

Priprava hibridnih hidrogelova na temelju materijala iz biogenog izvora

Jukić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni 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:149:060425>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Jukić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE

POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Lucija Jukić

Predala je izrađen završni rad dana: 17. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Stanislav Kurajica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Krunoslav Žižek, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Vesna Tomašić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni radi odobrilo obranu završnogradapred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 20. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Jukić

Priprava hibridnih hidrogelova na temelju materijala iz biogenog izvora

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Gordana Matijašić
prof. dr. sc. Stanislav Kurajica
prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

Zagreb, rujan 2024.

Želim izraziti iskrenu zahvalnost svojoj mentorici, prof. dr. sc. Gordani Matijašić, za njezino neprocjenjivo znanje i strpljenje tijekom cijelog istraživačkog procesa.

Također, zahvaljujem asistentici Teodori Prebeg, mag. ing. cheming., na dragocjenoj pomoći u eksperimentalnom dijelu, na svim savjetima i podršci.

Zahvaljujem i cijelom Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na pomoći i resursima koji su omogućili provedbu ovog istraživanja.

SAŽETAK

Ovaj rad istražuje pripremu i karakterizaciju hibridnih hidrogelova izrađenih od materijala iz biogenih izvora, s naglaskom na kombinaciju decelularizirane izvanstanične matrice (dECM) i alginata. Biomaterijali kao što su kolagen, alginat i njihovi derivati igraju ključnu ulogu u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu zbog svoje biokompatibilnosti, sposobnosti poticanja stanične proliferacije te omogućavanja obnove tkiva. Hidrogelovi, kao trodimenzionalne umrežene strukture s visokim sadržajem vode, oponašaju prirodno tkivo te su vrlo pogodni za isporuku stanica, lijekova i drugih bioaktivnih molekula. U ovom istraživanju, hibridni hidrogelovi pripremljeni su kombiniranjem prirodnih biomaterijala s dodanim sintetskim komponentama kako bi se postigla bolja kontrola nad njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima.

Eksperimentalni dio rada uključivao je postupak decelularizacije svinjske jetre kako bi se izolirala dECM, koja je potom modificirana metakrilacijom za bolju umreženost s drugim komponentama hidrogela. Hidrogelovi su pripremljeni u različitim omjerima dECM-MAA (metakrilirana izvanstanična matrica) i alginata, a zatim karakterizirani metodama infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC). FTIR analiza pružila je uvid u kemijske strukture i međusobne interakcije unutar hibridnih hidrogelova, omogućujući identifikaciju karakterističnih kemijskih vrpci koje odgovaraju specifičnim funkcionalnim skupinama dECM-a i alginata. S druge strane, DSC analiza omogućila je procjenu termičke stabilnosti i prijelaznih temperatura hidrogelova, koje su ključne za njihovu potencijalnu primjenu u biomedicinskim uređajima.

Rezultati pokazuju da je moguće manipulirati sastavom hibridnih hidrogelova kako bi se prilagodila njihova mehanička svojstva, termička stabilnost i biokompatibilnost specifičnim potrebama u biomedicinskim primjenama. Kombinacija prirodnih i sintetskih polimera, kao što su dECM-MAA i alginat, omogućuje stvaranje hibridnih materijala koji nude bolje performanse od pojedinačnih komponenata, osiguravajući bolju mehaničku otpornost i kontroliranu razgradnju. Ovi rezultati pružaju vrijedne smjernice za buduće optimizacije sastava hidrogelova u svrhu razvoja naprednih biomaterijala za regenerativnu medicinu, uključujući aplikacije kao što su isporuka lijekova, implantati i tkivni modeli. Rad također ističe važnost odabira prikladnih metoda karakterizacije, kao što su FTIR i DSC, u procjeni kompatibilnosti i stabilnosti novih biomaterijala za njihovu sigurnu i učinkovitu upotrebu.

Ključne riječi: hibridni hidrogelovi, izvanstanična matrica, alginat, metakril-anhidrid, DSC, FTIR.

ABSTRACT

Preparation of hybrid hydrogels based on materials from biogenic sources

This paper investigates the preparation and characterization of hybrid hydrogels made from biogenic source materials, with a focus on the combination of decellularized extracellular matrix (dECM) and alginate. Biomaterials such as collagen, alginate, and their derivatives play a crucial role in regenerative medicine and tissue engineering due to their biocompatibility, ability to promote cell proliferation, and support tissue regeneration. Hydrogels, as three-dimensional cross-linked structures with a high water content, mimic natural tissue environments and are highly suitable for the delivery of cells, drugs, and other bioactive molecules. In this study, hybrid hydrogels were prepared by combining natural biomaterials with synthetic components to achieve better control over their physicochemical properties.

The experimental part of the study involved the decellularization of porcine liver to isolate dECM, which was then methacrylated to improve cross-linking with other hydrogel components. Hydrogels were prepared in various ratios of dECM-MAA and alginate and subsequently characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC). FTIR analysis provided insights into the chemical structures and interactions within the hybrid hydrogels, allowing for the identification of characteristic chemical bands corresponding to specific functional groups of dECM and alginate. Meanwhile, DSC analysis enabled the evaluation of the thermal stability and transition temperatures of the hydrogels, which are critical for their potential application in biomedical devices.

The results demonstrate that it is possible to manipulate the composition of hybrid hydrogels to tailor their mechanical properties, thermal stability, and biocompatibility for specific needs in biomedical applications. The combination of natural and synthetic polymers, such as dECM-MAA and alginate, allows the creation of hybrid materials that offer better performance than individual components, ensuring improved mechanical resistance and controlled degradation. These findings provide valuable guidelines for future optimization of hydrogel compositions aimed at developing advanced biomaterials for regenerative medicine, including applications such as drug delivery, implants, and tissue models. The study also highlights the importance of selecting appropriate characterization methods, such as FTIR and DSC, for assessing the compatibility and stability of new biomaterials for their safe and effective use.

Key words: hybrid hydrogels, extracellular matrix, alginate, methacrylic anhydride, DSC, FTIR.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Inženjerstvo tkiva	2
2.2. Biomaterijali	3
2.3. Nosači.....	5
2.4. Izvanstanična matrica	6
2.5. Decelularizacija.....	8
2.6. Hibridni hidrogelovi.....	9
2.7. Fotopolimerizacija i fotoinicijatori	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.2. Decelularizacija izvanstanične matrice	12
3.3. Priprava hidrogelova	12
3.4. Priprava hibridnih hidrogelova	13
3.5. Metode karakterizacije	13
3.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	14
3.5.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	15
4.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija	16
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA.....	20

1. UVOD

Biomaterijali igraju ključnu ulogu u napretku medicinskih tehnologija, osobito u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu, gdje se koriste za obnovu ili zamjenu oštećenih tkiva. Odabir odgovarajućih biomaterijala presudan je za uspjeh tih tehnologija, budući da moraju biti biokompatibilni, biorazgradivi i mehanički stabilni kako bi podržali rast i diferencijaciju stanica [1].

Hidrogelovi su jedna od najperspektivnijih vrsta biomaterijala zbog svoje sposobnosti da upijaju velike količine vode, stvarajući okoliš sličan prirodnom tkivu. Oni mogu biti izrađeni od prirodnih ili sintetskih polimera, a njihova primjena obuhvaća različite medicinske svrhe, uključujući isporuku lijekova, zacjeljivanje rana i inženjerstvo tkiva [2]. Prirodni biomaterijali, poput kolagena i alginata, često se koriste u izradi hidrogelova zbog njihove inherentne biokompatibilnosti i sposobnosti poticanja stanične proliferacije [3]. Kolagen, kao glavni sastojak izvanstanične matrice (ECM), pruža strukturnu potporu i ključan je za regeneraciju tkiva [4].

Hibridni hidrogelovi, koji kombiniraju prirodne biomaterijale sa sintetskim polimerima, poput polikaprolaktona (PCL), omogućuju optimizaciju svojstava materijala. Ovi hibridi nude prednosti prirodnih materijala, poput biokompatibilnosti i bioaktivnosti, zajedno s mehaničkom stabilnošću i kontroliranom razgradnjom koju pružaju sintetski polimeri. Takvi materijali su sve popularniji u regenerativnoj medicini, jer pružaju poboljšana svojstva potrebna za učinkovito tkivno inženjerstvo [5].

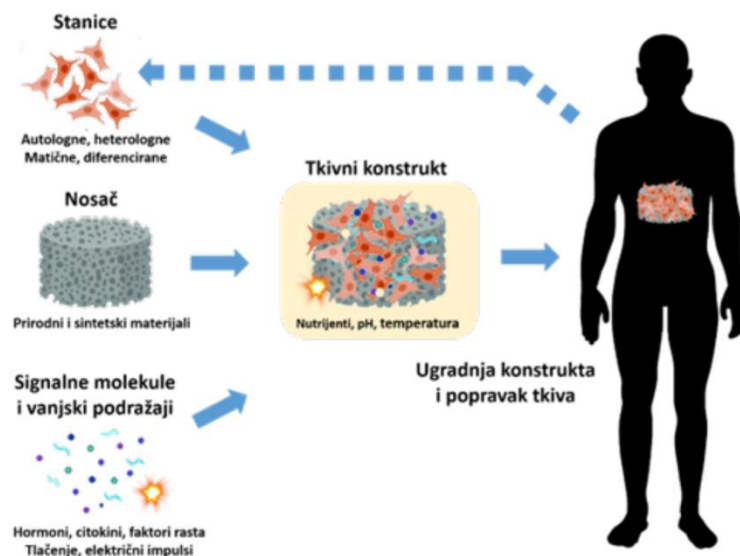
Cilj ovog rada je priprava i karakterizacija hibridnih hidrogelova temeljenih na materijalima iz biogenog izvora, s posebnim fokusom na kombinaciju decelularizirane izvanstanične matrice (dECM) i alginata. Pripremljeni hidrogelovi karakterizirani su metodama infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC) kako bi se procijenila njihova struktura i termička svojstva, s ciljem optimizacije njihove primjene u tkivnom inženjerstvu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje koje, povezivanjem znanja iz biomedicinskog područja te inženjerstva, nastoji pronaći načine za regeneriranje ili potpunu zamjenu oboljelog tkiva. To je relativno mlado znanstveno područje, a definirali su ga, u kontekstu u kakvom je danas poznato, 1993. godine Vacanti i Langer. Fokus tkivnog inženjerstva je razvoj tkivnih konstrukata *in vitro*, odnosno laboratorijski dobiti tkivo adekvatno za usađivanje u ljudski organizam. Iako se često povezuju, važno je razlikovati tkivno inženjerstvo koje se temelji na *in vitro* metodama od regenerativne medicine koja potiče regeneraciju tkiva izravno u tijelu pacijenta, odnosno *in vivo*. [7] Ključne komponente ovog procesa, poznate kao trijada tkivnog inženjerstva, su stanice, nosači stanica i biosignali nužni za preživljavanje stanica (slika 1). Stanice moraju biti zdrave i karakteristične za oštećeno tkivo. Najveći uspjeh često se postiže korištenjem stanica pacijenta. Međutim, u takvim slučajevima postoji rizik da su stanice u lošem stanju. Stoga se najčešće koristi pristup u kojem se primjenjuju matične stanice koje nude pouzdanu alternativu i mogu poboljšati rezultate liječenja. Nosači su trodimenzionalne strukture koje služe kao potpora za vezivanje stanica, omogućujući im da prolaze kroz procese proliferacije i diferencijacije. Ove strukture, često korištene u tkivnom inženjerstvu, repliciraju uvjete prirodnih tkiva i omogućuju stvaranje složenijih bioloških sustava. Osnovno pitanje inženjerstva tkiva leži u izboru i razvoju materijala za proizvodnju nosača, budući da kvaliteta i svojstva tih materijala značajno utječu na uspjeh i učinkovitost bioinženjerskih aplikacija. Nakon što se stanice pričvrste na nosač, trebaju primiti specifične signale za opstanak i proizvodnju vlastite matrice koja će na kraju zamijeniti izvorni nosač. Ključni signali koje stanice percipiraju obuhvaćaju koncentraciju kisika, mehaničke poticaje, faktore rasta, komponente izvanstanične matrice te razne male molekule. Za postizanje uspjeha u tkivnom inženjerstvu razvijeni su različiti pristupi koji se mogu kategorizirati kao unutartjelesni i izvantjelesni. Unutartjelesni pristupi koriste implantirane elemente tkivnog modela kako bi iskoristili prirodnu sposobnost pacijentovog organizma za obnavljanje oštećenog tkiva. Ovi pristupi uključuju: injektiranje zdravih stanica u područje oštećenja, implantaciju nosača prepunjenih zdravim stanicama te umetanje embrionalnih organa na mjesto gdje je tkivo oštećeno. S druge strane, izvantjelesno tkivno inženjerstvo uključuje uzgoj tkiva i cijelih organa u kultivacijskim sustavima poznatim kao bioreaktori. U ovim

bioreaktorima tkivni model se u potpunosti oblikuje prije nego što se implantira u tijelo pacijenta. [6, 7]



Slika 1 Trijada tkivnog inženjerstva [7]

2.2. Biomaterijali

Biomaterijali su definirani kao neživi materijali korišteni u medicinskim uređajima za interakciju s biološkim sustavima, prema definiciji usvojenoj na Konferenciji o definicijama u znanosti o biomaterijalima 1987. godine.[10] Da bi materijal bio klasificiran kao biomaterijal, mora biti biokompatibilan, što znači da ne smije izazivati štetne reakcije u tijelu. Također, treba pružati odgovarajuću mehaničku podršku i poticati rast i razvoj stanica. Biomaterijal treba omogućiti integraciju s okolnim tkivom i, prema potrebi, postepeno se razgraditi ili resorbirati tijekom procesa regeneracije. Konačno, mora biti sposoban pružiti fizičke i kemijske signale koji reguliraju funkciju stanica i podržavaju pravilno obnavljanje tkiva. [8] Biomaterijali koji se kroz povijest, ali i danas koriste u medicini i tkivnom inženjerstvu su:

- Metali
- Keramike
- Polimeri (prirodni i sintetski)
- Materijali iz biogenog izvora [3]

Metali se primjenjuju kao biomaterijali zbog svoje izvanredne električne i toplinske vodljivosti, kao i zbog svojih mehaničkih svojstava. Zbog slobodnih elektrona unutar metalne strukture, metali mogu učinkovito prenositi električni naboj i toplinsku energiju. Metali kao biomaterijali imaju visoke mehaničke osobine, izvanrednu otpornost na oštećenja i dobru duktilnost. Međutim, njihova loša biokompatibilnost, krutost i visoka specifična težina predstavljaju značajne nedostatke.[3] Neki metali se koriste kao pasivni nadomjesci za zamjenu tvrdih tkiva, uključujući potpune zamjene zapešća i koljena, ploče i vijke za liječenje prijeloma, uređaje za fiksaciju kralježnice te zubne implantate, zahvaljujući svojim iznimnim mehaničkim svojstvima i otpornosti na koroziju što je možda i glavni uvjet za korištenje u ove svrhe. Osim toga, određene metalne legure koriste se u aktivnijim ulogama u medicinskim uređajima poput vaskularnih stentova, vodilica za katetre, ortodontskih žica. Prva metalna legura koja je posebno razvijena za medicinsku primjenu bio je "vanadijski čelik" korišten za proizvodnju ploča za prijelome kostiju (poznatih kao Shermanove ploče) i vijaka. [9] Najčešće se, zbog svoje netkosičnosti i nekorozičnosti u ljudskom organizmu, koriste titan, tantal, paladij te njihove slitine s drugim metalima i nemetalima.[7]

Keramika kao biomaterijal u tkivnom inženjerstvu nudi značajne prednosti, uključujući iznimnu biokompatibilnost, kemijsku inertnost, visoku čvrstoću na kompresiju i otpornost na koroziju. Međutim, keramika također ima određene mane, kao što su niska čvrstoća na udarce, visoka specifična težina, krhkost i poteškoće u obradi. [3] Keramički materijali koji se koriste u tkivnom inženjerstvu uključuju biokeramiku, biostakla i staklokeramiku, koje se dalje mogu kategorizirati u tri glavne skupine. Prva kategorija uključuje inertnu keramiku koja, slično metalima, ne reagira s okolnim tkivom i stoga je potrebno kirurški je ukloniti. Druge dvije kategorije su biorazgradiva i bioaktivna keramika čiji razvoj je od velike važnosti, budući da se njihovom upotrebom izbjegavaju dodatni zahvati i narušavanje zdravlja pacijenta.[7]

Polimeri su ključni u tkivnom inženjerstvu zbog njihove sposobnosti da se prilagode specifičnim zahtjevima biomedicinskih aplikacija. Ovi materijali nastaju iz monomera, osnovnih građevnih jedinica, koje se kemijski povezuju u duge lance putem različitih mehanizama polimerizacije. Prirodni polimeri, poput kolagena i biljne celuloze, pružaju biokompatibilne osnove koje su idealne za poticanje regeneracije tkiva. Oni su biološki aktivni i mogu značajno poboljšati adheziju i rast stanica. Ipak, često imaju slabija mehanička svojstva, što može biti problematično u aplikacijama koje zahtijevaju nošenje opterećenja. Također, zbog svoje biološke varijabilnosti, izazovno je osigurati homogenost i dosljednost u

proizvodnji.[3] S druge strane, sintetski polimeri omogućuju kontrolu svojstava kao što su razgradivost i čvrstoća, ali često im nedostaju adhezijske točke za stanice, što zahtijeva dodatne kemijske prilagodbe kako bi se poboljšalo prijanjanje stanica. Hidrogelovi i nanovlakna predstavljaju dvije ključne forme polimernih nosača; hidrogelovi omogućuju fleksibilne i vodene okoline za rast stanica, dok se nanovlakna proizvode elektroispredanjem kako bi se stvorila struktura s velikom površinom za bolju interakciju s tkivom. [7]

Biomaterijali iz biogenih izvora, poput alginata i kolagena, nude brojne prednosti zbog svoje biokompatibilnosti i specifičnih svojstava koja mogu poboljšati regeneraciju tkiva. Ovi materijali se sve više koriste u različitim aplikacijama, od inženjerstva koštanog i hrskavičnog tkiva do 3D bioispisa. [7] Ewers je u svom istraživanju pokazao kako mikrostruktura koralja može biti korisna za regeneraciju kostiju, usmjeravajući razvoj novih materijala za ortopediju. [12] Gómez-Florit i suradnici su istakli upotrebu prirodnih polisaharida, poput metil-celuloze i alginata, u inženjerstvu tkiva, naglašavajući njihovu primjenu u stvaranju hidrogelova za medicinske svrhe. [11]

2.3. Nosači

Kako je već spomenuto, odabir materijala, ali i sama izrada nosača glavni su predmet zanimanja tkivnog inženjerstva. Nosači su, dakle, trodimenzionalne strukture izrađene od određenog biomaterijala, a koji služe za prijanjanje, rast i diferencijaciju stanica. Osnovna zadaća nosača je pružanje potpore tkivu dok stanice proizvode vlastiti matriks i cilj je da se nakon toga razgrade, a rezultat je konstrukt koji biološki nalikuje na izvorno tkivo. Dakle, izradom nosača pokušava se imitirati prirodna izvanstanična matrica. [13]

Osnovni kriteriji za procjenu nosača su:

- **Biokompatibilnost**

Nosači u tkivnom inženjerstvu trebaju biti biokompatibilni kako bi omogućili stanicama da se pravilno vežu, rastu i funkcionalno djeluju. Također, nakon što se implantiraju, moraju izazvati minimalnu imunološku reakciju kako bi se spriječile upale ili odbacivanje od strane organizma. [14] Ne postoji precizna definicija ili točna mjera biokompatibilnosti, ona se na neki način definira jedinstveno za svaku primjenu. [1]

- Biorazgradivost

Nosači bi trebali funkcionirati kao privremeni okvir za regeneraciju tkiva, koji će se s vremenom potpuno zamijeniti novim tkivom. Stoga je važno da budu biorazgradivi, pri čemu razgradni proizvodi trebaju biti netoksični i bezopasno izlučeni iz tijela, bez narušavanja normalnih tjelesnih funkcija.[15]

- Mehanička svojstva

Nosači trebaju imati mehanička svojstva koja odgovaraju specifičnom anatomskom mjestu na kojem će biti implantirani i biti dovoljno čvrsti da izdrže kiruršku manipulaciju. Važno je postići ravnotežu između čvrstoće materijala i njegove porozne strukture kako bi se omogućila optimalna infiltracija stanica i formiranje novih krvnih žila. [14]

- Struktura (mikrostruktura)

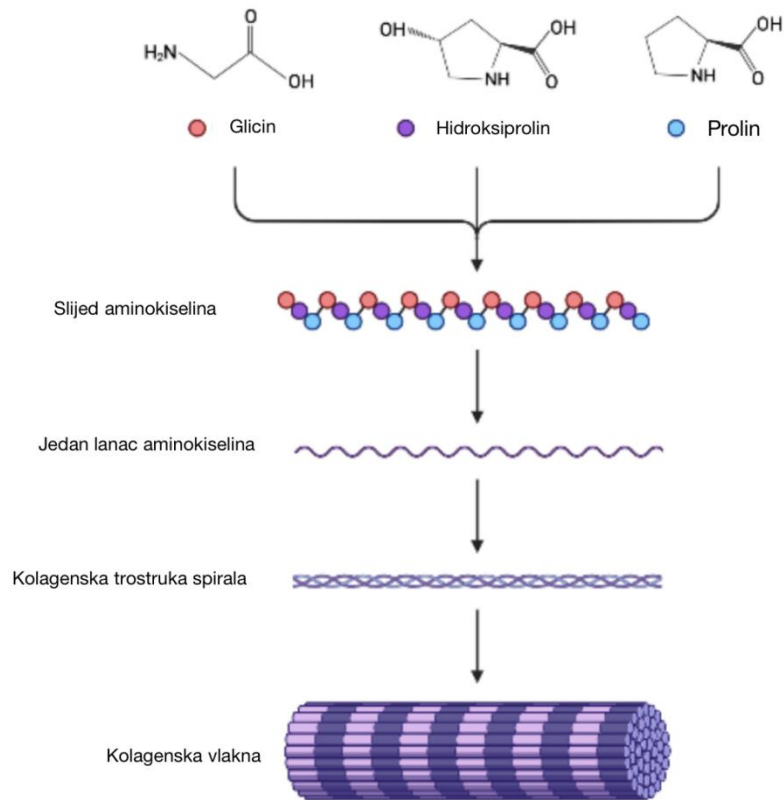
Nosači moraju biti visoko porozni kako bi potaknuli migraciju stanica, raspršivanje otpada, interakciju s tkivom te propuštanje hranjivih tvari i tekućina. Pore moraju biti dovoljno velike da omoguće prodor stanica, ali dovoljno male da osiguraju odgovarajuću gustoću stanica vezanih za nosač. [15]

2.4. Izvanstanična matrica

Izvanstanična matrica (ECM) je nestanični sklop proteina, glikoproteina i proteoglikana, koji su organizirani u specifičnu trodimenzionalnu strukturu za svako tkivo. Ove molekule imaju ključnu ulogu u pružanju strukturne potpore i čvrstoće, kao i u stvaranju veza za stanične receptore. [16] Izvanstanična matrica (ECM) može se podijeliti u dvije glavne kategorije: bazalnu membranu (BM) i intersticijsku matricu (IM). Bazalna membrana predstavlja sloj ECM-a koji je u kontaktu s epitelom i endotelom, služeći kao barijera koja odvaja različita tkiva unutar tijela. S druge strane, intersticijska matrica uključuje sve ostale vrste ECM-a koje se nalaze između stanica unutar tkiva. [18] Oponašajući jedinstvene stanične ili tkivne uvjete, proizvodi temeljeni na ECM-u obećavaju brzu integraciju s okolnim tkivima i ubranu obnovu njihove funkcionalnosti. [17]

Kolagen čini oko 90 % ECM-a i 30 % ukupnog proteina u ljudskom tijelu, a sastoji se od različitih tipova lanaca koji se formiraju od aminokiselina u stabilne trostruke helikse. Ove

helikse su stabilizirane vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama što im omogućuje da pružaju čvrstoću i elastičnost tkivima (slika 2). Varijacije u veličini i redosljedu aminokiselinskih lanaca kolagena uzrokuju različite vrste kolagena, koje se razlikuju u funkcionalnim svojstvima i ulozi unutar različitih tkiva. [4]



Slika 2 Struktura kolagena (Biorender)

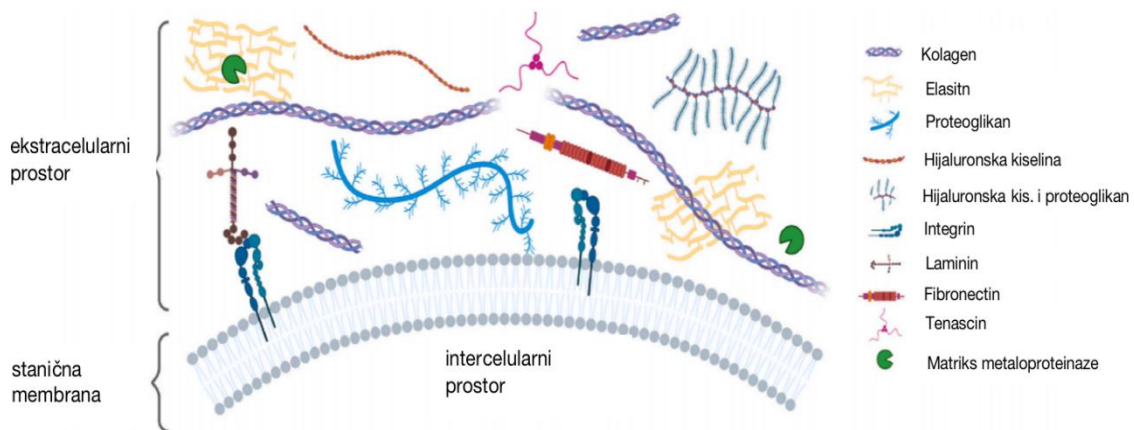
Fibronectin je vrsta proteoglikana koji se u ECM-u nalazi u malim količinama, ali ima jako važnu ulogu. Fibronectin značajno utječe na adheziju stanica, migraciju, proliferaciju, zgrušavanje krvi, vaskularizaciju, eliminaciju bakterija od strane fagocita i proces zarastanja rana, također povezuje razne strukturne proteine kao što su kolagen, fibrilin i tenascin-C.

Elastin je primarni sastojak elastičnih vlakana, koji tkivima pruža otpornost na deformaciju i pucanje zahvaljujući svojoj elastičnoj trodimenzionalnoj strukturi. Laminin, koji je ključni sastojak bazalne membrane, sudjeluje u vaskularizaciji i procesu obnavljanja epitelnih stanica tijekom zarastanja rana, povezujući različite ECM proteine i pružajući sučelje za prijanjanje epitelnih stanica. [4]

Hijaluronska kiselina (HA) ključna je komponenta izvanstanične matrice koja poboljšava viskoelastična svojstva tkiva zbog svoje sposobnosti da veže veliku količinu vode. Osim što

služi kao "rezervoar" za vodu, HA igra važnu ulogu u održavanju osmotske ravnoteže i filtriranju molekula unutar ECM-a. [4]

Hondroitin sulfat, keratan sulfat i heparan sulfat su heteropolisaharidi koji pripadaju klasi glikozaminoglikana i slični su hijaluronskoj kiselini po tome što se sastoje od ponovljenih disaharida. Hondroitin sulfat se sastoji od disaharidnih jedinica N-acetilgalaktozamina i glukuronske kiseline, dok keratan sulfat uključuje galaktozu i N-acetilglukozamin, a heparan sulfat sadrži iduronsku kiselinu i glukozamin. Ovi glikozaminoglikani se razlikuju po položaju sulfatnih skupina koje utječu na njihovu strukturu i funkciju, a svi igraju ključne uloge u vezivanju proteina, regulaciji metalnih iona i održavanju viskoelastičnosti ECM-a. [4] Na slici 3 je prikazan sadržaj izvanstanične matrice.



Slika 3 Prikaz sadržaja izvanstanične matrice [29]

2.5. Decelularizacija

Decelularizacija je proces uklanjanja svih staničnih komponenti iz tkiva ili organa, ostavljajući samo izvanstaničnu matricu (ECM) koja zadržava svoju izvornu sastav i strukturu. Ovaj postupak se provodi kako bi se stvorila "čista" ECM koja se može koristiti kao nosač u regenerativnoj medicini i biotehnologiji, omogućujući razvoj novih tkiva ili organa, ili kao model za istraživanje u laboratoriju. Decelularizacija se provodi kako bi se eliminirale stanične komponente koje mogu izazvati imunološke reakcije i upalu prilikom implantacije, čime se smanjuje rizik od odbacivanja implantata.

Postoje različite metode decelularizacije koje se mogu podijeliti u kemijske, enzimatske, fizičke i kombinirane tehnike. Kemijske metode često uključuju upotrebu detergenata kao što su Triton X-100 i natrijev dodecil-sulfat (SDS). Triton X-100 je učinkovit u uklanjanju stanica iz tkiva gdje su ključne komponente matrice proteini, dok SDS razgrađuje vanjske i nuklearne membrane, ali može denaturirati proteine i promijeniti strukturu matrice. Enzimatske metode koriste enzime poput tripsina i pepsina za uklanjanje staničnih ostataka, ali dugotrajna izloženost ovim enzimima može uzrokovati oštećenje matrice. Fizičke metode, kao što je smrzavanje i odmrzavanje, stvaraju kristale leda unutar stanica što uzrokuje njihovu razgradnju i olakšava decelularizaciju. Mehanička agitacija i sonikacija koriste se u kombinaciji s kemijskim tretmanima za poboljšanje učinkovitosti uklanjanja stanica, dok vakumski asistirani proces pomaže kemijskim tvarima da dosegnu cijelo tkivo, ali ne može samostalno ukloniti stanice. Kombinirane metode koriste prednosti svih prethodnih tehnika, ali zahtijevaju pažljivo balansiranje kako bi se postigli najbolji rezultati. [19]

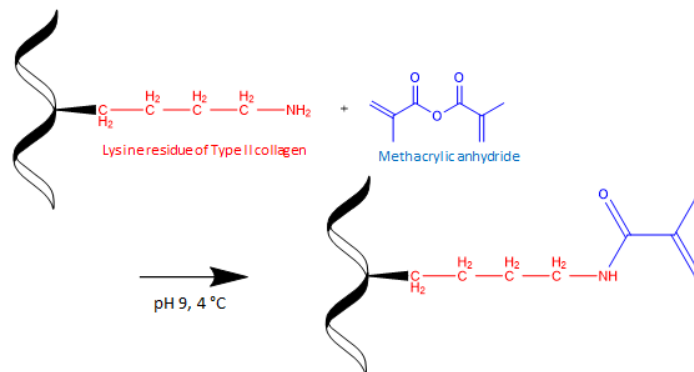
2.6. Hibridni hidrogelovi

Hidrogelovi su materijali formirani od hidrofilnih polimera koji se umrežavaju i mogu upiti više od 70 % vode u svojoj ukupnoj masi. Oni mogu biti fizički ili kemijski umreženi, pri čemu fizički hidrogelovi reagiraju na podražaje poput temperature i pH, dok kemijski hidrogelovi nude bolju mehaničku stabilnost zahvaljujući kovalentnim vezama. Na temelju metode pripreme i vrsta polimera, hidrogelovi mogu biti prirodni, poput celuloze i kolagena, ili sintetski, kao što su polikaprolakton i polivinil-alkohol.

Hibridni hidrogelovi su složeni materijali koji kombiniraju prirodne i sintetske molekule, fizičko i kemijsko umrežavanje te koriste prednosti i jedne i druge strane. Često se koriste prirodni biorazgradivi i biokompatibilni polimeri zajedno sa sintetskim polimerima. Dok prirodni polimeri osiguravaju biokompatibilnost i mjesta za adheziju stanica, sintetski polimeri dodaju dodatnu čvrstoću i mogućnost modifikacije svojstava. Hidrogelovi prirodnih polimera se također mogu ojačavati kroz funkcionalizaciju i kovalentno umrežavanje. [2]

Behan i kolege su istraživali primjenu metakrilatnih hidrogelova. Pripremili su metakrilatno modificirane hidrogelove od izvanstanične matrice hrskavice (cECM-MA) i procijenili njihovu primjenu za 3D ispis i tkivno inženjerstvo. Zaključili su da metakrilacija poboljšava stabilnost, mehanička svojstva i printabilnost hidrogelova, omogućujući im bolju primjenu u

stvaranju funkcionalnih tkivnih konstrukcija. Metakrilatna grupa omogućava formiranje umrežene strukture kroz fotokrižanje. Na slici 4 je prikazana reakcija metakril-anhidrida s lizinskom skupinom na zavojnici kolagena.[20]



Slika 4 Reakcija metakril-anhidrida i lizinske skupine na kolagenu [20]

Primjer hibridnog hidrogela koji se sastoji od mješavine ECM-a i PCL-a (polikaprolakton) pokazuje sinergiju bioloških i mehaničkih svojstava. U ovom kontekstu, ECM pruža biološke komponente i podršku za rast i diferencijaciju stanica, dok PCL, sintetički biokompatibilni polimer, doprinosi mehaničkoj stabilnosti i dugotrajnoj čvrstoći hidrogela. PCL je poznat po svojoj viskoelastičnosti i sposobnosti da održi oblik i funkcionalnost tiskanih struktura, čak i kada se materijal koji se koristi za oblaganje stanica brzo razgradi. Kombinacija ovih materijala omogućava stvaranje stabilnih bioprintanih konstrukcija koje mogu podržati funkcionalne karakteristike i dugotrajnu primjenu u inženjerstvu tkiva. [5]

2.7. Fotopolimerizacija i fotoinicijatori

Fotopolimerizacija je proces u kojem UV svjetlost aktivira fotoinicijator ili sam monomer, pokrećući reakciju polimerizacije. Monomeri, poput metakrilne kiseline (MAA), mogu se fotopolimerizirati sami bez dodatnih fotoinicijatora. Nakon početne faze u kojoj se potroše inhibitori i kisik, brzina polimerizacije MAA povećava se linearno s vremenom zračenja sve dok ne postigne stabilnu konverziju polimerizacije. Konverzija polimerizacije MAA je niža u usporedbi s akrilnom kiselinom (AA), što se može pripisati nižoj reaktivnosti MAA i mogućem isparavanju monomera tijekom zračenja. [21]

Fotoinicijatori su kemijski spojevi koji apsorbiraju svjetlost u UV regiji i reagiraju stvaranjem radikala koji pokreću polimerizaciju. Oni omogućuju umrežavanje nezasićenih monomera i

polimera bez potrebe za dodatnim toplinskim obradama. Odabir odgovarajućeg fotoinicijatora ovisi o njegovim svojstvima apsorpcije, reaktivnosti i kinetici unutar sustava. [22] Litij-fenil (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfinat (LAP) je fotoinicijator koji pokreće slobodnu radikalnu polimerizaciju pri izlaganju svjetlu, te se koristi u bioprintanju s želatina- metakrilatom (GelMA). Iako je LAP koristan za umrežavanje polimera, slobodni radikali koje proizvodi mogu biti citotoksični, ali nisu pokazali mutagenost u bakterijskim testovima. [23]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.2. Decelularizacija izvanstanične matrice

Svinjska jetra izrezana je na sitne komadiće i ispirana u otopini 1 % SDS dok nije izbijelila. Zatim je dobro isprana u etanolu i destiliranoj vodi nakon čega je provedena liofilizacija. Dobiveni liofilizat, 300 mg, pomiješan je s 0,01 M HCl (pH = 2) i 30 mg pepsina (Pepsin, Acros Organics B.V.B.A., Belgija) te stavljen na tresilicu na 350 o/min, 96 sati pri sobnoj temperaturi.

Budući da je za metakrilaciju bilo potrebno podesiti pH vrijednost na oko 9, dodavana je 1 M NaOH (NaOH, P.A, Lach-Ner, Češka), kap po kap, a pH-vrijednosti praćene su pomoću indikatorskih papirića. Takav pH deprotonira lizine (aminokiselina) na zavojnici kolagena čime se povećava reaktivnost prema metakrilnom anhidridu.

3.2.1. Metakrilacija

Pripremljena je otopina dECM-MA u omjeru 1 g ECM / 3 mL MA od 300g ECM-a i 0,9 mL MA. Dodavano je 50 µL otopine metakril- anhidrida (metakrilanhidrid, 94 %, stabilizirano s 0,2 % 2,4-dimetil-6-tert-butilfenolom, Thermoscientific, SAD) 18 puta, u razmaku od oko 3 minute. Postupak je trajao oko 55 minuta. Tijekom provođenja metakrilacije, kao i sat vremena nakon samog procesa, praćena je pH-vrijednost koja je održavana na približno 9.

3.2.2. Dijaliza

U čaši je pripremljena otopina octene kiseline. Uzorak je dodan u celuloznu membranu (Spectra/Por, širina membrane 1 kDa). Dijaliza je trajala 25 sati, s tim da je medij, odnosno otopina octene kiseline jednom promijenjena. Nakon dijalize uzorak je stavljen u centrifugu, 4 minute na 400 o/min, a zatim opet liofiliziran.

3.3. Priprava hidrogelova

Pripremljena je otopina dECM-MAA koncentracije 8 mg/mL tako što je 20 mg liofiliziranog uzorka otopljeno u 2,5 mL 0,1 M otopine NaOH (NaOH, P.A, Lach-Ner, Češka).

3.3.1. Priprema alginata

Za pripremu 3 %-tne otopine alginata, najprije je 50 mL destilirane vode zagrijano na 50 °C koristeći magnetsku mješalicu. Nakon što je voda postigla željenu temperaturu, na analitičkoj vagi je pažljivo izmjereno 1,5 g praha natrijeva alginata (natrijeva sol alginske kiseline, niska viskoznost, Alfa Aesar, Njemačka). Prah alginata je potom dodan u prethodno zagrijanu vodu, a otopina je miješana na magnetskoj miješalici tijekom približno jednog sata kako bi se postiglo potpuno otapanje.

3.4. Priprava hibridnih hidrogelova

Pripremljeni su hibridni hidrogelovi koji se sastoje od različitih omjera alginata i dECM-MAA. Pet uzoraka hidrogelova je formulirano s različitim udjelima alginata i dECM-MAA kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1 Uzorci hibridnih hidrogelova s udjelima dECM-MAA i 3 %- tnog alginata

Uzorak	Udio dECM-MAA, %	Udio 3 % alginata, %
1	100	0
2	75	25
3	50	50
4	25	75
5	0	100

Za svaki uzorak pripremljen je volumen od 1 mL, pri čemu je svakoj otopini dodano 0,5 mg LAP-a (Lithium Phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate, BLD Pharm, Kina) kao umreživač za dECM-MAA komponentu. Kao sredstvo za umrežavanje alginata dodano je 5 µL otopine CaCl₂ (CaCl₂, bezvodni, GRAM-MOL, Hrvatska).

Pripremljeni uzorci osvijetljeni su UV lampom 7 puta po 60 sekundi.

3.5. Metode karakterizacije

Hibridni hidrogelovi dECM-MAA / 3 % alginat karakterizirani su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared*

spectroscopy, FTIR) te razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC).

3.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

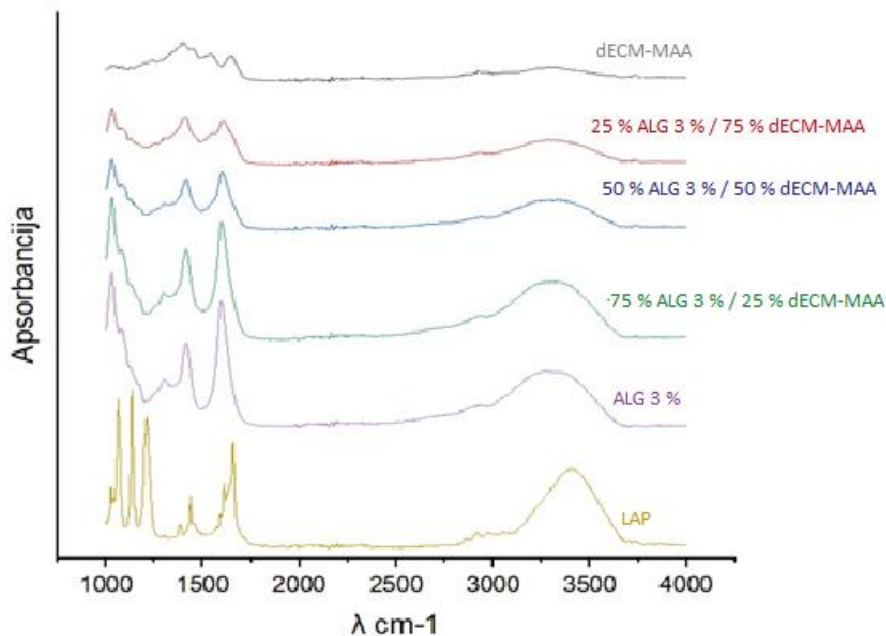
FTIR analize provedene su korištenjem ATR-FTIR spektrometra Vertex 70 (Bruker, SAD) opremljenog dijamantnim kristalom. Uzorci hibridnih hidrogelova, nakon prethodnog čišćenja prizme, dodavani su pojedinačno, a na kraju je analiziran i LAP. Za analizu je potrebna vrlo mala količina uzorka i sam uzorak je nakon analize neoštećen. Spektri su snimljeni na području od 1000 do 4000 cm^{-1} .

3.5.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija

DSC analize provedene su na uređaju DSC 823/TSO (Mettler Toledo, Švicarska). Mala količina uzorka (oko 4 mg) stavljena je u lončić, koji je zatim hermetički zatvoren, pri čemu je na poklopcu napravljena mala rupica iglom prije postavljanja u uređaj. Važno je da mase uzoraka budu slične kako bi usporedba rezultata bila valjana. Snimani su termogrami u temperaturnom području od 0 °C do 225 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom



Slika 5 FTIR spektri hibridnih uzoraka dECM-MAA / 3 % ALG

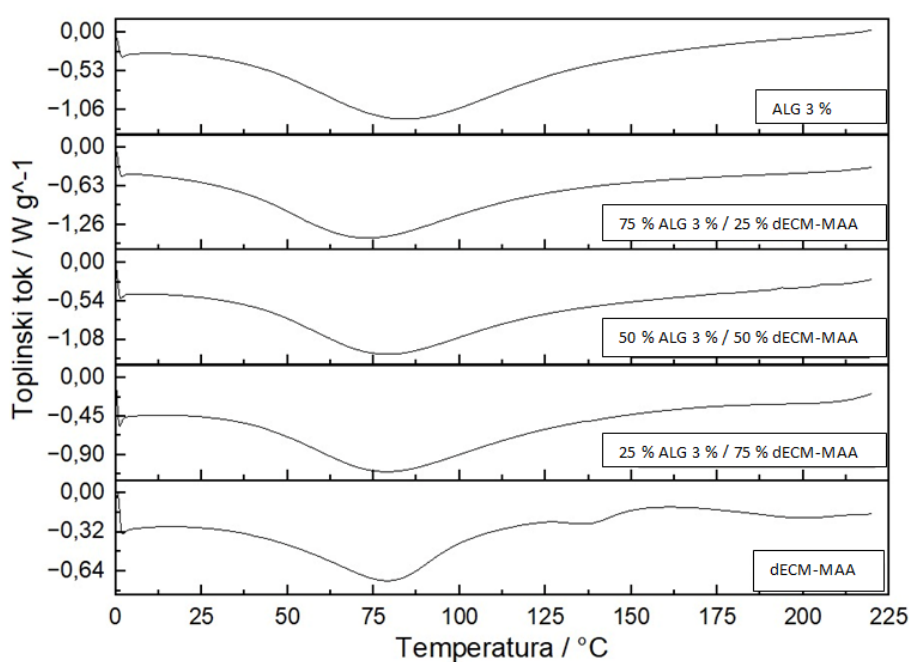
FTIR analiza korištena je za dokazivanje karakterističnih funkcionalnih skupina i kemijskih veza. Na slici 5 su prikazani spektri dobiveni FTIR analizom. Spektar dobiven za 3 %-tnu otopinu alginata pokazuje karakteristične maksimume od oko 1040 cm^{-1} do 1400 cm^{-1} , koji se pripisuju istežanju C=O i C=C veza. Široki vrh pri približnoj valnoj duljini od 3250 cm^{-1} ukazuje na polimerno rastezanje vezane O - H skupine. [24] Maksimum oko 1600 cm^{-1} pripisuje se asimetričnoj i simetričnoj vibraciji istežanja karboksilne skupine (COOH). [25] Huang, C. C je u spektru za natrijev alginat dobio i rastezanje C-H piranoidnog prstena (šesteročlani prsten) pri 2903 i 2932 cm^{-1} , dok se u dobivenim rezultatima vidi tek mali maksimum na tom području. [26]

Spektar čiste dECM-MAA prikazuje karakteristične vrpce na području između 1225 i 1725 cm^{-1} , također široku vrpcu na oko 3800 cm^{-1} . Maksimum na oko 1240 cm^{-1} pripisuje se amidnoj skupini koja se nalazi u kolagenu u izvornoj svinjskoj koži. [26] Maksimum na duljini od oko 1700 cm^{-1} pripisuje se C=O rastežanju. [27] Široka vrpca na području od 2800

do 3000 cm^{-1} ukazuje na prisutnost metilnih i metilenskih skupina što ukazuje da je uspješno provedena metakrilacija dECM-a. [28]

Na spektrima hibridnih uzoraka vidljivi su maksimumi karakteristični za dECM-MAAA, kao i za alginat (ALG) 3 %. Povećanjem udijela alginata povećava se i intenzitet maksimuma karakterističnih za alginat. Apsorpcija od 3600 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} sugerira osnaživanje vodikovih veza kao rezultat interakcije između dECM molekule i molekule alginata (ALG). [26]

4.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija



Slika 6 Termogrami hibridnih uzoraka dECM-MAA / 3 % ALG

Tablica 2 Početne i maksimalne temperature uzoraka

Uzorak	Početna temperatura, °C	Maksimalna temperatura, °C
100% alg 3%	35,90	142,46
75% alg 3% / 25% dECM-MAA	30,41	131,67
50% alg 3% / 50% dECM-MAA	35,74	136,85
25% alg 3% / 75% dECM-MAA	37,64	133,57
100% dECM-MAA	40,21	106,97

Tablica 3 Normalizirane entalpije uzoraka

Uzorak	Normalizirana entalpija, J/g
100% alg 3%	-396,82
75% alg 3% / 25% dECM-MAA	-403,92
50% alg 3% / 50% dECM-MAA	-331,58
25% alg 3% / 75% dECM-MAA	-231,32
100% dECM-MAA	-117,43

DSC (razlikovna pretražna kalorimetrija) je termodinamička tehnika kojom se mjeri količina toplinske energije koju uzorak apsorbira ili oslobađa tijekom kontroliranog povećanja ili smanjenja temperature. Primarno se koristi za proučavanje faznih prijelaza, poput topljenja, kristalizacije i denaturacije biomolekula. Pomaže u karakterizaciji materijala u smislu stabilnosti, prijelaznih temperatura i promjena u strukturi. [30] Na slici 6 su prikazani termogrami kod kojih je uočljiv endotermni prijelaz, što ukazuje da je došlo do denaturacije uzoraka. Endotermni prijelaz je u temperaturnom području od 70 °C do 120 °C koji ukazuje na isparavanje otapala. [31]

Korištenjem DSC analize moguće je pratiti stabilnost uzoraka kroz promjene u početnoj i maksimalnoj temperaturi. Početna temperatura je ona pri kojoj počinje denaturiranje, a maksimalna pokazuje kada dolazi do maksimalnog raspada. [30] Podaci o početnim i maksimalnim temperaturama prikazani su u Tablici 2. Rezultati pokazuju najnižu POČETNU temperaturu kod uzorka s 75 % alginata i 25 % dECM-MAA (30,41 °C), nakon čega slijedi uzorak s 50 % alginata i 50 % dECM-MAA (35,74 °C), te 100 % alginata (35,90 °C). Uzorak s 25 % alginata i 75 % dECM-MAA ima temperaturu od 37,64 °C, dok je najviša temperatura zabilježena kod uzorka s 100 % dECM-MAA (40,21 °C). Ovi rezultati ukazuju na to da prva tri uzorka nisu prikladna za primjenu u tkivnom inženjerstvu zbog toga što je njihova početna temperatura niža od prosječne ljudske temperature, koja iznosi oko 37 °C. Četvrti uzorak je na granici upotrebljivosti, dok se peti uzorak može smatrati adekvatnim s obzirom na ovaj kriterij. Viša maksimalna temperatura je povoljnija jer implicira veću toplinsku stabilnost materijala. U rezultatima se vidi da najveću maksimalnu temperaturu ima uzorak alginata 3 % (142,46 °C), najmanju čista dECM-MAA (106,97 °C), a ostali uzorci imaju iznos između tih dviju vrijednosti. Povećanjem udjela alginata povećava se i maksimalna temperatura, s tim da je uzorak 75 % alginata / 25 % dECM-MAA iznimka. Iako maksimalna temperatura ukazuje na to da alginat povećava toplinsku stabilnost uzorka, početna temperatura pokazuje obrnuto,

dodatakom alginata denaturacija počinje pri nižim temperaturama. Iz toga se zaključuje da alginat nije povoljno utjecao na toplinska svojstva hibridnog hidrogela.

Tablica 3 prikazuje vrijednosti normaliziranih entalpija. Normalizacija je izvršena koristeći programski paket STARe, s obzirom na masu uzorka. Najniža vrijednost endotermnog minimuma, što odgovara najvećoj entalpiji dehidracije, zabilježena je za uzorak s 3 % alginata, dok je najmanja entalpija pronađena za čisti dECM-MAA. Kako se udio alginata povećava, tako se entalpija također povećava, iako opet postoji iznimka kod uzorka s 75 % alginata i 25 % dECM-MAA. Veće vrijednosti entalpije ukazuju na jače veze unutar materijala, što sugerira da dodatak alginata doprinosi stvaranju čvršćeg i umreženijeg hibridnog hidrogela. [31]

5. ZAKLJUČAK

Provedena je uspješna priprava hibridnih hidrogelova s različitim omjerima dECM-MAA i alginata.

Promjenom omjera dECM-MAA i alginata moguće je mijenjati svojstva hidrogela kako bi se prilagodio specifičnim potrebama u tkivnom inženjerstvu.

Analize FTIR spektroskopije su pokazale da su u uzorcima zadržane karakteristične vrpce koje odgovaraju i dECM-u i alginatu, što potvrđuje uspješno umrežavanje dvaju materijala. Također prisutnost metilnih i metilenskih skupina ukazuje na uspješno provedenu metakrilaciju izvanstanične matrice.

Termička svojstva hibridnih hidrogelova ocijenjena su pomoću DSC analize, koja je otkrila da se uzorci razlikuju u svojoj toplinskoj stabilnosti ovisno o omjeru alginata i dECM-MAA. Uzorak 100 % dECM-MAA pokazao je najvišu početnu temperaturu denaturacije, što ga čini najstabilnijim u smislu termičke otpornosti. S druge strane, najveću maksimalnu temperaturu pokazuje čisti alginat. Iz toga se može zaključiti da je pri nižim temperaturama stabilniji hidrogel čistog dECM-MAA, a pri višim se sporije raspada uzorak čistog alginata. Uzorci s višim udjelom alginata, poput uzorka 75% alginata i 25% dECM-MAA, pokazali su niže početne temperature, što sugerira da takvi hidrogelovi nisu prikladni za primjenu pri tjelesnoj temperaturi (37 °C). Rezultati eksperimenta ukazuju na to da je prisutnost alginata u hibridnom hidrogelu dovela do smanjenja početne temperature denaturacije, što sugerira da nije potvrđena pretpostavka o poboljšanju termičkih svojstava hidrogela. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da alginat nije doprinio poboljšanju svojstava hidrogela prema postavljenim hipotezama.

Ovaj rad pruža osnovu za daljnja istraživanja u poboljšanju svojstava hibridnih biomaterijala i njihovoj primjeni u biomedicinskim tehnologijama.

6. LITERATURA

- [1] Ratner, B. D. . (2013). *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. Academic Press.
- [2] Prebeg, T., Perić Kačarević, Ž., & Matijašić, G. (2023). Hybrid hydrogels for bioink development and potential use in dental tissue engineering. *International Journal of Dental Biomaterials Research*, 1, 22–29.
- [3] Todros, S., Todesco, M., & Bagno, A. *Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration*. In *Processes* (2021). (Vol. 9, Issue 11).
- [4] Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, Y. (2021). Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature.
- [5] Chen, M., Feng, Z., Guo, W., Yang, D., Gao, S., Li, Y., Shen, S., Yuan, Z., Huang, B., Zhang, Y., Wang, M., Li, X., Hao, L., Peng, J., Liu, S., Zhou, Y., & Guo, Q. (n.d.). Supporting Information PCL-MECM Based Hydrogel Hybrid Scaffolds and Meniscal Fibrochondrocytes Promote Whole Meniscus Regeneration in a Rabbit Meniscectomy Model.
- [6] Krstulović Ema, *Tkivno inženjerstvo, završni rad*, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Odjel za Biologiju, 2022.
- [7] Prebeg, T., Dolenc, T., Slivac, I., & Matijašić, G. (2023). Postupci obrade i pripreme životinjske izvanstanične matrice za primjenu u tkivnom inženjerstvu Preparation of animal extracellular matrix for tissue engineering. In *Croatian Journal of Food Technology* (Vol. 18).
- [8] Chen, F. M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 53, pp. 86–168).
- [9] Joon Park, R. S. Lakes, (2007). *Biomaterials: an introduction*. Third edition. (Pages 99-137)
- [10] Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909.
- [11] Gomez-Florit, M., Pardo, A., Domingues, R. M. A., Graça, A. L., Babo, P. S., Reis, R. L., & Gomes, M. E. (2020). Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 24).
- [12] Ewers R. (2005). Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results. *Dental Implant* (Volume 63, Issue 12). (Pages 1712-1723).
- [13] Rhee, S., Puetzer, J. L., Mason, B. N., Reinhart-King, C. A., & Bonassar, L. J. (2016). 3D Bioprinting of Spatially Heterogeneous Collagen Constructs for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(10), 1800–1805.
- [14] O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95.

- [15] Troy, E., Tilbury, M. A., Power, A. M., & Wall, J. G. (2021). Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 19).
- [16] Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(5), 377–383.
- [17] Xing, Q., Qian, Z., Jia, W., Ghosh, A., Tahtinen, M., & Zhao, F. (2017). Natural Extracellular Matrix for Cellular and Tissue Biomanufacturing. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 3(8), 1462–1476
- [18] Valdoz, J. C., Johnson, B. C., Jacobs, D. J., Franks, N. A., Dodson, E. L., Sanders, C., Cribbs, C. G., & van Ry, P. M. (2021). The ECM: To scaffold, or not to scaffold, that is the question. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23).
- [19] Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B., & Abarategi, A. (2020). Tissue-specific decellularization methods: Rationale and strategies to achieve regenerative compounds. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 15, pp. 1–29).
- [20] Behan, K., Dufour, A., Garcia, O., & Kelly, D. (2022). Methacrylated Cartilage ECM-Based Hydrogels as Injectables and Bioinks for Cartilage Tissue Engineering. *Biomolecules*, 12(2).
- [21] Wang, H., & Brown, H. R. (2004). Self-initiated photopolymerization and photografting of acrylic monomers. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(11), 1095–1099.
- [22] Hany F. Sobhi, Synthesis and characterization of acylphosphine oxide photoinitiators, doktorski rad, Cleveland State University, (2005).
- [23] Nguyen, A. K., Goering, P. L., Elespuru, R. K., Das, S. S., & Narayan, R. J. (2020). The photoinitiator lithium phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) phosphinate with exposure to 405 nm light is cytotoxic to mammalian cells but not mutagenic in bacterial reverse mutation assays. *Polymers*, 12(7)
- [24] Liu, S., Li, Y., & Li, L. (2017). Enhanced stability and mechanical strength of sodium alginate composite films. *Carbohydrate Polymers*, 160, 62–70.
- [25] Li, J., Wu, Y., He, J., & Huang, Y. (2016). A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films. *Journal of Materials Science*, 51(12), 5791–5801
- [26] Huang, C. C. (2021). Characteristics and preparation of designed alginate-based composite scaffold membranes with decellularized fibrous micro-scaffold structures from porcine skin. *Polymers*, 13(20).
- [27] Claudia R. E. Mansur, Elisabeth E. C. Monteiro, Characterization of Methacrylic Polymers by Calorimetry and Infrared Analyses, *Applied Polymer*, 1997.
- [28] Zhang, Y., Wang, J., Xue, S., Wu, J., Chang, L., & Li, Z. (2016). Kinetic study on changes in methyl and methylene groups during low-temperature oxidation of coal via in-situ FTIR. *International Journal of Coal Geology*, 154–155, 155–164.

- [29] Noro, J., Vilaça-Faria, H., Reis, R. L., & Pirraco, R. P. (2024). Extracellular matrix-derived materials for tissue engineering and regenerative medicine: A journey from isolation to characterization and application. In *Bioactive Materials* (Vol. 34, pp. 494–519).
- [30] Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). *Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience*.
- [31] Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Shah, Y. A., Altoubi, H. W. K., Kotta, S., Sharma, P., Anwer, M. K., Kaithavalappil, D. S., Koca, E., & Aydemir, L. Y. (2023). Fabrication, Characterization, and Antioxidant Potential of Sodium Alginate/Acacia Gum Hydrogel-Based Films Loaded with Cinnamon Essential Oil. *Gels*, 9(4).