

ELASTYCZNE PODŁOŻA POLIAKRYLOAMIDOWE DO BADAŃ KOMÓRKOWYCH

KAROLINA ZAMORA^{1*}, DANIEL DZIUB¹, JUSTYNA NOWAK¹,
WOJCIECH PIEKARCZYK², ZENON RAJFUR¹, JADWIGA LASKA²

¹ UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, INSTYTUT FIZYKI,
UL. REYMONTA 4, 30-059 KRAKÓW

² AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

* E-MAIL: KAROLINA.ZAMORA@GMAIL.COM

Streszczenie

Podłoża do hodowli komórkowej charakteryzują się różnymi właściwościami mechanicznymi, które mogą mieć znaczący wpływ na zachowanie komórek. Szczególnie ciekawy typ podłoży stanowią hydrożele akryloamidowe, zarówno ze względu na łatwość ich syntezy, jak i na fakt, iż poprzez niewielkie zmiany ilości substratów wykorzystywanych w wytwarzaniu tych podłoży, można uzyskać podłoża znacznie różniące się elastycznością. Dodatkową zaletą hydrożeli akryloamidowych jest to, że pomimo znacznych różnic elastyczności, biogodność i bioaktywność pozostają niezmienione.

W niniejszym artykule skupiono się na opisie syntezy podłoży akryloamidowych do hodowli komórkowej, a także na scharakteryzowaniu ich cech mechanicznych i sprawdzeniu wpływu elastyczności podłoży na hodowlę rybich komórek keratynocytowych. Keratynocyty to komórki, których hodowla jest niewymagająca, w porównaniu do innych linii komórkowych, gdyż mogą one być hodowane bez konieczności wykorzystywania drogich pożywek, a także bez konieczności inkubowania w temperaturze 37°C.

W pracy szczegółowo opisano sposób wytwarzania podłoży akryloamidowych o różnych stopniach elastyczności. Hydrofilowość otrzymanych podłoży sprawdzano metodą goniometryczną poprzez pomiar kąta zwilżania. Istotną częścią eksperymentu było określenie właściwości mechanicznych otrzymanych podłoży poprzez pomiar prędkości rozchodzenia się podłużnej fali ultradźwiękowej. W ten sposób porównano właściwości mechaniczne czterech podłoży różniących się modulem elastyczności. Stwierdzono, iż największe prędkości rozchodzenia się fal dotyczą próbek o najniższym module elastyczności, co świadczy o największym upakowaniu cząsteczek polimeru i pośrednio potwierdza najwyższy stopień usieciowania polimeru.

Otrzymane podłoża posłużyły jako matryce do hodowli keratynocytów, których migrację obserwowano pod mikroskopem. Zaobserwowano znaczne różnice w zachowaniu się komórek, szybkości ich migracji oraz przyjmowaniu kształtu wskazującego stresogenne działanie podłoży o niskim module elastyczności rzędu kilku kPa oraz korzystne oddziaływanie podłoży twardych o module elastyczności >30 kPa.

Słowa kluczowe: podłoża poliakryloamidowe, elastyczność, hydrożele, keratynocyty

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 11-18]

ELASTIC POLYACRYLAMIDE SUBSTRATES FOR CELL STUDIES

KAROLINA ZAMORA^{1*}, DANIEL DZIUB¹, JUSTYNA NOWAK¹,
WOJCIECH PIEKARCZYK², ZENON RAJFUR¹, JADWIGA LASKA²

¹ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF PHYSICS,
UL. REYMONTA 4, 30-059 KRAKÓW, POLAND

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

* E-MAIL: KAROLINA.ZAMORA@GMAIL.COM

Abstract

Cell culture substrates show different mechanical properties, that may have significant influence on behavior of cells. Acrylamide hydrogels are particularly interesting substrates, due to both the ease of their synthesis and the fact, that by small changes in the amounts of reactants used in their manufacturing process, one can obtain substrates of significantly different elasticity level. An additional advantage of acrylamide hydrogels is that despite of significant changes in elasticity they exhibit no changes in biological properties.

This article is focused on the synthesis of acrylamide substrates for cell culturing, characterization of their mechanical properties, and also on searching the influence of elasticity of the substrates on culture of fish keratinocytes. Keratinocytes are cells, which culture is simplified, compared to other cell lines, since they may be cultured without usually expensive nourishments and the necessity of incubation at 37°C.

The detailed description of the synthesis of acrylamide substrates of different levels of elasticity is given in this paper. Hydrophilicity of the obtained substrates was also investigated by testing the contact angle by goniometric method. An important part of the experiment was determining mechanical properties of the obtained substrates by measuring velocity of propagation of ultrasonic longitudinal wave for substrates of different elasticity modules. In that way comparison of the elasticity of the four different substrates was possible. It has been found, that the largest wave propagation velocity refers to the samples of the lowest elastic modules, what proves the highest degree of cross-linking in these hydrogels.

The established substrates were used as matrices for keratinocytes culture, which migration was observed under the microscope. Depending on the substrate significant differences in cell behavior, their migration velocity, and shape changing has been observed. The soft hydrogels with elasticity modulus less than several kPa were stressful for the cells while hard ones with elasticity of >30 kPa were beneficial.

Keywords: polyacrylamide substrates, elasticity, hydrogels, keratinocytes

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 11-18]

Podłoża stosowane w hodowlach komórek i tkanek charakteryzują się różnymi właściwościami mechanicznymi, które bezpośrednio wpływają na zachowanie kultur komórkowych. Również mikrostruktura wszczepianego materiału może mieć znaczący wpływ na zachowanie komórek znajdujących się w rejonie implantu. Zachowanie komórek na powierzchniach krawędzi, rowków bądź innych elementów topograficznych odbiega od odpowiedzi komórek osadzanych na gładkich podłożach. W wielu przypadkach komórki reagują na zmianę topografii poprzez ukierunkowanie migracji np. wzdłuż grzbietów i włókien na podłożach [1].

Wśród licznych materiałów stosowanych do wyrobu podłoży do hodowli komórkowych szczególnie popularne są hydrożele polimerowe. Stały się one popularne w latach 50. dwudziestego wieku - pierwszym materiałem hydrożelowym użytym jako implant medyczny był poli(alkohol winylowy), wyprodukowany w formie gąbki. Do wytwarzania materiałów hydrożelowych stosuje się zarówno polimery biodegradowalne, jak i syntetyczne. Biokompatybilne hydrożele polimerowe znajdują szerokie zastosowanie w biomedycynie i farmacji, szczególnie w kontrolowanym dostarczaniu i uwalnianiu leków, inżynierii tkankowej oraz medycynie regeneracyjnej [2,3].

Żele polimerowe to materiały będące połączeniem cieczy z ciałem stałym, w których luźno usieciowana matryca polimerowa tworzy trójwymiarową sieć wypełnioną płynami, ale nie rozpuszcza się w nich. Ilość płynów zaabsorbowanych przez żel może być dużo większa niż ilość polimeru. Trójwymiarowy charakter matrycy polimerowej zapewnia swoistą równowagę struktury żelu – zwiększenie żelu wzrasta wraz ze wzrostem długości mostków sieciujących i odległości między nimi.

W niniejszej pracy wykorzystano żele poliakryloamidowe, wytworzone z akryloamidu usieciowanego bisakryloamidem. Przez kontrolowane zmiany stężenia tych dwóch składników można otrzymać szereg podłoży o różnej elastyczności, przy czym sieciowanie żeli poliakryloamidowych nie wpływa znacząco na wymiary matrycy. Żele te można poddać aktywacji i pokryć wybranymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej przed rozpoczęciem hodowli komórkowej, co daje możliwość niezależnego sterowania właściwościami mechanicznymi i biologicznymi podłoża. Ponadto żele poliakryloamidowe są izotropowe i sprężyste (powracają do pierwotnego kształtu po odjęciu sił odkształcających), co sprawia iż możliwe jest wykonanie obliczeń charakteryzujących deformacje obszarów podłoża. Rozmiary porów nie przekraczają 100 nm, co uniemożliwia migrację komórek w głąb podłoża [10]. Przedstawione badania dotyczyły migracji keratynocytów, czyli komórek nabłonkowych. U ssaków komórki te wraz ze wzrostem ulegają procesom rogowacenia, co pozwala im pełnić funkcje ochronne [4]. W przypadku rybich keratynocytów tylko u wybranych gatunków następuje obumieranie komórek naskórka. W większości przypadków rybi naskórek pokryty jest warstwą śluzu pełniącego rolę warstwy ochronnej w środowisku wodnym [5]. Ważną cechą charakterystyczną tego typu komórek jest migracja posiadająca podobny mechanizm jak w przypadku gojenia się ran. A zatem komórki migrują, gdy nie wyczuwają obok siebie innych komórek. W celu przemieszczenia się, opisywane komórki tworzą płaskie wysunięcie błony komórkowej – lamellipodium. Fazy ruchu keratynocytów nie są wyraźnie rozdzielone w czasie, lecz toczą się równolegle i w efekcie migracja odbywa się płynnie.

Rybie keratynocyty są często używane w badaniach komórkowych ze względu na liczne zalety, wśród których warto wymienić między innymi: niewymagające warunki hodowli i obserwacji (brak konieczności stabilizowania temperatury i stężenia CO₂) oraz łatwość ich pozyskiwania.

Substrates used in cell studies and tissue engineering differ in mechanical properties, that directly influence behavior of cell cultures. Also, the microstructure of implanted material can have a significant impact on behaviour of cells residing in the region of implant. The behavior of the cells on edges, grooves or other topographical elements differs from the response of cells cultured on smooth surfaces. In many cases, cells respond to the changes in topography by directing their migration, for example along the grooves and fibres of the substrate [1].

Among many materials applied for cell culturing, especially popular ones are polymer hydrogels. They became popular in the 1950s. The first hydrogel material used as a medical implant was poly(vinyl alcohol) produced in the form of a sponge. Both, natural and synthetic polymers are used for manufacturing hydrogel materials. Biocompatible polymer hydrogels are widely used in biomedicine and pharmacy, particularly in controlled delivery and release of drugs, tissue engineering and regenerative medicine [2,3].

Polymer gels are materials that are combination of a liquid and a solid, where loosely crosslinked polymeric matrix forms a three dimensional network, that is filled with fluid, but does not dissolve in it. The amount of liquids absorbed by gel can be much greater than the amount of the polymer. The three-dimensional character of polymer matrix provides a unique balance of the gel structure – swelling of the gel increases with the increase of crosslinks length and the distance between them.

In this work, polyacrylamide gels produced from acrylamide crosslinked with bis-acrylamide were used. By controlling changes of the concentration of these two components, a number of substrates of different elasticity can be produced, wherein the crosslinking does not significantly affect the dimensions of the matrix. These gels may be activated and coated with selected extracellular matrix proteins before the start of cell culture, which allows for independent control of the mechanical and biological properties of the substrate. Moreover, polyacrylamide gels are isotropic and resilient (they return to original shape after removal deformation forces), which makes possible to perform calculations characterizing the deformation of the substrate. The size of the pores does not exceed 100 nm, which prevents cells from migration into the substrate [10]. Results presented in this article refer to the migration of keratinocytes that are epithelial cells. In mammals these cells usually keratinize while growing, which enables them to perform their protective functions [4]. In the case of fish keratinocytes, death of epidermal cells occurs only among selected species. In most cases fish skin is covered with the layer of mucus, that acts as a protective layer in the aquatic environment [5]. An important attribute of these kinds of cells is migration, which mechanism is similar to wound healing. Thus, cells migrate when they do not sense other cells nearby. In order to move, keratinocytes form a flat protrusion of the cell membrane – lamellipodium. Movement phases of keratinocytes are not clearly separated in time, but run simultaneously, resulting in smooth migration.

Fish keratinocytes are often used in cell studies because of their numerous advantages, among which worth mentioning are undemanding culture and observation conditions (lack of necessity to stabilize the temperature and concentration of CO₂), and effortless procuring.

Poza wyżej wymienionymi zaletami, keratynocyty są interesującym obiektem w badaniach podstawowych także z powodu względnie stałego kształtu podczas migracji oraz dużej szybkości przemieszczania się, co wyraźnie skraca czas zbierania danych. Ciało komórki jest w przybliżeniu eliptyczne, zaś uwzględniając lamellipodia można jej kształt określić jako wachlarzowaty [6].

Materiały i metody

Do otrzymywania hydrożeli oraz funkcjonalizacji podłoży użyto następujących odczynników:

- akryloamid - 40% roztwór wodny (BioRad)
- N,N'-metylenbisakryloamid - 2% roztwór wodny (BioRad)
- (3-aminopropyl)trietyloksysilan (APTES) (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (BioRad)
- nadsiarżan amonu (APS) (BioRad)
- woda destylowana H₂O^{dd}
- aldehyd glutarowy - 0,5% roztwór wodny (BioRad)
- kwas 1-[6-[(4-azydo-2-nitrofenylo)amino]heksanoiloksy]-2,5-dioksopirrolidyno-3-sulfonowy (sulfo-SANPAH) (BioRad)
- sztuczny płyn fizjologiczny PBS (phosphate-buffered saline) – 1 litr PBS przygotowano w laboratorium poprzez zmieszanie w roztworze wodnym: wodorosiarczanu(VI) sodu - 8,599 g (Sigma-Aldrich), diwodorosiarczanu(VI) potasu - 2,177 g (Sigma-Aldrich) oraz chlorku sodu - 9,002 g (Sigma-Aldrich).

Morfologię podłoży scharakteryzowano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (Nova 200 NanoSEM). Hydrofilowość oznaczono metodą goniometrii (DSA10Mk2 Kruss). Prędkość przejścia fal ultradźwiękowych przez żele zmierzono na aparacie CT-3 z głowicami o częstotliwości 1 MHz.

Wyniki i dyskusja

Otrzymywanie podłoży akrylanowych o różnej sztywności

W tej pracy skupiono się na hydrożelach poliakryloamidowych (PAM), różniących się między sobą sztywnością, jako podłożach do hodowli komórkowych. Poliakryloamid jest całkowicie biogodny pomimo tego, że monomer jest silnie toksyczny. Bardzo dużą zaletą tego typu materiału jest to, iż moduł sprężystości można bardzo łatwo zmienić przez zmianę względnych stężeń akryloamidu i bisakryloamidu. Pomimo zmiany właściwości mechanicznych PAM chemiczna budowa powierzchni żelu nie ulega zmianie [7,8]. Dzięki temu, że rozmiary porów w żelach poliakryloamidowych są mniejsze niż 100 nm, komórki nie migrują do wnętrza żelu [9,10]. Wielkość porów została określona na podstawie obrazów SEM (RYS. 1).

Żele poliakryloamidowe o różnej elastyczności otrzymano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej w literaturze [10]. Ilości użytych odczynników zostały zebrane w TABELI 1.

Polimeryzacja akryloamidu zachodziła zgodnie z mechanizmem rodnikowym. Schemat zachodzącej reakcji przedstawiono na RYS. 2.

Katalizatorami reakcji były N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), natomiast nadsiarżan amonu był inicjatorem reakcji wolnorodnikowej. Proces polimeryzacji przebiegał w środowisku wodnym. Kolejność dodawania składników była istotna ze względu na dużą szybkość reakcji polimeryzacji. Pierwszym krokiem było zmieszanie odpowiednich ilości akryloamidu, bisakryloamidu z wodą destylowaną. Następnie bardzo szybko dodawano kolejno APS oraz TEMED. Pobierano po 0,1 ml tak otrzymanej mieszaniny i przenoszono na szkiełka mikroskopowe, po czym nakrywano kroplę mniejszym szkiełkiem i pozostawiano do całkowitej polimeryzacji.

In addition to these advantages, keratinocytes are also interesting objects in basic research because of their relatively unchanging shape during migration, and their high speed of movement, which clearly reduces the time of data collecting. Cell body is approximately elliptical, only when considering lamellipodia, its shape could be specified as a fan-shaped [6].

Materials and methods

For the preparation of hydrogels and functionalization of substrates following reagents were used:

- acrylamide - 40% water solution (BioRad)
- N,N'-metylenebisacrylamide - 2% water solution (BioRad)
- (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (BioRad)
- ammonium persulfate (APS) (BioRad)
- distilled water H₂O^{dd}
- glutaraldehyde - 0.5% water solution (BioRad)
- 1-[6-[(4-azydo-2-nitro-phenyl)amino]hexanoyloxy]-2,5-dioxy-pyrrolidine-3-sulfonic acid (sulfo-SANPAH) (BioRad)
- synthetic physiological fluid PBS (phosphate-buffered saline) – 1 liter of PBS was prepared in laboratory by mixing in water solution: sodium bisulfate(VI) - 8.599 g (Sigma-Aldrich), potassium dihydrosulfate(VI) – 2.177 g (Sigma-Aldrich) and sodium chloride – 9.002 g (Sigma-Aldrich).

The morphology of the substrates was characterized by scanning electron microscopy (Nova 200 NanoSEM). The hydrophilicity was determined by the method of goniometry (DSA10Mk2 Kruss). The velocity of transition of ultrasonic waves through gels was measured with a CT-3 apparatus with heads of 1 MHz frequency.

Results and Discussion

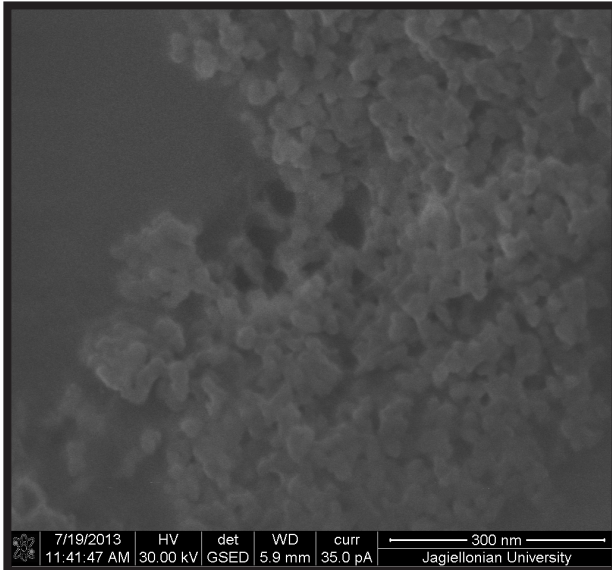
Preparation of acrylate substrates of different stiffness

This work is focused on polyacrylamide hydrogels (PAM) of various stiffness as substrates for cell studies. Polyacrylamide is biocompatible despite the fact that the monomer is highly toxic. One major advantage of this kind of material is the possibility of easy change of the elasticity modulus, by varying the relative concentrations of acrylamide and bis-acrylamide. Despite the change of mechanical properties of PAM, chemical structure of the gel surface does not change [7,8]. Because the pore sizes in polyacrylamide gels are smaller than 100 nm, the cells do not migrate into the interior of the gel [9,10]. Pores size was estimated from SEM images (FIG. 1).

Polyacrylamide gels of different elasticity were prepared according to the procedure previously described in the literature [10]. The amounts of used reagents together with the elasticity modules are summarized in TABLE 1.

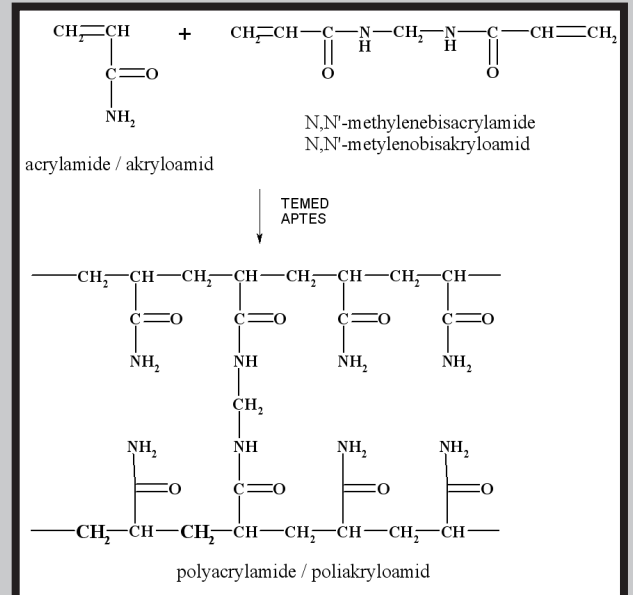
Acrylamide polymerization occurred according to the radical mechanism. The scheme of the reaction taking place is presented in FIG. 2.

The catalyst for the reaction was N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and the free radical polymerization initiator was ammonium persulfate (APS). The polymerization process was carried out in an aqueous medium. The order of addition of the reagents was important due to the high speed of polymerization reaction. The first step was mixing the appropriate amounts of acrylamide, bis-acrylamide and distilled water. Then, APS and TEMED were added successively. After that, 0.1 ml of the mixture was transferred onto microscope coverslip glass. Then the smaller glass was used to cover the drop and was left to complete the polymerization.



RYS. 1. Zdjęcie SEM wysuszonego hydrożelu poli(akryloamido-co-N,N'-metylenobisakryloamidowego).

FIG. 1. SEM image of dried poly(acrylamide-co-N,N'-methylenebisacrylamide) hydrogel.



RYS. 2. Schemat reakcji kopolimeryzacji akryloamidu i N,N'-metylenobisakryloamidu.

FIG. 2. Scheme of copolymerization of acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide.

TABELA 1. Odczynniki używane w przygotowaniu podłoży poliakryloamidowych.
TABLE 1. Reagents used in the preparation of polyacrylamide substrates.

Nr próbki Sample No.	Ilość użytego roztworu akryloamidu The amount of used acrylamide solution [ml]	Ilość użytego roztworu bis-akryloamidu The amount of used bis-acrylamide solution [ml]	Woda destylowana Distilled water [ml]	TEMED [ml]	APS [ml]	Moduł elastyczności według [10] Elasticity modulus according to [10] [kPa]
1	0.75	0.75	8.5	0.1	0.01	1.37±0.22
2	1.0	1.5	7.5	0.1	0.01	3.24±0.58
3	2.5	1.5	6.0	0.1	0.01	34.88
4	2.0	2.4	5.6	0.1	0.01	40.40±2.39

Układ zalewano roztworem PBS w celu wymycia pozostałości monomeru. Ilości monomeru i czynnika sieciującego dobrano na podstawie literatury tak, by otrzymane hydrożele znacząco różniły się modułem elastyczności E [10]. Oczekiwane wartości modułów E były następujące: próbka 1 – 1,37±0,22 kPa, próbka 2 – 3,24±0,58 kPa, próbka 3 – 34,88 kPa, próbka 4 – 40,40±2,39 kPa. Numery próbek zgodne są z TABELĄ 1.

Otrzymane hydrożele charakteryzowały się bardzo gładką powierzchnią, co stwierdzono w obserwacjach w skaningowym mikroskopie elektronowym. Morfologia próbek była identyczna niezależnie od sztywności hydrożelu.

Szkiełka, na których osadzano podłoża były wcześniej odpowiednio modyfikowane powierzchniowo. Pierwszym etapem modyfikacji była silanizacja przy pomocy 0,5% wodnego roztworu 3-aminopropylotrietoksylanu (APTES). Każde szkiełko trzymano w roztworze silanu przez 10 minut, a następnie płukano w wodzie destylowanej przez 20 minut. Po wysuszeniu powierzchnia była aktywowana przy pomocy 0,5% wodnego roztworu aldehydu glutarowego. Reakcja aktywacji trwała 30 minut. Na RYS. 3 zobrazowano reakcje zachodzące na powierzchni szkła po silanizacji.

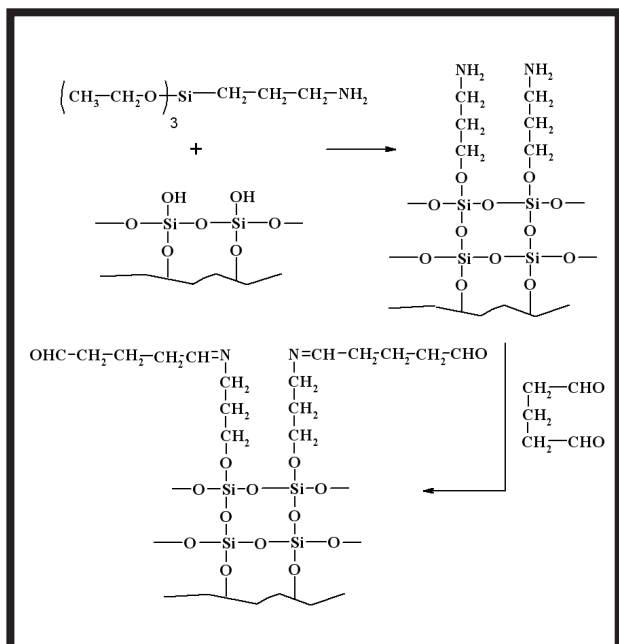
Migracja komórkowa jest bezpośrednio związana z tworzeniem punktów adhezyjnych. Aby do tego doszło na powierzchni hydrożelu muszą znajdować się odpowiednie białka macierzy pozakomórkowej. W celu immobilizacji białek na powierzchni podłoży przeprowadzono funkcjonalizację przy pomocy heterobifunkcyjnego związku sieciującego sulfo-SANPAH, którego wzór strukturalny znajduje się na RYS. 4.

PBS solution was poured over the system to rinse the residual monomer. The amounts of monomer and crosslinking agent were selected based on the literature data, so that the received hydrogels were of different elasticity modulus E. The expected values of modulus E according to [10] were as follows: sample 1 – 1.37±0.22 kPa, sample 2 – 3.24±0.58 kPa, sample 3 – 34.88 kPa, sample 4 – 40.40±2.39 kPa. Sample numbers are in accordance with TABLE 1.

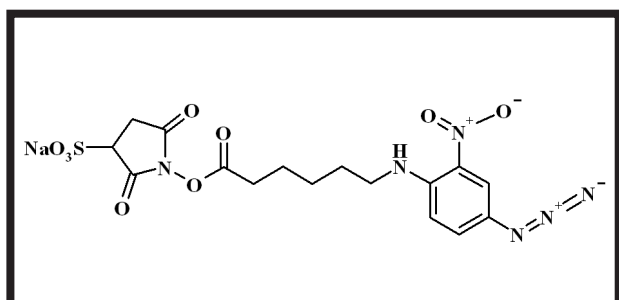
The all obtained hydrogels showed a very smooth surface, which was found in the observations in the scanning electron microscope. The morphology of the samples was the same, regardless on the stiffness of the hydrogel.

The glasses, on which substrates were deposited, were previously modified on their surface. The first step of modification was silanization by 0.5% water solution of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Each glass was kept in silane solution for 10 minutes, and then rinsed with distilled water for 20 minutes. After drying, the surface was activated with 0.5% glutaraldehyde solution. The activation reaction lasted 30 minutes. Creation of the silanized surface of glass is presented in FIG. 3.

Cell migration is directly related to the formation of points of adhesion. For this to occur, there have to be appropriate extracellular matrix proteins on the surface of the hydrogel. In order to immobilize proteins on the surface of the substrates, functionalization with the use of a crosslinker – sulfo-SANPAH, which structural formula is illustrated in FIG. 4, was carried out.



RYS. 3. Proces silanizacji powierzchni szkła.
FIG. 3. Silanization process of glass surface.

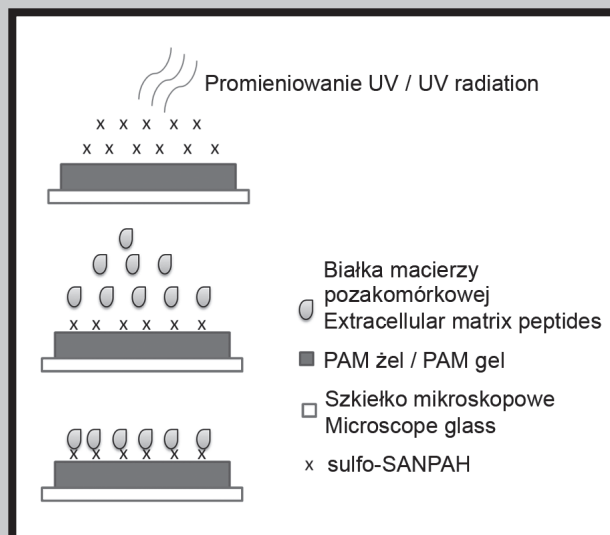


RYS. 4. Budowa chemiczna sulfo-SANPAH.
FIG. 4. Chemical structure of sulfo-SANPAH.

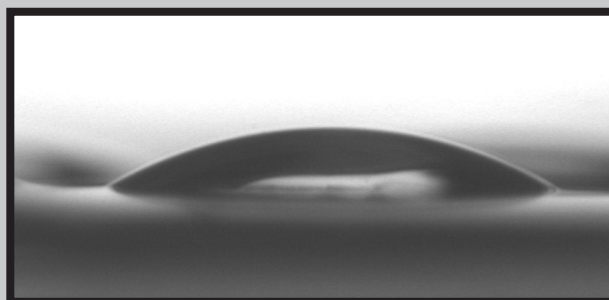
Reakcja przyłączenia sulfo-SANPAH do powierzchni poliakryloamidowej jest katalizowana przez promieniowanie UV o długości fali od 320 do 350 nm. Jest to możliwe dzięki obecności w strukturze fotoreaktywnej grupy nitrofenyloazydowej. W trakcie procesu funkcjonalizacji powstają wiązania kowalencyjne, które powodują, że cząsteczka jest silnie związana z powierzchnią żelu. Schematycznie funkcjonalizacja podłoża pokazana jest na RYS. 5.

Hydrofilowość otrzymanych poliakryloamidów

Podłoża różniące się stopniem usieciowania i w związku z tym elastycznością, poddano badaniom kąta zwilżania metodą goniometryczną. Przed wykonaniem badania żele wyciągano z PBSu i suszono przez 60 minut. Krople nanoszone na powierzchnię żeli (niezależnie od stopnia sztywności), zwykle były wchłaniane przez podłoże, rozpyływały się na jego powierzchni lub kąt zwilżania był bardzo mały. Świadczy to o bardzo dużej hydrofilowości podłoży. Różnice w sztywności podłoży poliakryloamidowych nie wpływają znacząco na ich hydrofilowość, aczkolwiek na powierzchni żelu miękkiego (próbki 1 i 2) kropla wody wsiąkała w próbkę, podczas gdy na twardszych powierzchniach (próbki 3 i 4) pozostawała na powierzchni, co przedstawiono na RYS. 6. Różne miejsca na powierzchni próbek trochę różniły się hydrofilowością, ale kąt zwilżania zawsze był mniejszy niż 30°.



RYS. 5. Schemat procesu funkcjonalizacji podłoża.
FIG. 5. Scheme of substrate functionalization process.



RYS. 6. Przykładowy kształt kropli na powierzchni hydrożelu akryloamidowego.
FIG. 6. Exemplary shape of the drop on the surface of acrylamide hydrogel.

The reaction of sulfo-SANPAH attachment to the surface of polyacrylamide is catalyzed by UV radiation with a wavelength of 320 to 350 nm. This is possible due to the presence of photoreactive nitrophenylazide groups in the structure. In the process of functionalization, the covalent bonds are formed, which cause that the molecule is firmly bound to the gel surface. The scheme of the functionalization is given in FIG. 5.

The hydrophilicity of the obtained polyacrylamides

The substrates differing with the degree of crosslinking, and therefore the flexibility, were submitted to the tests of contact angle using goniometry method. Before performing the tests, gels were pulled out of PBS and dried for 60 minutes. Water droplets applied on the surfaces of substrates during the test were usually absorbed by substrate, dissipated on its surface or the contact angle was very small. This demonstrates a very high hydrophilicity of substrates. Differences in stiffness of polyacrylamide substrates do not have a significant influence on their hydrophilicity, however the droplets on the soft gels (sample 1 and 2) just sank into the surface, while these on samples 3 and 4 partially stayed on the surface as shown in FIG. 6. Different parts of the same sample also slightly differed in hydrophilicity, however the angle never exceeded 30°.

Pomiar prędkości podłużnych fal ultradźwiękowych

Sprężystość próbek porównano poprzez pomiar prędkości rozchodzenia się fal ultradźwiękowych w sporządzonych żelach. Pomiar wykonano przy pomocy aparatu CT-3 z głowicami o częstotliwości 1 MHz. Próbki miały średnicę ok. 35 mm i grubość ok. 2 mm. Po wyciągnięciu z roztworu PBS, żele pozostawiano na określony czas na powietrzu, a następnie dokonywano pomiaru prędkości fal ultradźwiękowych w określonych odstępach czasu w kilku niezależnych od siebie seriach pomiarowych, następujących po sobie w czasie od 45 minut do 100 minut. Próbki umieszczano między dwiema głowicami i w każdej serii pomiarowej odczytywano czas przejścia podłużnej fali ultradźwiękowej oraz drogę przebytą przez falę. Pomiar prowadzono przy dwóch różnych ustawieniach głowic: 1) odległość między głowicami równa jest dokładnie średnicy próbki, tzn. głowice tylko stykają się z próbką, 2) odległość między głowicami zostaje zmniejszona o 1 mm, tzn. próbka ulegała niewielkiemu ściśnięciu pomiędzy głowicami. Wykonano 21 serii pomiarowych dla próbek nr 1, 2 i 4 oraz 15 dla próbki 3. By uniknąć błędów pomiarowych, co pewien czas wykonywano pomiar sprawdzający na wzorcach 2 μ s i 10 μ s, a serie pomiarowe poprzedzał i kończył pomiar prędkości fali ultradźwiękowej w powietrzu. Średnia prędkość podłużnej fali ultradźwiękowej w powietrzu dla całego okresu badania w temperaturze pokojowej wynosiła $343,6 \pm 1,05$ m/s.

Najwyższe średnie wartości podłużnej fali ultradźwiękowej wyznaczono dla próbki nr 1 (najniższy moduł elastyczności) $v_L = 1662,3 \pm 12,6$ m/s, a nieco niższe (w granicach błędów pomiarowego) dla próbki nr 2 $v_L = 1655,9 \pm 6,6$ m/s. Natomiast dla próbek 3 i 4 (wysoki moduł elastyczności) uzyskano znacznie mniejsze wartości prędkości podłużnej fali ultradźwiękowej: odpowiednio $v_L(3) = 1576,6 \pm 9,2$ m/s i $v_L(4) = 1547,8 \pm 4,6$ m/s. Stwierdzono, że suszenie próbek nie ma wpływu na wartości wyznaczonych prędkości fali, co dobitnie świadczy, że obserwowana szybkość przechodzenia fali jest ściśle związana z istnieniem ośrodka polimerowego w hydrożelu. Trzeba jednak dodać, że wartości szybkości zbliżone są do szybkości rozchodzenia się fali ultradźwiękowej w wodzie. Próbki nie zmieniają właściwości sprężystych z czasem suszenia. Nieznaczny wpływ na właściwości ma docisk głowic do próbki. Obserwuje się wzrost prędkości o ok. 6% w pomiarach z głowicami dociśniętymi.

Analiza wyników wykazała, że dla każdej próbki występują dwa rodzaje wyników niezależnie od odległości pomiędzy głowicami. Na RYS. 7 przedstawiono wykresy zmian szybkości fali ultradźwiękowej w czasie dla próbek 2 i 4 różniących się znacznie modulem elastyczności. Niższe wartości z reguły uzyskiwane są przy lekkim kontakcie i są mniejsze o ok. 100 m/s od wartości maksymalnych. Generalnie, większe różnice szybkości obserwowano dla próbek miękkich. W próbkach charakteryzujących się niskim modulem elastyczności obserwowano dalszy spadek szybkości o 100 m/s. Najwyższe wartości szybkości uzyskano dla próbki nr 1 o najniższym module elastyczności i znacznie niższe dla próbki nr 2. Istotne obniżenie szybkości pojawia się przy znacznym wzroście modułu elastyczności hydrożelu.

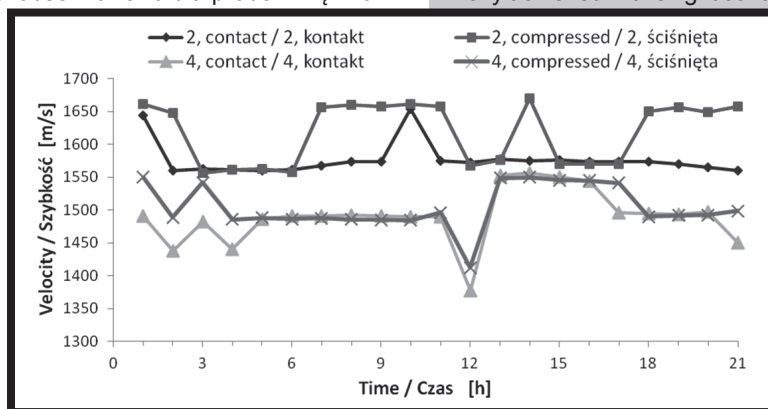
Measurements of velocity of ultrasonic waves propagation

The resilience of the samples was compared by measuring the velocity of propagation of ultrasonic waves in the prepared gels. The measurements were performed by the CT-3 apparatus with heads of 1 MHz frequency. The diameter of samples was about 35 mm, and their thickness was approximately 2 mm. After removing samples from PBS, gels were left for a specified time in the air, and then the velocity of propagation of ultrasonic waves was measured in a number of independent series, following each other in time from 45 minutes to 100 minutes. Samples were placed between the two heads and in each measurement series, the time of transmission of longitudinal ultrasonic wave and the distance crossed by the wave were recorded. Measurements were conducted at two different positions of heads: 1) the distance between heads was equal to the diameter of the sample, i.e. the heads were in contact with the sample, and the sample dimensions were not disturbed; 2) the distance between the heads was reduced by 1 mm, i.e. the sample was slightly compressed between the heads. 21 measuring series were performed for each of the samples 1, 2 and 4, and 15 series for the sample 3. To avoid measurement errors, a checking measurement has been taken periodically using the standards of 2 μ s and 10 μ s, and the measurement series were preceded and ended by a measurement of velocity of ultrasonic wave in the air. The average velocity of longitudinal ultrasonic wave in the air for the whole testing period at room temperature was 343.6 ± 1.05 m/s.

The highest values were determined for the sample 1 (the lowest flexibility modulus) $v_L = 1662.3 \pm 12.6$ m/s, and slightly lower (but within the measurement error) for sample 2 $v_L = 1655.9 \pm 6.6$ m/s. In contrast, samples 3 and 4 (high flexibility modulus) gave much lower values of the velocity of longitudinal ultrasonic wave, respectively: $v_L(3) = 1576.6 \pm 9.2$ m/s and $v_L(4) = 1547.8 \pm 4.6$ m/s. It was found that the measured velocity values are not affected by the drying time, which clearly shows, that observed velocity is closely related to the existence of polymeric center in the hydrogel. Although, it should be noted, that the velocity values are similar to that in water. The samples do not change their elastic properties while drying. Changing the distance between heads (compressing the sample) has a slight effect on the obtained values. An increase in the speed by about 6% was observed in the compressed samples.

Analysis of the results showed that for each sample there are two types of results regardless the distance between the heads. FIG. 7 shows the changes of the velocity of the ultrasonic wave in time for samples 2 and 4, which significantly differ with elasticity modulus. Lower values are generally achieved with a light contact of heads with the a sample,

however, at maximum they are less only about 100 m/s. Larger difference in the velocity values were observed for soft samples then for the harder ones. For samples with low elastic modulus further reduction of values by 100 m/s was observed. The highest values of velocity were attained for the sample 1 with the lowest elasticity modulus, and a slightly lower for the sample 2. Significant reduction of velocity occurs with considerable increase in elastic modulus of the hydrogel.



RYS. 7. Zmiany szybkości fali ultradźwiękowej w czasie.
FIG. 7. Changes of the velocity of the ultrasonic wave vs. time.

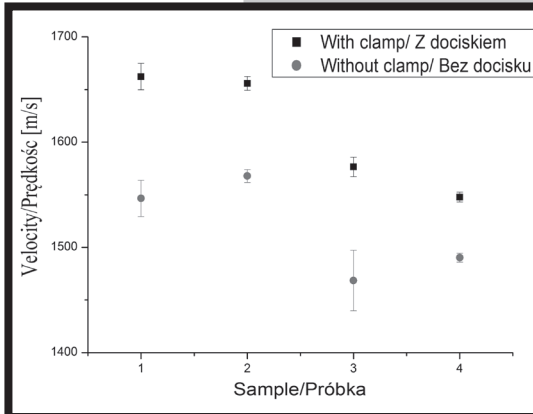
Średnie wartości szybkości przechodzenia fali ultradźwiękowej wraz z odchyleniem standardowym dla wszystkich rodzajów hydrożeli w zależności od modułu elastyczności podano na RYS. 8.

Obserwacja migracji komórek keratynocytowych na podłożach hydrożelowych

Podłoża hydrożelowe wykorzystano w celu obserwacji zachowania komórek keratynocytowych, pochodzących z rybich łusek. Procedura przygotowania tych komórek jest dobrze opisana w wielu publikacjach np. w [6]. Pojedyncze łuski, pozyskane z ryb gatunku Molinezja, umieszczano między dwoma, nałożonymi na siebie podłożami lub szkiełkami nakrywkowymi. Następnie dokonywano infuzji małej ilości pożywki DMEM (Euroclone) z 10% surowicą FBS (Sigma Aldrich) pomiędzy te podłoża. Tak utworzony „sandwicz” pozostawiano w uszczelnionej szalce Petriego na okres od 24 do 72 godzin w temperaturze pokojowej. Po upływie tego okresu, sprawdzano czy komórki zeszyły z łuski na podłoże i wtedy separowano podłoża od siebie. Podłoża z komórkami były umieszczane w plastikowych szalkach Petriego z pożywką DMEM/FBS. Następnie dokonywano pomiarów migracji keratynocytów za pomocą mikroskopu optycznego Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Obrazy migrujących komórek rejestrowano używając techniki fotografii poklatkowej (tzw. time lapse) co 20 sekund przez 20 minut.

Komórki obserwowano na wszystkich czterech podłożach hydrożelowych. Prawidłowo migrujące komórki, były rozplaszczane na podłożach i przybierały wydłużone, wrzecionowate kształty. Na RYS. 9 przedstawiono przykładowe zdjęcia mikroskopowe komórek na podłożach hydrożelowych o modułach elastyczności 1,3 kPa (RYS. 9a) oraz 40 kPa (RYS. 9b).

Porównując zachowanie się komórek na wszystkich czterech rodzajach podłoży stwierdzono, iż komórki znacznie łatwiej migrują na podłożach o większej sztywności, czyli na próbkach 3 i 4 (E odpowiednio 35 i 40 kPa). Na tych podłożach komórki zachowywały swój charakterystyczny wachlarzowaty kształt (RYS. 9b). Natomiast na podłożach o niskim module elastyczności (próbki 1 i 2, E odpowiednio 1,3 i 3,2 kPa) zaobserwowano niezwykle interesujący przykład przybierania nietypowego dla rybich keratynocytów kształtu kulistego (RYS. 9a). Kształt taki jest typowy raczej dla komórek stacjonarnych. Pomimo tej zmiany, niektóre komórki keratynocytów usiłowały dalej migrować. Wyjaśnienie mechanizmu wpływu zmniejszonej elastyczności podłoża na taki kształt i zachowanie komórek keratynocytów wymaga dalszych badań. Obserwacje te zostały opisane szczegółowo w innej publikacji [11].



RYS. 8. Średnie prędkości fal ultradźwiękowych w badanych hydrożelach.

FIG. 8. Average values of the ultrasonic wave velocity in the studied hydrogels.

Average values of the velocity of transition of an ultrasonic wave with the standard deviation for all types of hydrogels according to the elastic modulus is shown in the FIG. 8.

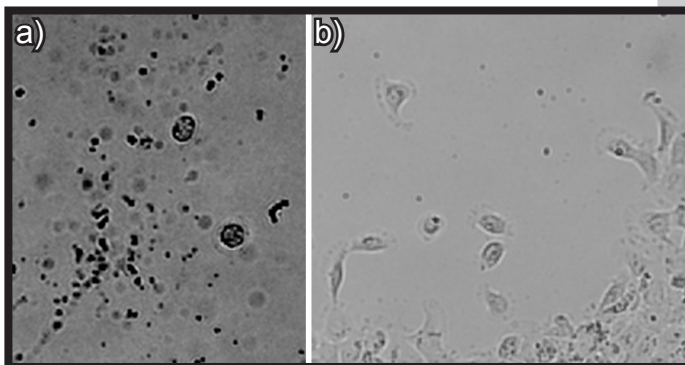
Observation of keratinocyte cell migration on hydrogel substrates

Hydrogel substrates were used to observe the behavior of keratinocytes derived from fish scales. The preparation procedure of these cells is well described in several papers, for example in [6]. Fish scales, collected from Molly fish, were placed in between two substrate plates or between the substrate and a coverslip. Then infusion

of the small amount of DMEM cell media (Euroclone) with 10% of FBS (Sigma Aldrich) between the substrates was performed. The formed “sandwich” was left in a sealed Petri dish for 24 to 72 hours at room temperature. After that, it was checked whether the cells migrated from the scale onto the substrate and then substrates were separated. Substrates with the cells on them were placed in plastic Petri dishes with DMEM/FBS medium. Cell migration measurements were performed employing optical microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Images of the migrating cells were registered using time lapse technique with 20 s between frames for 20 minutes.

The cells were observed on all four hydrogel substrates. Properly migrating cells were flattened on substrates and assumed elongated, fusiform-like shape. In FIG. 9 there are shown exemplary microscopic images of cells on hydrogel substrates with elastic modulus of 1.3 kPa (FIG. 9a) and 40 kPa (FIG. 9b).

Comparing cell behavior on all four types of substrates, it was found that the cells migrate more easily on substrates with higher stiffness, that is on sample 3 and 4 (E - 34 and 40 kPa, respectively). On these substrates cells maintained their characteristic fan-like shape (FIG. 9b). However, on the substrates with a low elasticity modulus (samples 1 and 2, E - 1.3 and 3.2 kPa, respectively) a very interesting example of atypical, as for fish keratinocytes, spherical shape was observed (FIG. 9a). Such shape is typical for stationary cells. Despite this shape change, some of the keratinocytes still tried to migrate. In order to explain the mechanism of influence of decreased substrate elasticity on such cells shape and behavior requires further research. More detailed studies are described in another publication [11].



RYS. 9. Komórki keratynocytowe na podłożu hydrożelowym po 24 godzinach przebywania na podłożu:

a) podłoże o module elastyczności 1,3 kPa,
b) podłoże o module elastyczności 40 kPa.
Powiększenie 10x.

FIG. 9. Keratinocytes on hydrogel substrate after 24 hrs of residing on a substrate:

a) substrate of the elasticity modulus 1.3 kPa,
b) substrate of the elasticity modulus 40 kPa.
Magnification 10x.

Otrzymano cztery rodzaje hydrożeli akryloamidowych znacznie różniących się modulem elastyczności. Porównano ich właściwości mechaniczne poprzez pomiar szybkości rozchodzenia się fali ultradźwiękowej, a następnie zbadano wpływ elastyczności podłoża na zachowanie się keratynocytów.

Potwierdzono, że podłoża akryloamidowe są odpowiednimi materiałami do hodowli komórek keratynocytowych, które są z kolei doskonałym modelem do badania parametrów procesu migracji komórkowej. Wykorzystując te podłoża wykazano, że średnia szybkość migracji keratynocytów na podłożach sztywnych była znacznie większa niż na podłożach o module elastyczności 10 do 40 razy niższym. Zaobserwowane w badaniach zmiany kształtu keratynocytów na miękkich podłożach jednoznacznie wskazują na wpływ elastyczności podłoża na ten rodzaj komórek.

Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu VENTURES/2012-9/3 finansowanego przez Fundację Nauki Polskiej i współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem sprzętu zakupionego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Polskiego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (grant nr POIG.02.01.00-12-023/08).

Summary

Four types of acrylamide hydrogels of significantly different elasticity modulus were obtained. Their mechanical properties were compared by measuring the velocity of propagation of ultrasonic waves, and then the influence of the substrate elasticity on keratinocytes behavior was studied.

We confirmed that acrylamide substrates are appropriate materials to culture keratinocyte cells which, on the other hand, are a very good model to study parameters of cell migration process. We proved that the keratinocytes average migration velocity on the stiff substrates was significantly higher than on substrates of elasticity modulus of 10 to 40 times lower. Observed in this work changes of keratinocytes shape on the soft substrates unambiguously indicate an influence of the substrate elasticity on this type of cells.

Acknowledgements

This work was done in the framework of the project VENTURES/2012-9/3 financially granted by Foundation for Polish Science, co-financed from European Union, Regional Development Fund.

The research was carried out with the equipment purchased thanks to the financial support of the European Regional Development Fund in the framework of the Polish Innovation Economy Operational Program (contract no. POIG.02.01.00-12-023/08).

Piśmiennictwo

- [1] Ross Aftin M., Zhongxiang J., Bastmeyer M., Lahann J.: Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. *Cell Culture Substrates* 8 (2012) 336-355.
- [2] Jagur-Grodzinski J.: Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polymer Advanced Technologies* 21 (2010) 27-47.
- [3] Kirschner Chelsea M., Anseth Kristi S.: Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia* 61 (2013) 931-944.
- [4] Cichocki T., Litwin J.A., Mirecka J.: *Kompendium histologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego 2011.
- [5] Kilarski W.: *Anatomia ryb*. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Sp. z o.o., Poznań, 2012.
- [6] Lee J., Ishihara A., Theriot J.A.: Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature* 362 (1993) 167-171.
- [7] Pelham, R.J. Jr. and Wang, Y.: Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13661-13665 (1997).

References

- [8] Khatiwala C.B., Peyton S.R., Putnam, A.J.: Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290 (2006) C1640-C1650.
- [9] Flanagan L.A., Ju Y.E., Marg B., Osterfield M., Janmey P.A.: Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13 (2002) 2411-2415.
- [10] Tse J.R., Engler A.J.: Preparation of Hydrogels Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols in Cell Biology Suppl.* 47 (2010) 10.16.1-10.16.16.
- [11] Dziob D., Nowak J., Laska J., Kolodziej T., Cyzio P., Zamora K., Raczowska J., Rajfur Z.: The influence of substrate elasticity on the migration parameters of fish keratocytes. Submitted to *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*.