

MAKROPORÉZNÍ HYDROGELY PRO BUNĚČNÉ KULTIVACE A JEJICH PROSTOROVÉ ZOBRAZENÍ

JAKUB KAŇKA^a, EVA CHYLÍKOVÁ
KRUMBHOLCOVÁ^a, DANA CHMELÍKOVÁ^a, JIŘÍ
PÁNEK^a, BOHUMILA PODHORSKÁ^a,
SABINA KREJČÍKOVÁ^a, TOMÁŠ VAMPOLA^b,
NILOUFAR RASHEDI BANAFSHEHVARAGH^a,
MIROSLAV VETRÍK^a, ZHANSAYA KABEROVA^a
a MIROSLAVA DUŠKOVÁ SMRČKOVÁ^a

^a Ústav makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 00 Praha 6,

^b České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6
m.duskova@imc.cas.cz

Došlo 3.5.19, přijato 27.6.19.

Klíčová slova: makroporézní hydrogel, konfokální mikroskopie, 3D rekonstrukce

Obsah

1. Úvod
2. Požadavky na hydrogely v biomedicině a jejich charakterizace
3. Syntéza hydrogelů
4. Morfologie hydrogelů a tvorba pórů
5. Metody pro vizualizaci hydrogelů
6. Závěr

1. Úvod

Makromolekulární hydrogely jsou v odborné literatuře definovány jako gely obsahující v rovnovážně zbotnalém stavu velké množství vody¹. Hydrogely připravované ze syntetických prekurzorů jsou čím dál úspěšněji využívány jako substráty pro buněčné kultivace v biomedicinském výzkumu i praxi a dnes jsou již syntetizovány „na míru“ potřebám kultivované tkáně. Díky podobnosti s přírodní materií a svým široce laditelným fyzikálně chemickým vlastnostem, zejména botnácím a mechanickým, ale také možnosti volit chemické složení kombinováním stavebních jednotek v jejich struktuře, jsou hydrogely předmětem živého vědeckého zájmu. Zejména intenzivně jsou zkoumány v oboru tkáňového inženýrství² a řízeného transportu a uvolňování léčiv³, jakož i v oboru implantologie jako

materiály potenciálně vhodné pro vývoj implantátů umožňujících dlouhodobý přímý kontakt s organismem⁴.

Kromě medicínských aplikací nacházejí hydrogely své uplatnění i v chemicko-technologických oblastech, např. jako stacionární fáze v gelové chromatografii⁵ nebo jako účinné a selektivní sorbenty molekul a iontů ve vodném prostředí a v poslední době také jako média pro udržení a získávání vody nebo CO₂. Jednou z prvních aplikací hydrogelů byly vynálezy syntetických kontaktních čoček^{6,7}.

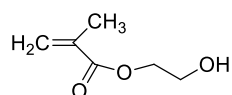
2. Požadavky na hydrogely v biomedicině a jejich charakterizace

Pro úspěšnou aplikaci v tkáňovém inženýrství musí hydrogel vykazovat specifické vlastnosti. Kandidátem je biokompatibilní, neimunogenní a netoxický materiál řízeně odbouratelný v organismu, mající prostorovou strukturu vhodnou pro uchycení a proliferaci buněk daného typu. Chemicky a mechanicky musí gel věrně imitovat vnitřní prostředí extracelulární matrice dané tkáně. Makromolekulární hydrogely mohou být vystavěny z molekulárních stavebních jednotek rozličného druhu i původu; syntetických monomerů^{8–11}, přírodních látek^{3,12–14}, či jejich kombinací¹⁵. Aby uchycení a množení buněk v gelu bylo úspěšné, musí být příslušný proces podpořen chemickou modifikací gelové matrice bioaktivními sloučeninami (motivy), např. oligopeptidy podporujícími adhezi buněk^{16–18}, ať již fyzikální sorpcí proadhezivních molekul z kultivačního média, anebo kovalentně vázanými bioaktivními motivy.

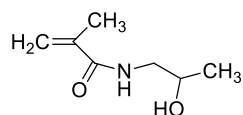
Klíčovou charakteristikou každého substrátu je kromě chemického složení i jeho vnitřní prostorové uspořádání, zejména porozita a její topologie: velikost, tvar, průchodnost i vzájemná propojenost pórů (podíl komunikujících pórů) a např. velikost vnitřní plochy stěn propojených „chodbiček“. Tyto parametry určují úspěšné uchycení jednotlivých buněk a tvorbu nadbuněčných útvarů a tkání.

3. Syntéza hydrogelů

Mezi dobře prozkoumané metody přípravy makromolekulárních hydrogelů dnes patří především volně-radikálová polymerace, která byla použita k přípravě hydrogelů také v této studii. Reakční směs obsahuje v nejjednodušším případě monomer(y), síťovadlo, iniciátor a popřípadě zřed'ovadlo (např. vodu či vodný roztok anorganických solí). Avšak již malou změnou typu a koncentrace zřed'ovadla lze zásadně ovlivnit výslednou mikrostrukturu hydrogelové polymerní sítě: uplatňuje se zde



2-hydroxyethyl-methakrylát (HEMA)



N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)

Obr. 1. Chemické struktury monomerů používaných při výrobě hydrogelů

mechanismus fázové separace neboli mikrosynereze, který se projevuje tak, že při určité konverzi (tedy při dosažení jisté průměrné délky polymerních řetězců i stupně jejich vzájemného sesítování) se začne vznikající polymer z roztoku oddělovat v důsledku snižující se mísitelnosti složek systému. Tyto procesy diktované termodynamikou byly na obecné úrovni dobře popsány v dobách, kdy se intenzivně pracovalo na vývoji opticky čirých hydrogelů pro oftalmologické aplikace¹⁹. Jakékoliv přiblížení k podmínkám synereze (oddělení fází) totiž znamenalo riziko zákalu či zblednutí gelu a tedy nemožnost jeho použití. Jevu fázové separace se nyní využívá k regulaci mikro- i nanostruktury síťujících systémů při přípravě mikrostrukturovaných hydrogelů^{20,21}.

Často používanými monomery pro přípravu hydrogelů jsou 2-hydroxyethyl-methakrylát (HEMA) a N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA), jejichž strukturální vzorce jsou uvedeny na obr. 1 (cit.²²).

4. Morfologie hydrogelů a tvorba pórů

Morfologie gelu utvářená fázovou separací je kromě složení monomerní směsi určována i termodynamickou kvalitou zředěvadla, jímž mohou v případě hydrogelů být i vodné roztoky solí.

Často používanou metodou tvorby pórů o definované velikosti a tvaru je přidávek pevných a v monomerní směsi nerozpustných částic, tzv. templátů (porogenů)⁸, které jsou po polymeraci vymyty vhodným rozpouštědlem a zanechají tak pouze otisk svého tvaru – pór v gelové matici, aniž by jejich případná residua v hydrogelu měla škodlivý efekt. Templát může mít velmi přesně definovanou geometrii²³. S výhodou se používají částice solí či cukrů, které jsou snadno vodou extrahovatelné a z hlediska biokompatibility bezpečné²⁴. Koncentrace, velikost, tvar a uspořádání částic v monomerní směsi určuje celkový objem pórů

a míru jejich možného propojení ve vzniklém hydrogelu. Pokud je použita koncentrace částic templátu příliš nízká, jednotlivé póry se vzájemně nepropojí a daný hydrogel v buněčných kultivacích nebude fungovat jako tzv. 3D substrát. Pokud je částic příliš mnoho, gel není spojité a rozpadne se na větší či menší fragmenty. Úkolem je tedy „vyladit“ množství částic tak, aby se pohybovalo mezi těmito dvěma kritickými prahy, a aby pokud možno došlo k částečnému překryvu stěn některých částic a tím ke vzniku průchozích kanálků. Prostorové rozložení pórů vzniklých tímto způsobem lze matematicky simulovat např. pomocí přístupu Monte Carlo, jímž lze generovat topologii cest vzniklých náhodným rozmístěním objektů: tyto úlohy spadají do oblasti tzv. těsně uspořádaných systémů^{25–27}.

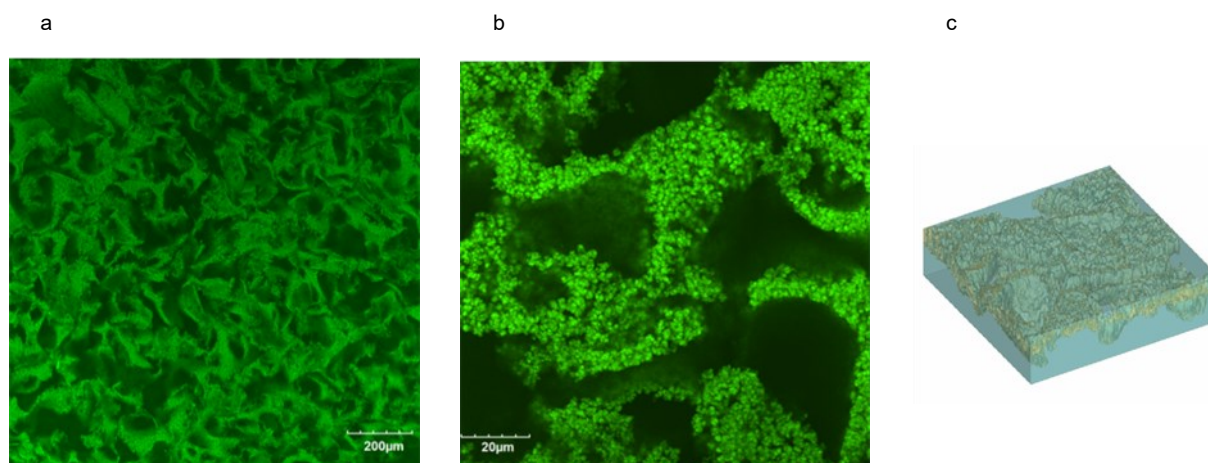
Kryogelační techniky²⁸ využívají podobného efektu s tím, že částice tvořící budoucí póry jsou generovány v průběhu samotné polymerace vymražením. Roli porogenu hraje samo zředěvadlo, nejčastěji voda, někdy ve směsi s organickým rozpouštědlem, např. dimethylsulfoxidem (DMSO)²⁹. Monomerní roztok je během polymerace nutné zmrazit dostatečně hluboko pod bod tání zředěvadla, které pak ze směsi vymrzá ve formě krystalků, vytlačující monomerní směs do svého okolí, kde probíhá vlastní polymerace. Při laboratorní teplotě pak krystaly roztají a tak vzniknou póry. V případě kryogelace 2-hydroxyethyl-methakrylátu se kromě vymražení uplatnil i proces mikrosynereze v přepážkách mezi krystaly a vznikl tak hydrogel o porozitě s dvojnásobnou charakteristickou velikostí pórů, viz obr. 2.

Mezi novější metody utváření hydrogelů s definovanou prostorovou strukturou patří 3D tisk³⁰, elektrospinning³¹ a produkce injektovatelných gelačních roztoků, které tvoří hydrogel *in situ*³². Stejně tak je pozornost věnována laserovému řezání daných objektů v předem připraveném bločku hydrogelu^{33,34}.

5. Metody pro vizualizaci hydrogelů

V materiálové laboratoři vyvíjející nové materiály pro tkáňové inženýrství je nezbytné disponovat metodami, kterými lze vnitřní strukturu hydrogelu vizualizovat, rekonstruovat ji v prostoru, charakterizovat a pokud možno kvantifikovat parametry struktury, jako např. objem gelové fáze, charakteristickou velikost pórů a její distribuci či objem vzájemně propojených pórů. Na základě znalosti složité prostorové struktury gelu lze také simulovat jeho deformační chování. Fluorescenční laserová skenovací konfokální mikroskopie (LSCM – Laser Scanning Confocal Microscopy) ve spojení s vyspělým softwarem představuje účinnou metodu, díky níž je možno definovat parametry vyvíjených hydrogelů *in situ*, tj. ve stavu rovnovážného nabití ve vodě. To je významný rozdíl oproti rozšířené zobrazovací technice skenovací elektronové mikroskopie, kdy je pro snímání struktury nutné nejprve zavodnění vzorky vysušit nebo zmrazit, což zpravidla obnáší změnu objemu a někdy také morfologie gelu.

Ve vysokonapěťové skenovací elektronové mikrosko-



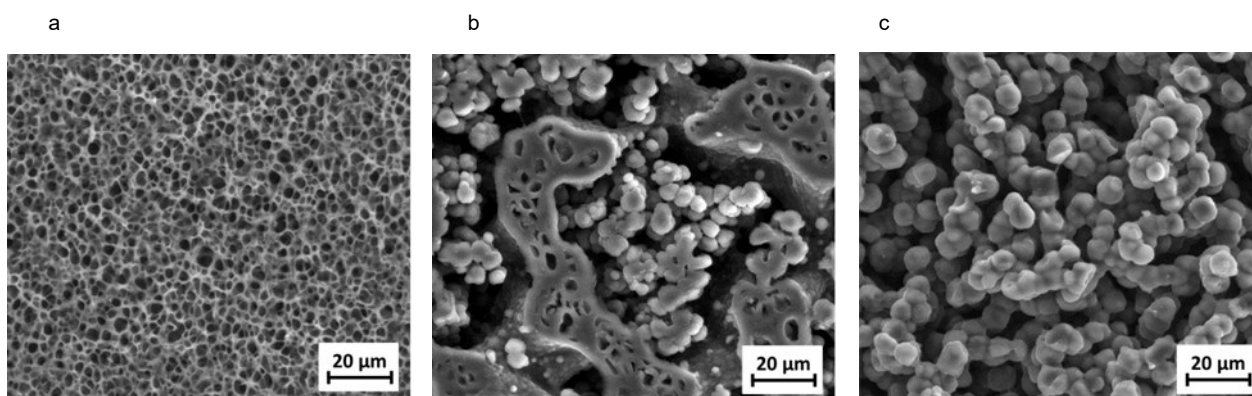
Obr. 2. Makroporézní kryogel z poly(2-hydroxyethyl-methakrylátu) zobrazený pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie ve zbotnalém stavu při laboratorní teplotě. a) zvětšení 5 \times , b) zvětšení 50 \times . 2c: počítačová rekonstrukce získaná skládáním 205 x,y rovin nasnímaných v řezech vzdálených 0,44 μm , hydrogel obarven kovalentně navázaným fluoresceinem. Zpracováno softwarem Materialise Interactive Medical Image Control System - MIMICS[®], verze 8.13.

píi (high voltage SEM, HVSEM) je preparát zobrazován v suchém stavu, jehož bývá dosaženo lyofilizací: vzorek je po vysušení pokoven nanometrickou vrstvou kovu pro zvýšení vodivosti elektronů a snímání probíhá při laboratorní teplotě. V tzv. kryogenní nízkovakuové SEM (low vacuum SEM, cryo-SEM or cryo-LV SEM) se zbotnalý gel nejprve rychle hluboce zmrazí v kapalném dusíku nebo hélíu a poté, stále udržován při nízké teplotě, je skenován svazkem elektronů při teplotách pod nulou (např. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Při zmrazování zejména zbotnalých hydrogelů zůstává vždy otázkou, nakolik mohlo změnou teploty dojít ke změně struktury. Metoda LSCM je dnes široce využívána pro studium buněčných struktur a buněčných procesů³⁵. Její velká přednost spočívá v možnosti pozorovat vnitřní uspořádání vzorku bez nutnosti pořizování tenkých řezů hmoty. Při sledování buněk osídlených substrátů nedochází k usmrcení buněk, jako je tomu u skenovací elektronové mikroskopie. V praxi je tedy možné pomocí LSCM pozorovat buněčné děje v reálném čase. Celosvětová vědecká obec vděčí za tuto účinnou a dnes stále zdokonalovanou neinvazivní metodu nahlížení do vnitřku hmoty českým vědcům M. Petráňovi a M. Hadravskému^{36,37}, kteří metodu v 60. letech vynalezli a zasloužili se o její aplikaci v biologii a medicíně, potažmo materiálových oborech.

Použití metody LSCM ukazuje obr. 2 na příkladu kryogelu připraveného síťovací polymerizací 2-hydroxyethyl-methakrylátu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vodním prostředí. HEMA při polymerizaci do určité míry síťuje i bez přídavku síťovačů, protože samovolnou transesterifikací tohoto monomeru vždy vzniká určité množství dvojfunkčního diesteru. Přepážky mezi póry jsou tvořeny jemnou strukturou slinutých kuliček poly(2-hydroxyethyl-methakrylátu) (pHEMA) o průměru kolem jednoho mikrometru, které se vytvořily fázovou separací v gelujícím

systému. Gel byl obarven fluoresceinem – v obrázku zelené oblasti. Na obrázku 2a vyniká celková struktura zbotnalého hydrogelu, v níž jsou dobře patrné velké póry (cca 20 až 60 μm) vzniklé vymytím částic porogenu a vzájemně oddělené porézními gelovými přepážkami. Na obr. 2c je 3D počítačová rekonstrukce tohoto vzorku získaná skládáním 205 x,y rovin nasnímaných v řezech vzdálených mezi sebou 0,44 μm podél souřadnice z .

Rovněž lze použít skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)³⁸, a to zejména pro objasnění detailů struktur, které jsou pod rozlišovací prahem optického systému LSCM. SEM však v některých případech může poskytovat zkreslené obrazy a to kvůli nutnosti vzorky fixovat, „zpevnit“, k čemuž se používá technika prudkého zmrazení vzorků v kapalném dusíku, následovaného pokovení a vlastního skenování, přičemž oba procesy probíhají ve zmrazeném vzorku. Bylo prokázáno, že ve vysoce nabotnalých hydrogelech část vody přejde zmrazením, byť velmi prudkým, v ledové krystaly a jenom zbylá část zůstává amorfni. Tvorba krystalu pak vede ke vzniku trvalé porozity gelové matrice. V případě makroporézních gelů dochází při SEM často jen k mírnému zkreslení, protože vymrzající led vytvoří krystaly v již existujících pórech a struktura matrice v přepážkách zůstává zachována. Přepážky však z důvodu mrznutí okolní kapaliny a změny stupně nabotnání mění s teplotou svou tloušťku, která neodpovídá zbotnalému stavu při aplikační, zpravidla pokojové či fyziologické teplotě. Výhodou elektronové mikroskopie je však velká hloubka ostrosti a vysoký kontrast: metoda poskytuje obrazy o vysokém rozlišení a vynikající zřetelnosti. Pokud lze vzniku artefaktů předejít, anebo je systém natolik znám, že artefakt je jasně identifikován, tak také SEM poskytuje cenný vhled do vnitřní struktury složitých systémů.

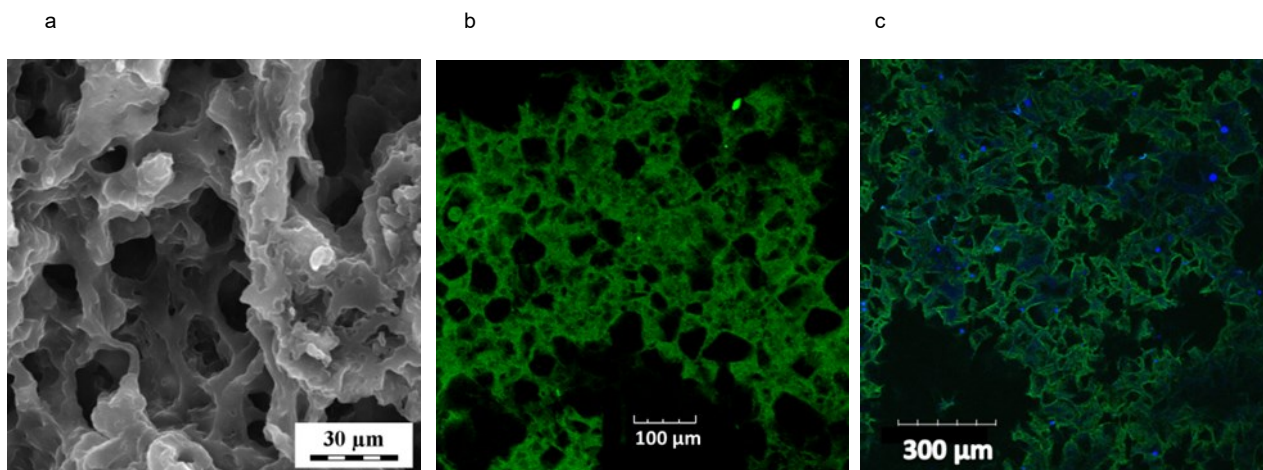


Obr. 3. Vliv zřed'ovadla, tj. vodného roztoku NaCl, v němž probíhala síťující polymerace 2-hydroxyethyl-methakrylátu, na výslednou morfologii hydrogelu. Zobrazení pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Obsah zřed'ovadla v polymerující směsi 60 obj.% ve všech případech, koncentrace NaCl ve vodě: a) 0,4 M; b) 0,5 M; c) 0,6 M, síť'ovadlo tvořilo 1 mol.% ve směsi monomer-síť'ovadlo

Ačkoli SEM (na rozdíl od konfokální mikroskopie) není pro studium struktury porézní nabotnalé matrice hydrogelů metoda bezproblémová³⁹, lze ji v případě úspěšného měření brát v potaz jako doplňující zdroj dat. Oproti konfokální mikroskopii umožňuje SEM z jediného obrázku pohlížet na vzorek i do třetího rozměru. Ve srovnání se světelnou mikroskopii lze na elektronovém mikroskopu docílit značně většího zvětšení. Při velkém zvětšení v SEM je dopadajícím svazkem elektronů vzorek teplotně namáhán a může dojít k jeho poškození. Oproti tomu konfokální mikroskopie poskytuje možnost zobrazit strukturu materiálu ve vrstvě o tloušťce několik desítek až stovek mikronů (záleží na celkové světelné propustnosti vzorku). Při analýze na elektronové mikroskopii je vzorek zobrazen vždy jen v místě, kterým byl veden řez.

Použití metody SEM lze ilustrovat na příkladu síťující polymerace 2-hydroxyethyl-methakrylátu a vlivu koncentrace chloridu sodného ve vodě coby zřed'ovadla s vysolujícím efektem na její průběh; vzorky připravené v přítomnosti vodného roztoku NaCl vykazovaly mléčný zákal, zatímco monomerní směs, tj. směs monomeru a síť'ovadla v koncentraci jednotek molárních procent o stejném složení polymerizovaná v čisté vodě, poskytla opticky čirý hydrogel²¹. Na obr. 3 je zobrazena postupná změna struktury makroporézního hydrogelu: od struktury celulární na obr. 3a k dokonale bikontinuální na obr. 3c způsobená změnou koncentrace solného zřed'ovadla použitého při polymerizaci tohoto gelu (koncentrace NaCl ve vodě 0,4; 0,5; 0,6 M).

Při studiu morfologické struktury hydrogelů se tedy rozhodně vyplatí provést analýzu vzorků souběžně jak na



Obr. 4. Makroporézní hydrogel zobrazený metodami a) skenovací elektronové mikroskopie-, b) laserové skenovací konfokální mikroskopie ve zbotnalém stavu při laboratorní teplotě a c) tentýž substrát osídlený mesenchymálními kmenovými buňkami získanými ze stehenní kosti potkana (pátý den kultivace, jádra buněk obarvena modrým barvivem Hoechts 33342)

konfokálními, tak i elektronovém mikroskopu, jak je ilustrováno na obr. 4 na příkladu makroporézního hydrogelu připraveného z HPMa rovněž za přítomnosti vymývatelného částicového porogenu a s cíleně vyvolanou fázovou separací v přepážkách. Obrázek 4a pořízený metodou SEM ukazuje, že vlivem lyofilizace došlo ke ztuhnutí gelových přepážek, v nichž tak není patrná jemná porozita (tu lze pozorovat na obr. 4b) a na druhé straně dochází ke zvětšení velkých pórů (lyofilizace způsobí odbování gelové fáze provázené změnou objemu). Obrázky rovnovážně zbotnalého vzorku pořízené konfokální mikroskopií tak ukazují reálnou tloušťku i jemnou strukturu přepážek a dokazují, že tvar a velikost pórů se od předchozího zobrazení liší.

6. Závěr

Příklady zobrazení makroporézních hydrogelů popsané výše ukazují, že jak metoda skenovací elektronové mikroskopie, tak i metoda zobrazení konfokálními světelným mikroskopem přináší významné a vzájemně se doplňující poznatky při studiu prostorové struktury měkkých, zbotnalých materiálů. Metoda LSCM umožňuje celkový náhled na prostorovou strukturu zbotnalého gelu v případě, že gel lze dobře odlišit od botnacího prostředí např. inkorporací fluorescenčního barviva a umožňuje získat plošné řezy v hloubce materiálu, z nichž pak lze 3D strukturu počítačově zrekonstruovat. Pro poznání jemných detailů struktury je výhodné použít metodu SEM, s níž je však vždy nutné pracovat s vědomím možného vzniku artefaktů způsobených přípravou vzorku, a proto je potřebné mít jistotu, zda se struktura gelu daného složení při zkoumání metodou SEM mění či nikoliv – tu lze získat paralelním experimentem s využitím LSCM.

V případě buněčných testů a studia průběhu degradace polymerní sítě je však nutné spolehnout se pouze na konfokální mikroskopií, kdy lze vzorek studovat v reálném čase opakovaně. V případě skenovací elektronové mikroskopie bohužel dochází k destrukci vzorku, a proto nelze pozorovat dynamiku studovaných dějů.

Výzkum byl financován z projektů GAČR 17-08531S (2017-2019) a GAČR 17-11140S (2017-2019) a z institucionálních zdrojů ÚMCH AV ČR, v. v. i.

LITERATURA

- Jones R. G., Kahovec J., Stepto R., Wilks E. S., Hess M., Kitayama T., Metanovski W. V.: *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009.
- Mikos A. G. a 12 spoluautorů: *Tissue Eng.* 12, 3307 (2006).
- van Tomme S. R., Hennink W. E.: *Expert Rev. Med. Devices* 4, 147 (2007).
- Wan W. K., Campbell G., Zhang Z. F., Hui A. J., Boughner, D. R.: *J. Biomed. Mater. Res.* 63, 854 (2002).
- Lozinsky V. I., Plieva F. M., Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Bioseparation* 10, 163 (2001).
- Wichterle O., Lím D.: *Nature* 165, 117 (1960).
- Michálek J., Chmelíková D., Chylíková Krumbholcová E., Podešva J., Dušková Smrčková M.: *Chem. Listy* 112, 143 (2018).
- Přádný M., Dušková Smrčková M., Dušek K., Janoušková O., Sadakbayeva Z., Šlouf M., Michálek J.: *J. Polym. Res.* 21, 1 (2014).
- Michálek J., Dušková Smrčková M., Přádný M., Chylíková Krumbholcová E.: *Chem. Listy* 112, 490 (2018).
- Dušková Smrčková M., Sadakbayeva Z., Steinhart M., Dušek K.: *Macromol. Symp.* 372, 28 (2017).
- Burdick J. A., Anseth, K. S.: *Biomaterials* 23, 4315 (2002).
- Antoine E. E., Vlachos P. P., Rylander M. N.: *Tissue Eng., Part B* 20, 683 (2014).
- Popryadukhin P. V., Yukina G. Y., Dobrovolskaya I. P., Ivankova E. M., Yudin V. E.: *Cell Tissue Biol.* 12, 247 (2018).
- Linnes M. P., Ratner B. D., Giachelli C. M.: *Biomaterials* 28, 5298 (2007).
- Gyles D. A., Castro L. D., Silva J. O. C., Ribeiro-Costa R. M.: *Eur. Polym. J.* 88, 373 (2017).
- Aizawa Y., Owen S. C., Shoichet M. S.: *Prog. Polym. Sci.* 37, 645 (2012).
- Bracher M., Bezuidenhout D., Lutolf M. P., Franz T., Sun M., Zilla P., Davies N. H.: *Biomaterials* 34, 6797 (2013).
- Mammadov B., Sever M., Guler M. O., Tekinay A. B.: *Biomater. Sci.* 1, 1119 (2013).
- Dušek K., Sedláček B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 36, 1569 (1971).
- Sadakbayeva Z., Dušková Smrčková M., Šturcová A., Pflieger J., Dušek, K.: *Eur. Polym. J.* 101, 304 (2018).
- Karpushkin E., Dušková Smrčková M., Šlouf M., Dušek K.: *Polymer* 54, 661 (2013).
- Kopeček J., Kopečková P.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 62, 122 (2010).
- Wang B., Jin P., Yue Y., Ji S., Li Y., Luo H.: *RSC Adv.* 5, 5072 (2015).
- Kubínová Š., Horák D., Hejčl A., Plichta Z., Kotek J., Proks V., Forostyak S., Syková E.: *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 9, 1298 (2015).
- Baule A., Makse H. A.: *Soft Matter* 10, 4423 (2014).
- Tian J., Xu Y., Jiao Y., Torquato S.: *Sci. Rep.* 5, 16722 (2015).
- Xu W., Zhu Z., Zhang D.: *Soft Matter* 14, 8684 (2018).
- Sedláček T., Proks V., Šlouf M., Dušková Smrčková M., Studenovská H., Rypáček F.: *Biomacromolecules* 16, 3455 (2015).
- Ozmen M. M., Okay O.: *React. Funct. Polym.* 68, 1467 (2008).
- You S., Li J., Zhu W., Yu C., Mei D., Chen S.: *J. Mater. Chem. B* 6, 2187 (2018).
- Hochleitner G., Jüngst T., Brown T. D., Hahn K., Moseke C., Jakob F., Dalton P. D., Groll J.: *Biofabri-*

- cation 7, 35002 (2015).
32. Huebsch N. a 17 spoluautorů: *Nat. Mater.* 14, 1269 (2015).
 33. Applegate M. B., Coburn J., Partlow B. P., Moreau J. E., Mondia J. P., Marelli B., Kaplan D. L., Omenetto F. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 12052 (2015).
 34. Lee K. S., Yang D. Y., Park S. H., Kim R. H.: *Polym. Adv. Technol.* 17, 72 (2006).
 35. Ishikawa-Ankerhold H. C., Ankerhold R., Drummen G. P. C.: *Molecules* 17, 4047 (2012).
 36. Kopecký M.: *Vesmír* 95, 222 (2016).
 37. Frank L., Kubínová L., Petráň M., Delong A., Nebesářová J., Hozák P.: *Vesmír* 83, M1 (2004).
 38. Miller D. R., Peppas N. A.: *Biomaterials* 7, 329 (1986).
 39. Paterson S. M., Casadio Y. S., Brown D. H., Shaw J. A., Chirila T. V., Baker M. V.: *J. Appl. Polym. Sci.* 127, 4296 (2012).

J. Kaňka^a, E. Chylíková Krumbholcová^a, D. Chmelíková^a, J. Pánek^a, B. Podhorská^a, S. Krejčíková^a, T. Vampola^b, N. R. Banafshevaragh^a, M. Vetrík^a, Z. Kaberova^a, and M. Dušková Smrčková^a (^a *Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Prague*, ^b *Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Division of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Prague*): **Macroporous Hydrogels for Cell Cultivations and Their 3-D Visualization**

Macromolecular hydrogels provide model synthetic substrates widely applied in biomedical research, especial-

ly for studies of the cellular settlement. Today, hydrogels are tailored with respect to specific needs of the given model or a real tissue. Key characteristics of the hydrogel substrates are their chemical composition, morphological structure, and, most notably, the porosity and its topology: size, shape, and mutual connectivity of pores. To develop new substrates, it is therefore necessary to use methods for the visualization and reconstruction of their inner structure in space and to characterize, if possible quantify, its parameters, such as the total volume of the pores, the fraction of communicating pores, characteristic patency and the total area of the inner walls of the connecting corridors. Fluorescent confocal microscopy in combination with an advanced software represents an efficient method to determine parameters mentioned above, in order to characterize hydrogels *in situ*, i.e., in the state of equilibrium swelling in water. Thus, this method differs significantly from another widespread technique, i.e., the scanning electron microscopy, where the samples, saturated with water, have to be freeze-dried first, and then the structure of each sample is determined in the frozen state. This paper compares the results of both imaging methods, as applied to macroporous hydrogels. Advantages and shortcuts of both methods are discussed.

English translation is available in the on-line version.

Keywords: macroporous hydrogel, confocal microscopy, 3D reconstruction

Acknowledgements

The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, projects No. 17-08531S (2017-2019) and 17-11140S (2017-2019).

MACROPOROUS HYDROGELS FOR CELL CULTIVATIONS AND THEIR 3-D IMAGING

JAKUB KAŇKA^a, EVA CHYLÍKOVÁ
KRUMBHOLCOVÁ^a, DANA CHMELÍKOVÁ^a, JIŘÍ
PÁNEK^a, BOHUMILA PODHORSKÁ^a,
SABINA KREJČÍKOVÁ^a, TOMÁŠ VAMPOLA^b,
NILOUFAR RASHEDI BANAFSHEHVARAGH^a,
MIROSLAV VETRÍK^a, ZHANSAYA KABEROVA^a,
and MIROSLAVA DUŠKOVÁ SMRČKOVÁ^a

^a Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Heyrovský Sq. 2, 162 06 Prague 6, ^b Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Technická 4, 166 07 Prague 6
m.duskova@imc.cas.cz

Keywords: macroporous hydrogel, laser scanning confocal microscopy, scanning electron microscopy, 3-D reconstruction

Content

1. Introduction
2. Requirements for hydrogels in biomedicine and their characterization
3. Synthesis of hydrogels
4. Morphology of hydrogels and the pore formation
5. Methods of hydrogel visualization
6. Conclusion

1. Introduction

In specialized literature, the macromolecular hydrogels are defined as gels containing in an equilibrium state large amount of water¹. Hydrogels prepared from various synthetic precursors are being used with increasing success as substrates for cell cultivations in biomedical research and practice; currently, they can be tailor-made to meet the specific requirements of the given cultivated tissue. Due to their resemblance with natural materials, broadly tunable physico-chemical properties (especially swelling and mechanical ones), and also the possibility to choose their chemical composition by combining constitutional units in their chains, the hydrogels are subject to a vivid scientific interest. They are very intensively studied as materials for the tissue engineering² and the controlled transport and release of drugs³, and as materials potentially

suitable for implants enabling a long-term direct contact with organisms⁴.

In addition to the medicinal applications, the hydrogels find their use also in chemical technology as, e.g., the stationary phase in gel chromatography⁵ or effective and selective sorbents of molecules and ions in aqueous media, and, recently, also as media for collecting and restoring water or CO₂. One of the first applications of hydrogels was the invention of the synthetic contact lenses^{6,7}.

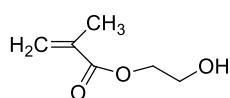
2. Requirements for hydrogels in biomedicine and their characterization

In order to be applied successfully in tissue engineering, the hydrogel must show particular properties. A biocompatible, non-immunogenic and non-toxic material controllably degradable in organism, having a space structure suitable to keep and proliferate the cells, is considered to be an appropriate candidate. The gel must faithfully imitate the inner milieu of the extracellular matrix of the given tissue, both chemically and mechanically. Macromolecular hydrogels can consist of molecular building units of various kinds and origin, such as synthetic monomers^{8–11}, natural substances^{3, 12–14}, or their combinations¹⁵. To make the settlement and proliferation of the cells in the gel successful, the corresponding process must be supported by a chemical modification of the gel matrix using bioactive compounds (motives), e.g., oligopeptides enhancing the adhesion of the cells^{16–18}, be it through a physical sorption of pro-adhesive molecules from the cultivation media or through covalently bonded bioactive motives.

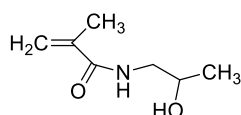
The key characteristic of every substrate is, besides the chemical composition, its inner space arrangement, especially the porosity and its topology: the sizes, shapes, permeability, and the mutual connectivity of the pores (the fraction of communicating pores), as well as the size of the inner area of the walls of connected channels. These parameters determine the extent of the proliferation and growth of individual cells and the formation of supracellular structures and tissues.

3. Synthesis of hydrogels

One of the methods of the preparation of the macromolecular hydrogels, well explored in detail, is the free-radical polymerization which was used to prepare hydrogels also in this study. In the simplest case, the reaction mixture contains monomer(s), a crosslinking agent, an initiator and possibly a diluting agent (e.g., water or an



2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)



N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA)

Fig. 1. Chemical structures of monomers used in hydrogel formation

aqueous solution of inorganic salts). However, even a small change of the type and concentration of the diluent can substantially affect the resulting microstructure of the hydrogel polymeric network: here, the mechanism of the phase separation or microsineresis takes place, which manifests itself so that – at a certain degree of conversion (i.e., when a certain average length of polymer chains and the extent of crosslinking is achieved) – the polymer being formed starts to separate from the solution as a result of decreasing miscibility of the components of the system. Generally, these thermodynamically governed processes were well described when an intensive development of optically pure hydrogels for ophthalmological applications was under way¹⁹. Namely, any approach to the conditions of syneresis (phase separation) would mean a risk of turbidity or whitening of the gel and, therefore, the exclusion of its use. Since the phase separation induces bicontinuous and spatially uniform morphologies spanning the whole volume, the phenomenon is now used to control microstructure of the crosslinking systems to prepare microstructured hydrogels^{20,21}.

2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) are monomers often used to prepare hydrogels. Their structural formulae are presented in Fig. 1 (ref.²²).

4. Morphology of hydrogels and the pore formation

An addition of solid particles (insoluble in the monomer mixture), or the so called sacrificed templates (porogens)⁸, is a frequently used method of the formation of pores with a defined size and shape. After the polymerization is completed, these particles are washed out by a proper solvent, leaving just imprints of their shape (pores) in the gel matrix, without any detrimental effect

due to a possible presence of their residues in the hydrogel. The template can have a very accurately defined geometry²³. It is advantageous to use the particles of salts or sugars which are easy to extract by water and safe from the standpoint of biocompatibility of the resulting material²⁴.

The concentration, size, shape and arrangement of the particles in the monomer mixture determine the overall volume of the pores and the extent of their possible communication in the hydrogel formed. If the template particle concentration is too low, individual pores do not interconnect and the given hydrogel intended for the cell cultivation would not act as the so-called 3D substrate. If there are too many particles, the gel is not continuous and disintegrates to bigger or smaller fragments. Therefore, the amount of particles should be tuned so that it ranges between these two critical limits and thus the walls of majority of particles partially overlap, leading to a formation of passable channels. The space arrangement of the pores formed in this way can be simulated mathematically by, e.g., the Monte Carlo approach, enabling one to generate the topology of paths originating by a random distribution of objects: such tasks belong to the field of the so-called closely packed systems^{25–27}.

The cryogelation techniques²⁸ use a similar effect: the particles forming the future pores are generated during the polymerization by freezing. The diluent itself, most commonly water, sometimes mixed with dimethyl sulfoxide (DMSO), acts as the porogen²⁹. During the polymerization, the monomer solution must be frozen sufficiently deep below the melting point of the diluent which freeze-separates in a form of small crystals, driving thus the monomer mixture out to their environment where the polymerization itself takes place. After heating to room temperature, the crystals melt, giving rise to pores. In case of the cryogelation of 2-hydroxyethyl methacrylate, in addition to freezing, a process of microsineresis took place in the partition walls between the crystals, thus forming a dual pore size hydrogel, i.e., the matrix with two different characteristic sizes of pores, cf. Fig. 2.

There are also more recent methods to form hydrogels with defined space structure, such as 3D printing³⁰, electrospinning³¹, and a production of injectable gelation solutions forming the hydrogel *in situ*³². Further, attention is devoted to the laser cutting of given objects in a preformed block of a hydrogel^{33,34}.

5. Methods of hydrogel visualization

Material researchers, striving to develop new objects for tissue engineering, need to have methods at their disposal, enabling them to visualize, reconstruct in space (typically, using a sophisticated software), characterize and, if possible, quantify the inner structure of hydrogels and its parameters, such as the volume of the gel phase, characteristic sizes of the pores and their distribution, or the volume of communicating vs. isolated pores. The knowledge of the complex space structure of the gel makes

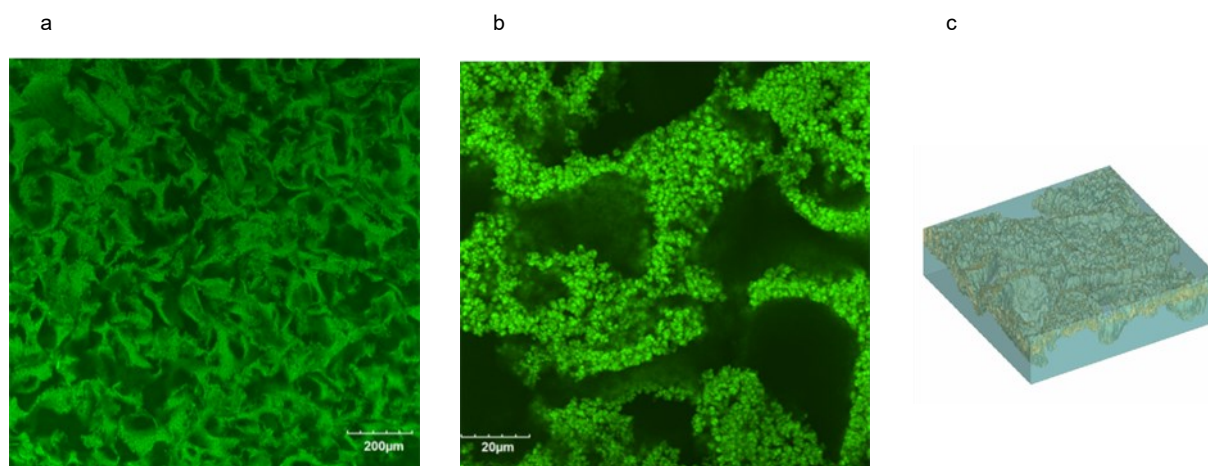


Fig. 2. Macroporous cryogel from poly(2-hydroxyethyl methacrylate) depicted using the laser scanning confocal microscopy of samples in a swollen state at room temperature. (a) magnification 5 \times , (b) magnification 50 \times , (c) computer reconstruction obtained by assembling the x-y planar scans obtained by laser scanning confocal microscopy method. For details see the text.

it possible to simulate also its deformation behavior. The fluorescence laser scanning confocal microscopy (LSCM) in connection with an advanced software represents an efficient method enabling to determine parameters of hydrogels under study *in situ*, i.e., in the state of equilibrium swelling in water. The requirements for sample preparation for the wide-spread family of the scanning electron microscopy techniques (SEM) differ substantially from those required for the LSCM method as they typically involve sample volume change caused by drying or cooling. In the high voltage SEM (HVSEM) the specimen is examined in its dried state which includes some way of drying of the hydrated gel, most often deep temperature freeze-drying, then trimming the sample, its sputtering with metal at room temperature and finally the dry metal coated sample scanning in the microscope vacuum chamber at room temperature. In the cryogenic low vacuum SEM (cryo-SEM or cryo-LV SEM) the sample has a somewhat different temperature history. The swollen gel is first rapidly frozen (flash freeze or “quenching” using liquid nitrogen or even helium) and then, without being consequently treated at room temperature, the sample is passed to the scanning chamber where the process of electron detection (in this case back scattered electrons) typically runs at temperatures below zero such as $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obviously, various profiles of temperature changes applied to such delicate water-swollen materials like hydrogels can induce various effects on gels morphology.

Presently, the LSCM method is widely used to study cell structures and cell processes in their native (hydrated) state³⁵. Its great merit lies in the possibility to observe the sample inner structure without the necessity to make thin slices of the material. When following the substrates colonized by cells, the cells are not killed, as it is the case with

SEM. In practice, therefore, LSCM make it possible to observe the cell processes in real time. This efficient and non-invasive method, which is still being refined, was invented and applied in biology, medicine, and material sciences by Czech researchers M. Petráň and M. Hadravský^{36,37} in sixties and is acknowledged by global scientific community.

The use of the LSCM method is demonstrated in Fig. 2 where a case of a cryogel is presented, as prepared by a crosslinking polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in aqueous media. During the polymerization, HEMA forms crosslinks to some extent even without any addition of the crosslinking agent because a certain amount of bifunctional diester is formed through a spontaneous transesterification of this monomer. The partition walls between the pores consist of a fine structure of sintered balls of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) which have approx. one micrometer in diameter and were formed by a phase separation in the gelling system. The gel was colored by fluorescein, as seen in Fig. 2 (green regions). The overall structure of the swelled hydrogel is accentuated in Fig. 2a where large pores are well perceptible (ca. 26–60 μm); they are formed by washing out the particles of the porogen and mutually separated by porous gel partition walls. 3D computer reconstruction of this sample obtained by composing of 205 x,y-planar surfaces sliced at a distance of 0.44 μm along the z-axis.

As complementary methods, SEM or cryo-SEM³⁸ can be used simultaneously, especially to elucidate the fine details of the structures which are below the detection limit of LSCM. However, in some cases, cryo-SEM may yield misrepresented images due to the structure change induced by sample flash freezing. It was demonstrated that, when

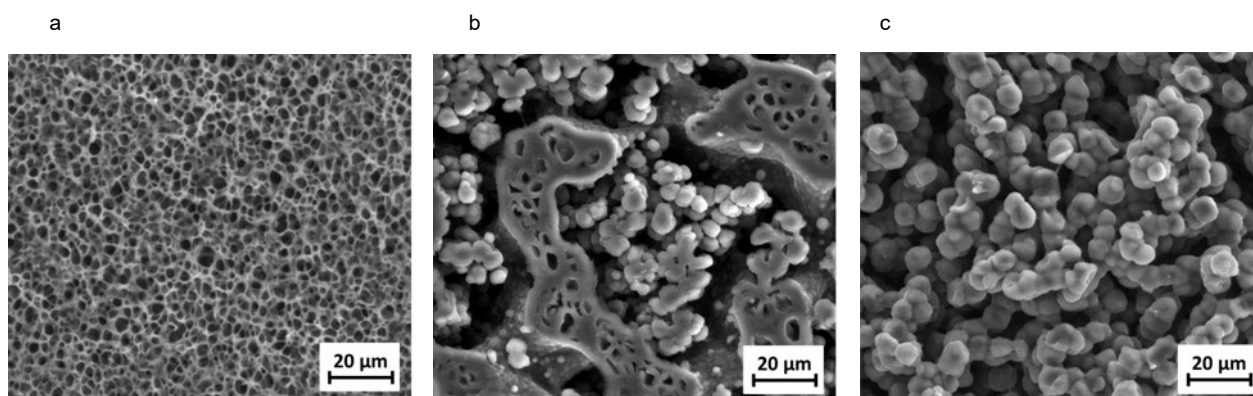


Fig. 3. Effect of diluent (aqueous NaCl solution), in which the crosslinking polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate proceeded, on the final morphology of the hydrogel, as imaged by the cryo-scanning electron microscopy. The content of the diluent in the mixture was 60 vol.% in all cases, the concentration of NaCl in water was (a) 1.4 M, (b) 0.5 M, (c) 0.6 M, the concentration of the crosslinking agent was 1 mol.% with respect to the monomer only

highly swollen hydrogels are subject to freezing, even though rapid, not all water transforms into amorphous state and a part of it forms ice crystals. Then the formation of crystals leads to a permanent porosity or even mechanical failure of the gel matrix. In case of macroporous gels, the SEM results show only moderate distortion because water forms ice crystals in already-existing pores and the matrix structure in the partition walls remains preserved. During the freezing, however, the degree of swelling changes, and so does the hydrogel matrix volume; then, the thickness of the walls does not correspond to the swollen state at the application (usually room or physiological) temperature. The advantage of the SEM methods lies in their large depth of focus and high contrast: the methods yield images with a high resolution and excellent clarity. If the formation of artifacts can be avoided or the system is known

enough, i.e., the artifacts can be identified clearly, then SEM methods yield a valuable insight into inner structures of complex soft systems.

Although SEM is not a trouble-free method for the study of the porous swollen hydrogel matrix³⁹ (in contrast to LSCM), it can be accepted as a complementary source of data. When compared to LSCM, SEM enables one to get a deeper spatial view in a single scanned plane of the sample. In comparison with light microscopy, SEM offers a substantially higher magnification. However, when using high energy (HV) for a prolonged scanning time, some samples may show signs of degradation under the beam of electrons due to excess heat. In contrast, the confocal microscopy provides a possibility to display the material structure within a layer having several tens to hundreds micrometers in thickness (depending on the overall light

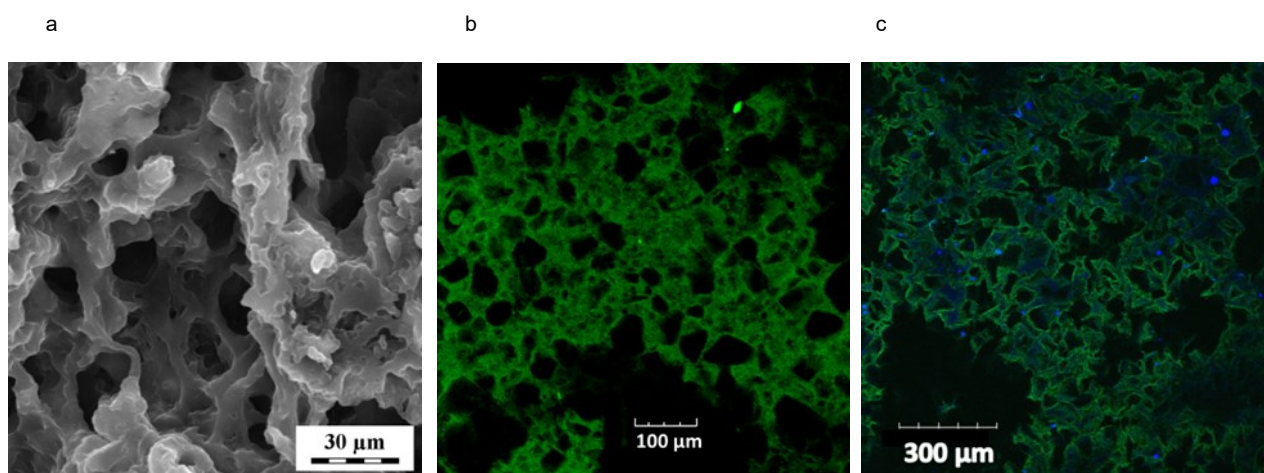


Fig. 4. Macroporous hydrogel depicted by (a) scanning electron microscopy, (b) laser scanning confocal microscopy in a swollen state at room temperature, and (c) the same substrate settled by mesenchymal stem cells obtained from the rat femur. For details see the text

permeability) after image rendering.

The use of cryo-SEM can be illustrated on the example of the crosslinking polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and of the influence of the aqueous sodium chloride solution (with varying concentration) as a diluting agent having a salting-out effect on the polymer being formed. Samples prepared in aqueous NaCl showed a milky turbidity, whereas the monomer mixture (i.e., a mixture of monomers and a crosslinking agent with concentrations in units of molar per cents) of the same composition, polymerized in pure water, yielded an optically clear hydrogel²¹. Fig. 3 shows a gradual change of the structure of the macroporous hydrogel: from a cellular structure (Fig. 3a) to a perfect bicontinuous one (Fig. 3c) caused by a change of the concentration of the salt (0.4, 0.5, and 0.6 M aq. NaCl) in the diluting agent used during the polymerization of this gel.

When studying the morphological structure of swollen hydrogels it is definitely worth of performing an analysis of the samples simultaneously both on confocal and on electron microscope. This is illustrated in Fig. 4 showing a macroporous hydrogel prepared from HPMA in presence of a washable particle porogen using the crosslinking-induced phase separation in the partition walls. The image in Fig. 4a taken with HV SEM shows that the freeze-drying resulted in compacting the gel walls, in which no fine porosity is therefore visible (this, on the contrary, can be seen in Fig. 4b) and, on the other hand, in increasing the large pores (the freeze drying caused a deswelling of the gel phase, accompanied by a change of volume). Thus, images of the equilibrium-swollen sample taken by the confocal microscopy show a real thickness, as well as the real fine structure of the partition walls, and bring a proof that the shape and size of pores differ from the preceding way of imaging.

6. Conclusion

The examples of the imaging of the macroporous hydrogels described above show that both the scanning electron microscopy (HV SEM and cryo-SEM) and the confocal light microscopy yield important and mutually complementary results for the study of the spatial structure of soft, swollen materials. The laser scanning confocal microscopy (LSCM) enables one to get an overall picture of the morphological features of a swollen gel, if the gel can easily be distinguished from the swelling media (e.g., by an incorporation of a fluorescent dye) and to obtain planar slices in the depth of the material, from which the 3D structure can be reconstructed by a computer. In order to reveal fine details of the structure, it is advantageous to use SEM; however, when using this method, the danger of artifacts (caused by the preparation of samples) should be kept in mind. Therefore, one must be sure whether or not the structure of the gel of a given composition changes when studied by SEM; this certainty can be obtained by using a parallel experiment of LSCM. In case of the cell tests and the study of the polymer network degradation,

however, it is necessary to rely on the confocal microscopy only which makes it possible to follow sample changes in real time. Regrettably, the SEM method destructs the samples, and this hinders observing the dynamics of the processes under study by this technique.

The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, projects No. 17-08531S (2017-2019) and 17-11140S (2017-2019).

REFERENCES

1. Jones R. G., Kahovec J., Stepto R., Wilks E. S., Hess M., Kitayama T., Metanovski W. V.: *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009.
2. Mikos A. G. and 12 co-authors: *Tissue Eng.* 12, 3307 (2006).
3. van Tomme S. R., Hennink W. E.: *Expert Rev. Med. Devices* 4, 147 (2007).
4. Wan W. K., Campbell G., Zhang Z. F., Hui A. J., Boughner, D. R.: *J. Biomed. Mater. Res.* 63, 854 (2002).
5. Lozinsky V. I., Plieva F. M., Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Bioseparation* 10, 163 (2001).
6. Wichterle O., Lím D.: *Nature* 165, 117 (1960).
7. Michálek J., Chmelíková D., Chylíková Krumbholcová E., Podešva J., Dušková Smrčková M.: *Chem. Listy* 112, 143 (2018).
8. Přádný M., Dušková Smrčková M., Dušek K., Janoušková O., Sadakbayeva Z., Šlouf M., Michálek J.: *J. Polym. Res.* 21, 1 (2014).
9. Michálek J., Dušková Smrčková M., Přádný M., Chylíková Krumbholcová E.: *Chem. Listy* 112, 490 (2018).
10. Dušková Smrčková M., Sadakbayeva Z., Steinhart M., Dušek K.: *Macromol. Symp.* 372, 28 (2017).
11. Burdick J. A., Anseth, K. S.: *Biomaterials* 23, 4315 (2002).
12. Antoine E. E., Vlachos P. P., Rylander M. N.: *Tissue Eng., Part B* 20, 683 (2014).
13. Popryadukhin P. V., Yukina G. Y., Dobrovolskaya I. P., Ivankova E. M., Yudin V. E.: *Cell Tissue Biol.* 12, 247 (2018).
14. Linnes M. P., Ratner B. D., Giachelli C. M.: *Biomaterials* 28, 5298 (2007).
15. Gyles D. A., Castro L. D., Silva J. O. C., Ribeiro-Costa R. M.: *Eur. Polym. J.* 88, 373 (2017).
16. Aizawa Y., Owen S. C., Shoichet M. S.: *Prog. Polym. Sci.* 37, 645 (2012).
17. Bracher M., Bezuidenhout D., Lutolf M. P., Franz T., Sun M., Zilla P., Davies N. H.: *Biomaterials* 34, 6797 (2013).
18. Mammadov B., Sever M., Guler M. O., Tekinay A. B.: *Biomater. Sci.* 1, 1119 (2013).
19. Dušek K., Sedláček B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 36, 1569 (1971).

20. Sadakbayeva Z., Dušková Smrčková M., Šturcová A., Pflieger J., Dušek, K.: *Eur. Polym. J.* 101, 304 (2018).
21. Karpushkin E., Dušková Smrčková M., Šlouf M., Dušek K.: *Polymer* 54, 661 (2013).
22. Kopeček J., Kopečková P.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 62, 122 (2010).
23. Wang B., Jin P., Yue Y., Ji S., Li Y., Luo H.: *RSC Adv.* 5, 5072 (2015).
24. Kubinová Š., Horák D., Hejčl A., Plichta Z., Kotek J., Proks V., Forostyak S., Syková E.: *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 9, 1298 (2015).
25. Baule A., Makse H. A.: *Soft Matter* 10, 4423 (2014).
26. Tian J., Xu Y., Jiao Y., Torquato S.: *Sci. Rep.* 5, 16722 (2015).
27. Xu W., Zhu Z., Zhang D.: *Soft Matter* 14, 8684 (2018).
28. Sedlačík T., Proks V., Šlouf M., Dušková Smrčková M., Studenovská H., Rypáček F.: *Biomacromolecules* 16, 3455 (2015).
29. Ozmen M. M., Okay O.: *React. Funct. Polym.* 68, 1467 (2008).
30. You S., Li J., Zhu W., Yu C., Mei D., Chen S.: *J. Mater. Chem. B* 6, 2187 (2018).
31. Hochleitner G., Jüngst T., Brown T. D., Hahn K., Moseke C., Jakob F., Dalton P. D., Groll J.: *Biofabrication* 7, 35002 (2015).
32. Huebsch N. and 17 co-authors: *Nat. Mater.* 14, 1269 (2015).
33. Applegate M. B., Coburn J., Partlow B. P., Moreau J. E., Mondia J. P., Marelli B., Kaplan D. L., Omenetto F. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 12052 (2015).
34. Lee K. S., Yang D. Y., Park S. H., Kim R. H.: *Polym. Adv. Technol.* 17, 72 (2006).
35. Ishikawa-Ankerhold H. C., Ankerhold R., Drummen G. P. C.: *Molecules* 17, 4047 (2012).
36. Kopecký M.: *Vesmír* 95, 222 (2016).
37. Frank L., Kubínová L., Petráň M., Delong A., Nebesářová J., Hozák P.: *Vesmír* 83, M1 (2004).
38. Miller D. R., Peppas N. A.: *Biomaterials* 7, 329 (1986).
39. Paterson S. M., Casadio Y. S., Brown D. H., Shaw J. A., Chirila T. V., Baker M. V.: *J. Appl. Polym. Sci.* 127, 4296 (2012).

Abstract

Macromolecular hydrogels provide model synthetic substrates widely applied in biomedical research, especially for studies of the cellular settlement. Today, hydrogels are tailored with respect to specific needs of the given model or a real tissue. Key characteristics of the hydrogel substrates are their chemical composition, morphological structure, and, most notably, the porosity and its topology: size, shape, and mutual connectivity of pores. To develop new substrates, it is therefore necessary to use methods for the visualization and reconstruction of their inner structure in space and to characterize, if possible quantify, its parameters, such as the total volume of the pores, the fraction of communicating pores, characteristic patency and the total area of the inner walls of the connecting corridors. Fluorescent confocal microscopy in combination with an advanced software represents an efficient method to determine parameters mentioned above, in order to characterize hydrogels *in situ*, i.e., in the state of equilibrium swelling in water. Thus, this method differs significantly from another widespread technique, i.e., the scanning electron microscopy, where the samples, saturated with water, have to be freeze-dried first, and then the structure of each sample is determined in the frozen state. This paper compares the results of both imaging methods, as applied to macroporous hydrogels. Advantages and shortcuts of both methods are discussed.