

Utjecaj detergenata na djelotvornost decelularizacije tkiva

Omerčić, Dinka

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:149:001686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dinka Omerčić

ZAVRŠNI RAD

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

Kandidatkinja **Dinka Omerčić**

Predala je izrađen završni rad dana: 4. rujna 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. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 9. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dinka Omerčić

Utjecaj detergenata na djelotvornost decelularizacije tkiva

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof.dr.sc. Gordana Matijašić

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Želim iskreno zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Gordani Matijašić, koja me nadahnula svojom stručnošću i neizmjernom podrškom tijekom pisanja ovog rada. Hvala mojoj majci, sestri i posebno mome ocu, koji je sada na nebu – vaša beskrajna podrška i ljubav su mi bili neprocjenjivi. Očev neumorni trud i podrška, čak i u teškim danima, značili su mi više nego što riječi mogu izraziti. Također, zahvaljujem svojim prijateljicama koje sam stekla tijekom studija; vaše prijateljstvo postalo je moj oslonac i nadam se da će trajati kroz sve životne izazove koji su pred nama.

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

SAŽETAK

Sve veća potreba za nadomjestkom određenog tkiva ili organa, uz manjak donora, za sobom povlači novu sferu interesa kroz tkivno inženjerstvo i razvoj tkiva *in vitro*. Takav se poduhvat bazira na naciepljivanju stanica na nosač izvanstanične matrice od biomaterijala izražene biokompatibilnosti. Pri tome se stvara trodimenzionalno izgrađeno kompleksno tkivo, koje se potom transplantira. Kako bi se izvanstanična matrica izolirala, postala nosačem za stanice te zadržala svoju strukturu, potrebno je proći kroz proces decelularizacije. U tom je procesu tkivo podvrgnuto fizikalnim, kemijskim i enzimatskim postupcima.

U ovome je radu provedena decelularizacija svinjske jetre putem kemijske metode, gdje su upotrebljavani detergentski: natrijev lauril sulfat (SDS), natrijev lauret sulfat (SLES), Triton-X 100 i Tween 20. Nakon provedenih decelularizacija, postupak se nastavio kvantifikacijom bioloških komponenata kojima je utvrđena koncentracija prisutne deoksiribonukleinske kiseline (DNK), kolagena i glikozaminoglikana (GAG). Dodatno je analizirana struktura tkiva svjetlosnim mikroskopom i stereomikroskopom.

Rezultati istraživanja pokazali su varijabilnu učinkovitost detergenata poput SDS-a, SLES-a, Triton-X 100 i Tween 20 u procesu decelularizacije svinjske jetre. Kvantifikacija sadržaja DNK, kolagena i glikozaminoglikana (GAG-a) u decelulariziranim uzorcima tkiva otkrila je različitu sposobnost detergenata u očuvanju ovih ključnih komponenata. Mikrografije tkiva dodatno su ilustrirale oštećenja i puknuća u strukturi izvanstanične matrice, s nekim detergentima koji su uzrokovali veća oštećenja od drugih. Ovi rezultati naglašavaju potrebu za pažljivim odabirom detergenata i optimizacijom procesa decelularizacije kako bi se minimizirala oštećenja strukture tkiva i osigurala njihova biokompatibilnost za buduću primjenu.

Ključne riječi: tkivno inženjerstvo, izvanstanična matrica, decelularizacija, detergent

ABSTRACT

The impact of detergents on the tissue decellularization efficacy

Increasing need for the replacement of a specific tissue or organ, with a smaller number of donors, entail a new sphere of interest through tissue engineering and tissue development *in vitro*. Such an undertaking is based on the grafting of a cell on an extracellular matrix carrier made of biomaterials with pronounced biocompatibility. In doing so, a three-dimensional complex tissue is created, which is then transplanted. In order for the extracellular matrix to be isolated, become a carrier for cells and retain its structure, it is necessary to go through the decellularization process. In this process, the tissue is subjected to physical, chemical and enzymatic procedures.

In this work, decellularization of porcine liver was carried out by a chemical method using 1% solutions of detergents sodium lauryl sulfate (SDS), sodium laureth sulfate (SLES), Triton-X 100 and Tween 20. After the decellularization, the obtained samples were tested using quantification methods, in order to measure the presence of DNA, collagen and GAG for the detection of residual biological material. In addition to various methods of quantification, the tissue structure was analyzed using a light microscope and a stereomicroscope.

The research results showed variable effectiveness of detergents such as SDS, SLES, Triton-X 100, and Tween 20 in the decellularization process of porcine liver. Quantification of DNA, collagen, and glycosaminoglycan (GAG) content in decellularized tissue samples revealed the different abilities of detergents in preserving these key components. Tissue micrographs further illustrated damages and ruptures in the extracellular matrix structure, with some detergents causing greater damage than others. These findings emphasize the need for careful selection of detergents and optimization of the decellularization process to minimize tissue structure damage and ensure their biocompatibility for future applications.

Key words: tissue engineering, extracellular matrix, decellularization, detergent

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Inženjerstvo tkiva	2
2.2. Biomaterijali.....	3
2.3. Trijada tkivnog inženjerstva.....	6
2.3.1. Stanica .6	
2.3.2. Nosači 6	
2.3.3. Biosignali.....	7
2.4. Tehnike konstruiranja nosača.....	8
2.5. Decelularizacija i izvanstanična matrica.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali i instrumenti	11
3.1.1. SDS ... 11	
3.1.2. SLES 12	
3.1.3. Triton-X 100	13
3.1.4. Tween 20.....	13
3.2. Decelularizacija	14
3.3. Metode karakterizacije.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Sadržaj DNK.....	17
4.2. Sadržaj kolagena	18
4.3. Sadržaj GAG-a.....	19
4.4. Struktura decelulariziranog tkiva	20
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Jetra, kao najveći unutarnji organ čovjeka, izrazito kompleksne strukture te još kompleksnijih fizioloških funkcija, predstavlja idealno sjelo mnogih bolesti akutnog ili kroničnog tijeka, koja često završe ireverzibilnim promjenama. Upravo te promjene indiciraju vrlo čestu potrebu za transplatacijom organa, koju transplantacijska kirurgija smatra i dalje tehnički vrlo zahtjevnim zahvatom koji podliježe mnogim komplikacijama, prije svega imunološkom odbacivanju organa. Komplikacije su nažalost sve prisutnije i prije samih operacijskih zahvata zbog sve većih nedostataka dostupnosti donorskih organa.

Upravo su te činjenice uzrokovale intenzivniji razvoj tkivnog inženjerstva koje kroz svoje intradisciplinarno djelovanje biomedicinskih i inženjerskih znanosti središnjicu svog djelovanja utjelovljuje kroz uzgoj vlastitog tkiva *in vitro* sa ciljem razvoja biološkog materijala za potpomaganje funkcije tkiva, nacjepljivanjem stanica na nosač izvanstanične matrice (engl. *extracellular matrix*, ECM) od biomaterijala, stvarajući pri tome trodimenzionalno izgrađeno kompleksno tkivo *in vitro*, koje se potom transplantira.

Kako bi se izvanstanična matrica izolirala iz tkiva uz zadržavanje trodimenzionalne strukture, koristi se proces decelularizacije. Decelularizacija se provodi mehaničkim, enzimskim ili kemijskim metodama. U ovom se radu pozornost zadržala na kemijskom načinu decelularizacije, upotrebom različitih detergenata. Decelularizirano je tkivo svinjske jetre upotrebom četiri različita detergenta: natrijev lauril sulfat (engl. *sodium lauryl sulfate*, SDS), natrijev lauret sulfat (engl. *sodium laureth sulfate*, SLES), Triton-X 100 te Tween 20. Djelotvornost decelularizacije procijenjena je na temelju zaostale mase DNK, kolagena i glikozaminoglikana u decelulariziranom tkivu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inženjerstvo tkiva

Čovjekova težnja za stvaranjem novih tkiva datira tisućama godina prije nove ere i seže u Drevni Egipat, gdje se vjerovalo da se tijela obnavljaju ponovnim spajanjem dijelova tijela nakon smrti [1]. Od pukog vjerovanja do realizacije prošlo je nekoliko tisuća godina.

U početku je dominirala ideja transplantacije, započeta transplantacijom kože, no zbog nedostatka donora i postoperativnih komplikacija, najčešće odbacivanja organa od strane imunološkog sustava, počela se razvijati nova ideja nastanka tkiva u umjetnim uvjetima *in vitro*.

Upravo tada na scenu stupa tkivno inženjerstvo kao interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti na razvoj bioloških nadomjestaka koji obnavljaju, održavaju i poboljšavaju funkciju tkiva ili cijelih organa [2].

Primjeri tkivnog inženjerstva mogu se pronaći već 1933. godine, kada je Bisceglie zatvorio stanice mišjeg tumora u polimernu membranu i umetnuo ih u trbušnu šupljinu svinje. Stanice su živjele dovoljno dugo da ih imunološki sustav nije odbacio [3].

Iako su počeci tkivnog inženjerstva vezani uz uzgoj stanica kože, tkivno inženjerstvo najveći odjek u javnosti doživjelo je 1997. godine, kada je Vacanti uzgajao ljudsko uho na leđima miša [3]. Dr. Charles Vacanti uspješan je znanstvenik i suosnivač društva Tissue Engineering. Pokušaj kojim je Charles Vacanti približio tkivno inženjerstvo javnosti, nažalost, završio je imunološkim odbacivanjem uha, ali je znatno pridonio daljnjem shvaćanju i razvoju tkivnog inženjerstva.

Naime, tkivno inženjerstvo se sastoji od tri opće komponente: reparativnih stanica koje mogu formirati funkcionalnu matricu, odgovarajućih prirodnih ili umjetnih nosača za transplantaciju i potporu, te biomolekula koje će pomoći u formiranju željenog tkiva.

Stanice koje je Vacanti koristio bile su goveđi hondrociti implantirani u miša s imunodeficijencijom, dok je nosač bila poliglikolna kiselina. Vrlo brzo je došlo do odbacivanja uha, kao i nastanka strukturalnih problema pokrivenosti kožom te nedostataka kontrole rasta samog uha [3].

Upravo su takvi neuspjesi potaknuli daljnja ulaganja i istraživanja na području biomaterijala, započevši treću generaciju biomaterijala, pripravu nosača na koji će se nasađivati stanice, te kreiranje idealnih bioreaktora koji će oponašati fiziološke uvjete u organizmu.

Godine 1994. Joseph i Charles Vacanti osnovali su Tissue Engineering Society u Bostonu, a društvo je službeno osnovano u državi Massachusetts 8. siječnja 1996. Doktor Horch i Stark potaknuli su europski ogranak društva European Tissue Engineering Society (ETES) u Freiburgu, u Njemačkoj.[3] Ranije 1990-ih osnovano je društvo Pittsburgh Tissue Engineering Initiative (PTEI). U Nagoyi, Japanu, 1997. godine dr.Minora Ueda organizirala je Japanese Tissue Engineering Initiative (JTEI). [3]

Uz kontinuirano globalno širenje, u siječnju 2005. godine, Tissue Engineering Society (TES) prelazi u Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS).

Od tada se počinje više financijski ulagati u ovo područje inženjerstva, što se nastavlja i danas.

2.2. Biomaterijali

Biomaterijali se definiraju kao tvari koje se implementiraju u sustav da povećaju ili zamijene funkcionalnost tkiva ili organa [4]. Iako postoji nekoliko vrsta biomaterijala, zajedničko im je svojstvo biokompatibilnosti [5].

Biokompatibilnost se veže uz izuzetak toksičnih, alergijskih i kancerogenih reakcija u tijelu upotrebom biomaterijala. Ona može biti površinska i strukturalna. Kao što i sami nazivi nalažu, strukturalna opisuje optimalnu prilagodbu mehaničkom ponašanju tkiva, dok je površinska odgovorna za usklađenost implantata s tijelom na biološkoj, kemijskoj i fizikalnoj razini. Za optimalnu interakciju potrebna je usklađenost obje vrste biokompatibilnosti.

Biomaterijali se dijele u tri skupine ovisno o njihovoj interakciji s tijelom; inertni, aktivni i resorbirajući biomaterijali.

Prva generacija biomaterijala, odnosno inertni biomaterijali su materijali koji imaju minimalni utjecaj na okolno tkivo nakon njihove ugradnje. Danas se inertni materijali najčešće upotrebljavaju u ortopediji, protetici i stomatologiji. U tu skupinu pripadaju keramike metalnih oksida poput Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 , staklene niti ugljika ili kompoziti sa staklenim nitima ugljika,

metali ili čelici presvučeni tankim filmovima poput TiN, SiC, ZrO₂, BN, B₄C, zatim staklo-keramike ili porculanski glinenci [6].

Biokeramika može biti sintetičkog ili prirodnog podrijetla te je dizajnirana za stvaranje veza s kostima i pojavila se kao alternativa metalnim implantatima. Keramika se definira kao oksidi, nitridi, sulfidi i karbidi metala i metaloida [7].

Njihova biokompatibilnost proizlazi iz sastava, jer su građeni od istih iona koji se nalaze u tijelu te onih koji ne izazivaju toksične reakcije u organizmu.. Kao osnovna karakteristika se ističe njihovo nevezanje s okolnim tkivom. Ono što se vrlo često dogodi je stvaranje biofilma na površini biomaterijala što može dovesti do potpune izolacije ili deformacije, zbog čega može nastati sekundarno oštećenje okolnog tkiva [6].

Nikada implantat nije sačinjen od samo jednog materijala, pa je potrebno obratiti pažnju na svojstva svakog od njih. Ono što inertni biomaterijali od fizičkih svojstava moraju imati su izuzetna čvrstoća, tvrdoća te otpornost na lomljenje i krhanje s velikom sposobnošću stlačivosti i savitljivosti.

Jednostavan primjer inertnih biomaterijala, koji je pomogao velikom broju ljudi je umjetan kuk. On je sastavljen od nekoliko materijala: metalne drške ugrađene u bedrenu kost te keramičke kugle sa slojem polietilena za povezivanje kugle i zgloba [6].

U ovome primjeru opisana su tri materijala – metali, keramika i polimeri, dok se još koriste i biomaterijali iz biogenog izvora.

Metali kod kojih se kao prednost navodi visoka mehanička čvrstoća, velika otpornost na lomljenje i duktilnost, najčešće se koriste u ortopediji, ortodontiji i kardiovaskularnoj grani medicine. Nedostaci korištenja metala su niska biokompatibilnost, visoka specifična težina, nedostatak savitljivosti i pojava korozije. Najčešće korišteni metali su nehrđajući čelik, titan, nikal, platina, CoCrMo, Ti₆Al₄V te tantal.

Keramika je rado korišten materijal u istim granama medicine, a kao svoje prednosti, za razliku od metala, ispoljava u vrlo dobroj biokompatibilnosti, kemijskoj inerciji, visokoj stlačivosti i otpornosti na koroziju. Baš kao i metali, nažalost, visoke je specifične težine, niske vlačne čvrstoće, lomljiva je te komplicirana za obradu. Najčešće korištena keramika je ona na bazi aluminijske, cirkonijske, beta tri kalcijeva fosfata, pirolita [5].

Polimeri s velikom čvrstoćom, a opet niskom specifičnom težinom te lakom obradom svoju su najčešću namjenu pronašli, uz ortopediju, ortodontiju i kardiokirurgiju, i u kirurgiji mekih tkiva i plastičnoj kirurgiji. Mane ovih materijala su sklonosti razgradnji i deformaciji tijekom određenog vremena. Najčešće korišteni su polimetilmetakrilat (PMMA), polietilen izrazito visoke molekularne težine (UHMWPE), polimljična kiselina (PLA), politetrafluoretilen (PTFE), najlon, polietilen, poliuretan, celuloid, celofan, polikaprolakton (PCL), poliglikolna kiselina (PGA) [5].

Najčešće korišteni biomaterijal iz biogenog izvora je perikardij svinje i goveda. Oni su najbolje biokompatibilnosti, ali zahtijevaju posebne uvjete skladištenja. Idealna su zamjena za srčane zaliske, ponekad čak i čitavo srce [5].

Iz navedenih primjera inertnih biomaterijala, uz sve dobre karakteristike, dva su glavna nedostataka koja su potaknula daljnja istraživanja i traženje druge generacije biomaterijala, a to su nedostatak samoobnove i prilagodba fiziološkim promjenama u organizmu.

Tako na scenu stupaju materijali koji pokazuju bioaktivnost, odnosno sposobnost materijala da prilikom stupanja u kontakt s tjelesnom tekućinom, potakne specifičan biološki odgovor organizma koji će povezati biomaterijal s organizmom.

Primjer takvog materijala je bioaktivno staklo koje je danas u širokoj primjeni za izradu medicinskih implantata u periodontici te oralnoj i maksiofacijalnoj kirurgiji [6]. Kod bioaktivnog stakla dolazi do aktivacije sedam porodica gena iz stanica kostiju, koji potom sintetiziraju proteine i potiču množenje novih osteoblasta. Pritom dolazi do otapanja površinskog sloja stakla te stvaranje specifičnog sloja za koji će se nove stanice vezati i rasti.

U drugu generaciju biomaterijala spadaju i resorbirajući biomaterijali. Oni se kontrolirano otapaju u tjelesnoj tekućini dok dolazi do postupne zamjene novim tkivom. Primjeri su polimeri građeni od polimljične i poliglikolne kiseline koji se u tijelu hidrolitički razgrade na ugljikov dioksid i vodu [6].

Treća se generacija biomaterijala svodi na kombinaciju prve i druge, sa svrhom da biomaterijali pomognu tkivu da se samo obnovi. Primjeri treće generacije biomaterijala su polimeri na čijoj su površini ugrađeni proteini, peptidi i druge biomolekule koje oponašaju okolinu izvanstanične matrice i tako potiču višefunkcionalnu staničnu površinu [6].

Poticanjem staničnog rasta na molekularnoj razini oni otvaraju novo područje interesa – tkivno inženjerstvo.

2.3. Trijada tkivnog inženjerstva

Trijada tkivnog inženjerstva čine stanica, nosač, te biosignal. Njihovim optimiziranjem stvara se funkcionalno tkivo koje je u mogućnosti potpuno zamijeniti ili poboljšati funkciju oštećenog tkiva ili cijelog organa. Postupak stvaranja tkiva *in vitro* podrazumijeva izolaciju ili uzgoj stanice, potom njeno nasađivanje na nosače uz djelovanje raznih biosignala koji svojim djelovanjima učvršćuju kultivaciju stanica i konačni razvoj tkiva.

2.3.1. Stanica

Stanice su temelj stukture, funkcionalnosti i reprodukcije svih živih bića, te predstavljaju ishodište postojanja tkiva. Stanice korištene u tkivnom inženjerstvu moraju ispunjavati brojne kriterije kako bi bile prikladne za stvaranje tkiva izvan živog organizma. Moraju postojati u dovoljnoj količini, imati sposobnost diferenciranja u željeni fenotip, prilagoditi se nosačima, strukturalno i mehanički odgovarati nativnim stanicama te se dobro integrirati u organizam bez imunološkog odbacivanja [8]. Iako su u klasičnom shvaćanju tkivnog inženjerstva korištene stanice onog tkiva kojeg se želi stvoriti, danas se sve češće koriste u tkivnom inženjerstvu matične stanice [8]. Do toga dolazi, jer su upravo matične stanice nediferencirane i nespecijalizirane stanice koje su sposobne diferencirati se u različite tipove stanica [9].

2.3.2. Nosači

Nosači, drugi dio trijade, trebali bi oponašati funkciju izvanstanične matrice. Oni reguliraju prianjanje, pokretljivost, umnažanje i diferencijaciju stanica. Nosač predstavlja predložak za stvaranje tkiva nakon što se na njega nasade prethodno izolirane stanice.

Baš kao što stanice, tako i nosači korišteni u tkivnom inženjerstvu moraju ispunjavati veći broj kriterija [10]. Prije svega moraju biti biokompatibilni, što znači da stanice trebaju prianjati na materijal, slobodno se kretati po površini i kroz nosač, te proliferirati prije taloženja nove izvanstanične matrice.

Nakon ugradnje u organizam, nosač ne smije izazvati imunološku reakciju. Dapače, jedan od ciljeva tkivnog inženjerstva je omogućiti stanicama pacijenta da stvaranjem vlastite izvanstanične matrice zamijene ugrađeni nosač tokom nekog izvjesnog vremena.

Biorazgradivost i nepostojanje toksičnih nusprodukata također su ključni kriteriji. Mehanička svojstva nosača moraju odgovarati anatomskom položaju ugradnje, a visoka poroznost s dobrom međusobnom povezanošću pora je nužna za migraciju stanica i vaskularizaciju kroz cijeli volumen nosača. Raspon veličina pora razlikuje se od tkiva do tkiva [11].

2.3.3. Biosignali

Stanice zahtijevaju posebne signale za preživljavanje nakon nanošenja na nosač. Svako tkivo zahtijeva različitu kombinaciju signala, uključujući razinu kisika, mehaničku stimulaciju, faktore rasta, molekule izvanstanične matrice i druge manje molekule [11]. U proizvodnji kompleksnijih tkiva, uz biosignale se koriste i bioreaktori za poboljšanje transporta tvari.

Kretanje otopljenih tvari unutar tkiva u statičnim uvjetima ovisi o gradijentu koncentracije i mehanizmu difuzije, tako da se veće molekule kreću sporije preko gradijenta od manjih molekula [12].

Zbog prijenosa tvari mehanizmom difuzije dolazi do nedostatka hranjivih tvari koji održavaju konstrukciju tkiva ili dolazi do nakupljana endogenih otpadnih proizvoda.

Dinamički bioreaktori, koji omogućuju konvektivno miješanje, poboljšavaju prijenos tvari, distribuciju stanica i homogenost unutar tkiva [12]. Bioreaktori postižu dinamično stanje miješanjem, kao što je tikvica za centrifugiranje, te ubrzavaju proces prijenosa tvari. Zbog mehaničke stimulacije omogućuju bolji i brži prijenos tvari, poboljšavaju i distribuciju stanica unutar tkiva i homogenost zbog konvektivnog strujanja (protočna perfuzija) [13].

Osim tikvica s centrifugom i protočne perfuzije, koriste se i bioreaktori s rotirajućom stijenkom, kompresijom, te naprezanjem.

Bioreaktori se mogu koristiti u tkivnom inženjerstvu za prevladavanje problema povezanih s tradicionalnim statičnim uvjetima kulture, poboljšanje stanične distribucije i ubrzanje sazrijevanja konstrukta tkiva [13].

Za potrebe inženjerstva tkiva, bioreaktori se koriste na tri načina: da omoguće, *in vitro*, oponašanje stanja u kojem stanice postoje *in vivo* kako bi se razumjela normalna stanična i molekularna fiziologija [12]. Izvan potreba tkivnog inženjerstva, bioreaktori imaju važnu

ulogu i kod genskih i staničnih terapija, te oponašanja patološkog stanja za bolje razumijevanje patofiziologije.

Uloga bioreaktora je standardizacija, kontrola i automatizacija uvjeta kulture za postizanje ponovljivih rezultata [14].

2.4. Tehnike konstruiranja nosača

Najčešće pristup konstrukcije nosača temelji se na proizvodnji poroznog nosača. Korištene sirovine mogu biti prirodne ili sintetičke, a postupci različiti. Pristup je često upotrebljavan zbog svoje pristupačnosti i mogućnosti korištenja raznih materijala te dizajniranja nosača s kontrolom fizikalno-kemijskih svojstava.

Drugi pristup uključuje korištenje hidrogelova, prirodnog ili sintetičkog podrijetla, koji se koriste kao materijali za nosače, a pogodni su za inkapsuliranje stanica s obzirom na njihovu biokompatibilnost [11].

Treći pristup temelji se na korištenju slojeva stanica u tehnici poznatoj kao inženjerstvo staničnih listova.

Četvrti pristup uključuje decelularizaciju tkiva i dobivanje izvanstanične matrice iz alogenih ili ksenogenih tkiva.

2.5. Decelularizacija i izvanstanična matrica

Decelularizacija je proces kojim se izolira izvastanična matrica uklanjajući stanice i stanični sadržaj s njihovih veznih molekula (integrina) i drugih izvanstaničnih ligandnih kompleksa s ciljem očuvanja sastava, mikrostrukture i mehaničkih svojstava te prirodno prisutnih polisaharida i proteina u okolini [15]. Glavni predmet interesa decelularizacije je izvanstanična matrica koja se definira kao heterogena, bezstanična tekuća, polutekuća, ili kruta vlaknasta mreža sastavljena od polisaharida i proteina.

Porast je interesa upotrebe ECM-a kao nosača u području tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine jer zadržava isključivo prirodne biokemijske karakteristike i ultrastrukturalnu konstrukciju [16]. Stanicama pruža zaštitu, osigurava strukturu te služi za organizaciju stanica. Kao takva, idealni je medij za remodeliranje tkiva i djeluje kao predložak za rekonstrukciju tkiva i organa [15].

Potrebno je poznavati sam sastav ECM-a, da bi se moglo pristupiti mehaničkim i kemijskim postupcima decelularizacije. Naime, njegove komponente se strukturni, fibrozni i vezni glikoproteini i proteoglikani koji čine trodimenzionalnu strukturu. Izvanstanična matrica se sastoji od staničnih materijala prikazanih na slici 1.

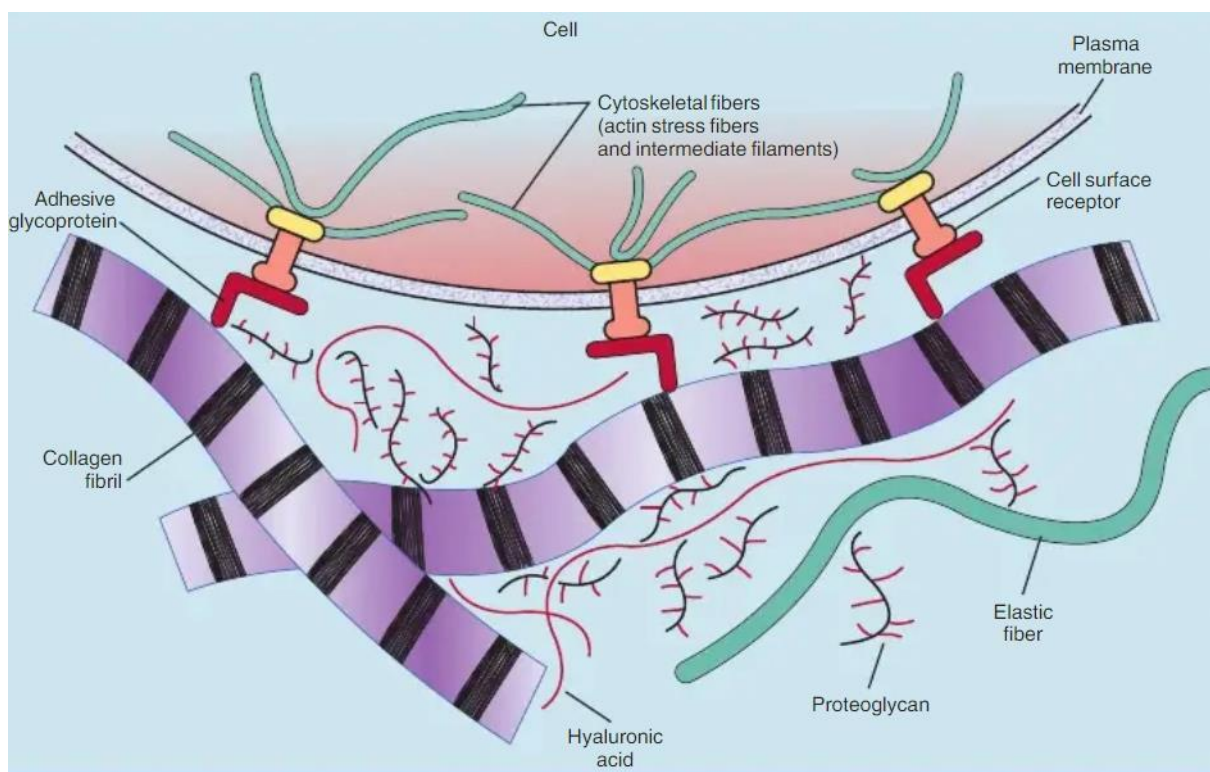
Najzastupljeniji heteropolisaharidi u ljudskom tijelu, ali i ECM-u su glikozaminglikani (GAG). Oni predstavljaju linearne anionske polisaharide sastavljene od jedinica disaharida amino šećera N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin i uronske kiseline. Nalaze se na samoj površini gdje su odgovorni za mehaničku čvrstoću i komunikaciju među stanicama te između stanica i ECM-a. Utječu na staničnu proliferaciju, migraciju, regeneraciju i remodeliranje tkiva. Od proteina najzastupljeniji je kolagen, odgovoran za strukturalnu održivost, izdržljivost ECM-a i regulaciju staničnih reakcija.

Antigeni epitopi su združeni sa staničnim membranama i unutarstaničnim komponentama, te su najčešće odgovorni za imunološki odgovor. Ostale komponente ECM-a su generalno vrlo dobro prihvaćene. Materijal za nosač potrebno je prethodno obraditi, bilo da je to sam ECM ili da potiče od ECM-a.

Predobrada označava upravo decelularizaciju, koja započinje razaranjem stanične membrane otapajući uzorak tkiva u ionskoj otopini kako bi se nastavilo razaranje unutarstaničnih komponenata izlaganjem detergentima. Ovi se procesi mogu kombinirati s fizikalnim, kemijskim ili enzimatskim postupcima, kako bi se uklonilo što više staničnog materijala.

Fizikalni postupci obuhvaćaju sonikaciju, odmrzavanje i zamrzavanje, struganje ili miješanje. Kemijski postupci podrazumijevaju izlaganje lužinama ili kiselinama, kao i postupak sterilizacije. Enzimatska obrada provodi se upotrebom enzima tripsina i nukleaze.

U konačnici, uvjeti koje decelularizacija mora zadovoljiti su: odsustvo staničnih jezgara, ukupna količina dvolančane DNK mora biti manja od 50 ng mg^{-1} suhog tkiva, a ostaci DNK u ECM-u moraju biti kraći od 200 parova baza [16].



Slika 1. Komponente ECM-a (preuzeto iz literaturnog izvora [17])

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i instrumenti

Za potrebe eksperimentalnog istraživanja korištena je svinjska jetra lokalnog dobavljača, kupljena u mesnici.

Proces decelularizacije se provodio korištenjem detergenata:

- natrijev lauril sulfat; SDS (Biosynth, Slovačka)
- natrijev lauret sulfat; SLES (Biosynth, Slovačka)
- Triton-X 100 (Biochem Chemopharma, Francuska)
- Tween 20 (VWR Chemicals, SAD)

Pripremljene su otopine detergenata masenog udjela 1 %.

Dodatne otopine i materijali koji su se koristili su:

- destilirana voda
- PBS (otopina fosfatnog pufera, engl. *phosphate-buffered saline*); mješavina soli natrijeva klorida (Lach-Ner, Češka), kalijeva dihidrogenfosfata (Gram-mol d.o.o., Hrvatska), te kalijeva klorida (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- 96 %-tna otopina etanola (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- fiziološka otopina (0,9 %-tna otopina NaCl), (Lach-Ner, Češka)

Instrumenti korišteni u istraživanju:

- magnetska miješalica C-MAG HS 7 digital (IKA, Staufen, Njemačka)
- tehnička vaga (PB602-S, Mettler Toledo)
- svjetlosni mikroskop BA 200 (Motic, Kina)

Ostali laboratorijski pribor: špatula, laboratorijske čaše, parafilm, trbušasti magnetič, cjedilo

3.1.1. Natrijev lauril sulfat

Natrijev lauril sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) je organosulfatni spoj koji se sastoji od C₁₂ lanca kao rep spojen na sulfatnu skupinu, time imajući i glavu i rep kao amfifilna svojstva potrebna za detergent. SDS je jedan od najkorištenijih ionskih detergenata, te njegova osnovna

svojstva prikazana su u tablici 1. U usporedbi s drugim detergentima, SDS potpunije uklanja nuklearne ostatke i citoplazmatske proteine, kao što je vimentin. [18]

Tablica 1. Svojstva SDS-a

Proizvođač	Biosynth, Slovačka
Molekulska formula	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{S}$
Molekulska masa, g/mol	288,4
Izgled	Kristalan, bijel
Fizičko stanje	Čvrsto
Topljivost	Topljiv u vodi, a djelomično u etanolu
Talište	204 – 207 °C
pH	6 – 9
CAS broj	151-21-3

3.1.2. Natrijev lauret sulfat

Anionski surfaktanti čine 60 % svjetske proizvodnje surfaktanta, a natrijev lauret sulfat (engl. *sodium lauryl ether sulphate*, SLES) je jedan od najkorištenijih. [19] U domaćinstvu se koristi u manjim koncentracijama od 0,4 do 12 mg L⁻¹, dok se u industrijskim postrojenjima SLES nalazi u mnogo većim koncentracijama. Ima široki raspon uporabe zbog velike otpornosti na tvrdu vodu, dobre je topljivosti te visoke razine biorazgradivosti. Svojstva SLES-a navedena su u tablici 2.

Tablica 2. Svojstva SLES-a

Proizvođač	Biosynth, Slovačka
Molekulska formula	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{Na}$
Molekulska masa, g/mol	420
Izgled	Bijela do žućkasta viskozna pasta
Fizičko stanje	Tekuće
Topljivost	Voda
Talište	204 – 207 °C
pH	6,5 – 9,5
CAS broj	9004-82-4

3.1.3. Triton-X 100

Oktoksinol 9 (engl. *octoxynol*) je neionski surfaktant s nenabijenom hidrofilnom grupom. Njegov je sinonim Triton-X 100. Koristi se kao sredstvo protiv pjenjenja, kao emulgator i za poboljšanje topljivosti formulacije pesticida u vodi [20]. Tablica 3. prikazuje osnovna svojstva detergenta.

Tablica 3. Svojstva Triton-X 100

Proizvođač	Biochem Chemopharma, Francuska
Molekulska formula	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$
Molekulska masa, g/mol	250,38
Izgled	Svijetlo žuta viskozna tekućina
Fizičko stanje	Tekuće
Topljivost	Voda
Talište	6 °C
pH	5 – 8
CAS broj	2315-67-5

3.1.4. Tween 20

Polioksietilen sorbitan monolaurat (engl. *polyoxyethylene sorbitan monolaurate*), odnosno Tween 20, je neionski surfaktant koji ima široku upotrebu kao emulgator i stabilizator u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. [21]

Tween 20 je bistra, bez mirisa, lako tečiva pri sobnoj temperaturi, ostala svojstva su prikazana u tablici 4. Niska toksičnost i prihvatljivi stupanj biorazgradivosti su odgovorni za često korištenje.

Tablica 4. Svojstva Tween 20

Proizvođač	VWR Chemicals, SAD
Molekulska formula	$C_{58}H_{114}O_{26}$
Molekulska masa, g/mol	1225
Izgled	Svijetlo žuta viskozna tekućina
Fizičko stanje	Tekuće
Topljivost	Voda

Talište	6 °C
pH	6 – 8
CAS broj	9005-64-5

3.2. Decelularizacija

Korišteno tkivo za decelularizaciju je svinjska jetra. Koristili su se samo određeni dijelovi svinjske jetre, odnosno izbjegavala su se područja izražene žilavosti i punokrvnosti. Dio koji je ostao se izrezao na tanke listiće debljine 1 mm, oblika kvadrata. Dio koji se ne koristi za decelularizaciju služi kao referentni uzorak koji će pokazati o uspjehu eksperimenta.

Uzorci su potom stavljeni u veliku laboratorijsku čašu od 2 litre i miješani u fiziološkoj otopini na mehaničkoj miješalici kako bi se veći dio uzorka isprao. Potom su stavljeni u destiliranu vodu te miješani pomoću magnetske miješalice na 250 o/min preko noći.

Sljedeći dan se u laboratorijsku čašu stavi 1,6 L destilirane vode, duguljasti magnetič i prethodno izračunata masa detergenta koja iznosi 16 grama. Sadržaj laboratorijske čaše se stavlja na miješanje 30 minuta na magnetskoj miješalici na 250 do 300 o/min (slika 2). Uzorak je zaštićen od mogućih vanjskih onečišćenja parafilmom koji je pričvršćen na laboratorijsku čašu.

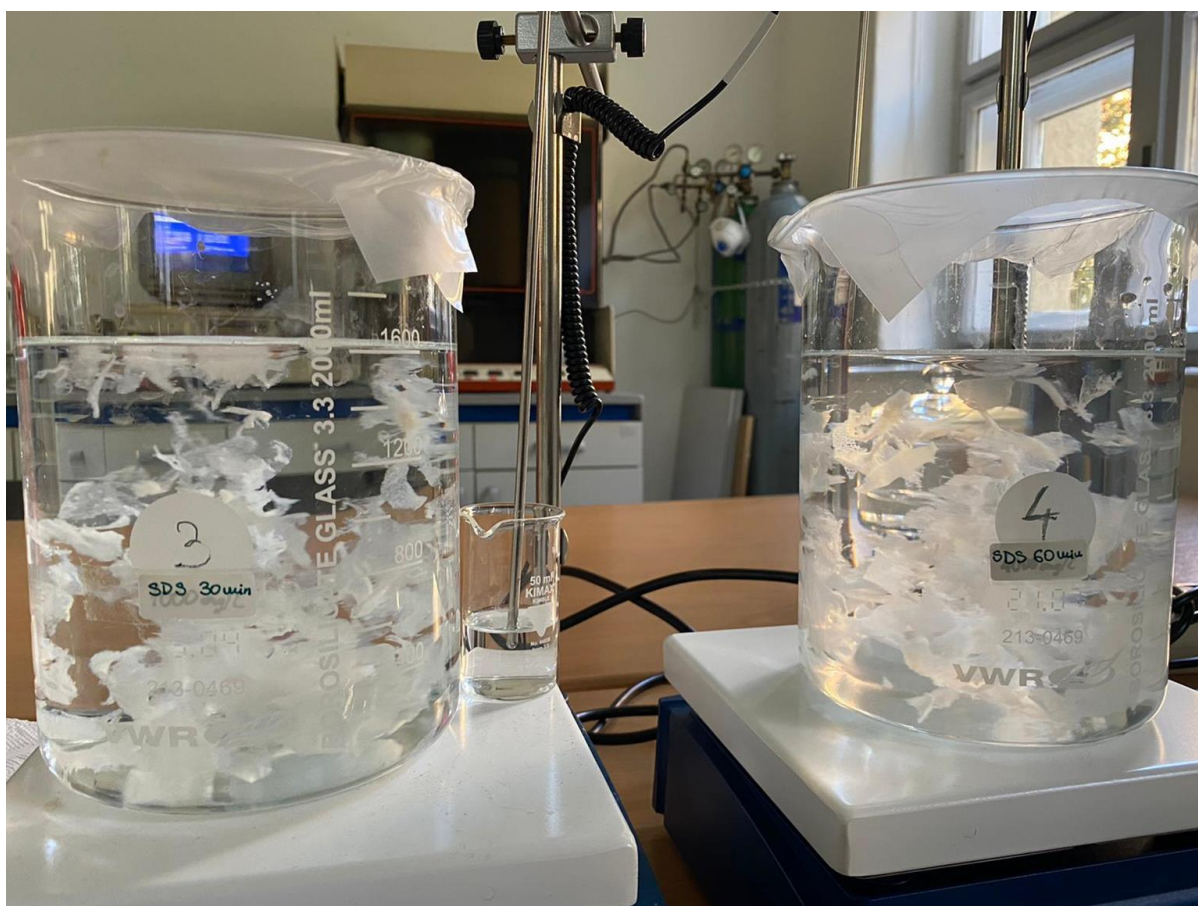
Nakon 30 minuta provodi se promjena medija. Uzorci se prvo ispiru s destiliranom vodom, a zatim se dodaje nova otopina detergenta i uzorak se ponovo miješa. Promjena medija se provodi sve dok komadići jetre ne postanu bijeli, odnosno sve dok uzorak ne bude u potpunosti decelulariziran. Pritom je vrlo važno obratiti pozornost predugom izlaganju uzorka detergentu, jer može doći do razaranja strukture uzorka tkiva jetre. Također se mora pripaziti na jačinu miješanja na magnetskoj miješalici. Ako se preintenzivno miješa dolazi do neželjenog zapetljaja komadića što bi onemogućilo difuziju detergenta u dijelove tkiva, te bi se time smanjila djelotvornost decelularizacije. Isto tako, premali intenzitet miješanja smanjuje djelotvornost decelularizacije jer je potrebno dulje vrijeme kontakta detergenta i tkiva što bi s vremenom jako oštetilo uzorak.

Nakon opisanog postupka uzorak se ostavlja u destiliranoj vodi 16 sati. Potom se komadi jetre stavljaju u 96 %-tnu otopinu etanola kako bi se uzorak očistio od svih suvišnih tvari organskog podrijetla. Konačno se komadi jetre ponovo ostavljaju u destiliranoj vodi 16 sati.

Zatim se priprema otopina koja se sastoji od 10 mililitara fosfatnog pufera (PBS) i 90 mililitara destilirane vode. U tako pripremljenoj otopini komadići jetre se ispiru 1 sat, a zatim se ponovo ostavljaju u destiliranoj vodi preko noći.

Uzorci se zatim cijede i liofiliziraju kako bi se sačuvali za daljnja istraživanja.

Isti postupak je proveden kod preostala tri detergenta.



Slika 2. Prikaz miješanja uzoraka tijekom postupka decelularizacije svinjske jetre s SDS-om

3.3. Metode karakterizacije

Postoji niz dostupnih metoda za utvrđivanje uspješnosti uklanjanja staničnog materijala iz tkiva. Određena je prisutnost DNK, GAG-a, te kolagena u uzorcima. Ispitivanja su provedena na Sveučilištu u Zagrebu Prirodoslovnomatematičkom fakultetu na Odjelu za molekularnu

biologiju. Prije kvantifikacije DNK, prema uputama proizvođača provedena je izolacija DNK s priborom Monarch Genomic DNA Purification Kit (BioLabs, Engleska). Za samu kvantifikaciju DNK korištena je oprema QuantiFluor dsDNA Sample Kit (Promega, SAD) prema propisanim uputama. Kvantifikacija GAG-a provedena je priborom Total Glycosaminoglycans Assay Kit (Abcam, UK) prema uputama proizvođača. Prisutnost kolagena određena je priborom Total Collagen Assay Kit (Abcam, UK) slijedeći upute proizvođača. Struktura uzoraka karakterizirana je svjetlosnim mikroskopom BA 200 (Motic, Kina), te stereomikroskopom SZX 16 (Olympus, Japan).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sadržaj DNK

Sadržaj DNK pokazatelj je prisutnosti rezidualnih stanica u decelulariziranom tkivu. Kako bi tkivo kasnije bilo dobro prihvaćeno u organizmu, prethodi mu što bolje provedena decelularizacija, odnosno što manje već spomenutog zaostalog sadržaja DNK u decelulariziranom tkivu.

Tablica 5. Vrijednosti DNK u decelulariziranom tkivu za uzorke SDS, SLES, Triton-X 100 i Tween 20

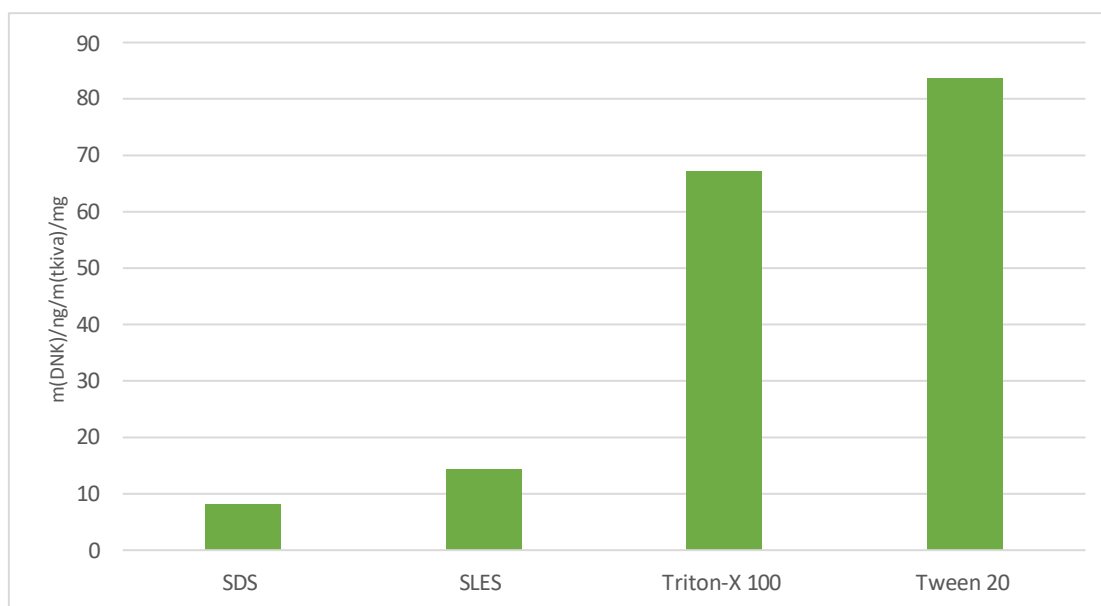
IME UZORKA	DNK
	$m(\text{DNK})/m(\text{tkiva}), \text{ng/mg}$
SDS	$8,194 \pm 0,001$
SLES	$14,423 \pm 0,013$
Triton-X 100	$67,105 \pm 0,016$
Tween 20	$83,620 \pm 0,074$

Dvije glavne komponente sposobne inducirati imunogeni odgovor uključuje rezidualne genetske materijale kao što je DNK. Prema tome, preporučeno je da decelularizirana ECM sadrži manje od 50 ng DNK po mg tkiva da ne izaziva značajnu upalnu reakciju. [22]

Prema dobivenim vrijednostima sadržaja DNK u decelulariziranom tkivu (tablica 5), najmanji udio zaostalog DNK u tkivu dobiven je u uzorku SDS (8,194 ng/mg).

Prihvatljiv sadržaj DNK dobiven je i kod uzorka SLES (14,423 ng/mg), dok kod uzoraka Triton-X 100 i Tween 20 nije dobiven zadovoljavajući sadržaj DNK (< 50 ng/mg) (slika 3). Ovi su se detergentski pokazali manje uspješnima u otklanjanju DNK. Do navedenog je moglo doći zbog toga što neionski detergentski kao što je Triton-X 100 i Tween 20 ometaju DNK-lipid, lipid-lipid, lipid-protein veze ne ometajući njihove strukture. Naprotiv ionski detergentski otapaju stanične i nukleinske membrane. [23]

U usporedbi s drugim detergentskim, SDS ima veću učinkovitost u uklanjanju staničnih ostataka kao što su nuklearni i citoplazmatski spojevi iz gustog i debelog tkiva. [24]



Slika 3. Grafički prikaz mase DNK po miligramu tkiva za različite uzorke

4.2. Sadržaj kolagena

Jedan od najvažnijih aspekata regeneracije tkiva ili organa putem tehnika decelularizacije je održavanje mehaničkog integriteta i karakteristika prirodnog tkiva kako bi se osigurala njeno ispravna funkcionalnost. [22]

ECM se prvenstveno sastoji od kolagena te predstavlja integritet ECM-a, njegova redukcija ukazuje na oštećenje ECM-a.

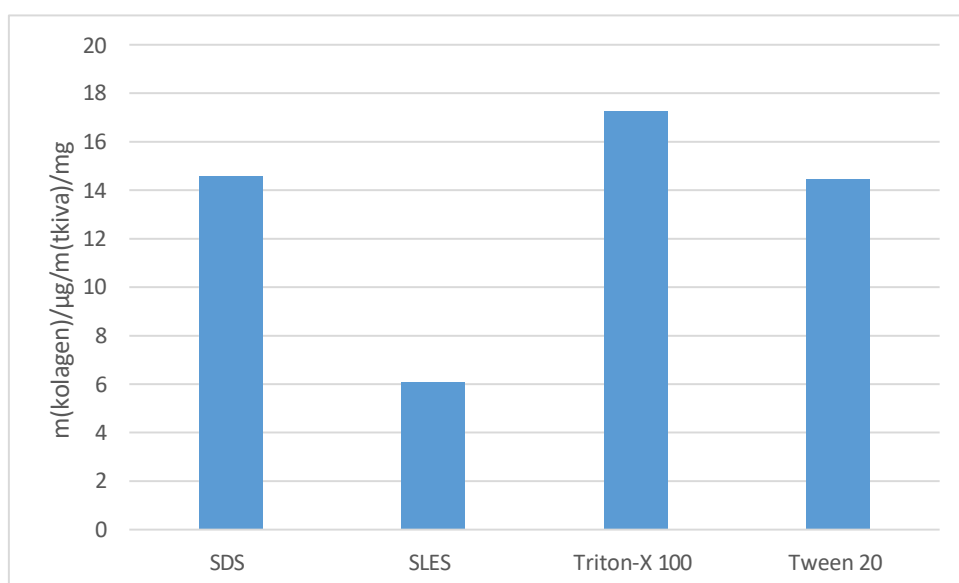
Prema dobivenim vrijednostima mase kolagena prisutne u decelulariziranom tkivu (tablica 6), najpovoljniji detergent je Triton-X 100 koji je rezultirao najboljim očuvanjem kolagena u uzorku tkiva ($17,254 \pm 0,000 \mu\text{g}/\text{mg}$).

Neionski detergentsi ometaju interakcije lipid-lipid i lipid-protein, ali ostavljaju interakcije protein-protein netaknute. [17]

Najveće oštećenje ECM-a, odnosno najmanju vrijednost kolagena ima uzorak tkiva tretiran SLES-om ($6,066 \pm 0,012 \mu\text{g}/\text{mg}$). Grafički prikaz mase kolagena po miligramu tkiva za različite uzorke vidi se na slici 4.

Tablica 6. Vrijednosti kolagena u decelulariziranom tkivu za uzorke SDS, SLES, Triton-X 100, Tween 20

IME UZORKA	KOLAGEN
	$m(\text{kolagen})/m(\text{tkiva}),$ $\mu\text{g}/\text{mg}$
SDS	$14,587 \pm 0,018$
SLES	$6,066 \pm 0,012$
Triton-X 100	$17,254 \pm 0,000$
Tween 20	$14,450 \pm 0,026$



Slika 4. Grafički prikaz mase kolagena po miligramu tkiva za različite uzorke

4.3. Sadržaj GAG-a

Uz kolagen, sadržaj GAG-a ukazuje na promjenu u strukturnom sastavu decelulariziranog tkiva. GAG je komponenta ECM-a odgovorna za zadržavanje vode u tkivu. Nedostatak ili izrazito male vrijednosti GAG-a ukazuje na oštećenu izvanstaničnu matricu.

Uzorak tkiva tretiran Tween-om 20 jedini ukazuje na prisutnost GAG-a ($0,489 \pm 0,130 \mu\text{g}/\text{mg}$) (tablica 7). Obrada ostalim detergentima (SDS, SLES, Triton-X 100) rezultirala je GAG-om ispod granice detekcije.

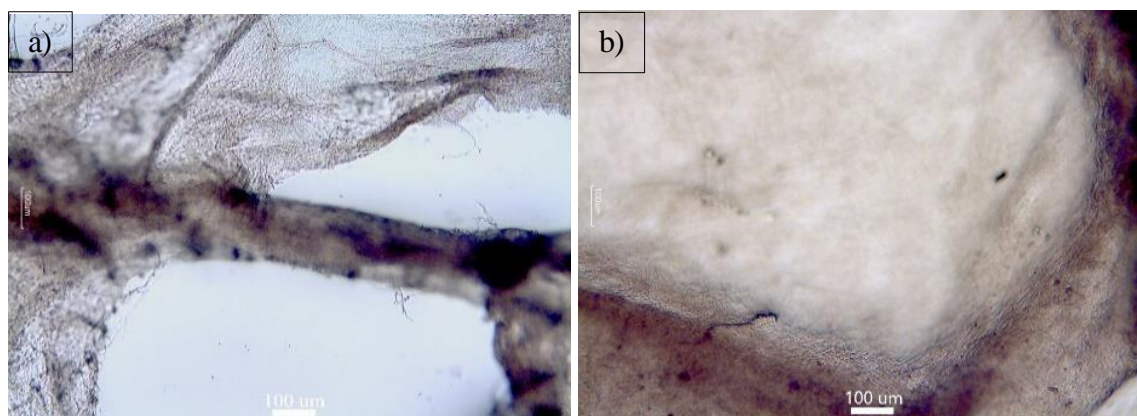
Tablica 7. Vrijednosti GAG-a u decelulariziranom tkivu za uzorke SDS, SLES, Triton-X 100, Tween 20

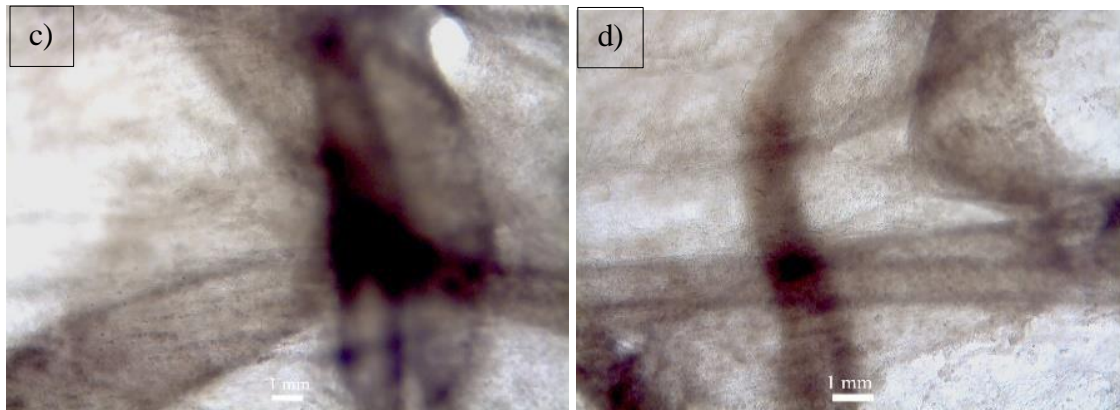
IME UZORKA	GAG
	$m(\text{GAG})/m(\text{tkiva}), \mu\text{g}/\text{mg}$
SDS	0
SLES	0
Triton-X 100	0
Tween 20	$0,489 \pm 0,130$

4.4. Struktura decelulariziranog tkiva

Za dodatnu procjenu učinkovitosti provedene decelularizacije koristi se svjetlosni mikroskop. Mikrografije vizualno mogu ukazati na pravilno dobivenu boju tkiva, te na stanje decelulariziranog tkiva.

Svjetlosnim mikroskopom dobivene su mikrografije tkiva prikazane na slici 5.





Slika 5. Mikrografije uzoraka tkiva a) SDS, b) SLES, c) Triton-X 100 i d) Tween 20

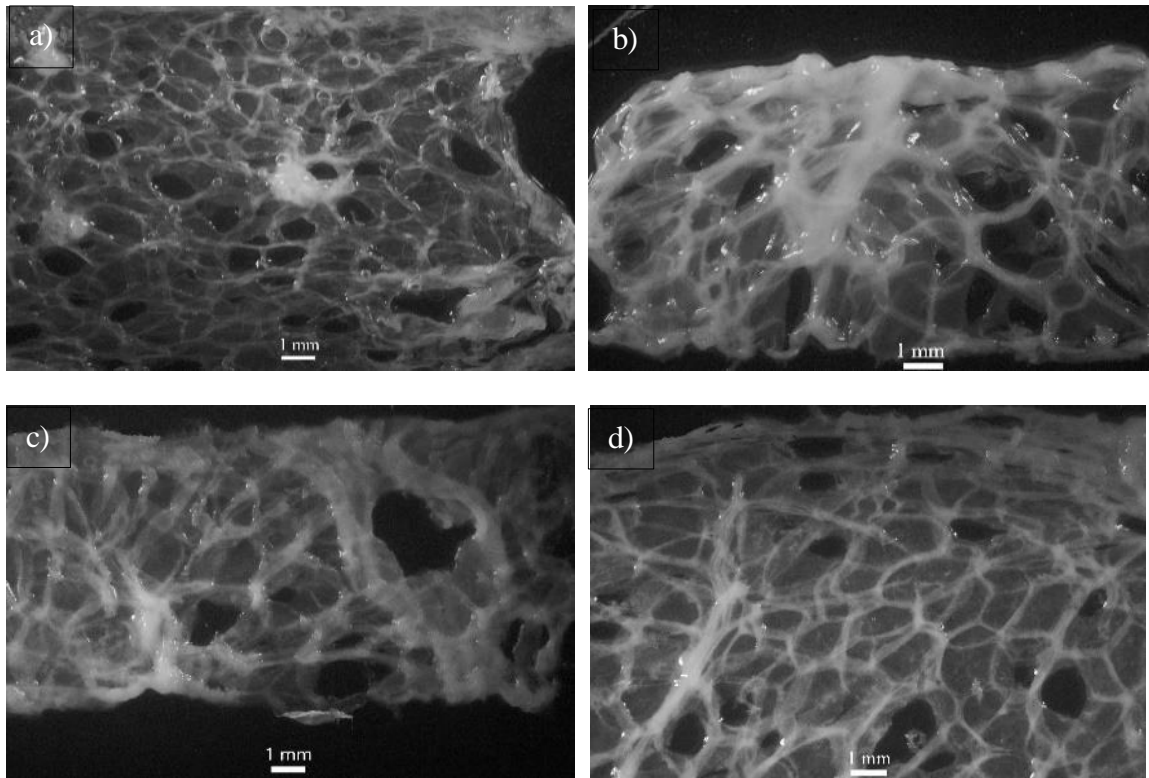
Mikrografije su pokazale najveće oštećenje tkiva za uzorak tretiran SDS-om (slika 5a). Stanje tkiva podudara se sa vrijednostima GAG-a ispod razine detekcije. GAG je važna komponenta za strukturu izvanstanične matrice, njegov jako mali sadržaj ukazuje na neodrživost njegove funkcionalnosti nakon decelularizacije.

Međutim, niske vrijednosti GAG-a dobivene su i kod uzoraka tretiranih detergentima SLES, te Triton-X 100.

SDS otapa i vanjsku i nuklearnu membranu, ali također teži uklanjanju proteina i može promijeniti izvornu strukturu matrice [25]. Od ionskih detergenta, SDS je agresivniji od SLES-a, time i ima jači destruktivni utjecaj na strukturu tkiva. Jako oštećenje strukture tkiva kod decelularizacije SDS-om može se smanjiti kraćim periodom decelularizacije.

Triton-X 100 je neionski detergent i usmjeren je na interakcije lipid-lipid i lipid-protein, ali interakciju protein-protein ostavlja netaknutom [25].

Neionski detergentsi učinkoviti su u uklanjanju stanica iz tankih tkiva i uzrokuju manje poremećaje ultrastrukture i manje uklanjanja glikozaminoglikana u usporedbi s ionskim detergentima. Ionski detergentsi učinkoviti su u uklanjanju nuklearnih ostataka i citoplazmatskih proteina iz gustih tkiva, ali također uklanjaju čimbenike rasta i GAG-ove te se pokazalo da oštećuju kolagen [25].



Slika 7. Mikrografije uzoraka tkiva a) SDS, b) SLES, c) Triton-X 100 i d) Tween 20

Slika 7. prikazuje mikrografije tkiva na kojima se može vidjeti poželjna bijela boja decelulariziranog tkiva, te mrežu kolagenih vlakana s poroznom strukturom.

Ovakvo ponašanje izvanstanične matrice u skladu je sa kvantificiranim vrijednostima kolagena i GAG-a, oboje važnih za strukturu i funkcionalnost ECM-a.

Najveća vrijednost kolagena detektirana je u uzorku tkiva tretiranim Triton-X 100 detergentom, te ona iznosi $17,254 \pm 0,000 \mu\text{g}/\text{mg}$. Dok je najmanja vrijednost kolagena po mg tkiva detektirana u uzorku tretiranom SLES-om ($6,066 \pm 0,012 \mu\text{g}/\text{mg}$). Sadržaji kolagena potvrđuju prethodna istraživanja da decelularizacija upotrebom neionskih detergenata kao što je Triton X-100 smatra se manje oštom za tkivo od ionskih detergenata i stoga je korisna za decelularizaciju gdje je važno očuvanje ECM proteoma [26].

Na slici 7. vidljiva su puknuća tkiva i znatna oštećenja izvanstanične matrice kod svih uzoraka (SDS, SLES, Triton-X 100 i Tween 20).

Navedeni defekt u strukturi mogao je izazvati nepravilna mehanička ophodnja s uzorkom tkiva prilikom decelularizacije. Uslijed slabijeg miješanja uzorka potreban je duži period miješanja da bi se osigurala potpuna decelularizacija tkiva. Za ionske detergente koji oštećuju strukturu ECM-a u većim razmjerima, duže miješanje uzorkuje i veća oštećenja.

Kada bi se decelularizacija radila pri većim brzinama vrtnje, može doći do zapetljaja tkiva i tako stvoriti deblje dijelove uzorka gdje decelularizacija nebi bila učinkovita, odnosno teže bi detergent prodirao u sve žile tkiva i bili bi neželjeni zaostaci nukleusa.

5. ZAKLJUČAK

Uzorci svinjske jetre podvrgnuti su postupku decelularizacije 1%-tnim detergentima SDS, SLES, Triton-X 100, te Tween 20 nakon čega su rezultati pobliže proučavani.

Decelularizacija s obzirom na masu DNK po miligramu uzorka tkiva uspješna je kod uzoraka tretiranih detergentima SDS i SLES jer decelularizirana izvanstanična matrica sadrži manje od 50 ng DNK po mg tkiva. Ostali detergenti, Triton-X 100 i Tween 20, nisu zadovoljili spomenuti uvjet uspješne decelularizacije.

S obzirom na masu kolagena po miligramu tkiva najuspješniji detergent u decelularizaciji pokazao se Triton-X 100. Najneuspješniji, odnosno detergent koji je dao najmanje vrijednosti kolagena s time i najoštećeniju strukturu tkiva je SLES. Detergenti Tween 20 i SDS podjednako su očuvali strukturalni element ECMa.

Tween 20 jedini je očuvao, iako malenu, koncentraciju GAGa, dok ostali u vrijednostima premalim za detekciju.

Mikrografije svih tretiranih uzoraka pokazuju velika oštećenja strukture ECMa što se podudara sa kvantificiranim vrijednostima.

Unatoč tome što je SDS bio prvi izbor zbog učinkovitog uklanjanja DNK i smanjenja mogućnosti upalne reakcije, na temelju rezultata strukturnih elemenata zaključujemo da ne postoji idealan detergent za proces decelularizacije jer ne omogućava formiranje optimalnog nosača za nasađivanje stanica.

U kontekstu procesa decelularizacije, idealni detergent bio bi onaj koji može učinkovito ukloniti stanične komponente poput DNK-a, dok istovremeno minimalno oštećuje strukturalne elemente izvanstanične matrice, kao što su kolagen i glikozaminoglikani (GAG-ovi), osiguravajući tako formiranje čvrstog i biokompatibilnog nosača za nasađivanje stanica.

6. LITERATURA

- [1] D. K. Finch, M. A. Sleeman, J. Moisan, F. Ferraro, S. Botterell, J. Campbell, D. Cochrane, S. Cruwys, E. England, S. Lane, E. Rendall, M. Sinha, C. Walker, G. Rees, M. A. Bowen, A. Schneider, M. Liang, R. Faggioni, M. Fung, P. R. Mallinder, T. Wilkinson, R. Kolbeck, T. Vaughan, D. C. Lowe, Whole-Molecule Antibody Engineering: Generation of a High-Affinity Anti-IL-6 Antibody with Extended Pharmacokinetics, *J. Mol. Biol.* 411 (2011) 791-807.
- [2] R. Langer, *Tissue Engineering, Mol. Ther.* 1 (2000) 12-15.
- [3] E. Krstulović, *Tkivno inženjerstvo, završni rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2022.*
- [4] J. Gašparinčić, *Metali, polimeri i kompoziti kao biomaterijali, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje, 2007.*
- [5] S. Todros, M. Todesco, A. Bagnò, *Biomaterials and their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration, Processes, 1949 (2021) 9-11.*
- [6] A. Moguš – Milanković, *Tri generacije biomaterijala, Kem. Ind* 54 (2005) 131-134.
- [7] S. Punj, J. Singh, K. Singh, *Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future perspectives. Vol. 47., Ceram. Int. (2021), 28059-28074.*
- [8] N. Ashammakhi, R. L. Reis, *Topics in Tissue Engineering, Vol. 2., Expertissues, 2006, poglavlje 11.*
- [9] D. Ivanković, *Inducirane pluripotentne matične stanice, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2015.*
- [10] F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Mater. Today* 14 (2011) 88–90.
- [11] M. Ivanković, L. Bauer, A. Ressler, A. Rogina, M. Antunović, H. Ivanković, *Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva, Kem. Ind.* 68 (9-10) (2019) 457–468.
- [12] C. Selden, B. Fuller, *Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design, Bioengineering (2018) 5(2), 32.*
- [13] S. Partap, N. A. Plunkett, J. F. O'Brien, *Bioreactors in Tissue Engineering, Acta. Biotechnol* 19 (2011) 55-69.

- [14] H. Anwarul, M. Rami, *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, Vol. 2, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2017, 1-34.
- [15] F. Ivančić, *Istraživanje biokompatibilnosti izvanstaničnog matriksa jetre i elektroispredanih nosača od poli-ε-kaprolaktona*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2019.
- [16] A. Hassanpour, T. Talaei – Khozani, E. Kargar – Abarghouei, V. Razban, Z. Vojdani, Decellularized human ovarian scaffold based on a sodium lauryl ester sulfate (SLES)-treated protocol, as a natural three-dimensional scaffold for construction of bioengineered ovaries, *Stem Cell Res. Ther.* 252 (2018) 2-4.
- [17] G. Meisenberg, W. H. Simmons, *Principles of Medical Biochemistry*, Vol.4, Elsevier, 2016, 212-229.
- [18] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27 (2006) 3675–3683.
- [19] A. M. S. Paulo, R. Aydin, M. R. Dimitrov, H. Vreeling, A. J. Cavaleiro, P. A. Garcia-Encina, A. J. M. Stams, C. M. Plugge, Sodium lauryl ether sulfate (SLES) degradation by nitrate-reducing bacteria, *Environ. Biotechnol. L* (2017) 101, 5163–5173.
- [20] D. Norton, S. A. Shamsi, Capillary electrochromatography of Triton X-100, *Electrophoresis* (2004) 25, 586–593.
- [21] M. Eskandani, H. Hamishehkar, J. E. N. Dolatabadi, Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20), *DNA Cell Biol.* Vol 32 (2013) 498-503.
- [22] M. N. Barkestani, S. Naserian, G. Uzan, S. Shamdani, Post-decellularization techniques ameliorate cartilage decellularization process for tissue engineering applications, *J. Tissue Eng.* 12 (2021) 1-26.
- [23] L.J.White, A. J. Taylor, D. M. Faulk, T. J. Keane, L. T. Saldin, J. E. Reing, I. T. Swinehart, N. J. Turner, B. D. Ratner, S. F. Badylak, The Impact of Detergents on the Tissue Decellularization Process: a ToF-SIMS Study, *Acta. Biomater* 50 (2017) 207-219.
- [24] A. H. A. Zahmati, R. Alipoor, A. R. Shahmirzadi, V. Khori, M. M. Abolhasani, *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*, IMMINV 2(3),76-81.

[25] U. Mendbil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion, N. Garcia-Urquia, B. Olalde-Graello, A. Abarrategi, Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 5447.

[26] D. Moffat, K. Ye, S. Jin, Decellularization for the Retention of Tissue Niches, *J. Tissue. Eng* 13(2022)20417314221101151.