b01937.
- [176] X.F. Yang, Equilibrium contact angle and intrinsic wetting hysteresis, *Appl. Phys. Lett.* 67, 2249–2251 (1995). doi:10.1063/1.115119.
- [177] C.-C. Chang, Y.-J. Sheng, H.-K. Tsao, Wetting hysteresis of nanodrops on nanorough surfaces, *Phys. Rev. E*. 94, 042807 (2016). doi:10.1103/PhysRevE.94.042807.
- [178] V. Vaičiškauskas, G.J. Babonas, Z. Kuprionis, G. Niaura, V. Šablinskas, *Paviršiaus optinė spektroskopija*, Vilnius, 2008.
- [179] R.M.A. Azzam, N.M. Bashara, S.S. Ballard, *Ellipsometry and Polarized Light*, *Phys. Today*. 31, 72–72 (1978). doi:10.1063/1.2994821.
- [180] A.-H. Liu, P.C. Wayner, J.L. Plawsky, Image scanning ellipsometry for measuring nonuniform film thickness profiles, *Appl. Opt.* 33, 1223 (1994). doi:10.1364/AO.33.001223.
- [181] A. Biswas, T. Wang, A.S. Biris, Single metal nanoparticle spectroscopy: optical characterization of individual nanosystems for biomedical applications, *Nanoscale*. 2, 1560 (2010). doi:10.1039/c0nr00133c.
- [182] B. Bhushan, D. Hansford, K.K. Lee, Surface modification of silicon and polydimethylsiloxane surfaces with vapor-phase-deposited ultrathin fluorosilane films for biomedical nanodevices, *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film*. 24, 1197–1202 (2006). doi:10.1116/1.2167077.
- [183] A. Larsson, B. Liedberg, Poly (ethylene glycol) Gradient for Biochip Development Poly (ethylene glycol) , *Langmuir*. 23, 11319–11325 (2007). doi:10.1021/la700729q.
- [184] W. Liu, C. Deng, C.R. McLaughlin, P. Fagerholm, N.S. Lagali, B. Heyne, et al., Collagen–phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes, *Biomaterials*. 30, 1551–1559 (2009). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.022.
- [185] D. Priest, R. Munger, A new instrument for monitoring the optical properties of corneas, *IOVS*. 39, 35215 (1998).
- [186] J.D. and, M. Radmacher*, Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope, (1998). doi:10.1021/LA9713006.
- [187] I. Sokolov, M.E. Dokukin, N. V. Guz, Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments, *Methods*. 60, 202–213 (2013). doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.037.
- [188] J.L. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips, *Rev. Sci. Instrum.* 64, 1868 (1993). doi:10.1063/1.1143970.

- [189] T.R. Jones, I. Kang, D.B. Wheeler, R.A. Lindquist, A. Papallo, D.M. Sabatini, et al., CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens, *BMC Bioinformatics*. 9, 482 (2008). doi:10.1186/1471-2105-9-482.
- [190] S. Löfås, B. Johnsson, A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1526 (1990). doi:10.1039/c39900001526.
- [191] J. Song, J. Chen, C.M. Klapperich, V. Eng, C.R. Bertozzi, Functional glass slides for in vitro evaluation of interactions between osteosarcoma TE85 cells and mineral-binding ligands, *J. Mater. Chem.* 14, 2643 (2004). doi:10.1039/b408597n.
- [192] S. Kuddannaya, Y.J. Chuah, M.H.A. Lee, N. V. Menon, Y. Kang, Y. Zhang, Surface Chemical Modification of Poly(dimethylsiloxane) for the Enhanced Adhesion and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5, 9777–9784 (2013). doi:10.1021/am402903e.
- [193] T. Peterbauer, J. Heitz, M. Olbrich, S. Hering, Simple and versatile methods for the fabrication of arrays of live mammalian cells., *Lab Chip*. 6, 857–863 (2006). doi:10.1039/b601803c.
- [194] R.S. Fischer, K.A. Myers, M.L. Gardel, C.M. Waterman, Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior, *Nat. Protoc.* 7, 2056–2066 (2012). doi:10.1038/nprot.2012.127.
- [195] Joong Ho Moon, Jin Ho Kim, Ki-jeong Kim, Tai-Hee Kang, Bongsoo Kim, Chan-Ho Kim, et al., Absolute Surface Density of the Amine Group of the Aminosilylated Thin Layers: Ultraviolet–Visible Spectroscopy, Second Harmonic Generation, and Synchrotron-Radiation Photoelectron Spectroscopy Study, (1997). doi:10.1021/LA9705118.
- [196] Photopolymerization using copolymers containing aldehyde groups therein as photoinitiators, (1966). <http://google.com/patents/US3450615> (accessed May 23, 2017).
- [197] R.J. Fitzmaurice, J.M. Ahern, S. Caddick, Synthesis of unsymmetrical ketones via simple C-H activation of aldehydes and concomitant hydroacylation of vinyl sulfonates., *Org. Biomol. Chem.* 7, 235–237 (2009). doi:10.1039/b819235a.
- [198] P.C. Nalam, H.-S. Lee, N. Bhatt, R.W. Carpick, D.M. Eckmann, R.J. Composto, Nanomechanics of pH-Responsive, Drug-Loaded, Bilayered Polymer Grafts, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9, 12936–12948 (2017). doi:10.1021/acsami.6b14116.
- [199] N. a. Peppas, A.R. Khare, Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11, 1–35 (1993). doi:10.1016/0169-409X(93)90025-Y.

- [200] P.I. Kou, J.H., Amidon, G.L. and Lee, J.H. Kou, *Pharm. Res.* 5, 592–597 (1988).
- [201] Y. Xiang, D. Chen, Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly(HEMA–PEGMA–MAA) composite hydrogel, *Eur. Polym. J.* 43, 4178–4187 (2007). doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.08.005.
- [202] J. Murakami, T. Nishida, T. Otori, Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing., *J. Lab. Clin. Med.* 120, 86–93 (1992).
- [203] H.P. Erickson, N. Carrell, J. Mcdonagh, Fibronectin Molecule Visualized in Electron Microscopy: A Long, Thin, Flexible Strand, *J Cell Biol.* 91, 673-678 (1981).
- [204] W.S. To, K.S. Midwood, Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair., *Fibrogenesis Tissue Repair.* 4, 21 (2011). doi:10.1186/1755-1536-4-21.
- [205] L. Faxälv, T. Ekblad, B. Liedberg, T.L. Lindahl, Blood compatibility of photografted hydrogel coatings, *Acta Biomater.* 6, 2599–2608 (2010). doi:10.1016/j.actbio.2009.12.046.
- [206] A.C. Romano, E.M. Espana, S.H. Yoo, M.T. Budak, J.M. Wolosin, S.C.G. Tseng, Different Cell Sizes in Human Limbal and Central Corneal Basal Epithelia Measured by Confocal Microscopy and Flow Cytometry, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 44, 5125 (2003). doi:10.1167/iovs.03-0628.
- [207] Y.H. Tee, T. Shemesh, V. Thiagarajan, R.F. Hariadi, K.L. Anderson, C. Page, et al., Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton, *Nat. Cell Biol.* 17, 445–457 (2015). doi:10.1038/ncb3137.
- [208] M. Théry, Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions., *J. Cell Sci.* 123, 4201–13 (2010). doi:10.1242/jcs.075150.
- [209] Y. Lai, Y. Sun, C.M. Skinner, E.L. Son, Z. Lu, R.S. Tuan, et al., Reconstitution of Marrow-Derived Extracellular Matrix Ex Vivo: A Robust Culture System for Expanding Large-Scale Highly Functional Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells Dev.* 19, 1095–1107 (2010). doi:10.1089/scd.2009.0217.
- [210] Y. Hayashi, M.K. Furue, T. Okamoto, K. Ohnuma, Y. Myoishi, Y. Fukuhara, et al., Integrins Regulate Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal, *Stem Cells.* 25, 3005–3015 (2007). doi:10.1634/stemcells.2007-0103.
- [211] G.C. Hunt, P. Singh, J.E. Schwarzbauer, Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells, *Exp. Cell Res.* 318, 1820–1831 (2012). doi:10.1016/j.yexcr.2012.06.009.

- [212] W. Liu, C. Deng, C.R. McLaughlin, P. Fagerholm, N.S. Lagali, B. Heyne, et al., Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes., *Biomaterials*. 30, 1551–1559 (2009). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.022.
- [213] J.M. Hackett, N. Lagali, K. Merrett, H. Edelhauser, Y. Sun, L. Gan, et al., Biosynthetic Corneal Implants for Replacement of Pathologic Corneal Tissue: Performance in a Controlled Rabbit Alkali Burn Model, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52, 651 (2011). doi:10.1167/iops.10-5224.
- [214] N. Saeidi, K.P. Karmelek, J.A. Paten, R. Zareian, E. DiMasi, J.W. Ruberti, Molecular crowding of collagen: A pathway to produce highly-organized collagenous structures, *Biomaterials*. 33, 7366–7374 (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.041.
- [215] Surface modification of silicon and gold-patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity, *Biosens. Bioelectron.* 20, 1697–1708 (2005). doi:10.1016/J.BIOS.2004.06.025.
- [216] L.S. Fujikawa, C.S. Foster, T.J. Harrist, J.M. Lanigan, R.B. Colvin, Fibronectin in healing rabbit corneal wounds., *Lab. Invest.* 45, 120–129 (1981).
- [217] T. Nishida, S. Nakagawa, C. Nishibayashi, H. Tanaka, R. Manabe, Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo., *Arch. Ophthalmol.* 102, 455–6. (1984)
- [218] N. Yamada, N. Morishige, R. Yanai, Y. Morita, K. Kimura, T. Chikama, et al., Open Clinical Study of Eye Drops Containing the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN for Treatment of Persistent Corneal Epithelial Defects, *Cornea*. 31, 1408–1413 (2012). doi:10.1097/ICO.0b013e31824afd6c.
- [219] M. Mirazul Islam, V. Cèpla, C. He, J. Edin, T. Rakickas, K. Kobuch, et al., Functional fabrication of recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels for regenerative medicine applications., *Acta Biomater.* 12, 70–80 (2015). doi:10.1016/j.actbio.2014.10.035.
- [220] S. Patel, J. Marshall, F.W. Fitzke, Refractive index of the human corneal epithelium and stroma., *J. Refract. Surg.* 11, 100–105 (1995).
- [221] E.M. Beems, J.A. Van Best, Light transmission of the cornea in whole human eyes., *Exp. Eye Res.* 50, 393–395 (1990).
- [222] Y. Zeng, J. Yang, K. Huang, Z. Lee, X. Lee, A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea., *J. Biomech.* 34, 533–7 (2001).
- [223] N. Saeidi, E.A. Sander, R. Zareian, J.W. Ruberti, Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement, *Acta Biomater.* 7, 2437–2447 (2011). doi:10.1016/j.actbio.2011.02.038.

- [224] A. Bernard, J.P. Renault, B. Michel, H.R. Bosshard, E. Delamarche, Microcontact Printing of Proteins, *Adv. Mater.* 12, 1067–1070 (2000). doi:10.1002/1521-4095(200007)12:14<1067::AID-ADMA1067>3.0.CO;2-M.
- [225] J. Fukuda, Y. Sakai, K. Nakazawa, Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing, *Biomaterials.* 27, 1061–1070 (2006). doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.031.
- [226] 6.777J/2.751J Material Property Database, PDMS. <http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pdms.htm>
- [227] T. Shibue, R.A. Weinberg, Integrin 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10290–10295 (2009). doi:10.1073/pnas.0904227106.
- [228] K.A. Diehl, J.D. Foley, P.F. Nealey, C.J. Murphy, Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 75A, 603–611 (2005). doi:10.1002/jbm.a.30467.
- [229] M. Griffith, J. Phopase, R. Ravichandran, Z. Ruzele, V. Cepla, R. Valiokas, et al., Surface Modification of Collagen Hydrogels, 2015. doi:WO2015055661.
- [230] T.T. Nguyen, C. Gobinet, J. Feru, S.B. -Pasco, M. Manfait, O. Piot, Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction, *Spectrosc. An Int. J.* 27, 421–427 (2012). doi:10.1155/2012/686183.
- [231] B.G. Frushour, J.L. Koenig, Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin, *Biopolymers.* 14, 379–391 (1975). doi:10.1002/bip.1975.360140211.
- [232] Q. Zhang, K.L. Andrew Chan, G. Zhang, T. Gillece, L. Senak, D.J. Moore, et al., Raman microspectroscopic and dynamic vapor sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue, *Biopolymers.* 95, 607–615 (2011). doi:10.1002/bip.21618.
- [233] C. Li, G. Guan, R. Reif, Z. Huang, R.K. Wang, Determining elastic properties of skin by measuring surface waves from an impulse mechanical stimulus using phase-sensitive optical coherence tomography., *J. R. Soc. Interface.* 9, 831–41 (2012). doi:10.1098/rsif.2011.0583.
- [234] A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates., *J. Cell Sci.* 116, 1881–92 (2003). doi:10.1242/jcs.00383.
- [235] M.J.P. Biggs, M. Fernandez, D. Thomas, R. Cooper, M. Palma, J. Liao, et al., The Functional Response of Mesenchymal Stem Cells to

- Electron-Beam Patterned Elastomeric Surfaces Presenting Micrometer to Nanoscale Heterogeneous Rigidity, *Adv. Mater.* 1702119 (2017). doi:10.1002/adma.201702119.
- [236] A.A.K. Moe, M. Suryana, G. Marcy, S.K. Lim, S. Ankam, J.Z.W. Goh, et al., Microarray with Micro- and Nano-topographies Enables Identification of the Optimal Topography for Directing the Differentiation of Primary Murine Neural Progenitor Cells, *Small*. 8, 3050–3061 (2012). doi:10.1002/smll.201200490.
- [237] W. Wang, J. Li, K. Wang, Z. Zhang, W. Zhang, G. Zhou, et al., Induction of predominant tenogenic phenotype in human dermal fibroblasts via synergistic effect of TGF- β and elongated cell shape, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2015).
- [238] K. Kushiro, T. Yaginuma, A. Ryo, M. Takai, Differences in Three-Dimensional Geometric Recognition by Non-Cancerous and Cancerous Epithelial Cells on Microgroove-Based Topography, *Sci. Rep.* 7, 4244 (2017). doi:10.1038/s41598-017-03779-6.
- [239] H. Yu, K.P. Lim, S. Xiong, L.P. Tan, W. Shim, Functional Morphometric Analysis in Cellular Behaviors: Shape and Size Matter, *Adv. Healthc. Mater.* 2, 1188–1197 (2013). doi:10.1002/adhm.201300053.
- [240] M. Prager-Khoutorsky, A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, et al., Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing, *Nat. Cell Biol.* 13, 1457–1465 (2011). doi:10.1038/ncb2370.
- [241] Y. Zhou, R. Valiokas, B. Liedberg, Structural Characterization of Microcontact Printed Arrays of Hexa(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiols on Gold, *Langmuir*. 20, 6206–6215 (2004). doi:10.1021/la049421a.

8. SANTRAUKA

List of Abbreviations

AFM	atomic force microscopy
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilane
BSA	bovine serum albumin
ETA	monoethanolamine
HEMA	2-hydroxyethyl methacrylate
PEGMA	poly(ethylene glycol) methacrylate (Mn =500)
MAA	methacrylic acid
HP	HEMA and PEGMA copolymer
HPMAA	HEMA, PEGMA and MAA copolymer
HDF-GFP	GFP expressing human dermal fibroblast
HF-GFP	GFP expressing human fibroblast
HCEC	human cornea epithelium cells
ECM	extracellular matrix
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
FN	fibronectin
GA	glutaraldehyde
NHS	N-hydroxysuccinimide
PEG	poly(ethylene glycol)
PC	porcine collagen)
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffer saline
PDMS	polydimethylsiloxane
SC-1	standard clean 1
SEM	scanning electron microscopy
SAM	self-assembling monolayer
TCP	tissue culture plate
μCP	micro-contact printing

Introduction

Biocompatibility is a stringent requirement for materials intended for biological and medical research and clinical applications. Only biocompatible materials can be employed for mimicking and restoring the properties of natural tissues. Within the context of developing the tools and techniques to be used in the regenerative medicine of the next generation, it is equally important that biocompatible materials not only function as physical scaffolds – supporting cell growth and tissue formation – but that they also interactively promote or correct the vital processes leading to the regeneration of damaged tissues. At the molecular scale, the cell experiences contact with a material via the physical interactions and molecular recognition events occurring between the cellular and material surfaces. Therefore, an establishment of biophysical and biological models for studying those mechanisms relies on obtaining appropriate model surfaces. This type of surfaces is designed to display a controlled presentation of functional groups, interactions and topographies for a programmable and interactive manipulation of biochemical and mechanobiological processes, structure, growth, migration and cellular differentiation.

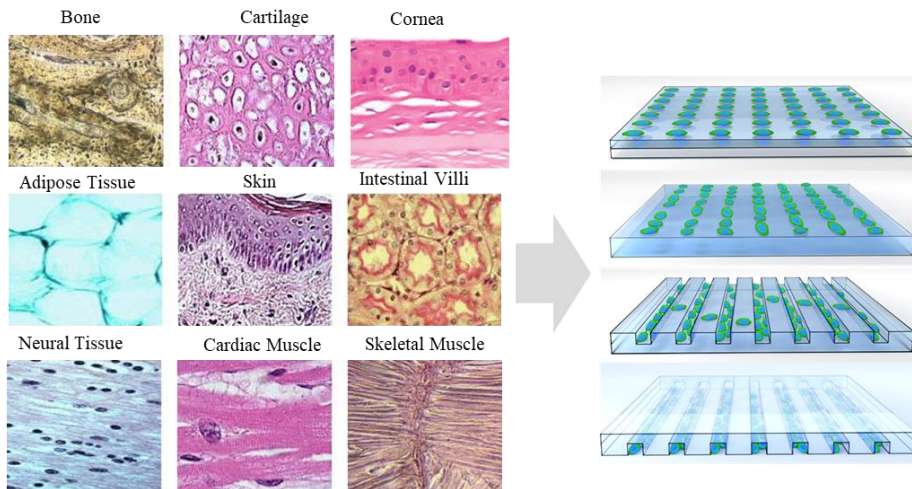


Fig. 1. A schematic explaining the concept of mimicking the architectures of living tissues by employing artificial systems

The surfaces serving as supports of *in vitro* systems also have to be biocompatible, stable in the complex media (including cells, proteins, metabolites etc.) and non-toxic in long-term cell culture experiments.

Novelty and Relevance

Glass modification by ultrathin organic layers is a common strategy for defining chemical composition and tuning physical properties. It is important for many life science and medical applications. Despite borosilicate glass being widely used in microscopy, cell culture, compound screening and other systems, the chemical surface variation and poor reproducibility of its physical properties remains a technical challenge [1][2].

It is even more actual in the context of emerging chip platforms that are based on micro- and nanostructures, which have to be fabricated on/in a defined and biocompatible substrate. In the latter applications, the surface composition and topography have to be understood and defined at the nanoscopic and molecular scale.

For advanced biophysical models and different *in vitro* systems, as well as for regenerative medicine applications, it is critical to obtain 2D-3D micro- and nanopatterns, surface topographies and, ultimately, miniature building blocks. One class of promising biomaterials in this regard are biosynthetic hydrogels based on ECM proteins, with collagen being the primary variant. They are biocompatible, optically transparent and possess elastomechanical properties suitable for the fabrication of regenerative implants [9][10][11].

Therefore, the present study has, for the first time, demonstrated them as a platform for functional and structural micro- and nanofabrication.

Modern 3D models of tissues and organs are technically complex, integrated microdevices (analogous to the integral circuits and microprocessors used in electronics). They allow for increasing the complexity of the processes under investigation via combining the fluidic and material transfer dynamics with cell adhesion, migration, phenotypes and with addressable, multi-channel detection and bioinformatics tools. This direction of multi-disciplinary engineering is highly promising, as it allows for combining individual tissue blocks into one system, better mimicking the physiology of natural tissues and organs [11][12][13]. In the future, this type of devices could be utilized in the HTS of pharmaceutical and chemical compounds as well as in regenerative and personalized medicine. Protein-based hydrogels are promising materials for fabricating the building blocks of this kind [8][14][9]. It has been shown that collagen and collagen-MPC hydrogels are optically transparent and mechanically stable enough for fabricating implants. However, the possibility of obtaining functional patterns and fabricating microscopic and sub-microscopic topographies has not been demonstrated in this kind of materials. Even the most recent literature shows that most of the studies have been focused on the patterning and micro/nanofabrication of either solid materials such as silicon and titanium or synthetic elastomers and different plastics, together with

studying how they interact with living cells. Therefore, the fabrication and characterization of biosynthetic elastomer-like materials is important for advanced biomaterials and tissue engineering.

Finally, this work relates to developing the next generation of eye corneal implants. According to the data of the World Health Organization, 253 million people have visual disorders, including 36 million people suffering from blindness [4]. Diseases involving eye corneal damages are one of the main causes for blindness [5]; there is a shortage of donor corneas, especially in the developing world [6]. However, even having donor corneas, there are risks of rejection, biohazards etc. [7]. Therefore, the present study has delved into the fabrication of biosynthetic, hydrogel-based, microstructure-enhanced corneal implants.

Scientific Goals and Tasks

The goals of this work were the following: i) The establishment of an efficient strategy for chemically modifying a borosilicate glass surface in order to obtain chemically and physically stable, bio-repellent coatings suitable for functional modifications; ii) The physical characterization and microfabrication of/on such a coating; iii) The fabrication, physical and biological characterization of protein-based microstructures on biosynthetic hydrogels used in corneal implant applications; iv) The demonstration of mechanically integral 3D building blocks containing micro-nanotopographies as promising tissue scaffolds.

To achieve the goals, the following tasks have been identified:

1. A chemical strategy for a light-controlled, initiator-free *in situ* synthesis of a bio-inert, chemically functionalized coating on borosilicate glass;
2. A physical characterization of the synthesized coating on glass by using surface analysis techniques;
3. The fabrication and characterization of protein micropatterns on the bio-inert coating;
4. The fabrication and characterization of protein micropatterns on biosynthetic, protein-based hydrogels used as eye corneal implants.
5. The fabrication and characterization of surface topographies in biosynthetic, protein-based hydrogels;
6. A survey of the effects and applicability of the designed topographies and devices in immortalized human cell cultures.

Statements to be Defended

1. The chemical interaction between the GA-modified glass surface and the HPMMA monomers leads to high yields in the *in situ* synthesis of cross-linked PEG coatings.
2. The nanometers-thick PEG MA coatings on glass display hydrogel-like physico-chemical properties and chemical reactivity.
3. Fabricated fibronectin micropatterns on PEG hydrogel display controlled structure and robustness; they are suitable for the fabrication of single- and multiple-cell arrays.
4. Despite the high water content and high crosslinking degree, collagen hydrogels have a physically defined surface, which can serve as a substrate for the fabrication biochip-like architectures using microcontact-based lithography.
5. Protein hydrogels retain their shape with nanometric precision, thus behaving like biosynthetic elastomers.

List of the Author's Publications Related to this Thesis

1. Mirazul Islam, M.; Cèpla, V.; He, C.; Edin, J.; Rakickas, T.; Kobuch, K.; Ruželė, Ž.; Jackson, W. B.; Rafat, M.; Lohmann, C. P.; et al. Functional Fabrication of Recombinant Human Collagen-Phosphorylcholine Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *Acta Biomater.* **2015**, *12*, 70–80.
2. M. Griffith, J. Phophase, R. Ravichandran, Ž. Ruželė, V. Cèpla, R. Valiokas, M. M. Islam, T. Rakickas, Surface modifications of collagen hydrogels, patent application, Publication number WO2015/055661; 23 April **2015**.J.
3. Phophase, M. Griffith, M. M. Islam, R. Valiokas, R. Ravichandran, V. Cèpla, Ž. Ruželė, T. Rakickas, Regenerative prostheses as alternatives to donor corneas for transplantation, patent application, patent granted EPO 14784228.0-1455, **2018**.

Other publications:

1. V. Jakubkiene, V. Cepla, M. M. Burbuliene, and P. Vainilavicius, *Synthesis and Functionalization of 8-Methyl-2h-pyrimido[2,1-c][1,2,4]triazine-3,6(1h,4h)-dione*, Journal of Heterocyclic Chemistry, Vol. 49, p. 737-741, **2012**.
2. H. Erfle, R. Valiokas, V. Cèpla, V. Starkuvienė, Bioactive compound delivery assembly, patent application, publication number: WO / 2017/140429, August 24, **2017**.

Contributions by the Authors

The author, based on the consultations that he had with the supervisor, developed all experimental research plans, performed the biocompatible hydrogel synthesis on glass substrates, including the synthesis strategy, choice of components and the assembly of a silanization set-up. The author also (1) performed the analysis by stylus profilometry, imaging ellipsometry and participated during the planning, implementation and data analysis of the AFM measurements; (2) designed and produced, using photolithography, the masters for fibronectin patterning and the molds for PC-MPC hydrogels having microtopography; (3) performed fibronectin patterning on biocompatible hydrogel and corneal implant surfaces; (4) adopted a micro-molding technique for collagen-based hydrogel microfabrication; (5) planned and participated in Raman spectroscopy measurements; (6) participated in all cell experiments and data analysis; (7) processed and analyzed the experimental data by coordinating the coworkers. The author of the dissertation published one scientific article and co-authored two international patent applications, all related to the defended thesis.

Tomas Rakickas performed the AFM measurements described in Chapters 3 and 4.

Gintarė Garbenčiūtė assisted in preparing the samples with bio-inert coating, as well as silanizing the glass surface, and performed the measurements of the surface water contact angle presented in Chapter 3.

Aušra Baradokė performed kinetic measurements by imaging ellipsometry, shown in Chapter 3.

Airina Mazėtytė carried out cell culturing and contributed to cell experiments described in Chapter 5 under the guidance of the author. Part of the results presented in Chapter 5 were included in her master's thesis [15].

Dr. Mirazul Islam M. manufactured and characterized the implants and performed cell experiments presented in Chapter 4.

Dr. Artūras Ulčinas performed the AFM topography and the mechanical properties measurements, Chapter 5.

Romuald Eimont carried out the production of protein hydrogels with topographic structures, assessed the size of the topographic structures using optical microscopy and contributed to cell experiments (the data are presented in Chapter 5) under guidance of the Author. Part of the results presented in Chapter 5 were included in his master's thesis [16].

Dr. Ilja Ignatjev performed the Raman spectrometry measurements, Chapter 5.

Structure of the Thesis

This doctoral thesis consists of 7 chapters.

Chapter 1. Literature Survey

This chapter presents the main model surfaces for the fabrication of the scaffolds and the structural elements of the tissue, including self-assembled monolayers, ultra-thin PEG layers and PEG hydrogel coatings. Also, it provides an introduction into the main natural tissue scaffold – the extra cellular matrix (ECM) – and especially its two essential components: collagen and fibronectin. Further on, the concept of biosynthetic hydrogels and their application as corneal implants is introduced. The short overview of the most commonly used techniques for fabrication of micro- and nanostructures on/of the soft hydrogel substrates is given. Finally, the analytical techniques relevant for this type of materials and surfaces are described.

Chapter 2. Materials and Experimental Techniques

In this chapter, the main methods and materials used in the performed experiments are described. Bio-repellent hydrogels on a glass substrate were synthesized using Self-Initiated Photografting and Photo Polymerization (SIPGP) [59]. The polymerization of PEG hydrogel was induced by a UV light instead of the chemical initiators. Borosilicate glass or commercial OptiSlide substrates were washed using the SC-1 cleaning procedure and treated in a plasma dry cleaner. Immediately after the plasma treatment, the glass substrates were silanized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTMS) in a custom-made vapor phase deposition apparatus, which was adapted from another study [182]. Prior to the hydrogel photografting process, the silanized slides were rinsed with water and dried; then, a drop of 5% w/w of glutaraldehyde (GA) solution in 0,1M PB pH=8.0 buffer was applied on a surface for 10 min to convert the amine group into an aldehyde group. After this step, the samples were again rinsed with water and dried. The monomer solutions of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA, $M_n = 500$) and methacrylic acid (MAA) were prepared in water to obtain 360 mM or 240 mM solutions. Monomer solutions with a 1:1:1 (HPMAA) ratio or 1:1 HEMA:PEGMA (HP) with a total monomer concentration of 360 mM or 240 mM were thoroughly mixed. The used SIPGP method was described elsewhere[35]. Shortly, a drop of mixed monomer solution, about $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, was casted on a glass slide and covered with a UV-transparent quartz disk forming a sandwich type of construct, where the glass slide was hanging under the quartz disk. The assembly was placed in a chamber, purged with moisturized nitrogen gas, preserving the monomer solution from dehydration and oxygen, and exposed to the UV light (TUV PL-S 11 W, main emission peak at 254 nm) for 6 min. Hydrogel gradients [183] with 3, 6, 9, 12, 15 min UV light exposure time

sections were created using a custom-built, shutter-opening system moving in 3 mm steps. After the UV exposure step, the glass slides with a formed hydrogel layer were rinsed in water for 1 min, dried under a nitrogen stream and kept in air at 4 °C until further use.

For μ CP on hydrogels, square 10 mm \times 10 mm PDMS stamps were prepared using the previously published protocol [241]. Prior to printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed with ethanol, dried under a stream of N₂ gas and treated with oxygen plasma (20 W power) for 30 s in a plasma dry cleaner. The stamps were then pre-loaded with 30 μ l of an “ink” solution, containing 0.1 mg/ml FN with 10 μ g/ml bovine plasma fibronectin labelled with HiLyte Fluor™ 488 or 10 μ g/ml BSA-TR® in 0.1 M PB buffer, pH 8.0. For cell experiments, the labelled fibronectin was omitted to avoid an overlap of the used fluorescence dyes. After 10 min of incubation with the “ink” at room temperature, the excess of the “ink” was removed with a pipette and the stamp dried under the N₂ stream for 20 s.

During preparations for μ CP, the carboxyl groups in HPMAA or RHCIII-MPC hydrogel were activated by immersing the samples in 1 ml of ethanol solution for HPMAA and PBS pH 5.7 for RHCIII-MPC for 15 min. The solution contained 10 mM N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and 2.5 mM of N-hydroxysuccinimide (NHS) (Fig 2A(1)).

All samples were rinsed for 30 s in ethanol for HPMAA and in PBS pH 5.7, then in water for 10 s and dried with N₂ gas. Then, the substrates with NHS/EDC-treated surfaces were placed in a Petri dish. Further on, the substrates were printed by applying the PDMS stamp onto the hydrogel surface (Fig 2A(2)). The printing procedure was performed manually without any load, using the N₂ stream to get the stamp into contact with the hydrogel surface. The stamp was left on for five minutes and then removed using tweezers. For control samples the μ CP step was omitted (Fig 2B). The patterned hydrogel surfaces were incubated with a solution containing 100 mM ETA for HPMAA, and 10 mM PEG₃-NH₂ for RHCIII-MPC, in PBS pH 8.0 for 40 min, to passivate the remaining unreacted carboxyl groups (Fig. 2A(3)). The samples were then carefully washed several times in water and stored at 4 °C. The HPMAA samples were stored in air, while the RHCIII-MPC samples in PBS pH 7.3.

Collagen hydrogels RHCIII-MPC and PC-MPC were produced as previously published [212]. Briefly, 500 mg of a 18% (w/w) RHCIII or 12% (w/w) porcine collagen type I solution was buffered with 150 ml of 0.63M MES buffer in a syringe mixing system [8]. Then, it was thoroughly mixed with calculated volumes of an MPC solution and a PEGDA solution in an MES buffer in a mixing system immersed in an ice-water bath. The collagen:

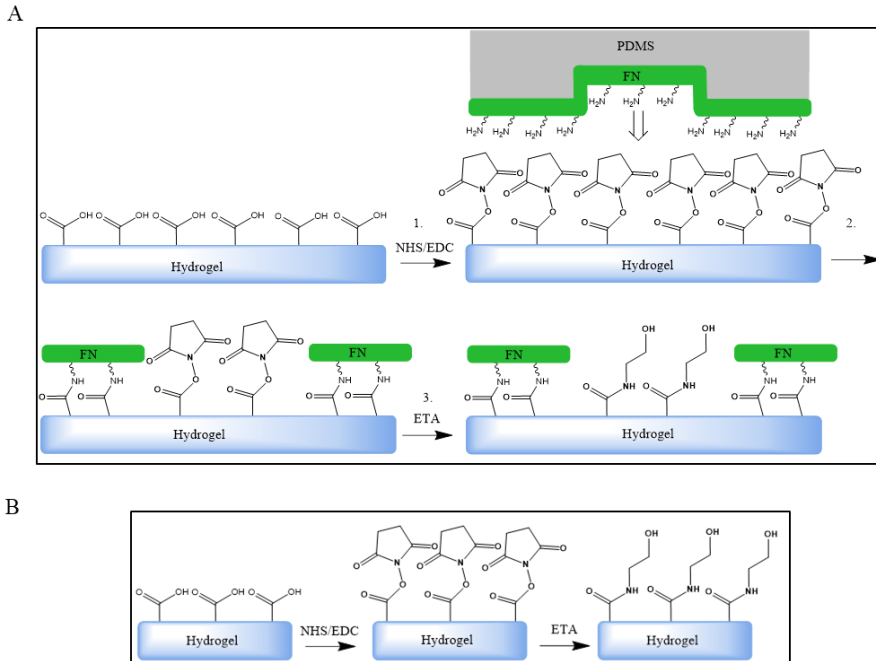


Fig. 2. A schematic of the microcontact printing procedure (A), including the activation of free hydrogel carboxyl groups, fibronectin “ink” printing and passivation with ETA. (B) An explanation of hydrogel carbonyl group activation and passivation steps

MPC ratio was 4:1 (w/w). The MPC:PEGDA ratio was 3:1 (w/w). The collagen: MPC ratio was 4:1 (w/w). The MPC:PEGDA ratio was 3:1 (w/w). Subsequently, 25 ml of a 4% (w/v) APS solution in sn MES buffer containing TMEDA (APS: TMEDA=1:0.78,w/w) was added into the collagen–MPC–PEGDA solution and thoroughly mixed. Calculated volumes of an EDC and NHS solution (both at 20% w/v, molar equivalent ratio collagen–NH₂ : for RHCIII-MPC: EDC:NHS: =1:0.4:0.4, for PC-MPC EDC:NHS: =1:0.7:0.7, for PC EDC:NHS: =1:0.7:0.7) were then added to crosslink collagen by thoroughly mixing. The final mixture was immediately dispensed onto a glass plate or, alternatively, into PDMS molds having specific shapes (Fig. 3). The hydrogels were cured at 100% humidity under nitrogen at room temperature for 24 h. After demolding, they were washed thoroughly with 10mM phosphate buffered saline (PBS) and stored in PBS containing 1% chloroform to maintain sterility.

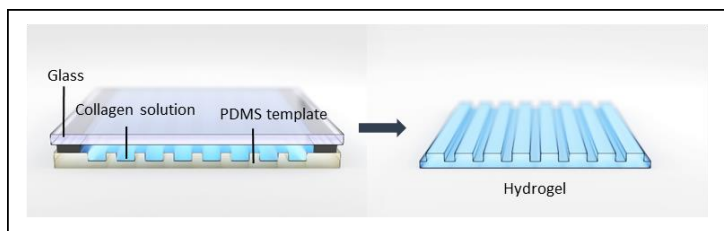


Fig. 3. A schematic explaining the fabrication of the PC-MPC hydrogel with surface topographies by the micromolding method

Atomic force microscopy, AFM. This type of the scanning probe microscopy techniques is based on an atomically-sharp probe used to collect the structural, mechanical and physicochemical information about a sample surface with a high spatial resolution. This information can be 3D-topography, stiffness, interaction force and other. In the present work, we used a commercial NanoWizard® 3 (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) AFM mounted onto an Olympus IX73 (Olympus, Tokyo, Japan) inverted optical microscope. The elastic properties of a hydrogel surface were measured in a liquid environment using QI Advanced mode (JPK Instruments AG, Berlin, Germany). This is a force spectroscopy-based technique, where force-displacement curves are captured in each image pixel and various surface properties (like elastic modulus or the thickness of an uncompressed hydrogel film) are calculated during curve analysis.

Stylus profilometry. Like AFM, a stylus profilometer also uses a sharp probe, called a stylus, which is brought into physical contact with the surface at a specified constant force. While it is moved laterally across the sample surface, it records the surface profile. This method is sensitive and provides high vertical resolution. For thickness measurements of bioinert coatings, a Dektak 150 (Veeco, Santa Barbara, USA) stylus profilometer was used.

Fluorescence microscopy. To characterize the reproducibility of the μ CP patterns, the patterned hydrogels were imaged using an upright Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) or an inverted Olympus IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) optical microscopes.

Imaging Null Ellipsometry. The thickness of organic layers and patterns were measured by an imaging null ellipsometer (Nanofilm_ep3, Accurion GmbH, Goettingen, Germany) using a laser emitted at a 658 nm wavelength. This device can be used as a classical null ellipsometer; however, it is additionally equipped with an objective and a CCD camera instead of a photodetector. Thus, it captures/acquires microscopic images with an ellipsometric contrast. This system is capable of measuring thin film parameters like thickness, refractive index and (*in situ*) adsorption. It also

records the 3D maps of these parameters within the selected regions of interest.

Contact angle goniometry. Surface free energy can be estimated by analyzing the macroscopic water droplet shape on the investigated surface. In the present study, for water contact angle measurements, a commercial Drop Shape Analyzer – DSA25 (KRÜSS GmbH, Hamburg, Germany) was used.

Raman spectrometry. Raman spectrometry is a convenient method for qualitatively analyzing the chemical compositions of fully hydrated biosynthetic hydrogels. Raman scattering spectra were registered with an Echelle type RamanFlex 400 (Perkin Elmer Inc., USA) spectrometer.

Chapter 3. The Characterization and Application of Synthetic Peg Hydrogels on Glass

PEG hydrogels have been *in situ* synthesized on borosilicate (microscopy) glass substrates by self-initiated photografting and photo polymerization (SIPGP) from 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) and methacrylic acid (MAA) monomers. By employing surface analysis techniques, the conditions for efficient synthesis were investigated. Hydrogel films' thickness was measured in air and at different pH in buffer; we also evaluated the hydrogel thickness dependency on pH. The applicability of the synthesized HPMAA hydrogels as substrates for the fabrication of glass supported biochips, e.g., arrays for single and multiple cell patterning and microscopic analysis, was assessed. Fibronectin patterns onto HPMAA were fabricated by μ CP. Their nanoscopic structure was studied in air and in buffer, while also evaluating the stability of hydrogels having fibronectin patterns in the physiological buffer by recording imaging ellipsometry kinetics. Most of the cell patterning techniques are problematic due to nonspecific binding and/or poor stability of the protein patterns [126].

In the case of long-term experiments, the artificial materials used in the chip architecture can cause cytotoxic effects. Thus, the developed PEG hydrogel/glass substrates showed as a promising alternative for the fabrication of extracellular matrix protein-based microstructures both for single-cell, cell array and cell culture technologies.

The surface photografting of poly(ethylene glycol)-based methacrylate hydrogels can be obtained by using a free radical reaction of hydroxyl-terminated PEG methacrylate monomers having an average chain length of 10 ethylene glycol units (PEGMA) with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), which is initiated with an UV light at 254 nm. This reaction is very efficient on cycloolefin polymer-coated silicon surfaces [35]. However, it does not take place on borosilicate glass (pristine or silanol-enriched SiO_x).

For a quantitative characterization, a null ellipsometry was employed using commercial glass substrates (OptiSlide) that had a high refractive index layer and a top SiO₂ layer to mimic the glass surface. For example, the treatment of a chemically clean microscopy glass surface with HEMA: PEGMA (HP) 240 mM mixtures in combination with exposure to the 254 nm wavelengths light (an exposure time 6 min) does not result in the formation of a detectable organic coating (Fig.4A), although similar treatments yield up to 40 nm-thick HP layers on cycloolefin polymer-coated silicon surfaces [35]. A possible explanation is that the HP hydrogels have not got enough covalent attachment points on a borosilicate glass surface.

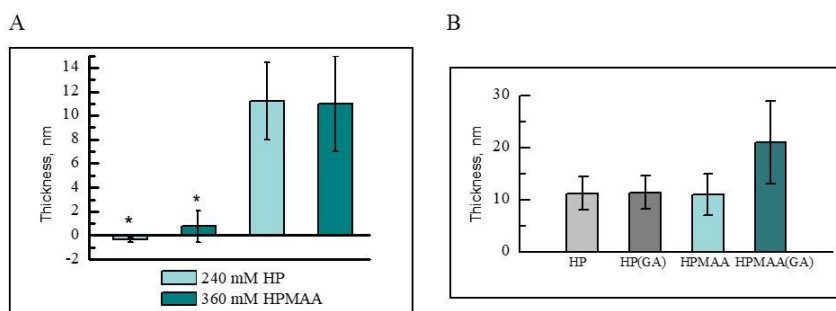


Fig. 4. A comparison of hydrogel synthesis efficiency at different compositions. The ellipsometric thickness of 240 mM HP and 360 mM HPMAA hydrogels on an APTMS-free * and on an APTMS-modified OptiSlide substrate, respectively (A). The profilometric thickness of 240 mM HPMAA and HP hydrogels after 6 min UV exposure on an APTMS-modified glass slide, glutaraldehyde (GA)-treated and untreated (B). The duration of UV exposure was 6 min.

Based on the above observations, for the experiments described in the present study, silanized microscopy glass substrates were used. The schematic in Fig. 5 explains the main steps in the chemical synthesis of PEG hydrogels on glass by SIPGP. After silanization with APTMS, null ellipsometry indicated a resulting layer having a thickness d of 0.6 ± 0.1 nm, a value very close to the calculated and averaged monolayer of the aminosilylated layer, which is 0.66 nm in thickness [195].

Additionally, we tested the GA for conversion of the amine groups present on the APTMS-functionalized glass into aldehydes via the Schiff base formation. Usually, the GA-treated surfaces are used for ligand immobilization [191][192] as well as for polymer bonding to glass surfaces [193][194]. However, no data are available in literature regarding the usage of GA in improving SIPGP. Thus, the GA treatment on the silanized

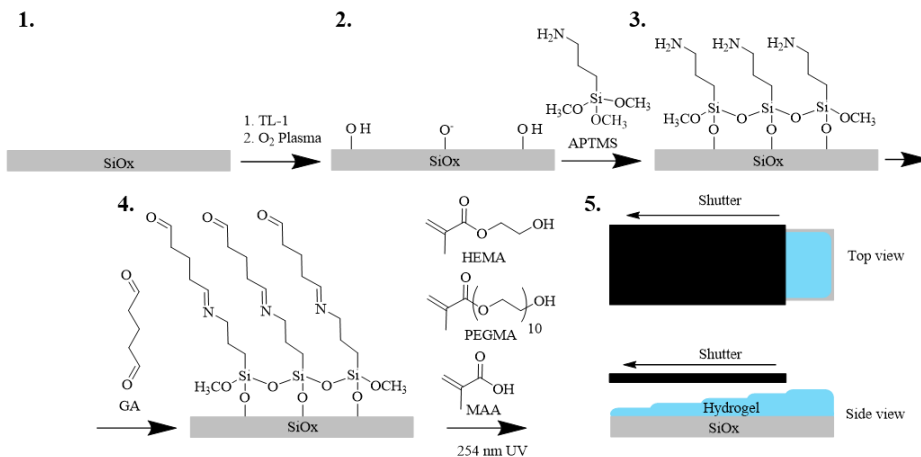


Fig. 5. A schematic explaining APTMS silanization, gluteraldehyde (GA) treatment and HPMAA hydrogel gradient formation steps

OptiSlide substrates was tested and the product of such a treatment was measured as an ellipsometric thickness increment $\Delta d = 0.2 \pm 0.1$ nm.

Subsequently, UV-controlled polymerization of HEMA and PEGMA was investigated, with or without MAA monomers. In most of the cases, the hydrogel layer thickness was measured with a stylus profilometer in ambient air. The thickness of the hydrogels on microscopy glass substrates was compared with that measured using ellipsometry on the OptiSlide substrates (see below). Four different types of hydrogels were synthesized using the published HEMA:PEGMA (1:1) monomer composition at 240 mM total concentration [35] and 6 min UV exposure. The comparison suggested that the thickest hydrogel layer was obtained in the case of surface pretreated by GA and with the presence of MAA monomers in the polymerization solution (Fig. 4B). Furthermore, Fig. 6A reveals the influence of monomer solution concentrations (240 or 360 mM, respectively) as well as the UV exposure time (the radiation dose). For this purpose, hydrogel gradients on glass surfaces were generated by a motorized shutter, as explained in the final step in Scheme 1, and measured the hydrogel thicknesses along the gradient.

Once again, the surface profilometry data (Fig. 6A) confirmed that the pretreatment of the APTMS-silanized glass surfaces influenced the thickness of the HPMAA layer, especially at the shorter UV light exposure times. For example, for HPMAA prepared from the 360 mM monomer solutions, at 3 min exposure time, the profilometric thickness d was 11 ± 4 nm on the GA-treated vs. 5 ± 3 nm on the non-treated surface, and at 6 min the d values were 34 ± 9 nm vs. 19 ± 7 nm, respectively. Obviously, higher monomer

concentrations allowed for obtaining thicker HPMAA layers for the exposure times starting from 6 min and longer.

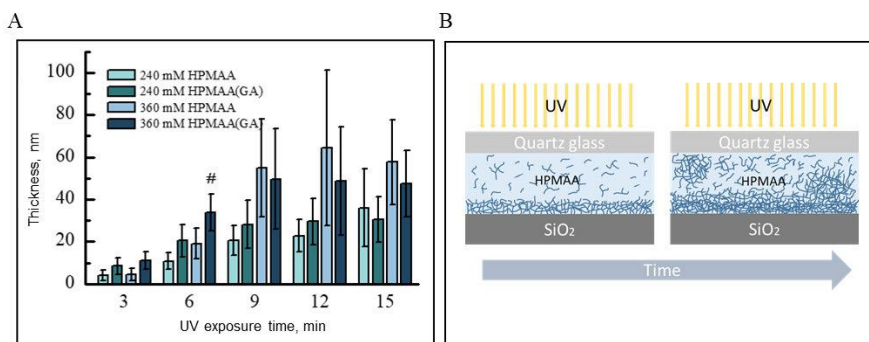


Fig. 6. PEG hydrogel synthesis efficiency as a function of the UV exposure time. Profilometric thicknesses of HPMAA hydrogels on APTMS silanized glass slides, GA- treated or untreated using 240 mM and 360 mM solution concentrations in a different UV exposure time (A). A schematic explanation of the growth mechanism (B). In A, four samples from three separated batches of each variation were measured with a profilometer in three different places at the synthesis time points of 3, 6, 9, 12 and 15 min. The error bars represent the standard deviation. #-in A marks the chosen the formulation

However, for the UV exposure times longer than 6 min, the HPMAA layer thickness did not change significantly, or it had even started to decrease. One explanation for this is that more grafting points were created not only on the surface, but also inside of the monomer solution and, thus, the entire polymer brushes were grafted to the surface together with the monomers (Fig. 6B). Such an explanation is plausible bearing in mind the observed significant increase in the standard deviation values. Also, a previous publication [35] reported that in the absence of monomers, the degree of hydrogel matrix degradation was almost linearly dependent on the UV exposure time. Based on these considerations, for the further production of the HPMAA coatings, the APTMS-silanized and GA-treated glass substrates, 360 mM monomer solution concentrations and 6 min UV exposure times were chosen.

Finally, the hydrogel thickness values obtained by surface profilometry and null ellipsometry were cross-validated. The measured thicknesses d of HPMAA (360 mM, 6 min) coatings on the OptiSlides by the two techniques were in excellent agreement: 25.5 ± 9.2 nm and 25.8 ± 5.1 nm, respectively. However, some hydrogel thickness differences between the microscopy glass and OptiSlide substrates were noticed: the d values, measured by profilometry, were 25.5 ± 9.2 nm and 34 ± 9 nm, respectively, for the same optimized synthesis conditions as above.

Swelling is the basic property of hydrogel materials, which indicates their capacity to recruit water molecules and also relates to their interactions with biomolecules, e.g., the repulsion of proteins. Typically, it is measured as the weight ratio of a hydrated and a dry hydrogel, respectively. Due to the above mentioned monomer depletion and hydrogel degradation at longer UV exposures, sufficiently thick hydrogel layers for measurements of the hydrogel weight changes were not synthesized. Instead, the pH-dependent swelling behavior of the photografted HPMAA hydrogel was characterized by AFM [198] with an unmodified tip, measuring the thickness of dry and hydrated hydrogel. The advantage of the relatively new QI mode, which provides a much better control of the probe interaction force, is capability of evaluating the height of an almost unaffected (non-compressed) surface. Therefore, the hydrated hydrogel in buffer was measured, and we recorded two thickness values: the thickness of a compressed hydrogel (to 11 nN force), called the setpoint height, and the thickness of a non-compressed hydrogel, called the contact point height (Fig. 7A).

For determining the absolute hydrogel layer thickness, the samples were scratched to locally remove the hydrogel layer from the glass substrate. According to AFM topography analysis, the thickness of dry HPMAA hydrogel in air was 21 nm (Fig. 7B). Then, by performing an AFM QI scanning of the same ROI in 0.1 M PB pH=7.0, two thickness data sets were calculated – a setpoint height and a contact point height, respectively. The contact point height is a scanner displacement at the point when the onset of repulsive interaction between the AFM tip and the analyzed surface is registered. The setpoint height is a similar parameter as the height obtained in the ordinary contact mode, but it is defined as the scanner displacement reaching the set interaction force (setpoint). Fig. 7A shows the typical force-displacement curves obtained on bare cleaned glass (blue curve) and on HPMAA hydrogel (red curve) surfaces, respectively, with the indicated setpoint heights (dashed lines) and contact point heights (dot lines). As expected, the slope of the force curve registered for the hydrogel surface was lower, indicating a much softer and deformable material. Also, the differences between the setpoint height and contact point height values were different for both types of surfaces. This difference was much larger for the hydrogel surface, showing deformation (compression) in addition to the cantilever bending (detectable on the hard glass surface). Fig. 7C, D shows two representations of the same hydrated HPMAA hydrogel film/area: one is a compressed to a 11 nN force (the setpoint height), and the other one is basically uncompressed, i.e., the contact point height. The histograms of the pixel values revealed two peaks – the first (offset to 0 nm in both images) was due to the glass surface and the second indicated the hydrogel layer thickness. Thus, for this particular HPMAA sample, the thickness of the

uncompressed hydrogel in water was about 105 nm, and the thickness of a compressed hydrogel was 49.5 nm.

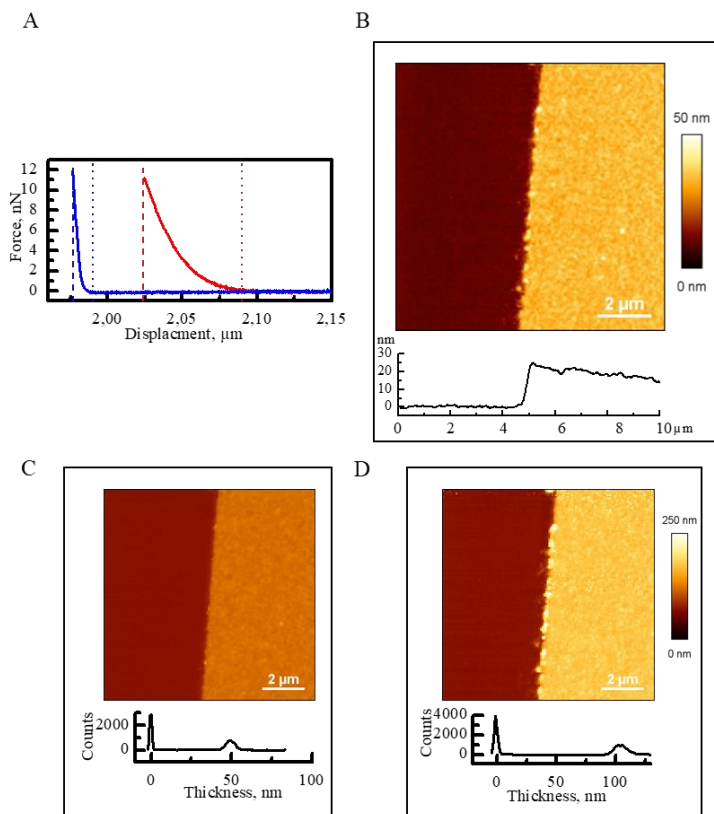


Fig. 7. Typical AFM force curves, obtained on glass (blue curve) and HPMAA hydrogel (red curve) surface (A). Dot lines indicate the position where the probe starts to detect interaction. The contact point height (CPH) is registered at this point. The dashed lines show the position where a defined set point (11 nN force pressure) is reached and a set point height (SPH) is registered. An AFM topography analysis, the thicknesses of dry HPMAA hydrogel (B) Glass and hydrogel layer images obtained using different atomic force microscope (AFM) data sets: set point (11 nN) height (C) and the contact point height (CPH) (D) in 0.1 M PB pH=7.0 buffer, respectively. For the clarity of presentation, the glass surface height was set to 0 nm

It is known that the swelling of a carboxyl group-containing hydrogels is pH-dependent [199] and similar to that observed for anionic copolymers. In a high-pH medium the carboxyl groups are ionized [200] and, due to the electrostatic repulsion, hydrogels can swell extensively thus increasing the overall water uptake capacity. A lowering of the pH of the medium causes the rapid de-swelling of hydrogels [201]. The swelling behavior of our

freshly prepared and chemically blocked (passivated) HPMAA hydrogels was measured in the pH range from 4.5 to 8.0. The hydrogel thickness was determined at each pH using the contact point height data sets (Fig. 8). For swelling ratio calculations, the thickness of hydrogel in air was taken as for reference. Increasing the pH from 5.0 to 7.0, the hydrogel thickness had also continuously increased. As expected, the swelling was higher for the carboxy groups-containing (unmodified) hydrogel, especially at higher pH, whereas the reduction of the swelling ratio could be related to the smaller number of ionic moieties inside the hydrogel passivated with ethanolamine. Water contact angle measurements also confirm the reduction of free carboxyl on the HPMAA surface, the HPMAA surface hydrophilicity having changed from $45.7 \pm 3.6^\circ$ to $52.9 \pm 4.4^\circ$ for HPMAA and HPMAA ethanolamine passivated hydrogel surfaces, respectively.

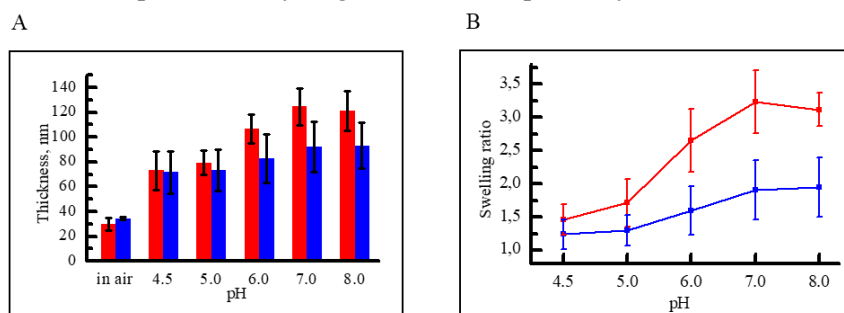


Fig. 8. Thickness (A) and swelling ratio (B) dependency of untreated HPMAA hydrogel (red bars and curve) and those treated by NHS/EDC, followed by ethanolamine (blue bars and curve), in different pH environments. The AFM data were collected on the same sample area using a contact point height data set in 4.5; 5.0; 6.0; 7.0 and 8.0 pH buffer, collected from four different samples

Protein patterning on HPMAA layers. Swelling PEG hydrogels functionalized with chemical reactive groups offer a convenient platform for extracellular matrix (ECM) mimetics. Therefore, ECM protein patterning by μ CP on photografted HPMAA surfaces was tested. PDMS stamps having protruding features, such as discs (the diameter $d=25.7\pm 0.2\ \mu\text{m}$) or stripes (the width $w=191.2\pm 1.1\ \mu\text{m}$), were employed. Fibronectin, which is a cell-interactive protein, e.g., it promotes the adhesion and migration of corneal epithelial cells during wound healing [216][217], was printed.

The fluorescence microscopy of the printed dry hydrogel samples confirmed an excellent replication of the original PDMS patterns: $d=26.2 \pm 0.3\ \mu\text{m}$ and $w=191.7\pm 0.6\ \mu\text{m}$ for the FN discs and lines, respectively (Fig 9A, B). Such a good reproducibility indicated no uncont-

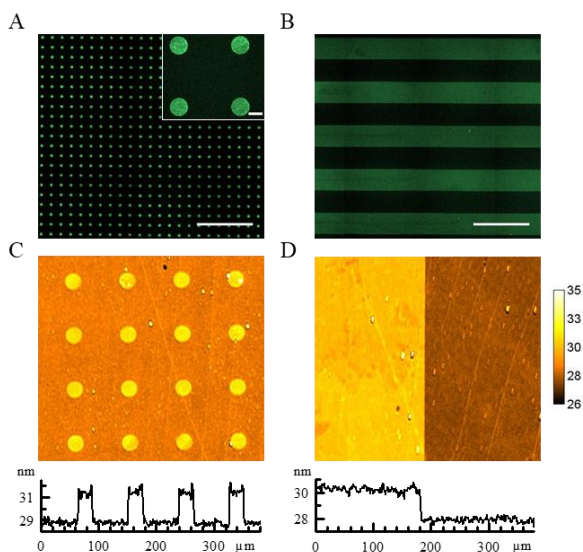


Fig. 9. An example of fibronectin micropatterns on a HPMAA hydrogel substrate. Fluorescence images of 26 μm diameter-dots (A) and 192 μm wide lines (B). Thickness maps and cross-sections of the fibronectin patterns were measured with imaging ellipsometry (C)(D). Scale bars are 20 μm and 500 μm , respectively

rolled FN ink diffusion on the HPMAA surface during μCP . Approx. 95% of the total patterned surface area was essentially defect-free. Imaging ellipsometry indicated that the FN layer thickness measured in air in the patterns printed on HPMAA was 3.0 ± 0.5 nm for the disc and 2.5 ± 0.2 nm for the line features, respectively (Fig 9C, D). Such thickness values were comparable to the average diameter of a FN globule, which is 2 nm [203], indicating that the μCP process yielded a complete monolayer of the protein molecules.

In addition, the fine structure of the FN patterned HPMAA surface was probed by AFM. Scannings of the same samples both in air and also in 0.1 M PBS buffer, pH= 7.4 were performed, in the most actual environment for our cell culture experiments (see below). A topography analysis in air yielded a FN disc feature height of 3.2 ± 1.2 nm (Fig 10A), which was in an excellent agreement with the imaging ellipsometry data. The printed protein features had well-defined borders, they were uniformly filled with FN, relatively smooth and mainly resembling the HPMAA hydrogel surface topography (Fig 10D). The RMS surface roughness in the FN regions was 2.6 ± 0.4 nm, whereas in the bare hydrogel areas, it was 2.1 ± 0.3 nm. Subsequently, upon placing the patterned HPMAA samples in PBS, the FN feature topography and height changed, as evidenced by imaging the sample in the setpoint height (Fig 10B, E), and CPH (Fig 10C, F) modes,

respectively. The compressed hydrogel, imaged with the AFM SPH mode, revealed structures like interconnecting fibrils present both in the FN features and on the bare hydrogel region (Fig 10E). However, such fibrous structures were less visible in the uncompressed hydrogel image (Fig 10F), imaged in the CPH mode, in addition to the surface being dominated by a grainy texture. The height of the compressed FN features was 4.7 ± 1.8 nm, whereas in the uncompressed (contact point height) imaging mode, it became even 12.0 ± 3.0 nm. Both imaging modes indicated an increased RMS surface roughness both on the FN and bare hydrogel areas. In the SPH mode, the corresponding RMS values were 4.3 ± 0.3 nm and 3.5 ± 0.7 nm, whereas in the CPH mode, 7.2 ± 1.3 nm and 5.5 ± 1.3 nm, respectively. To sum up, despite the observed swelling in PBS, the printed FN patterns remained stable and preserved their structural integrity.

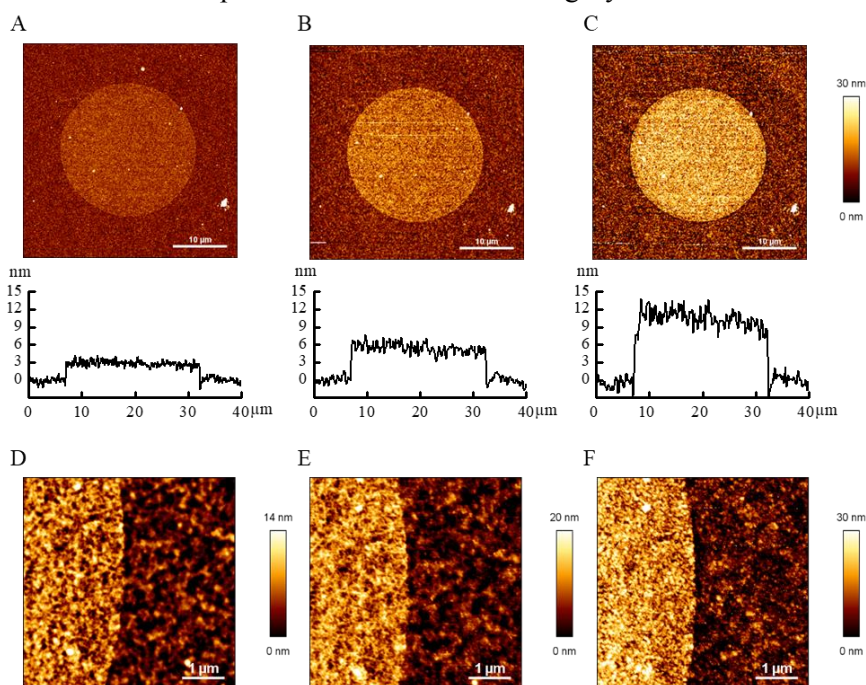


Fig. 10. The thickness, surface topography and the fine structure of micropatterned fibronectin dots on the HPMAA hydrogel, measured with AFM. The large area scan of a whole dot, whereas height cross-sections are shown below the corresponding images (A–C). The zoom-in of the corresponding scans is in the bottom panel (D–E). The scans were made in air using AC mode (A and D), a 11 nN set point height image in 0.1 M PB pH=7.3 (C and E) and a CPH data set in the same buffer (C and F)

An imaging ellipsometry was employed for sensogram registrations of BSA and FN interactions with the FN-patterned and passivated HPMAA hydrogel regions, respectively, on the OptiSlide substrates under flow conditions. The chosen protein system mimicked two different types of biological environments: BSA was chosen as a representative of surface-sticky blood plasma proteins, whereas FN is an ECM protein that is synthesized by cells themselves, e.g., under long-term cell culture conditions [204]. Fig. 11A shows an imaging ellipsometry micrograph of the border region of a FN pattern on HPMAA hydrogel in 0.1 M pH=7.3 PB that was treated with proteins solutions. Subsequently, the recorded ellipsometry kinetics (Fig. 11 B) showed that the analyzed ROIs remained stable in the running buffer (50 μ L/min flow rate), i.e., they were in good agreement with the above-discussed AFM data confirming the integrity of the fabricated interface.

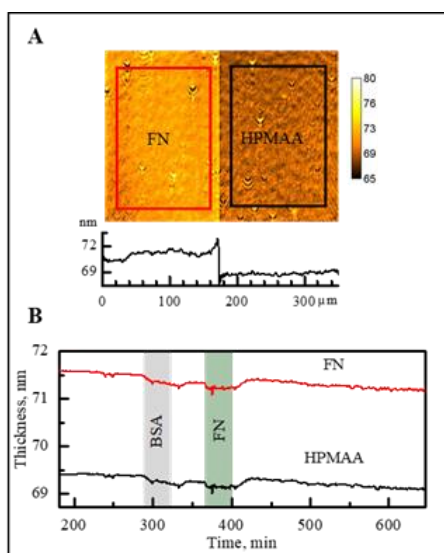


Fig. 11. Fibronectin-patterned HPMAA hydrogel chip stability and a non-specific proteins attachment from the solution test, taken using imaging ellipsometer kinetic measurements. A thickness map with a marked HPMAA (black square) and FN (red square) with regions of interest (A) on the chip. In the graph (B), the red curve represents FN, and the black curve denotes the HPMAA thickness changes during the time. Cross-sections in the graph represent BSA and FN solution inlet time into kinetic/SPR cell

Also, the sequential injections of both BSA and FN did not affect the sensograms, i.e., no non-specific protein binding was detected within the noise level of the instrument, which was less than about 0.2 nm. This

confirms that under such flow conditions, the FN micropatterns remain stable on the HPMAA layer at least for time periods of 12 hours.

The interactions between living cells and the HPMAA surface were characterized, and the applicability of the FN patterns on hydrogel/microscopy glass for cell patterning and controlled culture experiments were evaluated (Fig 12). As a model system for single-cell arrays, 26 μm diameter disc-shaped FN patterns were fabricated. About 4 000 human cornea epithelium cells (HCEC) were seeded onto them and cultured for 4 h (the sample area was $20\times 20\text{ mm}^2$). Under such conditions, the cells occupied $64\pm 12\%$ of all FN discs. Out of these, $88\pm 7\%$ were occupied by single cells. Nonspecific cell binding in the HPMAA areas outside the FN discs were never observed. A microscopy analysis confirmed that cell adhesion started immediately after seeding and, after 4 h, most of the cells were completely spread on the FN discs that had a surface area of $540\pm 50\text{ }\mu\text{m}^2$. Fluorescence images showed no signs of degradation or deformation of the FN discs. Namely, actine and nuclei staining indicated that the HCEC fully adhered on all features and formed round cell bodies with non-polarized actin networks (Fig. 12B). Such single-cell patterns remained stable during the 4 h cell culture (the experiment time was limited to avoid cell proliferation).

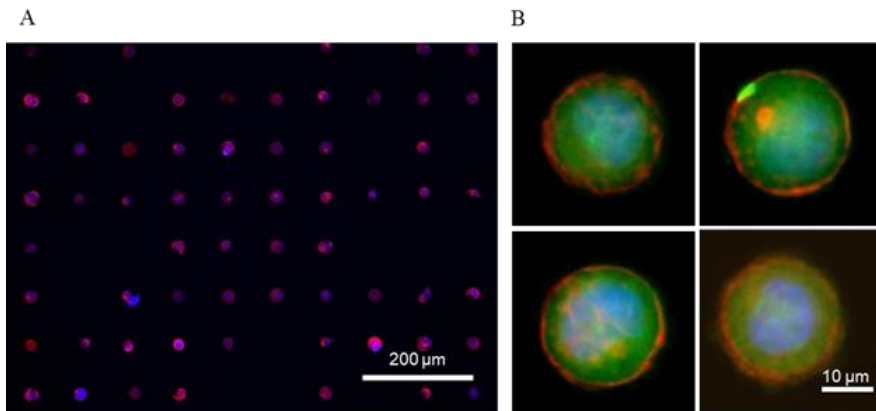


Fig. 12. Fluorescence micrographs showing the interaction of fibronectin patterns on HPMAA with the HCEC-GFP cells. Cells were fixated for 4 hours after seeding and the actin (red), vinculin (green) and nucleus (blue) were stained. An overview image (A) of the biochip and zoom-ins of different single cells (B)

The stability and biocompatibility of the FN-patterned HPMAA surfaces (FN stripes having a width of $192\text{ }\mu\text{m}$) were evaluated by performing spatially-controlled cell culture experiments that continued for 96 h. Despite the observed almost three times higher cell density on the FN areas, after 96 h, the cells remained as viable as on the glass and TCP substrate.

Chapter 4. The Surface Modifications of Biosynthetic Hydrogels

Previous studies reported on RHCIII hydrogels for implant applications that were reinforced by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) to form an interpenetrating network, RHCIII-MPC [14]. These hydrogels stimulated tissue regeneration while repelling any unwanted ingrowth of blood vessels into the implants [213]. In the present study, such reinforced hydrogels were tested as fully hydrated substrates for exploring the effect of surface modifications by μ CP. Taking advantage of the improved mechanical stability of the RHCIII-MPC hydrogel, those micropatterns were printed and analyzed that consisted of human fibronectin (FN) as “ink.” The effect of the printed FN micropatterns on the growth of human corneal epithelial cells was quantitatively evaluated.

The most stable RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4 hydrogels were optimal for μ CP. Fig. 13 shows an example of fully hydrated collagen hydrogel and typical resulting striped FN patterns, as visualized by antibody staining. An analysis of the fluorescence micrographs of the hydrogel samples confirmed good replication of the original patterns: the 30 and 200 μ m stripes. On the PDMS stamp, the width of the narrow stripes was $26.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (based on bright-field microscopy), while that of the printed FN stripes was $27.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$. The thick stripes on the PDMS stamps and the resulting FN patterns had widths of 190.6 ± 1.7 and $191.7 \pm 2.6 \mu\text{m}$, respectively. The good reproducibility indicated that uncontrolled FN ink diffusion on partially dried collagen hydrogel samples was minimal. On the samples printed with the 30 μm stripe pattern, the printed area occupied approx. 37% of the sample area, and approx. 32% of the total hydrogel surface was patterned and defect-free. On the 200 μm -striped samples, the printed sample area occupied 40% of the sample, and approx. 26% of the total hydrogel surface was printed and free from printing defects. Also, the FN ink distribution on the entire patterned surface was satisfactorily homogeneous.

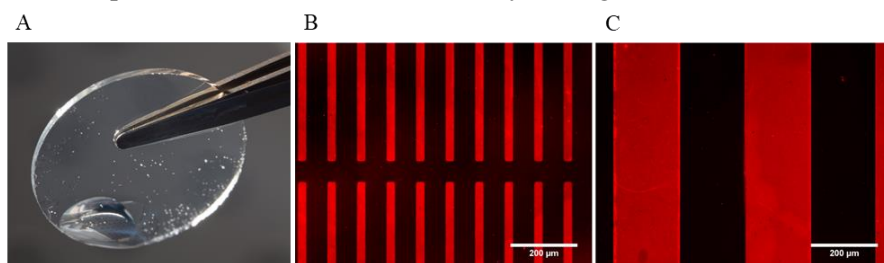


Fig. 13. *Fibronectin-patterned RHCIII-MPC hydrogels. An example of a collagen hydrogel disk (A). Fluorescence micrographs of fibronectin stripes having a width of (B) 30 μm and (C) 200 μm on the surface of RHCIII-MPC hydrogels, visualized by antibody staining*

Micro- and nanotopography of the fully hydrated RHCIII–MPC hydrogels was determined by an AFM analysis. The original, unmodified collagen hydrogel surfaces appeared uneven, with irregularly arranged surface fibrils visible (Fig. 14A). The root mean square (RMS) of surface roughness as measured within a representative $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ scan area was 3.5 nm. The regions of interest (ROIs) for AFM scans on the chemically activated and μCP samples were identified by simultaneous fluorescence microscopic imaging. The AFM tip was positioned in the ROIs that were patterned with FN and BSA-TR® mixture. In topography images of the hydrogel surface after μCP and/or deactivation, the collagen fibrils appeared partially aligned (Fig. 14B), in contrast to the unmodified surface (Fig. 14A). However, the fine details of the collagen fibrils could not be resolved. There was no distinct overall height difference between the majority of the printed and adjacent unprinted areas, due either to the high initial surface roughness and/or the ability to print a very thin, possibly monolayer, thickness of FN. The edges of the stripes, however, were slightly corrugated by the printing and served to delineate the stripe boundaries. The RMS surface roughness of the FN-printed and unprinted regions on this particular sample shown in Fig. 4B was very similar, having values of 1.3 and 1.4 nm, respectively. The AFM analysis, therefore, has showed that the surface modification by μCP resulted only in a very small change in the topography.

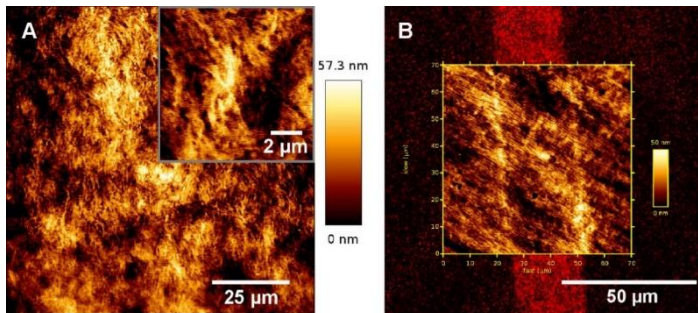


Fig. 14. Contact mode AFM topography images of the RHCIII–MPC hydrogel surface before and after the μCP . (A) Unmodified hydrogel, showing a surface that comprised uneven, irregularly arranged fibrils. Inset, $10 \mu\text{m}$ scan image. (B) Printed hydrogel surface, overlaid with a fluorescence microscopy image of a printed fibronectin stripe. Surface collagen fibrils that were visible appeared to be partially aligned

Live/dead staining performed showed no cytotoxic effects caused by the patterning. The numbers of dead cells (stained red) were negligible: 0 in most of the samples, 1–2 cells in a few others (Fig. 15A–D). An analysis of the proliferation of HCECs on the different surfaces over time showed obvious differences between the patterned and non-patterned samples (Fig.

15E). The only two types where the growth rate could not be told apart ($p > 0.05$) were the unmodified and deactivated RHCIII-MPC surfaces. The total number of cells counted per defined ROI was highest on the hydrogels patterned with 200 μm stripes. However, when taking into account that the total FN-coated surface area per ROI on the 30 μm pattern was half that on the 200 μm pattern, the results show that the thinner stripes yielded approx. 26% more cells after normalization of the surface areas.

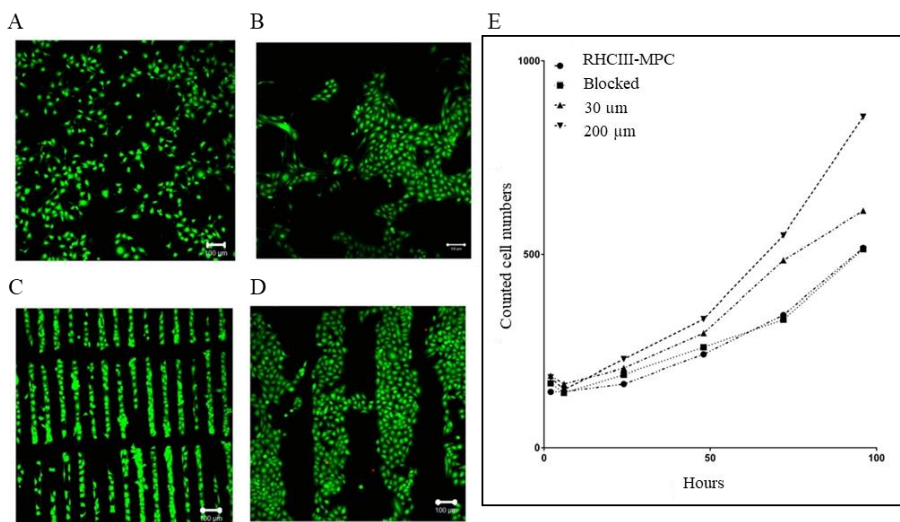


Fig. 15. A characterization of cell growth on RHCIII-MPC hydrogel surfaces that were (A) unmodified, (B) deactivated or patterned with (C) 30 μm and (D) 200 μm lines. Live/dead staining shows live cells as green, while dead cells fluoresce in red. Scale bars are 100 μm . A calculated proliferation rate of cells on the different surfaces is shown in (E)

An immunohistochemical analysis and the behavior of cells on the different surfaces shows that the integrin $\beta 1$ family, which is involved in binding ECM macromolecules, including collagen and FN, was expressed by HCECs growing on all groups. The proportions of integrin $\beta 1$ -expressing cells in the deactivated surfaces and the 30 and 200 μm patterns were significantly different from those growing on the unmodified RHCIII-MPC hydrogel surfaces (Fig. 16A). With the highest expression on the 30 μm stripes, although this was not significantly different from the 200 μm stripes or the deactivated surfaces. The immunohistochemical localization of FAK-positive cells showed that significantly more cells were growing on the 30 μm striped patterns that were positively stained ($p \leq 0.05$) than those of the other groups (Fig. 16B). Staining for the Ki67 protein associated with cell proliferation showed that the samples with 30 μm striped patterns supported

a significantly larger proportion ($p \leq 0.05$) of positively stained cells than the other groups (Fig. 16C).

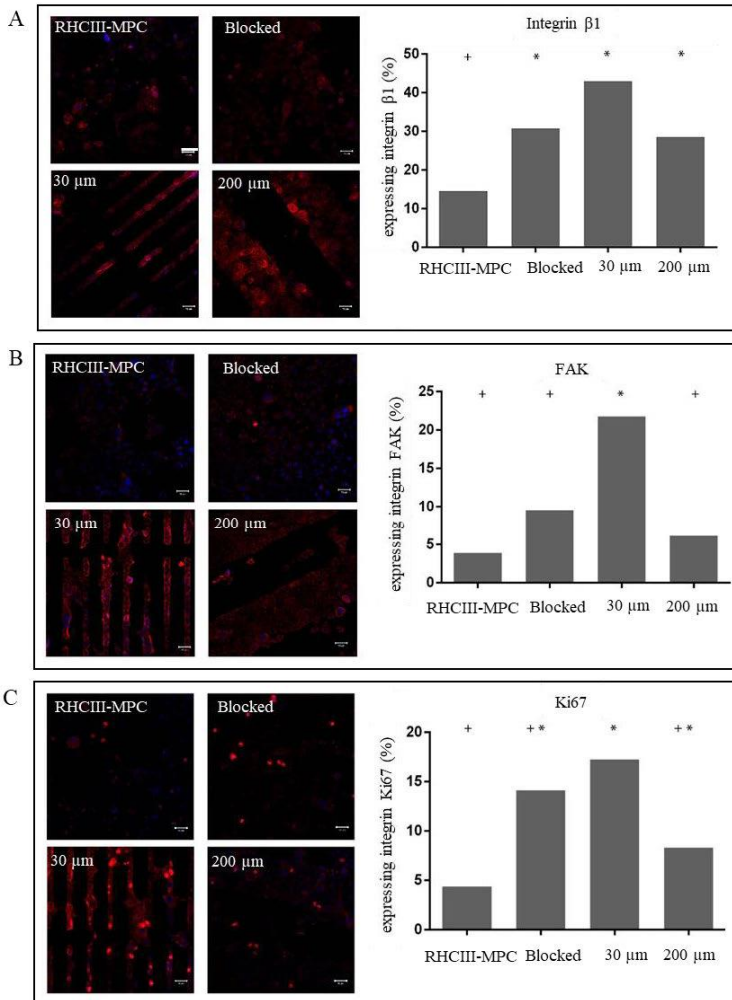


Fig. 16. Immunostaining for (A) integrin $\beta 1$, (B) FAK and (C) Ki67. The micrographs show cells on the hydrogel surfaces, from the top left – deactivated, top right – unmodified, bottom left – patterned 30 μm stripes and bottom right – patterned 200 μm stripes. The scale bars are set at 50 μm . The bar graphs show the ratios between the total cell count and the cells stained for (D) integrin $\beta 1$, (E) FAK and (F) Ki67. Bars with similar symbols (* or +) are not significantly different from each other ($p > 0.05$ by Tukey test). In contrast, bars with dissimilar symbols are significantly different ($p \leq 0.05$) from each other

Chapter 5. Biosynthetic Hydrogels as 3D Scaffolds

In this part of the study, we processed biosynthetic hydrogels and analyzed the composition and properties of three-dimensional scaffolds at micro- and nanoscales. The chemical composition of fully hydrated PC-MPC and PC hydrogels was characterized and compared using a Raman spectroscopy. Also, the surfaces elastic modulus were measured by AFM. Finally, the feasibility of the micromoulding technique for the fabrication of 3D micro/nanotopographies in porcine collagen type I-MPC (PC-MPC) was tested. For the first time, biosynthetic hydrogel structures, with precision down to the scale of nanometers, were produced. Furthermore, human skin fibroblast growth on the fabricated PC-MPC micro- and nanostructures was investigated. Also, the hydrogel blocks with produced surface groove topographies were used as microchannel scaffolds for making controlled 3D environments for the cells.

The Characterization of PC-MPC hydrogel. Fig. 17A displays a typical Raman spectra of PC and PC-MPC hydrogels after baseline correction. As expected, the amide I band 1666 cm^{-1} in both hydrogels spectra is the most intensive one, which is caused by C=O stretching vibrational mode from the repeating peptide triplet Gly-X-Y, where X usually proline and Y is hydroxyproline. Two vibrational modes at 1244 cm^{-1} and 1270 cm^{-1} are in the region of the amide III band and are related to the biphasic nature of the triple-spiral structure – for example, to the interactions between proline-containing and proline-free chain fragments [231]. Proline and hydroxyproline ring vibrational modes are monitored in the $820\text{--}985\text{ cm}^{-1}$ region. The vibrational mode of the hydroxyproline ring is observed at 878 cm^{-1} . The 856 and 919 cm^{-1} vibrational modes might be assigned to the proline ring [232]. A hydroxyproline vibrational mode at 1211 cm^{-1} is observed in the subtracted spectrum. It should be remembered that in the PC hydrogel, collagen concentration is $10 \pm 2\%$ higher as compared to the PC-MPC hydrogel. The collagen content can be directly related to the amount of hydroxyproline and proline, which directly affects the increase in Raman signals. This can be explained by the fact that in PC-MPC hydrogel hydroxyproline interactions with other hydrogel functional groups, such as PEG or phosphorylcholine, the groups are stronger. Therefore, the PC-MPC hydrogel can be characterized as a relatively denser structure with less defects, which makes the vibration position shifted to the side of higher wavenumbers (from 1202 cm^{-1} to 1211 cm^{-1}). The observed 938 cm^{-1} band can be attributed to the proline and/or hydroxyproline vibrational mode of the C-C functional group in the Gly-X-Y chain [232]. This vibrational mode is sensitive to the relative humidity in the hydrogel and can be used to determine the amount of water inserted in the material. The 938 cm^{-1} signal

is not observed in the subtracted spectrum (Fig. 17B). It can be argued that the amount of water trapped inside the two hydrogels is very similar.

Vibrational modes at 1001 and 1031 cm^{-1} are attributed to the vibrations phenylalanine ring. The signal at 815 cm^{-1} is the C-O-C stretching vibrational mode, which is potentially linked to the interactions of collagen triple helical structure [230].

From a comparison of the Raman spectra of PC and PC-MPC hydrogels, the signals of collagen structure elements in both hydrogels are clearly visible. Subsequently, several new signals emerged in the subtracted spectrum (Fig. 17B). In the PC hydrogel, a 556 cm^{-1} signal is dominating, which can be assigned to the (COO^-) group. In the PC-MPC hydrogel, several other modes have appeared. One of them was the deformation of the O-C-O bond at 690 cm^{-1} . The signal at 1090 cm^{-1} can be linked to the stretching vibrational mode of the O-P-O fragment in the chain. The vibrational mode at 1137 cm^{-1} can be attributed to the C-C stretching vibration in the chain. The 1643 cm^{-1} can be assigned to the vibrational mode of the amide I (C = O fragment) when the structure of protein is unordered and corresponds to intermolecular hydrogen bonding of this functional group inside hydrogel.

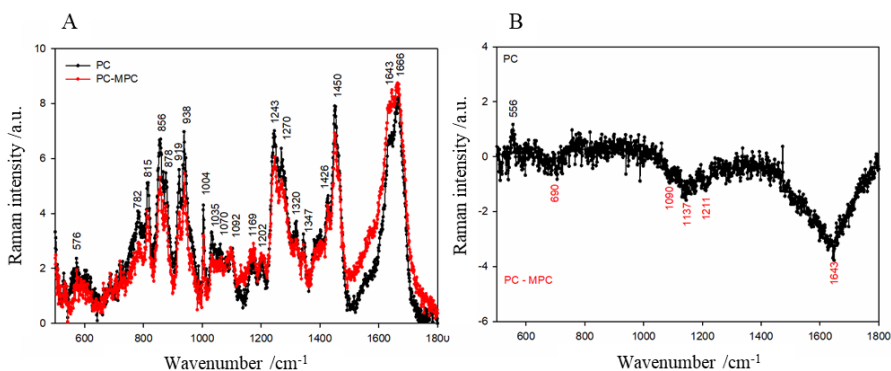


Fig. 17. Combined (A) and subtracted (B) Raman scattering spectra of PC and PC-MPC hydrogels

The elastomechanical properties of fully hydrated PC-MPC and PC hydrogels were investigated by AFM. The surfaces of the hydrogels were mechanically pressed by an AFM probe. The PC-MPC hydrogel elasticity was 0.195 ± 0.027 MPa compared to PC hydrogel, which had an elasticity of 0.367 ± 0.063 MPa (Table 1). However, these data differed from the macroscopically measured mechanical properties of PC-MPC and PC hydrogels, where the elasticity was respectively 0.87 and 2.09 MPa [229]. Comparing these data, a tendency is observed that PC-MPC hydrogels had an approx. two times lower elastic modulus as compared to the PC hydrogel.

Table 1. PC and PC-MPC hydrogels elastic modulus measured with AFM and its comparison with modulus from a reference [229]

	Elastic modulus AFM (MPa)	Elastic modulus (MPa) [229]
PC	0.367± 0.063	2.09
PC-MPC	0.195± 0.027	0.87

Fabrication of hydrogel surface topographies. PDMS molds with 30, 60, 200 μm (29 ± 0.5 , 59 ± 1 , $196\pm 2\mu\text{m}$) wide and 20 ± 1 μm deep grooves were prepared using the protocol described previously [241]. PC-MPC hydrogel was casted into a PDMS mold just before chemically crosslinking it using NHS/EDC. Hydrogel topographies were in 29 ± 1 , 59 ± 1 , $195\pm 2\mu\text{m}$ width and 20 ± 1 μm in depth, they remained self-supported and almost ideally replicated the mold shape. The stability of the hydrogels with the groove topographies stability was tested in cell grow medium in an incubator for 24 hours, Human fibroblast (HF) cells growing for 24 hours followed by the enzymatic (trypsinization) procedure. The effect of those procedures had minimum effect on the dimensions of the grooves. Variations in the groove width was less than 2 % as compared to the lateral dimensions of the original mold (Fig. 18).

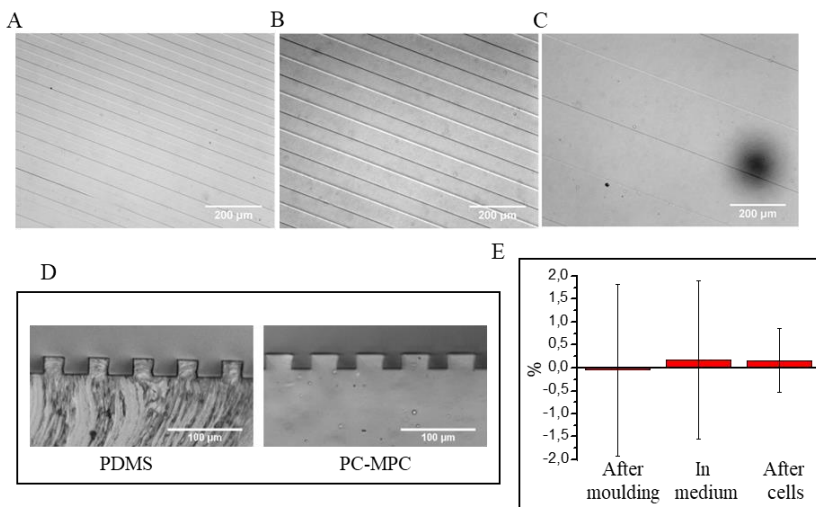


Fig. 18. PC-MPC hydrogels with surface topographies. Microscopic images of PC-MPC hydrogel grooves having 30 μm (A), 60 μm (B) and 200 μm (C) in width and 25 μm in depth. Cross-sections images of 30 μm -wide hydrogel grooves and a PDMS mold (D). PC-MPC hydrogels width values directly after molding, after 24 h in cell growth medium (37°C) and after 24 h dermal fibroblast culturing and trypsinization (E), % relative width changes compared to the mold

To investigate the possibilities of scaling down hydrogel topographies to sub-cellular dimensions, spike and grid-like nanopatterns were tested. PC-MPC hydrogels were successfully casted onto nanostructured molds and hydrogel replicas were made. The surface nanopatterns of hydrogel obtained by the molding and replica molding techniques, respectively, were verified using AFM. The smallest reproduced features had their dimensions close to 500 nm. This was a satisfactory result for materials, which contain approx. 90% of water. Note that collagen type I itself has distinct nanoscopic structures consisting of three left-handed helices, which arrange into an extended helix with roughly 1-2 nm in diameter and 300 nm in length. The collagen helices further form fibrils with a periodicity of 67 nm, ranging from 10 to 500 nm in width and up to several microns long [74]. By controlling the structure of collagen hydrogel from micrometers, sub-micrometers to nanometers scale one can create hydrogel scaffolds with desirable effects on cells.

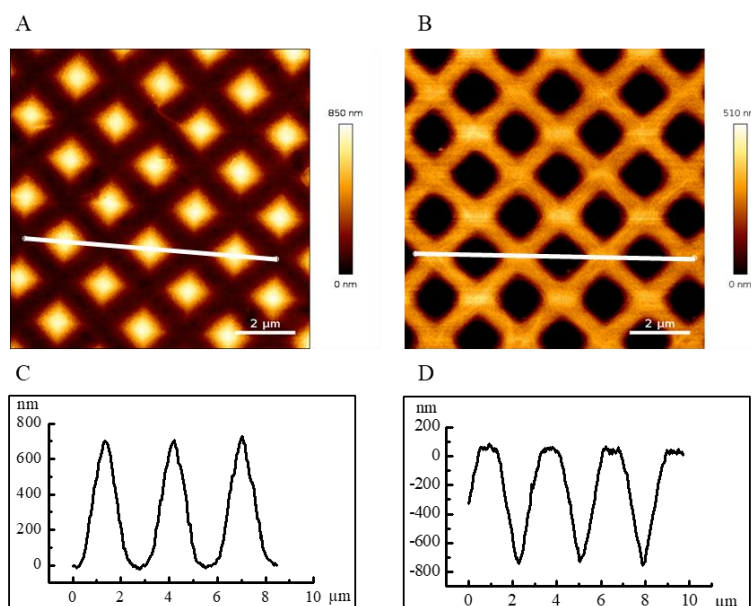


Fig. 19. Examples of fabricated collagen hydrogel nanopatterns. PC-MPC hydrogel nanospike (B) and nanohole (C) topographies with their height cross-sections (C, D) visualized using AFM topography scanning

Cell interaction with microscopic surface topographies. The effect of topography on human dermal fibroblasts expressing GFP (HDF-GFP) was examined by characterizing the cells grown on the hydrogels with grooves: 20 μm in depth, having different widths, 30 μm , 60 μm , and 200 μm (Fig. 20A). Flat PC-MPC hydrogel and TCP were used as controls. HF-GFPs

were cultivated for 4 days. The cells were uniformly aligned along the grooves and arranged on the structured matrix (Fig. 20B–D) with a clear tendency to elongate and align along the edges of the grooves, whereas the cells cultured on the untreated hydrogel or on wide grooves appeared freely spread and randomly oriented (Fig. 20E, F). The cytoplasm of GFP/stained

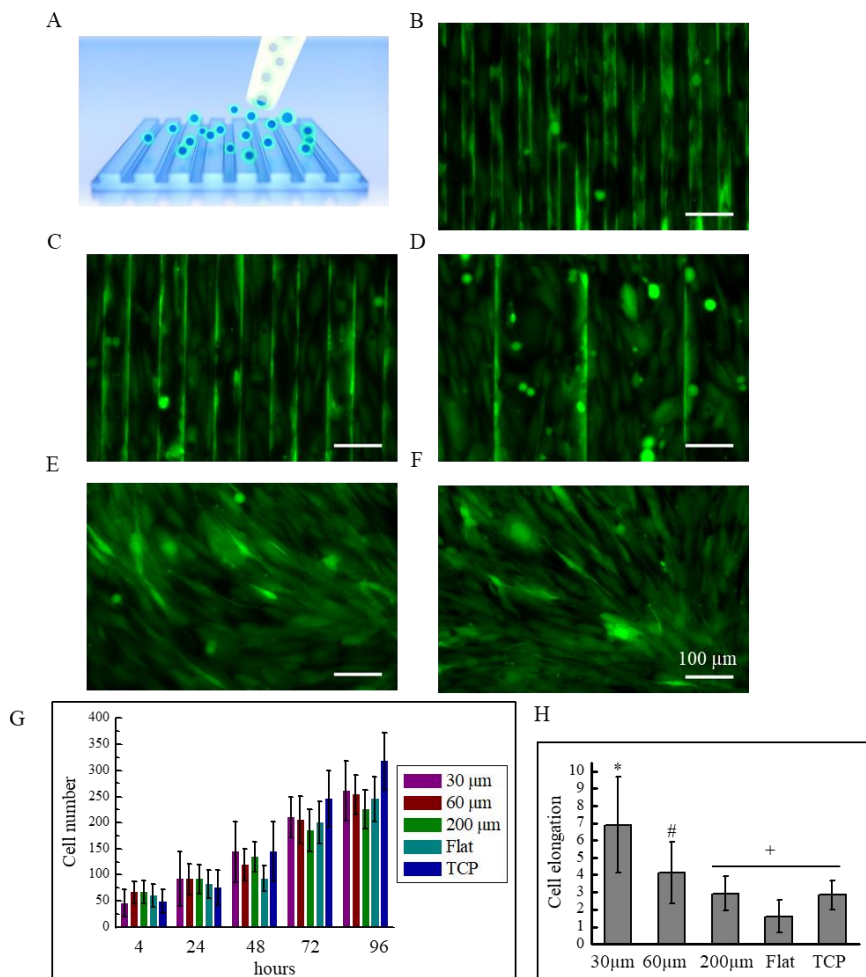


Fig. 20. Cell interaction with PC-MPC hydrogels having microscopic groove topographies. A schematic of cell seeding onto PC-MPC hydrogel grooves (A). Human skin fibroblast-GFP cells on PC-MPC hydrogels with groove topographies having 30 μm (B), 60 μm (C), 200 μm (D) in width, flat PC-MPC hydrogel (E) and TCP (tissue culture plate) (F) surfaces 96 hours after cell seeding. Cell proliferation (G) and cell elongation (H) data are represented in charts. Bars with dissimilar symbols are significantly different ($p < 0.01$, ANOVA) and bars with similar symbols (+) are not significantly different from each other ($p > 0.01$, ANOVA)

cells exhibited a more elongated shape along the groove edges, while the cells within the unpatterned environment showed an arbitrary pattern with no apparent alignment.

An understanding of the molecular exchanges at the cell-substrate interface is a key to tissue engineering. Conventional quantitative methods are mostly based on the long/short axis of cells to derive the total area of cell spreading. Among them, the aspect ratio (AR), RN/shape factor, and circularity are most commonly used. The axial ratio and AR are frequently used to describe the elongation of the cell [239]. Therefore, the AR to evaluate cell elongation were measured. A higher AR ratio means a more elongated cell morphology. A morphometrical analysis showed that cell elongation was higher on the grooves having the 30 and 60 μm width (Fig. 20H). There was no statistical difference between cell elongation on the 200 μm -wide groove topography and the flat PC-MPC hydrogel and TCP surfaces, respectively.

Cells ingrowth into a microchannel scaffold. Hydrogels having 30, 60, 200 μm -wide and 20 μm -deep grooves were used as a microchannel scaffold for cell migration and viability evaluation in 3D environment. The cells were seeded in a hydrogel-made device, having a seeding “pocket” (Fig. 21A) on the TCP, and were left to migrate into the PC-MPC microchannels (Fig. 21B). The channels mimic a geometrically well-defined 3D structure where the cells can interact with the PC-MPC material, each other or simply migrate freely. The migration efficiency was evaluated by counting cell nuclei, stained with DAPI in the 3 mm-long channels (Fig. 21C). In the recorded microscopy images, the channels were arbitrarily divided into 200 μm /long sections, and the cells were counted. In 30, 60 and 200 μm -wide channels, the cell number was evenly decreasing through the entire channel length, from 6 to 1, from 12 to 4 and 41 to 6 cells in the respective sections (Fig. 21D). Life/Dead staining showed that the cell viability inside the microchannel scaffold was as high as that of the cells on the TCP surface. A morphometrical analysis showed that cell elongation was higher in the 30 and 60 μm -wide microchannels, whereas in the 200 μm wide microchannels, the cells showed no sign of increasing elongation, which was comparable to the TCP-cultivated cell elongation results.

Cell interaction with hydrogels having surface nanotopographies. We examined the effects of PC-MPC hydrogel surfaces having nanostructures – nanoholes, nanopikes (Fig. 22) – with the cells. Flat PC-MPC and TCP were again used as control surfaces. The cells conformed to the shape of the nanostructures on the hydrogel surface. For example, they spread out into shapes that replicated those of their growing environment, e.g., squared cells within square hydrogel wells (Fig. 22 B). A morphometrical analysis showed that the AR ratio of cells, which were growing on flat and nanostructured

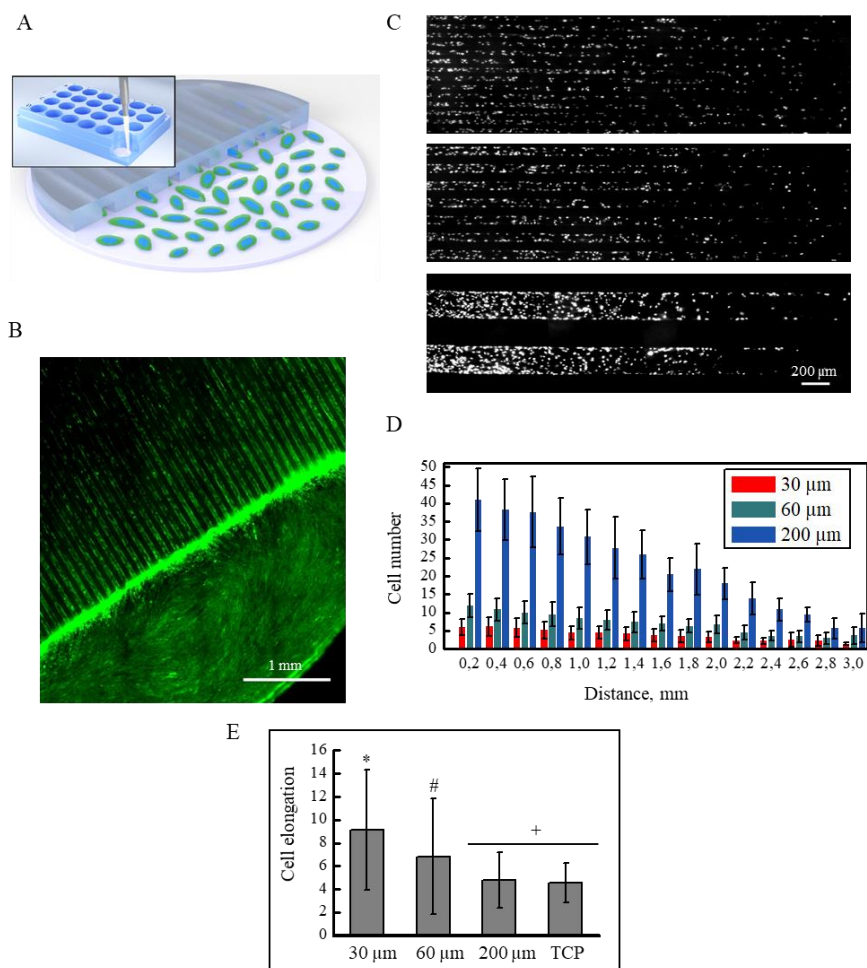


Fig. 21. The interaction of cells with PC-MPC hydrogel channels. A schematic of the cell seeding into PC-MPC hydrogel microchannels (A). A fluorescence overview image of human skin fibroblast-GFP migration in a PC-MPC hydrogel micro-channel scaffold taken at 96 hours after cell seeding (B). Cell distribution in 30, 60, 200 μm -wide and 3 mm-long channels; the nuclei were stained with DAPI (C). The statistical distribution in channel sections has the same dimensions as in C (D). Cell elongation data are represented on a chart (E). Bars with dissimilar symbols are significantly different ($p < 0.01$, ANOVA), and bars with similar symbols (+) are not significantly different from each other ($p > 0.01$, ANOVA)

PC-MPC hydrogel, have decreased as compared to TCP. Moreover, the cells became more multipolar on PC-MPC hydrogel with nanospikes as compared with the other PC-MPC surfaces. For the morphometrical analysis,

50 cells on each surface were examined; almost 95% of the cells on the nanostructured surface show a specific shape

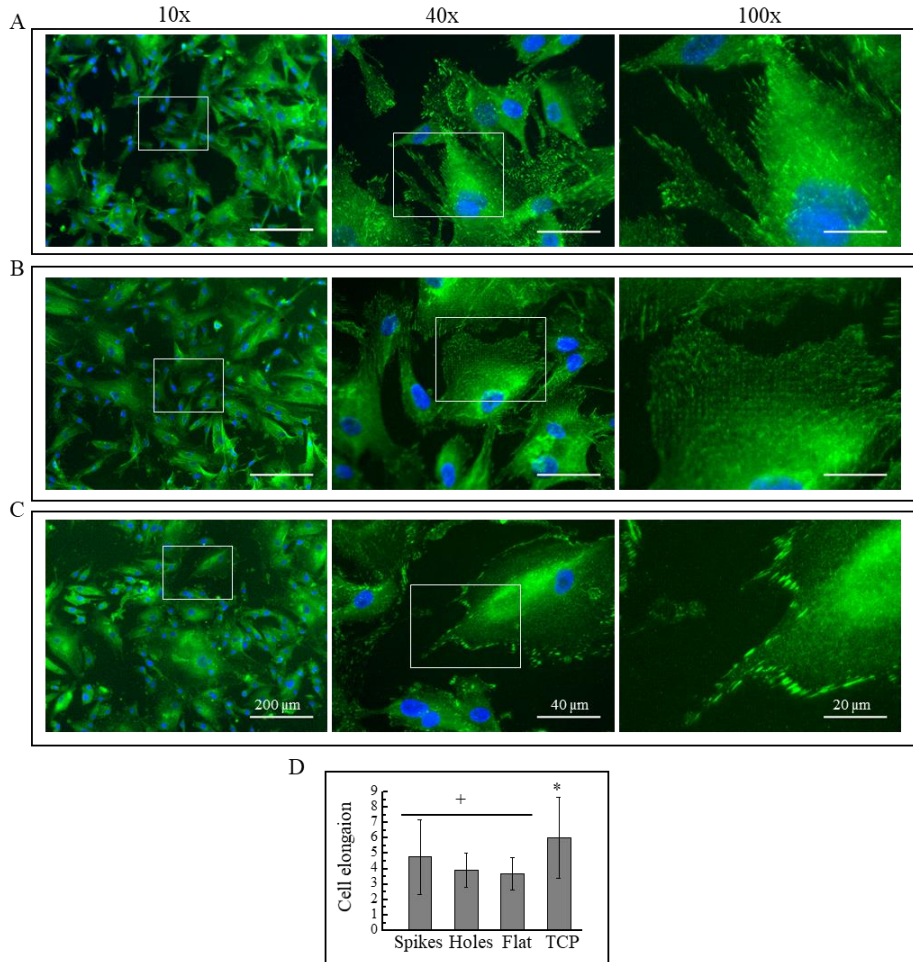


Fig. 22. Cell interaction with PC-MPC hydrogel nanopopographies. Fluorescence images of human dermal fibroblasts taken at 4 hours after seeding onto PC-MPC hydrogel nanospikes (A), nanoholes (B) and flat surfaces. Cellular vinculins (green) and nuclei (blue) were stained. Cell elongation data represented on a chart (D). Bars with dissimilar symbols are significantly different ($p < 0.01$, ANOVA) and bars with similar symbols (+) are not significantly different from each other ($p > 0.01$, ANOVA)

Conclusions

1. An *in situ* HPMAA polymerization onto borosilicate glass is efficient when the latter is modified with aldehyde groups, most likely due to a more efficient interfacial interaction with MAA.
2. The synthesized 34 ± 9 nm-thick HPMAA hydrogel films on borosilicate glass display swelling ratios change from 1.5 ± 0.3 to 3.0 ± 0 upon changing the aqueous solution pH from 4.0 to 8.0.
3. Fibronectin micropatterns on the HPMAA coatings consist of a uniform layer of proteins that has a brush-like surface morphology. The dimensions of the micropatterns in the 26-192 μm range match the stamp with 3% deviation; they remain structurally stable in the complex biochemical environment, even during prolonged cell culturing.
4. Despite the fibrous surface morphology and the 85.5 ± 0.2 % water content, fully hydrated RHCIII-MPC (RHCIII-18/MPC(2/1)-EDC0.4) hydrogels (designed as eye corneal replacements) can be functionalized using contact lithography. The generated non-topographic fibronectin micropatterns display a 4% deviation in their lateral dimensions in the 27-192 μm range.
5. PC-MPC hydrogels display a controlled chemical composition and elastomechanical properties as confirmed by Raman and AFM analysis in a hydrated state, respectively. This material behaves as a biosynthetic elastomer, technologically suitable for replicating microscopic and smaller topographies and devices by molding-polymerization.

CURRICULUM VITAE

Full name: **Vytautas Cėpla**
Date and place of birth: **1985 05 13**, Marijampolė, Lithuania
Education: **2004** “Rygiškių Jono” Gymnasium of Marijampolė
2008 Bachelor’s Degree in Chemistry at Vilnius University
2010 Master’s Degree in Chemistry at Vilnius University
2010–2014 PhD studies at the Center for Physical Sciences and Technology, Institute of Physics, Lithuania

PADĒKA

Norīu padēkoti darbo vadovui dr. Ramūnui Valiokui uē galimybē atlikti tīriamuosius darbus, pagalbā juos atliekant ir raēant disertacijā. Taip pat norīu pareikēti padēkā prof. May Griffith (Monrealio universitetas), supāēindīnīusīai su regeneracīnēs medicīnos sritīmī, Dr. Mirazul Islam uē dalījīmāēi patīrtīmī dirbant su akīes implantais ir lāētelēmīs.

Nuoēirdēēiai dēkoju visam Nanoinēēinerījos skyriui ir UAB „Ferentis“ kolektyvui uē pagalbā atliekant tyrimus, bendradarbiavīmā, patarīmus ir palaikymā. Atskīrai norīu padēkoti Tomui Rakickui ir dr. Artūruī Ulēēīnui uē metodīnīus patarīmus ir pasīdalytā patīrtī.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS

Autoriaus publikacijos disertacijos tema:

1. Mirazul Islam, M.; Cèpla, V.; He, C.; Edin, J.; Rakickas, T.; Kobuch, K.; Ruželė, Ž.; Jackson, W. B.; Rafat, M.; Lohmann, C. P.; et al. Functional Fabrication of Recombinant Human Collagen-Phosphorylcholine Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *Acta Biomater.* **2015**, *12*, 70–80.

Patentai:

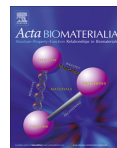
2. J. Phophase, M. Griffith, M. M. Islam, R. Valiokas, R. Ravichandran, V. Cèpla, Ž. Ruželė, T. Rakickas, Regenerative prostheses as alternatives to donor corneas for transplantation, patent application, patent granted EP3057624B1, sausio **2018**.
3. M. Griffith, J. Phophase, R. Ravichandran, Ž. Ruželė, V. Cèpla, R. Valiokas, M. M. Islam, T. Rakickas, Surface modifications of collagen hydrogels, patent application, Publication number WO2015/055661; **2015** m. balandžio 23 d.

Paper 1

Mirazul Islam, M.; Cěpla, V.; He, C.; Edin, J.; Rakickas, T.; Kobuch, K.; Ruželè, Ź.; Jackson, W. B.; Rafat, M.; Lohmann, C. P.; et al.

Functional Fabrication of Recombinant Human Collagen-Phosphorylcholine Hydrogels for Regenerative Medicine Applications.

Acta Biomater. 2015, 12, 70–80.



Functional fabrication of recombinant human collagen–phosphorylcholine hydrogels for regenerative medicine applications

M. Mirazul Islam^{a,d,1}, Vytautas Čepla^{b,1}, Chaoliang He^{c,1,2}, Joel Edin^d, Tomas Rakickas^b, Karin Kobuch^e, Živilė Ruželė^b, W. Bruce Jackson^c, Mehrdad Rafat^{c,d,f}, Chris P. Lohmann^e, Ramūnas Valiokas^{b,*,1}, May Griffith^{a,c,d,*,1}

^aSwedish Medical Nanoscience Center, Dept. of Neurosciences, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm, Sweden

^bDept. of Nanoengineering, Center for Physical Sciences and Technology, Savanorių 231, LT-02300 Vilnius, Lithuania

^cOttawa Hospital Research Institute – Vision, 501 Smyth Road, Ottawa, Ontario K1H 8L6, Canada

^dIntegrative Regenerative Medicine Centre, Dept. of Clinical and Experimental Medicine, Cell Biology Bldg. – Level 10, Linköping University, S-58185 Linköping, Sweden

^eClinic of Ophthalmology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Germany

^fDept. of Biomedical Engineering, Linköping University, S-58185 Linköping, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2014

Received in revised form 8 October 2014

Accepted 24 October 2014

Available online 31 October 2014

Keywords:

Hydrogel

Cornea

Collagen

Laser profiling

Surface modification

ABSTRACT

The implant–host interface is a critical element in guiding tissue or organ regeneration. We previously developed hydrogels comprising interpenetrating networks of recombinant human collagen type III and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (RHCIII–MPC) as substitutes for the corneal extracellular matrix that promote endogenous regeneration of corneal tissue. To render them functional for clinical application, we have now optimized their composition and thereby enhanced their mechanical properties. We have demonstrated that such optimized RHCIII–MPC hydrogels are suitable for precision femtosecond laser cutting to produce complementing implants and host surgical beds for subsequent tissue welding. This avoids the tissue damage and inflammation associated with manual surgical techniques, thereby leading to more efficient healing. Although we previously demonstrated in clinical testing that RHCIII-based implants stimulated cornea regeneration in patients, the rate of epithelial cell coverage of the implants needs improvement, e.g. modification of the implant surface. We now show that our 500 μm thick RHCIII–MPC constructs comprising over 85% water are suitable for microcontact printing with fibronectin. The resulting fibronectin micropatterns promote cell adhesion, unlike the bare RHCIII–MPC hydrogel. Interestingly, a pattern of 30 μm wide fibronectin stripes enhanced cell attachment and showed the highest mitotic rates, an effect that potentially can be utilized for faster integration of the implant. We have therefore shown that laboratory-produced mimics of naturally occurring collagen and phospholipids can be fabricated into robust hydrogels that can be laser profiled and patterned to enhance their potential function as artificial substitutes of donor human corneas.

© 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Biointeractive scaffolds designed to mimic the extracellular matrix (ECM) of the body are becoming the scaffolds of choice in

regenerative medicine. The interface between implant and host is now recognized as a critical element in guiding the repair and regeneration of target tissues or organs. Biologically inert materials developed as implants for the cornea and other tissue systems can be rendered biointeractive by a range of microfabrication techniques. Micromoulding, microfluidics, lithographic patterning and similar processes have already employed for introduction of grooves, channels or other topographical/cell adhesion-promoting features [1–5], or for grafting of interactive peptides [6], growth factors and other bioactives to promote cell attachment and growth [2,7–9]. Biomaterials comprising naturally derived and mimics of ECM components and hybrids of natural and synthetic polymers have also been developed as implants that serve as regeneration scaffold and templates by providing instructive cues

* Corresponding author at: Integrative Regenerative Medicine Centre, Dept. of Clinical and Experimental Medicine, Cell Biology Bldg. – Level 10, Linköping University, S-58185 Linköping, Sweden. Tel.: +46 13 28 1756.

** Co-corresponding author. Tel.: +370 5 2641818.

E-mail addresses: valiokas@ftmc.lt (R. Valiokas), May.Griffith@liu.se (M. Griffith).

¹ These authors contributed equally.

² Present address: Key Laboratory of Polymer Eco-materials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 5625 Renmin Street, Changchun 130022, China.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.035>

1742–7061/© 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

to endogenous cells to affect regeneration. A range of biomimetic materials fabricated as hydrogels, membranes, meshes and other structures have now been developed as tissue models and as scaffolds or templates for regenerative medicine. An extensive review of the latest biomimetic and bioinspired materials and their application in engineering different tissues and organs has been collected by Jabbari et al. in the Handbook of Biomimetics and Bioinspiration series [10].

In the cornea, the bulk of the corneal ECM comprises type I collagen. However, our team had shown that recombinantly produced human type I and type III collagen behaved similarly as implants in mini-pigs over 12 months [11]. More importantly, we showed in a clinical study that carbodiimide crosslinked recombinant human collagen type III (RHCIII) hydrogels as corneal implants promoted epithelial and stromal cell and nerve regeneration [12]. Despite the successful regeneration, compression of the soft biomaterials by the sutures used in the surgery, as well as a sub-optimal fit into the wound bed, delayed epithelial coverage of the implant by endogenous in-growing epithelial cells, leading to localized implant thinning and fibrosis in some patients [12]. Hence, robust implants that could be grafted with more precision and without suturing, and that could encourage more rapid cell coverage to circumvent infection, would be a vast improvement for future clinical application. Indeed, others have shown that post-fabrication modification is often needed to ensure a seamless host-graft interface and/or modulate cell behaviour to obtain the desired clinical behaviour [13,14].

We have previously fabricated RHCIII implants that were reinforced by the introduction of a second network of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) to form interpenetrating networks of RHCIII-MPC [15] and showed in a rabbit alkali burn cornea model of severe pathology that these hydrogels stimulated regeneration while repelling unwanted invasion of blood vessels into the implants [16]. In this study, we increased the mechanical strength of these hydrogels to render them suitable for post-fabrication modification to circumvent the problems of the previous generations of RHCIII and RHCIII-MPC implants. We evaluated the use of ultrahigh-speed femtosecond lasers developed for ophthalmic surgery to profile RHCIII-MPC hydrogels for surgical grafting. These lasers have been shown to produce cuts to within a 10 μm deviation from the target [17]. Creating matched cuts in the implant and surgical bed would allow precise lock-and-key fitting of the implant into host cornea, thereby enabling suture-free and hence compression-free retention. For surface modification to enhance cell attachment and rapid implant coverage, a range of established methods exist. These range from the creation of aligned collagen fibrils by molecular crowding [18] to various lithographic methods. However, most of these were developed for chips and other solid supports [19], but not for soft hydrogels that comprise over 85% water. Here, we tested the feasibility of microcontact printing (μCP) [20] as a means to introduce surface patterning onto fully hydrated, 500 μm thick hydrogels. Taking advantage of the improved mechanical stability of the RHCIII-MPC hydrogel, we printed and analysed micropatterns that used human fibronectin (FN) as “ink”. FN is a cell-interactive protein in the ECM that promotes adhesion and migration of corneal epithelial cells during wound healing [21,22] and has been successfully tested therapeutically for the repair of persistent epithelial defects in human corneas [23]. We quantitatively evaluated the effect of the printed FN micropatterns on the growth of human corneal epithelial cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All inorganic salts and basic chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO and Steinheim,

Germany), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) or Merck KGaA (Darmstadt, Germany) unless otherwise stated. Research grade RHCIII, produced in yeast (*Pishia pastoris*), was purchased from 3H Biomedical (Uppsala, Sweden) and FibroGen Inc. (San Francisco, CA). N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES), poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA, $M_n = 575$), ammonium persulphate (APS) and N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) were obtained from Sigma–Aldrich (MO, USA). MPC was obtained from Biocompatibles (UK) and Paramount Fine Chemicals Co. Ltd (Dalian, China).

2.2. Recombinant human collagen–phosphorylcholine hydrogels

RHCIII-MPC hydrogels were produced as previously published [15], but with a range of different starting concentrations of RHCIII to select the optimal formulation for laser profiling and μCP . Briefly, 450–500 mg of RHCIII solution of one of a range of starting concentrations (13.7, 18 or 20% (w/w)) was buffered with 150 μl of 0.625 M MES buffer within a syringe mixing system in an ice-water bath. Next, 200 μl of MPC solution in 0.625 M MES was added to the mixing system. The MPC:RHCIII (w/w) ratios used with either 1:4, 1:2 or 1:1. PEGDA was then added from a microsyringe (PEGDA:MPC (w/w) = 1:3). Calculated volumes of 4% (w/v) APS solution in MES and 2% (v/v) TEMED solution in MES were added sequentially (APS/MPC (w/w) = 0.015:1, APS:TEMED (w/w) 1:0.77). After thoroughly mixing, calculated amounts of NHS (10% (w/v) in MES) and EDC (5% (w/v) in MES) solutions were added and the reactants were thoroughly mixed at 0 °C (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.3–1.5:1, EDC:NHS (mol:mol) = 1:1). The final mixed solution was immediately cast into cornea-shaped moulds (12 mm diameter, 500 μm thick) or between two glass plates with 500 μm spacers. The hydrogels were cured overnight at 100% humidity under nitrogen at room temperature. The cornea-shaped implants were cured for an additional 5 h at 37 °C. After demoulding, they were washed thoroughly with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) and then stored in PBS containing 1% chloroform to maintain sterility.

2.3. Characterization of hydrogels

All samples were tested in triplicate. The water content of RHCIII-MPC hydrogels was determined by weighing samples that were blotted dry to remove surface liquid to obtain the wet weight (W_0). These pre-weighed hydrogels were then dried at room temperature under vacuum to constant weight, which is the dry weight (W). The equilibrated water content of hydrogels ($W_t\%$) was obtained according to the following equation: $W_t\% = (W_0 - W)/W_0 \times 100\%$.

Optical properties of the resulting hydrogels were characterized by obtaining the refractive indices (RIs) of 500 μm flat, fully hydrated hydrogels equilibrated in PBS using an Abbe refractometer (Model C10, VEE GEE Scientific Inc., Kirkland, Washington) at 21 °C with bromonaphthalene as the calibration agent. Light transmission and backscattering measurements were carried out at 21 °C on a custom-built instrument equipped with a quartz halogen lamp for white light measurements, as previously reported [24]. The percentage light transmission through the hydrogels was compared to the open beam intensity. The amount of backscattered light (%) from each sample was measured by the circular array of eight built-in photodiodes, angled at 30° off axis.

The mechanical properties (tensile strength, moduli and elongation at break) were determined using an Instron mechanical universal tester (Model 3342, Instron, Canton, MA) equipped with a 10 N load cell and Instron Series IX/S software. Flat hydrogels (12 mm \times 5 mm rectangular strips, 0.44 mm thick) were measured.

The gauge length of each specimen tested was 5 mm. The crosshead speed was 10 mm min^{-1} and the sampling rate was 10 points s^{-1} . Implants were not pre-stressed. Measurements were taken at room temperature.

The morphology of the RHCIII–MPC hydrogels compared to human corneas and RHCIII hydrogels alone was examined using scanning electron microscopy (SEM). All samples were lyophilized to minimize the shrinkage of the human cornea and collagen scaffolds due to the vacuum applied during freeze-drying and SEM imaging. Briefly, PBS-equilibrated samples of each construct or human eye bank corneas were frozen overnight at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ and then placed in the drying chamber of a lyophilizer at a condenser temperature of $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ and vacuum pressure of 0.8, and dried for 7 h. The scaffolds did not collapse through the process, while there was some degree of shrinkage for all test samples, e.g. 40% for human cornea and 50% for the biosynthetic collagen hydrogels, due to the applied vacuum. The samples were then cut, using a sharp surgical knife, at a vertical angle to minimize the changes in the scaffolds' structure due to the cut, then attached to metal holders using conductive double-sided tape and sputter coated with a gold layer for 60 s at 0.1 bar vacuum pressure (Cressington Sputter Coater 108) prior to SEM examination. SEM micrographs were taken at 25 kV at various magnifications on a scanning electron microscope (Model S-2250N, Hitachi, Japan). Comparisons were made against human eye bank corneas prepared in the same way.

2.4. Precision laser cutting of the hydrogels and tissue welding

Laser trephination (or cutting) of three cornea-shaped RHCIII–MPC hydrogels (12 mm in diameter and $500 \mu\text{m}$ thick) was carried out using a femtosecond laser (IntraLase™ FS Laser, Abott Medical Optics, Abbott Park, Illinois, USA). The laser was set to cut out a top-hat-shaped implant from the hydrogel (one of the more common configurations for laser-assisted tissue trephination). The cutting parameters used were 6.0 mm diameter on the anterior side cut, 8.0 mm diameter on the posterior side cut and a depth of $250 \mu\text{m}$ for the lamellar cut. The energy used for the ring lamellar cut, anterior side cut and posterior side cut were 2.80, 1.50 and $1.50 \mu\text{J}$, respectively.

For implant/tissue welding, matched complementary cuts were also made on excised porcine corneas (obtained from an abattoir) and RHCIII–MPC implants using a femtosecond laser (Wave Light GmbH Erlangen, Germany). RHCIII–MPC implants inserted into the matched donor cornea bed were welded together using standard riboflavin/dextran crosslinking techniques (1% riboflavin, 365 nm , 3 mW cm^{-2} , 30 min) [25] using a MLase UV crosslinking device (MLase AG, Germering, Germany).

2.5. Microcontact printing on hydrogels

RHCIII–MPC hydrogels containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII– NH_2 (mol:mol) = 0.4:1, were used for all μCP . Flat-cast hydrogels were cut into approximately $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 500 \mu\text{m}$ pieces and washed with 0.1 M PBS, pH 5.7, and dried under a nitrogen gas (N_2) stream prior to use. Free native carboxyl groups from the hydrogel surface were activated by immersing the samples in 2 ml of the PBS (pH 5.7) solution containing 10 mM EDC and 2.5 mM NHS for 15 min. All samples were rinsed for 30 s in fresh PBS buffer and dried with N_2 gas just before printing.

Square $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ poly(dimethylsiloxane) (PDMS; Dow Corning, Midland, MI, USA) stamps were prepared using a previously published protocol [26]. To examine the attachment and proliferation of single human corneal epithelial cells, a stamp comprising $30 \mu\text{m}$ wide protruding stripes separated by $60 \mu\text{m}$

spaces was designed. To examine the attachment and spread of multiple cells, $200 \mu\text{m}$ wide stripes, separated by $200 \mu\text{m}$ spaces, were tested. Prior to printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed in ethanol, dried under a stream of nitrogen gas and treated with oxygen plasma (20 W power) for 30 s in a plasma dry cleaner (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany). The stamps were then preloaded with "ink" comprising a $30 \mu\text{l}$ solution of 0.5 mg ml^{-1} human FN (Yo Proteins AB, Huddinge, Sweden) with $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ bovine serum albumin conjugated with fluorescent Texas Red (BSA-TR[®]; Invitrogen, Eugene, OR, USA) in 0.1 M PBS buffer, pH 8.0, for visualization of the patterns. For cell seeding experiments, BSA-TR was omitted to avoid any unwanted non-specific interactions between it and the cells. After 10 min of incubation with "ink" at room temperature, the stamps were rinsed in water for 20 s and dried for 1 min under a N_2 stream.

The activated RHCIII–MPC samples were placed in a Petri dish and then the upper surfaces were dried carefully with the N_2 gas in preparation for μCP . The bottom corners of the hydrogel samples were left in contact with water to prevent complete dehydration and therefore undesired deformation of the hydrogels. Surfaces were then printed by applying the PDMS stamp onto the hydrogel surface. All printing was performed manually without any load, using the nitrogen stream to bring the stamp into contact with the hydrogel surface. The stamp was left on for 5 min, then removed using tweezers. The patterned hydrogel surface was incubated with a solution containing 10 mM (PEG)₃NH₂ (Molecular Biosciences, Boulder, CO, USA) in PBS, pH 8.0, for 40 min to deactivate all remaining unreacted carboxyl groups. The surfaces were then carefully washed several times with fresh PBS, pH 7.3, and stored in this buffer solution prior to further use.

2.6. Characterization of printed hydrogels

To characterize the reproducibility of the μCP patterns, the optically transparent patterned hydrogels were imaged using an Olympus BX51 upright microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a $10\times$, NA 0.3 water immersion objective and a Peltier-cooled Fvieu II CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Fluorescence images of fibronectin–BSA-TR[®] patterns were acquired and analysed using analySIS software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

The presence of FN in the micropatterns was confirmed by using a primary rabbit polyclonal antibody against FN (Abcam, Cambridge, UK), followed by a secondary antibody, donkey anti-rabbit IgG, conjugated with quantum dots Qdot655 (H+L) (Life Technologies, USA).

To investigate the effect of μCP on the micro- and nanotopography of fully hydrated RHCIII–MPC constructs, atomic force microscopy (AFM) measurements were carried out with the samples fully immersed in 0.1 M PBS buffer, pH 7.3, using a NanoWizard[®] 3 AFM microscope (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) mounted onto an Olympus IX81 inverted optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan) to allow for combined optical and AFM imaging of the same surface. Sample topography images were obtained in contact mode using SNL-10 probes (Bruker, Billerica, MA, USA). Regions of interest for AFM analysis were selected with fluorescence microscopy to include the printed and unprinted zones of the surface within one large area ($70 \times 70 \mu\text{m}^2$) scan. Several different size scans were made. Images obtained were processed and the surface roughness was calculated using the region analysis tool within the AFM JPK data processing software.

2.7. Cytotoxicity evaluation

All samples with 30 and $200 \mu\text{m}$ patterned stripes, and control samples comprising deactivated and unmodified hydrogels, were

placed into 24-well plates. Immortalized human corneal epithelial cells (HCECs) [27] were seeded onto the surface of the materials at a density of 2×10^4 cells per well. The HCECs were maintained in keratinocyte serum-free medium (KFSM; Life Technologies, Invitrogen, Paisley, UK) containing $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ bovine pituitary extract and 5 ng ml^{-1} epidermal growth factor for 48 h in a humidified 37°C incubator. Cell viability was measured by using a Live/Dead staining kit (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, UK), where cells were double-stained by calceinacetoxymethyl (Calcein AM) and ethidium homodimer-1 (EthD-1). The live cells displayed green fluorescence, while the dead cells fluoresced red.

2.8. Cell attachment and proliferation

Green fluorescence protein (GFP) transfected HCECs were employed to facilitate cell counts. A stable GFP-HCEC cell line was established by the transfection of HCEC cells with a vector containing a puromycin-resistant gene together with GFP, using the Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Life Technologies, California, USA). Selection of puromycin-resistant cells with $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of puromycin added to the medium was performed to obtain stable GFP-expressing lines.

To examine proliferation rates on the different surfaces, 6 mm hydrogel discs with 30 and 200 μm FN striped patterns, and PEG-NH₂ deactivated and unmodified samples, were fitted snugly into 96-well plates. Five thousand GFP-HCECs were seeded into each well. GFP-HCECs were also seeded onto the tissue culture plate as a control for overall cell health. The cells were maintained in KFSM within a humidified 37°C incubator with 5% CO₂. Photomicrographs of the cells were taken at 2, 6, 24, 48 and 96 h, using a fluorescence microscope (AxioVert A1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Counts were made by sampling three different $1290 \times 965 \mu\text{m}^2$ areas on each hydrogel surface.

2.9. Immunohistochemistry

GFP-HCECs were cultured on hydrogels for 4 days, by which time the cells had reached confluence/near confluence on the patterns. Each sample was washed in 10 mM PBS, pH 7.4, then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. For permeabilization and blocking of unspecific binding, samples were incubated in PBS containing 0.25% Triton X-100 for 10 min and 5% foetal calf serum (FCS) in PBST (0.05% Tween-20 in PBS) (FCS/PBST) for 1 h, respectively. Samples were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in FCS/PBST: anti-proliferating cell protein Ki67 antibody (1:600; Sigma-Aldrich, MO, USA), anti-focal adhesion kinase (FAK) antibody (1:500;

Abcam, Cambridge, UK) and anti-integrin beta 1 (integrin $\beta 1$) antibody (1:200; Abcam). After rinsing, the samples were exposed to the secondary antibody, Alexa Fluor-594 (1:400; Invitrogen, Oregon, USA) at room temperature for 1 h in the dark for visualization. After another rinse, the samples were incubated with 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (PromoKine, Heidelberg, Germany) for 1 min as a nuclear counterstain. All samples were given a final rinse prior to mounting and examination under a confocal microscope (LSM700, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). A total area of $50,000 \mu\text{m}^2$ per sample was used for all the counts.

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using general linear models that relate responses to linear combinations of predictor variables. These *p* value tests were followed by a Tukey test in cases where significance was found. The analyses were performed using Minitab[®] software (Minitab Ltd., Coventry, UK). Ratios of cell populations are shown in Fig. 5 as percentages and are therefore not portrayed with standard deviations. The ratio data have skewed distributions that are close to zero and one. Hence, these data were log transformed before analysis to better comply with the assumptions of general linear models. Intervals for feature sizes are ± 1 standard deviation.

3. Results

3.1. RHCIII-MPC hydrogels

A range of adjustments in hydrogel formulations were tested for producing a mechanically reinforced material suitable for post-fabrication of the implants. These included starting RHCIII contents of 13.7, 18 and 20%, and different RHC:MPC and EDC:RHCIII-NH₂ ratios. The resulting optical and mechanical properties of the hydrogels are given in Appendix A. The resulting enhancement in properties of RHCIII-MPC hydrogels after optimization of the above parameters as compared to our previously published formulation [15] is shown in Table 1. In both the 13.7 and 18% RHCIII-MPC hydrogels, we found that a 2:1 RHCIII:MPC ratio with 0.4:1 EDC:RHCIII-NH₂ gave the optimal formulations.

Increasing the collagen content from 13.7 to 18% decreased the water content from 90.1 ± 2.4 to approx. 86% ($85.5 \pm 0.2\%$ for RHCIII-MPC and $86.0 \pm 0.2\%$ for RHCIII only). Thus, the MPC content did not make much of a difference. Additionally, the EDC:RHCIII-NH₂ ratio showed no obvious influence on the RI, while the RI increased with increasing MPC content within the gels.

Table 1

Comparison of key properties of 18% RHCIII-MPC (RHCIII:MPC (w/w) = 2:1; EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1) hydrogels with a previous 13.7% RHCIII-MPC (RHCIII:MPC (w/w) = 2:1; EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.3:1) hydrogel formulation grafted onto alkali burn rabbit cornea and 18% RHCIII-only (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1) hydrogels, with human cornea properties from the literature serving as a benchmark.

Properties	13.7% RHCIII-MPC ^a	18% RHCIII-MPC	RHCIII only	Human cornea
Water content (%)	90.1 \pm 2.4	85.5 \pm 0.2	86.0 \pm 0.2	78 [40]
<i>Optical properties:</i>				
Refractive index	1.35	1.36	1.35	1.37–1.38 [28]
Transmission (%)	98.3 \pm 1.5	91.6 \pm 0.46	87.4 \pm 0.9	87 [41]
Backscatter (%)	1.8 \pm 0.0	1.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.4	3 [42]
<i>Mechanical properties:</i>				
Tensile strength (MPa)	1.29 \pm 0.31	2.12 \pm 0.18	2.37 \pm 0.4	3.81 \pm 0.4 [43]
Elongation at break (%)	37.89 \pm 10.31	33.34 \pm 3.87	28.21 \pm 2.01	
Elastic modulus (MPa)	5.26 \pm 1.5	9.46 \pm 3.58	15.33 \pm 2.67	3–13 [44,45]
<i>Thermodynamic properties:</i>				
Td ($^\circ\text{C}$)	54.1	57.6	53.1	65.1 [11]

^a Data from [15].

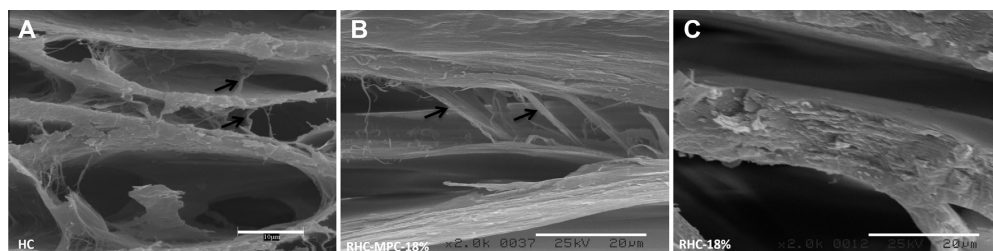


Fig. 1. SEM micrographs of cross-sections of (A) human cornea, showing the lamellar structure of the collagenous ECM with inter-lamellar connections (arrows) (scale bar, 10 μm); (B) 18% RHCIII-MPC(2/1) hydrogel crosslinked with EDC (RHCIII:MPC (w:w) = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1), showing lamellae and inter-lamellar connections; and (C) 18% RHCIII-only hydrogel crosslinked with EDC (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1), depicting the lamellar structure without the inter-lamellar connections (scale bars, 20 μm).

The measured transmittance of white light decreased with the increased RHCIII concentration. Compared to the native cornea (transmittance: $\sim 87\%$; backscatter: $\sim 3\%$), however, all the RHCIII-MPC gels showed a higher transmittance and lower backscatter. The RHCIII-only gels, on the other hand, exhibited a transmittance comparable to the native cornea (approx. 87%). All the cornea substitutes displayed a slightly lower RI of 1.35, which is that of water, compared to native cornea (1.37–1.38 [28]).

The effect of the material composition on mechanical properties is summarized in Fig. A2 (Appendix A). In general, increasing the solids content of the hydrogels from 13.7 to 18% increased the tensile strength of RHCIII-MPC hydrogels from 1.29 ± 0.31 to 2.12 ± 0.18 MPa (Table 1). The tensile strengths of the 18% RHCIII-only hydrogels were comparable to the 18% RHCIII-MPC hydrogels, at 2.37 ± 0.4 MPa. However, the RHCIII-only hydrogels were stiffer (an elastic modulus of 15.33 ± 2.67 MPa) and less elastic (elongation at break of $28.21 \pm 2.01\%$) than the corresponding RHCIII-MPC hydrogels (lower elastic modulus of 9.46 ± 3.58 MPa; higher elongation at break of $33.34 \pm 3.87\%$).

The 18% RHCIII-MPC hydrogels were more thermodynamically stable ($T_d = 57.6^\circ\text{C}$) than both the 18% RHCIII-only ($T_d = 53.1^\circ\text{C}$) or 13.7% RHCIII-MPC hydrogels ($T_d = 54.1^\circ\text{C}$). However, none were as stable as the native corneas ($T_d = 65.1^\circ\text{C}$) (Table 1).

SEM imaging of cross-section of samples was performed for structural comparison of the produced RHCIII-MPC and RHCIII-only hydrogels with native human corneas. A distinct lamellar structure could be seen for both human and biosynthetic corneas (Fig. 1A–C). The lamellar structure was observed throughout the entire cross-section of all samples, while it was more homogeneous for the human cornea and better representative of the whole structure than that of the biosynthetic ones. In addition, the RHCIII-MPC hydrogels comprised lamellae-like layers interconnected by some tiny fiber-like structures (Fig. 1B), which better mimics the structure of the human cornea (Fig. 1A) than the RHCIII crosslinked by EDC/NHS, which had large lamellae without any inter-lamellar connections (Fig. 1C). However, the inner morphology of the biosynthetic corneas differed from that of their native counterpart in the number of lamellar layers and the spacing between layers. For example, the lamella-like layers in the biosynthetic corneas were thicker and fewer compared to the lamellae of the native cornea. In addition, the spacing between the ordered lattice structures of the native cornea was smaller (~ 15 μm) than that of the biosynthetic corneas (~ 150 μm). The lamellar spacing for the human cornea had a wide size distribution ranging from 2 to 40 μm . Overall, despite some similarities between the biosynthetic corneas and their natural counterparts, the human cornea has a much more complex microstructure with a higher degree of interconnectivity, as expected.

3.2. Precision laser profiling and tissue welding

The optimized hydrogels were sufficiently robust to allow complete cutting of “top-hat” implants using the femtosecond laser. The resulting mean dimensions of the cuts were an anterior diameter of 5.9 mm, a posterior diameter of 8.1 mm and a depth of 260 μm for the lamellar cut (Fig. 2A). For example, RHCIII-MPC hydrogels containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1 (designated RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4), which had shown good mechanical properties, cut well with the laser. As shown in Fig. 2B, top-hat-shaped gels with precisely cut edges could be obtained. However, hydrogels with the lower 13.7% RHCIII content (but otherwise with the same proportions of MPC and EDC crosslinker) fell apart during cutting (data not shown).

Laser-cut implants were successfully fitted into matched laser-cut surgical beds (Fig. 2C). After riboflavin/UV crosslinking, the implants remained permanently adhered to the corneal bed (Fig. 2D), and submicroscopic physical fibre-like connections were present between the implant and adjacent cornea (Fig. 2E) when viewed by SEM. In contrast, implants detached completely in controls without UV irradiation.

3.3. Overall quality of the microcontact printed patterns

The most stable RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4 hydrogels that lent themselves well to laser profiling were also optimal for μCP (process diagrammed in Fig. 3A). Fig. 3B and C show the typical resulting striped FN patterns, as visualized by staining with an anti-fibronectin antibody. Analysis of the fluorescence micrographs of the hydrogel samples confirmed good replication of the original patterns of the 30 and 200 μm stripes defined in the photolithographic mask production step (not shown). On the PDMS stamp, the width of the narrow stripes was 26.8 ± 0.5 μm (based on bright-field microscopy), while that of the printed FN stripes was 27.1 ± 0.8 μm . The thick stripes on the PDMS stamps and the resulting FN patterns had widths of 190.6 ± 1.7 and 191.7 ± 2.6 μm , respectively. The good reproducibility indicated that uncontrolled FN ink diffusion on partially dried collagen hydrogel samples was minimal. On the samples printed with the 30 μm stripe pattern, the printed area occupied approx. 37% of the sample area, and approx. 32% of the total hydrogel surface was patterned and defect-free. On the 200 μm striped samples, the printed sample area occupied 40% of the sample, and approx. 26% of the total hydrogel surface was printed and free from printing defects. Also, FN ink distribution on the entire patterned surface was satisfactorily homogeneous.

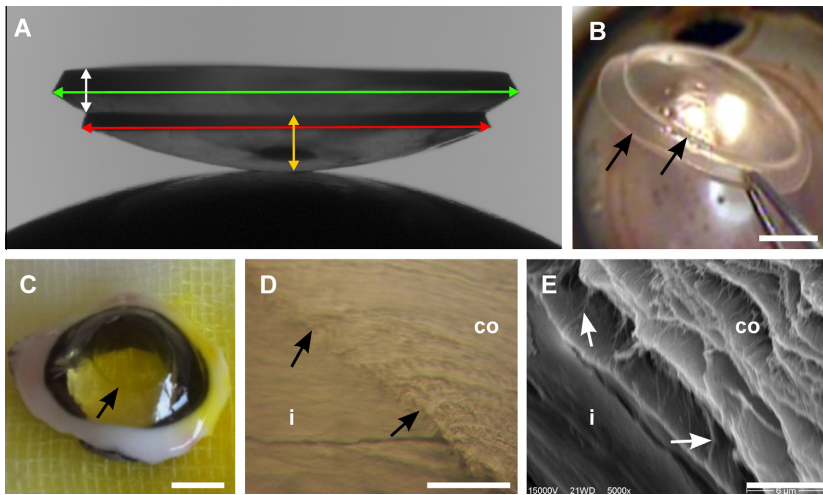


Fig. 2. (A) RHCIII-MPC implant after cutting with a femtosecond laser, showing the dimensions of the cuts. Red arrow: anterior diameter of 5.9 mm; green arrow: posterior diameter of 8.1 mm; yellow arrow: anterior lamellar cut of 260 μm ; white arrow: remaining posterior depth of 240 μm . (B) Laser-cut implant forming a top-hat-shaped hydrogel. The precisely cut edges are indicated by arrows. Scale bar, 2 mm. (C) Cut implant after tissue welding to a matched laser-cut surgical bed in an excised pig cornea by UV crosslinking. The apposed edges are arrowed. Scale bar, 4 mm. (D) Cornea (co) and implant (i) as viewed under polarized light, showing the very tight apposition between the implant and host tissue after tissue welding (arrows). Scale bar, 50 μm . (E) SEM image of the “welded” implant–cornea interface, showing the presence of small fibrous crosslinks (arrows) established between the two. Scale bar, 6 μm .

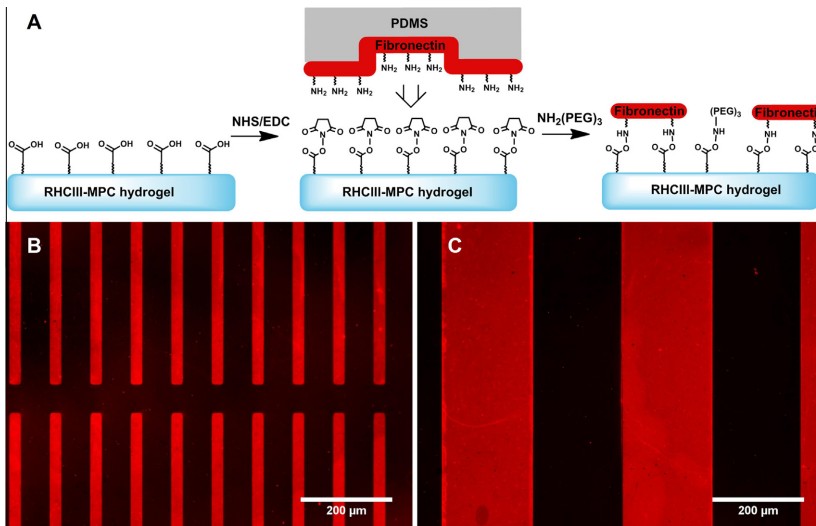


Fig. 3. (A) Schematic of the microcontact printing procedure, including free collagen hydrogel carboxyl group activation, “ink” printing and passivation steps. Fluorescence microscopical images of the resulting patterned (B) 30 μm and (C) 200 μm stripes on the surface of RHCIII-MPC hydrogels, visualized by staining with an anti-fibronectin antibody.

3.4. Atomic force microscopy

The effect of μCP on the micro- and nanotopography of fully hydrated RHCIII-MPC hydrogels was determined by AFM analysis. The original, unmodified collagen hydrogel surfaces appeared

uneven, with irregularly arranged surface fibrils visible (Fig. 4A). The root mean square (RMS) of surface roughness as measured within a representative $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ scan area was 3.5 nm. The regions of interest (ROIs) for AFM scans on the chemically activated and microcontact printed samples were identified by simultaneous

fluorescence microscopy imaging. The AFM tip was positioned in the ROIs that were patterned with FN and BSA-TR[®] mixture. In topography images of the hydrogel surface after μ CP and/or deactivation, the collagen fibrils appeared to be partially aligned (Fig. 4B), in contrast to the unmodified surface (Fig. 4A). However, the fine details of the collagen fibrils could not be resolved. There was no distinct overall height difference between the majority of the printed and adjacent unprinted areas, due either to the high initial surface roughness and/or the ability to print a very thin, possibly monolayer, thickness of FN. The edges of the stripes, however, were slightly corrugated by the printing and served to delineate the stripe boundaries. The RMS surface roughnesses of the FN-printed and unprinted regions on this particular sample shown in Fig. 4B were very similar, at 1.3 and 1.4 nm, respectively. The AFM analysis therefore showed that the μ CP resulted only in a very small change in the surface topology.

3.5. Effect of patterning on cytotoxicity, cell adhesion and proliferation

Printing with PDMS stamps can result in a slight contamination of the sample surface with loose PDMS particles [26,29], but these can be removed by subsequent sample deactivation and washing steps. The Live/Dead staining performed showed that there were no cytotoxic effects from the patterning. The numbers of dead cells (stained red) were negligible: 0 in most of the samples, 1–2 cells in a few others (Fig. 5A–D).

Analysis of the proliferation of HCECs on the different surfaces over time showed obvious differences between the patterned and non-patterned samples (Fig. 5E). The only two types where the growth rate could not be told apart ($p > 0.05$) were the unmodified and deactivated RHCIII–MPC surfaces. The total number of cells counted per defined ROI was highest on the hydrogels patterned with 200 μ m stripes. However, when taking into account that the total FN-coated surface area per ROI on the 30 μ m pattern was half that on the 200 μ m pattern, the results show that the thinner stripes yielded approx. 26% more cells after normalization of the surface areas.

3.6. Immunohistochemistry and cell behaviour

Fig. 6 shows the behaviour of cells on the different surfaces. The integrin β 1 family, which is involved in binding ECM macromolecules, including collagen and FN, was expressed by HCECs growing

on all groups. The proportions of integrin β 1-expressing cells in the deactivated surfaces and the 30 and 200 μ m patterns were significantly different from those growing on the unmodified RHCIII–MPC hydrogel surfaces (Fig. 6A), with the highest expression on the 30 μ m stripes, although this was not significantly different from the 200 μ m stripes or the deactivated surfaces ($p > 0.05$).

Immunohistochemical localization of FAK-positive cells showed that significantly more cells were growing on the 30 μ m striped patterns that were positively stained ($p \leq 0.05$) than those of the other groups (Fig. 6B).

Staining for the Ki67 protein associated with cell proliferation showed that the samples with 30 μ m striped patterns supported a significantly larger proportion ($p \leq 0.05$) of positively stained cells than the other groups (Fig. 6C).

4. Discussion

Hydrated interpenetrating networks of RHCIII–MPC hybrid hydrogels were prepared by simultaneous crosslinking of RHCIII with EDC/NHS and radical polymerization of MPC monomer with APS/TEMED as the initiator system and the PEGDA as the macromolecular crosslinker. Biphasic responses were found in hydrogels with increases in RHCIII starting concentration and MPC content. In particular, the increased MPC content that ensued in RHCIII:MPC molar ratios of 1:1 resulted in weak, brittle hydrogels. This could be due to the high MPC concentration, which might have hindered the entanglement and crosslinking of the RHCIII microfibrils. The increased RHCIII concentration from 18 to 20%, which resulted in overall weaker gels, could be due to the increase in viscosity of the collagenous mixture making it difficult to properly crosslink the very viscous RHCIII. The higher solids content would therefore have made the hydrogel stiffer but not stronger. An increase in EDC concentration relative to RHCIII–NH₂ content beyond 0.4 did not enhance the strength of the hydrogels. The combination of 18% RHCIII with an RHCIII:MPC ratio of 2:1 and a molar equivalent of 0.4 EDC (RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4) resulted in strong, stable and optically clear hydrogels. Although they comprised over 85% water, these hydrogels were nevertheless sufficiently robust for subsequent post-fabrication modifications, i.e. laser cuts and μ CP.

SEM analysis shows that both RHCIII-only and RHCIII–MPC hydrogels had a lamellar arrangement of collagen fibrils. The addition of the second network resulted in additional fibrous structures that connected the lamellae in RHCIII–MPC hydrogels.

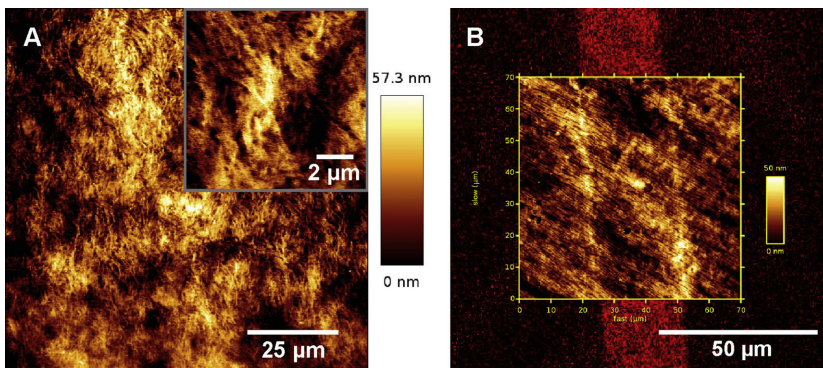


Fig. 4. Contact mode AFM topography images of the RHCIII–MPC hydrogel surface before and after the microcontact printing. (A) Unmodified hydrogel, showing a surface that comprised uneven, irregularly arranged fibrils. Inset, 10 μ m scan image. (B) Printed hydrogel surface, overlaid with a fluorescence microscopy image of a printed fibronectin stripe. Surface collagen fibrils that were visible appeared to be partially aligned.

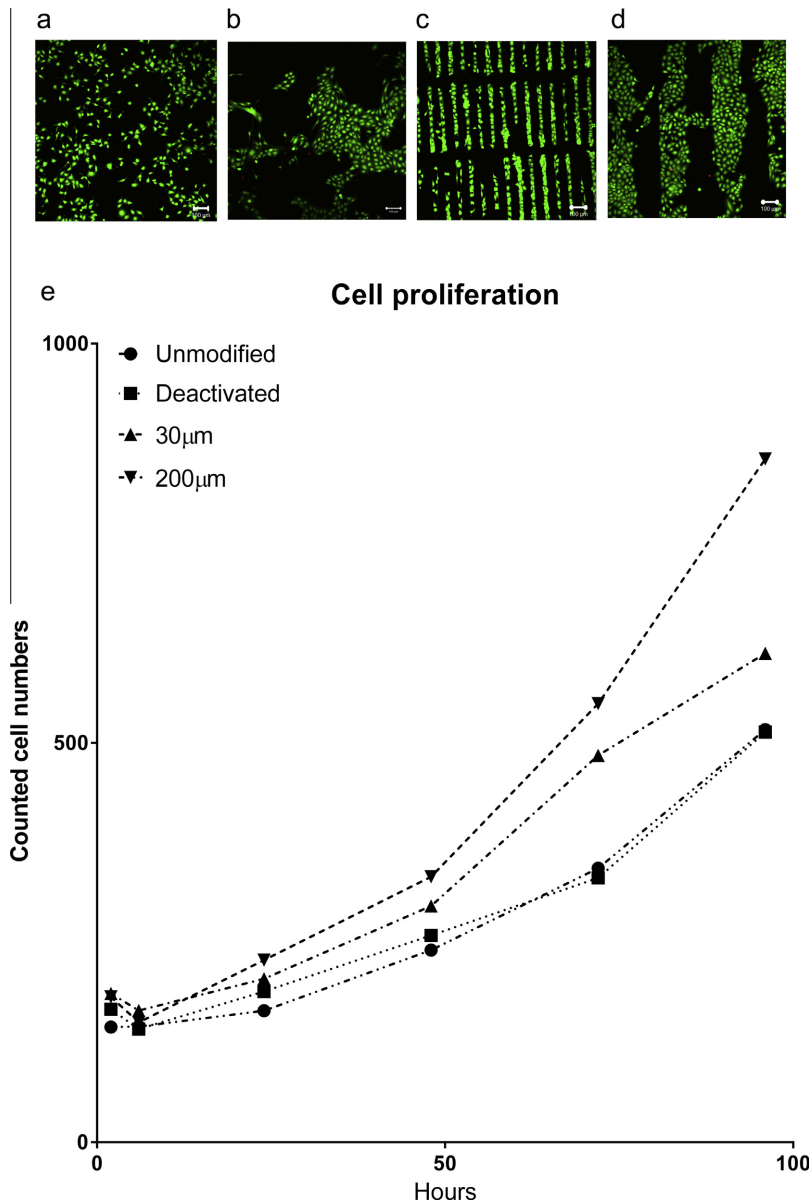


Fig. 5. Cell growth on RHCIII-MPC hydrogel surfaces that were (A) unmodified, (B) deactivated, or patterned with (C) 30 μm and (D) 200 μm lines. Live/Dead staining shows live cells as green, while dead cells fluoresce red. Scale bars, 50 μm. The proliferation rate of cells on the different surfaces is shown in (E).

These tiny inter-lamellar structures were only seen in the RHCIII-MPC hydrogels, and were likely the result of combined long-range and short-range crosslinkers that resulted in an interpenetrating network. The inter-lamellar connecting structure

was not observed in RHCIII-only scaffolds. Nevertheless, the interconnected multilayer structure was simpler and sparser than that of the native corneas, which had a larger number of lamellae and many more inter-lamellar connections. The driving force

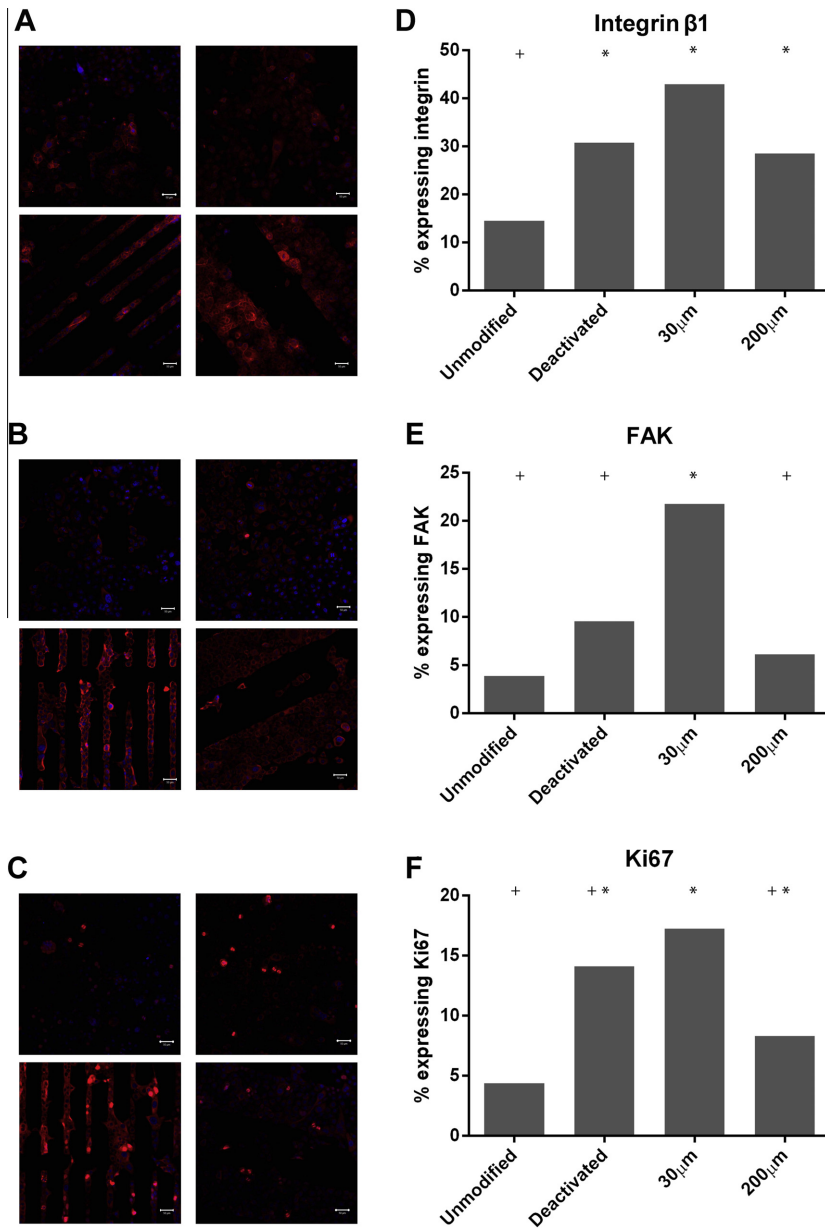


Fig. 6. Immunostaining for (A) integrin β 1, (B) FAK and (C) Ki67. The micrographs show cells on the hydrogel surfaces, from top left – deactivated, top right – unmodified, bottom left – patterned 30 μ m stripes and bottom right – patterned 200 μ m stripes. Scale bars, 50 μ m. The bar graphs show the ratios between the total cell count and the cells stained for (D) integrin β 1, (E) FAK and (F) Ki67. Bars with similar symbols (+ or *) are not significantly different from each other ($p > 0.05$ by Tukey test). In contrast, bars with dissimilar symbols are significantly different ($p \leq 0.05$) from each other.

behind the formation of the lamellar structures is unclear. The most plausible explanation has been put forward by Ruberti's group [18,30]. At the high collagen concentrations used to fabricate implants and under the confined environment of the moulds used, molecular crowding as described by Ruberti et al. is present. Prior to moulding, the collagen is mixed very thoroughly using a syringe mixing system [31], which generates a lot of shear force. During the moulding, the mixed collagen is then compressed within the mould with a final compression-cum-shearing action.

Femtosecond lasers are now being used in surgery, particularly ophthalmic refractive surgery, as alternatives to conventional mechanical cutting tools. They have ultrashort (10^{-15} s) pulses that can cut out three-dimensional shapes within the cornea by producing multiple adjacent minute spots of explosions in it. The RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4 hydrogels, like human corneal tissue, lent themselves to being precisely cut by the femtosecond laser, as shown by the resulting well-defined cuts. In contrast, the laser pulses broke up weaker hydrogels. This shows that RHCIII-MPC hydrogels were sufficiently robust to maintain their integrity during the laser cutting, which is important for grafting applications without sutures. We also showed that, in the excised porcine corneas, the implants could be precisely fitted and welded together with the host cornea. This opens up the possibility of future sutureless implantation, or the use of fewer sutures.

Microcontact printing has been used as a method to transfer proteins and other biological macromolecules onto solid substrates without the loss of their biological activity [32,33]. However, most of the literature on μ CP applications typically describes patterning on hard substrates such as glass, silicon, metals or robust and elastic polymers (e.g. polystyrene, polymethylmethacrylate, PDMS) [32–34]. In this study, we showed that μ CP could be used to introduce reproducible functional protein patterns onto the surfaces of thick, highly hydrated, largely collagenous matrices. The reproducibility of the patterns was good, with a standard deviation of 0.8 μ m for the 30 μ m pattern and 2.6 μ m for the 200 μ m pattern. It should be noted that the RHCIII-MPC hydrogels developed in this study for μ CP had a tensile strength of 2.15 ± 0.14 MPa and an elastic modulus of 10.53 ± 3.25 MPa. This is comparable to the 2.24 MPa tensile strength and elastic modulus of 0.360–0.870 MPa for PDMS [35], which is a common stamp material used for μ CP. However, unlike PDMS, which is hydrophobic, the RHCIII-MPC hydrogels comprised $85.5 \pm 0.2\%$ water.

Fibronectin is a large glycoprotein that is present in the basement membrane of the normal corneal epithelium. Its elaboration is increased during wound healing and the macromolecule appears at wound sites, where it serves as a temporary matrix for cell migration [36]. The fibronectin molecule and its bioactive peptide derivatives Arg–Gly–Asp (RGD) and Pro–His–Ser–Arg–Asn (PHSRN) have been reported to enhance healing of corneal epithelial wounds in rabbit models [21,22] and in clinical trials [23]. Fibronectin enhances wound healing through its interactions with β 1 integrins. Corneal epithelial cells express β 1 integrins and migrate over the newly laid down FN. After healing is complete, the expression of both integrin and FN is diminished [36].

Cell attachment to FN triggers integrin-mediated signalling. Previously, β 1 integrin–FAK signalling has been shown to initiate proliferation of metastatic lung cancer cells [37] and other cell types, for example, in this case, HCECs. In our hydrogels, there was a trend towards the aligned cells on 30 μ m FN stripes having the highest expression of β 1 integrin, FAK and Ki67, showing that the width of the patterned FN stripes was able to influence cell behaviour. Thus, although the total number of the cells counted per ROI was highest on the 200 μ m stripe pattern, proliferation as demonstrated by the expression Ki67, a cellular marker for proliferation, was highest in the 30 μ m stripes. We have therefore shown that, despite the ability of the unmodified RHCIII-MPC

hydrogels to support corneal epithelial cells, the attractiveness of the hydrogel as a substrate was enhanced by the transfer of FN onto the hydrogel surface. Micropatterning has been previously used to manipulate cell growth and differentiation, and nanoscale topography has been shown to affect corneal epithelial cell migration [38]. In the present study, however, there was little change in pitch, and the surface roughnesses of the printed and unprinted areas were similar. The manipulation of cell adhesion has been found to affect mitosis [39]. In our study, the 30 μ m stripes are approximately the diameter of a corneal epithelial cell, so each cell will only have two neighbours along the FN stripe. On the 200 μ m stripes, each cell is surrounded by neighbouring cells. It would appear that a combination of the differential adhesion afforded by the FN and the presence/absence of neighbouring cells affected the proliferation of corneal epithelial cells on our surfaces. Whether or not the micropatterning with an array of thin stripes that promoted the highest proliferation rates will do the same in vivo is yet to be determined by micropatterning on cornea-shaped hydrogels for animal studies.

5. Conclusion

We have shown that biomimetic hydrogels comprising interpenetrating networks of synthetically produced human collagen and phosphorylcholine can attain mechanical properties that are suitable for post-fabrication modification using laser cutting and μ CP. Use of the femtosecond laser produced highly precise cuts on the RHCIII-MPC gels that would be suitable for implantation. Microcontact printing of FN was able to further enhance cell adhesion and growth on the 500 μ m thick, already biocompatible hydrogels that comprised over 85% water.

Acknowledgements

We thank Dr. Chyan-Jang Lee for establishing the GFP-HCEC cell line used for this study, and Ms. Kimberley Merrett for assistance in characterization of the hydrogels. We also thank Dr. Sadhana Kulkarni and David Priest, University of Ottawa Eye Institute, for assistance with the laser cutting study; and Dr. Joanne M. Hackett (currently at Cambridge University Health Partners) for assistance with preliminary cell culture/biocompatibility studies during optimization of the RHCIII-MPC hydrogels. We thank Johannes Junger and Michael Baumann, MLase AG, for help with the UV crosslinking, and the Medical Devices Bureau, Health Canada, for use of the SEM system. We gratefully acknowledge funding from an NSERC-CIHR Canada Collaborative Health Research Project grant (M.G.) and subsequent funding for an EU Nanomedicine ERANet project "I-CARE" to M.G., R.V. and MLase AG, through the Swedish Research Council, Research Council of Lithuania and VDI Germany, respectively.

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Figs. 3, 4, 6 are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.035>.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.035>.

References

- [1] Fink J, Thery M, Azioune A, Dupont R, Chatelain F, Bornens M, et al. Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip* 2007;7:672–80.
- [2] Chung BG, Lee KH, Khademhosseini A, Lee SH. Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering. *Lab Chip* 2012;12:45–59.
- [3] Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem* 2008;8:270–80.
- [4] Jeon HJ, Simon CG, Kim GH. A mini-review: cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014;00B.
- [5] Singh RK, Seliktar D, Putnam AJ. Capillary morphogenesis in PEG–collagen hydrogels. *Biomaterials* 2013;34:9331–40.
- [6] Hynd MR, Frampton JP, Dowell-Mesfin N, Turner JN, Shain W. Directed cell growth on protein-functionalized hydrogel surfaces. *J Neurosci Methods* 2007;162:255–63.
- [7] Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. *Biomaterials* 2005;26:7286–96.
- [8] Lim JY, Donahue HJ. Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *Tissue Eng* 2007;13:1879–91.
- [9] Coq N, van Bommel T, Hikmet RA, Stapert HR, Dittmer WJ. Self-supporting hydrogel stamps for the microcontact printing of proteins. *Langmuir* 2007;23:5154–60.
- [10] Jabbari E, Kim DH, Lee LP, Ghaemmaghami A, Khademhosseini A, editors. *Biologically-Driven Engineering of Materials, Processes, Devices, and Systems. Handbook of Biomimetics and Bioinspiration*. Singapore: World Scientific Publishing; 2014.
- [11] Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR, Dravida S, Lagali N, Shinozaki N, et al. Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3887–94.
- [12] Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, Jackson WB, Munger R, Liu Y, et al. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase I clinical study. *Sci Transl Med* 2010;2:46ra61.
- [13] Dirk SM, Lin P, Buerger S, Cicotte KN, Reece GP, Hedberg-Dirk E. Biomimetic approaches to peripheral neuroprosthetic interfaces. In: Jabbari E, Kim DH, Lee LP, Ghaemmaghami A, Khademhosseini A, editors. *Handbook of Biomimetics and Bioinspiration*. Singapore: World Scientific Publishing; 2014. p. 121–51.
- [14] Kim K, Hong S, Lee H. Mussel-inspired adhesive biomaterials. In: Jabbari E, Kim DH, Lee LP, Ghaemmaghami A, Khademhosseini A, editors. *Handbook of Biomimetics and Bioinspiration*. Singapore: World Scientific Publishing; 2014. p. 273–91.
- [15] Liu W, Deng C, McLaughlin CR, Fagerholm P, Lagali NS, Heyne B, et al. Collagen–phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials* 2009;30:1551–9.
- [16] Hackett JM, Lagali N, Merrett K, Edelhauser H, Sun Y, Gan L, et al. Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: performance in a controlled rabbit alkali burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:651–7.
- [17] Holzer MP, Rabsilber TM, Auffarth GU. Femtosecond laser-assisted corneal flap cuts: morphology, accuracy, and histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2828–31.
- [18] Saeidi N, Karmelek KP, Paten JA, Zareian R, DiMasi E, Ruberti JW. Molecular crowding of collagen: a pathway to produce highly-organized collagenous structures. *Biomaterials* 2012;33:7366–74.
- [19] Lan S, Veisoh M, Zhang M. Surface modification of silicon and gold-patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity. *Biosens Bioelectron* 2005;20:1697–708.
- [20] Qin D, Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat Protoc* 2010;5:491–502.
- [21] Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 1981;45:120–9.
- [22] Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R. Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. *Arch Ophthalmol* 1984;102:455–6.
- [23] Yamada N, Morishige N, Yanai R, Morita Y, Kimura K, Chikama T, et al. Open clinical study of eye drops containing the fibronectin-derived peptide PHSRN for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 2012;31:1408–13.
- [24] Priest D, Munger R. A new instrument for monitoring the optical properties of corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:5352.
- [25] Meek KM, Hayes S. Corneal cross-linking – a review. *Ophthalmic Physiol Opt* 2013;33:78–93.
- [26] Zhou Y, Valiokas R, Liedberg B. Structural characterization of microcontact printed arrays of hexa(ethylene glycol)-terminated alkanethiols on gold. *Langmuir* 2004;20:6206–15.
- [27] Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:614–21.
- [28] Patel S, Marshall J, Fitzke 3rd FW. Refractive index of the human corneal epithelium and stroma. *J Refract Surg* 1995;11:100–5.
- [29] Graham DJ, Price DD, Ratner BD. Solution assembled and microcontact printed monolayers of dodecanethiol on gold: a multivariate exploration of chemistry and contamination. *Langmuir* 2002;18:1518–27.
- [30] Saeidi N, Sander EA, Zareian R, Ruberti JW. Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement. *Acta Biomater* 2011;7:2437–47.
- [31] Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, Fagerholm P, Lagali N, Watsky MA, et al. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1869–75.
- [32] Bernard A, Delamarque E, Schmid H, Michel B, Bosshard HR, Biebuyck H. Printing patterns of proteins. *Langmuir* 1998;14:2225–9.
- [33] Bernard A, Renault JP, Michel B, Bosshard HR, Delamarque E. Microcontact printing of proteins. *Adv Mater* 2000;12:1067–70.
- [34] Fukuda J, Sakai Y, Nakazawa K. Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing. *Biomaterials* 2006;27:1061–70.
- [35] PDMS (polydimethylsiloxane), 6.777J[2.751J]. *Material Property Database*, 2014. <<http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pdms.htm>>.
- [36] Murakami J, Nishida T, Otori T. Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 1992;120:86–93.
- [37] Shibue T, Weinberg RA. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:10290–5.
- [38] Diehl KA, Foley JD, Nealey PF, Murphy CJ. Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration. *J Biomed Mater Res A* 2005;75A:603–11.
- [39] Thery M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci* 2010;123:4201–13.
- [40] Maurice DM. In: Davson H, editor. *The Eye*. New York: Academic Press; 1962. p. 296.
- [41] van den Berg TJ, Tan KE. Light transmittance of the human cornea from 320 to 700 nm for different ages. *Vision Res* 1994;34:1453–6.
- [42] Beems EM, Van Best JA. Light transmission of the cornea in whole human eyes. *Exp Eye Res* 1990;50:393–5.
- [43] Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomechan* 2001;34:533–7.
- [44] Crabb RA, Chau EP, Evans MC, Barocas VH, Hubel A. Biomechanical and microstructural characteristics of a collagen film-based corneal stroma equivalent. *Tissue Eng* 2006;12:1565–75.
- [45] Jue B, Maurice DM. The mechanical properties of the rabbit and human cornea. *J Biomechan* 1986;19:847–53.

Paper 2

J. Phophase, M. Griffith, M. M. Islam, R. Valiokas,
R. Ravichandran, V. Cèpla, Ž. Ruželè, T. Rakickas,

**Regenerative prostheses as alternatives to donor corneas for
transplantation, patent application, patent granted EP3057624B1,
sausio 2018.**



- (51) International Patent Classification:
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01) *A61L 27/26* (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01) *C08J 3/24* (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01) *C08F 283/06* (2006.01)
- (21) International Application Number: PCT/EP2014/072025
- (22) International Filing Date: 14 October 2014 (14.10.2014)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
1351214-0 14 October 2013 (14.10.2013) SE
- (71) Applicant: UAB FERENTIS [LT/LT]; Savanoriu 231, 02300 Vilnius (LT).
- (72) Inventors: PHOPASE, Jaywant; Rydsvägen 118 B, S-584 31 Linköping (SE). GRIFFITH, May; Lamböhov, Fyrkanten, S-585 98 Linköping (SE). MIRAZUL ISLAM, Mohammad; Luftvämsgatan 34, Lgh nr 1101, S-587 34 Linköping (SE). VALIOKAS, Ramunas; Bukles 2, 21103 Trakai (LT). RAVICHANDRAN, Ranjithkumar; c/o Madhanagopal, Rydsvägen 90A, S-584 31 Linköping (SE). CEPLA, Vytautas; Literatu 4-2, 01125 Vilnius (LT). RUZELE, Zivile; Taikos 4-9, Kreivalauziai, 15166 Nemencine (LT). RAKICKAS, Tomas; Antakalnio 104-12, 10201 Vilnius (LT).
- (74) Agent: BRANN AB; Box 12246, S-102 26 Stockholm (SE).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:
 — of inventorship (Rule 4.17(iv))
 Published:
 — with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: REGENERATIVE PROSTHESES AS ALTERNATIVES TO DONOR CORNEAS FOR TRANSPLANTATION

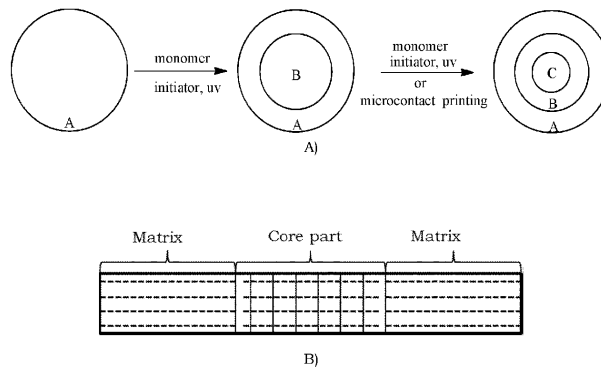


Figure 1.

(57) Abstract: The present invention relates to a corneal implant comprising a matrix material and a core part wherein the core part is arranged essentially in the middle of the matrix material. The core part is anti fouling in order to stop cell proliferation across said part. The present invention further relates to a method of preparing the said product and the use of the same.

WO 2015/055656 A1

REGENERATIVE PROSTHESES AS ALTERNATIVES TO DONOR CORNEAS FOR
TRANSPLANTATION

FIELD OF THE INVENTION

- 5 The invention is for a regenerative prosthesis (RPro), a combination, duo-function regeneration promoting implant-prosthetic device, and the method of fabricating such a combination implant. The goal is to restore vision to corneal blind patients, supplementing and possibly replacing the use of donated corneas.

10 BACKGROUND

There is a severe worldwide shortage of donated organs for transplantation. Even when they are available, immune rejection is a major problem. The only widespread treatment for corneal blindness is transplantation of donor cornea, which is also in severe shortage., Corneal limbal epithelial stem cell transplantation is common but
15 only useful when one layer is damaged. Donor corneas are still needed for deeper injuries and allogeneic grafts are still problematic and face a high rate of rejection.

Stem cell transplantation is considered the state-of-the-art and has been applied, with limited success, as a last hope treatment for restoring function to vital organs such as the heart or liver. The state-of-the-art relies on the introduction of adult
20 source stem cells to repopulate badly damaged or diseased areas. Rejection even in the simple, immune-privileged cornea of foreign implanted stem cells is high. In the cornea transplantation using allogeneic donor tissue has remained the gold standard for over a century. Plastic-based prostheses (keratoprotheses or KPro) e.g. Boston KPro and OOKP, have been used to restore vision in severe ocular surface damage
25 but only as last resorts, as they have an unnatural appearance, suffer from complex implantation procedures and most importantly, have serious complications including retroprosthetic membrane formation, calcification, infection, glaucoma. Continuous immunosuppression is required.

The inventors have previously successfully implanted biosynthetic implants made
30 from (recombinant human) collagen (RHC) into 10 patients in a clinical study in Sweden. All 10 patients showed regeneration of corneal tissues and nerves, without the need of sustained immunosuppression over 4 years. We have since then

strengthened the implants by introducing a second network of materials by formation of interpenetrating networks (IPNs) of recombinant human collagen and MPC-co-PEGDA (MPC=2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, PEGDA= polyethylene glycol-diacrylate) (RHC-MPC). This new generation of implants have shown to be safe, and successfully promoted regeneration of corneal cells and nerves in mini-pig and rabbit models, and in two human patients. Still there is a need for an implant that remains optically clear when implanted and where the mechanical properties can be tailored in order to match the surrounding tissue and to enable suturing.

10 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a product which functions as a duo-functional regenerative prosthesis (RPro), or an implant, which controls the cell and tissue ingrowth on or into the implant, and the invention further relates to a method for preparing said product and the use of said product.

- 15 In a first aspect the present invention relates to a product having a first and a second side and wherein the material comprises a matrix material and a core material wherein the core material is arranged within the matrix material in a limited area of the matrix material and wherein the core material is at least partly exposed at the first and the second side;
- 20 wherein the matrix material is a hydrogel comprising a cross-linked extracellular matrix polymers, polypeptides or polysaccharides such as collagen, collagen mimetic peptides, hyaluronic acid or chitosan or mixtures thereof; and
- wherein the core material is based on olefinic or UV polymerizable monomers or polypeptides or mixtures thereof.
- 25 In a second aspect the present invention relates to a method of making the product according to the present invention wherein the method comprises:
- providing a matrix polymer and a cross-linker in a suitable solvent;
 - cross-linking the matrix polymer to form the matrix material;
 - providing core olefinic monomers or UV polymerizable monomers or polypeptides
- 30 or a mixtures thereof, and an initiator, optionally in a suitable solvent;

-adding the core olefinic monomers or UV polymerizable monomers or polypeptides or a mixtures thereof, and the initiator to the surface or the bulk of the matrix material; and

-letting the core olefinic monomers polymerize for a suitable period of time.

5 In a third aspect the present invention relates to a hydrogel of a cross-linked polymer network comprising

at least one first polymer and at least one second polymer wherein the first polymer is a natural polymer provided with methacrylate and/or acrylate functional groups and the second polymer comprises a synthetic and/or a natural polymer having at
10 least two functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate;

wherein the first and the second polymers are cross-linked via said functional groups; and

wherein the total concentration of polymers in the hydrogel is at least 2 weight%.

15 In a fourth aspect the present invention relates to a method of preparing the hydrogel comprising:

-providing a solution of a first polymer comprising a natural polymer comprising methacrylate and/or acrylate functional groups;

20 -providing a second polymer comprising a synthetic and/or a natural polymer having at least two functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate, or synthetic and/or natural monomers having thiol, acrylate and/or methacrylate functional groups;

-mixing the first and the second polymer, or monomers, in water to a total polymer concentration of at least 2 weight%; and

25 -letting the functional groups of the first and the second polymer chains cross-link, optionally applying UV radiation to the mixture when the second polymer has acrylate and/or methacrylate functional groups.

In a fifth aspect the present invention relates to an implant comprising the product according to the present invention.

In a sixth aspect the present invention relates to the use of the product according to the present invention as a barrier device, a coating material, as an anti-wrinkle material or as a model material.

- 5 In a seventh aspect the present invention relates to a method of treating a patient with a damaged or malfunctioning cornea comprising replacing the damaged or malfunctioning cornea with the implant according to the present invention.

In an eighth aspect the present invention relates to an injectable composition comprising a first and a second solution wherein the first solution is an aqueous
10 solution comprising a natural polymer comprising methacrylate and/or acrylate functional groups; and the second solution is an aqueous solution comprising a synthetic and/or a natural polymer having two or more functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate functional groups; and wherein the polymer concentration in each solution is at least 5 weight%.

- 15 In a ninth aspect the present invention relates to a hydrogel comprising collagen mimetic peptides and cross-linking agents.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. A) A schematic view of the product. A=Matrix material: Natural/synthetic
20 bio-interactive hydrogel, B=central polymer core with anti-cell/vessel in-growth/anti-fouling properties, homogeneously embedded into hydrogel A, C= natural /synthetic polymer layer/ pattern adhered or covalently bound on the surface of B. B) A schematic cross sectional view of the implant according to the present invention with a matrix and a core part wherein the core part comprises a core material comprising
25 polymerizable monomers or a mixture thereof and the hydrogel of the matrix material.

Figure 2. FTIR spectra showing: a) collagen-EDC/NHS only; b) collagen-MPC formulation without any MPC peaks, c) LiU collagen-MPC showing MPC peaks. The main MPC identification peak is the ester carbonyl peak at 1722 cm⁻¹ together with
30 the peaks at 1065 and 961 cm⁻¹, from the phosphate group; d) MPC only.

Figure 3. Schematic showing the fabrication of hydrogels comprising an ECM mimetic peptide, in this case, a triple helical collagen mimetic peptide (CMP) and a polymer template, e.g. 4 armed PEG.

Figure 4. Schematic for self assembling *via* hetero-dimerization.

- 5 Figure. 5. (a) Matrix material implant made from collagen mimetic peptides (CMPs) templated on a multi-armed PEG backbone. (b) Corneal epithelial cells growing on the CMP-PEG hydrogel.

Figure 6. Digestion of matrix material hydrogels by collagenase, showing that CMP-PEG hydrogel is resistant to enzymatic digestion.

- 10 Figure 7. (a) collagen-MPC hydrogel; (b) collagen-MPC hydrogel with central poly methyl methacrylate core serving as an optic.

Figure 8. Corneal epithelial cell culture on the MPC-MMA surface (images taken after 3 days of culture).

Figure 9. RPro with pHEMA-PEGMEM core.

- 15 Figure 10. CMP (collagen mimetic peptide) RPro with pHEMA-PEGMEM core.

Figure 11. Schematic structure of the obtained synthetic PEG hydrogel on top of a hydrogel according to the present invention.

Figure 12. Fluorescence micrograph showing visualization of a biotin-terminated pattern on a hydrogel surface containing layers as shown in figure 11.

- 20 Figure 13. a) Human fibronectin (traces of BSA-TR®) patterns on MPC collagen hydrogel: the line width 30 μm , space in-between 60 μm . b) Corneal epithelium cells on 30 μm -wide line patterns on MPC collagen hydrogel. c) Human fibronectin (trace of BSA-TR®) patterns on MPC collagen, the line width 200 μm , spacing 200 μm . d) Corneal epithelium cells on 200 μm line patterns on MPC collagen.

- 25 Figure 14. A) To the left, transmission electron micrograph of an RHCIII-MPC hydrogel examined following high pressure freezing. The image shows a predominantly uniaxial orientation of very fine collagen filaments. Right: The direction of preferentially aligned collagen from the same specimen, as determined by x-ray scattering, has been superimposed onto an image of the hydrogel. The

data confirms that a predominantly uniaxial alignment of collagen exists throughout the hydrogel. B) Schematic figure of a hydrogel surface according to the present invention with aligned collagen fibrils.

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In the present invention the term “hydrogel” means a gel of hydrophilic natural or synthetic polymers where the dispersion media is water.

10 In the present invention the term “arm” means side chain connected to a main or common polymeric back bone. For example a two arm polymer has two chains connected at one common point or are connected to one common polymeric back bone. A star polymer or a star co-polymer is a polymer where several polymeric chains are connected at one common point.

15 In the present application the term “transparent” means a light transmission of at least 80% of light in a wavelength range of 400-700 nm measured by using any suitably technique for example a UV spectrophotometer, and using pure PBS for background reading.

20 The object of the present invention is to 1) prepare a matrix material (A) which is resistant to enzymatic degradation and supports the cellular ingrowth promoting regeneration, 2) prepare a core material with desired dimensions (diameter of 2-8 mm, preferably 3-5 mm) optionally modified, preferably homogeneously, using synthetic polymer blocking vessel ingrowth, and optionally 3) to surface modify either the whole product or the core material with polymer/bioactive moieties for desired cellular response.

25 The cornea comprises a largely collagenous extracellular matrix (ECM) interspersed with stromal cells, and sandwiched by epithelial and endothelial cell layers. Natural ECM polymers like collagen are generally mechanically weak, unstable and difficult to process, while some synthetic polymers are strong with controlled stability and easily moldable. On the other hand, hydrogels comprising two or more components (natural
30 and/or synthetic polymers) are generally reliable materials for biomedical applications, due to the superior properties of the final product compared to the

properties of each individual component. By generating composite hydrogels based on interpenetrating networks (IPNs), biointeractive properties of natural ECM may be maintained together with the robustness and higher enzymatic stability of the synthetic polymer.

5

One of the major issues when using transplantation as a treatment is the potential risk of rejection due to inflammation caused by immune response or infection. The normal cornea is avascular and corneal neovascularization induced by inflammation, disease or sutures often result in opacification and rejection of transplanted cornea. Furthermore, in cases where patients lack viable progenitor or stem cells, and stem cell transplantation is not available or an option, there is a need for an alternative treatment. Therefore, the aim of the present invention is to prepare a product, such as an implant or prosthesis, comprising a transparent central core part comprising anti-fouling polymer/polymers which hinder cell migration and vessel ingrowth. The transparent core part can be superimposed onto the matrix material by adding a second component, core monomers optionally together with an initiator, to the matrix material and polymerize it, preferably by UV exposure. The cross-linking may be performed prior to implantation, during the transplantation, during the insertion of the implant, or after implantation. The core part is designed to hinder cells to migrate over or into the said part (e.g. by excluding blood vessels, in growing stromal cells) in order to remain cell-free to allow unhindered transmission of light for vision. In certain cases, e.g. where corneal stem cells are completely depleted and transplantation is not possible, the core part may be modified in order to block migration of non-corneal cells or abnormal cells over the core material to allow unhindered transmission of light.

The product, or implant, of the present invention comprises a matrix material and a core material, and optionally a coating or an imprint or a pattern on the surface of the matrix and/or core material. The matrix material may be an immune compatible biomaterial that is designed to stimulate cell adherence or regeneration, and maybe also repair of damaged tissue, of the human cornea by engaging the patient's own stem or progenitor cells to affect the regeneration. This matrix material can be used alone, where stem or progenitor cells are available to migrate over or into the implant and affect the repair and regeneration.

Figure 1 discloses a schematic view from above of the present invention where the implant comprises a matrix material (A), a central polymer core with antifouling properties (B), preferably homogeneously arranged in the matrix material A. A natural and/or synthetic polymer layer or coating (C) may further be adhered to or covalently bound to the surface of B. The matrix material (A) may may be a hydrogel. See figure 7.

In one embodiment the corneal implant (a two dimensional implant having a thickness) has a first and a second opposed surface. The implant comprises a matrix material and a core material wherein the core material is arranged essentially in a central part of the matrix material and the core material is at least partly exposed at the first and the second surface. The matrix material is a hydrogel comprising cross-linked collage and/or collagen mimetic peptides (CMP).

The core material is based on olefinic or UV polymerizable monomers or a mixture thereof and the core material is transparent (i.e. a light transmission of at least 80% of light in the range of 400-700 nm) and anti fouling in order to transmit light and hinder cell integration into or across the core material.

The matrix material or the hydrogel

The matrix material is is biointeractive, bio- and immune compatible, and may be used as a scaffold, especially as an implant, for stimulating in-growth of host cells (stem or progenitor cells) to differentiate and regenerate a healthy tissue. The matrix material may be porous with where the pores have a diameter of 1-50 nm, for example 5-20 nm.

The matrix material comprises matrix polymers which may be cross-linked extracellularmatrix (ECM) macromolecules, natural and/or synthetic polymers and/or co-polymers of said polymers (hybrids) mimicking ECM molecules. A non-limiting list of polymers is collagen, collagen mimetic peptides combinations of synergistic cell-interactive motifs, e.g. from cell adhesion peptides, anti-infective peptides (anti-microbial, anti-viral, anti-fungal or synthetic cationic or cell penetrating peptides with anti-infective properties) or combinations thereof or combinations with

synthetic polymers for examples PEG. The matrix material may also be an interpenetrating network of natural and/or synthetic analogs of the ECM of the corneal stroma. In one embodiment the matrix material comprises amine groups. In another embodiment the matrix material comprises collagen, native or recombinant collagen.

The present inventors have prepared hydrogels of collagen or CMP wherein the fibrils of the collagen or CMP are essentially uniaxial orientated or aligned, figure 7. The uniaxial orientation is believed to be a result of the higher order of assembly of the fibres which may be a result of the high collagen concentration. Surface modification may also influence the orientation of the fibrils, furthermore without being bound by theory but high pressure freezing of the hydrogel may also influence the orientation of the fibrils, Figure 7. An essentially uniaxial orientation of the fibrils is believed to increase the mechanical properties of the hydrogel, the transparency and may even influence the cell proliferation and growth.

The generation of a 3D ECM (Extra Cellular Matrix) like environment by cell integration into and across the matrix material the fibers (or fibrils) of the matrix material should be substantially smaller than the cells which have a diameter of around 5-20 micrometers. Synthetic fibres usually have microfibers in the range of 10-50µm. Thus, cells attached to synthetic microfibers are still in a two dimensional environment with a curvature dependent on the diameter of the microfibers. In addition, because of their micro-scale sizes, the mechanical strength of these polymeric fibers often prevents material structural adaptations from the forces exerted by cells during their adhesion, migration and maturation processes. Therefore the fibres (or fibrils) according to the present invention may have a diameter in the range of 1-30 nm, for example 5-20nm. The diameter of the fibrils is believed to influence the transparency and makes it possible to make hydrogels with a thickness of up to 1 mm and still be transparent.

The cross-linker for the matrix polymer may be an epoxide or a di-epoxide such as C1-C10 di-epoxide such 1,3-butadiene di-epoxide, 1,5-hexadiene di-epoxide, or C6-C16 ether di-epoxides such as dimethylallyl ether di-epoxide and 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE). By using a di-epoxide, especially BDDGE, the cross-linking step becomes more biocompatible instead of using the less preferred EDC

cross-linker. In comparison with EDC crosslinking the epoxide cross-linker also results in improved enzymatic stability (Fig 6) and better mechanical properties, for example higher elongation at break (Table 1).

The matrix material according to the present invention may be an IPN of one type of
5 ECM molecule and another type of ECM molecule, or of an ECM molecule and a synthetic polymer. In one embodiment the matrix material comprises MPC-co-PEGDA, figure 2. In one embodiment the matrix material is an IPN, or a mixture, of MPC-co-PEGDA and collagen (MPC-Coll). A problem has been to prepare such IPNs or mixtures with a high MPC content, however, the present inventors have prepared
10 products with much higher MPC contents than previously disclosed. The higher amount of MPC makes the matrix material and the final product more stable and less susceptible to enzymatic degradation. A higher MPC content also increases the elongation at break but makes the material rigid enough to be sutured.

The matrix material or the hydrogel may be a hydrogel comprising a first polymer
15 which is a natural polymer, for example collagen or collagen mimetic peptides (CMP), and a second polymer comprising a synthetic and/or natural polymer wherein the second polymer preferably is hydrophilic. The second polymer may be partly or fully water soluble which is believed to improve the properties of the obtained hydrogel. The first polymer comprises methacrylate and/or acrylate
20 functional groups while the second polymer comprises thiol, methacrylate and/or acrylate functional groups. In one embodiment the hydrogel is cross-linked or further cross-linked using cross-linking agents for example or EDC and NHS.

The cross-linking agents may be selected from but not limited to EDC, EDC methiodide (1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide), DCC
25 (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), BDDC (1,3-Bis(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)carbodiimide), DIC (N,N'-diisopropylcarbodiimide, (CH₃)₂CH-N=C=N-CH(CH₃)₂), PyOxim[Ethyl cyano(hydroxyimino)acetato-O₂]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate, N-hydroxysuccinimide (HOSu), N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide (HONB), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt),
30 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (6-Cl-HOBt), 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt), 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine (HODhbt) and its aza derivative (HODhat) or combinations thereof.

When the hydrogel comprises collagen and/or collagen mimetic peptides (CMP) and cross-linking agents, said agents may be EDC and NHS. The molar equivalent ratio of EDC to amine of CMP may be 1:0.5 to 1:3, such as 1:1 to 1:2. The molar ratio of EDC:NHS may be from 2:1 to 1:2, such as 1.5:1 to 1:1.5, or 1:1. By cross-linking the hydrogel via the functional groups (for example methacrylate and thiol) and by the use of EDC:NHS the mechanical properties may be altered and the gelation time may also be shortened.

The first polymer may be selected from collagen, fibrin, cell-interactive proteins (e.g. laminin, fibronectin), hyaluronic acid, chitosan, collagen mimetic peptides, proteins, recombinant proteins or peptides, lignin or cellulose or combinations thereof.

The hydrogel according to the present invention comprises a first and a second polymer. In one embodiment the first polymer is collagen and/or collagen mimetic peptide (CMP). In another embodiment the first polymer is collagen, for example collagen I, collagen II, collagen III, collagen IV or collagen V, or mixtures thereof.

The second polymer may comprise one or more of PEG, PVA, polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate), PNIPAAm, silk, collagen, hyaluronic acid, chitosan, collagen mimetic peptides, chimeric peptides based on collagen and cell-interactive peptides, plant lignin, cellulose or plant gum proteins, recombinant proteins or peptides, and co-polymers thereof.

In one embodiment the second polymer is a synthetic polymer, preferably selected from one or more of polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate) or poly(N-isopropylacryl amide) (PNIPAAm). In one embodiment the second polymer is PEG with thiol functional groups. The cell-interactive peptides may be laminin, fibronectin, entactin or vitronectin. In one embodiment the second polymer comprises at least two arms, preferably three or more arms, or four or more arms.

In one embodiment the hydrogel comprises one additional second polymer selected from polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM),
5 poly(pentaerythritol triacrylate) or poly(N-isopropylacryl amide) (PNIPAAm). The molar ratio between the second polymer and the additional second polymer may be 3:1 to 0.5:1, such as 2:1 to 1:1.

In one embodiment the second polymer is PEG with 2, 4 or 6 arms. In another embodiment the second polymer or the additional second polymer is PEG with four
10 arms each having thiol groups.

The mechanical properties of the hydrogels can be tuned by varying the methacrylated/acrylated collagen or CMP concentration and/or the methacrylated/acrylated collagen/CMP:thiol molar ratio (or acrylate or methacrylate ratio), thus controlling the degree of crosslinking. Soft hydrogels will
15 be produced with initial collagen/CMP concentrations of 3 and 5 wt%. The collagen/CMP:thiol molar ratio (or acrylate or methacrylate ratio) may be varied from 1 to 10, such as 2 to 8, or 3 to 6. The molar ratio between the functional groups of the first polymer and the functional groups of the second polymer may be from 1:5 to 1:0.5 such as 1:3 to 1:1, or 1:2. Cell viability and proliferation will be
20 assessed on the resulting hydrogels in order to understand the optimal hydrogel mechanical properties that favour cell survival and ultimately regeneration.

Collagen mimetic peptides (CMP) are short synthetic peptides (15-100 amino acids long, preferably 20-40 amino acids) with an inherent ability to adopt a triple helical fold similar to the natural collagen. CMP's have mainly been used as model systems
25 for elucidating and understanding the formation and stability of triple helix in the natural collagens. In order to enhance CMP's ability to form nanofibers and hydrogels CMP may be connected to a template. Without being bound by theory the template may stabilize the triple helix of the CMP and thereby enhance the possible formation of higher order of assembly. The template may be a polymer or a co-
30 polymer and may have at least two arms (such as 3, 4, 5 or 6 arms) or the templates may be a multiple branched molecule or polymer such as spider silk, hyperbranched polymers or dendrimers. In one embodiment the template is multiarm polyvinylchloride. In another embodiment the template may be a

succinylated poly(N-isoacrylamide), e.g. polyethylene glycol (PEG), terpolymer of poly(N-isopropylacrylamide-coacrylic acid-coacryloxysuccinimide or PNiPAAm-coAAc-coASI. Preferably the template has two or more long chains, for example each chain may have a molecular weight of at least 5000g/mol, or at least
5 15,000g/mol. The arms or branches of the template comprise functional groups that may form secondary bonds such as hydrogen bonds or dipole-dipole bonds. Figure 3 discloses CMP and templates and the formation of triple helix.

Multi-armed PEGs and PEG-collagen hydrogels have previously been reported as scaffolds for tissue engineering. PEG containing hydrogels have previously been
10 shown to have fairly low elastic modulus, between 0.2-2 MPa for collagen-PEG hydrogels. Prior art has shown cell adhesion to said scaffolds with a preference for rough surfaces. Both PEG and PEG-collagen gels are susceptible to hydrolysis and PEG-collagen hydrogels are easily degraded by collagenase within 2 days. In one
15 embodiment of the present invention the matrix material (the hydrogel) comprises a PEG with at least 3 arms, or at least 4 arms, or 8 arms, or a combination thereof. Addition of CMP, however, renders the hybrid resistant to collagenase and thereby more stable.

The present inventors have produced collagen or CMP hydrogels that are transparent (for example the light transmission may be at least 80%, or at least
20 85%, or preferably at least 90% for wave lengths between 400 and 700 nm, and with backscatter under 3%, as low as 1%). This transparency is important in certain applications such as intraocular lenses, cornea implants or prostheses etc., which has not been the case when hydrogels have been cross-linked with EDC.

The matrix material or the hydrogels of the present invention may be cross-linked
25 via the functional groups of the first and the second polymer and optionally via cross-linking agents. In one embodiment the cross-link is a thio-ether as a result of a reaction between a methacrylate and a thiol group. In another embodiment the cross-link is a carbon-carbon bond for example as a result from a reaction between methacrylate or acrylate groups.

30 The matrix material or the hydrogel may further comprise cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC) or silk. The addition of these polymers improves the mechanical properties for example the suturability.

In order to minimize the risk of damages to the eye or discomfortness the matrix material should preferably be as soft as possible, the elastic modulus may be less than 200 MPa, or less than 100 MPa or less than 50 MPa, or less than 10 MPa. The tensile strength of the hydrogel may be 1 MPa or more, or 3 MPa or more. The
5 elongation at break may be more than 10 %, or more than 20 %, or more than 30 %.

The core part

The core part is preferably arranged essentially in the middle of the matrix material and is transparent. The core monomers that are added to the matrix material are
10 polymerized within the matrix material forming the core material, i.e. it forms an interpenetrating network (IPN) or the like together with the matrix material, and may be arranged to be exposed on both sides of the implant. The weight ratio of polymerized olefinic or UV polymerizable monomers (that are anti fouling) may be
15 from 1wt% to 95 wt% for example 1 wt% or more, or 5 wt% or more, or 15 wt% or more, or 30 wt% or more, or 50 wt% or more, or 95 wt% or less, or 85 wt% or less, or 75 wt% or less, or 65 wt% or less, or 55 wt% or less of the total weight of the core part. In one embodiment the ratio of polymerized olefinic or UV polymerizable monomers is 30-70 wt%, or 40-60 wt%. When the application is a cornea implant
20 the amount of core monomers added is calculated to result in a core part having a diameter of 2-8 mm, or 3-5 mm. Any suitable initiator may be used for polymerizing the core monomers, preferably in an amount of 0.5-5 wt%, or 1-3 wt%.

The core monomers, and optionally an initiator and optionally the cross-linker may
25 be added to the surface of the matrix material or injected into the matrix material or added to the matrix material in any other suitable way. The core monomers and the cross-linker are left to diffuse into the matrix material and optionally left to diffuse through the matrix material to the other side of the product. In one embodiment the core monomers and the cross-linker is left to diffuse into the
30 hydrogel for at least 30 seconds or more, or 1 minute or more, or 5 minutes or more, or 15 minutes or more, or 2 hours or more, or 24 hours or more. In one embodiment the monomers are left to diffuse for 1 to 15 minutes. The core monomers are then left to cross-link preferably by applying UV radiation for at least 5 minutes, or at

least 15 minutes. Preferably the core monomers are added in surplus and preferably the product is washed and rinsed after the cross-linking step. In order to obtain a core part in a limited area of the matrix material a mask may be used to cover the area where the core material is not wanted. In that way only core monomers that are within the desired limited area will be exposed to UV and polymerized.

The core monomers are preferably olefinic monomers susceptible to radical polymerisation. Non-limiting olefinic monomers are acrylated monomers such as methacrylate (MA), methyl methacrylate (MMA), methyl ether methacrylate (MEM), or hydroxyethyl methacrylate (HEMA), HEMA-poly ethylene glycol methacrylate (HEMA-PEGMA), HEMA-polyethylene glycol methyl ether methacrylate (HEMA-PEGMEM), 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) and hydroxyl-terminated oligo(ethylene glycol) methacrylate (HOEGMA) or alkenes such as propylene, butene, pentene, hexene, or cyclic alkenes such as styrene, or combinations or co-polymers thereof. Polypeptides, for example polylysine, may be used in the core material. The polypeptides may have anti-fouling or anti cell/vessel growth properties or they may be present in the core part above a concentration where they start to exhibit anti-fouling or anti cell/vessel growth properties. α -N-carboxyanhydride ring-opening polymerization (α -NCA ROP) enables the efficient generation of homopolypeptides or block copolypeptides possessing desired chemical functionality to a targeted molecular weight in a controlled manner. Polymerization can be initiated either by UV exposure or by amine groups present in the matrix material. Another core material is fouling resistant biomimetic poly(ethylene glycol) based grafted polymers. In one embodiment the core monomers is a mixture of polypeptides and olefinic monomers.

In order to minimize the risk of damages or discomfort to the eye the core part should preferably be as soft as possible. Since the core part according to the present invention partly contains a hydrogel, the core part is not rigid but soft and elastic. The elastic modulus of the core material may be less than 200 MPa, or less than 100 MPa or less than 50 MPa, or less than 10 MPa, depending on the chemical composition and/or the method of making the hydrogel. The tensile strength of the hydrogel may be 1 MPa or more, or 3 MPa or more. The elongation

at break may be more than 10 %, or more than 20 %, or more than 30 %, depending on the chemical composition and/or the method of making the hydrogel. The mechanical properties may be tailored in order to adopt them to the host tissue.

5

Surface modifications

In order to tailor the properties of the product the surface of the hydrogel and/or the core material may be modified, patterned or coated for example by photografting, microcontact printing or other lithography, templating, molding or any other suitable
10 technique. Pattern resolution goes from 0.01 μm up to 500 μm or more, and may comprise of one or more patterns modified areas on the hydrogel and/or the core material with same or different coating functionality. The pattern may be of any geometrical shape and be regular or irregular and may be continuous or
15 discontinuous. For example the pattern may be in the shape or lines or dots, or dots making up a line. The lines may be aligned and/or parallel. The dots or the lines may have a maximum width or diameter of 10 nm or more, for example 500 nm or more, or 1 μm or more, or 20 μm or more, or 100 μm or more, for example 10-50 μm , or 20-40 μm . The width of the lines has shown to influence the cell proliferation, Example 10 and Figure 13. The lines or dots may be spaced at a
20 distance of 1 μm or more, or 20 μm or more, or 50 μm or more, for example 20-70 μm . The space between the lines or the dots may influence the cell proliferation and growth.

According to the present invention a surface compound is added to the hydrogel
25 surface. The surface compound is selected from the group consisting of polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers, PEG-methacrylate polymer/monomers, other acrylate, methacrylate, carboxyl, amino, amide, epoxide, hydroxyl, cyano, nitride, sulfanamido, acetylenyl, alkene, esters like imidoesters(N-hydroxysuccinimide ester) or pentafluorphenol ester or other, azide, thiol,
30 maleimide, functionalized PEG derivatives, bifunctional compounds, drugs, bioactive substances, biological molecules including proteins or peptides. In one embodiment the surface compound is selected from polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers and/or PEG-methacrylate polymer/monomers. In

another embodiment the surface compounds are selected from fibronectin, entactin or vitronectin.

In one embodiment the surface is functionalized with a PEGMA coating prior to lithography or printing. This introduces MA onto the surface of any hydrogel to standardize the surface chemistry (monomers and/or other molecules bearing functional groups may be used in this approach). The surface functionalization by PEG-MA may be done on any biopolymer, and may be done without the addition of an initiator. The surface of the matrix material and/or the core material may be modified, coated and/or patterned with PEG-MA, N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), polypeptides such as YIGSR, IKVAV, RGD, ECM proteins, fibronectin derived peptides, combinations of synergistic peptides, DGEA peptide from collagen, antibodies, glycosaminoglycans, motifs from growth factors, or pharmaceutically active substances.

Polyethylene glycol-methacrylate (PEGMA) may be applied to a hydrogel without the use of an initiator resulting in a less toxic product. The application is done by UV photo-grafting the PEGMA on a hydrogel or a protein film. This modification enables 1) standardizing surface properties of collagen hydrogels, 2) attachment of surface functional groups, 3) creation of physical barrier for contamination. To the inventors knowledge this has never been done before for a regenerative implant or a prosthesis produced with such a protecting/functional PEGMA layer. For in vitro applications a thin (tens of nm) initiator free PEGMA hydrogel may be arranged on top of the "main hydrogel" with a purpose of standardizing surface properties for contact printing or photolitho. This again has a clear technological advantage: e.g., no optimization is needed for printing of chemical/biomolecular compounds even if there are slight variations in the quality of "main hydrogel" material, or even if its composition is changed intentionally. Also, such PEGMA + functional monomer or attached protein/bioactive substance layer/pattern will locally stimulate/suppress adhesion of cells, guide them, whereas during the later stages of cell culture experiment the tissue -promoting properties of the "main hydrogel" will become dominant. In order to take advantage of such cell programming architecture, the bearing material (the "main hydrogel") should be preferably be stable, especially if one wants to create 3D models, so that it supports the desired morphology, shape and patterns during production, storing and cell culture/tissue application steps.

The generalized resulting film structure as described above is shown in Fig. 11. This type of surface modification allows standardizing the chemical properties of the original protein and/or biosynthetic hydrogel film that, dependent on its composition, might display different number of surface chemical groups per surface area. This is advantageous for any further chemical modifications and functionalization including patterning of the surface (see below). In the implant device applications, such a modification makes it possible for the invention to be used as an additional barrier for exchange of different particles or viruses and bacteria between the implant and its surrounding tissue. Since the thickness of the barrier is very small, it will be degraded after some time after having performed its function. Further modifications of the photografted PEG hydrogel could be done, for example by microcontact printing of functional methacrylate monomers.

The present invention may be used in both in vitro and in vivo applications. For example the compound may be used for various implants such as but not limited to, cornea, cardiac patches, intraocular lenses, joints, and synovia, or in cosmetic surgery as a filling material such as breast implants or lip filling material, or as an anti-wrinkle material. The present invention may also be used as a drug-delivery vehicle, tissue glue or a barrier. The compound may further be used in vitro for example in chips, arrays, coatings or assays. The product according to the present invention may be used as a model or a model surface for studying cell migration or proliferation. The product may be coated on surfaces such as petri dishes or microwell plates in order to arrange cells in specific patterns or just as a cell growth support.

25 **Method of forming the hydrogel**

The hydrogels may be prepared by mixing a first and a second polymer or by mixing a first and a second solution where the first solution comprises the first polymer and the second solution comprises the second polymer. In one embodiment the pH of the first solution is less than 5, preferably less than 3, or more than 10, preferably more than 12. The first and the second solution may be prepared using water or purified water or any suitable buffer. In one embodiment

the first polymer is methacrylated collagen or methacrylated CMP, and wherein the pH of the first solution is less than 5 or more than 10.

Without being bound by theory it is believed that the introduction of photochemically cross-linkable moieties into the first natural polymer will facilitate rapid and controllable intermolecular and intramolecular cross-linking leading to formation of a hydrogel. The cross-linking reactivity of the first natural polymer is enhanced by the incorporation of methacrylate and/or acrylate groups along its triple helical chain, which render it reactive towards nucleophilic attacks via Michael addition reaction. In addition, by being susceptible of radical formation under low-energy UV light irradiation, methacrylate groups offer another synthetic route to bridge collagen helices with a series of hydrophilic compounds (non-zero crosslinking). This modification makes the method presented herein very versatile for the synthesis of collagen/CMP-based hydrogels. The method according to the present invention may use UV in order to form cross-links or to speed up the cross-linking formation, for example UV 365nm wavelength may be used for 5 to 15 min. In one embodiment a photoinitiator is used, for example at a concentration of 1-5 % (w.r.t. to the first polymer). However, the method of preparing the present hydrogels does not require the use of UV, in one embodiment no UV is used.

When preparing the hydrogel the collagen or CMP concentration in the first solution may be 0.2 weight% or higher, or 0.5 weight% or higher, or 1 weight% or higher, or 2 weight% or higher, 5 weight% or higher, or 8 weight% or higher, or 12 weight% or higher, or 15 weight% or higher, up to 18 weight%.

When the hydrogel according to the present invention is prepared using CMP and a template the molar ratio between CMP and the template may be 10:1 to 1:10, such as 5:1 to 1:5, or 2:1 to 1:2.

The hydrogels may be prepared using a syringe mixing system. In a non-limiting example, a collagen (a first polymer) solution is placed into a syringe coupled to a second empty syringe through a 3-way T connector with septum at one end. Solutions of monomers/polymers (a second polymer/monomer) and photo initiator are then added sequentially from syringes via septum and mixed by pumping the combined solutions between the two main syringes. In one embodiment the injectable composition comprises a first and a second aqueous solution wherein the first solution is an aqueous solution comprising collagen or collagen mimetic

peptide (CMP) comprising methacrylate and/or acrylate. The second solution is an aqueous solution comprising a synthetic polymer having two or more functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate functional groups. The polymer concentration in each solution is not more than 3 weight% in order to
5 facilitate proper mixing and not too high viscosity. In one embodiment the composition further comprises cells and/or growth factors and/or cell nutrients.

The hydrogel may be prepared using a syringe mixing system. The syringe mixing system allows for a coupling reaction mostly in the localized regions where a concentrated aqueous collagen or CMP solution comes into contact with the
10 crosslinking agents. In yet another embodiment the composition is arranged in a syringe wherein the first solution is arranged in a first compartment and the second solution in a second compartment.

The functionalizations of the natural and synthetic polymers and the system for forming hydrogels presented herein are also suitable as inks for 3D printing in
15 order to prepare complex 3D structures, or for incorporating cells into the structure for example. The hydrogels of the present invention may be prepared together with cells, for example stem cells.

Amending the conductivity of a collagen solution

The present inventors have found that the transparency of collagen or CMP based
20 hydrogels can be controlled by manipulating the conductivity of collagen based solutions prior to further modification and/or crosslinking. The target conductivity is achieved by constant volume diafiltration.

The transparency of the cornea is critically dependent on the absence of any gaps
25 in the matrix that are comparable in size to the wavelength of light, and on the presence of thin, parallel collagen fibrils

In a non-limiting example a diafiltration system and membrane of choice is set-up as per the manufacturer's directions. A conductivity sensor is inserted into the permeate line as close as possible to the permeate exit port and the conductivity
30 sensor is connected to a digital recording device. The collagen based solution is diafiltrated at constant volume using water (preferably sterile), USP (e.g. WFI) until the target conductivity is achieved. The processing data (permeate conductivity and

temperature) are recorded every 60 seconds. The conductivity for each diavolume of permeate is noted.

For many collagen-based solutions and crosslinking methods the target conductivity to achieve hydrogels with optimized transparency has been found to be $45 \pm 5\mu\text{S}/\text{cm}$ or $45 \pm 2\mu\text{S}/\text{cm}$. The target conductivity may be adjusted as required for alternative modifications and crosslinking methods.

The present method is applicable to all starting volumes of collagen based solutions. Ten to twenty diavolumes of water (preferably purified such as sterile for example USP water) is consumed to reach the above stated target conductivity. The temperature of the collagen solution throughout the process is preferably kept within 4 to 30 °C, or 10 to 25°C, and must be controlled in a manner such that the temperature of the permeate passing thru the conductivity sensor is kept constant ($\pm 1^\circ\text{C}$, preferably $\pm 0.5^\circ\text{C}$) and within the calibration range ($\pm 1^\circ\text{C}$, preferably $\pm 0.5^\circ\text{C}$) of the sensor. The present inventors have found that if the temperature is not kept constant the correct conductivity of the solution will not be detected. The feed flow rate and feed pressure is dependent upon the diafiltration system used and may be adjusted in accordance with common practice. The present inventors have found that one feed flow rate that may be used is 1-10 LPM/m² (LPM means litres per minute), or 2-7 LPM/m², or 3 - 5 LPM/m² and a maximum feed pressure may be 10-35 PSI (69-241kPa), or 15-30 PSI (103-207kPa), or 20-25PSI (138-172kPa) or 25 PSI (172kPa). The feed flow rate and feed pressure is preferably controlled in a manner that ensures a sufficient permeate flow rate thru the conductivity sensor. The present inventors have found that diafiltration time for 1 litre of a collagen based solution may be 8 to 10 hours. In one embodiment the diafiltrated solution is lyophilized followed by reconstitution of the collagen, i.e. making a new solution at any suitable concentration of the lyophilized collagen or CMP using water or any suitable buffer solution.

Light transmission and back-scattering measurements may be carried out at room temperature for white light (quartz-halogen lamp source) and for narrow spectral regions (centered at 450, 500, 550, 600 and 650 nm). In one embodiment a custom-built instrument was used to measure the percent transmission of samples as compared to open beam intensity. The relative percent of light back scattered

from the collimated beam by the sample was measured with a circular array of 8 photodiodes, 30 degrees off axis.

The diafiltration also influences the mechanical properties which is clearly seen in Examples 11 and 12. By diafiltrating preferably prior to crosslinking the collagen
5 the obtained hydrogel has a significantly higher elongation at break compared to non diafiltrated. The elastic modulus is also decreased indicating a softer hydrogel.

Applications

The present invention may be used as an implant itself or as part of an implant or as a vehicle for delivering active compounds such as drugs or growth factors, for
10 example. The list of potential implants includes, but is not limited to, intraocular lenses, cornea, breast, lips, skin, or cardiac patches.

The inventors have been able to reproduce the morphology of the meshes found in decellularized dermis by eletrospinning and plastic compression of porcine collagen alone or with other polymers (Fig. 4A and B). However, to optimize the components
15 of the dermal scaffold not only to support dermal fibroblasts but to allow for blood vessel in-growth, a soft fibrin hydrogel pre-seeded with EPCs may be incorporated to allow very rapid angiogenesis and allow for anastomosis formation, which is critical to successful grafting.

Although compressed fibrous meshes can be used as skin substitutes, a smooth substrate is more desirable for a smooth skin epidermis. The mesh may therefore
20 be arranged within a hydrogel. Because of the cell friendly chemistry of the present hydrogel it is possible to incorporate cells (e.g. autologously harvested and expanded) into the fibrous mesh-hydrogel construction.

A cornea implant may have a thickness of 150-500 μ m, such as 250-350 μ m. The
25 implant may be prepared by placing the hydrogel or the solutions forming the gel between two plates or molds having the desired thickness as a distance between the plates/molds. UV (for example 365nm wavelength) may be applied for 5 to 20 minutes, such as 10-15 minutes.

CMP hydrogels have comparable mechanical properties to recombinant human
30 collagen and are sufficiently robust for grafting as corneal implants, as shown in grafts into mini-pigs. Example 3 discloses certain properties of some CMP

hydrogels.

The hydrogels according to the present invention may also be used in lab-on-a-chip systems, microscopy and microarray substrates, cell and tissue culture dishes, microwell plates, microfluidic and sampling, separation, purification, analytical
5 tools. In this type of applications, the hydrogel can be used as an optimal support/environment for cell growth, proliferation, differentiation, tissue formation. Also, the hydrogel can be employed as a technical material for production of any kind of component for the above devices. The hydrogel can be used in the device as produced or it can be post-fabricated in order to obtain a specific shape,
10 morphology, topography, stiffness, surface chemical, biochemical or physical properties, etc.

EXAMPLES

The present inventors have developed a non-limiting number of matrix materials
15 preferably based on ECM macromolecules. Examples of collagen matrix materials are given below:

Example 1: **Collagen materials**

A simple matrix material can be fabricated from carbodiimide crosslinked or epoxide
20 or diepoxide, preferably BDDGE, crosslinked or UV crosslinked collagen/modified collagen as known in the art.

Example 2: **Collagen Interpenetrating Networked materials**

These can be made from collagen-MPC or methcarylated collagen (MA) hybrid.

25

Collagen-MPC-co-PEGDA

0.5ml of 15% (wt/wt) collagen aqueous solution was taken in the 3 way syringe system and thoroughly mixed with 150µl of MES (2-(N-morpholino)ethane sulfonic

acid) buffer in the syringe system. The pH of collagen solution was adjusted to pH 5 ± 0.5 with 2M NaOH. After that calculated volume of 10% wt/vol of NHS was added followed by MPC solution and PEGDA solution in MES buffer. The Collagen:MPC ratios was 2:1 (wt/wt) and the MPC:PEGDA ratio was 3:1 (wt/wt). Then calculated volume of 4% (wt/vol) APS (ammonium persulfate) in MES and 2% (vol/vol) TEMED (Tetramethylethylenediamine) in MES were added subsequently to the syringe mixing system. The ratio of APS: MPC (wt/wt) was 0.03:1 and the ratio of APS:TEMED (wt/wt) was 1:0.77. Then calculated volume of EDC (5% wt/vol) was added. The molar ratio of Collagen-NH₂:EDC was 1:0.7 and EDC:NHS was 2:1.

10

Collagen (MA)

0.3mL (300 µL) of 5% MA-collagen (MAC) solution was taken in the 3 way syringe system and 300 µL of PEGDA and/ HEMA containing 2% (w.r.collagen) Irgacure 2959 was added to the syringe and mixed well. The solution from the syringe was casted between two a glass slide/mould with spacers of desired thickness and exposed to UV 365nm wavelength for 10 to 15 min.

15

Collagen-MPC-BDDGE

0.5ml of 15% (wt/wt) collagen solution was loaded into a syringe mixing system and thoroughly mixed with 150µl of Na-bicarbonate buffer in the syringe system. After that calculated volume of MPC solution and PEGDA solution in MES buffer was added. The Collagen:MPC ratios was 2:1 (wt/wt) and the MPC:PEGDA ratio was 3:1 (wt/wt). Then calculated volume of 8% (wt/vol) APS in MES and 6% (vol/vol) TEMED in MES were added subsequently to the syringe mixing system. The ratio of APS: MPC (wt/wt) was 0.03:1 and the ration of APS:TEMED (wt/wt) was 1:0.77. Then adequate amount of 2N NaOH was added to bring the pH at 11. Then calculated volume of BDDGE was added. The molar ratio of Collagen-NH₂:BDDGE was 1:2.

20

25

Collagen-MPC interpenetrating networks (IPNs) have been previously described but there is no confirmation of that there is MPC in said networks.

The inventors of the present invention have shown that the addition of the MPC to a collagen network increased the elastic modulus the elongation at break in collagen hydrogels as shown in Table 1. In recombinant human collagen examples however a decrease in elastic modulus occurred, which correlated well to the increase in elasticity of the samples. Use of RHC instead of porcine collagen from previous data shows a 10-fold increase in tensile strength.

Table 1. Changes in mechanical properties of collagen versus collagen-MPC hydrogels.

	PC	PC-MPC	RHC	RHC-MPC	PC-MPC-BDDGE 1:2	PC-MPC-BDDGE 1:4
Tensile strength (MPa)	0.15	0.12	1.7	1.29	0.10	0.15
Elongation at break (%)	14.57	21.29	13.88	37.89	16.41	12.88
Young's elastic modulus (MPa)	2.09	0.87	20.26	5.26	1.23	1.75

10 PC=Porcine Collagen

RHC=Recombinant Human Collagen

Example 3: Collagen mimetic peptide hydrogels

15 Short bioactive peptide sequences that are cell-interactive have been used to mimic the properties of the holoprotein. Longer sequences, for example, collagen mimetic peptides (CMPs), are able to self-assemble and a range of these have been developed to model ECM-based peptides.

In one example a 38 amino acid CMP and a long chain multiarm template (for example 4 arm/8 arm PEG, PNIPAAm, silk) was used to promote stepwise triple

helical self assembly and form hydrogels, see figure 3 and 4. Multiarm templates of appropriate lengths and flexibility will assist CMPs to self assemble into collagen-like triple helical network through well-defined self association; and will also provide the necessary backbone support to maintain the stiffness and mechanical strength to form self-supporting hydrogels. These biomaterials are highly designable, diversifiable with improved mechanical, optical and enzymatic properties. A series of such building blocks using different polymeric multiarm templates conjugated with CMPs or chimeric peptides comprising natural and synthetic ECM motifs or anti-microbial peptides can be produced. The combinations of such hetero moieties would give rise to multiple hybrid supramolecular assemblies mimicking natural ECM architecture, see figure 4, with tunable physical and biological properties.

Synthesis of collagen mimetic peptide (CMP):

CMP's were synthesized on Symphony automated peptide synthesizer (Protein Technologies Inc.) using standard fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with HCTU (ChemPep Inc.) as the activating reagent. The synthesis was performed on a 0.1 mmol scale with Fmoc-PEG-PS resin (Applied Biosystems) using fourfold excess of amino acid in each coupling. The peptides were cleaved from the resin by treatment with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA), water and triisopropylsilane (TIS) (95:2.5:2.5 v/v; 10 mL per gram of polymer) for 2 h at room temperature. After filtration, TFA was evaporated and the peptides were precipitated by the addition of cold diethyl ether, centrifuged and lyophilized. The crude products were purified by reversed-phase HPLC on a semi-preparative C-18 column (Grace Vydac) and identified from their MALDI-TOF spectra. The maximum at 225 nm and minimum near 200 nm are characteristic triple helical self assembly. The triple helical folding was found stable upto 40 °C.

Synthesis of PEG-CMP:

Solution of CMP in water and solution of 8-Arm PEG-Maleimide in DMSO was mixed at the molar ratio of PEG-Maleimide: CMP=1:2.5 (Fig). After 4 days of continuous stirring the mixture was dialyzed through a dialysis membrane (12-

14,000 molecular weight, Spectrum Laboratories, Inc., CA, US). After dialysis the solution was lyophilized to get solid PEG-CMP.

¹H spectra of 8-Arm PEG-Maleimide and PEG-CMP confirmed the conjugation of CMP with PEG-Maleimide. The complete disappearance of C=C Maleimide peaks (6.5-6.6) indicated the 100% conjugation of CMP with 8-Arm PEG-Maleimide.

Preparation of an example of CMP hydrogel:

CMP hydrogel was prepared using a syringe mixing system as described in Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 May;47(5):1869-75 which is hereby incorporated by reference. The solution of (12 weight%) CMP-PEG was crosslinked.

To fabricate CMP hydrogels, 0.5 mL aliquots of 12% (wt/wt) of CMP-PEG in aqueous solution was loaded into a syringe mixing system free of air bubbles. Calculated volumes of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (1.0 equimolar with respect to lysine NH₂ in CMP) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (1.0 equivalence) solutions were added and thoroughly mixed at room temperature. The final solution was immediately dispensed as flat sheets or into curved polypropylene contact lens molds and cured at 100% humidity at 21°C for up to 24 hours. The implants were washed three times with fresh 1x PBS prior to storage in PBS. Fig. 5A shows a CMP-based hydrogel, moulded as a corneal implant, with biocompatibility towards corneal cells (Fig. 5B).

The hydrogels of the present invention exhibit good elastic properties (i.e. high elongation at break), probably due to the presence of PEG. But the combination of CMP and PEG led to hydrogels that were biocompatible allowing host cells to grow and proliferate and showed a much higher elastic moduli (>200 kPa) and were unexpectedly resistant to collagenase compared to other collagen-based materials (Fig. 6), making it an excellent candidate for a prosthesis that needs to retain its form to function.

Central Polymer (Optical) Core

This is the “core” of the invention, the ability to convert a regular corneal implant into a prosthesis. For example a methacrylate (MA) solution with UV initiator Irgacure 2959 (2 weight%) is added to the MPC-collagen hydrogel. Preferably the MA is allowed to
5 diffuse into the hydrogel for at least 30 seconds or more, or 1 minute or more, or 5 minutes or more, or 15 minutes or more, or 2 hours or more, or 24 hours or more . The time interval allows for conversion of an implant from a regenerative implant to a prosthesis during surgery. Generally the gels were exposed to UV-A at 360 nm for 15 mins to form an optical core.

10

Example 4: RPro with methyl methacrylate (MMA) core

Collagen-MPC hydrogels were prepared as described above. MMA (methyl methacrylate) solution with UV initiator Irgacure 2959 (2 weight%) was added at the center of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and
15 incubated it for 2 days for the diffusion of MMA into MPC-collagen gels. The gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. The resulting RRro is shown in Fig.7. Human corneal epithelial cells were seeded on the top of the scaffold and cell images were shown in Fig. 8.

20 Example 5: RPro with poly-hydroxyethyl methacrylate (pHEMA) core

Collagen-MPC prosthesis with pHEMA central core was prepared from HEMA using the procedure described in 1. HEMA (hydroxyethyl methacrylate) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and incubated it for 5-10 mins for the
25 diffusion of HEMA into MPC gels. Gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. HEMA diffuses into MPC gels and whole centre has been polymerized but on its own, a pHEMA core is transparent.

Example 6: RPro with pHEMA-Poly-ethylene glycol methacrylate (PEGMA) core

Collagen-MPC prosthesis with (pHEMA-PEGMA) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMA (Poly-ethylene glycol methacrylate) HEMA-PEGMA solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and
5 incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMA into MPC gels. Gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA + PEGMA was polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre was transparent and stable for months.

10 **Example 7: RPro with pHEMA-PEGMEM core**

Collagen-MPC prosthesis with pHEMA-PEGMEM (MEM is methyl ether methacrylate) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMEM (1:1) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC collagen hydrogel and incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMEM
15 into MPC gels. Gels are exposed to UV at 360nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA+PEGMEM was polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre is transparent (Fig. 9 and 10) and it is stable for months.

Example 8: Collagen mimetic peptide (CMP) RPro with pHEMA-PEGMEM core

20 CMP prosthesis with pHEMA-PEGMEM (MEM is methyl ether methacrylate) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMEM (1:1) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of CMP hydrogel and incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMEM into MPC gels. Gels are exposed to UV at 360nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA+PEGMEM was
25 polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre is transparent (Fig. 9 and 10) and it is stable for months.

Surface coating, printing or patterning

30 **Example 9: PEG-MA coating**

Synthetic collagen photografting to the collagen surface was performed by adding a drop of 240 mM concentration of aqueous monomer solution of HEMA:PEGMA (1:1) was applied to the sample and pressed by a freestanding quartz disc. Subsequent irradiation with UV light (11W) for 3 minutes gave a 20-25 nm PEG-hydrogel layer on the top of collagen surface (figure 11, as evidenced by atomic force microscopy analysis (AFM)).

Further modifications of the photografted PEG hydrogel could be done, for example by microcontact printing of functional methacrylate monomers. They were subsequently crosslinked with the PEG hydrogel (on-top of the original protein film) by additional irradiation with UV light. The present inventors have microcontact printed aminoethylmethacrylate (AEMA), fibronectin and streptavidine that generated an amino group-containing pattern on otherwise chemically inert PEG hydrogel surfaces. Furthermore the surface was biotinylated via coupling NHS-biotin conjugate. Finally, the resulting pattern was visualized by streptavidin-coated quantum dots (Fig. 12).

Example 10: **Microcontact printing with fibronectin “ink”**

Recombinant human collagen type III (RHCIII)-MPC hydrogel samples, 500 μm thick, were washed using 0.1 M PBS buffer pH 5.7 and dried under a nitrogen gas (N_2) stream prior to use. Free carbonyl groups on the collagen surfaces were activated using 1ml of 2.5 mM N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) and 10 mM ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) solution (PBS, pH=5,7) for 15 min. All samples were rinsed for 30 s in fresh PBS buffer (pH=5,7) and dried with N_2 just before printing.

Stamps (5 mm X 5 mm) of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) were prepared using a previously published protocol. To examine attachment and proliferation of single corneal epithelial cells, a pattern that comprised 30 μm wide lines separated by 60 μm spaces in between was used. To examine the attachment and spread of multiple cells, 200 μm wide lines, separated by 200 μm spaces were tested. For printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed in ethanol, dried in a stream of nitrogen gas and treated with oxygen plasma (intensity 20W) for 30s in plasma dry cleaner (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany). The stamps were then coated with

“ink”, in this example, comprising a 10 μL solution containing of fibronectin 0.5 mg/ml and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA-TR® in PBS buffer, pH 8.0. After 10 min. at room temperature, the stamps were rinsed in water for 20 s and dried for 1 min. under a nitrogen gas stream.

- 5 Activated RHCIII-MPC surfaces were then contact-printed for 5 min. The stamp was then removed and patterned RHCIII-MPC hydrogel surface was layered with a blocking solution containing 10 mM $(\text{PEG})_3\text{NH}_2$ in PBS buffer pH8.0 for 40 min. After incubation, the surfaces were carefully washed several times with fresh PBS buffer pH7.4 and are ready for use or stored in buffer solution until used, for example for
- 10 seeding cells. Fig. 13 shows examples of fibronectin patterned surfaces and cells.

Diafiltration of collagen

Example 11.

15 Method

- RHC III (bulk acidic solution) was diafiltrated until the conductivity of the permeate was 45 μS . Note: this was changed from our earlier method in which the end point was 40 μS .
- 20 • The diafiltrated bulk acidic solution was lyophilized in house.
- All implants were made in 0.05 MMES that was filtered thru a 0.2 μm filter.
- The EDC: primary amine ratio was 0.4 (EDC:NHS ration was 1:1).
- Starting volume was 0.4 ml.
- Total dilution was 150 μl (from the T-piece) + 24.5 μl (EDC) + 14.7 μl (NHS) =
- 25 189.2 μl resulting in a final collagen content of approximately 12.6%

Characterization	Human Cornea	15% RHCII Formulation	Prebious 13.7% RHCII Formulation
Optical properties			
Transmission	>85%	n/a	89.8 ± 9%
Backscatter	6-8%		0.81%
Refractive Index	1.3375	1.358 ± 0.0015	1.35
Thermodynamic properties			
DSC (°C)	65.1	57.82	58.6
Mechanical properties			
Tensile strenght (Mpa)	3.8	1.439 ± 0.094	1.700 ± 0.205
Modulus (Mpa)	3-13	8.82 ± 2.18	20.26 ± 2.04
% Breaking Strain	-	23.01 ± 3.47	13.89 ± 0.69
% Water content	80%	90.5 ± 3.58%	90%
TEM	n/a	n/a	n/a
In vitro Biocompatibility		Supports epithelial cell proliferation and stratification	Supports epithelial cell proliferation and stratification

Note: Water content based on drying down an intact 500 µm implant.

Table 2.Characterization.

The collagenase degradation profile for 15% RHC III as compared to 13.7% RHC III at equivalent crosslinking ratios is given below. All material was made using a permeate conductivity cut-off of 45 μS .

- 5 RHC =Recombinant Human Collagen

Example 12

Method

-Diafiltration of 2 batches of RHC III bulk acidic solution

- 10 -Batch 1: Final permeate conductivity =40 μS

-Batch 2: Final permeate conductivity =45 μS

-RHC Gels were made with EDC:primary amine ratio of 0.4 (EDC:NHS ratio was 1:1)

Results

Mechanical properties	Permeate = 40 μS	Permeate = 45 μS
Tebstile strength (MPa)	1.700 \pm 0.205	2.02 \pm 0.319
Modulus (MPa)	20.26 \pm 2.04	9.639 \pm 1.700
% Breaking Strain	13.89 \pm 0.69	32.68 \pm 1.77

Table 3. Mechanical properties

- 15 Example 13 – Hydrogel of MAC and PEG-SH

A hydrogel from the Michael addition reaction was prepared by mixing 0.5 mL of 10 wt% MAC with a 4-arm PEG thiol using a three way syringe system. The PEG thiol was dissolved in water and added to get the overall concentration of methacrylated collagen of 5%. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers of desired thickness and stored under humid conditions overnight. A stiff hydrogel was obtained. This result confirms the proof-of-concept that a stiff hydrogel can be prepared by the overnight reaction of MAC with a 4 arm

20

PEG thiol. The absence of UV light and by-products makes this hydrogel promising for corneal application. Such features make this hydrogel suitable for encapsulation and delivery of stromal stem cells in cases of HSV conditions, when the patient lacks the pool of the stem cells, thus making conventional regenerative approaches impractical.

Hydrogels

Example 14 – Methacrylation of collagen

0.5% collagen solution in 1X PBS was prepared (pH 6.5 – 6.7). The pH was raised to 10 using NaOH at -4°C. Methacrylic anhydride (10:1 molar ratio w.r.t. amine groups in collagen) was added drop wise to collagen solution in 3 batches and the solution was stirred vigorously for 4 hours. The reaction mixture was dialyzed for 4 days against distilled water at room temperature.

The results were analysed using circular dichroism and NMR.

The circular dichroism spectrum of MAC at 1% by weight concentration in Milli-Q water, at room temperature, showed maximum at 225 nm and a minimum near 200nm at pH 7.4 and pH 10 which is indicative of collagen triple helices. The triple helical propensity is higher at high pH.

HNMR spectra of MAC at 1% by weight concentration in D₂O, at room temperature showed two new peaks between 5-6 ppm, characteristic for two acrylic protons of methacrylic functionality.

The inventors found that transparency was achieved by varying the pH of methacrylated collagen (MAC) in water. MAC was transparent if the pH was either less than 5 or above 10. This is something not reported before.

Example 15 – Formation of hydrogel with MAC and acrylate monomers

The example relates to mixing of MA-collagen with acrylate monomers to form multicomponent gel

0.3mL (300 µL) of 5% MA-collagen (MAC) solution was taken in the 3 way syringe system and 300 µL of polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), hydroxyethyl methacrylate (HEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM) containing 2% (w.r.t collagen) Irgacure 2959 was added to

the syringe and mixed well. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers of desired thickness and exposed to UV 365nm wavelength for 10 to 15 min.

MAC	Acrylate monomer	Ratio (mol)
300 μ L	300 μ L	1:1

Table 4. Experimental set up.

- 5 The example relates to mixing of MA-collagen with multiple acrylate monomers to form multicomponent gel

300 μ L of 5% MA-collagen was mixed with two different acrylate monomers e.g. (HEMA+ PEGDA) with 2% (w.r.t collagen) Irgacure 2959 and mixed well. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers

10 of desired thickness and exposed to UV 365nm wavelength for 10 to 15 min.

MAC	HEMA	PEGDA	Ratio
300 μ L	150 μ L	150 μ L	1:0.5:0.5

Table 5. Experimental set up.

- The hydrogel was analysed with DSC. It showed that the hydrogel comprises at least two polymer networks with T_{g1} and T_{g2} of 44.7 and 56.3 $^{\circ}$ C, respectively. A third step is visible in the curve, but further studies are needed to confirm the
- 15 presence of a three-polymer hydrogel.

Example 16 – Preparation of CMP hydrogel

- T-piece mixing system was used to make hydrogels with CMP, which was previously described. For making the hydrogel 500mg of 12% (w/w) CMP was mixed with 300 μ l of water. Calculated volumes of NHS and then EDC were added to
- 20 the syringe mixing system. Depending on the molar equivalent ratio of EDC to amine of CMP, 3 different types of hydrogel were made; CMP-NH₂:EDC=1:0.5, CMP-NH₂:EDC=1:1 and CMP-NH₂:EDC=1:2. The molar ratio of EDC:NHS was 1:1. The stock solution concentrations of EDC and NHS were adjusted in such a way that in all different types of hydrogels, dilution factor of CMP remained same. All addition

followed by thorough mixing. Table 6 and 7 discloses some results and properties of the obtained hydrogels. Circular dichroism revealed triple helical formation.

Formulation	Tensile strength	Elongation at	Young's
CMP:EDC/NHS ratio	/max Load (kPa)	Break (%)	Modulus (mPa)
1:0.5	1.47±1.2	67.10±37.20	0.22±0.05
1:1	1.79±0.5	64.02±8.09	0.21±0.08
1:2	0.99±0.3	30.04±7.42	0.26±0.04

Table 6. Mechanical properties of CMP hydrogels.

Formulation	Initial Wt	1h	Water	24h	Water
		drying	Content (%)	drying	Content
CMP 1:1	45.9	20.6	55%	3.2	93%
CMP 1:1	39.4	16.6	58%	3	92%
CMP 1:2	49.3	23.5	52%	4.9	90%
CMP 1:2	48.3	22.2	54%	4.3	91%

Table 7. Water content of CMP hydrogels.

5 Example 17. – In vivo study of CMP hydrogel

The CMP-EDC 1:2 hydrogel was tested in vivo in a pig. Cornea shaped implants were implanted into the eyes of three pigs and regular analysis were conducted. As positive control collagen based hydrogel was used and the results from the CMP hydrogel have so far been as good as for the collagen. CMP hydrogels integrates into the host tissue and discloses epithelial regeneration after 2 weeks already. After 3 months the sensitivity of the eye was restored together with the tear formation function. After 9 months nerves were regenerated. The stability of the hydrogel is seen in figure 6.

Example 18.

Materials

All inorganic salts and basic chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO and Steinheim, Germany), Carl Roth GmbH
5 (Karlsruhe, Germany) or Merck KGaA (Darmstadt, Germany) unless otherwise stated. Research grade RHCIII, produced in yeast (*Pishia pastoris*), was purchased from 3H Biomedical (Uppsala, Sweden) and Fibrogen (San Francisco, CA). N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethane sulfonic acid Monohydrate (MES), Poly(ethylene glycol) diacrylate
10 (PEGDA, Mn =575), Ammonium persulphate (APS) and N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) were obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA). 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) was obtained from Biocompatibles (UK) and Paramount Fine Chemicals Co. Ltd. (Dalian, China).

Recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels

15 RHCIII-MPC hydrogels were produced as we previously published [15] but with a range of different starting concentrations of RHCIII to select an optimal formulation for laser profiling and μ CP. Briefly, a 450-500 mg of RHCIII solution of one of a range of starting concentrations (13.7 (w/w)%, 18 (w/w)% or 20 (w/w)%) was buffered with 150 μ l of 0.625 M MES buffer within a syringe mixing system in an
20 ice-water bath. 200 μ l MPC solution in 0.625 M MES was added into the mixing system. The MPC:RHCIII (w/w) ratios used with either 1:4, 1:2 or 1:1. PEGDA was then added by a microsyringe (PEGDA:MPC (w/w) = 1:3). Calculated volumes of 4% (w/v) APS solution in MES and 2% (v/v) TEMED solution in MES were added sequentially (APS/MPC (w/w) = 0.015:1, APS:TEMED (w/w) 1:0.77). After
25 thoroughly mixing, calculated amounts of NHS (10% (w/v) in MES) and EDC (5% (w/v) in MES) solutions were added and the reactants were thoroughly mixed at 0 °C (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.3 - 1.5:1, EDC:NHS (mol:mol) = 1:1). The final mixed solution was immediately cast into cornea-shaped moulds (12 mm diameter, 500 μ m thick) or between two glass plates with 500 μ m spacers. The hydrogels
30 were cured overnight at 100% humidity under nitrogen at room temperature. The

cornea-shaped implants were cured for an additional 5 h at 37 °C. After demoulding, they were washed thoroughly with 10 mM phosphate buffered saline (PBS) and then stored in PBS containing 1% chloroform to maintain sterility.

Characterization of hydrogels

5 All samples were tested in triplicate. The water content of RHCIII-MPC hydrogels was determined by weighing samples that were blotted dry to remove surface liquid to obtain the wet weight (W_0). These pre-weighed hydrogels were then dried at room temperature under vacuum to constant weight, which is the dry weight (W). The equilibrated water content of hydrogels ($Wt\%$) was obtained according to the
10 following equation: $Wt\% = (W_0 - W)/W_0 \times 100\%$.

Optical properties of the resulting hydrogels were characterised by obtaining the refractive indices (RIs) of 500 μm flat, fully hydrated hydrogels equilibrated in PBS using an Abbe refractometer (Model C10, VEE GEE Scientific Inc., Kirkland, Washington) at 21 °C with bromonaphthalene as the calibration agent. Light
15 transmission and back-scattering measurements were carried out at 21°C on a custom-built instrument equipped with a quartz halogen lamp for white light measurements as previously reported [24]. The percentage light transmission through the hydrogels was compared to the open beam intensity. The amount of backscattered light (%) from each sample was measured by the circular array of
20 eight built-in photodiodes, angled at 30 degrees off axis.

The mechanical properties (tensile strength, moduli and elongation at break) were determined using an Instron mechanical universal tester (Model 3342, Instron, Canton, MA) equipped with a 0.01 kN load cell and Instron Series IX/S software. Flat hydrogels (12 mm \times 5 mm rectangular strips, 0.44 mm thick) were measured.
25 The gauge length of each specimen tested was 5 mm. The crosshead speed was 10 mm min^{-1} and the sampling rate was 10 points s^{-1} . Implants were not pre-stressed. Measurements were taken at room temperature.

The morphology of the RHCIII-MPC hydrogels compared to human corneas and RHCIII hydrogels alone was examined using scanning electron microscopy (SEM). All samples were lyophilized to minimize the shrinkage of the human cornea and collagen scaffolds due to the vacuum applied during freeze-drying and SEM
5 imaging. Briefly, PBS-equilibrated samples of each construct or human eye bank corneas were frozen overnight at -80 °C and then placed in the drying chamber of a lyophilizer at a condenser temperature of -40 °C and vacuum pressure of 0.8 Torr and dried for 7 hrs. The scaffolds did not collapse through the process while there was some degree of shrinkage for all test samples, e.g. 40% for human cornea and
10 50% for the biosynthetic collagen hydrogels due to the applied vacuum. The samples were then cut using a sharp surgical knife at a vertical angle to minimize the changes in the scaffolds' structure due to the cut and attached onto metal holders using conductive double-sided tape, and sputter coated with a gold layer for 60 seconds at 0.1 bar vacuum pressure (Cressington Sputter Coater 108) prior
15 to SEM examination. SEM micrographs were taken at 25 kV at various magnifications on a scanning electron microscope (Model S-2250N, Hitachi, Japan). Comparisons were made against human eye bank corneas prepared in the same way.

Precision laser cutting of the hydrogels and tissue welding

20 Laser trephination (or cutting) of three cornea-shaped RHCIII-MPC hydrogels (12 mm in diameter and 500 µm thick) was carried out using a femtosecond laser (IntraLase™ FS Laser, Abott Medical Optics, Abbott Park, Illinois, USA). The laser was set to cut out a top-hat shaped implant from the hydrogel (one of the more common configurations for laser-assisted tissue trephination).

25 The cutting parameters used were 6.0 mm diameter of the anterior side cut, 8.0 mm diameter of the posterior side cut, and a depth of 250 µm for the lamellar cut. The energy for the ring lamellar cut, anterior side cut and posterior side cut were 2.80 µJ, 1.50 µJ and 1.50 µJ, respectively. For implant/tissue welding, matched complementary cuts were also made on excised porcine corneas (obtained from an
30 abbatoir) and RHCIII-MPC implants using the femtosecond laser (Wave Light GmbH Erlangen, Germany). RHC-MPCIII implants inserted into the matched donor cornea

bed were welded together using standard riboflavin/dextran crosslinking techniques (1% riboflavin, 365 nm, 3 mW/cm², 30 min.) [25] using a MLase UV crosslinking device (MLase AG, Germering, Germany).

Microcontact printing on hydrogels

5 RHCIII-MPC hydrogels containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1 were used for all μ CP. Flat-cast hydrogels were cut into approximately 2 cm \times 2 cm \times 500 μ m pieces and washed with 0.1 M PBS, pH 5.7 and dried under a nitrogen gas (N₂) stream prior to use. Free native carboxyl groups from the hydrogel surface were activated by immersing the
10 samples in 2 ml of the PBS (pH 5.7) solution containing 10 mM EDC and 2.5 mM NHS for 15 min. All samples were rinsed for 30 s in fresh PBS buffer and dried with N₂ gas just before printing.

Square 1.5 cm \times 1.5 cm poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (Dow Corning, Midland, MI,

USA) stamps were prepared using a previously published protocol [26]. To examine
15 the attachment and proliferation of single human corneal epithelial cells, a stamp that comprised 30 μ m-wide protruding stripes separated by 60 μ m spaces was designed. To examine the attachment and spread of multiple cells, 200 μ m-wide stripes, separated by 200 μ m spaces were tested. Prior to printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed in ethanol, dried under a stream of nitrogen gas
20 and treated with oxygen plasma (20 W power) for 30 s in plasma dry cleaner (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany). The stamps were then pre-loaded with "ink" comprising a 30 μ L solution of 0.5 mg/ml human fibronectin (FN) (Yo Proteins AB, Huddinge, Sweden) with 2 μ g/ml bovine serum albumin conjugated with fluorescent Texas Red (BSA-TR®; Invitrogen, Eugene, OR, USA) in
25 0.1 M PBS buffer, pH 8.0 for visualisation of the patterns. For cell seeding experiments, BSA-TR was omitted to avoid any unwanted nonspecific interactions between BSA-TR and cells. After 10 min. of incubation with "ink" at room temperature, the stamps were rinsed in water for 20 s and dried for 1 min. under a N₂ stream.

The activated RHCIII-MPC samples were placed in a Petri dish and then the upper surfaces were dried carefully with the N₂ gas in preparation for μ CP. The bottom corners of the hydrogel samples were left in contact with water to prevent complete dehydration and therefore undesired deformation of the hydrogels. Surfaces then
5 were printed by applying the PDMS stamp onto the hydrogel surface. All printing was performed manually without any load, using the nitrogen stream to get the stamp into contact with the hydrogel surface. The stamp was left on for five minutes and then removed using tweezers. The patterned hydrogel surface was incubated with a solution containing 10 mM (PEG)3NH₂ (Molecular Biosciences,
10 Boulder, CO, USA), in PBS, pH 8.0 for 40 min. to de-activate all remaining unreacted carboxyl groups. The surfaces were then carefully washed several times with fresh PBS, pH 7.3 and stored in this buffer solution prior to further use.

Characterization of printed hydrogels

To characterise the reproducibility of the μ CP patterns, the optically transparent
15 patterned hydrogels were imaged using an Olympus BX51 upright microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 10x, NA 0.3 water immersion objective and a Peltier-cooled Fview II CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Fluorescence images of fibronectin- BSA-TR[®] patterns were acquired and analysed using analySIS software (Olympus Soft Imaging Solutions
20 GmbH, Münster, Germany).

The presence of FN in the micropatterns was confirmed by using a primary rabbit polyclonal antibody against FN (Abcam, Cambridge, UK), followed by a secondary antibody, donkey antirabbit IgG, conjugated with quantum dots Qdot655 (H+L) (Life Technologies, USA). To investigate the effect of μ CP on the micro- and nano-
25 topography of fully hydrated RHCIII-MPC constructs, atomic force microscopy (AFM) measurements were carried out with the samples fully immersed in 0.1 M PBS buffer, pH 7.3 using a NanoWizard[®] 3 AFM microscope (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) mounted onto an Olympus IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) inverted optical microscope to allow for combined optical and AFM imaging of the
30 same surface. Sample topography images were obtained in contact mode using SNL-10 (Bruker, Billerica, MA, USA) probes. Regions of interest for AFM analysis

were selected with fluorescence microscopy to include the printed and unprinted zones of the surface within one large area (70 x 70 μm^2) scan. Several different size scans were made. Images obtained were processed and the surface roughness was calculated using the region analysis tool within the AFM JPK data processing software.

Cytotoxicity evaluation

All samples with 30 μm and 200 μm patterned stripes, and control samples comprising deactivated and unmodified hydrogels, were placed into 24-well plates. Immortalized human corneal epithelial cells (HCECs) from a cell line [27] were seeded onto the surface of the materials at a density of 2×10^4 cells per well. The HCECs were maintained in Keratinocyte Serum-Free Medium (KSFM; Life Technologies, Invitrogen, Paisley, UK) containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine pituitary extract and 5 ng/ml epidermal growth factor for 48 hours in a humidified 37 $^{\circ}\text{C}$ incubator. Cell viability was measured by using a Live/Dead staining kit (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, UK), where cells were double-stained by calceinacetoxymethyl (Calcein AM) and ethidium homodimer-1 (EthD-1). The live cells displayed green fluorescence while the dead cells fluoresced red.

Cell attachment and proliferation

Green fluorescence protein (GFP) transfected HCECs were employed to facilitate cell counts. A stable GFP-HCEC cell line was established by transfection of HCEC with a vector containing a puromycin resistant gene together with GFP, using the Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Life Technologies, California, USA). Selection of puromycin resistant cells with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin added to the medium was performed to obtain stable GFP-lines. To examine proliferation rates on the different surfaces, 6 mm hydrogel discs with 30 μm and 200 μm FN striped patterns, and PEG-NH₂ deactivated and unmodified samples, were placed within 96 well plates to fit snugly. Five thousand GFP-HCECs were seeded into each well. GFPHCECs were also seeded onto the tissue culture plate as a control for overall cell health. The cells were maintained in KSFM within a humidified 37 $^{\circ}\text{C}$ incubator with 5 % CO₂. Photomicrographs of the cells were taken at 2, 6, 24, 48

and 96 hours, using a fluorescence microscope (AxioVert A1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Counts were made by sampling three different 1290 x 965 μm^2 areas on each hydrogel surface.

Immunohistochemistry

5 GFP-HCECs were cultured on hydrogels for 4 days until when the cells reached confluence/near confluence on the patterns. Each sample was washed in 10 mM PBS, pH 7.4 and then fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS for 20 min. For permeabilization and blocking of unspecific binding, samples were incubated in PBS containing 0.25 % Triton X-100 for 10 min. and 5 % foetal calf serum (FCS) in
10 PBST (0.05 % Tween-20 in PBS) (FCS/PBST) for 1 hour, respectively. Samples were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies diluted in FCS/PBST: anti-proliferating cell protein Ki67 antibody (1:600) (Sigma-Aldrich, MO, USA), anti-focal adhesion kinase (FAK) antibody (1:500) (Abcam, Cambridge, UK) and antiintegrin beta 1 (integrin $\beta 1$) antibody (1:200) (Abcam). After rinsing,
15 the samples were exposed to the secondary antibody, Alexa Fluor-594 (1:400) (Invitrogen, Oregon, USA) at room temperature for 1 hour in the dark for visualisation. After another rinse, the samples were incubated with 4',6- diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (PromoKine, Heidelberg, Germany) for 1 min. as nuclear counterstain. All samples were given a final rinse prior to mounting and
20 examination under a confocal microscope (LSM700, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). A total area of 50000 μm^2 per sample was used for all the counts.

Results

RHCIII-MPC hydrogels

A range of adjustments in hydrogel formulations were tested for producing a
25 mechanically reinforced material suitable for post-fabrication of the implants. These included a starting RHCIII content of 13.7%, 18% and 20%; different RHC:MPC ratios and EDC:RHCIII-NH₂ ratios. The resulting optical and mechanical properties of the hydrogels are given in Appendix A. The resulting enhancement in

properties of RHCIII-MPC hydrogels after optimization of the above parameters as compared to previously published formulation. In both 13.7% and 18% RHCIII-MPC hydrogels, we found that a 2:1, RHCIII:MPC ratio with 0.4 EDC:RHCIII-NH₂ gave the optimal formulations.

- 5 Increasing of the collagen content from 13.7% to 18% decreased the water content from 90.1±2.4% to approximately 86% (85.5±0.2% for RHCIII-MPC and 86.0±0.2% for RHCIII only). Hence, it turned out that the MPC content did not make much of a difference. Additionally, the EDC:RHCIII-NH₂ ratio showed no obvious influence on the RI, while the RI increased with increasing MPC content within the gels.
- 10 The measured transmittance of white light decreased with the increased RHCIII concentration. Compared to the native cornea (transmittance: ~87%, backscatter: ~3%), however, all the RHCIII-MPC gels showed a higher transmittance and lower backscatter. The RHCIII only gels, on the other hand, exhibited a transmittance comparable to the native cornea (approx. 87%). All the cornea substitutes displayed
- 15 a slightly lower RI of 1.35, which is that of water, compared to native cornea (1.37~1.38 [28]). In general, increasing the solids content of the hydrogels from 13.7% to 18% increased the tensile strength of RHCIII-MPC hydrogels from 1.29±0.31 MPa to 2.12±0.18 MPa. The tensile strengths of the 18% RHCIII only hydrogels were comparable to the 18% RHCIII-MPC hydrogels at 2.37±0.4 MPa.
- 20 However, RHCIII only hydrogels were stiffer (an elastic modulus of 15.33±2.67 MPa) and less elastic (elongation at break of 28.21±2.01%) than corresponding RHCIII-MPC hydrogels (lower elastic modulus of 9.46±3.58 MPa; higher elongation at break of 33.34±3.87%). The 18% RHCIII-MPC hydrogels were more thermodynamically stable (T_d = 57.6 °C) than both the 18% RHCIII only (T_d = 53.1 °C) or 13.7%
- 25 RHCIII-MPC hydrogels (T_d = 54.1 °C).

However, none were as stable as the native corneas (T_d = 65.1 °C). SEM imaging of cross-section of samples was performed for structural comparison of the produced RHCIII-MPC and RHCIII only hydrogels with native human corneas. A distinct lamellar structure could be seen for both human and biosynthetic corneas. The

30 lamellar structure was observed throughout the entire cross-section of all samples while it was more homogeneous for the human cornea and better representative of

the whole structure than that of the biosynthetic ones. In addition, the RHCIII-MPC hydrogels comprised lamellae-like layers interconnected by some tiny fiber-like structures, that better mimics the structure of the human cornea than the RHCIII crosslinked by EDC/NHS which had large lamellae without any inter-lamellar connections. However, the inner morphology of the biosynthetic corneas differed from their native counterpart in the number of lamella layers and the spacing between layers. For example, the lamella-like layers in the biosynthetic corneas were thicker and their number was lower compared to lamellas of the native cornea. In addition, the spacing between the ordered lattice structures of the native cornea was smaller (~ 15 microns) than that of the biosynthetic corneas (~ 150 microns). The lamella spacing for the human cornea had a wide size distribution ranging from 2 to 40 microns. Overall, despite some similarities between the biosynthetic corneas and their natural counterparts, the human cornea has a much more complex microstructure with higher degree of interconnectivity, as expected.

Precision laser profiling and tissue welding

The optimized hydrogels were sufficiently robust to allow complete cutting of “top-hat” implants using the femtosecond laser. The resulting mean dimensions of the cuts were: anterior diameter of the 5.9 mm, posterior diameter of 8.1 mm, and depth of 260 μm for the lamellar cut. For example, RHCIII-MPC hydrogels containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4 : 1 (designated RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4), which had shown good mechanical properties, cut well with the laser. Top-hat shaped gels with precisely cut edges could be obtained. However, hydrogels with the lower 13.7% RHCIII content (but otherwise with same proportions of MPC and EDC crosslinker), fell apart during cutting.

Laser cut implants were successfully fitted into matched laser cut surgical beds. After riboflavin/UV-crosslinking, the implants remained permanently adhered to the corneal bed and sub-microscopical physical fibre-like connections were present between the implant and adjacent cornea when viewed by SEM. In contrast, implants detached completely in controls without UV radiation.

Overall quality of the microcontact printed patterns

The most stable RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4 hydrogels which lent themselves well to laser profiling were also optimal for μ CP. The results show typical resulting striped FN patterns as visualized by staining with an anti-fibronectin antibody. Analysis of the fluorescence micrographs of the hydrogel samples confirmed good replication of the original patterns of the 30 and 200 μ m stripes defined in the photolithographic mask production step. On the PDMS stamp, the width of the narrow stripes was $26.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (based on brightfield microscopy), while that of the printed FN stripes was $27.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$. The thick stripes on the PDMS stamps and the resulting FN patterns had widths of 190.6 ± 1.7 and $191.7 \pm 2.6 \mu\text{m}$, respectively. The good reproducibility indicated that uncontrolled FN ink diffusion on partially dried collagen hydrogel samples was minimal. On the samples printed with 30 μ m stripe pattern, the printed area occupied approx. 37 % of the sample area, and approx. 32 % of the total hydrogel surface was patterned and defect-free. On the 200 μ m striped samples, the printed sample area occupied 40 % of the sample and approximately 26 % of the total hydrogel surface was printed and free from printing defects. Also, FN ink distribution on the entire patterned surface was satisfactorily homogeneous.

Atomic force microscopy

The effect of μ CP on the micro- and nanotopography of fully hydrated RHCIII-MPC hydrogels was determined by AFM analysis. The original, unmodified collagen hydrogel surfaces appeared uneven, with irregularly arranged surface fibrils visible. The root mean square (RMS) of surface roughness as measured within a representative $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ scan area was 3.5 nm.

The regions of interest (ROIs) for AFM scans on the chemically activated and microcontact printed samples were identified by simultaneous fluorescence microscopy imaging. The AFM tip was positioned in the ROIs that were patterned with FN and BSA-TR® mixture. In topography images of the hydrogel surface after μ CP and/or deactivation, the collagen fibrils appeared to be partially aligned, in contrast to the unmodified surface. However, the fine details of the collagen fibrils

could not be resolved. There was no distinct overall height difference between the majority of the printed and adjacent unprinted area, either due to the high initial surface roughness and/or due to the ability to print a very thin, possibly monolayer thickness of FN. The edges of the stripes, however, were slightly corrugated by the printing and served to delineate the stripe boundaries. The RMS surface roughness of the FN-printed and unprinted regions on this particular sample, was very similar, at 1.3 nm and 1.4 nm, respectively. The AFM analysis therefore showed that the μ CP resulted only in a very small change in the surface topology.

Effect of patterning on cytotoxicity, cell adhesion and proliferation

Printing with PDMS stamps can result in a slight contamination of the sample surface with loose PDMS particles, but these can be removed by subsequent sample deactivation and washing steps. Live/dead staining performed indeed showed that there were no cytotoxic effects from the patterning. The numbers of dead cells (stained red) were negligible: 0 in most of the samples, 1-2 cells in a few others.

Analysis of the proliferation of HCECs on the different surfaces over time showed obvious differences between the patterned and non-patterned samples. The only two types where the growth rate could not be told apart ($P > 0.05$) were the unmodified and deactivated RHCIII-MPC surfaces. The total number of cells counted per a defined ROI was highest on the hydrogels patterned with 200 μ m stripes. However, when taking into account that the total FN-coated surface area per ROI was two times less on the 30 μ m pattern than on the 200 μ m pattern, the results show that the thinner stripes yielded approx. 26% more cells after normalization of the surface areas.

Immunohistochemistry and cell behaviour

The results show the behaviour of cells on the different surfaces. The integrin β 1 family, which is involved binding ECM macromolecules including collagen and fibronectin, was expressed by HCECs growing on all groups. The proportion of

integrin $\beta 1$ -expressing cells in the deactivated surfaces, 30 and 200 μm patterns, respectively, were significantly different from those growing on the unmodified RHCIII-MPC hydrogel surfaces, with the highest expression on the 30 μm stripes, although not that significantly different from the 200 μm stripes and deactivated surfaces ($P > 0.05$). Immunohistochemical localization of FAK-positive cells showed that significantly more cells were growing on the 30 μm striped patterns that were positively stained ($P \leq 0.05$) than those of the other groups. Staining for the Ki67 protein associated with cell proliferation showed that the samples with 30 μm striped patterns supported a significantly larger proportion ($P \leq 0.05$) of positively stained cells than the other groups.

CLAIMS

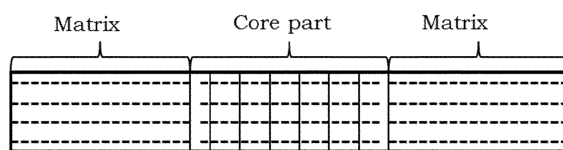
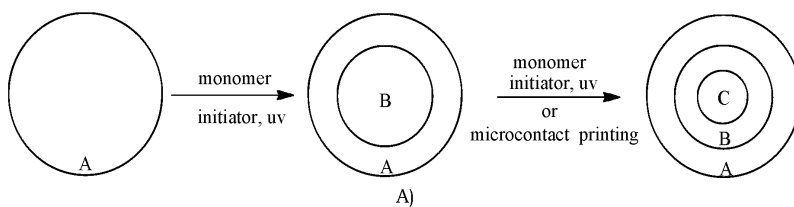
1. A corneal implant having a first and a second opposed surface and wherein the implant comprises a matrix part and a core part;
- 5 wherein the matrix part contains a matrix material comprising a hydrogel of cross-linked collagen and/or collagen mimetic peptides (CMP);
- wherein the core part is arranged essentially in a central part of the matrix material and wherein the core part comprises a core material of an interpenetrating network (IPN) comprising polymerized olefinic or UV polymerizable monomers or a mixture
- 10 thereof and the hydrogel of the matrix material;
- wherein the core material is at least partly exposed at the first and the second surface; and
- wherein the core part is transparent (i.e. a light transmission of at least 80% of light in the range of 400-700 nm) and anti fouling.
- 15 2. The implant according to claim 1 wherein the core material comprises 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-polyethylene glycol-diacrylate (MPC-co-PEGDA).
3. The implant according to any one of claims 1 or 2 wherein the polymerized olefinic or UV polymerizable monomers is selected from poly methyl methacrylate
- 20 (PMMA), poly-hydroxyethyl methacrylate (pHEMA), pHEMA-poly ethylene glycol methacrylate or pHEMA-PEGMEM.
4. The implant according to any one of claims 1 or 2 wherein the surface of the matrix material and/or the core material is modified and/or patterned with PEG-MA.
- 25 5. The implant according to any one of claims 1 or 2 wherein the surface of the matrix material and/or the core material is modified and/or patterned with N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), polypeptides such as YIGSR, IKVAV, RGD, ECM proteins, fibrinectine derived peptides, combinations of synergistic peptides, DGEA peptide from collagen, antibodies, glycosaminoglucans, motifs from growth factors,
- 30 or pharmaceutically active substances.

6. The implant according to claim 2 wherein the polyethylene glycol has at least 3 arms, preferably at least 4 arms.
7. The implant according to any one of the preceding claims wherein the weight ratio of core material is 1 wt% or more, or 5 wt% or more, or 15 wt% or more, or 30 wt% or more, or 50 wt% or more, or 95 wt% or less, or 85 wt% or less, or 75 wt% or less, or 65 wt% or less, or 55 wt% or less, of the total weight of the product.
8. The implant according to any one of the preceding claims wherein the matrix material is cross-linked with a di-epoxide.
9. The implant according to any one of the preceding claims wherein matrix material comprises CMP on a PEG wherein the PEG has 2, 4 or 6 arms.
10. The implant according to claim 1 wherein matrix material comprises CMP on a PEG wherein the PEG has 2, 4 or 6 arms and wherein the core material comprises MPC-co-PEGDA.
11. The implant according to any of the preceding claims wherein the matrix material comprises cellulose, carboxymethyl cellulose or silk.
12. The implant according to any of the preceding claims wherein the collagen or CMP are present in the form of fibrils and wherein the fibrils are essentially uniaxial orientated.
13. A method of making the product according to any one of claims 1 to 12 wherein the method comprises:
- providing a matrix polymer and a cross-linker in a suitable solvent;
 - cross-linking the matrix polymer to form the matrix material;
 - providing core olefinic monomers or UV polymerizable monomers or polypeptides or a mixtures thereof, and an initiator, optionally in a suitable solvent;
 - adding the core olefinic monomers or UV polymerizable monomers or polypeptides or a mixtures thereof, and the initiator to the surface or the bulk of the matrix material; and
 - letting the core olefinic monomers polymerize for a suitable period of time.

14. The method according to claim 13 wherein the olefinic based material is left to diffuse after addition in at least 15 minutes.

15. The method according to any one of claims 13 or 14 wherein the curing is
5 obtained during UV radiation using a mask.

FIGURES



B)

Figure 1.

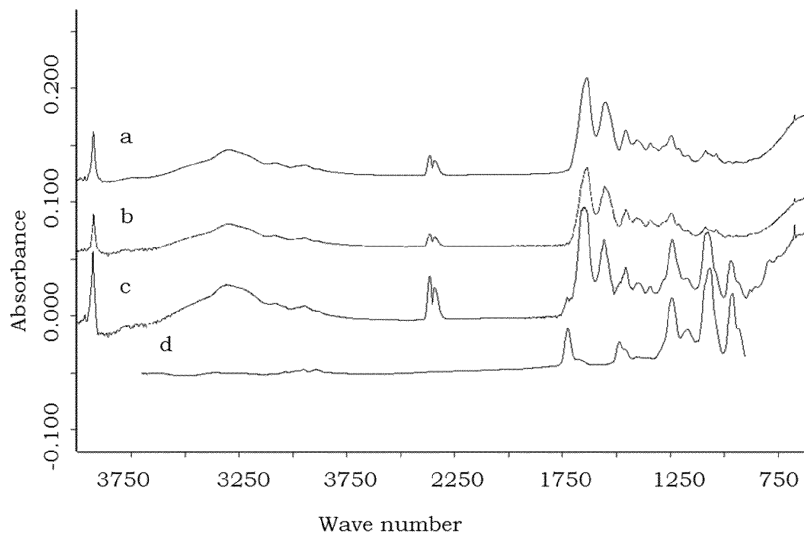


Figure 2.

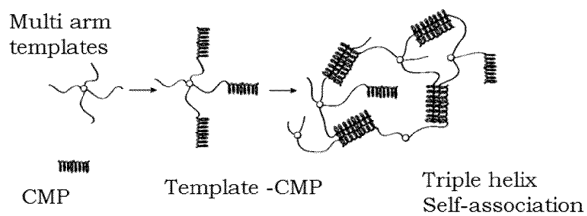


Figure 3.

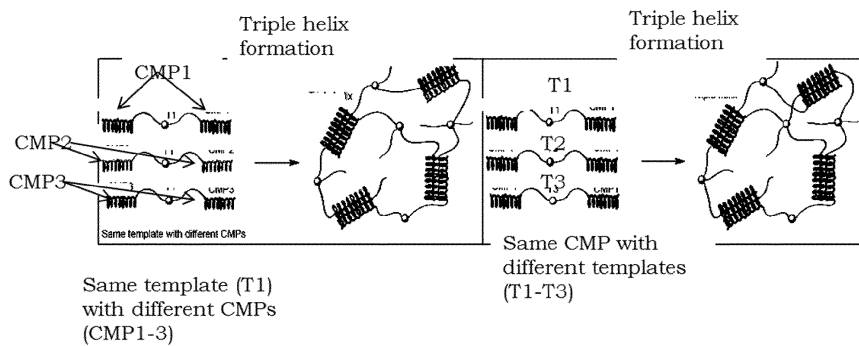


Figure 4

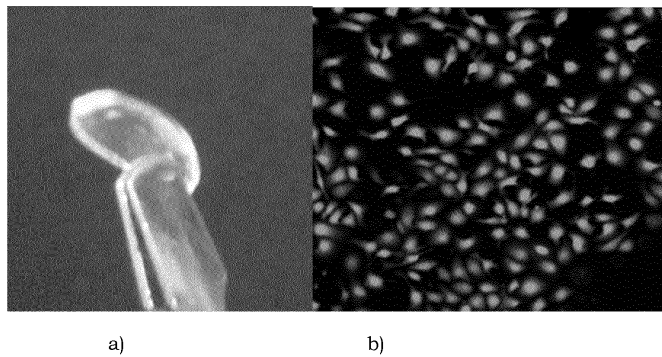


Figure 5

4/8

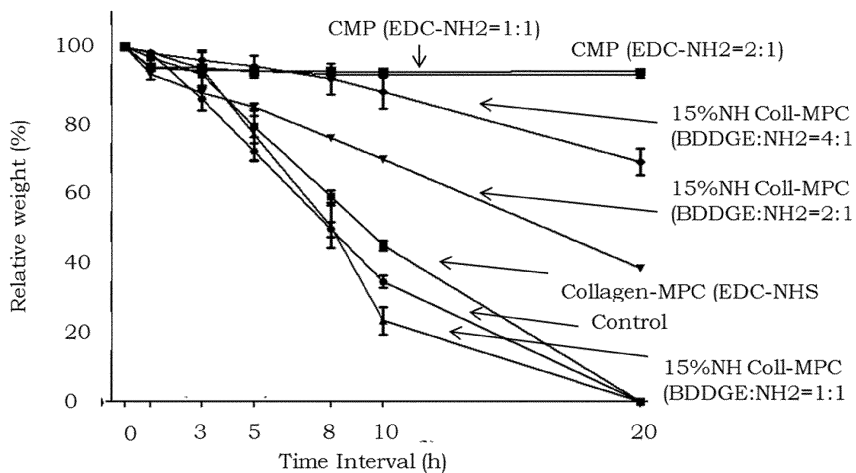


Figure 6.

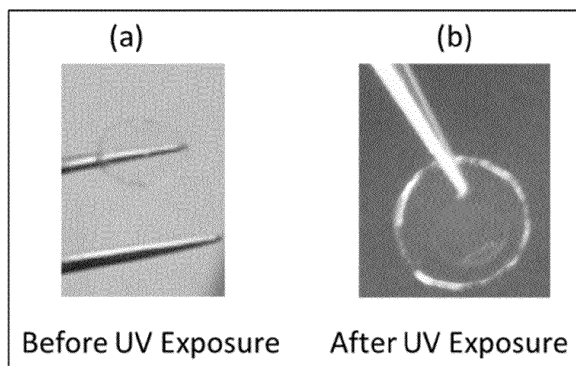


Figure 7.

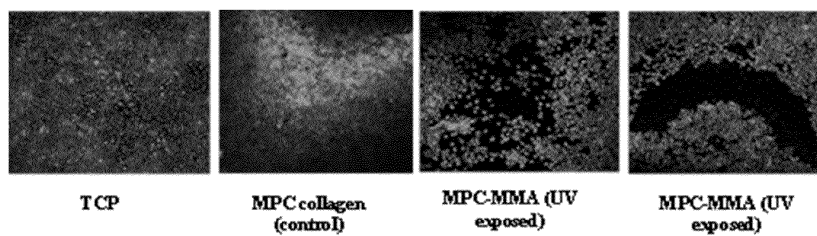


Figure 8.

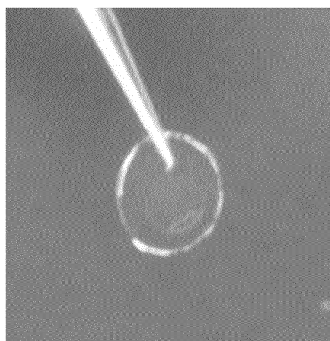


Figure 9.

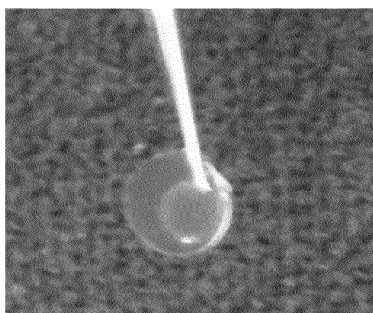


Figure 10.

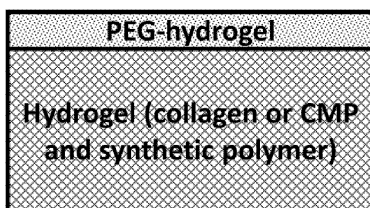


Figure 11.

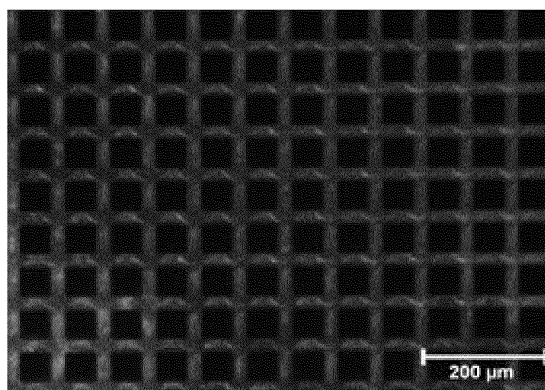


Figure 12.

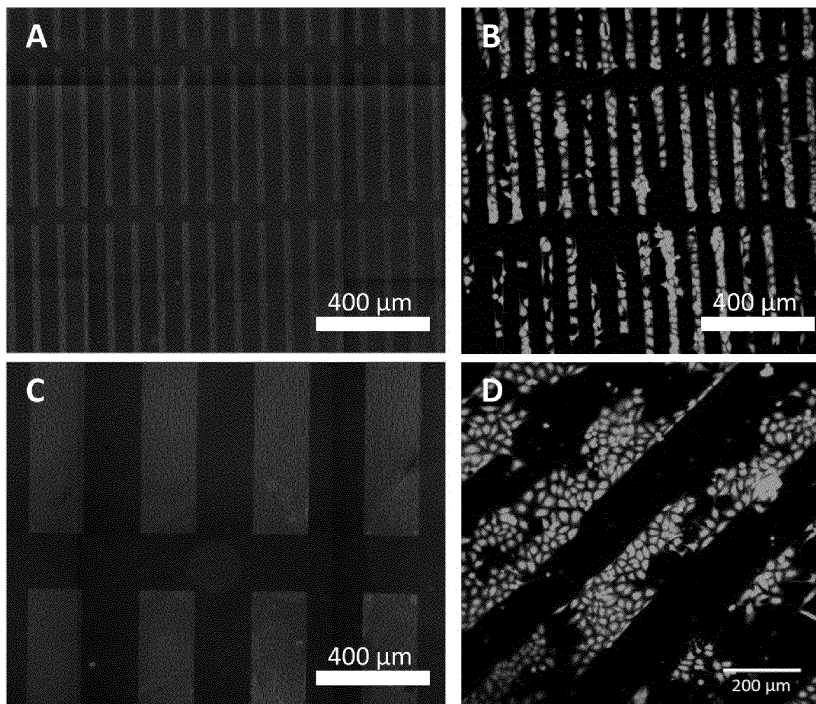
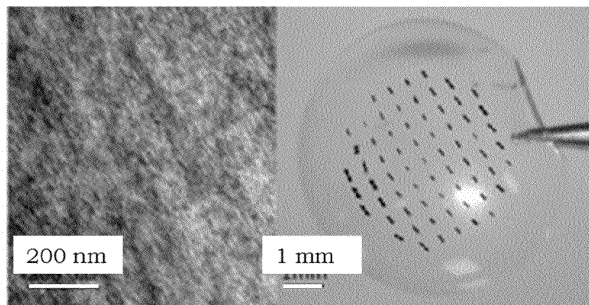
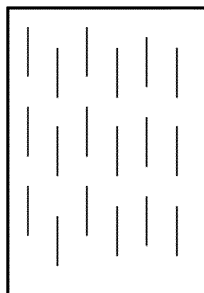


Figure 13.

8/8



A)



B)

Figure 14.

Paper 3

M. Griffith, J. Phophase, R. Ravichandran, Ž. Ruželė,

V. Cěpla, R. Valiokas, M. M. Islam, T. Rakickas,

Surface modifications of collagen hydrogels, patent application,

Publication number WO2015/055661;

2015 m. balandžio 23 d.



(51) International Patent Classification:

A61L 27/26 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01)
C08F 283/06 (2006.01) A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2014/072032

(22) International Filing Date:

14 October 2014 (14.10.2014)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

1351214-0 14 October 2013 (14.10.2013) SE

(71) Applicant: UAB FERENTIS [LT/LT]; Savanoriu 231, 02300 Vilnius (LT).

(72) Inventors: GRIFFITH, May; Lambohov, Fyrkantens, S-585 98 Linköping (SE). PHOPASE, Jaywant; Rydsvägen 118 B, S-584 31 Linköping (SE). RAVICHANDRAN, Ranjithkumar; c/o Madhanagopal, Rydsvägen 90A, S-58431 Linköping (SE). RUZELE, Zivile; Taikos 4-9, Kreivalauziai, 15166 Nemencine (LT). CEPLA, Vytautas; Literatu 4-2, 01125 Vilnius (LT). VALIOKAS, Ramunas; Bukles 2, 21103 Trakai (LT). MIRAZUL ISLAM, Mohammad; Luftvärmsgatan 34, Lgh nr 1101, S-587 34 Linköping (SE). RAKICKAS, Tomas; Antakalnio 104-12, 10201 Vilnius (LT).

(74) Agent: BRANN AB; Box 12246, S-102 26 Stockholm (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SURFACE MODIFICATION OF COLLAGEN HYDROGELS

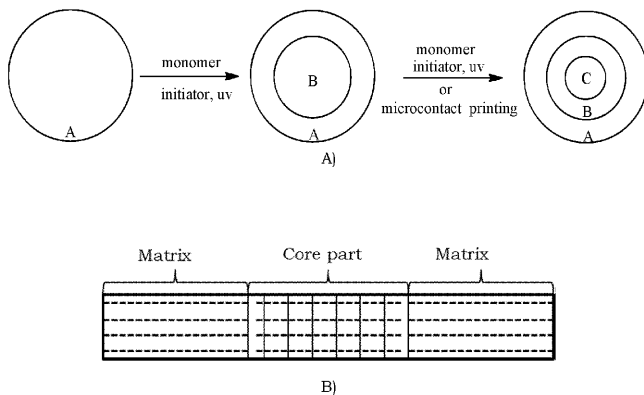


Figure 1.

(57) Abstract: The present invention relates to method of surface modifying a hydrogel using microcontact printing or photolithography or inkjetand hydrogels obtained by said method.



WO 2015/055661 A1

SURFACE MODIFICATION OF COLLAGEN HYDROGELS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to surface modifications of collagen hydrogels comprising an interpenetrating network of collagen or collagen mimetic peptide and a synthetic polymer, and a material that is otherwise used in implant and prosthesis applications and is known as promoting regeneration of tissues.

BACKGROUND

Surface modifications of various kinds have been used for a long time in order to control cell attachment or cell proliferation.

Microcontact printing (or μ CP) is a form of soft lithography that uses the relief patterns on a master polydimethylsiloxane (PDMS) stamp to form on the surface of a substrate patterns of different inks through conformal contact. The latter typically consists of bifunctional compounds, proteins, peptides. Other direct patterning methods are nanotransfer printing (nTP), dip-pen nanolithography, as well as inkjet printing, direct laser writing of photoreactive species, etc. Applications of these methods are wide ranging including microelectronics, surface chemistry and cell biology.

Microlithography and nanolithography refer specifically to lithographic patterning methods capable of structuring material on a fine scale. Typically, features smaller than 10 micrometers are considered microlithographic, and features smaller than 100 nanometers are considered nanolithographic. Photolithography is one of these methods, regularly applied to semiconductor manufacturing of microchips.

Photolithography is also commonly used for fabricating Microelectromechanical systems (MEMS) devices. Photolithography generally uses a pre-fabricated photomask or reticle as a master from which the final pattern is derived.

Even though these techniques are well known and have been used for a long time they have their limits. For example these techniques are difficult to apply to hydrogels that contain a high content of water, possess ill-defined surface, are UV light and mechanical pressure sensitive. Production of high quality patterns and topographical features becomes an unreliable task, especially on industrial scale.

SUMMARY OF THE INVENTION

The aim of the present invention is to present a method of surface modifying, for example post-modification, of a collagen hydrogel surface in order to enhance and/or control cell response and tissue formation.

In a first aspect the present invention relates to a method of modifying a hydrogel comprising:

- a) providing a hydrogel surface wherein the hydrogel comprises a cross-linked polymer network comprising
at least one first polymer and at least one second polymer wherein the first polymer comprises collagen and/or collagen mimetic peptide (CMP) comprising methacrylate and/or acrylate functional groups and the second polymer comprises a synthetic polymer having at least two functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate;
wherein the first and the second polymers are cross-linked via said functional groups; and
wherein the hydrogel is transparent (i.e. a light transmission of at least 80% of light in the wavelength range of 400-700 nm);
- b) applying surface compounds selected from polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers, PEG-methacrylate polymer/monomers, other acrylate, methacrylate, carboxyl, amino, amide, epoxide, hydroxyl, cyano, nitride, sulfanamido, acetylenyl, alkene, esters like imidoesters(N-hydroxysuccinimide ester) or pentafluorophenol ester or other, azide, thiol, maleimide, functionalized PEG derivatives, bifunctional compounds, drugs, bioactive substances, biological molecules including proteins or peptides to said surface; and
- c) treating the applied surface compounds by microcontact printing or photolithography or inkjet, or any other fabrication technique in order to create a pattern of said surface compounds.

In a second aspect the present invention relates to a hydrogel obtained by the method according to the present invention.

In a third aspect the present invention relates to a hydrogel comprising a cross-linked polymer network comprising

- 5 at least one first polymer and at least one second polymer wherein the first polymer comprises collagen and/or collagen mimetic peptide (CMP) comprising methacrylate and/or acrylate functional groups and the second polymer comprises a synthetic polymer having at least two functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate;

- 10 wherein the first and the second polymers are cross-linked via said functional groups;

wherein the hydrogel is transparent (i.e. a light transmission of at least 80% of light in the wavelength range of 400-700 nm); and

- 15 wherein the collagen or CMP are present in the form of fibrils and wherein the fibrils are essentially uniaxial orientated.

In a fourth aspect the present invention relates to a method of forming a hydrogel with a polyethylene glycol-methacrylate (PEGMA) coating by UV-grafting the PEGMA onto the collagen or other protein-containing hydrogel.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

- Figure 1. A) A schematic view of the product. A=Matrix material: Natural/synthetic bio-interactive hydrogel, B=central polymer core with anti-cell/vessel in-growth/anti-fouling properties, homogeneously embedded into hydrogel A, C= natural /synthetic polymer layer/ pattern adhered or covalently bound on the surface of B. B) A
25 schematic cross sectional view of the implant according to the present invention with a matrix and a core part wherein the core part comprises a core material comprising polymerizable monomers or a mixture thereof and the hydrogel of the matrix material.

- 30 Figure 2. FTIR spectra showing: a) collagen-EDC/NHS only; b) collagen-MPC formulation without any MPC peaks, c) LiU collagen-MPC showing MPC peaks. The

main MPC identification peak is the ester carbonyl peak at 1722 cm⁻¹ together with the peaks at 1065 and 961 cm⁻¹, from the phosphate group; d) MPC only.

Figure 3. Schematic showing the fabrication of hydrogels comprising an ECM mimetic peptide, in this case, a triple helical collagen mimetic peptide (CMP) and a
5 polymer template, e.g. 4 armed PEG.

Figure 4. Schematic for self assembling *via* hetero-dimerization.

Figure 5. (a) collagen-MPC hydrogel; (b) collagen-MPC hydrogel with central poly methyl methacrylate core serving as an optic.

Figure 6. Corneal epithelial cell culture on the MPC-MMA surface (images taken after
10 3 days of culture).

Figure 7. A) To the left, transmission electron micrograph of an RHCIII-MPC hydrogel examined following high pressure freezing. The image shows a predominantly uniaxial orientation of very fine collagen filaments. Right: The direction of preferentially aligned collagen from the same specimen, as determined
15 by x-ray scattering, has been superimposed onto an image of the hydrogel. The data confirms that a predominantly uniaxial alignment of collagen exists throughout the hydrogel. B) Schematic figure of a hydrogel surface according to the present invention with aligned collagen fibrils.

Figure 8. Schematic structure of the obtained synthetic PEG hydrogel on top of a
20 hydrogel according to the present invention.

Figure 9. Fluorescence micrograph showing visualization of a biotin-terminated pattern on the hydrogel surface.

Figure 10. a) Human fibronectin (traces of BSA-TR®) patterns on MPC collagen hydrogel: the line width 30 μm, space in-between 60 μm. b) Corneal epithelium cells on 30 μm-wide line patterns on MPC collagen hydrogel. c) Human fibronectin (trace of BSA-TR®) patterns on MPC collagen, the line width 200 μm, spacing 200 μm. d)
25 Corneal epithelium cells on 200 μm line patterns on MPC collagen.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In the present invention the term “hydrogel” means a gel of hydrophilic natural or synthetic polymers where the dispersion media is water.

In the present invention the term “arm” means a side chain connected to a main or
5 common polymeric back bone. For example a two arm polymer has two chains
connected at one common point. A star polymer or a star co-polymer is a polymer
where several polymeric chains are connected at one common point.

In the present application the term “transparent” means a light transmission of at
least 80% of light in a wavelength range of 400-700 nm measured by using any
10 suitably technique for example a UV spectrophotometer, and using pure PBS for
background reading.

In the present invention the term “pattern” encompasses physical, chemical, or
topographic, 2D or 3D, pattern.

The present invention relates to a method of surface modifying a hydrogel wherein the
15 hydrogel has mechanical properties that allows such modifications. The hydrogel is
preferably based on an interpenetrating network of at least one first polymer and at
least one second polymer. The first polymer comprises collagen or collagen mimetic
peptide (CMP) having methacrylate and/or acrylate functional groups, and the
second polymer comprises a synthetic polymer having at least two functional groups
20 selected from thiol, acrylate and/or methacrylate. The first and the second polymers
are cross-linked via the functional groups. In order for the hydrogels to be surface
modified according to the present invention it is preferable if the hydrogel has an
elastic modulus of at least 1 MPa or at least 5 MPa. The hydrogel according to the
present invention contains at least 80wt% water, or at least 85wt% water, or at least
25 90wt% water, for example 85-90wt% water.

The hydrogel combined with surface modification/patterning enhances for example
tissue regenerative properties of the hydrogel but may also be used for construction
of tissue on a chip models. To the knowledge of the present inventors there is no
prior disclosure of for example fibronectin patterns of relatively narrow
30 stripes/lines, said stripes may further stimulate epithelial cell proliferation on a
material that supports tissue regeneration.

The surface modified hydrogel according to the present invention may be used as an implant, for example a cornea implant. The cornea comprises a largely collagenous extracellular matrix (ECM) interspersed with stromal cells, and sandwiched by epithelial and endothelial cell layers. Natural ECM polymers like collagen are generally mechanically weak, unstable and difficult to process, while some synthetic polymers are strong with controlled stability and easily moldable. On the other hand, hydrogels comprising two or more components (natural and/or synthetic polymers) are generally reliable materials for biomedical applications, due to the superior properties of the final product compared to the properties of each individual component. By generating a hydrogel based on interpenetrating networks (IPNs), biointeractive properties of natural ECM may be maintained together with the robustness and higher enzymatic stability of the synthetic polymer.

To use contact printing, photolithography on hydrogels is known. However, prior art discloses difficulties to produce well defined patterns and the methods are usually not suitable for large scale production. The present inventors have shown that even aqueous material may be used for contact printing or photolithography for example to prepare a surface pattern on the material. Prior art have shown that when photolithography on gels in the dry collapse state the pattern may be distorted/damaged when the gels are rehydrated in buffer. On the other hand, to perform photolithography in water is expensive and technically difficult, not compatible with most of the production facilities. Instead of such complicated processes, by using a material that withstands contact printing or photolithography the present invention makes it possible to prepare hydrogels containing 2D patterns/3D patterns in a large scale production.

One of the major issues when using transplantation as a treatment is the potential risk of rejection due to inflammation caused by immune response or infection. The normal cornea is avascular and corneal neovascularization induced by inflammation, disease or sutures often result in opacification and rejection of transplanted cornea. Furthermore, in cases where patients lack viable progenitor or stem cells, and stem cell transplantation is not available or an option, there is a need for an alternative treatment. Therefore, the aim of the present invention is to prepare a hydrogel, or an implant, comprising a transparent central core part comprising anti-fouling polymer/polymers which hinder cell migration and vessel ingrowth. The transparent, core part can be superimposed onto the matrix material by adding a second

component, core monomers optionally together with an initiator, to the matrix material and polymerize it, preferably by UV exposure. The cross-linking may be performed prior to implantation, during the transplantation, during the insertion of the implant, or after implantation. The core part is designed to hinder cells to migrate
5 over or into the said part (e.g. by excluding blood vessels, in growing stromal cells) in order to remain cell-free to allow unhindered transmission of light for vision. In certain cases, e.g. where corneal stem cells are complete depleted and transplantation is not possible, the core part may be modified in order to block migration of non-corneal cells or abnormal cells over the core material to allow unhindered
10 transmission of light.

The product, or implant, of the present invention comprises a matrix material and a core part, and optionally a coating or an imprint or a pattern on the surface of the matrix and/or core part. The matrix material may be an immune compatible biomaterial that is designed to stimulate cell adherence or regeneration, and maybe
15 also repair of damaged tissue, of the human cornea by engaging the patient's own stem or progenitor cells to affect the regeneration. This matrix material can be used alone, where stem or progenitor cells are available to migrate over or into the implant and affect the repair and regeneration.

Figure 1 discloses a schematic view from above of the present invention where the
20 implant comprises a matrix material (A) of a hydrogel, a central polymer core with antifouling properties (B), preferably homogeneously arranged in the matrix material A. A natural and/or synthetic polymer layer or coating (C) may further be adhered to or covalently bound to the surface of B. The matrix material (A) may may be a hydrogel.

25 In one embodiment the corneal implant (a two dimensional implant having a thickness) has a first and a second opposed surface. The implant comprises a matrix material and a core part wherein the core part is arranged essentially in a central part of the matrix material. The core part comprises a core material which is at least partly exposed at the first and the second surface. The matrix material is
30 a hydrogel comprising cross-linked collagen and/or collagen mimetic peptides (CMP).

The core material is based on olefinic or UV polymerizable monomers or a mixtures thereof and the core material is transparent (i.e. a light transmission of at least

80% of light in the range of 400-700 nm) and anti fouling in order to transmit light and hinder cell integration into or across the core material. The amount of core monomers added is calculated to result in a core part having a diameter of 2-8 mm, or 3-5 mm. In one embodiment the ratio of polymerized olefinic or UV polymerizable monomers in the core part is 30-70 wt%, or 40-60 wt%.

The matrix material or the hydrogel

The matrix material/hydrogel is biointeractive, bio- and immune compatible, and may be used as a scaffold or an implant, for stimulating in-growth of host cells (stem or progenitor cells) to differentiate and regenerate a healthy tissue. The matrix material may be porous with a diameter of 1-50 nm, for example 5-20 nm.

The matrix material or the hydrogel comprises polymers which may be cross-linked extracellularmatrix (ECM) macromolecules, natural and/or synthetic polymers and/or co-polymers of said polymers (hybrids) mimicking ECM molecules. A non-limiting list of polymers is collagen, collagen mimetic peptides, combinations of synergistic cell-interactive motifs, e.g. from cell adhesion peptides, anti-infective peptides (anti-microbial, anti-viral, anti-fungal or synthetic cationic or cell penetrating peptides with anti-infective properties) or combinations thereof or combinations with synthetic polymers for examples PEG. The matrix material may also be an interpenetrating network of natural and/or synthetic analogs of the ECM of the corneal stroma. In one embodiment the matrix material comprises amine groups. In another embodiment the matrix material comprises collagen, native or recombinant collagen.

The present inventors have prepared hydrogels of collagen or CMP wherein the fibrils of the collagen or CMP are essentially uniaxial orientated or aligned, figure 7. The uniaxial orientation is believed to be a result of the higher order of assembly of the fibres which may be a result of the high collagen concentration. Surface modification may also influence the orientation of the fibrils, furthermore without being bound by theory but high pressure freezing of the hydrogel may also influence the orientation of the fibrils, Figure 7. An essentially uniaxial orientation of the fibrils is believed to increase the mechanical properties of the hydrogel, the transparency and may even influence the cell proliferation and growth.

The generation of a 3D ECM (Extra Cellular Matrix) like environment by cell integration into and across the matrix material the fibers (or fibrils) of the matrix material should be substantially smaller than the cells which have a diameter of around 5-20 micrometers. Synthetic fibres usually have microfibers in the range of 10-50µm. Thus, cells attached to synthetic microfibers are still in a two dimensional environment with a curvature dependent on the diameter of the microfibers. In addition, because of their micro-scale sizes, the mechanical strength of these polymeric fibers often prevents material structural adaptations from the forces exerted by cells during their adhesion, migration and maturation processes. Therefore the fibres (or fibrils) according to the present invention may have a diameter in the range of 1-30 nm, for example 5-20nm. The diameter of the fibrils is believed to influence the transparency and makes it possible to make hydrogels with a thickness of up to 1 mm and still be transparent.

The cross-linker for the hydrogel polymer may be an epoxide or a di-epoxide such as C1-C10 di-epoxide such 1,3-butadiene di-epoxide, 1,5-hexadiene di-epoxide, or C6-C16 ether di-epoxides such as dimethylallyl ether di-epoxide and 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE). By using a di-epoxide, especially BDDGE, the cross-linking step becomes more biocompatible instead of using the less preferred EDC cross-linker. In comparison with EDC crosslinking the epoxide cross-linker also results in improved enzymatic stability and better mechanical properties, for example higher elongation at break (Table 1).

The hydrogel according to the present invention may be an IPN of one type of ECM molecule and another type of ECM molecule, or of an ECM molecule and a synthetic polymer. In one embodiment the hydrogel comprises MPC-co-PEGDA, Figure 2. In one embodiment the hydrogel is an IPN, or a mixture, of MPC-co-PEGDA and collagen (MPC-Coll). A problem has been to prepare such IPNs or mixtures with a high MPC content, however the present inventors have prepared products with much higher MPC contents than previously disclosed. The higher amount of MPC makes the hydrogel more stable and less susceptible to enzymatic degradation. A higher MPC content also increases the elongation at break but makes the material rigid enough to be sutured.

The hydrogel may be a hydrogel comprising a first polymer which is a natural polymer, for example collagen or collagen mimetic peptides (CMP), and a second polymer comprising a synthetic and/or natural polymer wherein the second

polymer preferably is hydrophilic. The second polymer may be partly or fully water soluble which is believed to improve the properties of the obtained hydrogel. The first polymer comprises methacrylate and/or acrylate functional groups while the second polymer comprises thiol, methacrylate and/or acrylate functional groups. In one embodiment the hydrogel is cross-linked or further cross-linked using cross-linking agents for example or EDC and NHS.

The cross-linking agents may be selected from but not limited to EDC, EDC methiodide (1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide), DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), BDDC (1,3-Bis(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)carbodiimide), DIC (N,N'-diisopropylcarbodiimide), (CH₃)₂CH-N=C=N-CH(CH₃)₂, PyOxim[Ethyl cyano(hydroxyimino)acetato-O₂]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate, N-hydroxysuccinimide (HOSu), N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide (HONB), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (6-Cl-HOBt), 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt), 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine (HODhbt) and its aza derivative (HODhat) or combinations thereof.

When the hydrogel comprises collagen and/or collagen mimetic peptides (CMP) and cross-linking agents said agents may be EDC and NHS. The molar equivalent ratio of EDC to amine of CMP may be 1:0.5 to 1:3, such as 1:1 to 1:2. The molar ratio of EDC:NHS may be from 2:1 to 1:2, such as 1.5:1 to 1:1.5, or 1:1. By cross-linking the hydrogel via the functional groups (for example methacrylate and thiol) and by the use of EDC:NHS the mechanical properties may be altered and the gelation time may also be shortened.

The first polymer may be selected from collagen, fibrin, cell-interactive proteins (e.g. laminin, fibronectin), hyaluronic acid, chitosan, collagen mimetic peptides, proteins, recombinant proteins or peptides, lignin or cellulose or combinations thereof.

The hydrogel according to the present invention comprises a first and a second polymer. In one embodiment the first polymer is collagen and/or collagen mimetic peptide (CMP). In another embodiment the first polymer is collagen, for example collagen I, collagen II, collagen III, collagen IV or collagen V, or mixtures thereof.

The second polymer may comprise one or more of PEG, PVA, polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate)

(pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate), PNIPAAm, silk, collagen, hyaluronic acid, chitosan, collagen mimetic peptides, chimeric peptides based on collagen and cell-interactive peptides, plant lignin, cellulose or plant gum proteins, recombinant proteins or peptides, and co-polymers thereof.

In one embodiment the second polymer is a synthetic polymer, preferably selected from one or more of polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate) or poly(N-isopropylacryl amide) (PNIPAAm). In one embodiment the second polymer is PEG with thiol functional groups. The cell-interactive peptides may be laminin, fibronectin, entactin or vitronectin. In one embodiment the second polymer comprises at least two arms, preferably three or more arms, or four or more arms.

In one embodiment the hydrogel comprises one additional second polymer selected from polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate) or poly(N-isopropylacryl amide) (PNIPAAm). The molar ratio between the second polymer and the additional second polymer may be 3:1 to 0.5:1, such as 2:1 to 1:1.

In one embodiment the second polymer is PEG with 2, 4 or 6 arms. In one embodiment the second polymer or the additional second polymer is PEG with four arms each having thiol groups.

The mechanical properties of the hydrogels can be tuned by varying the methacrylated/acrylated collagen or CMP concentration and/or the methacrylated/acrylated collagen/CMP:thiol molar ratio (or acrylate or methacrylate ratio), thus controlling the degree of crosslinking. Soft hydrogels will be produced with initial collagen/CMP concentrations of 3 and 5 wt%. The collagen/CMP:thiol molar ratio (or acrylate or methacrylate ratio) may be varied from 1 to 10, such as 2 to 8, or 3 to 6. The molar ratio between the functional groups of the first polymer and the functional groups of the second polymer may be from 1:5 to 1:0.5 such as 1:3 to 1:1, or 1:2. Cell viability and proliferation will be

assessed on the resulting hydrogels in order to understand the optimal hydrogel mechanical properties that favour cell survival and ultimately regeneration.

Collagen mimetic peptides (CMP) are short synthetic peptides (15-100 amino acids long, preferably 20-40 amino acids) with an inherent ability to adopt a triple helical fold similar to the natural collagen. CMP's have mainly been used as model systems for elucidating and understanding the formation and stability of triple helix in the natural collagens. In order to enhance CMP's ability to form nanofibers and hydrogels CMP may be connected to a template. Without being bound by theory the template may stabilize the triple helix of the CMP and thereby enhance the possible formation of higher order of assembly. The template may be a polymer or a copolymer and may have at least two arms (such as 3, 4, 5 or 6 arms) or the templates may be a multiple branched molecule or polymer such as spider silk, hyperbranched polymers or dendrimers. In one embodiment the template is multiarm polyvinylchloride (PVC). In another embodiment the template may be a succinylated poly(N-isocrylamide), e.g. polyethylene glycol (PEG), terpolymer of poly(N-isopropylacrylamide-coacrylic acid-coacryloxysuccinimide or PNiPAAm-coAAc-coASI. Preferably the template has two or more long chains, for example each chain may have a molecular weight of at least 5000g/mol, or at least 15,000g/mol. The arms or branches of the template comprise functional groups that may form secondary bonds such as hydrogen bonds or dipole-dipole bonds. Figure 3 and 4 disclose CMP and templates and the formation of triple helix.

Multi-armed PEGs and PEG-collagen hydrogels have previously been reported as scaffolds for tissue engineering. PEG containing hydrogels have previously been shown to have fairly low elastic modulus, between 0.2-2 MPa for collagen-PEG hydrogels. Prior art has shown cell adhesion to said scaffolds with a preference for rough surfaces. Both PEG and PEG-collagen gels are susceptible to hydrolysis and PEG-collagen hydrogels are easily degraded by collagenase within 2 days. In one embodiment of the present invention the matrix material (the hydrogel) comprises a PEG with at least 3 arms, or at least 4 arms, or 8 arms, or a combination thereof. Addition of CMP, however, renders the hybrid resistant to collagenase and thereby more stable.

The present inventors have produced collagen or CMP hydrogels that are transparent (for example the light transmission may be at least 80%, or at least 85%, or preferably at least 90% for wave lengths between 400 and 700 nm, and

with backscatter under 3%, as low as 1%). This is important in certain applications such as intraocular lenses, cornea implants or prosthesis etc., which has not been the case when hydrogels have been cross-linked with EDC.

- The matrix material or the hydrogels of the present invention may be cross-linked via the functional groups of the first and the second polymer and optionally via cross-linking agents. In one embodiment the cross-link is a thio-ether as a result of a reaction between a methacrylate and a thiol group. In another embodiment the cross-link is a carbon-carbon bond for example as a result from a reaction between methacrylate or acrylate groups.
- 10 The hydrogel may further comprise cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC) or silk. The addition of these polymers improves the mechanical properties for example the suturability.

- In order to withstand microcontact printing or photolithography or inkjet the hydrogel should have an elastic modulus of at least 1 MPa, or at least 3 MPa, or at least 5 MPa, or at least 10 MPa. The tensile strength of the hydrogel may be 1 MPa or more, or 3 MPa or more. The elongation at break may be more than 10 %, or more than 20 %, or more than 30 %.

Surface modifications

- In order to tailor the properties of the product the surface of the hydrogel and/or the core material may be modified, patterned or coated for example by photografting, microcontact printing or other lithography, templating, molding or any other suitable technique. Pattern resolution goes from 0.01 μm up to 500 μm or more, and may comprise of one or more patterns modified areas on the hydrogel and/or the core material with same or different coating functionality. The pattern may be of any geometrical shape and be regular or irregular and may be continuous or discontinuous. For example the pattern may be in the shape of lines or dots, or dots making up a line. The lines may be aligned and/or parallel. The dots or the lines may have a maximum width or diameter of 10 nm or more, for example 500 nm or more, or 1 μm or more, or 20 μm or more, or 100 μm or more, for example 10-50 μm , or 20-40 μm . The width of the lines has shown to influence the cell adhesion and/or proliferation. The inventors have shown that a pattern with a width of 30 μm wide fibronectin stripes or lines enhanced cell attachment and showed highest mitotic rates, an effect that potentially may be utilized for faster

integration of an implant, Example 10 and Figure 10. The lines or dots may be spaced at a distance of 1 μm or more, or 20 μm or more, or 50 μm or more, for example 20-70 μm . The space between the lines or the dots may influence the cell proliferation and growth.

5

According to the present invention a surface compound is added to the hydrogel surface. The surface compound is selected from the group consisting of polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers, PEG-methacrylate polymer/monomers, other acrylate, methacrylate, carboxyl, amino, amide, epoxide, hydroxyl, cyano, nitride, sulfanamido, acetylenyl, alkene, esters like imidoesters (N-hydroxysuccinimide ester) or pentafluorophenol ester or other, azide, thiol, maleimide, functionalized PEG derivatives, bifunctional compounds, drugs, bioactive substances, biological molecules including proteins or peptides. In one embodiment the surface compound is selected from polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers and/or PEG-methacrylate polymer/monomers. In another embodiment the surface compounds are selected from fibronectin, entactin or vitronectin.

In one embodiment the surface is functionalized with a PEGMA coating prior to lithography or printing. This introduces MA onto the surface of any hydrogel to standardize the surface chemistry (monomers and/or other molecules bearing functional groups may be used in this approach). The surface functionalization by PEG-MA may be done on any biopolymer, and may be done without the addition of an initiator. The surface of the matrix material and/or the core material may be modified, coated and/or patterned with PEG-MA, N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), polypeptides such as YIGSR, IKVAV, RGD, ECM proteins, fibronectin derived peptides, combinations of synergistic peptides, DGEA peptide from collagen, antibodies, glycosaminoglucans, motifs from growth factors, or pharmaceutically active substances.

Polyethylene glycol-methacrylate (PEGMA) may be applied to a hydrogel without the use of an initiator resulting in a less toxic product. The application is done by UV photo-grafting the PEGMA on a hydrogel or a protein film. This modification enables 1) standardizing surface properties of collagen hydrogels, 2) attachment of surface functional groups, 3) creation of physical barrier for contamination. To the inventors knowledge this has never been done before for a regenerative implant or a

prosthesis produced with such a protecting/functional PEGMA layer. For in vitro applications a thin (tens of nm) initiator free PEGMA hydrogel may be arranged on top of the "main hydrogel" with a purpose of standardizing surface properties for contact printing or photolitho. This again has a clear technological advantage: e.g.,
5 no optimization is needed for printing of chemical/biomolecular compounds even if there are slight variations in the quality of "main hydrogel" material, or even if its composition is changed intentionally. Also, such PEGMA + functional monomer or attached protein/bioactive substance layer/pattern will locally stimulate/suppress
10 adhesion of cells, guide them, whereas during the later stages of cell culture experiment the tissue -promoting properties of the "main hydrogel" will become dominant. In order to take advantage of such cell programming architecture, the bearing material (the "main hydrogel") should be preferably be stable, especially if one wants to create 3D models, so that it supports the desired morphology, shape and patterns during production, storing and cell culture/tissue application steps.

15 The generalized resulting film structure described above is shown in Fig. 8. This type of surface modification allows standardizing the chemical properties of the original protein and/or biosynthetic hydrogel film that, dependent on its composition, might display different number of surface chemical groups per surface area. This is advantageous for any further chemical modifications and functionalization including
20 patterning of the surface (see below). In the implant device applications, such a modification makes it possible for the invention to be used as an additional barrier for exchange of different particles or viruses and bacteria between the implant and its surrounding tissue. Since the thickness of the additional hydrogel barrier is very small (typically, tens of nm), it will be degraded after some time after having
25 performed its function. Further modifications of the photografted PEG hydrogel could be done, for example by microcontact printing of functional methacrylate monomers.

The present invention may be used in both in vitro and in vivo applications. For example the compound may be used for various implants such as but not limited to, cornea, cardiac patches, intraocular lenses, joints, and synovia, or in cosmetic
30 surgery as a filling material such as breast implants or lip filling material, or as a anti-wrinkle material. The present invention may also be used as a drug-delivery vehicle, tissue glue or a barrier. The compound may further be used in vitro for example in chips, arrays, coatings or assays. The product according to the present invention may be used as a model or a model surface for studying cell migration or

proliferation. The product may be coated on surfaces such as Petri dishes or microwell plates or lab-on-a-chip devices in order to arrange cells in specific patterns or just as a cell growth support.

Method of forming the hydrogel

- 5 The hydrogels may be prepared by mixing a first and a second polymer or by mixing a first and a second solution where the first solution comprises the first polymer and the second solution comprises the second polymer. In one embodiment the pH of the first solution is less than 5, preferably less than 3, or more than 10, preferably more than 12. The first and the second solution may be
10 prepared using water or purified water or any suitable buffer. In one embodiment the first polymer is methacrylated collagen or methacrylated CMP, and wherein the pH of the first solution is less than 5 or more than 10.

Without being bound by theory it is believed that the introduction of photochemically cross-linkable moieties into the first natural polymer will facilitate
15 rapid and controllable intermolecular and intramolecular cross-linking leading to formation of a hydrogel. The cross-linking reactivity of the first natural polymer is enhanced by the incorporation of methacrylate and/or acrylate groups along its triple helical chain, which render it reactive towards nucleophilic attacks via Michael addition reaction. In addition, by being susceptible of radical formation
20 under low-energy UV light irradiation, methacrylate groups offer another synthetic route to bridge collagen helices with a series of hydrophilic compounds (non-zero crosslinking). This modification makes the method presented herein very versatile for the synthesis of collagen/CMP-based hydrogels. The method according to the present invention may use UV in order to form cross-links or to speed up the cross-
25 linking formation, for example UV 365nm wavelength may be used for 5 to 15 min. In one embodiment a photoinitiator is used, for example at a concentration of 1-5 % (w.r.t. to the first polymer). However, the method of preparing the present hydrogels does not require the use of UV, in one embodiment no UV is used.

When preparing the hydrogel the collagen or CMP concentration in the first
30 solution may be 0.2 weight% or higher, or 0.5 weight% or higher, or 1 weight% or higher, or 2 weight% or higher, 5 weight% or higher, or 8 weight% or higher, or 12 weight% or higher, or 15 weight% or higher, up to 18 weight%.

When the hydrogel according to the present invention is prepared using CMP and a template the molar ratio between CMP and the template may be 10:1 to 1:10, such as 5:1 to 1:5, or 2:1 to 1:2.

The hydrogels may be prepared using a syringe mixing system. In a non-limiting
5 example, a collagen (a first polymer) solution is placed into a syringe coupled to a second empty syringe through a 3-way T connector with septum at one end. Solutions of monomers/polymers (a second polymer/monomer) and photo initiator are then added sequentially from syringes via septum and mixed by pumping the combined solutions between the two main syringes. In one embodiment the
10 injectable composition comprises a first and a second aqueous solution wherein the first solution is an aqueous solution comprising collagen or collagen mimetic peptide (CMP) comprising methacrylate and/or acrylate. The second solution is an aqueous solution comprising a synthetic polymer having two or more functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate functional groups. The
15 polymer concentration in each solution is not more than 3 weight% in order to facilitate proper mixing and not too high viscosity. In one embodiment the composition further comprises cells and/or growth factors and/or cell nutrients.

The hydrogel may be prepared using a syringe mixing system. The syringe mixing system allows for a coupling reaction mostly in the localized regions where a
20 concentrated aqueous collagen or CMP solution comes into contact with the crosslinking agents. In yet another embodiment the composition is arranged in a syringe wherein the first solution is arranged in a first compartment and the second solution in a second compartment.

The functionalizations of the natural and synthetic polymers and the system for
25 forming hydrogels presented herein are also suitable as inks for 3D printing in order to prepare complex 3D structures, or for incorporating cells into the structure for example. The hydrogels of the present invention may be prepared together with cells, for example stem cells.

Amending the conductivity of a collagen solution

30 The present inventors have found that the transparency of collagen or CMP based hydrogels can be controlled by manipulating the conductivity of collagen based solutions prior to further modification and/or crosslinking. The target conductivity is achieved by constant volume diafiltration.

The transparency of the cornea is critically dependent on the absence of any gaps in the matrix that are comparable in size to the wavelength of light, and on the presence of thin, parallel collagen fibrils

In a non-limiting example a diafiltration system and membrane of choice is set-up as per the manufacturer's directions. A conductivity sensor is inserted into the permeate line as close as possible to the permeate exit port and the conductivity sensor is connected to a digital recording device. The collagen based solution is diafiltrated at constant volume using water (preferably sterile), USP (e.g. WFI) until the target conductivity is achieved. The processing data (permeate conductivity and temperature) are recorded every 60 seconds. The conductivity for each diavolume of permeate is noted.

For many collagen-based solutions and crosslinking methods the target conductivity to achieve hydrogels with optimized transparency has been found to be $45 \pm 5\mu\text{S}/\text{cm}$ or $45 \pm 2\mu\text{S}/\text{cm}$. The target conductivity may be adjusted as required for alternative modifications and crosslinking methods.

The present method is applicable to all starting volumes of collagen based solutions. Ten to twenty diavolumes of water (preferably purified such as sterile for example USP water) is consumed to reach the above stated target conductivity. The temperature of the collagen solution throughout the process is preferably kept within 4 to 30 °C, or 10 to 25°C, and must be controlled in a manner such that the temperature of the permeate passing thru the conductivity sensor is kept constant ($\pm 1^\circ\text{C}$, preferably $\pm 0.5^\circ\text{C}$) and within the calibration range ($\pm 1^\circ\text{C}$, preferably $\pm 0.5^\circ\text{C}$) of the sensor. The present inventors have found that if the temperature is not kept constant the correct conductivity of the solution will not be detected. The feed flow rate and feed pressure is dependent upon the diafiltration system used and may be adjusted in accordance with common practice. The present inventors have found that one feed flow rate that may be used is 1-10 LPM/m² (LPM means litres per minute), or 2-7 LPM/m², or 3 – 5 LPM/m² and a maximum feed pressure may be 10-35 PSI (69-241kPa), or 15-30 PSI (103-207kPa), or 20-25PSI (138-172kPa) or 25 PSI (172kPa). The feed flow rate and feed pressure is preferably controlled in a manner that ensures a sufficient permeate flow rate thru the conductivity sensor. The present inventors have found that diafiltration time for 1 litre of a collagen based solution may be 8 to 10 hours. In one embodiment the diafiltrated solution is lyophilized followed by reconstitution of the collagen, i.e. making a new solution at

any suitable concentration of the lyophilized collagen or CMP using water or any suitable buffer solution.

Light transmission and back-scattering measurements may be carried out at room temperature for white light (quartz-halogen lamp source) and for narrow spectral
5 regions (centered at 450, 500, 550, 600 and 650 nm). In one embodiment a custom-built instrument was used to measure the percent transmission of samples as compared to open beam intensity. The relative percent of light back scattered from the collimated beam by the sample was measured with a circular array of 8 photodiodes, 30 degrees off axis.

10

The diafiltration also influences the mechanical properties which is clearly seen in Examples 12 and 13. By diafiltrating preferably prior to crosslinking the collagen the obtained hydrogel has a significantly higher elongation at break compared to non diafiltrated. The elastic modulus is also decreased indicating a softer hydrogel.

15 **Applications**

The present invention may be used as an implant itself or as part of an implant or as a vehicle for delivering active compounds such as drugs or growth factors for example. A non-limiting list of potential implants is intraocular lenses, cornea, breast, lips, skin, or cardiac patches.

20 The inventors have been able to reproduce the morphology of the meshes found in decellularized dermis by eletrospinning and plastic compression of porcine collagen alone or with other polymers (Fig. 4A and B). However, to optimize the components of the dermal scaffold not only to support dermal fibroblasts but to allow for blood vessel in-growth, a soft fibrin hydrogel pre-seeded with EPCs may be incorporated
25 to allow very rapid angiogenesis and allow for anastomosis formation, which is critical to successful grafting.

Although compressed fibrous meshes can be used as skin substitutes, a smooth substrate is more desirable for a smooth skin epidermis. The mesh may therefore be arranged within a hydrogel. Because of the cell friendly chemistry of the present
30 hydrogel it is possible to incorporate cells (e.g. autologously harvested and expanded) into the fibrous mesh-hydrogel construction.

A cornea implant may have a thickness of 150-500 μ m, such as 250-350 μ m. The implant may be prepared by placing the hydrogel or the solutions forming the gel between two plates or molds having the desired thickness as a distance between the plates/molds. UV (for example 365nm wavelength) may be applied for 5 to 20 minutes, such as 10-15 minutes, figure 5.

CMP hydrogels have comparable mechanical properties to recombinant human collagen and are sufficiently robust for grafting as corneal implants, as shown in grafts into mini-pigs. Example 3 discloses certain properties of some CMP hydrogels.

- 10 The hydrogels according to the present invention may also be used in lab-on-a-chip systems, microscopy and microarray substrates, cell and tissue culture dishes, microwell plates, microfluidic and sampling, separation, purification, analytical tools. In this type of applications, the hydrogel can be used as an optimal support/environment for cell growth, proliferation, differentiation, tissue formation.
- 15 Also, the hydrogel can be employed as a technical material for production of any kind of component for the above devices. The hydrogel can be used in the device as produced or it can be post-fabricated in order to obtain a specific shape, morphology, topography, stiffness, surface chemical, biochemical or physical properties, etc.

20

EXAMPLES

The present inventors have developed a non-limiting number of matrix materials or hydrogels preferably based on ECM macromolecules. Examples of collagen matrix materials are given below:

25 Example 1: **Collagen materials**

A simple matrix material can be fabricated from carbodiimide crosslinked or epoxide or diepoxide, preferably BDDGE, crosslinked or UV crosslinked collagen/modified collagen as known in the art.

30 Example 2: **Collagen Interpenetrating Networked materials**

These can be made from collagen-MPC or methcarylated collagen (MA) hybrid.

Collagen-MPC-co-PEGDA

0.5ml of 15% (wt/wt) collagen aqueous solution was taken in the 3 way syringe system and thoroughly mixed with 150 μ l of MES (2-(*N*-morpholino)ethane sulfonic acid) buffer in the syringe system. The pH of collagen solution was adjusted to pH 5 \pm 5 0.5 with 2M NaOH. After that calculated volume of 10% wt/vol of NHS was added followed by MPC solution and PEGDA solution in MES buffer. The Collagen:MPC ratios was 2:1 (wt/wt) and the MPC:PEGDA ratio was 3:1 (wt/wt). Then calculated volume of 4% (wt/vol) APS (ammonium persulfate) in MES and 2% (vol/vol) TEMED (Tetramethylethylenediamine) in MES were added subsequently to the syringe mixing 10 system. The ratio of APS: MPC (wt/wt) was 0.03:1 and the ratio of APS:TEMED (wt/wt) was 1:0.77. Then calculated volume of EDC (5% wt/vol) was added. The molar ratio of Collagen-NH₂:EDC was 1:0.7 and EDC:NHS was 2:1.

Collagen (MA)

0.3mL (300 μ L) of 5% MA-collagen (MAC) solution was taken in the 3 way syringe 15 system and 300 μ L of PEGDA and/ HEMA containing 2% (w.r.t collagen) Irgacure 2959 was added to the syringe and mixed well. The solution from the syringe was casted between two a glass slide/mould with spacers of desired thickness and exposed to UV 365nm wavelength for 10 to 15 min.

Collagen-MPC-BDDGE

20 0.5ml of 15% (wt/wt) collagen solution was loaded into a syringe mixing system and thoroughly mixed with 150 μ l of Na-bicarbonate buffer in the syringe system. After that calculated volume of MPC solution and PEGDA solution in MES buffer was added. The Collagen:MPC ratios was 2:1 (wt/wt) and the MPC: PEGDA ratio was 3:1 (wt/wt). Then calculated volume of 8% (wt/vol) APS in MES and 6% (vol/vol) TEMED 25 in MES were added subsequently to the syringe mixing system. The ratio of APS: MPC (wt/wt) was 0.03:1 and the ration of APS:TEMED (wt/wt) was 1:0.77. Then adequate amount of 2N NaOH was added to bring the pH at 11. Then calculated volume of BDDGE was added. The molar ratio of Collagen-NH₂:BDDGE was 1:2.

Collagen-MPC interpenetrating networks (IPNs) have been previously described but 30 there is no confirmation of that there is MPC in said networks.

The inventors of the present invention have shown that the addition of the MPC to a collagen network increased the elastic modulus the elongation at break in collagen

hydrogels as shown in Table 1. In recombinant human collagen examples however a decrease in elastic modulus occurred, which correlated well to the increase in elasticity of the samples. Use of RHC instead of porcine collagen from previous data shows a 10-fold increase in tensile strength.

- 5 Table 1. Changes in mechanical properties of collagen versus collagen-MPC hydrogels.

	PC	PC-MPC	RHC	RHC-MPC	PC-MPC-BDDGE 1:2	PC-MPC-BDDGE 1:4
Tensile strength (MPa)	0.15	0.12	1.7	1.29	0.10	0.15
Elongation at break (%)	14.57	21.29	13.88	37.89	16.41	12.88
Young's elastic modulus (MPa)	2.09	0.87	20.26	5.26	1.23	1.75

PC=Porcine Collagen

RHC=Recombinant Human Collagen

10 Example 3: **Collagen mimetic peptide hydrogels**

Short bioactive peptide sequences that are cell-interactive have been used to mimic the properties of the holoprotein. Longer sequences, for example, collagen mimetic peptides (CMPs), are able to self-assemble and a range of these have been developed to model ECM-based peptides.

- 15 In one example a 38 amino acid CMP and a long chain multiarm template (for example 4 arm/8 arm PEG, PNIPAAm, silk) was used to promote stepwise triple helical self assembly and form hydrogels, see figure 3. Multiarm templates of appropriate lengths and flexibility will assist CMPs to self assemble into collagen-like triple helical network through well-defined self association; and will also
 20 provide the necessary backbone support to maintain the stiffness and mechanical

strength to form self-supporting hydrogels. These biomaterials are highly designable, diversifiable with improved mechanical, optical and enzymatic properties. A series of such building blocks using different polymeric multiarm templates conjugated with CMPs or chimeric peptides comprising natural and synthetic ECM motifs or anti-microbial peptides can be produced. The combinations of such hetero moieties would give rise to multiple hybrid supramolecular assemblies mimicking natural ECM architecture, see figure 4, with tunable physical and biological properties.

Synthesis of collagen mimetic peptide (CMP):

CMP's were synthesized on Symphony automated peptide synthesizer (Protein Technologies Inc.) using standard fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with HCTU (ChemPep Inc.) as the activating reagent. The synthesis was performed on a 0.1 mmol scale with Fmoc-PEG-PS resin (Applied Biosystems) using fourfold excess of amino acid in each coupling. The peptides were cleaved from the resin by treatment with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA), water and triisopropylsilane (TIS) (95:2.5:2.5 v/v; 10 mL per gram of polymer) for 2 h at room temperature. After filtration, TFA was evaporated and the peptides were precipitated by the addition of cold diethyl ether, centrifuged and lyophilized. The crude products were purified by reversed-phase HPLC on a semi-preparative C-18 column (Grace Vydac) and identified from their MALDI-TOF spectra. The maximum at 225 nm and minimum near 200 nm are characteristic triple helical self assembly. The triple helical folding was found stable upto 40 °C.

Synthesis of PEG-CMP:

Solution of CMP in water and solution of 8-Arm PEG-Maleimide in DMSO was mixed at the molar ratio of PEG-Maleimide: CMP=1:2.5 (Fig). After 4 days of continuous stirring the mixture was dialyzed through a dialysis membrane (12-14,000 molecular weight, Spectrum Laboratories, Inc., CA, US). After dialysis the solution was lyophilized to get solid PEG-CMP.

¹H spectra of 8-Arm PEG-Maleimide and PEG-CMP confirmed the conjugation of CMP with PEG-Maleimide. The complete disappearance of C=C Maleimide peaks (6.5-6.6) indicated the 100% conjugation of CMP with 8-Arm PEG-Maleimide.

Preparation of an example of CMP hydrogel:

CMP hydrogel was prepared using a syringe mixing system as described in Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 May;47(5):1869-75 which is hereby incorporated by reference. The solution of (12 weight%) CMP-PEG was crosslinked.

- 5 To fabricate CMP hydrogels, 0.5 mL aliquots of 12% (wt/wt) of CMP-PEG in aqueous solution was loaded into a syringe mixing system free of air bubbles. Calculated volumes of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (1.0 equimolar with respect to lysine NH₂ in CMP) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (1.0 equivalence) solutions were added and thoroughly mixed at room temperature. The final solution
- 10 was immediately dispensed as flat sheets or into curved polypropylene contact lens molds and cured at 100% humidity at 21°C for up to 24 hours. The implants were washed three times with fresh 1x PBS prior to storage in PBS. Analysis showed a CMP-based hydrogel, moulded as a corneal implant, with biocompatibility towards corneal cells.
- 15 The hydrogels of the present invention exhibit good elastic properties (i.e. high elongation at break), probably due to the presence of PEG. But the combination of CMP and PEG led to hydrogels that were biocompatible allowing host cells to grow and proliferate and showed a much higher elastic moduli (>200 kPa) and were unexpectedly resistant to collagenase compared to other collagen-based materials
- 20 (Fig. 6), making it an excellent candidate for a prosthesis that needs to retain its form to function.

Central Polymer (Optical) Core

- This is the “core” of the invention, the ability to convert a regular corneal implant into
- 25 a prosthesis. For example a methacrylate (MA) solution with UV initiator Irgacure 2959 (2 weight%) is added to the MPC-collagen hydrogel. Preferably the MA is allowed to diffuse into the hydrogel for at least 30 seconds or more, or 1 minute or more, or 5 minutes or more, or 15 minutes or more, or 2 hours or more, or 24 hours or more. The time interval allows for conversion of an implant from a regenerative implant to a
- 30 prosthesis during surgery. Generally the gels were exposed to UV-A at 360 nm for 15 mins to form an optical core.

Example 4: RPro with methyl methacrylate (MMA) core

Collagen-MPC hydrogels were prepared as described above. MMA (methyl methacrylate) solution with UV initiator Irgacure 2959 (2 weight%) was added at the center of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and incubated it for 2 days for the diffusion of MMA into MPC-collagen gels. The gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. The resulting RRro is shown in Fig.7. Human corneal epithelial cells were seeded on the top of the scaffold and cell images were shown in Fig. 6.

Example 5: RPro with poly-hydroxyethyl methacrylate (pHEMA) core

Collagen-MPC prosthesis with pHEMA central core was prepared from HEMA using the procedure described in 1. HEMA (hydroxyethyl methacrylate) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and incubated it for 5-10 mins for the diffusion of HEMA into MPC gels. Gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. HEMA diffuses into MPC gels and whole centre has been polymerized but on its own, a pHEMA core is transparent.

Example 6: RPro with pHEMA-Poly-ethylene glycol methacrylate (PEGMA) core

Collagen-MPC prosthesis with (pHEMA-PEGMA) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMA (Poly-ethylene glycol methacrylate) HEMA-PEGMA solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC collagen hydrogel at an amount saturating the matrix material and incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMA into MPC gels. Gels were exposed to UV at 360 nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA + PEGMA was polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre was transparent and stable for months.

Example 7: RPro with pHEMA-PEGMEM core

Collagen-MPC prosthesis with pHEMA-PEGMEM (MEM is methyl ether methacrylate) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMEM (1:1) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of MPC

collagen hydrogel and incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMEM into MPC gels. Gels are exposed to UV at 360nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA+PEGMEM was polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre is transparent (Fig. 9) and it is stable for months.

5

Example 8: **Collagen mimetic peptide (CMP) RPro with pHEMA-PEGMEM core**

CMP prosthesis with pHEMA-PEGMEM (MEM is methyl ether methacrylate) central core was prepared using the same procedure described in 1. HEMA-PEGMEM (1:1) solution with UV initiator Irgacure (2 weight%) was added at the centre of CMP hydrogel and incubated it for 15 mins for the diffusion of HEMA-PEGMEM into MPC gels. Gels are exposed to UV at 360nm for 15 mins. 1:1 ratio of HEMA+PEGMEM was polymerized in the centre of MPC gels. The polymerized part in the centre is transparent (Fig. 7) and it is stable for months.

15 **Surface coating, printing or patterning**

Example 9: **PEG-MA coating**

Synthetic collagen photografting to the collagen surface was performed by adding a drop of 240 mM concentration of aqueous monomer solution of HEMA:PEGMA (1:1) was applied to the sample and pressed by a freestanding quartz disc. Subsequent irradiation with UV light (11W) for 3 minutes gave a 20-25 nm PEG-hydrogel layer on the top of collagen surface, evidenced by atomic force microscopy analysis (AFM).

Further modifications of the photografted PEG hydrogel could be done, for example by microcontact printing of functional methacrylate monomers. They were subsequently crosslinked with the PEG hydrogel (on-top of the original protein film) by additional irradiation with UV light. The present inventors have microcontact printed aminoethylmethacrylate (AEMA), fibronectin and streptavidine that generated an amino group-containing pattern on otherwise chemically inert PEG hydrogel surfaces. Furthermore the surface was biotinylated via coupling NHS-biotin conjugate. Finally, the resulting pattern was visualized by streptavidin-coated quantum dots (Fig. 9).

30

Example 10: Microcontact printing with fibronectin “ink”

Recombinant human collagen type III (RHCIII)-MPC hydrogel samples, 500 μm thick, were washed using 0.1 M PBS buffer pH 5.7 and dried under a nitrogen gas (N₂) stream prior to use. Free carbonyl groups on the collagen surfaces were activated
5 using 1ml of 2.5 mM N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) and 10 mM ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) solution (PBS, pH=5,7) for 15 min. All samples were rinsed for 30 s in fresh PBS buffer (pH=5,7) and dried with N₂ just before printing.

Stamps (5 mm X 5 mm) of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) were prepared using a
10 previously published protocol. To examine attachment and proliferation of single corneal epithelial cells, a pattern that comprised 30 μm wide lines separated by 60 μm spaces in between was used. To examine the attachment and spread of multiple cells, 200 μm wide lines, separated by 200 μm spaces were tested. For printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed in ethanol, dried in a stream of nitrogen gas
15 and treated with oxygen plasma (intensity 20W) for 30s in plasma dry cleaner (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany). The stamps were then coated with “ink”, in this example, comprising a 10 μL solution containing of fibronectin 0.5 mg/ml and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA-TR® in PBS buffer, pH 8.0. After 10 min. at room temperature, the stamps were rinsed in water for 20 s and dried for 1 min. under a
20 nitrogen gas stream.

Activated RHCIII-MPC surfaces were then contact-printed for 5 min. The stamp was then removed and patterned RHCIII-MPC hydrogel surface was layered with a blocking solution containing 10 mM (PEG)₃NH₂ in PBS buffer pH8.0 for 40 min. After incubation, the surfaces were carefully washed several times with fresh PBS buffer
25 pH7.4 and are ready for use or stored in buffer solution until used, for example for seeding cells. Fig. 10 shows examples of fibronectin patterned surfaces and cells.

Example 11.

Microcontact printing on a hydrogel.

30 Red fluorescence shows fibronectin printed on top of a RHCIII hydrogel block (obtained according to Example 10) with a PDMS stamp. Atomic force microscopy (AFM) topography image was obtained in the actual position of the pattern. A 3D

projection of the AFM image clearly showed that the polymer has locally collapsed in the PDMS stamp/contact area, i.e. a depression was formed.

For comparison, the same microcontact printing procedure was applied to RHCIII-MPC hydrogel blocks:

- 5 Contact mode AFM topography images of the RHCIII-MPC hydrogel surface before and after the microcontact printing. Printed collagen surface, overlaid with the fluorescence image of a printed fibronectin stripe. Surface collagen fibrils that were visible appeared to be aligned.

The effect of microcontact printing (μ CP) on the micro- and nanotopography of fully
10 hydrated RHCIII-MPC hydrogels was determined by AFM analysis. The original, unmodified collagen hydrogel surfaces appeared uneven, with irregularly arranged surface fibrils visible. The root mean square (RMS) of surface roughness as measured within a representative $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ scan area was 3.5 nm. The regions of interest (ROIs) for AFM scans on the chemically activated and microcontact printed
15 samples were identified by simultaneous fluorescence microscopy imaging. The AFM tip was positioned in the ROIs that were patterned with fibronectin (FN) and BSA-TR® mixture. In topography images of the hydrogel surface after μ CP and/or deactivation, the collagen fibrils appeared to be aligned, in contrast to the unmodified surface. However, the fine details of the collagen fibrils could not be
20 resolved. There was no distinct overall height difference between the majority of the printed and adjacent unprinted area, either due to the high initial surface roughness and/or due to the ability to print a very thin, possibly monolayer thickness of FN. The edges of the stripes, however, were slightly corrugated by the printing and served to delineate the stripe boundaries. The RMS surface roughness
25 of the FN-printed and unprinted regions on this particular sample was seen in AFM and was very similar, at 1.3 nm and 1.4 nm, respectively. The AFM analysis therefore showed that the μ CP resulted only in a very small change in the surface topology.

Diafiltration of collagen

- 30 Example 12.

Method

- RHC III (bulk acidic solution) was diafiltrated until the conductivity of the permeate was 45 μ S. Note: this was changed from our earlier method in which the end point was 40 μ S.
- The diafiltrated bulk acidic solution was lyophilized in house.
- 5 • All implants were made in 0.05 MMES that was filtered thru a 0.2 μ m filter.
- The EDC: primary amine ratio was 0.4 (EDC:NHS ration was 1:1).
- Starting volume was 0.4 ml.
- Total dilution was 150 μ l (from the T-piece) + 24.5 μ l (EDC) + 14.7 μ l (NHS) = 189.2 μ l resulting in a final collagen content of approximately 12.6%

10

Characterization	Human Cornea	15% RHCII Formulation	Prebious 13.7% RHCII Formulation
Optical properties			
Transmission	>85%	n/a	89.8 \pm 9%
Backscatter	6-8%		0.81%
Refractive Index	1.3375	1.358 \pm 0.0015	1.35
Thermodynamic properties			
DSC ($^{\circ}$ C)	65.1	57.82	58.6
Mechanical properties			
Tensile strenght (Mpa)	3.8	1.439 \pm 0.094	1.700 \pm 0.205
Modulus (Mpa)	3-13	8.82 \pm 2.18	20.26 \pm 2.04
% Breaking Strain	-	23.01 \pm 3.47	13.89 \pm 0.69
% Water content	80%	90.5 \pm 3.58%	90%
TEM	n/a	n/a	n/a
In vitro Biocompatibility		Supports epithelial cell proliferation and stratification	Supports epithelial cell proliferation and stratification

Note: Water content based on drying down an intact 500 μ m implant.

n/a – not available at the time of filing

Table 2. Characterization.

The collagenase degradation profile for 15% RHC III as compared to 13.7% RHC III at equivalent crosslinking ratios is given below. All material was made using a permeate conductivity cut-off of 45 μ S.
 5 RHC =Recombinant Human Collagen

Example 13

Method

10 -Diafiltration of 2 batches of RHC III bulk acidic solution

-Batch 1: Final permeate conductivity =40 μ s

-Batch 2: Final permeate conductivity =45 μ s

-RHC Gels were made with EDC:primary amine ratio of 0.4 (EDC:NHS ratio was 1:1)

Results

Mechanical properties	Permeate = 40 μS	Permeate = 45 μS
Tebstile strength (MPa)	1.700 \pm 0.205	2.02 \pm 0.319
Modulus (MPa)	20.26 \pm 2.04	9.639 \pm 1.700
% Breaking Strain	13.89 \pm 0.69	32.68 \pm 1.77

15 Table 3. Mechanical properties.

Example 14 – Hydrogel of MAC and PEG-SH

A hydrogel from the Michael addition reaction was prepared by mixing 0.5 mL of 10 wt% MAC with a 4-arm PEG thiol using a three way syringe system. The PEG thiol was dissolved in water and added to get the overall concentration of methacrylated
 20 collagen of 5%. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers of desired thickness and stored under humid conditions overnight. A stiff hydrogel was obtained. This result confirms the proof-of-concept that a stiff hydrogel can be prepared by the overnight reaction of MAC with a 4 arm PEG thiol. The absence of UV light and by-products makes this hydrogel promising
 25 for corneal application. Such features make this hydrogel suitable for encapsulation and delivery of stromal stem cells in cases of HSV conditions, when

the patient lacks the pool of the stem cells, thus making conventional regenerative approaches impractical.

Hydrogels

Example 15 – Methacrylation of collagen

- 5 0.5% collagen solution in 1X PBS was prepared (pH 6.5 – 6.7). The pH was raised to 10 using NaOH at -4°C. Methacrylic anhydride (10:1 molar ratio w.r.t. amine groups in collagen) was added drop wise to collagen solution in 3 batches and the solution was stirred vigorously for 4 hours. The reaction mixture was dialyzed for 4 days against distilled water at room temperature.

- 10 The results were analysed using circular dichroism and NMR.

The circular dichroism spectrum of MAC at 1% by weight concentration in Milli-Q water, at room temperature, showed maximum at 225 nm and a minimum near 200nm at pH 7.4 and pH 10 which is indicative of collagen triple helices. The triple helical propensity is higher at high pH.

- 15 HNMR spectra of MAC at 1% by weight concentration in D₂O, at room temperature showed two new peaks between 5-6 ppm, characteristic for two acrylic protons of methacrylic functionality.

The inventors found that transparency was achieved by varying the pH of methacrylated collagen (MAC) in water. MAC was transparent if the pH was either
20 less than 5 or above 10. This is something not reported before.

Example 15 – Formation of hydrogel with MAC and acrylate monomers

The example relates to mixing of MA-collagen with acrylate monomers to form multicomponent gel

- 0.3mL (300 µL) of 5% MA-collagen (MAC) solution was taken in the 3 way syringe
25 system and 300 µL of polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), hydroxyethyl methacrylate (HEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM) containing 2% (w.r.t collagen) Irgacure 2959 was added to the syringe and mixed well. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers of desired thickness and exposed to UV 365nm
30 wavelength for 10 to 15 min.

MAC	Acrylate monomer	Ratio (mol)
300 μ L	300 μ L	1:1

Table 4. Experimental set up.

The example relates to mixing of MA-collagen with multiple acrylate monomers to form multicomponent gel

- 300 μ L of 5% MA-collagen was mixed with two different acrylate monomers e.g. (HEMA+ PEGDA) with 2% (w.r.t collagen) Irgacure 2959 and mixed well. The solution from the syringe was casted between two glass slides/molds with spacers of desired thickness and exposed to UV 365nm wavelength for 10 to 15 min.

MAC	HEMA	PEGDA	Ratio
300 μ L	150 μ L	150 μ L	1:0.5:0.5

Table 5. Experimental set up.

- The hydrogel was analysed with DSC. It showed that the hydrogel comprises at least two polymer networks with T_{g1} and T_{g2} of 44.7 and 56.3 $^{\circ}$ C, respectively. A third step is visible in the curve, but further studies are needed to confirm the presence of a three-polymer hydrogel.

Example 17 – Preparation of CMP hydrogel

- T-piece mixing system was used to make hydrogels with CMP, which was previously described. For making the hydrogel 500mg of 12% (w/w) CMP was mixed with 300 μ l of water. Calculated volumes of NHS and then EDC were added to the syringe mixing system. Depending on the molar equivalent ratio of EDC to amine of CMP, 3 different types of hydrogel were made; CMP-NH₂:EDC=1:0.5, CMP-NH₂:EDC=1:1 and CMP-NH₂:EDC=1:2. The molar ratio of EDC:NHS was 1:1. The stock solution concentrations of EDC and NHS were adjusted in such a way that in all different types of hydrogels, dilution factor of CMP remained same. All addition followed by thorough mixing. Table 6 and 7 discloses some results and properties of the obtained hydrogels. Circular dichroism revealed triple helical formation.

Formulation	Tensile strength	Elongation at	Young's
-------------	------------------	---------------	---------

CMP:EDC/NHS ratio	/max Load (kPa)	Break (%)	Modulus (mPa)
1:0.5	1.47±1.2	67.10±37.20	0.22±0.05
1:1	1.79±0.5	64.02±8.09	0.21±0.08
1:2	0.99±0.3	30.04±7.42	0.26±0.04

Table 6. Mechanical properties of CMP hydrogels.

Formulation	Initial Wt	1h		24h	
		drying	Water Content (%)	drying	Water Content
CMP 1:1	45.9	20.6	55%	3.2	93%
CMP 1:1	39.4	16.6	58%	3	92%
CMP 1:2	49.3	23.5	52%	4.9	90%
CMP 1:2	48.3	22.2	54%	4.3	91%

Table 7. Water content of CMP hydrogels.

Example 18. – In vivo study of CMP hydrogel

The CMP-EDC 1:2 hydrogel was tested in vivo in a pig. Cornea shaped implants
 5 were implanted into the eyes of three pigs and regular analysis were conducted. As
 positive control collagen based hydrogel was used and the results from the CMP
 hydrogel have so far been as good as for the collagen. CMP hydrogels integrates
 into the host tissue and discloses epithelial regeneration after 2 weeks already.
 After 3 months the sensitivity of the eye was restored together with the tear
 10 formation function. After 9 months nerves were regenerated. The stability of the
 hydrogel was also analysed by studying changes in the relative weight with time.

Example 19.

Materials

All inorganic salts and basic chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO and Steinheim, Germany), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) or Merck KGaA (Darmstadt, Germany) unless otherwise stated. Research grade RHCIII, produced in yeast (*Pishia pistoris*), was purchased from 3H Biomedical (Uppsala, Sweden) and Fibrogen (San Francisco, CA). N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethane sulfonic acid Monohydrate (MES), Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA, $M_n = 575$), Ammonium persulphate (APS) and N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) were obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA). 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) was obtained from Biocompatibles (UK) and Paramount Fine Chemicals Co. Ltd. (Dalian, China).

Recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels

RHCIII-MPC hydrogels were produced as we previously published [15] but with a range of different starting concentrations of RHCIII to select an optimal formulation for laser profiling and μ CP. Briefly, a 450-500 mg of RHCIII solution of one of a range of starting concentrations (13.7 (w/w)%, 18 (w/w)% or 20 (w/w)%) was buffered with 150 μ l of 0.625 M MES buffer within a syringe mixing system in an ice-water bath. 200 μ l MPC solution in 0.625 M MES was added into the mixing system. The MPC:RHCIII (w/w) ratios used with either 1:4, 1:2 or 1:1. PEGDA was then added by a microsyringe (PEGDA:MPC (w/w) = 1:3). Calculated volumes of 4% (w/v) APS solution in MES and 2% (v/v) TEMED solution in MES were added sequentially (APS/MPC (w/w) = 0.015:1, APS:TEMED (w/w) 1:0.77). After thoroughly mixing, calculated amounts of NHS (10% (w/v) in MES) and EDC (5% (w/v) in MES) solutions were added and the reactants were thoroughly mixed at 0 oC (EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.3 - 1.5:1, EDC:NHS (mol:mol) = 1:1). The final mixed solution was immediately cast into cornea-shaped moulds (12 mm diameter, 500 μ m thick) or between two glass plates with 500 μ m spacers. The hydrogels were cured overnight at 100% humidity under nitrogen at room temperature. The cornea-shaped implants were cured for an additional 5 h at 37 oC. After

demoulding, they were washed thoroughly with 10 mM phosphate buffered saline (PBS) and then stored in PBS containing 1% chloroform to maintain sterility.

Characterization of hydrogels

- All samples were tested in triplicate. The water content of RHCIII-MPC hydrogels was determined by weighing samples that were blotted dry to remove surface liquid to obtain the wet weight (W₀). These pre-weighed hydrogels were then dried at room temperature under vacuum to constant weight, which is the dry weight (W). The equilibrated water content of hydrogels (Wt%) was obtained according to the following equation: $Wt\% = (W_0 - W)/W_0 \times 100\%$.
- Optical properties of the resulting hydrogels were characterised by obtaining the refractive indices (RIs) of 500 μm flat, fully hydrated hydrogels equilibrated in PBS using an Abbe refractometer (Model C10, VEE GEE Scientific Inc., Kirkland, Washington) at 21 °C with bromonaphthalene as the calibration agent. Light transmission and back-scattering measurements were carried out at 21°C on a custom-built instrument equipped with a quartz halogen lamp for white light measurements as previously reported [24]. The percentage light transmission through the hydrogels was compared to the open beam intensity. The amount of backscattered light (%) from each sample was measured by the circular array of eight built-in photodiodes, angled at 30 degrees off axis.
- The mechanical properties (tensile strength, moduli and elongation at break) were determined using an Instron mechanical universal tester (Model 3342, Instron, Canton, MA) equipped with a 0.01 kN load cell and Instron Series IX/S software. Flat hydrogels (12 mm \times 5 mm rectangular strips, 0.44 mm thick) were measured. The gauge length of each specimen tested was 5 mm. The crosshead speed was 10 mm min⁻¹ and the sampling rate was 10 points s⁻¹. Implants were not pre-stressed. Measurements were taken at room temperature.

The morphology of the RHCIII-MPC hydrogels compared to human corneas and RHCIII hydrogels alone was examined using scanning electron microscopy (SEM). All samples were lyophilized to minimize the shrinkage of the human cornea and

collagen scaffolds due to the vacuum applied during freeze-drying and SEM imaging. Briefly, PBS-equilibrated samples of each construct or human eye bank corneas were frozen over night at -80 °C and then placed in the drying chamber of a lyophilizer at a condenser temperature of -40 °C and vacuum pressure of 0.8 Torr and dried for 7 hrs. The scaffolds did not collapse through the process while there was some degree of shrinkage for all test samples, e.g. 40% for human cornea and 50% for the biosynthetic collagen hydrogels due to the applied vacuum. The samples were then cut using a sharp surgical knife at a vertical angle to minimize the changes in the scaffolds' structure due to the cut and attached onto metal holders using conductive double-sided tape, and sputter coated with a gold layer for 60 seconds at 0.1 bar vacuum pressure (Cressington Sputter Coater 108) prior to SEM examination. SEM micrographs were taken at 25 kV at various magnifications on a scanning electron microscope (Model S-2250N, Hitachi, Japan). Comparisons were made against human eye bank corneas prepared in the same way.

Precision laser cutting of the hydrogels and tissue welding

Laser trephination (or cutting) of three cornea-shaped RHCIII-MPC hydrogels (12 mm in diameter and 500 µm thick) was carried out using a femtosecond laser (IntraLase™ FS Laser, Abott Medical Optics, Abbott Park, Illinois, USA). The laser was set to cut out a top-hat shaped implant from the hydrogel (one of the more common configurations for laser-assisted tissue trephination).

The cutting parameters used were 6.0 mm diameter of the anterior side cut, 8.0 mm diameter of the posterior side cut, and a depth of 250 µm for the lamellar cut. The energy for the ring lamellar cut, anterior side cut and posterior side cut were 2.80 µJ, 1.50 µJ and 1.50 µJ, respectively. For implant/tissue welding, matched complementary cuts were also made on excised porcine corneas (obtained from an abattoir) and RHCIII-MPC implants using the femtosecond laser (Wave Light GmbH Erlangen, Germany). RHC-MPCIII implants inserted into the matched donor cornea bed were welded together using standard riboflavin/dextran crosslinking techniques (1% riboflavin, 365 nm, 3 mW/cm², 30 min.) [25] using a MLase UV crosslinking device (MLase AG, Germering, Germany).

Microcontact printing on hydrogels

- RHCIII-MPC hydrogels containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4:1 were used for all μ CP. Flat-cast hydrogels were cut into approximately 2 cm \times 2 cm \times 500 μ m pieces and washed with 0.1 M PBS, pH 5.7 and dried under a nitrogen gas (N₂) stream prior to use. Free native carboxyl groups from the hydrogel surface were activated by immersing the samples in 2 ml of the PBS (pH 5.7) solution containing 10 mM EDC and 2.5 mM NHS for 15 min. All samples were rinsed for 30 s in fresh PBS buffer and dried with N₂ gas just before printing.
- 10 Square 1.5 cm \times 1.5 cm poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (Dow Corning, Midland, MI, USA) stamps were prepared using a previously published protocol [26]. To examine the attachment and proliferation of single human corneal epithelial cells, a stamp that comprised 30 μ m-wide protruding stripes separated by 60 μ m spaces was designed. To examine the attachment and spread of multiple cells, 200 μ m-wide stripes, separated by 200 μ m spaces were tested. Prior to printing, the PDMS stamps were thoroughly rinsed in ethanol, dried under a stream of nitrogen gas and treated with oxygen plasma (20 W power) for 30 s in plasma dry cleaner (Femto, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany). The stamps were then pre-loaded with "ink" comprising a 30 μ L solution of 0.5 mg/ml human fibronectin (FN) (Yo Proteins AB, Huddinge, Sweden) with 2 μ g/ml bovine serum albumin conjugated with fluorescent Texas Red (BSA-TR®; Invitrogen, Eugene, OR, USA) in 0.1 M PBS buffer, pH 8.0 for visualisation of the patterns. For cell seeding experiments, BSA-TR was omitted to avoid any unwanted nonspecific interactions between BSA-TR and cells. After 10 min. of incubation with "ink" at room temperature, the stamps were rinsed in water for 20 s and dried for 1 min. under a N₂ stream.

- The activated RHCIII-MPC samples were placed in a Petri dish and then the upper surfaces were dried carefully with the N₂ gas in preparation for μ CP. The bottom corners of the hydrogel samples were left in contact with water to prevent complete dehydration and therefore undesired deformation of the hydrogels. Surfaces then

were printed by applying the PDMS stamp onto the hydrogel surface. All printing was performed manually without any load, using the nitrogen stream to get the stamp into contact with the hydrogel surface. The stamp was left on for five minutes and then removed using tweezers. The patterned hydrogel surface was
5 incubated with a solution containing 10 mM (PEG)3NH2 (Molecular Biosciences, Boulder, CO, USA), in PBS, pH 8.0 for 40 min. to de-activate all remaining unreacted carboxyl groups. The surfaces were then carefully washed several times with fresh PBS, pH 7.3 and stored in this buffer solution prior to further use.

Characterization of printed hydrogels

10 To characterise the reproducibility of the μ CP patterns, the optically transparent patterned hydrogels were imaged using an Olympus BX51 upright microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 10x, NA 0.3 water immersion objective and a Peltier-cooled Fview II CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Fluorescence images of fibronectin- BSA-TR® patterns were
15 acquired and analysed using analySIS software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

The presence of FN in the micropatterns was confirmed by using a primary rabbit polyclonal antibody against FN (Abcam, Cambridge, UK), followed by a secondary antibody, donkey antirabbit IgG, conjugated with quantum dots Qdot655 (H+L)
20 (Life Technologies, USA). To investigate the effect of μ CP on the micro- and nano-topography of fully hydrated RHCI-MPC constructs, atomic force microscopy (AFM) measurements were carried out with the samples fully immersed in 0.1 M PBS buffer, pH 7.3 using a NanoWizard® 3 AFM microscope (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) mounted onto an Olympus IX81 (Olympus, Tokyo, Japan)
25 inverted optical microscope to allow for combined optical and AFM imaging of the same surface. Sample topography images were obtained in contact mode using SNL-10 (Bruker, Billerica, MA, USA) probes. Regions of interest for AFM analysis were selected with fluorescence microscopy to include the printed and unprinted zones of the surface within one large area (70 x 70 μ m²) scan. Several different size
30 scans were made. Images obtained were processed and the surface roughness was calculated using the region analysis tool within the AFM JPK data processing software.

Cytotoxicity evaluation

All samples with 30 μm and 200 μm patterned stripes, and control samples comprising deactivated and unmodified hydrogels, were placed into 24-well plates. Immortalized human corneal epithelial cells (HCECs) from a cell line [27] were
5 seeded onto the surface of the materials at a density of 2×10^4 cells per well. The HCECs were maintained in Keratinocyte Serum-Free Medium (KSFM; Life Technologies, Invitrogen, Paisley, UK) containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine pituitary extract and 5 ng/ml epidermal growth factor for 48 hours in a humidified 37 $^{\circ}\text{C}$ incubator. Cell viability was measured by using a Live/Dead staining kit (Life Technologies,
10 Invitrogen, Paisley, UK), where cells were double-stained by calceinacetoxymethyl (Calcein AM) and ethidium homodimer-1 (EthD-1). The live cells displayed green fluorescence while the dead cells fluoresced red.

Cell attachment and proliferation

Green fluorescence protein (GFP) transfected HCECs were employed to facilitate cell
15 counts. A stable GFP-HCEC cell line was established by transfection of HCEC with a vector containing a puromycin resistant gene together with GFP, using the Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Life Technologies, California, USA). Selection of puromycin resistant cells with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin added to the medium was performed to obtain stable GFP-lines. To examine proliferation rates
20 on the different surfaces, 6 mm hydrogel discs with 30 μm and 200 μm FN striped patterns, and PEG-NH₂ deactivated and unmodified samples, were placed within 96 well plates to fit snugly. Five thousand GFP-HCECs were seeded into each well. GFPHCECs were also seeded onto the tissue culture plate as a control for overall cell health. The cells were maintained in KSFM within a humidified 37 $^{\circ}\text{C}$
25 incubator with 5 % CO₂. Photomicrographs of the cells were taken at 2, 6, 24, 48 and 96 hours, using a fluorescence microscope (AxioVert A1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Counts were made by sampling three different 1290 x 965 μm^2 areas on each hydrogel surface.

Immunohistochemistry

GFP-HCECs were cultured on hydrogels for 4 days until when the cells reached confluence/near confluence on the patterns. Each sample was washed in 10 mM PBS, pH 7.4 and then fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS for 20 min. For permeabilization and blocking of unspecific binding, samples were incubated in PBS containing 0.25 % Triton X-100 for 10 min. and 5 % foetal calf serum (FCS) in PBST (0.05 % Tween-20 in PBS) (FCS/PBST) for 1 hour, respectively. Samples were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies diluted in FCS/PBST: anti-proliferating cell protein Ki67 antibody (1:600) (Sigma-Aldrich, MO, USA), anti-focal adhesion kinase (FAK) antibody (1:500) (Abcam, Cambridge, UK) and anti-integrin beta 1 (integrin β 1) antibody (1:200) (Abcam). After rinsing, the samples were exposed to the secondary antibody, Alexa Fluor-594 (1:400) (Invitrogen, Oregon, USA) at room temperature for 1 hour in the dark for visualisation. After another rinse, the samples were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (PromoKine, Heidelberg, Germany) for 1 min. as nuclear counterstain. All samples were given a final rinse prior to mounting and examination under a confocal microscope (LSM700, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). A total area of 50000 μ m² per sample was used for all the counts.

Results

20 *RHCIII-MPC hydrogels*

A range of adjustments in hydrogel formulations were tested for producing a mechanically reinforced material suitable for post-fabrication of the implants. These included a starting RHCIII content of 13.7%, 18% and 20%; different RHC:MPC ratios and EDC:RHCIII-NH₂ ratios. The resulting optical and mechanical properties of the hydrogels are given in Appendix A. The resulting enhancement in properties of RHCIII-MPC hydrogels after optimization of the above parameters as compared to previously published formulation. In both 13.7% and 18% RHCIII-MPC hydrogels, we found that a 2:1, RHCIII:MPC ratio with 0.4 EDC:RHCIII-NH₂ gave the optimal formulations.

Increasing of the collagen content from 13.7% to 18% decreased the water content from 90.1±2.4% to approximately 86% (85.5±0.2% for RHCIII-MPC and 86.0±0.2% for RHCIII only). Hence, it turned out that the MPC content did not make much of a difference. Additionally, the EDC:RHCIII-NH₂ ratio showed no obvious influence on the RI, while the RI increased with increasing MPC content within the gels.

The measured transmittance of white light decreased with the increased RHCIII concentration. Compared to the native cornea (transmittance: ~87%, backscatter: ~3%), however, all the RHCIII-MPC gels showed a higher transmittance and lower backscatter. The RHCIII only gels, on the other hand, exhibited a transmittance comparable to the native cornea (approx. 87%). All the cornea substitutes displayed a slightly lower RI of 1.35, which is that of water, compared to native cornea (1.37~1.38 [28]). In general, increasing the solids content of the hydrogels from 13.7% to 18% increased the tensile strength of RHCIII-MPC hydrogels from 1.29±0.31 MPa to 2.12±0.18 MPa. The tensile strengths of the 18% RHCIII only hydrogels were comparable to the 18% RHCIII-MPC hydrogels at 2.37±0.4 MPa. However, RHCIII only hydrogels were stiffer (an elastic modulus of 15.33±2.67 MPa) and less elastic (elongation at break of 28.21±2.01%) than corresponding RHCIII-MPC hydrogels (lower elastic modulus of 9.46±3.58 MPa; higher elongation at break of 33.34±3.87%). The 18% RHCIII-MPC hydrogels were more thermodynamically stable (T_d = 57.6 °C) than both the 18% RHCIII only (T_d = 53.1 °C) or 13.7% RHCIII-MPC hydrogels (T_d = 54.1 °C).

However, none were as stable as the native corneas (T_d = 65.1 °C). SEM imaging of cross-section of samples was performed for structural comparison of the produced RHCIII-MPC and RHCIII only hydrogels with native human corneas. A distinct lamellar structure could be seen for both human and biosynthetic corneas. The lamellar structure was observed throughout the entire cross-section of all samples while it was more homogeneous for the human cornea and better representative of the whole structure than that of the biosynthetic ones. In addition, the RHCIII-MPC hydrogels comprised lamellae-like layers interconnected by some tiny fiber-like structures, that better mimics the structure of the human cornea than the RHCIII crosslinked by EDC/NHS which had large lamellae without any inter-lamellar connections. However, the inner morphology of the biosynthetic corneas differed from their native counterpart in the number of lamella layers and the spacing

between layers. For example, the lamella-like layers in the biosynthetic corneas were thicker and their number was lower compared to lamellas of the native cornea. In addition, the spacing between the ordered lattice structures of the native cornea was smaller (~ 15 microns) than that of the biosynthetic corneas (~ 150
5 microns). The lamella spacing for the human cornea had a wide size distribution ranging from 2 to 40 microns. Overall, despite some similarities between the biosynthetic corneas and their natural counterparts, the human cornea has a much more complex microstructure with higher degree of interconnectivity, as expected.

10 *Precision laser profiling and tissue welding*

The optimized hydrogels were sufficiently robust to allow complete cutting of “top-hat” implants using the femtosecond laser. The resulting mean dimensions of the cuts were: anterior diameter of the 5.9 mm, posterior diameter of 8.1 mm, and depth of 260 μm for the lamellar cut. For example, RHCIII-MPC hydrogels
15 containing 18% RHCIII, with RHCIII:MPC = 2:1 and EDC:RHCIII-NH₂ (mol:mol) = 0.4 : 1 (designated RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4), which had shown good mechanical properties, cut well with the laser. Top-hat shaped gels with precisely cut edges could be obtained. However, hydrogels with the lower 13.7% RHCIII content (but otherwise with same proportions of MPC and EDC crosslinker), fell apart during
20 cutting.

Laser cut implants were successfully fitted into matched laser cut surgical beds. After riboflavin/UV-crosslinking, the implants remained permanently adhered to the corneal bed and sub-microscopical physical fibre-like connections were present between the implant and adjacent cornea when viewed by SEM. In contrast,
25 implants detached completely in controls without UV radiation.

Overall quality of the microcontact printed patterns

The most stable RHCIII-18/MPC(2/1)-E0.4 hydrogels which lent themselves well to laser profiling were also optimal for μCP . The results show typical resulting striped FN patterns as visualized by staining with an anti-fibronectin antibody. Analysis of

the fluorescence micrographs of the hydrogel samples confirmed good replication of the original patterns of the 30 and 200 μm stripes defined in the photolithographic mask production step. On the PDMS stamp, the width of the narrow stripes was $26.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (based on brightfield microscopy), while that of the printed FN stripes was $27.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$. The thick stripes on the PDMS stamps and the resulting FN patterns had widths of 190.6 ± 1.7 and $191.7 \pm 2.6 \mu\text{m}$, respectively. The good reproducibility indicated that uncontrolled FN ink diffusion on partially dried collagen hydrogel samples was minimal. On the samples printed with 30 μm stripe pattern, the printed area occupied approx. 37 % of the sample area, and approx. 32 % of the total hydrogel surface was patterned and defect-free. On the 200 μm striped samples, the printed sample area occupied 40 % of the sample and approximately 26 % of the total hydrogel surface was printed and free from printing defects. Also, FN ink distribution on the entire patterned surface was satisfactorily homogeneous.

15 *Atomic force microscopy*

The effect of μCP on the micro- and nanotopography of fully hydrated RHCIII-MPC hydrogels was determined by AFM analysis. The original, unmodified collagen hydrogel surfaces appeared uneven, with irregularly arranged surface fibrils visible. The root mean square (RMS) of surface roughness as measured within a representative $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ scan area was 3.5 nm.

The regions of interest (ROIs) for AFM scans on the chemically activated and microcontact printed samples were identified by simultaneous fluorescence microscopy imaging. The AFM tip was positioned in the ROIs that were patterned with FN and BSA-TR® mixture. In topography images of the hydrogel surface after μCP and/or deactivation, the collagen fibrils appeared to be partially aligned, in contrast to the unmodified surface. However, the fine details of the collagen fibrils could not be resolved. There was no distinct overall height difference between the majority of the printed and adjacent unprinted area, either due to the high initial surface roughness and/or due to the ability to print a very thin, possibly monolayer thickness of FN. The edges of the stripes, however, were slightly corrugated by the printing and served to delineate the stripe boundaries. The RMS surface roughness of the FN-printed and unprinted regions on this particular sample, was very

similar, at 1.3 nm and 1.4 nm, respectively. The AFM analysis therefore showed that the μ CP resulted only in a very small change in the surface topology.

Effect of patterning on cytotoxicity, cell adhesion and proliferation

Printing with PDMS stamps can result in a slight contamination of the sample
5 surface with loose PDMS particles, but these can be removed by subsequent
sample deactivation and washing steps. Live/dead staining performed indeed
showed that there were no cytotoxic effects from the patterning. The numbers of
dead cells (stained red) were negligible: 0 in most of the samples, 1-2 cells in a few
others.

10 Analysis of the proliferation of HCECs on the different surfaces over time showed
obvious differences between the patterned and non-patterned samples. The only
two types where the growth rate could not be told apart ($P > 0.05$) were the
unmodified and deactivated RHCIII-MPC surfaces. The total number of cells
15 counted per a defined ROI was highest on the hydrogels patterned with 200 μ m
stripes. However, when taking into account that the total FN-coated surface area
per ROI was two times less on the 30 μ m pattern than on the 200 μ m pattern, the
results show that the thinner stripes yielded approx. 26% more cells after
normalization of the surface areas.

Immunohistochemistry and cell behaviour

20 The results show the behaviour of cells on the different surfaces. The integrin β 1
family, which is involved binding ECM macromolecules including collagen and
fibronectin, was expressed by HCECs growing on all groups. The proportion of
integrin β 1-expressing cells in the deactivated surfaces, 30 and 200 μ m patterns,
respectively, were significantly different from those growing on the unmodified
25 RHCIII-MPC hydrogel surfaces, with the highest expression on the 30 μ m stripes,
although not that significantly different from the 200 μ m stripes and deactivated
surfaces ($P > 0.05$). Immunohistochemical localization of FAK-positive cells showed
that significantly more cells were growing on the 30 μ m striped patterns that were
positively stained ($P \leq 0.05$) than those of the other groups. Staining for the Ki67

protein associated with cell proliferation showed that the samples with 30 μm striped patterns supported a significantly larger proportion ($P \leq 0.05$) of positively stained cells than the other groups.

CLAIMS

1. A method of modifying a hydrogel comprising:
 - a) providing a hydrogel surface wherein the hydrogel comprises a cross-
5 linked polymer network comprising
at least one first polymer and at least one second polymer wherein the
first polymer comprises collagen and/or collagen mimetic peptide (CMP)
comprising methacrylate and/or acrylate functional groups and the
second polymer comprises a synthetic polymer having at least two
10 functional groups selected from thiol, acrylate and/or methacrylate;

wherein the first and the second polymers are cross-linked via said
functional groups; and

wherein the hydrogel is transparent (i.e. a light transmission of at least
80% of light in the wavelength range of 400-700 nm);
 - 15 b) applying surface compounds selected from polyethylene glycol (PEG)-
acrylate polymer/monomers, PEG-methacrylate polymer/monomers,
other acrylate, methacrylate, carboxyl, amino, amide, epoxide, hydroxyl,
cyano, nitride, sulfanamido, acetylenyl, alkene, esters like imidoesters(N-
hydroxysuccinimide ester) or pentafluorophenol ester or other, azide, thiol,
20 maleimide, functionalized PEG derivatives, bifunctional compounds,
drugs, bioactive substances, biological molecules including proteins or
peptides to said surface; and
 - c) treating the applied surface compounds by microcontact printing or
photolithography or inkjet, or any other fabrication technique in order to
25 create a pattern of said surface compounds.
2. The method according to claim 1 wherein the surface compound is selected
from fibronectin or vitronectin.

3. The method according to claim 1 or 2 wherein the functional groups of the second polymer are thiol.
4. The method according to any one of claims 1 to 3 wherein the first polymer is a collagen mimetic peptide (CMP) connected to a template wherein said
5 template is a polymer having at least two arms or is a dendrimer and wherein the template comprises functional groups forming secondary bonds such as hydrogen bonds or dipole-dipole bonds with the CMP, for example multiarm PVC or multiarm PEG.
5. The method according to any one of claims 1 to 4 wherein the second
10 polymer comprises a polymer selected from functionalized polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol-diacrylate (PEGDA), PEG methacrylate (PEGMA), poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEM), poly(pentaerythritol triacrylate) or poly(N-isopropylacryl amide) (PNIPAAm).
- 15 6. The method according to any one of claims 1 to 5 wherein the second polymer is PEG with thiol functional groups.
7. The method according to claim 6 wherein the pattern is in the shape or lines or dots having a maximum width or diameter of 10 nm or more.
8. The method according to any of the preceding claims wherein maximum
20 width or diameter of the pattern is from 20 μm or more.
9. The method according to any of the preceding claims wherein the elastic modulus is at least 1 MPa, or at least 5 MPa.
10. The method according to any of the preceding claims wherein the collagen or
25 CMP are present in the form of fibrils and wherein the fibrils are essentially uniaxial orientated.
11. The method according to claim 1 wherein the surface compounds are selected from polyethylene glycol (PEG)-acrylate polymer/monomers and/or PEG-methacrylate polymer/monomers.
12. A hydrogel obtained by the method according to any one of claims 1 to 11.

FIGURES

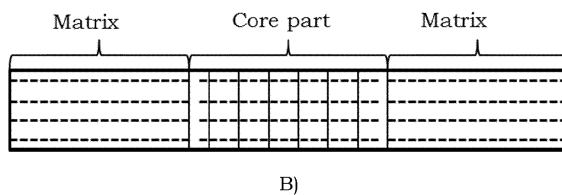
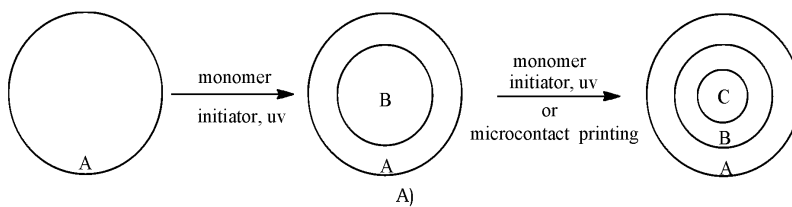


Figure 1.

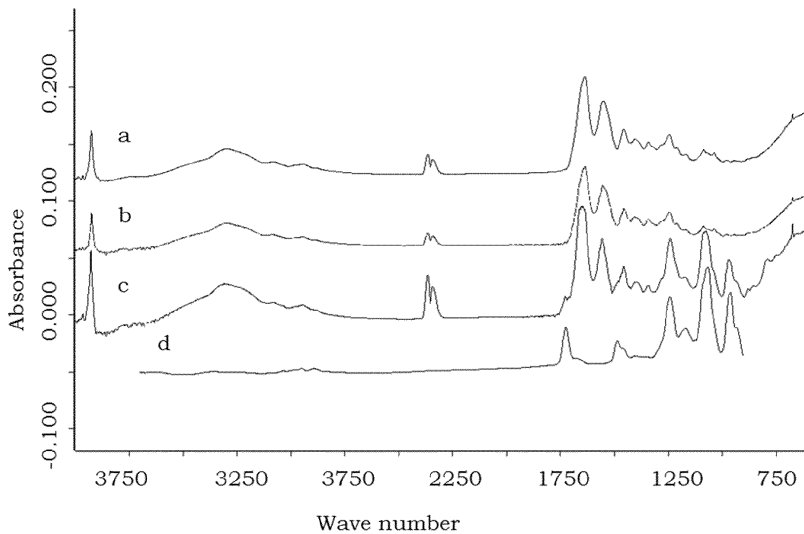


Figure 2.

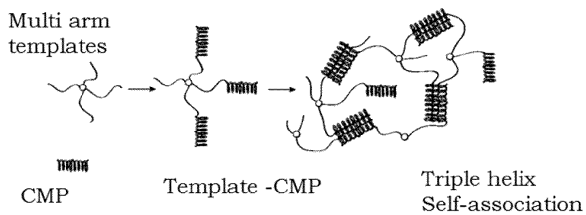


Figure 3.

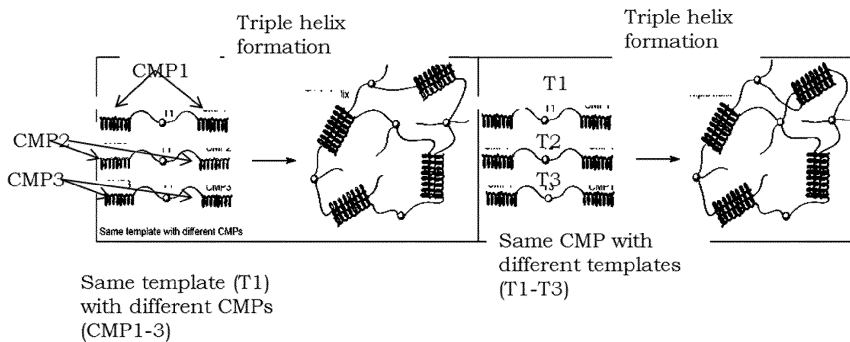


Figure 4

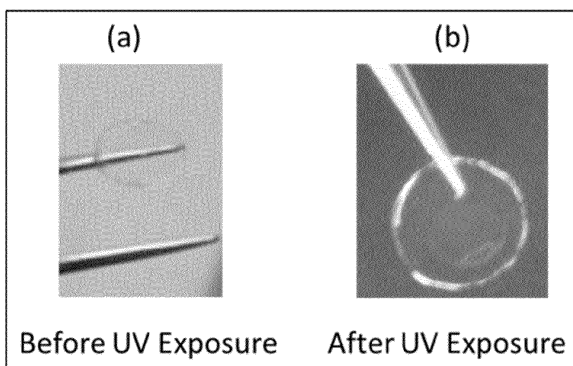


Figure 5.

4/6

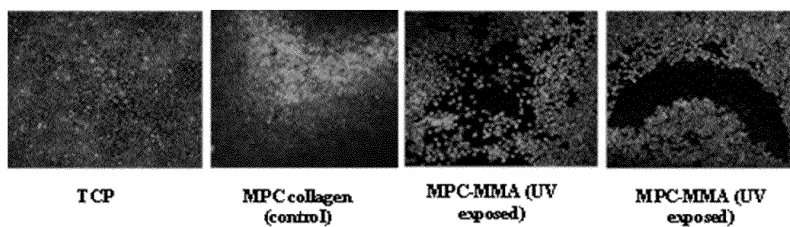
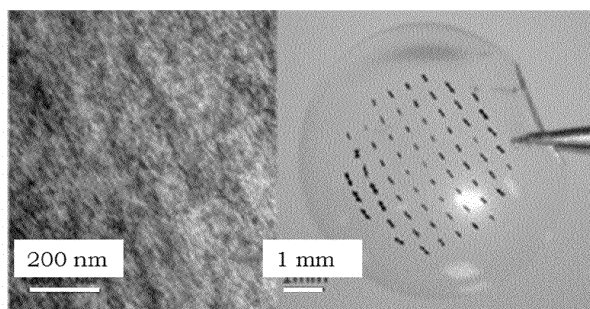
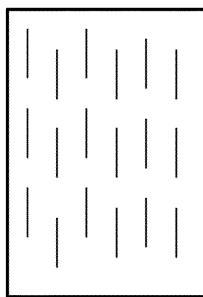


Figure 6.



A)



B)

5/6

Figure 7.

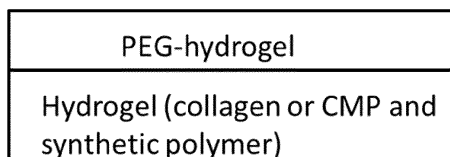


Figure 8.

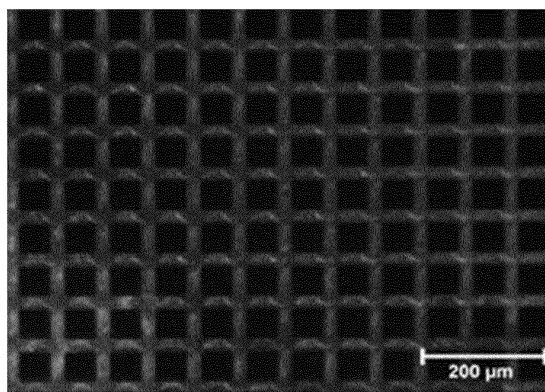


Figure 9.

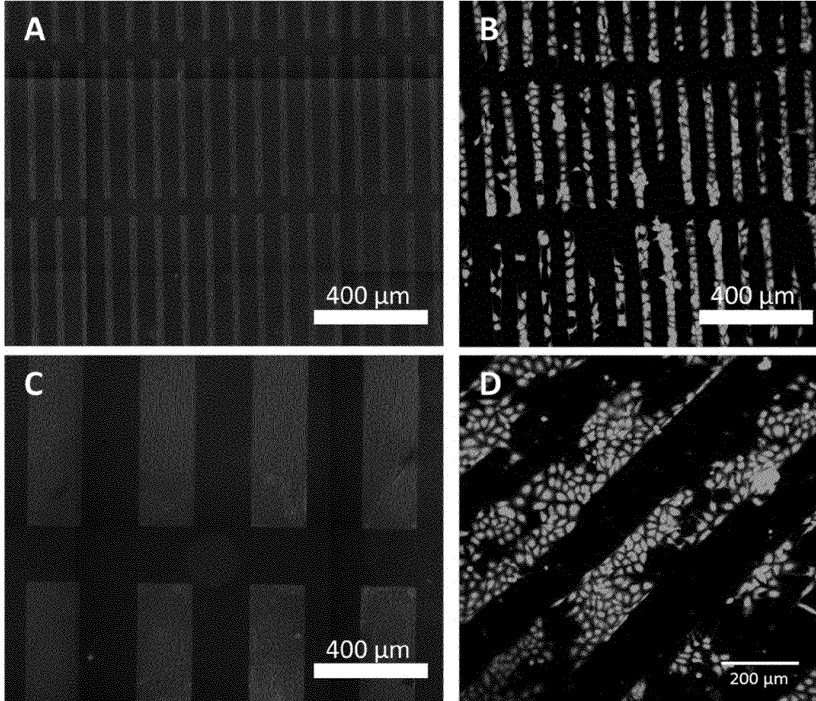


Figure 10.

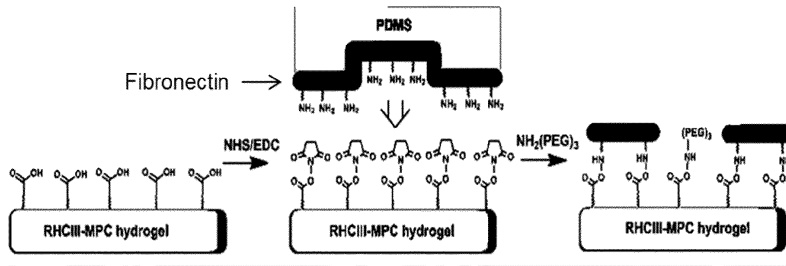


Figure 11.

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.