

Karakterizacija hidrogelova pripremljenih iz biogenog izvora za primjenu u inženjerstvu tkiva

Zrno, Julijan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:116027>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Julijan Zrno

**Karakterizacija hidrogelova pripremljenih iz biogenog izvora za
primjenu u inženjerstvu tkiva**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi povjerenstva:

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic

Zagreb, lipanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidat Julijan Zrno

Predao je izrađen diplomski rad dana: 04. lipnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Mirela Leskovic, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Sveučilište u
Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
(zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 07. lipnja 2024.

*Diplomski rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta
kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

SAŽETAK

Tkivno inženjerstvo uvelike je istraživano područje kojem znanstvenici posvećuju sve veću pozornost. Ono omogućuje regeneraciju oštećenih tkiva i organa, smanjujući potrebu za transplantacijama i donorima. Decelularizirana izvanstanična matrica (dECM) koristi se u tkivnom inženjerstvu jer pruža prirodnu podlogu koja podržava regeneraciju tkiva, zadržavajući biokemijske i biomehaničke faktore potrebne za rast stanica. Također, smanjuje rizik od imunološkog odbacivanja jer ne sadrži stanične komponente koje bi mogle izazvati imunološku reakciju. Hidrogelovi od decelularizirane izvanstanične matrice kombiniraju biokompatibilnost i prirodnu bioaktivnost dECM-a s mehaničkim svojstvima hidrogela, omogućujući optimalnu podršku za rast i diferencijaciju stanica.

Za decelularizaciju jetrenog tkiva korišten je deterdžent natrijev lauret sulfat (SLES). Decelularizirani uzorci dodatno su obrađeni ultrazvukom u trajanju od 1, 2, 4, 8 i 16 sati. Takvim uzorcima kvantificirane su biološke komponente DNK i kolagen. Provedena je i diferencijalna pretražna kalorimetrija kako bi se odredila termička stabilnost proteina. Pripremljeni hidrogelovi od dECM-a karakterizirani su mjerenjem promjene apsorbancije u vremenu kako bi se dobio uvid u kinetiku geliranja te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) kako bi se identificirala i potvrdila prisutnost specifičnih biokemijskih komponenti unutar hidrogela.

Provedenim ispitivanjima može se zaključiti da je decelularizacija uspješno provedena s obzirom da se kvantifikacijom utvrdio znatno smanjen sadržaj DNK, ali i visok sadržaj kolagena. Najbolje vrijednosti pokazuje uzorak SLES 0.5b 8h, što potvrđuje i FTIR analiza, pa je taj uzorak potencijal za daljnja istraživanja budući da ima i zadovoljavajuću kinetiku geliranja te maksimalnu temperaturu denaturacije.

Ključne riječi: tkivno inženjerstvo, decelularizirana izvanstanična matrica (dECM), hidrogelovi, ultrazvuk, SLES

ABSTRACT

Characterization of hydrogels made from biogenic source for tissue engineering applications

Tissue engineering is a largely researched field to which scientists are paying more and more attention. It enables the regeneration of damaged tissues and organs, reducing the need for transplants and donors. Decellularized extracellular matrix (dECM) is used in tissue engineering because it provides a natural substrate that supports tissue regeneration, retaining biochemical and biomechanical factors necessary for cell growth. Also, it reduces the risk of immune rejection because it does not contain cellular components that could cause an immune reaction. Decellularized extracellular matrix hydrogels combine the biocompatibility and natural bioactivity of dECM with the mechanical properties of hydrogels, enabling optimal support for cell growth and differentiation.

The detergent sodium laureth sulfate (SLES) was used to decellularize the liver tissue. Decellularized samples were additionally treated with ultrasound for 1, 2, 4, 8 and 16 hours. The biological components of DNA and collagen were quantified with such samples. Differential scanning calorimetry was also performed to determine the thermal stability of proteins. Prepared dECM hydrogels were characterized by measuring the change in absorbance over time to gain insight into gelation kinetics and by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to identify and confirm the presence of specific biochemical components within the hydrogel.

Based on the research, it can be concluded that the decellularization was successful, since the quantification showed a significant decrease in the DNA content, but also a high collagen content. The best values are shown by the sample SLES 0.5b 8h, which is also confirmed by the FTIR analysis, so this sample has the potential to be considered in further research since it has satisfactory gelling kinetics and the maximum denaturation temperature.

Key words: tissue engineering, decellularized extracellular matrix (dECM), hydrogels, ultrasound, SLES

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Tkivno inženjerstvo	2
2.2. Materijali u tkivnom inženjerstvu	3
2.2.1. Metali	3
2.2.2. Keramika	3
2.2.3. Polimeri	4
2.3. Hidrogelovi	7
2.3.1. Svojstva hidrogelova	8
2.3.2. Metode izrade nosača	9
2.4. Izvanstanična matrica	11
2.4.1. Decelularizirana izvanstanična matrica	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.2. Uređaji	17
3.3. Priprema uzoraka	18
3.4. Metode karakterizacije	19
3.4.1. Kinetika geliranja	19
3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	20
3.4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	20
3.4.4. Kvantifikacija bioloških komponenata	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Kvantifikacija bioloških komponenata	21
4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	23
4.3. Kinetika geliranja	25

4.4. FTIR analiza.....	28
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	38

1. UVOD

Problemi koje donosi tradicionalna transplantacija organa zahtijevaju moderna rješenja te se radi toga brojni današnji znanstvenici usmjeravaju u području tkivnog inženjerstva, discipline koja povezuje načela znanosti i inženjerstva. Unutar tkivnog inženjerstva istražuju se razni materijali s ciljem razumijevanja njihovih svojstava i potencijalne primjene u regenerativnoj medicini.

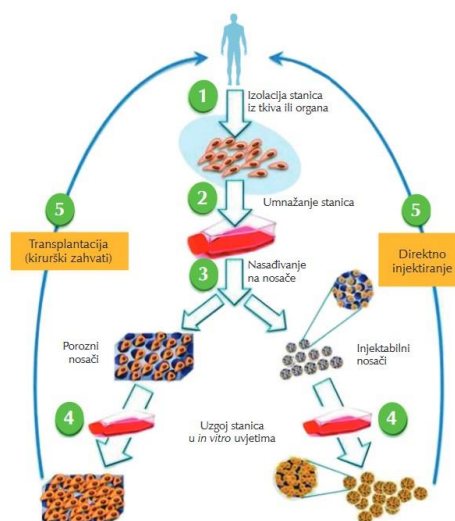
Jedan od ciljeva tkivnog inženjerstva je stvaranje bioaktivnih nosača koji mogu poduprijeti rast stanica i stvaranje novog tkiva. Takvi nosači predstavljaju trodimenzionalno okruženje koje mora biti slično prirodnom tkivu. Velika pažnja posvećena je biomaterijalima koji pokazuju dobra površinska, mehanička, biokompatibilna i biorazgradiva svojstva za primjenu u ove svrhe. Zbog svojih fizičkih svojstava koja su vrlo bliska onima živih tkiva, hidrogelovi su vrlo istraživani u ovom području. Razvijanje hidrogelova od decelularizirane izvanstanične matrice (dECM) prirodnih tkiva uvelike se istražuje u tkivnom inženjerstvu budući da izvanstanična matrica ima veliki značaj u proliferaciji, diferencijaciji i migraciji stanica. Decelularizacijom se uklanja imunogeni dio tkiva i osigurava prostor za infiltraciju novih stanica.

Raznim analizama dobivaju se potrebne informacije o ovim materijalima. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) daje uvid u prisutnost molekula na površini uzorka, diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) omogućuje jasan prikaz svojstava materijala dok podliježe temperaturnim promjenama, a kvantifikacijom bioloških komponenata dobiva se podatak o količini genetskog materijala i kolagena u uzorku. Analizom hidrogelova od dECM-a, pomoću mjerenja apsorbancije, doznaju se važni parametri koji opisuju proces geliranja i ukazuju na brzinu istog. Ove metode omogućuju dublje razumijevanje karakteristika biomaterijala, što je vrlo važno za optimizaciju njihove primjene u biomedicini. Cilj ovog rada je provesti karakterizaciju hidrogelova pripremljenih iz biogenog izvora uz pomoć navedenih metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Tkivno inženjerstvo

Inženjerstvo tkiva je novo i brzorastuće multidisciplinarno područje istraživanja koje kombinira principe inženjerstva, biomedicine i znanosti o materijalima za razvoj bioloških nadomjestaka koji mogu obnoviti, održati ili poboljšati funkciju oštećenih ili bolesnih tkiva i organa. Konačni cilj tkivnog inženjerstva je stvoriti funkcionalna i održiva tkiva za transplantaciju, izbjegavajući ograničenja i komplikacije povezane s tradicionalnom transplantacijom organa. Inženjerstvo tkiva usko je povezano s područjem regenerativne medicine koja je usmjerena na popravak ili zamjenu oštećenih tkiva i organa. Tkivno inženjerstvo i regenerativna medicina imaju zajednički cilj, iskorištavanje prirodne sposobnosti pojedinih tkiva da se regeneriraju. Tkivno inženjerstvo je fokusirano na razvoj bioaktivnih podloga, odnosno nosača (eng. *scaffold*) za stanični rast i stvaranje novog tkiva. Zadovoljavajući nosač mora imati dobra površinska i mehanička svojstva kako bi došlo do što bolje adsorpcije, umnažanja i diferencijacije stanica te visoku poroznost kako bi se nesmetano mogao odvijati prijenos kisika, hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Svojstva nosača bi trebala ostati ista tijekom cijelog vremena njegovog trajanja. Vrlo bitno svojstvo koje nosač, odnosno materijal od kojeg je on napravljen, mora zadovoljiti je biokompatibilnost i biorazgradljivost, budući da su nosači samo privremeni oslonac koji degradira tijekom rasta novog tkiva. Brzina njegove razgradnje trebala bi biti jednaka brzini regeneracije tkiva. [1]



Slika 1. Osnovni koraci u tkivnom inženjerstvu [2]

Glavne korake u inženjerstvu tkiva prikazuje slika 1. Izolirane stanice iz prirodnog tkiva nasađuju se na odabrani nosač nakon čega se primjenjuju potrebni biokemijski podražaji koji simuliraju razvoj i diferencijaciju stanica. U opisanim *in vitro* uvjetima pomoću signalnih molekula (proteina i faktora rasta) simuliraju se fiziološki uvjeti te dolazi do procesa izmjene hranjivih tvari i nusprodukata. Nakon implantiranja takvog nasađenog nosača na mjesto oštećenja, regeneracija tkiva inducira se *in vivo*. [2]

2.2. Materijali u tkivnom inženjerstvu

Važni čimbenici u inženjerstvu tkiva su materijali i tehnike izrade nosača. U posljednja dva desetljeća proučavani su različiti materijali za izradu nosača, kao što su metali i njihove legure, keramika, polimeri itd., a jedna od zanimljivijih i sve popularnijih tehnika je 3D-ispis.

2.2.1. Metali

Do sada su se metali i njihove legure koristili kao materijali u ortopediji zbog svojih vrhunskih mehaničkih svojstava poput duktilnosti, krutosti te otpornosti na habanje i koroziju. Nosači na bazi metala kao što su titan, željezni oksid, zlato, srebro i magnezij koriste se u inženjerstvu tvrdih tkiva u obliku šipki, kuglica, žica, ljusti, čestica ili vlakana. Metali imaju svojstva koja im omogućuju lako dobivanje željenih oblika, dimenzija i sastava. Međutim, ovi materijali se ne smatraju biokompatibilnima, a nedostatak je i njihova inertnost te u pojedinim slučajevima potreba za vađenjem takvih implantata što iziskuje dodatan operativni zahvat. [3]

2.2.2. Keramika

Određene vrste keramičkih nanočestica, kao što su hidroksiapatit (HA) i TCP (trikalcijev fosfat) nanočestice, imaju komponente slične kostima, što ih čini savršenim kao nadomjesni materijal. Biokeramika se u ljudskom tijelu može ponašati na tri različita načina: (1) bez izravne interakcije s fiziološkim medijem, što ukazuje na bioinertno ponašanje; (2) podvrgavajući se kemijskim reakcijama te interakcija s okolnim tkivom, pokazujući bioaktivna svojstva; (3) kao bioresorptivan materijal koje tijelo s vremenom apsorbira nakon što izvrši svoju funkciju u popravku tkiva. S obzirom na visoku adsorpcijsku sposobnost, izvrsnu biokompatibilnost i dobru biorazgradljivost, CaP (kalcijev fosfat) nanočestice mogu se koristiti u izradi nosača čija

je uloga dostaviti lijek u oštećene stanice pacijenta. Zbog krhke strukture i poteškoća u podešavanju brzine biorazgradnje, primjena keramike u svrhe inženjerstva tkiva je za sada ograničena. [3-5]

2.2.3. Polimeri

Polimeri su se također pokazali kao dobri materijali koji mogu oponašati izvanstaničnu matricu (ECM, eng. *extracellular matrix*), a ovisno o podrijetlu mogu se podijeliti na prirodne i sintetske. Dok su prirodni polimeri uključeni u staničnu adheziju, tj. sudjeluju u interakciji između stanica, odnosno između stanica i izvanstanične matrice (ECM), sintetski polimeri su bioinertni. Međutim, sintetski polimeri zbog svog sastava ne mogu toliko dobro imitirati izvanstaničnu matricu pa su tako interakcije između stanica i nosača nešto slabije. Ono što je također nedostatak kod ovih polimera je to što se ponekad u njihovoj pripremi koriste agresivna, pa čak i toksična otapala. S druge strane, polimeri prirodnog podrijetla teže su obradivi te imaju lošija mehanička svojstva i nedosljednost u sastavu. Nepoželjna strana ovih polimera je i ta što, usadivanjem u organizam, može doći do nepoželjne imunološke reakcije. Budući da obje vrste imaju određene prednosti i nedostatke, kako bi se poboljšala fizikalno-kemijska i biološka svojstva, različiti materijali mogu se kombinirati zajedno, odnosno upotrijebiti kao kompozit. [6]

2.2.3.1. Sintetski polimeri

Među sintetskim polimerima, poliesteri se naširoko proučavaju za primjene u inženjerstvu tkiva. Poznati primjeri koji se često koriste su polimljična kiselina (PLA), poliglikolna kiselina (PGA) i polikaprolakton (PCL). Razgradnja ovih poliestera događa se hidrolizom njihovih esterskih veza. PGA je hidrofilni polimer i njegova razgradnja je brza i *in vitro* i *in vivo*. PLA je hidrofobniji od PGA zbog dodatne metilne skupine u jedinicama koje se ponavljaju pa se zbog toga razgrađuje sporije. Kako bi se dobio polimer s brzinom razgradnje između brzina razgradnje PLA i PGA, priprema se kopolimer polimljične i poliglikolne kiseline (PLGA). PCL se zbog svoje sporije razgradnje u odnosu na PLA, PGA i PLGA može upotrijebiti za izradu nosača koji će imati dugotrajniju primjenu, odnosno dugoročno oslobađati lijek. Međutim, ovi poliesteri relativno su kruti i imaju vrlo ograničenu fleksibilnost, što pak ograničava njihovu primjenu na tkiva poput hrskavice, tetiva, ligamenata, krvnih žila, kože i

mišića. Također, oni možda neće poduprijeti rast stanica dugoročno. Što se tiče 3D-ispisa, spomenuti poliesteri zahtijevaju organska otapala, a mogu i degradirati pri visokim temperaturama. [7, 8]

PCL je hidrofobni poliestar koji se odlikuje visokom plastičnošću i malom brzinom degradacije. Spora razgradnja PCL-a može poboljšati strukturnu stabilnost nosača i uravnotežiti brzu razgradnju prirodnih polimera. [9] Dodavanje PCL-a nosačima može osigurati zadovoljavajuća biomehanička svojstva i omogućiti 3D-ispis. [10] PCL je zbog svojih svojstava, kao što su viskoelastičnost, mala cijena i izvrsna kompatibilnost prilikom miješanja, jedan od atraktivnijih materijala za 3D-ispis. Međutim, ograničenja primjene su posljedica njegove hidrofobnosti i nedostatka bioaktivne površine zbog čega je razvijeno nekoliko pristupa za svladavanje ovih nedostataka. Kako bi se povećala stanična adhezija i proliferacija primjenjuje se nekoliko metoda za poboljšanje površine PCL nanovlakana, kao što je obrada plazmom, fizikalna adsorpcija te graft-polimerizacija. [11]

Zbog svoje biorazgradljivosti i efekta pamćenja oblika, poliuretani se smatraju dobrim materijalima za 3D-biotisak. [12]

2.2.3.2. Prirodni polimeri

Materijali ekstrahirani iz bioloških sustava kao što su biljke, mikroorganizmi, alge i životinje poznati su prirodni polimeri koji se od nedavno upotrebljavaju u području biomaterijala. Polimeri na prirodnoj bazi kao netoksični materijali vrlo su slični tkivima domaćina te stoga mogu poboljšati migraciju, adheziju, proliferaciju i diferencijaciju stanica. [13] Nedostaci prirodnih polimera su visoko-temperaturna osjetljivost i slabija mehanička svojstva. Osim toga, nepoželjan imunološki odgovor, koji je uzrokovan endotoksinima ili nečistoćama te nedosljednost u svojstvima od uzorka do uzorka također su nedostaci ovih polimera. [14] Kako bi se njihovi nedostaci sveli na minimum potrebni su posebni pristupi proizvodnji, pročišćavanju, kontroli degradacije i mehaničkih svojstava te povećanju kompatibilnosti prirodnih polimera. Ovi biološki materijali se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu za regeneraciju različitih tkiva kao što su hrskavica, kosti, mišići, koža, jetra i gušterača. Biomaterijali prirodnog podrijetla dijele se u dvije skupine, a to su materijali na bazi proteina i oni na bazi polisaharida. [15]

Proteini

Kolagen koji se sastoji od polipeptidnih lanaca ekstrahira se iz izvanstanične matrice različitih tkiva životinja kao što su hrskavica, jetra, kost, tetiva i koža. Zbog svojih brojnih prednosti poput visoke biokompatibilnosti, niske antigenosti, enzimske digestije u tijelu i izvrsne interakcije sa stanicama, našao je razne primjene u ovom području. Mala mehanička čvrstoća i brza razgradnja dva su glavna ograničenja kolagena, a kombiniranje sa sintetskim polimerima uvelike poboljšava njegova mehanička svojstva. [16, 17]

Želatina je također proteinski biomaterijal koji se hidrolizom dobiva iz kolagena, čime su eliminirani potencijalni patogeni. Stoga su njezina kemijska i mehanička svojstva vrlo slična kolagenu. Prethodna istraživanja pokazala su da korištenje želatine bez ikakvog umreživača neće imati dovoljna mehanička svojstva za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Kako bi se savladala niska mehanička čvrstoća i brzo otapanje želatine u vodenom mediju, korištena su sredstva za umrežavanje kao što je glutaraldehid. No korištenje glutaraldehida ima nedostatke kao što su toksični učinci, smanjenje tlačne čvrstoće i promjene u mikrostrukтури. Kao rezultat toga potrebno je koristiti druge umreživače za pripremu želatinskih nosača. [18]

Još neki od zanimljivih materijala na bazi proteina su fibrin i fibroin svile. **Fibrin** igra važnu ulogu u homeostazi tako da ima vitalnu ulogu u spontanom obnavljanju oštećenih tkiva, a u medicini se koristi kao fibrinsko ljepilo. [19, 20]

Fibroin svile se zbog svoje visoke mehaničke čvrstoće koristi za tkiva koja zahtijevaju visoku mehaničku stabilnost. [21]

Polisaharidi

Hitin kao drugi najzastupljeniji prirodni polimer, nakon celuloze, ekstrahira se iz mnogih algi i većine gljiva, kao i insekata i rakova. Hitin i njegovi derivati su netoksični, biorazgradivi, hidrofilni, a također imaju veliku čvrstoću i visoku reaktivnost. [22, 23]

Hitozan je zajednički naziv za sve deacetilirane oblike hitina koji se međusobno razlikuju po stupnju deacetilacije i molekulskoj masi. Zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i bioadhezivnosti ima vrlo važnu primjenu u medicini. Danas se razvijaju razni pripravci u kojima je hitozan nosač djelatne tvari, a rezultati pokazuju veliki uspjeh u postizanju kontroliranog i kontinuiranog oslobađanja lijeka koji je uklopljen u hitozansku matricu. S obzirom da je vrlo primjenjiv kao nosač djelatne tvari, to potiče brojna znanstvena istraživanja ovog biomaterijala na području farmaceutskih i medicinskih znanosti. Hitozan s polianionima

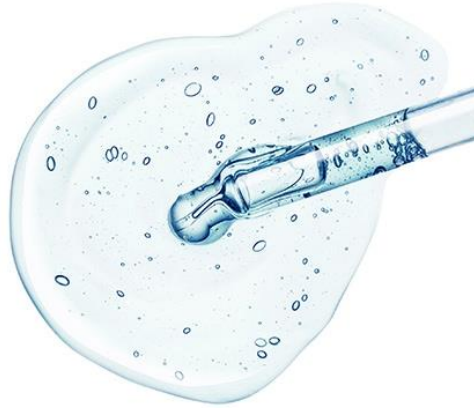
tvori gelove tako da je odlično sredstvo u izradi nosača koji se koriste u tkivnom inženjerstvu. [24] Porozna struktura hitozana je obećavajuća karakteristika za razvoj i optimizaciju raznih tkivnih nosača. Reguliranje poroznosti i morfologije pora nosača na temelju hitozana ključno je za kontrolu stanične adhezije i organizacije unutar modificiranog tkiva. Dodavanje hitozana u kolagenske nosače može značajno povećati veličinu pora i njegov modul stlačivosti. [25, 26]

Još neki od zanimljivih prirodnih biomaterijala koji se koriste u tkivnom inženjerstvu su hijaluronska kiselina, bakterijska (nano)celuloza i alginati. [15]

2.3. Hidrogelovi

Jedan od najistraživanijih biomaterijala za pripremu nosača su hidrogelovi. Hidrogelovi su hidrofilne polimerne mreže s trodimenzionalnom strukturom koje imaju sposobnost bubriti u vodi ili biološkim tekućinama. Mogu biti umreženi kemijskim ili fizičkim putem te apsorbirati velike količine vode bez otapanja i gubitka svog oblika. Što je polimer koji formira hidrogel hidrofilniji, hidrogel apsorbira veću količinu vode. Također, viši stupanj umreženja hidrogela rezultira nižim stupnjem bubrenja gela. [27] Različita svojstva hidrogelova kao što su propusnost, mehanička svojstva, površinska svojstva i biokompatibilnost, ovise o sadržaju vode u strukturi. Prednost hidrogelova pred drugim biomaterijalima proizlazi iz njihovih fizičkih svojstava koja su vrlo slična onima živih tkiva. Ta se sličnost temelji na njihovom sadržaju vode, mekoći i fleksibilnosti te minimalnoj međupovršinskoj napetosti s vodom ili biološkim tekućinama. U nabubrenom stanju hidrogelovi su mekani i elastični, slični živom tkivu. Kao što je već spomenuto, hidrogelovi se mogu pripremiti iz širokog spektra materijala prirodnog podrijetla, iz dijelova biljaka i životinja, te sintetskih materijala, kao i materijala pripremljenih modifikacijom tvari poput proteina i polisaharida. [28] Na slici 2 dan je prikaz hidrogela. [29]

Hidrogelovi se primjenjuju u medicini više od pedeset godina, a među prvima je razvijen hidrogel baziran na poli(2-hidroksietil metakrilatu) koji je imao uporabu u izradi kontaktne leće. Nakon toga, njegova primjena se značajno istraživala i proširila, naročito u posljednja dva desetljeća, pa se tako koristi kao sredstvo protiv opekline, kod izrade umjetnih hrskavica, u obliku flastera itd. [27]



Slika 2. Hidrogel

2.3.1. Svojstva hidrogelova

Hidrogel mora biti napravljen tako da što bolje oponaša izvanstaničnu matricu i na taj način potiče stvaranje novoga tkiva. To podrazumijeva osiguravanje prijenosa hranjivih tvari koje su potrebne za rast stanica, proliferaciju i diferencijaciju, staničnu adheziju i migraciju. Također je nužno osigurati mehaničku potporu i razgradnju uz uvjet da ne dolazi do stvaranja toksičnih produkata. [30] Drugo iznimno važno svojstvo koje hidrogel mora zadovoljiti je biokompatibilnost. To znači da u dodiru sa živim tkivom nosač ne smije izazvati oštećenje tkiva ili alergijske reakcije organizma.

Kada je u pitanju struktura, hidrogelni nosači moraju biti visoke poroznosti s dobrom povezanosti pora kako bi se omogućila pravilna funkcija stanica. [31] S obzirom na veličinu pora, hidrogelovi se dijele na: neporozne (1-10 nm), mikroporozne (10-100 nm) i makroporozne (100-1000 nm). Osim stupnja poroznosti, važni su i parametri poput volumena pora, veličine i raspodjele veličina pora te njihova međusobna povezanost. [27]

Mehanička svojstva hidrogelova prvenstveno ovise o njihovom sastavu i strukturi, a u mnogim slučajevima su slaba, zbog čega se mnogi od ovih materijala ne mogu koristiti za zamjenu oštećenih tkiva. Iako količina vode apsorbirane u polimernoj matrici hidrogela igra vrlo važnu ulogu u njegovim svojstvima difuzije i propusnosti te biokompatibilnosti, u mnogim slučajevima ona može negativno utjecati na njegova mehanička svojstva. Nadalje, udio vode u hidrogelu također utječe na njegova mehanička svojstva, jer povećanje udjela vode koja se smrzava u gelu uzrokuje pogoršanje njegove mehaničke otpornosti, budući da će ta voda

djelovati kao plastifikator, smanjujući temperaturu staklastog prijelaza. Strategije za poboljšanje mehaničkih svojstava hidrogelova uglavnom su umrežavanje i kopolimerizacija s hidrofobnim monomerima. [28]

2.3.2. Metode izrade nosača

Do sada je razvijen velik broj metoda za pripremu hidrogelova, a ovisno o pristupu i uvjetima izrade dobivaju se hidrogelovi različitih struktura i svojstava.

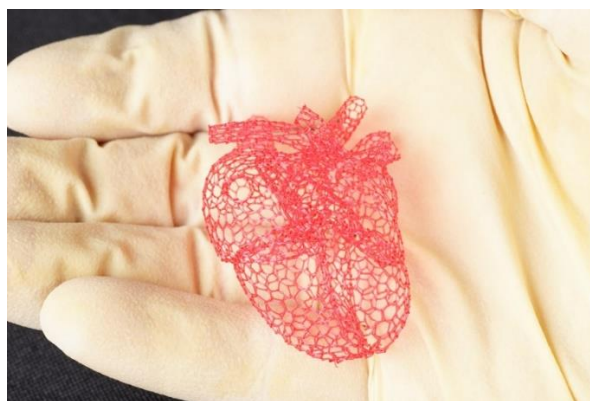
Lijevanje otapalom (eng. *solvent casting*) je metoda u kojoj se polimer otapa u prikladnom otapalu i dodaje se netopljiva sol. Nakon isparavanja otapala dobiva se sol-polimerni kompozit. Uranjanjem ovog kompozita u vodu ispire se sol, što rezultira vrlo poroznom strukturom. Ovom tehnikom moguće je proizvesti strukture velike poroznosti i kontrolirane veličine pora, ali samo jednostavnih struktura poput ravnih ploča i cijevi. Osim toga, zaostala otapala predstavljaju rizik od toksičnosti za stanice i tkiva. [32-34]

U **liofilizaciji** (eng. *freeze drying*) prvi korak uključuje otapanje polimera u otapalu i njegovo izlivanje u kalup. Otopina se zatim ohladi ispod svoje točke smrzavanja što rezultira skrnutim otapalom koje se potom podvrgava isparavanju sublimacijom. Ovim procesom se dobiva nosač čvrste strukture i međusobno povezanih pora. Stvrdnjavanje se događa pri temperaturi između $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a proces smrzavanja omogućuje podešavanje veličine pora. Prednost ove tehnike je nepostojanje visokih temperatura koje bi mogle ugroziti biološke komponente u nosaču. Međutim, nedostaci uključuju nepravilne veličine pora ($15\text{ }\mu\text{m}$ – $35\text{ }\mu\text{m}$), dugotrajan proces, visoku potrošnju energije i upotrebu citotoksičnih otapala. [35-38]

Toplinski inducirana fazna separacija (TIPS) je tehnika koja predstavlja namjerno induciranje odvajanja homogene polimerne otopine u različite faze smanjenjem njegove topljivosti kroz smanjenje temperature. Tijekom ovog procesa nastaju dvije faze: faza siromašna polimerima i faza bogata polimerima. Faza siromašna polimerima je eliminirana, a skrućivanjem faze bogate polimerima nastaje vlaknasta mreža nano-razine s velikom poroznošću, koja se koristi kao nosač. TIPS praćena liofilizacijom omogućuje proizvodnju nosača s poroznošću većom od 95 %. Nedostaci ove metode su ograničen izbor materijala za izradu i nedovoljna razlučivost. Dodatno, njegova primjenjivost u inženjerstvu košanog tkiva je ograničena jer dobiveni materijal nema odgovarajuće veličine pora. [38-42]

Elektroispredanjem (eng. electrospinning) se dobivaju netkane mreže čija vlakna mogu biti promjera od nekoliko desetaka nanometara pa sve do nekoliko desetaka mikrometara. Proces elektrospredanja odvija se uvođenjem taline ili otopine polimera u elektrostatsko polje visokog napona. Uređaj za kapilarno predenje spojen je na jednu visokonaponsku elektrodu, dok je druga elektroda povezana na zaslon (metalnu ploču ili valjak) za skupljanje vlakana. Električno polje uzrokuje ubrzavanje i stanjivanje nabijenog mlaza taline (ili otopine). Pod utjecajem elektrostatskih sila i velikih brzina deformacije iz nastalih vlakana nastaju snopovi. Promjer ovih vlakana znatno je manji od promjera uobičajenih vlakana. Zbog svojih smanjenih dimenzija, vlakna proizvedena elektrospredanjem imaju zadovoljavajuću mikrostrukturu, što rezultira specifičnim uporabnim svojstvima. [43]

Aditivna proizvodnja jedna je od novijih tehnika za izradu poroznih nosača za tkivno inženjerstvo. Poznatiji kao 3D-ispis, ovaj princip temelji se na dizajniranju željenog modela u računalnom programu (eng. *computer aided design*, CAD) gdje se podešavaju različita svojstva poput željenih dimenzija, poroznosti itd. Potom se, uz pomoć 3D-pisača, materijal nanosi sloj po sloj, sve do konačnog proizvoda. Ovisno o tehnologiji dobivanja slojeva i upotrijebljenim materijalima, koji mogu biti u krutom, tekućem i praškastom stanju, razvijeno je više postupaka aditivne proizvodnje, od kojih svaki otiskuje proizvod nešto drugačije strukture i rezolucije. Glavna prednost upotrebe ove tehnike je mogućnost proizvodnje prilagođenog nosača, tj. specifičnog za svakog pacijenta, kao i mogućnost izrade predmeta vrlo kompleksne geometrije. Različite tehnike aditivne proizvodnje, od kojih su najpoznatije stereolitografija (SLA), Polyjet (raspršivanje materijala) i selektivno lasersko sinteriranje (SLS), mogu se definirati kao biotisak ako uključuju uporabu nekog biomaterijala ili stanica. [44, 45] Na slici 3 prikazan je model srca ispisan 3D tehnikom. [46]



Slika 3. 3D-ispisan model srca

2.4. Izvanstanična matrica

Izvanstanična matrica (ECM) se sastoji od strukturnih i regulatornih proteina zajedno s polisaharidima, a proizvode ju i održavaju stanice. ECM igra ključnu ulogu u kontroli različitih staničnih funkcija poput proliferacije, migracije i diferencijacije. Svaki organ i tkivo posjeduje jedinstveni ECM s različitim biokemijskim sastavom i strukturnim rasporedom. Svojstva ECM-a vrlo su značajna u područjima tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine, budući da se u tim područjima često nastoji oponašati njen sastav i struktura. [47] ECM je složena trodimenzionalna mreža sastavljena od makromolekula od kojih su glavne kolagen, elastin, fibronektin i laminin. Njihove funkcije opisane su u tablici 1.

Tablica 1. Popis glavnih proteinskih komponenti u ECM-u. [48]

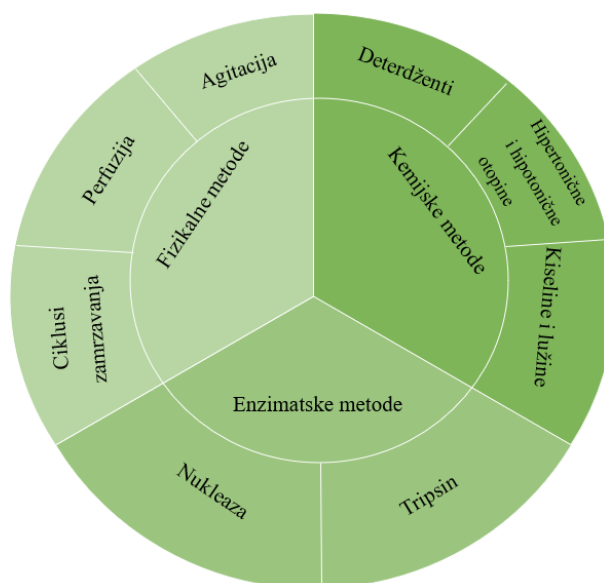
Protein	Tkiva	Funkcija
Kolagen	Koštani sustav i većina mekih tkiva	Omogućuju vlačnu čvrstoću, povezuju strukturu tkiva/organa, utječu na raspored tipova stanica.
Elastin	Većina mekih tkiva, poput krvožilnog sustava i mišića	Pružaju elastičnost, prilagođavaju mehanička svojstva.
Fibronektin	Većina organa/tkiva	Reguliraju ponašanje i funkciju stanica, reguliraju morfogenezu.
Laminin	Hrskavica, mišići	Potiču staničnu adheziju i migraciju, osiguravaju bioaktivna mjesta za umrežavanje.
Matricelularni proteini	Krvožilni sustav	Sadrže vezna mjesta za ECM strukturne proteine i stanične površinske receptore te moduliraju aktivnosti specifičnih faktora rasta.

2.4.1. Decelularizirana izvanstanična matrica

Unatoč širokoj upotrebi i brzom napredovanju različitih nosača razvijenih tkivnim inženjerstvom, uključujući one temeljene na prirodnim i sintetskim polimerima, njihova sposobnost da pomognu kod oštećenog tkiva ograničena je zbog poteškoća u repliciranju mikrokruženja *in vivo* te postizanju mehaničkih ili biokemijskih svojstava usporedivih s onima izvornih organa ili tkiva. Međutim, upotreba nosača od decelularizirane izvanstanične matrice (dECM) uvelike se istražuje u tkivnom inženjerstvu s obzirom da takvi nosači oponašaju idealno okruženje s izvornim trodimenzionalnim strukturama i nizom bioaktivnih komponenti, a dobivaju se uklanjanjem staničnih komponenti ECM-a raznim metodama decelularizacije. [48]

2.4.1.1. Metode decelularizacije

Cilj decelularizacije je temeljito uklanjanje staničnih komponenti uz očuvanje originalne strukture, sastava, kao i biokemijskih te mehaničkih svojstava izvorne izvanstanične matrice (ECM). Trenutačno ne postoji zlatni standard za decelularizaciju, budući da ona ovisi o više čimbenika povezanih s izvornim tkivom, kao što su vrsta i dob, anatomska lokacija te veličina. Unatoč tome, istraživači su osmislili niz protokola za decelularizaciju, uključujući metode poput fizičkih, kemijskih, enzimskih tretmana i kombinacije tih metoda (slika 3). U tablici 2 navedene su fizikalne metode decelularizacije. [48]



Slika 3. Osnovne metode decelularizacije [48]

Tablica 2. Fizikalne metode decelularizacije

Metode	Prednosti	Nedostaci
Ciklusi zamrzavanja	Remete staničnu membranu i izazivaju razaranje stanica stvaranjem intracelularnih kristala leda.	Narušavaju mikrostrukturu ECM-a kristalima leda. Zahtijevaju se naknadni tretmani za uklanjanje staničnog sadržaja.
Agitacija	Razara tkiva i stanice te odvaja stanice od bazalnih membrana.	Može inducirati smično naprezanje koje može oštetiti ECM. Nepotpuna decelularizacija. Gubitak bioaktivnih molekula.
Perfuzija	Uklanja stanice iz ECM-a te pomaže u uklanjanju staničnih komponenti i ostataka unutar prirodne vaskulature organa.	Rukovanje perfuzijskim uređajima zahtijeva visoku razinu sofisticiranosti.

Kemijski tretmani koriste deterdžente i kemijska sredstva za narušavanje stanične veze i uklanjanje stanične komponente.

Deterdženti

Topljivi amfifili poznati kao deterdženti, koji uključuju ionske, neionske i zwitterionske tipove, posjeduju sposobnost ometanja hidrofobno-hidrofilnih interakcija među molekulama. Oni igraju ključnu ulogu u uklanjanju imunogenih staničnih komponenti solubilizacijom staničnih membrana i odvajanjem DNK (deoksiribonukleinska kiselina) od proteina. Ovisno o jakosti, deterdženti mogu biti agresivni i blagi. Iako su učinkoviti, agresivni deterdženti mogu imati negativne učinke na izvanstaničnu matricu ometanjem i razdvajanjem proteina. Među njima, ionski deterdženti, kao što su natrijev dodecil sulfat (SDS), natrijev deoksikolat (SDC) i drugi, posebno su učinkoviti za decelularizaciju. To postižu prekidanjem interakcija lipid-lipid, lipid-protein, DNK-protein i protein-protein, što dovodi do eliminacije stanica i genetskog sadržaja. Koncentracija deterdženata je kritičan čimbenik u procesu decelularizacije. Više koncentracije rezultiraju nižim preostalim sadržajem DNK i smanjenom mehaničkom čvrstoćom u decelulariziranim ECM nosačima, dok niže koncentracije dovode do većeg zadržavanja kolagena, manje denaturacije ECM proteina i povećanih citotoksičnih učinaka s više preostalih staničnih komponenta. Unatoč svojoj učinkovitosti, ionski deterdženti imaju štetan utjecaj na

ECM strukturu i bioaktivne komponente zbog njihovog ometanja interakcija protein-protein. Dodatno, izazov uklanjanja zaostalog deterdženta i dalje postoji s obzirom da snažno stupa u interakciju s ECM proteinima, potencijalno inducirajući citotoksičnost u recelulariziranim stanicama. [48]

Nasuprot tome, neionski deterdženti nude blaži pristup solubilizaciji staničnih membrana i odvajanju DNK od proteina bez oštećenja strukture i orijentacije kolagena. Međutim, njihova blaža priroda ih čini nedovoljnima za potpuno uklanjanje jezgri i DNK. Stoga se ovi deterdženti koriste u kombinaciji s drugim sredstvima za decelularizaciju kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje staničnih komponenti. [48]

Kiseline i lužine

Metode decelularizacije koje koriste kiseline i lužine hidrolitički razgrađuju biomolekule, citoplazmatske komponente i nukleinske kiseline. Za decelularizaciju se obično koriste peroctena kiselina (PAA), klorovodična kiselina i octena kiselina. Naime, PAA pokazuje germicidno djelovanje protiv širokog spektra bakterija, virusa i gljivica. Unatoč njihovoj učinkovitosti, kiseline također mogu oštetiti mikrostrukturu ECM-a, smanjiti sadržaj kolagena i smanjiti čvrstoću tkiva. Stoga je važno pažljivo odabrati odgovarajuće kiseline i optimalne koncentracije. [49-51]

Decelularizacija pomoću lužina uključuje denaturaciju DNK i početak raspadanja stanica. Alkalne otopine, osobito one s pH iznad 11, učinkovite su u uklanjanju staničnih ostataka zbog osjetljivosti DNK na denaturaciju. Ipak, izloženost alkalnim otopinama može nepovoljno utjecati na strukturu izvanstanične matrice, promijeniti mehanička i viskoelastična svojstva, smanjiti sadržaj glikozaminoglikana te dovesti do uklanjanja faktora rasta unutar tkiva. Nadalje, alkalne otopine s rasponom pH od 10 do 12 mogu uzrokovati znatna oštećenja kolagenih vlakana, fibronektina i glikozaminoglikana, izazivajući ozbiljne reakcije imuniteta i potičući stvaranje fibroznih tkiva. [52]

Hipertonične i hipotonične otopine

Kroz osmotske učinke, metode koje koriste ove otopine postižu decelularizaciju tkiva potičući razaranje stanice, tj. dehidraciju, pucanje membrane i smrt. Potvrđeno je da hipertonične otopine mogu učinkovito eliminirati proteine, dok hipotonične otopine mogu olakšati uklanjanje jezgri i DNK. Nadalje, te se otopine lakše ispiru s tkiva, čime se smanjuje mogućnost stanične toksičnosti od bilo koje preostale otopine. Dodatno, otopine soli s hipertoničnim ili

hipotoničnim svojstvima, poput natrijeva klorida, pokazale su se učinkovitima u uklanjanju zaostalih kemikalija i staničnih ostataka iz ECM-a. [53]-[55] Međutim, pucanje membrane u hipotoničnim otopinama može uzrokovati raspršenje antigena u tkivima i rezultirati oticanjem tkiva. Unatoč tome što hipertonične/hipotonične otopine mogu pomoći u staničnoj smrti, ne mogu postići potpunu eliminaciju staničnih ostataka ako se ne kombiniraju s drugim deterdžentima ili enzimima. [53, 56]

Enzimatske metode

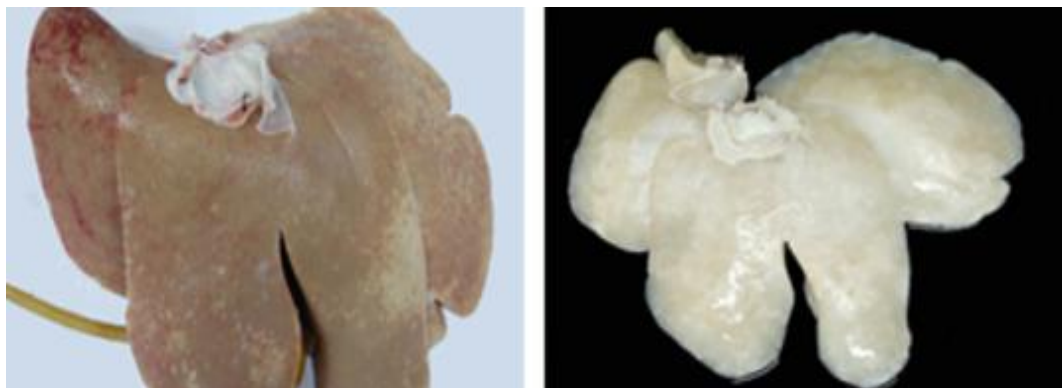
Enzimatske metode pružaju visoku specifičnost za uklanjanje staničnih komponenti i nepoželjnih komponenata ECM-a cijepanjem specifičnih lanaca unutar staničnih dijelova. Osnovne enzimatske metode, zajedno s njihovim mehanizmom i nedostacima, prikazane su u tablici 3. [48]

Tablica 3. Enzimatske metode decelularizacije

Metode	Prednosti	Nedostaci
Nukleaza	Katalizira hidrolizu unutarnjih ili terminalnih veza RNK (ribonukleinska kiselina) i DNK i pomaže u potpunom uklanjanju zaostalih nukleinskih kiselina.	Izaziva ozbiljno izobličenje strukture ECM-a. Nepotpuno se uklanja te može spriječiti recelularizaciju i transplantaciju.
Tripsin	Cijepa peptidne veze na karboksilnoj strani arginina i lizina.	Teško se postiže dovoljna decelularizacija. Potrebno je dugo vrijeme inkubacije. Remeti strukturu elastina i kolagena.
Fosfolipaza	Razgrađuje fosfolipidni dvosloj stanične membrane i čini stanice topivim.	Značajno smanjuje koncentraciju glikozaminoglikana.

Prethodno navedene metode (fizičke, kemijske i enzimске) imaju svoje prednosti i nedostatke. Sve one mogu u određenoj mjeri ukloniti stanične komponente, ali i naštetiti sastavu, strukturi i svojstvima izvanstanične matrice. Upotreba samo jednog od ovih tretmana nije dovoljna za minimiziranje štetnih učinaka na ECM i djelotvorno uklanjanje staničnog

sadržaja pa se zbog toga preporučuje kombinacija više metoda. [48] Na slici 4 prikazana je svinjska jetra obrađena decelularizacijom. [57]



Slika 4. Decelularizirana svinjska jetra

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Korišteni materijali i kemikalije tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada su:

- Svinjska jetra (kupljena u mesnici) – svinjska jetra odabrana je za istraživanje u ovom radu s obzirom da je anatomski i fiziološki vrlo slična ljudskoj jetri
- Enzim pepsin – za razgradnju proteina
- 0,01 M otopina klorovodične kiseline
- 0,1 M otopina natrijeva hidroksida
- 10x PBS otopina (fosfatni pufer, eng. *phosphate-buffered saline*) – za održavanje konstantne pH vrijednosti

3.2. Uredaji

Za provedbu eksperimentalnog dijela korišteni su sljedeći instrumenti:

- Tehnička vaga (PB602-S, Mettler Toledo)
- Magnetska miješalica (C-MAG HS 7 digital, IKA, Staufen, Njemačka)
- UV-Vis spektrofotometar (Shimadzu UV-1280) – instrument za određivanje apsorbancije
- DSC 823/TSO Mettler Toledo – instrument za diferencijalnu pretražnu kalorimetriju
- ATR-FTIR Bruker Vertex 70 – instrument za infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom

3.3. Priprema uzoraka

3.3.1. Decelularizacija

Decelularizacija uzoraka prethodno je provedena na sitno narezanim komadima svinjske jetre. Uzorci su obrađeni uz pomoć miješalice u fiziološkoj otopini, a zatim u otopini deterdženta natrijeva lauret-sulfata (SLES, engl. *sodium lauryl ether sulphate*), masenog udjela 0,5 %.

Pet uzoraka obrađeno je u ultrazvučnoj kupelji snage 120 W pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi od $30 \pm 1^\circ\text{C}$ u trajanju od 1 sata (SLES 0.5b 1h), 2 sata (SLES 0.5b 2h), 4 sata (SLES 0.5b 4h), 8 sati (SLES 0.5b 8h) i 16 sati (SLES 0.5b 16h). Šesti uzorak, SLES 0.5b, nije obrađen pomoću ultrazvuka, već je miješan na miješalici u 0,5 %-tnoj otopini SLES-a. Otopina se svakih 60 minuta zamjenjuje novom, sve do obezbojenja uzoraka. Nakon toga, uzorci se završno obrađuju destiliranom vodom, 96 %-tnim etanolom i otopinom PBS-a. Uzorci se potom zamrzavaju za daljnju provedbu eksperimenta.

U tablici 4 prikazane su oznake uzoraka i uvjeti provedbe decelularizacije.

Tablica 4. Oznake uzoraka i uvjeti pripreme

Oznaka uzorka	Deterdžent	Maseni udio deterdženta (%)	Vrijeme izmjene (min)	Vrijeme ultrazvučne obrade (h)
SLES 0.5b	SLES	0,5	60	-
SLES 0.5b 1h	SLES	0,5	60	1
SLES 0.5b 2h	SLES	0,5	60	2
SLES 0.5b 4h	SLES	0,5	60	4
SLES 0.5b 8h	SLES	0,5	60	8
SLES 0.5b 16h	SLES	0,5	60	16

3.3.2. Digestija

Digestija je provedena na prethodno decelulariziranim i liofiliziranim uzorcima svinjske jetre. Nakon što se usitni, izvaže se 200 mg uzorka dECM i doda 20 mg enzima pepsina te 20 mL 0,01 M otopine klorovodične kiseline. Pripremljeni uzorci mućkaju se na tresilici 48 sati pri 300 okretaja u minuti. Nakon 48 sati potrebno je pH dovesti do 7 kako bi se zaustavila aktivnost enzima. Uzorci se potom centrifugiraju kako bi se izdvojio supernatant koji se koristi u daljnjoj provedbi eksperimenta.

3.3.3. Priprema hidrogelova

Ispitivani hidrogelovi pripremljeni su tako da se u kivetu doda 16 mg liofiliziranog digestata decelularizirane izvanstanične matrice te 1,62 mL 0,01 M otopine klorovodične kiseline (pH = 2). Nakon miješanja i otapanja digestata provodi se neutralizacija na ledu uz dodatak 180 μ L 0,1 M otopine natrijeva hidroksida. Na kraju se dodaje 200 μ L 10x PBS otopine. Tako pripremljeni hidrogelovi u kivetama stavljeni su u staklenu posudu ispunjenu vodom sobne temperature koja ima ulogu izolatora s obzirom na njen visok toplinski kapacitet.

3.4. Metode karakterizacije

3.4.1. Kinetika geliranja

Kinetika geliranja pripremljenih hidrogelova analizirana je turbidimetrijskom analizom pomoću UV-Vis spektrofotometra (Shimadzu UV-1280). Ova se tehnika temelji na mjerenju zamućenja tijekom određenog vremena te samim time i povećanju apsorbancije do koje dolazi tijekom geliranja. Pripremljeni uzorci stavljeni su u laboratorijski sušionik pri temperaturi od 37 °C, a analiza je provedena u trajanju od 90 minuta, pri čemu se apsorbancija analizirala svakih 5 minuta pri valnoj duljini $\lambda = 405$ nm.

3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC; eng. *differential scanning calorimetry*) provedena je pomoću uređaja DSC 823/TSO Mettler Toledo. Mjerenje je provedeno na liofiliziranim uzorcima (nakon digestije i decelularizacije) u struji dušika uz protok 60 mL/min u temperaturnom rasponu od 20 do 170 °C brzinom zagrijavanja 5 °C/min. Za analizu se koriste aluminijski lončići koji se, nakon što se u njih stavi uzorak, hermetički zatvaraju i postavljaju u instrument u kojem se nalazi i prazan referentni lončić pomoću kojeg se osigurava pouzdano mjerenje te kalibracija samog uređaja.

3.4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

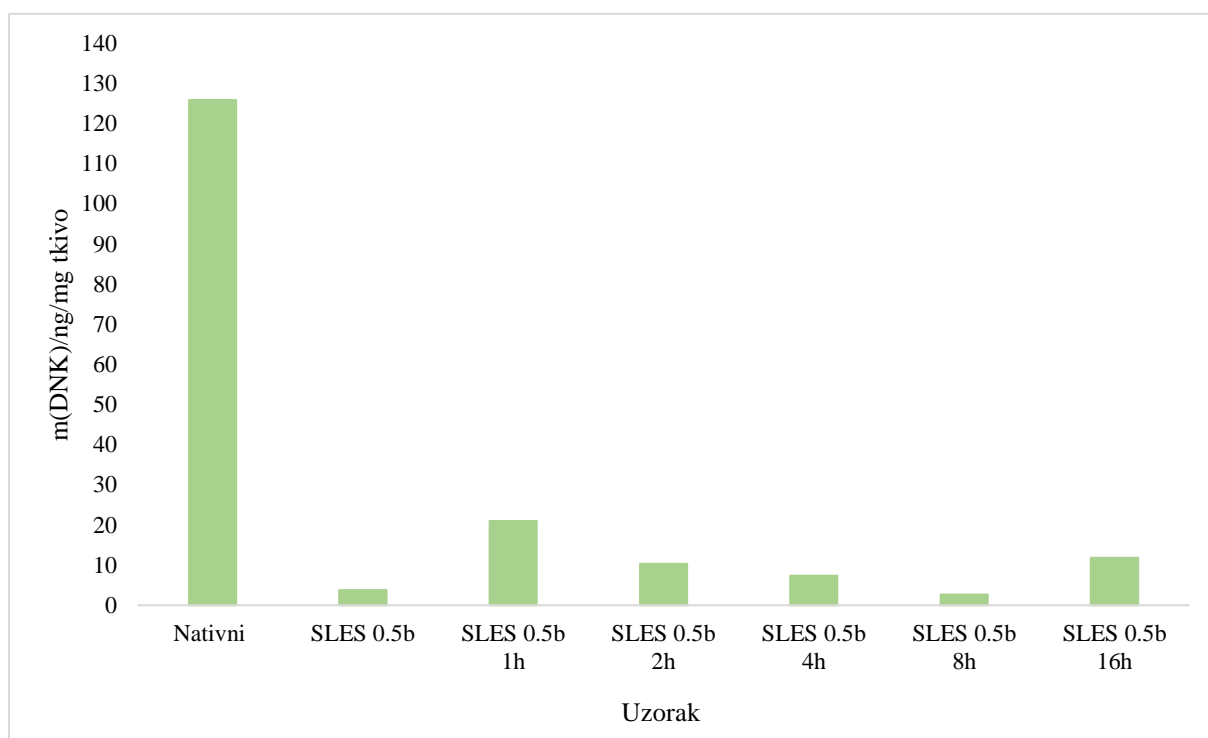
Radi jasnijeg uvida u kemijsku strukturu uzoraka provedena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR; eng. *Fourier transform infrared spectroscopy*). Spektri su snimljeni na instrumentu ATR-FTIR Bruker Vertex 70 u apsorpcijskom režimu u rasponu 400 – 4000 cm^{-1} 32 puta s rezolucijom 4 cm^{-1} pri temperaturi od 20 °C.

3.4.4. Kvantifikacija bioloških komponenata

Kvantifikacija bioloških komponenata provedena je na Odjelu za molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Za kvantifikaciju DNK korišten je pribor QuantiFluor dsDNA Sample Kit (Promega, SAD) te je kvantifikacija provedena prema protokolu proizvođača. Kako bi se kvantificirala DNK, bilo ju je potrebno prethodno izolirati. Izolacija je provedena pomoću pribora Monarch Genomic DNA Purification Kit (BioLabs, Engleska) prema uputama proizvođača. Kako bi se kvantificirao kolagen, korišten je pribor Total Collagen Assay Kit (Abcam, UK) te je postupak proveden prema uputama proizvođača.

4. REZULTATI I RASPRAVA

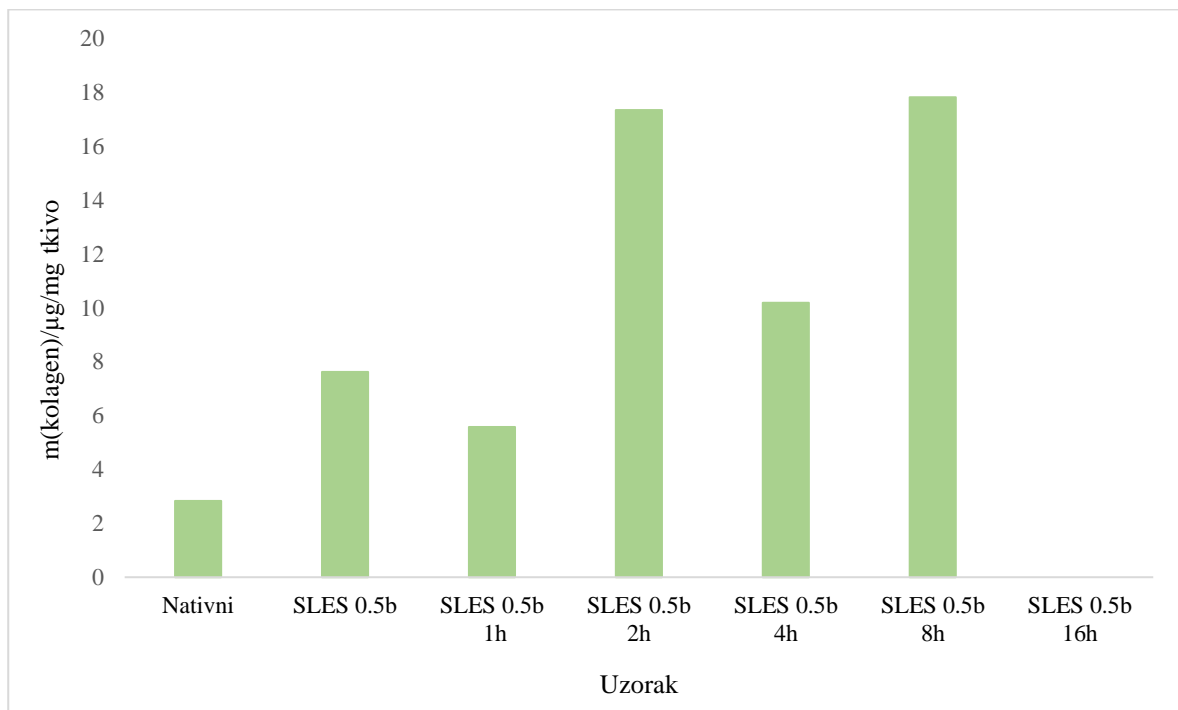
4.1. Kvantifikacija bioloških komponenata



Slika 5. Grafički prikaz količine DNK u tkivu nakon decelularizacije

Nakon postupka decelularizacije provedena je kvantifikacija bioloških komponenata u uzorcima tkiva, a na slici 5 prikazane su vrijednosti mase DNK po jedinici mase decelulariziranog tkiva. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako je u nativnom uzorku (uzorku koji nije obrađen niti jednim tretmanom) sadržana najveća količina DNK (125,85 ng/mg), dok je kod uzorka SLES 0.5b 8h vidljivo najbolje uklanjanje DNK (2,62 ng/mg), a slična vrijednost dobivena je i kod uzorka SLES 0.5b koji nije obrađen ultrazvukom (3,75 ng/mg). Iako uzorak SLES 0.5b 16h odstupa od ostalih, za uzorke SLES 0.5b 1h – SLES 0.5b 8h vidljiv je kontinuiran pad mase DNK, odnosno što je uzorak bio dulje izložen ultrazvuku to je učinkovitost uklanjanja DNK bila veća. Ovakav trend dobili su i Crapo i sur. koji su u svojem radu također ispitali utjecaj ultrazvuka na decelularizaciju. [58]

Niskom koncentracijom DNK u takvom tkivu postiže se smanjena imunogenost, čime se izbjegava rizik od upale i antigenosti nakon implantacije u tijelo pacijenta. [59] Temeljem brojnih istraživanja u kojima se provodila decelularizacija različitih vrsta tkiva, određen je minimalni kriterij za zadovoljavajuću decelularizaciju. Tkivo mora sadržavati manje od 50 ng DNK/mg tkiva i manje od 200 bp duljine fragmenata DNK kako bi se ono smatralo uspješno decelulariziranim. [58] Shodno navedenom, može se utvrditi da je decelularizacija uspješno provedena s obzirom da decelularizirani uzorci odgovaraju postavljenom kriteriju.



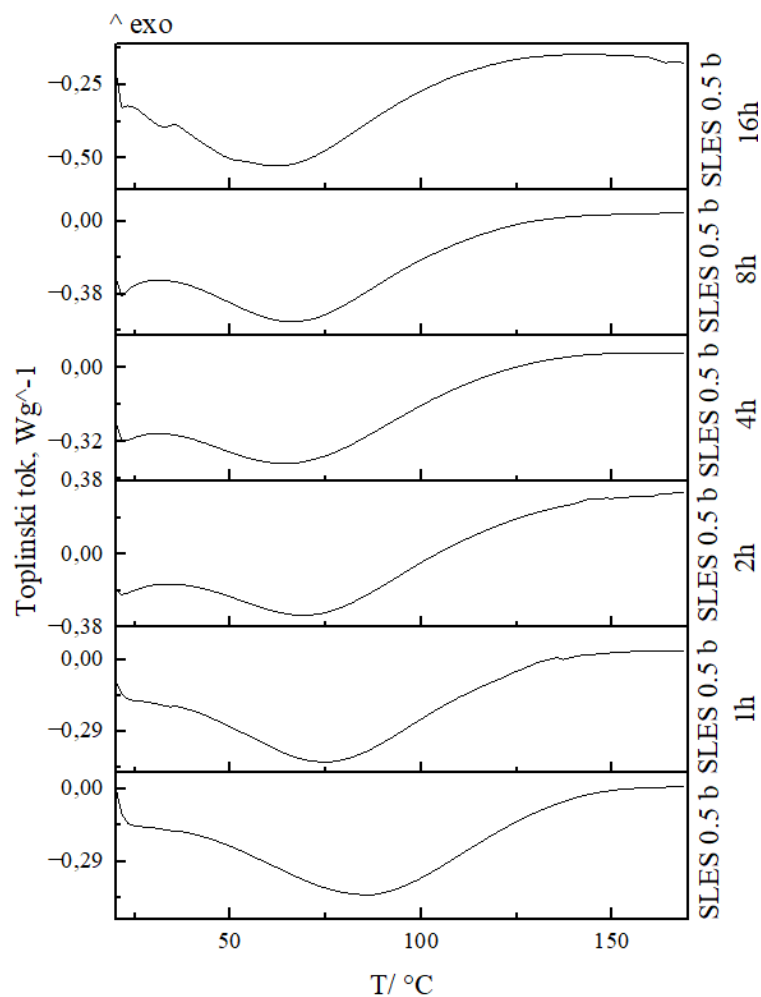
Slika 6. Grafički prikaz količine kolagena u tkivu nakon decelularizacije

Slika 6 prikazuje količinu kolagena u uzorcima tkiva nakon decelularizacije, a vrijednosti su iskazane kao masa kolagena po jedinici mase tkiva. Analizom je utvrđeno da je najveća količina kolagena očuvana u uzorku SLES 0.5b 8h (17,83 µg/mg), a približnu vrijednost ima i uzorak SLES 0.5b 2h (17,35 µg/mg). Za uzorak SLES 0.5b 16h pretpostavlja se da je došlo do greške mjerenja zbog čega je količina kolagena bila ispod razine detekcije. Nije uočen trend porasta/smanjenja mase kolagena s obzirom na pripremu uzoraka. Što se tiče uzorka SLES 0.5b (uzorak koji nije obrađen ultrazvukom), vidljivo je da njegov sadržaj kolagena nije izrazito visok u odnosu na uzorke podvrgnute ultrazvuku (osim uzorka SLES 0.5b 1h), a taj rezultat odgovara rezultatima prethodnih istraživanjima gdje se proučavao utjecaj ultrazvuka na ECM

uzorke te je uočeno da porastom intenziteta i vremena ultrazvuka raste sadržaj kolagena u tkivu. Međutim, agresivni uvjeti ultrazvuka mogu značajno oštetiti strukturu tkiva i smanjiti sadržaj proteina, pa je potrebno optimizirati uvjete kako ne bi došlo do gubitka bitnih komponenti u ECM-u. [60, 61]

Jetra je složen organ sastavljen od različitih komponenti, a hepatociti, glavne funkcionalne stanice jetre, zauzimaju većinski dio volumena tkiva. Kako ove stanice ne sadrže vlakna kolagena, njegov postotak je vrlo nizak u nativnom, neobrađenom uzorku. Uklanjanjem stanica može doći do smanjenja volumena tkiva, ali količina kolagena bi trebala ostati ista. Posljedica je povećana koncentracija kolagena po jedinici volumena u usporedbi s nativnim tkivom. [62]

4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija



Slika 7. DSC termogrami za uzorke nakon decelularizacije

Integriranjem površine iznad pika na termogramu (slika 7) moguće je odrediti vrijednosti entalpije i temperature pri kojoj se događa najveća endotermna promjena. Širina pikova posljedica je sve većeg broja proteina koji denaturiraju zbog kontinuiranog zagrijavanja. [63]

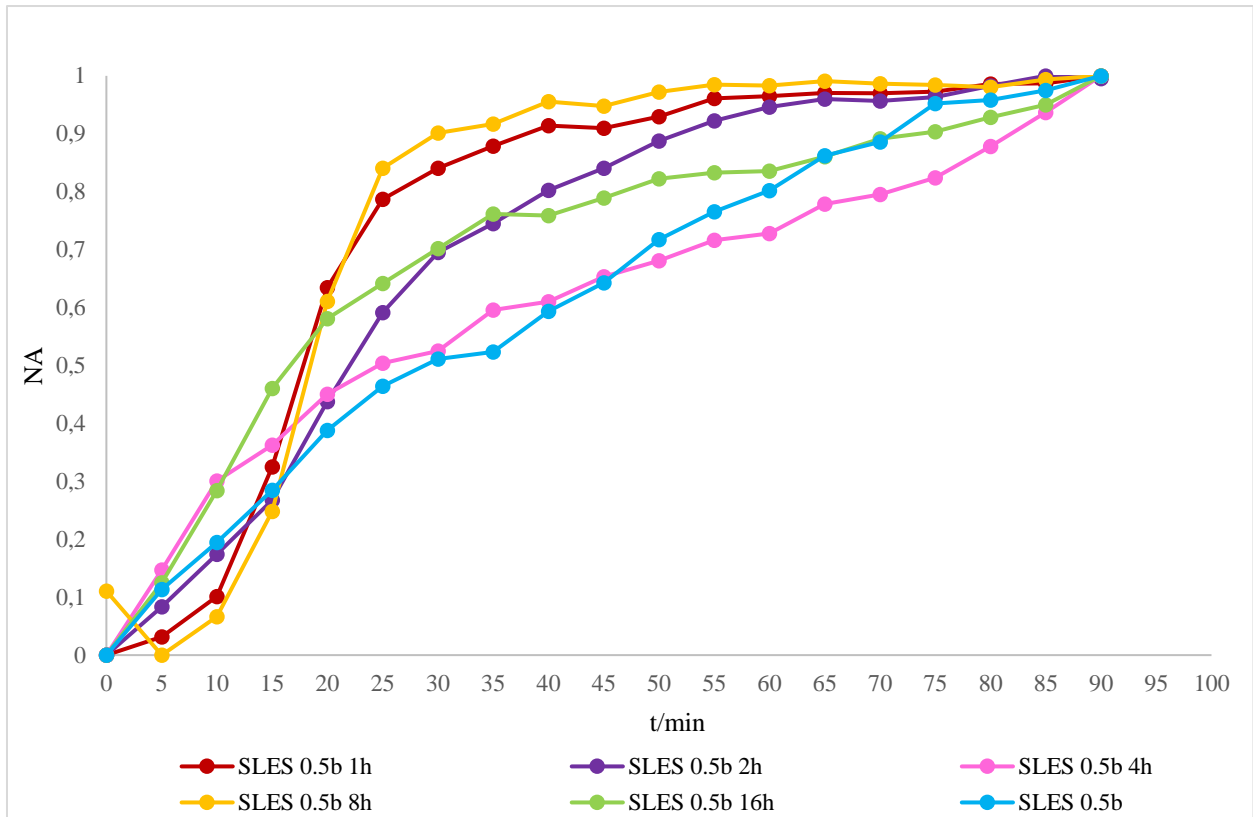
Tablica 5. Vrijednosti entalpija i maksimalnih temperatura

Uzorak	$\Delta H / \text{Wg}^{-1}$	$T_{\max} / ^\circ\text{C}$
SLES 0.5b	-20,91	87,75
SLES 0.5b 1h	-17,55	76,86
SLES 0.5b 2h	-16,15	75,00
SLES 0.5b 4h	-12,82	69,47
SLES 0.5b 8h	-13,06	68,86
SLES 0.5b 16h	-13,98	62,14

Pregledom vrijednosti temperatura u tablici 5 može se primijetiti kako se mijenja maksimalna temperatura denaturacije s obzirom na pripremu uzoraka. Što je uzorak dulje izložen tretmanu ultrazvukom, to je maksimalna temperatura denaturacije niža. S obzirom na trend promjene temperature, moguće je da produljena izloženost ultrazvuku rezultira smanjenjem same stabilnosti proteina. Ovakvi rezultati odgovaraju rezultatima istraživanja u kojem je također promatran utjecaj ultrazvuka na entalpiju i temperaturu denaturacije. [64] Promatrajući vrijednosti entalpija, vidi se da najveću vrijednost entalpije ima uzorak SLES 0.5b koji nije obrađen ultrazvukom. Veća entalpija obično ukazuje na veću količinu energije koja je potrebna za određeni termodinamički proces, odnosno promjenu. Uzorak koji ima veću vrijednost entalpije može imati složeniju ili stabilniju strukturu s više intramolekularnih veza i interakcija, pa je samim time potrebna i veća energija za razbijanje strukture. [64]

Promjene u vrijednostima entalpija u skladu su s promjenama temperatura denaturacije ispitivanih uzoraka. Kako se narušava struktura zbog ultrazvuka, T_{\max} se smanjuje jer su denaturirani proteini termički manje stabilni. Tijekom denaturacije proteina dolazi i do agregiranja proteina, a uzorci koji su obrađeni ultrazvukom, zbog manje stabilnosti, su skloniji agregiranju pa to može uzrokovati blagi porast entalpije kod uzoraka SLES 0.5b 8h i SLES 0.5b 16h. [63]

4.3. Kinetika geliranja



Slika 8. Promjena normaliziranih vrijednosti apsorbancije u vremenu

Nakon što se provede analiza na spektrofotometru, normalizirane vrijednosti apsorbancije izračunaju se pomoću sljedećeg izraza:

$$NA = (A - A_0) / (A_{\max} - A_0)$$

gdje je

NA – normalizirana apsorbancija,

A – apsorbancija u određenom vremenu,

A_0 – početna apsorbancija,

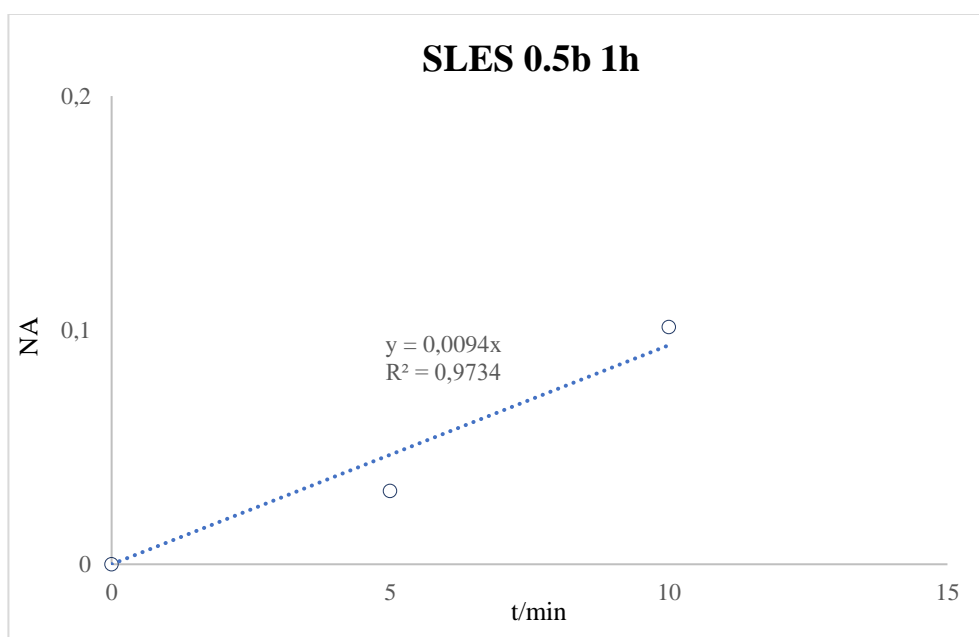
A_{\max} – maksimalna apsorbancija.

Na slici 9 prikazane su normalizirane vrijednosti apsorbancije u ovisnosti o vremenu za sve ispitivane uzorke. Za bolje razumijevanje kinetike geliranja određuju se tri parametra:

S – brzina geliranja; t_{lag} – faza odgode (eng. *lag time*) tj. period od početka mjerenja do značajnog povećanja apsorbancije; $t_{1/2}$ – vrijeme u kojem vrijednost normalizirane apsorbancije iznosi 0,5. Trajanje faze odgode (t_{lag}) računa se tako da se linearni dio krivulje ekstrapolira na x-os i u točki gdje je $NA=0$ odredi se vremenska vrijednost. Računanjem nagiba linearnog dijela krivulje određuje se treći parametar, brzina geliranja (S). [47] Vrijednosti ovih parametara prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Parametri kinetike geliranja

Uzorak	S (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	t_{lag} (min)
SLES 0.5b	0,019	26,3	0
SLES 0.5b 1h	0,009	53,2	0
SLES 0.5b 2h	0,018	28,4	0
SLES 0.5b 4h	0,030	16,7	0
SLES 0.5b 8h	0,054	18,6	9,3
SLES 0.5b 16h	0,029	17,1	0



Slika 9. Primjer određivanja parametara u Excel programu

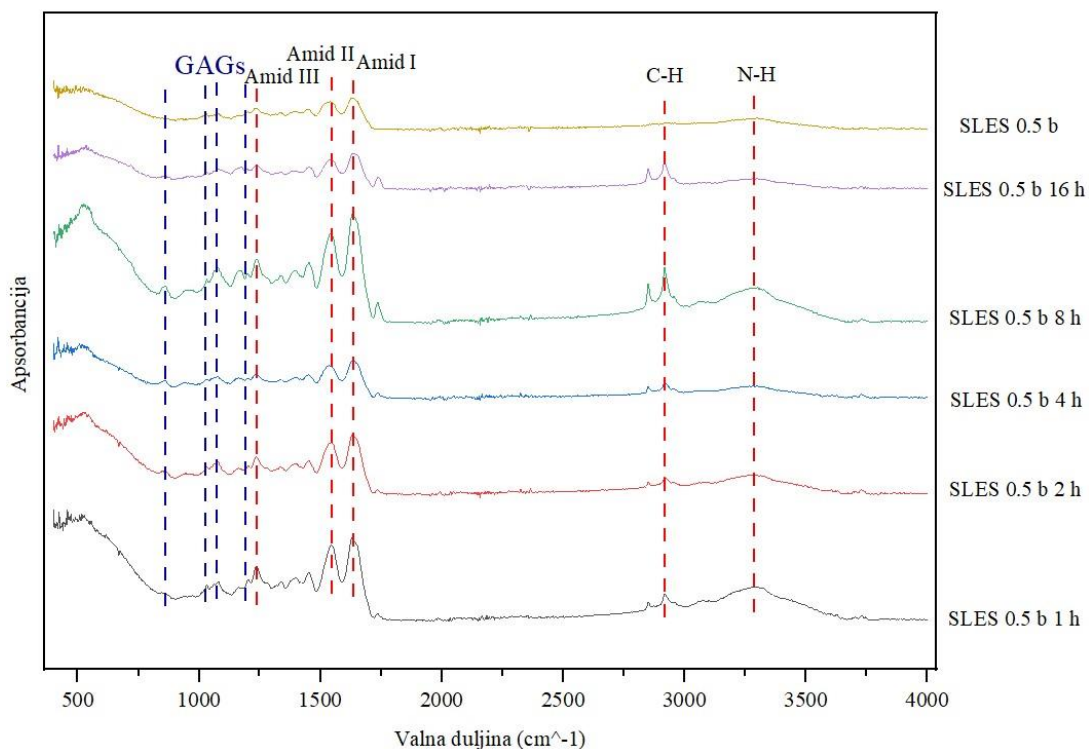
Računanje vrijednosti parametara kinetike geliranja provedeno je u programu Microsoft Excel pomoću regresijske analize, a primjer određivanja brzine geliranja prikazan je na slici 10. Linearni dio krivulje aproksimira se pravcem čiji nagib predstavlja brzinu geliranja (S). Računanjem navedenih parametara moguće je dobiti bolji uvid u kinetiku geliranja pojedinog uzorka. Proces geliranja kreće nakon što su stvoreni uvjeti za formiranje gela, kao npr. promjena temperature, pH vrijednosti, dodatak određenog agensa itd. Umrežavanju kolagenskih fibrila u trodimenzionalnu mrežu, koja je osnova strukture kolagenskog gela, uvelike doprinose vodikove veze te hidrofobne i elektrostatičke interakcije. Iz rezultata je vidljivo da je kod svih uzoraka $t_{lag} = 0$, osim kod uzorka SLES 0.5b 8h ($t_{lag} = 9,3$ min), što znači da vrlo brzo dolazi do rasta fibrila i proces geliranja započinje odmah, bez faze odgode. Naime, tijekom faze odgode ne dolazi do znatnog grupiranja molekula kolagena pa nema niti značajnih promjena apsorbancije. Inicijalna faza pojavljuje se samo kod uzorka koji je 8 sati bio pod djelovanjem ultrazvuka te stvaranje gela kreće kasnije nego kod ostalih uzoraka, odnosno molekule se grupiraju nešto teže i sporije dolazi do formiranja mreže. Zbog kompleksnosti mehanizma geliranja teško je odrediti zašto baš kod ovog uzorka postoji faza odgode, međutim uočena je potencijalna veza s entalpijom denaturacije ovog uzorka, koja je niža u odnosu na vrijednosti entalpija ostalih uzoraka. Ultrazvučna obrada može također imati i negativan utjecaj i oštetiti strukturu proteina što dovodi do smanjenja entalpije denaturacije i produljenja inicijalne faze geliranja zbog promjena u strukturi, slabih interakcija za grupiranje molekula i sl. Kako bi se dobilo više informacija o svemu navedenom, potrebno je provesti dodatna istraživanja, poput npr. mikroskopske analize. [64, 65]

Nadalje, promatrajući vrijednosti $t_{1/2}$ može se uočiti najmanja vrijednost za uzorak SLES 4h UZV (16,7 min) te približna vrijednost za uzorak SLES 16h UZV. Ti uzorci ukazuju na veću brzinu geliranja jer je potrebno manje vremena da se postigne određena razina formiranja gela. S druge strane, uzorak SLES 1h UZV ima najveću vrijednost $t_{1/2}$ te samim time može se reći da je njegova brzina geliranja najmanja.

Inicijalna faza popraćena je fazom u kojoj se svojstvo mijenja linearno kako geliranje napreduje. Linearni dio krivulje ukazuje na stalnu stopu promjene svojstva gela tijekom vremena. Kao što je spomenuto, brzina geliranja, S , može se odrediti računanjem nagiba koji predstavlja brzinu kojom se svojstvo gela mijenja po jedinici vremena tijekom cijelog procesa. Uspoređujući rezultate, može se zaključiti da uzorci koji su bili pod djelovanjem ultrazvuka dulje od 2 sata imaju manje vrijednosti $t_{1/2}$ i veće vrijednosti parametra S te samim time brže geliraju. Potencijalni razlog toga je već spomenuta agregacija proteina. Dulje izlaganje

ultrazvuku povećava vjerojatnost denaturacije proteina. Denaturirani proteini izlažu svoje hidrofobne i reaktivne skupine koje mogu lakše međusobno djelovati, što dovodi do bržeg geliranja. Ovi parametri su iznimno značajni, pa ovisno o specifičnoj primjeni te željenim svojstvima konačnog proizvoda znanstvenici i inženjeri često proučavaju i optimiziraju brzine geliranja kako bi postigli željene rezultate u različitim područjima. Primjerice, Kuo i sur. [66] dokazali su kako je sporije geliranje bolje jer rezultira homogenijom strukturom hidrogela te boljim mehaničkim svojstvima. [64-66]

4.4. FTIR analiza



Slika 10. FTIR spektar decelulariziranih uzoraka

Na slici 11 dan je FTIR spektar za ispitivane uzorke. Spektar pokazuje snažne vibracijske vrpce na 1630 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} i 1240 cm^{-1} , a to su ujedno i karakteristične skupine za amide I, II i III. Amide I karakterizira vibracija istezanja C=O veza iz proteina, za amide II karakteristične su vibracije savijanja N – H veza i vibracije istezanja C – N veza, dok su za amide III karakteristične vibracije veza u području $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$. [58] Također su vidljive nešto

slabije vibracijske vrpce za C – H veze pri 2915 cm^{-1} i za N – H veze pri 3290 cm^{-1} . U području oko 1000 cm^{-1} vidljivi su i glikozaminoglikani (GAGs). Ovom analizom daje se jasniji uvid u kemijsku strukturu uzoraka. Podatci su obrađeni u računalnom programu OriginLab. Spektar uzorka SLES 0.5 b (bez ultrazvuka) pokazuje vidljivu razliku u intenzitetu pikova u odnosu na pikove kod drugih spektara. Naime, u tome spektru pikovi su značajno manji. Razlog tome je što kolagen zbog svoje strukture i elektrostatskih interakcija (vodikove veze, Van der Waalove sile itd.) nema slobodu istezanja, što rezultira pikovima niskog intenziteta. Denaturacijom dolazi do promjene u strukturi i rastezanju lanaca što omogućuje veće istezanje ili savijanje veza pa su i pikovi većeg intenziteta. Spektar uzorka SLES 0.5b 8h pokazuje najintenzivnije pikove. Razlog tome može biti taj što je i kvantifikacijom bioloških komponenata utvrđeno da upravo taj uzorak sadrži najveću količinu kolagena. [67]

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog rada provedena je karakterizacija hidrogelova pripremljenih od decelulariziranog i digestiranog tkiva svinjske jetre. Turbidimetrijskom analizom istražena je kinetika geliranja, a provedene su i DSC i FTIR analize uzoraka, kao i kvantifikacija bioloških komponenata.

Identifikacijom bioloških komponenata nakon decelularizacije utvrđeno je da je najveća očuvana količina kolagena sadržana u uzorku koji je obrađen ultrazvukom u trajanju od 8 sati, a to je potvrđeno i podacima FTIR spektra gdje su uočeni najintenzivniji pikovi za ovaj uzorak, a koji ukazuju na vibracije veza u molekuli kolagena.

Porastom vremena obrade ultrazvukom uočen je kontinuiran pad mase DNK, koja je svuda ispod granice od 50 ng DNK/mg tkiva što upućuje na uspješnu decelularizaciju.

Analizom kinetike geliranja zaključuje se da uzorci koji su bili dulje od 2 sata pod obradom ultrazvuka brže geliraju, a mogući razlog je agregacija denaturiranih proteina.

Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom određene su normalizirane vrijednosti entalpija te maksimalna temperatura denaturacije. S obzirom na trend promjene temperature, postoji mogućnost da produljena izloženost ultrazvuku rezultira smanjenjem same stabilnosti proteina.

Uspoređujući sve rezultate, uzorak SLES 0.5b 8h se potencijalno može razmotriti za daljnja ispitivanja s obzirom na najmanju količinu DNK nakon decelularizacije, zadovoljavajuću očuvanu količinu kolagena, što pokazuje i FTIR analiza, te dobru kinetiku geliranja i zadovoljavajuću temperaturu denaturacije.

6. LITERATURA

- [1] Bigor, I., Nezasićeni poliesteri za primjene u tkivnom inženjerstvu, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2019.
- [2] Ivanković, M., Bauer, L., Ressler, A., Rogina, A., Antunović, M., Ivanković, H., Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva, *Kemija u Industriji*, **68** (2019) 457-468.
- [3] Okamoto, M., The role of scaffolds in tissue engineering, u: Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A. (ur.), *Handbook of tissue engineering scaffolds: Volume one*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2019, str. 23-49.
- [4] Wang, N., Dheen, S. T., Fuh, J. Y. H., Kumar, A. S., A review of multi-functional ceramic nanoparticles in 3D printed bone tissue engineering, *Bioprinting*, **23** (2021) 1-22.
- [5] Todros, S., Todesco, M., Bagno, A., *Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration*, *Processes*, **9** (2021) 1-21.
- [6] Asadi, N., Del Bakhshayesh, A. R., Davaran, S., Akbarzadeh, A., Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine, *Materials Chemistry and Physics*, **242** (2020) 1-36.
- [7] He, W., Feng, Y., Ma, Z., Ramakrishna, S., *Polymers for tissue engineering*, u: Mahapatro, A., Kulshrestha, A. S. (ur.), *Polymers for Biomedical Applications*, American Chemical Society, Washington, 2008, str. 310-335.
- [8] Hung, K. C., Tseng, C. S., Dai, L. G., Hsu, S. H., Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, **83** (2016) 156-168.
- [9] Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C., Silva, J. C., Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering, *International journal of biological macromolecules*, **102** (2017) 1174-1185.
- [10] Neufurth, M., Wang, X., Wang, S., Steffen, R., Ackermann, M., Haep, N. D., Schröder, H. C., Müller, W. E. G., 3D printing of hybrid biomaterials for bone tissue engineering: Calcium-polyphosphate microparticles encapsulated by polycaprolactone, *Acta biomaterialia*, **64** (2017) 377-388.

- [11] Li, Y., Li, X., Zhao, R., Wang, C., Qiu, F., Sun, B., Ji, H., Qiu, J., Wang, C., Enhanced adhesion and proliferation of human umbilical vein endothelial cells on conductive PANI-PCL fiber scaffold by electrical stimulation, *Materials Science and Engineering: C*, **72** (2017) 106-112.
- [12] Chen, Q., Liang, S., Thouas, G. A., Elastomeric biomaterials for tissue engineering, *Progress in polymer science*, **38** (2013) 584-671.
- [13] Rahmati, M., Pennisi, C. P., Budd, E., Mobasheri, A., Mozafari, M., Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends, u: Turksen, K. (ur.), *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 4: Stem Cells and Cell Based Strategies in Regeneration*, Springer; Ottawa, 2018, str. 1-19.
- [14] Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., Boesel, L. F., Oliveira, J. M., Santos, T. C., Marques, A. P., Neves, N. M., Reis, R. L., Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends, *Journal of the royal society interface*, **4** (2007) 999-1030.
- [15] Davaran, S., Asadi, N., Del Bakhshayesh, A. R., Akbarzadeh, A., Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine, *Materials Chemistry and Physics*, **242** (2020) 1-36.
- [16] Del Bakhshayesh, A. R., Mostafavi, E., Alizadeh, E., Asadi, N., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Fabrication of three-dimensional scaffolds based on nano-biomimetic collagen hybrid constructs for skin tissue engineering, *ACS Omega*, **3** (2018) 8605-8611.
- [17] Woods, B., Marques, A. L. P., Raftery, R. M., Moreira-Silva, J., Silva, T. H., Cryan, S. A., Reis, R. L., O'Brien, F. J., Multifunctional biomaterials from the sea: Assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality, *Acta Biomaterialia*, **43** (2016) 160-169.
- [18] Arabi, N., Zamanian, A., Effect of cooling rate and gelatin concentration on the microstructural and mechanical properties of ice template gelatin scaffolds, *Biotechnology and applied biochemistry*, **60** (2013) 573-579.
- [19] Chiti, M. C., Dolmans, M. M., Donnez, J., Amorim, C. A., Fibrin in reproductive tissue engineering: a review on its application as a biomaterial for fertility preservation, *Annals of biomedical engineering*, **45** (2017) 1650-1663.

- [20] Di Giancamillo, A., Deponti, D., Gervaso, F., Salvatore, L., Scalera, F., Mangiavini, L., Scurati, R., Sannino, A., Peretti, G. M., The analysis of different scaffolds and the benefit of fibrin glue for tendon tissue engineering at different culture times, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, **31** (2017) 67-73.
- [21] Mandal, B. B., Grinberg, A., Seok Gil, E., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., High-strength silk protein scaffolds for bone repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109** (2012) 7699-7704.
- [22] Ozdil, D., Aydin, H. M., Polymers for medical and tissue engineering applications, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **89** (2014) 1793-1810.
- [23] Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **45** (2017) 185-192.
- [24] Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Kitozan - biopolimer 21. stoljeća, *Farmaceutski glasnik*, **58** (2002) 1-10.
- [25] Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., Cho, C. S., Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology advances*, **26** (2008) 1-21.
- [26] Raftery, R. M., Woods, B., Marques, A. L., Moreira-Silva, J., Silva, T. H., Cryan, S. A., Reis, R. L., O'Brien, F. J., Multifunctional biomaterials from the sea: Assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality, *Acta Biomaterialia*, **43** (2016) 160-169
- [27] Jakus, D., Hidrogelovi za biomedicinske primjene, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2019.
- [28] Swarbrick, J., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Volume 6*, Informa Healthcare, New York, 2019, str. 2021-2039.
- [29] <https://rheolution.com/applications/life-sciences/viscoelasticity-of-biomaterials/formulation-of-hydrogels/> (pristup 12.12.2023)
- [30] Suamte, L., Tirkey, A., Babu, P. J., Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications, *Smart Materials in Medicine*, **4** (2023) 243-256.

- [31] Leòn, C., New perspectives in mercury porosimetry, *Advances in colloid and interface science*, **76** (1998) 341-372.
- [32] Hutmacher, D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, **21** (2000) 2529-2543.
- [33] Bajaj, P., Schweller, R.M., Khademhosseini, A., West, J. L., Bashir, R., 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine, *Annual Review of Biomedical Engineering*, **16** (2014) 247-276.
- [34] Subia, B., Kundu, J., Kundu, S.C., Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications, *Tissue Engineering*, **141** (2010) 13-18.
- [35] Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., Grigolo, B., Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives, *Materials Science and Engineering: C*, **78** (2017) 1246-1262.
- [36] Aranaz, I., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., del Monte, F., Preparation of chitosan nanocomposites with a macroporous structure by unidirectional freezing and subsequent freeze-drying, *Marine Drugs*, **12** (2014) 5619-5642.
- [37] Thouas, G. A., Thavornnyutikarn, B., Chantarapanich, N., Sitthiseripratip, K., Chen, Q., Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques, *Progress in Biomaterials*, **3** (2014) 61-102.
- [38] Eltom, A., Zhong, G., Muhammad, A., Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review, *Advances in Materials Science and Engineering*, **2019** (2014) 1-14.
- [39] Aram, E., Mehdipour-Ataei, S., A review on the micro-and nanoporous polymeric foams: preparation and properties, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **65** (2016) 358-375.
- [40] Li, Z., Xie, M. B., Li, Y., Ma, Y., Li, J.S., Dai, F. Y., Recent progress in tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **6** (2016) 755-766.
- [41] Kim, K. O., Lee, Y., Hwang, J. W., Kim, H., Kim, S. M., Chang, S. W., Lee, H. S., Choi, Y. S., Wound healing properties of a 3-D scaffold comprising soluble silkworm gland hydrolysate and human collagen, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **116** (2014) 318-326.

- [42] Chen, Q., Thavornyutikarn, B., Sitthiseripratip, K., Chantarapanich, N., Thouas, G. A., Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques, *Progress in Biomaterials*, **3** (2014) 61-102.
- [43] Hanžek, A., Priprava i karakterizacija kompozitnog skeleta za potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [44] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=69979> (pristup 12.12.2023.)
- [45] Abdelaal, O. A., Darwish, S. M., Review of rapid prototyping techniques for tissue engineering scaffolds fabrication, u: Öchsner, A., da Silva, L. F. M., Altenbach, H. (ur.), *Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials*, Springer, Berlin, 2013, str. 33-54.
- [46] <https://news.illinois.edu/view/6367/653690#image-1> (pristup 12.12.2023.)
- [47] Fernández-Pérez, J., Ahearne, M., The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels, *Scientific reports*, **9** (2019) 1-12.
- [48] Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., Liu, C., Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering, *Bioactive materials*, **10** (2022) 15-31.
- [49] Zambon, J. P., Atala, A., Yoo, J. J., Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications, *Methods*, **171** (2020) 3-10.
- [50] Gupta, S. K., Mishra, N. C., Dhasmana, A., Decellularization methods for scaffold fabrication, u: Turksen, K. (ur.), *Decellularized Scaffolds and Organogenesis: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2018, str. 1-10.
- [51] Yamanaka, H., Morimoto, N., Yamaoka, T., Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid, *Journal of Artificial Organs*, **23** (2020) 156-162.
- [52] Poornejad, N., Schaumann, L. B., Buckmiller, E. M., Momtahan, N., Gassman, J. R., Ma, H. H., Roeder, B. L., Reynolds, P. R., Cook, A. D., The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix, *Journal of biomaterials applications*, **31** (2016) 521-533.

- [53] Cornelison, R. C., Wellman, S. M., Park, J. H., Porvasnik, S. L., Song, Y. H., Wachs, R. A., Schmidt, C. E., Development of an apoptosis-assisted decellularization method for maximal preservation of nerve tissue structure, *Acta biomaterialia*, **77** (2018) 116-126.
- [54] Aeberhard, P. A., Grognez, A., Peneveyre, C., McCallin, S., Hirt-Burri, N., Antons, J., Pioletti, D., Raffoul, W., Applegate, L. A., Efficient decellularization of equine tendon with preserved biomechanical properties and cytocompatibility for human tendon surgery indications, *Artificial organs*, **44** (2020) 161-171.
- [55] Roth, S. P., Glauche, S. M., Plenge, A., Erbe, I., Heller, S., Burk, J., Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue-a pilot study, *BMC biotechnology*, **17** (2017) 1-10.
- [56] Kim, J. K., Koh, Y. D., Kim, J. O., Seo, D. H., Development of a decellularization method to produce nerve allografts using less invasive detergents and hyper/hypotonic solutions, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, **69** (2016) 1690-1696.
- [57] https://www.researchgate.net/figure/Figure-S2-Decellularized-whole-liver-scaffold-from-a-30kg-pig-following-a-standardized_fig1_294981434 (pristup 19.12.2023.)
- [58] Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F., An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, **32** (2011) 3233-3243.
- [59] Cao, G., Li, X., The Decellularization of Tissues. u: Li, X., Xie, H. (ur.), *Decellularized Materials*, Springer, New York, 2021, str. 69-115.
- [60] Hussey, G. S., Nascari, D. G., Saldin, L. T., Kolich, B., Lee, Y. C., Crum, R. J., El-Mossier, S. O., D'Angelo, W., Dziki, J. L., Badylak, S. F., Ultrasonic cavitation to prepare ECM hydrogels, *Acta Biomaterialia*, **108** (2020) 77-86.
- [61] Razali, U. H. M., Juraimy, A. M. M., Jusoh, Y. M. M., Dailin, D. J., Ya'akob, H., Zainol, N., Norulfairuz, D., Effect of Ultrasonic Amplitude on the Yield and Properties of Barramundi (*Lates calcarifer*) Skin Collagen, *Journal of Tropical Life Science*, **13** (2023) 247-256.
- [62] Coronado, R. E., Somaraki-Cormier, M., Natesan, S., Christy, R. J., Ong, J. L., Halff, G. A., Decellularization and Solubilization of Porcine Liver for Use as a Substrate for Porcine Hepatocyte Culture: Method Optimization and Comparison, *Cell Transplantation*, **26** (2017) 1840-1854.

- [63] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., Ashokkumar, M., Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, *Ultrasonics Sonochemistry*, **18** (2011) 951-957.
- [64] Liu, H., Zhang, H., Wang, K., Qi, L., Guo, Y., Zhang, C., Xu, Y., Impact of Ultrasonication on the Self-Assembly Behavior and Gel Properties of Bovine Bone Collagen I, *Molecules*, **28** (2023) 1-18.
- [65] Karoyo, A. H., Wilson, L. D., Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review, *Gels*, **3** (2017) 1-18.
- [66] Kuo, C. K., Ma, P. X., Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, **22** (2001) 511-521.
- [67] Maček, L., Istraživanje i modifikacija biopolimera hitina, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

A	apsorbancija
S	brzina geliranja
$t_{1/2}$	poluvrijeme reakcije
t_{lag}	faza odgode
ΔH	promjena entalpije
λ	valna duljina

Kratice

CaP	kalcijev fosfat, eng. <i>calcium phosphate</i>
dECM	decelularizirana izvanstanična matrica, eng. <i>decellularized extracellular matrix</i>
DNK	deoksiribonukleinska kiselina, eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija, eng. <i>differential scanning calorimetry</i>
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, eng. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GAGs	glikozaminoglikani, eng. <i>glycosaminoglycans</i>
HA	hidroksiapatit, eng. <i>hydroxyapatite</i>
PAA	peroctena kiselina, eng. <i>peracetic acid</i>
PBS	fiziološka otopina fosfatnog pufera, eng. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCL	polikaprolakton, eng. <i>polycaprolactone</i>
PGA	poliglikolna kiselina, eng. <i>polyglycolic acid</i>
PLA	polimliječna kiselina, eng. <i>polylactic acid</i>
PLGA	poli (mliječna-ko-glikolna) kiselina, eng. <i>poly (lactic-co-glycolic) acid</i>

RNK	ribonukleinska kiselina, eng. <i>ribonucleic acid</i>
SDC	natrijev deoksikolat, eng. <i>sodium deoxycholate</i>
SDS	natrijev dodecil sulfat, eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLA	stereolitografija, eng. <i>stereolithography</i>
SLES	natrijev lauret-sulfat, eng. <i>sodium lauryl ether sulphate</i>
SLS	selektivno lasersko sinteriranje, eng. <i>selective laser sintering</i>
TCP	trikalcijev fosfat, eng. <i>tricalcium phosphate</i>
TIPS	toplinski inducirana fazna separacija, eng. <i>thermally induced phase separation</i>
UV-Vis	ultraljubičasta i vidljiva spektrometrija, eng. <i>ultraviolet and visible spectrometry</i>