

# Hidrogelovi za biomedicinske primjene

---

Jakus, Damir

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:016529>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Damir Jakus

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Damir Jakus

**HIDROGELOVI ZA BIOMEDICINSKE PRIMJENE**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

doc. dr. sc. Anamarija Rogina

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, rujan 2019.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na stručnom vodstvu, savjetima i mogućnosti izrade završnog rada.*

*Hvala mojim roditeljima koji su bili velika potpora i oslonac tijekom mog studija.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1.Tkivno inženjerstvo .....	1
2. HIDROGELOVI.....	3
2.1.Klasifikacija hidrogelova .....	4
2.1.1.Prema podrijetlu .....	5
2.1.2.Prema izdržljivosti .....	6
2.1.3.Prema odgovoru na podražaje .....	6
2.2.Hidrogelovi na temelju prirodnih polimera .....	8
2.3.Samoudruženi hidrogelovi na temelju peptida .....	9
2.4.Hidrogelovi u odnosu na gelove.....	10
3. METODE PRIPRAVE HIDROGELOVA.....	11
3.1.Kemijsko umreživanje .....	11
3.1.1.Polimerizacija inicirana slobodnim radikalima .....	12
3.1.2.Umreživanje zračenjem.....	13
3.2.Fizičko umreživanje.....	13
3.2.1.Polielektrolitsko kompleksiranje ( ionskim interakcijama) .....	14
3.2.2.Vodikove veze .....	14
3.2.3.Hidrofobno povezivanje.....	14
4. PRIMJENA HIDROGELOVA .....	16
4.1.Kontaktne leće .....	17
4.2.Obloge za opekline i rane.....	17
4.3.Hidrogelovi kao nosači za sintezu nanočestica .....	19
4.4.Hidrogel kao nositelj tvari kod transplantacije srca.....	19
4.5.Hidrogel kao skelet .....	20
4.6.Hidrogelovi kao prepreka protiv restenoze .....	21
4.7.Hidrogelovi kao spremište lijekova.....	21
5. KRITERIJI DIZAJNIRANJA HIDROGELNOG SKELETA .....	22
5.1.Biorazgradnja.....	22
5.2.Biokompatibilnost.....	23
5.3.Veličina pora i stupanj poroznosti.....	24
5.4.Mehanička svojstva.....	25
5.5.Svojstva površine .....	26
5.6.Vaskularizacija.....	26

6. METODE IZRADE HIDROGELNOG SKELETA .....	28
6.1.Emulgiranje.....	28
6.2.Liofilizacija .....	29
6.3.Metoda lijevanja i ispiranja otapala.....	29
6.4.Plinsko pjenjenje.....	30
6.5.Fotolitografija .....	30
6.6.Elektropredenje .....	31
6.7.Mikrooblikovanje.....	32
6.8. 3D tiskanje organa/ tkiva .....	33
7. HIDROGELOVI U INŽENJERSTVU SRČANOG TKIVA.....	35
8. ZAKLJUČAK.....	37
LITERATURA .....	38

## SAŽETAK

U radu je opisan cilj razvoja tkivnog inženjerstva, područja njegova djelovanja i primjena hidrogelova u tkivnom inženjerstvu.

Tkivno inženjerstvo je područje koje uključuje principe inženjerstva i prirodnih znanosti s ciljem razvoja postojećih i otkrićem novih metoda obnova ljudskog tkiva i liječenja oboljelih organa ljudi. Također, opisana je značajna uloga hidrogelova u tkivnom inženjerstvu. Dan je pregled klasifikacije hidrogelova, metode njihove pripreme i primjene u biomedicini .

Ključna komponenta primjene hidrogelova u uspješnom tkivnom inženjerstvu je dizajniranje i izrada hidrogelnog skeleta. U radu su opisane neke tehnike izrade hidrogelnog skeleta i parametri koje gotovi skelet mora zadovoljiti.

Hidrogelovi imaju važnu ulogu u regeneraciji srčanog tkiva, transportu stanica, kisika i hranjivih tvari. Navedeni su primjeri istraživanja upotrebe hidrogelova u inženjerstvu srčanog tkiva na modelu životinja s ciljem primjene metoda na ljudsku populaciju.

**Ključne riječi:** tkivno inženjerstvo, hidrogelovi, biomedicina, hidrogelni skelet, srčano tkivo, životinje

## SUMMARY

### Hydrogels for biomedical applications

This paper describes the goal of tissue engineering development, its field of activity and the application of hydrogels in tissue engineering.

Tissue engineering is an area that incorporates the principles of engineering and natural sciences to develop existing and discover new methods of restoring human tissue and treating diseased human organs. Also, the significant role of hydrogels in tissue engineering is described. The classification of hydrogels, methods for their preparation and application in biomedicine are given.

A key component of the application of hydrogels in successful tissue engineering is the design and fabrication of the hydrogel skeleton. The paper describes some techniques for making a hydrogel skeleton and the parameters that the finished skeleton must satisfy.

Hydrogels play an important role in the regeneration of cardiac tissue, the transport of cells, oxygen and nutrients. Examples of the study of the use of hydrogels in cardiac tissue engineering on an animal model are presented with the aim of applying the methods to the human population.

**Keywords:** tissue engineering, hydrogels, biomedical sciences, hydrogel scaffold, cardiac tissue, animals



# 1. UVOD

## 1.1. Tkivno inženjerstvo

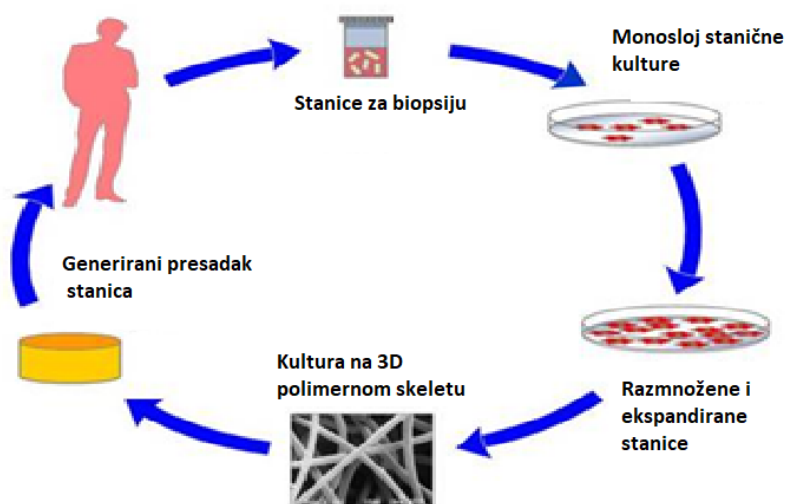
Tkivno inženjerstvo je brzo rastuće interdisciplinarno područje koje uključuje znanost o biomaterijalima, biološkim stanicama, interakcijama stanica i materijala i karakteristikama površine na koju su stanice vezane. Cilj istraživanja u ovom području je obnoviti, očuvati ili poboljšati funkcije tkiva. Također ima za cilj zamijeniti oboljele ili oštećene organe ili tkiva koja su neispravna ili su izgubljena uslijed nezgoda ili bolesti. Tipično inženjerstvo tkiva uključuje četiri ključne komponente: (a) odabrane i izolirane stanice (matične stanice različitog podrijetla, progenitorne stanice, (b) skelet izrađen od biomaterijala koji može biti prirodan ili sintetski, kako bi se osigurala platforma za funkciju stanica, adheziju i transplantaciju, (c) signalne molekule kao što su proteini i faktori rasta koji potiču određene stanične funkcije, (d) bioreaktore koji podržavaju biološki aktivan okoliš za staničnu ekspanziju i diferencijaciju.

Tkiva ili organi mogu se potencijalno razviti različitim pristupima. Najčešći pristup uključuje izolaciju tkivno specifičnih stanica iz biopsije malog tkiva pacijenta sakupljenih *in vitro*. Zatim se izolirane stanice ekspandiraju i nasade u trodimenzionalni skelet koji oponaša prirodne izvanstanične matrice (ECM) ciljanog tkiva. Ključna funkcija takvog skeleta je da (a) isporuči stanice sjemena na željeno mjesto u tijelu pacijenta, (b) potiče interakcije stanica-biomaterijal, (c) potiče staničnu adheziju, (d) dopušta odgovarajući transport plinova hranjivih tvari i faktora rasta kako bi se osiguralo preživljavanje stanica, proliferacija i diferencijacija, (e) kontrolira strukturu i funkciju modificiranog tkiva, (f) uzrokuje zanemariv stupanj upale ili toksičnosti *in vivo*. [1]

Skelet napunjen stanicama također se transplantira u pacijenta putem injekcije, uz pomoć igle, što je minimalno invazivna tehnika ili implantacijom tkiva na željeno mjesto u pacijentovu tijelu operacijom. [2] Planiranje i formiranje skeleta s optimalnim karakteristikama je ključno u uspješnom tkivnom inženjerstvu. Tijekom 21. stoljeća, hidrogelni skelet je privukao veliku pozornost zbog svoje jedinstvene kompozicijske i strukturne sličnosti s prirodnom izvanstaničnom matricom (ECM) uz njegov poželjan okvir za staničnu proliferaciju i preživljavanje. [3]

Da bi se mogli proučavati učinci lijekova i farmaceutika aktivno je razvijeno više ljudskih organa na modelu. Međutim, inženjerstvo kompleksnih metabolički zahtjevnih tkiva zahtijeva organizaciju višeg reda u interakcijskim funkcionalnim odjeljcima, na molekularnoj, staničnoj i tkivnoj ljestvici, uz odgovarajuću masu za generiranje fiziološke funkcije tkiva.

Osnovni princip tkivnog inženjerstva prikazan je na slici 1. Stanice se mogu izolirati iz bolesnikova tijela i u laboratoriju umnožiti. Nakon što je prisutan dovoljan broj stanica, one se mogu saditi na polimerni materijal i obrađivati *in vitro* u bioreaktoru ili inkubatoru. Kad je konstrukcija dovoljno sazrela, tada se mogu implantirati u područje oštećenja pacijentova tijela.

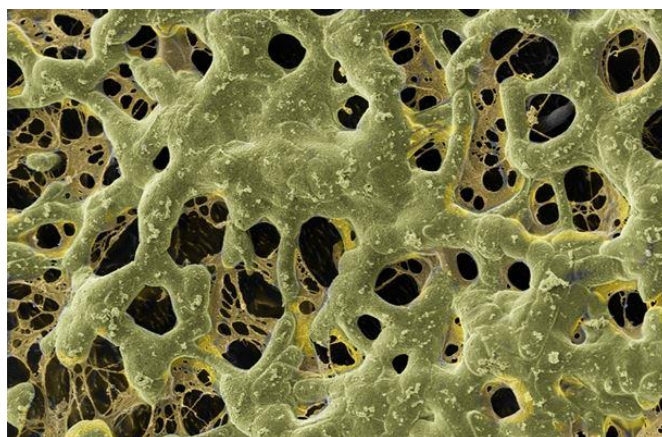


Slika 1. Prikaz osnovnog principa tkivnog inženjerstva [4]

Svaki organ je različit u svojim jedinstvenim strukturnim komponentama- različitim tipovima stanica, matrica i povezanosti među njima, biofizičkom okruženju- pritiskom i protokom i biokemijskim podražajima- opskrbljenosti kisikom, citokinima i faktorima rasta kako bi podržao specifičnu funkciju organa. U ovom pregledu raspravlja se o jedinstvenim značajkama i kritičnim inženjerskim izazovima u tkivnom inženjerstvu pri regeneraciji tkiva nekih ljudskih organa.

## 2. HIDROGELOVI

Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže sastavljene od hidrofilnih polimera koji su umreženi kovalentnim vezama ili se drže zajedno preko fizičkih intramolekularnih i intermolekularnih privlačnih sila. Hidrogelovi mogu apsorbirati velike količine vode ili bioloških fluida i nabubriti lako bez otapanja. Visoka hidrofilnost hidrogelova posljedica je prisutnosti hidrofilnih skupina kao što su karboksilne, amidne, amino i hidroksilne skupine raspodijeljene duž glavnog lanca polimera. U nabubrenom stanju, hidrogelovi su mekani i elastični, u velikoj mjeri slični živom tkivu. Osim toga, mnogi hidrogelovi, kao što je kitozan i hidrogelovi na temelju alginata su biološki podnošljivi.[3] Na slici 2. prikazan je hidrogel na temelju alginata.



*Slika 2.* Hidrogel na temelju alginata [5]

Pojava hidrogelova potječe od prije pedesetak godina kada je razvijen i istražen hidrogel na temelju poli(2-hidroksietil metakrilata) te je primijenjen pri izradi kontaktne leće. Od tada su se istraživanja na području hidrogelova značajno proširila, posebno u posljednja dva desetljeća. Hidrogelovi su se počeli upotrebljavati u tkivnom inženjerstvu, isporuci lijekova, zacjeljivanju rana ali i kao oftalmički materijali. Hidrogelovi obično postižu ravnotežu sila unutar tkiva pri bubrenju, a koja se javlja zbog osmoze koja uzrokuje ulazak vode ili bioloških tekućina u hidrofilnu hidrogelnu matricu i kohezivnih sila polimernih lanaca unutar hidrogela. Kohezivne sile mogu izdržati ekspanziju hidrogela i stupanj tih sila ovisi osobito o gustoći umreženja hidrogela. [6,7]

Općenito, što je polimer koji formira hidrogel hidrofilniji, hidrogel apsorbira veću količinu vode. Isto tako, što je viši stupanj umreženja određenog hidrogela, niži je stupanj bubrenja gela. Hidrogelovi u svojem suhom stanju obično se nazivaju "kserogelovi", dok se suhi porozni hidrogelovi nastali primjenom tehnika sušenja kao što su sušenje zamrzavanjem ili ekstrakcijom otapala nazivaju "aerogelovima" [6]. Aerogel je koloid izveden iz gela u kojemu je tekuća faza zamijenjena plinom, to je tvar izvandrednih svojstava među kojima se ističu toplinska izolacija i iznimno niska gustoća. U suhom stanju „kserogel“ gelovi su tvrdi i kruti, dok su u nabubrenom stanju vlažni, mekani i elastični, sposobni pretrpjeti velike deformacije, zbog čega su vrlo slični tkivima [7]. Hidrofilna površina hidrogela ima nisku međupovršinsku slobodnu energiju u kontaktu s fluidom iz tijela, što rezultira niskom težnjom za prijanjanjem proteina i stanica na ove površine, dok elastičnost hidrogelova osigurava minimalnu iritaciju okružujućeg tkiva nakon implantacije izazvane trenjem unutar okolnog tkiva. [8]

Zbog svojih specifičnih osobina hidrogelovi su predmet istraživanja i sve se više primjenjuju u praksi. Njihova upotreba do danas drastično je porasla, posebno u granama medicine, farmacije i zaštite životne sredine. Kod njihove primjene je važno da hidrogel tijekom bubrenja ostaje mehanički dovoljno čvrst, tj. da ne mijenja geometriju, da je fleksibilan, kao i da može kontroliranom brzinom oslobađati molekule koje su unijete u mrežu. [9].

## 2.1. Klasifikacija hidrogelova

Ovisno o vrsti monomera iz kojih su dobiveni, hidrogelovi pokazuju različito ponašanje, a samim time i primjenu u različitim svrhama. Možemo ih klasificirati na nekoliko načina u ovisno o sastavu, ionskom elektricitetu, podrijetlu, trajnosti, prirodi bubrenja s promjenama u okruženju, stupnju biorazgradivosti ili prirodi umreženja i sl. Po sastavu hidrogelovi mogu biti homopolimeri ili kopolimeri. Kopolimeri se koriste kako bi se poboljšala mehanička svojstva hidrogela ili ugradila komponenta koja reagira na vanjske stimulanse. Na osnovu prirode umreživanja dijele se na kemijski i fizički umrežene. Hidrogelovi se mogu razlikovati i prema strukturi mreže, koje mogu biti jednostavne, semi-interpenetrirajuće (semi-IPM), interpenetrirajuće i hibridne polimerne mreže. Semi-IPM predstavljaju kombinaciju međusobno isprepletene polimerne mreže i lanaca neumreženog polimera, interpenetrirajuće polimerne mreže (IPM) su kombinacija dva umrežena polimera međusobno isprepletena, a hibridne polimerne mreže (HPM) nastaju umreživanjem strukturnih jedinica dva različita

polimerna lanca. Važna podjela je i na neutralne i ionske, pri čemu ionski hidrogelovi mogu biti anionski, kationski i amfipatski. Osnovna najčešća podjela hidrogelova prikazana je u tablici 1. Postoji i podjela hidrogelova na osnovu veličine pora na: superporozne (pore > 100 μm), makroporozne (pore od 0,1 - 1 μm), mikroporozne (pore od 0,1 do 0,01 μm) i neporozne hidrogelove (pore između 0,001 i 0,01 μm), kao i niz drugih podjela.[8] U nastavku su detaljnije razrađene podjele prema podrijetlu, trajnosti hidrogelova i promjena u okruženju.

Tablica 1. Najčešća podjela hidrogelova [8]

Podrijetlo	Izdržljivost	Odgovor na podražaje	Umreživanje	Naboj	Sastav
prirodni sintetski hibridni	izdržljivi biorazgradljivi bionerazgradljivi	pametni konvencionalni	fizički umreženi kemijsko umreženi	kationski anionski neionski amfipatski	homopolimeri kopolimeri interpenetrirajući

### 2.1.1. Prema podrijetlu

Hidrogelovi se prema njihovom podrijetlu mogu podijeliti na prirodne, sintetske i polusintetske ili hibridne. Većina sintetskih hidrogelova sintetiziraju se tradicionalnom polimerizacijom vinilnih ili vinil-aktiviranih monomera. Uravnoteženje intenziteta bubrenja tih sintetskih hidrogelova široko se razlikuju ovisno o hidrofilnosti monomera i gustoći poprečnog križanja. Obično se dodaje bifunkcionalni monomer kako bi se reakcija odvijala *in situ*. Prirodni hidrogelovi izgrađeni su od prirodnih polimera, uključujući polinukleotide, polipeptide i polisaharide. Ovi prirodni polimeri dobivaju se iz različitih prirodnih izvora. Na primjer, kolagen se dobiva od sisavaca dok se kitozan dobiva iz egzoskeleta školjkaša. U tablici 2. navedeni su neki prirodni polimeri i monomeri koji se često koriste za dobivanje hidrogelova.

Tablica 2. Prirodni polimeri i monomeri koji se najčešće koriste za dobivanje hidrogela [8]

Prirodni polimer	Monomer
kitozan	Hidroksietil metakrilat (HEMA)
aliginat	N-(2-hidroksipropil) metakrilat (HPMA)
fibrin	N-vinil-2-pirolidon (NVP)
kolagen	N- izopropil akrilamid (NiPAAm)
želatina	Vinil acetat (Vac)
hijaluronska kiselina	Akrilna kiselina (AA)
dekstran	Metakrilna kiselina (MAA)

### 2.1.2. Prema izdržljivosti

Hidrogel može biti izdržljiv (kao što su većina hidrogela na temelju poliakrilata) ili biorazgradljiv (kao što su hidrogelovi na temelju polisaharida), ovisno o njihovoj stabilnosti u fiziološkom okruženju. Novija istraživanja usredotočena su na izradu i korištenje novih biorazgradljivih hidrogelova. Primjene takvih biorazgradljivih hidrogelova danas pokrivaju mnoga područja, uključujući biomedicinska i ne biomedicinska područja. Cijepanjem lanaca razgradljivih polimera unutar hidrogelne matrice mogu nastati oligomeri niske molekulske mase. Nastali oligomeri eliminiraju se iz tijela ili prolaze kroz daljnju degradaciju.

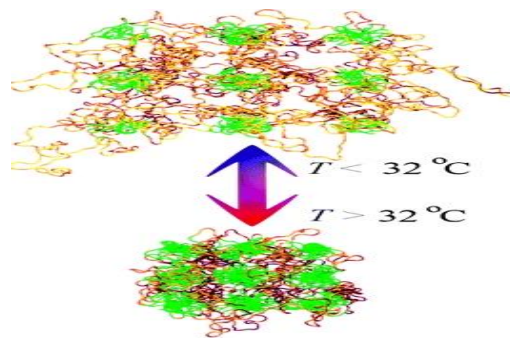
### 2.1.3. Prema odgovoru na podražaje

U proteklom desetljeću vidljiv je ogroman napredak u pripravi i istraživanju jedinstvene kategorije hidrogelova pod nazivom "pametni hidrogelovi". Unatoč sličnosti s konvencionalnim tipovima u metodama pripreme i tehnikama karakterizacije, pametni hidrogelovi mogu pokazivati neobične promjene u ponašanju prilikom bubrenja, promjene u umreženoj strukturi i/ili mehaničkim svojstvima kao odgovor na različite promjene u okolišu kao što su pH, temperatura, svjetlost, ionska snaga ili električno polje i sl. kao što je navedeno u tablici 3. Ovi podražaji uzrokuju nastajanje hidrogelova, međutim uklanjanjem tih podražaja hidrogelovi se vraćaju u prvotno stanje (reverzna promjena), a kao primjer može se uzeti značajna promjena u stupnju bubrenja pametnog hidrogela kao odgovor na razne ekološke podražaje. [9-11]

Tablica 3. Popis raznih vanjskih pobuda koje dovode do formiranja hidrogela i oslobađanja lijeka iz umrežene polimere matrice [12]

Vanjska pobuda	Hidrogel	Mehanizam	Polimeri
Temperatura	Temperaturno osjetljivi	Promjena uzrokuje promjenu u bubrenju, oslobađanje lijeka	PNIPAAm; PDEAAm
pH	Kiselo/bazni	Promjena uzrokuje bubrenje i oslobađanje lijeka	PAA; PDEAEM
Ionska jakost	Ionski	Promjena koncentracije iona unutar gela uzrokuje bubrenje i oslobađanje lijeka	neionski PNIPAAm
Električni signal	Polielektrolitni	Reverzno bubrenje pod utjecajem električnog polja	PHEMA
Magnetsko polje	Magnetske čestice dispergirane u mikrosferama	Promjena u bubrenju, oslobađanje lijeka	EVAC; PNIPAAm

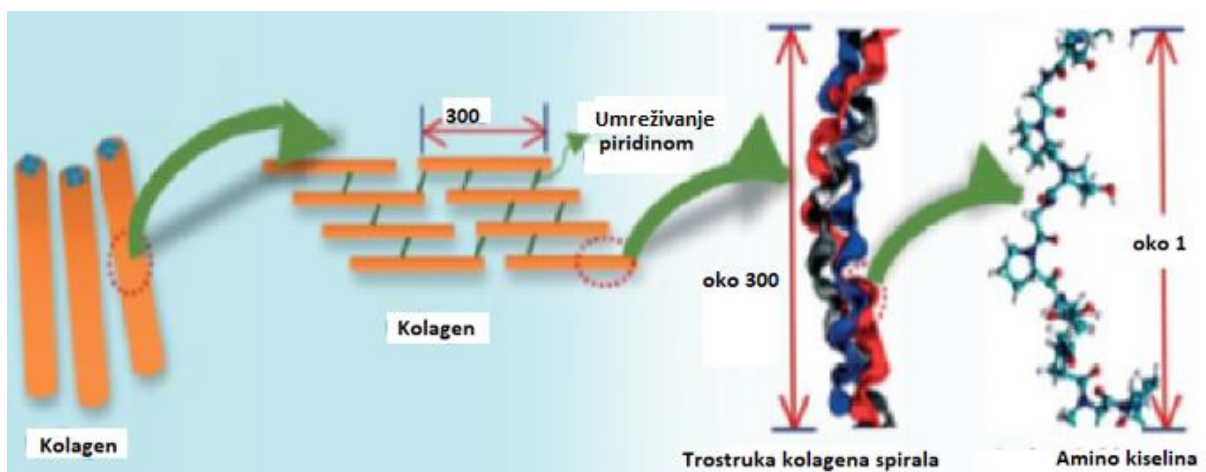
Kod temperaturno osjetljivih hidrogelova potrebno je poznavati donju kritičnu temperaturu topljivosti LCST (*lower-critical solution temperature*) ili gornju kritičnu temperaturu topljivosti UCST (*upper-critical solution temperature*). Ovisno o prirodi polimera od kojeg je načinjen, hidrogel će imati jednu od dvije karakteristične temperature, na kojima se javlja fazna promjena. Pozitivno temperaturno odstupanje osjetljivi hidrogelovi imaju UCST iznad koje bubre, a ispod koje se stežu. U ovu grupu spadaju: interpenetrirajuća polimerna mreža poli(akrilne kiseline) (PAK) i poliakrilamida (PAAm) ili kopolimer akrilamida i butilmetakrilata P(Aam-ko-BMA). Negativno temperaturno osjetljivi hidrogelovi imaju LCST iznad koje se stežu, a ispod koje bubre (slika 2.). Ovakvi hidrogelovi u polimernim lancima sadrže hidrofobne i hidrofilne grupe. Na nižim temperaturama dominantne su vodikove veze između hidrofilnih dijelova polimernog lanca i vode. S porastom temperature dolazi do povećanja konetičke energije molekula i vodikove veze slabe. Prevladava utjecaj hidrofobnog djela polimernih molekula i dolazi do kontrakcije molekula. S povećanjem sadržaja hidrofobnih grupa u molekuli polimera, LCST raste. [13,14]



Slika 2. Shematski prikaz bubrenja i stezanja, negativno temperaturno- osjetljivog hidrogela PNiPAAm-a koji ima LCST NA 32°C [14]

## 2.2.Hidrogelovi na temelju prirodnih polimera

Iz prirodnih polimera razvijeno je nekoliko hidrogelova za primjenu u tkivom inženjerstvu. Neki prirodni polimeri kao što su polinukleotidi, polipeptidi i različiti polisaharidi, dobivaju se iz različitih prirodnih izvora. Kitozan se dobiva iz egzoskeleta školjki, dok se kolagen dobiva od sisavaca. Kolagena hidrogelna vlakna jedan su od najpopularnijih prirodnih skeleta na temelju polimera u tkivno inženjerskim primjenama. Kao što je prikazano na slici 3. hidrogelni kolagen formira se samoagregacijom i umreživanjem (preko piridinijske veze) gdje su molekule kolagena u hidratiziranom okruženju. Molekule kolagena sastoje se od trostrukih spirala, pri čemu svaka trostruka spirala proizlazi iz samouređivanja triju polipeptidnih lanaca.



Slika 3. Ilustracija osnovne strukture kolagena [15]



Općenito, hidrogelovi na temelju polimera prirodnog podrijetla, poput kolagena, povoljni su u primjeni zbog svojih svojstvenog biološkog prepoznavanja, uključujući ligande koji vezuju receptore i osjetljivost staničnog aktiviranja proteolitičke pregradnje. Međutim, upotreba hidrogelova na temelju prirodnih sastojaka pokazala je neke nedostatke koji uključuju probleme s pročišćavanjem, imunogenošću i prijenosom patogena.

### 2.3.Samoudruženi hidrogelovi na temelju peptida

Hidrogelni skeleti temeljeni na samoudruženim peptidima (SAPs) jedna su od glavnih klasa u tkivno inženjerskim primjenama SAPs su polipeptidi koji podliježu samoudruživanju u specifičnim uvjetima, to je obično hidrofilno okruženje za stvaranje vlakana ili drugih vrsta nanostrukture. Ove amfifilne molekule sadrže polipeptid spojen na alkilni rep dugog lanaca i također funkcioniraju sa staničnim adhezijskim ligandom (RGD). Polipeptid predstavlja hidrofilno područje amfifilne molekule dok alkilni dio dugog lanca predstavlja hidrofobno područje. Takve amfifilne molekule temeljene na peptidu podložne su samoudruživanju u vlaknasti umreženi skelet hidrogela (u paralelnim nizovima nalik vrpici). Postoje razni hidrogelovi na temelju amfifilnih SAP-ova i koriste se u raznim primjenama tkivnog inženjerstva. Hidrogelovi na temelju SAP-a također se mogu koristiti za uključivanje bioaktivnih molekula i omogućavanje njihovog kontroliranog otpuštanja. SAPs-temeljeni hidrogelovi mogu se također kemijski konjugirati s različitim dijelovima, kako bi se omogućila signalizacija receptora stanične površine i pojačala stanična adhezija.

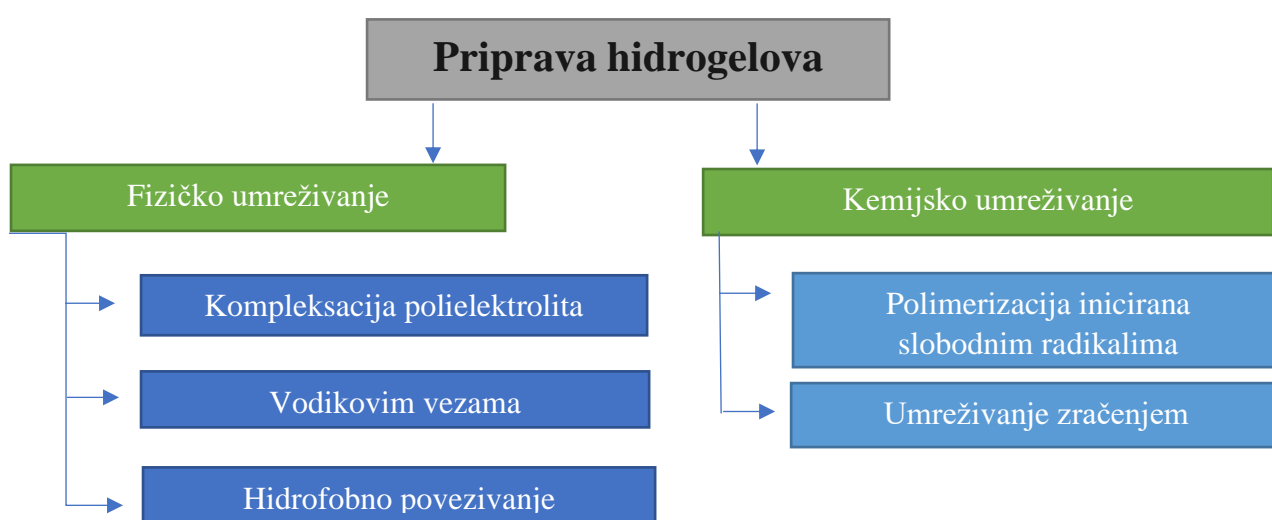
Uz mnoga superiorna svojstva SAP-a, poput njihove učinkovitosti u stvaranju hidrogelova koji nalikuju tkivu, oni nažalost imaju slaba mehanička svojstva. Zbog toga se ne mogu koristiti za primjenu tkiva koje zahtijevaju skelet visoke mehaničke čvrstoće.[16-20]

## 2.4. Hidrogelovi u odnosu na gelove

Jedna od uobičajenih zabluda u znanosti o polimerima je uporaba pojma "gel" umjesto "hidrogel" i obrnuto. Gelovi su polučvrsti materijali izgrađeni od hidrofilnih polimera, raspršenih u disperznom sredstvu, najčešće vodi, koji tvore hladetinastu masu. Hidrogelovi su također izrađeni od hidrofilnih polimernih lanaca, ali oni su umreženi što im omogućuje da nabubre i zadrže svoju trodimenzionalnu strukturu bez otapanja. Stoga, temeljna značajka hidrogelova, koja ih razlikuje od gelova je njihova umreženost. Međutim, gelovi također imaju mrežastu strukturu koja u međuprostorima sadrži molekule disperznog sredstva, a mućkanjem ili potresanjem mogu prijeći u svoj otopljeni oblik tzv. sloj. Hidrogelovi s obzirom na svoju konzistentnost nalikuju prirodnom tkivu čovjeka više od bilo kojih drugih sintetičkih biomaterijala zbog čega su pronašli veliku primjenu i u biomedicinskom području kod dizajniranja i izrade umjetnog tkiva, umjetne kože, obloga za umjetno srce, membrana za biosenzore, kontaktne leće itd. [21,22]

### 3. METODE PRIPRAVE HIDROGELOVA

Kao što je već spomenuto, hidrogelovi se dijele prema načinu dobivanja na kemijski i fizički umrežene sustave. Obje metode su vrlo zastupljene u procesima sinteze hidrogelova. Osnovna prednost kemijski umreženih hidrogelova je da pri njihovoj sintezi dolazi do formiranja kovalentnih mjesta umreženja između polimernih lanaca. U fizički umreženim hidrogelovima umreženja nastaju uslijed fizičkih interakcija koje se javljaju između različitih polimernih lanaca. Hidrogelovi se mogu pripremiti različitim postupcima, ovisno o traženoj strukturi i željenim primjenama. Neke od metoda opisane su u nastavku i sažete na slici 4.



Slika 4. Shematski dijagram koji prikazuje najčešće metode pripreme hidrogelova

#### 3.1. Kemijsko umreživanje

U kemijski umreženim hidrogelovima, poznatim i kao stalni ili stvarni hidrogelovi, polimerni lanci međusobno su povezani kovalentnim vezama. Mogu biti sintetizirani radikalnom polimerizacijom hidrofilnih monomera u prisutnosti umreživala, radikalnom polimerizacijom vodotopivih polimera, derivatizacijom dvo i / ili višenamjenskih skupina koje mogu polimerizirati, umreživanjem preko reakcija komplementarnih skupina kao što su aldehidi, adicijskim reakcijama, reakcijama kondenzacija, enzimima i ozračivanjem (UV, mikrovalno,  $\gamma$  - zračenje ili snop elektrona). Kemijski umreženi hidrogelovi se ne otapaju u nijednom otapalu. Dobiveni hidrogel ne može se oblikovati nakon dobivanja, jer polimer više nije topljiv, pa se oblikovanje izvodi istovremeno s postupkom polimerizacije. [23,24]

Kemijsko umreživanje hidrofилnih polimera je jedan od glavnih načina priprave hidrogelova. U ovoj tehnici, bifunkcionalno sredstvo za umreživanje se dodaje u razrijeđenu otopinu hidrofилnog polimera koji treba imati pogodnu funkcionalnu skupinu da reagira sa sredstvom za umreživanje. Ova je metoda prikladna za pripravu hidrogelova iz prirodnih i sintetskih hidrofилnih polimera. Hidrogelovi na temelju albumina i želatine su razvijeni korištenjem dialdehida ili formaldehida kao sredstva za umreživanje. Ovim postupkom razvijeni su hidrogelovi visokog sadržaja vode, zasnovani na osnovi unakrsnog povezivanja polietilen glikola i lizina, koji sadrži polipeptid. [25]

### 3.1.1. Polimerizacija inicirana slobodnim radikalima

Konvencionalna polimerizacija preko slobodnih radikala je poželjna tehnika za pripravu hidrogelova na temelju akrilata, amida i vinilnih laktama. [26]. Može se koristiti i za razvoj hidrogelova na temelju prirodnih polimera uz uvjet da ti polimeri imaju prikladne funkcionalne skupine ili su funkcijski povezane s radikalno polimerizirajućim skupinama. Takva metoda je korištena za razvoj različitih hidrogelova na temelju kitozana. [27]

Priprema hidrogela ovom tehnikom uključuje tipične korake polimerizacije preko slobodnih radikala, inicijaciju, propagaciju i terminaciju lanca. U koraku inicijacije postoji širok izbor vidljivih, toplinskih, ultraljubičastih i infracrvenih inicijatora koji se koriste za generiranje radikala. Takvi radikali tada reagiraju s monomerima pretvarajući ih u aktivne oblike koji reagiraju s više monomera i generiraju nove radikale. Rezultirajući radikali dugog lanca prolaze kroz stupanj terminacije i putem radikalnih kombinacija tvore polimerne matrice. Ova metoda pripreme hidrogela može se izvesti u otopini ili u masi. Polimerizacija u otopini je poželjna tijekom sinteze velike količine hidrogela i u tom slučaju je voda najčešće korišteno otapalo. Međutim, polimerizacija u masi je brža od polimerizacije u otopini i ne zahtijeva uklanjanje otapala što inače oduzima mnogo vremena. [28]

### 3.1.2. Umreživanje zračenjem

Ionizirajuće zračenje, kao i elektronski snop gama zraka ima visoku energiju, dovoljnu da ionizira jednostavne molekule u zraku ili u vodi. Tijekom ozračivanja polimerne otopine mnoga reaktivna mjesta se stvaraju duž polimernih lanaca. Kombinacija takvih radikala dovodi do stvaranja velikog broja međuveza. Formiranje hidrogela ovim postupkom može se provesti ozračivanjem polimera u masi ili u otopini. Međutim, zračenje polimerne otopine ima prednost zbog manje energije za formiranje makroradikala, takvo zračenje je učinkovitije zbog manje viskoznosti reakcijske smjese

Primjena zračenja za razvoj hidrogela nudi mnoge prednosti u odnosu na druge metode pripreme jer tijekom procesa zračenja nisu potrebni nikakvi katalizatori ili aktivatori za pokretanje reakcije. Također, metode zračenja su jednostavnije i stupanj umreženja može se lako kontrolirati doziranjem količine zračenja.[29] Zbog tih prednosti ova metoda se koristi za razvoj širokog spektra hidrogelova u mnogim biomedicinskim primjenama, gdje je najmanje onečišćenje nepoželjno. Tehnika se učinkovito koristi za pripremu hidrogela akrilne kiseline i pH reaktivnog hidrogela na temelju poli(etilen glikola)/karboksimetil kitozana. Međutim, ova tehnika se ne preporučuje za pripremu hidrogelova nekih polimera koji se razgrađuju pod utjecajem ionizirajućeg zračenja. [30]

### 3.2. Fizičko umreživanje

Umreživanje ne mora biti proizvod kemijske reakcije. Bilo koji fizički postupak koji dovodi do povezivanja polimernih lanaca može dovesti do stvaranja hidrogela. Postupci fizikalno-kemijskih umreživanja su obično reverzni i uključuju stvaranje slabih, sekundarnih sila, poput: vodikovih veza, elektrostatskih interakcija, Van der Waalsovih i Coulombovih sila, hidrofobnih interakcija, preklapanja lanaca. Fizički umreženi hidrogelovi poznati su i pod nazivom plastomeri, reverzni ili privremeni hidrogelovi jer su nestabilni, promjenom vanjskih faktora mogu se prevesti u sustave bez umreženja, mogu se razgraditi ili otopiti. Oni su nehomogeni zbog zapletenosti molekularnih lanaca ili hidrofobnih područja. Slobodni krajevi lanaca također predstavljaju prolazne nedostatke u mreži. Prisutnost reverznih točaka umreživanja (čvorišta) omogućuje njihovu termičku obradu, tj. prevođenje u polimernu otopinu zagrijavanjem. Nepostojanje mreže i mogućnost promjene nakon sinteze predstavljaju

njihove prednosti, dok je njihov nedostatak slaba mehanička svojstva u nabubrenom stanju. [31,32] Umreživanje polimera fizičkim interakcijama jedan je od najčećih pristupa za formiranje hidrogelova. Hidrogelovi razvijeni ovom tehnikom obićno se pripravlja u blagim uvjetima.

### 3.2.1. Polielektrolitsko kompleksiranje ( ionskim interakcijama)

U ovom pristupu hidrogelovi se pripravlja formiranjem polielektrolitnih kompleksa, gdje se formiraju veze između parova nabijenih mjesta duž polimernih okosnica. Nastale elektrolitske veze variraju u svojoj stabilnosti u skladu s pH sustava. Primjeri hidrogelova razvijenih ovom metodom su oni koji nastaju iz polielektrolitnih kompleksacija karboksilatnih skupina natrijevog alginata s amino skupinama raspoređenim po kitozanskim lancima. [33]

### 3.2.2. Vodikove veze

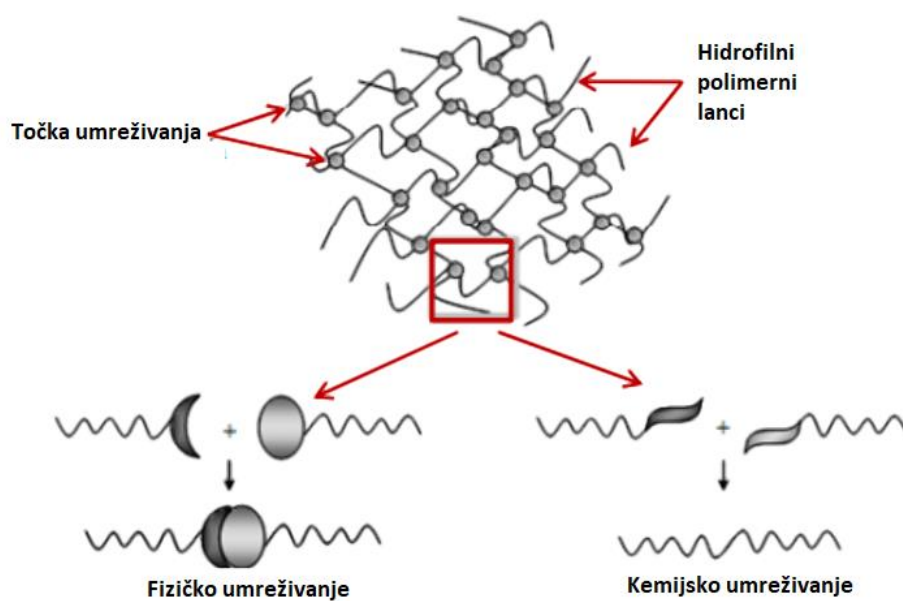
Vodikove veze između polimernih lanaca mogu također sudjelovati u formiranju hidrogelova, na primjer, u razvijanju hidrogela na temelju želatine. Vodikova veza nastaje povezivanjem elektronima siromašnih vodikovih atoma i funkcionalnih skupina velike elektronegativnosti. Na hidrogelove razvijene ovom tehnikom utječu mnogi faktori poput koncentracije polimera, molnog omjera svakog polimera, vrste otapala, temperature otopine i stupanju povezanosti.

### 3.2.3. Hidrofobno povezivanje

Daljnja metodologija za dobivanje hidrogela je provedena hidrofobnim interakcijama. Polimeri i kopolimeri kao što su cijepljeni i blok kopolimeri, obićno tvore strukture razdvojene hidrofobnim mikro-domenama. Te hidrofobne domene djeluju kao povezane križne točke u cijeloj polimernoj strukturi, a okružene su hidrofilnim područjima koja apsorbiraju vodu. Ovim je pristupom razvijen hidrogel zasnovan na cijepljenom tipu kopolimera sastavljen od hidrofilnog poli (hidroksietil metakrilata) (PHEMA) kao okosnice i male kolićine hidrofobnog poli(metilmetakrilata) (PMMA) kao duge grane. Općenito, mehanićka svojstva ovih

hidrofobno kombiniranih polimera su loša zbog slabe međuprostorne adhezije.[34] Međutim, ovaj pristup pripreme hidrogela ima i neke prednosti poput niske cijene sustava.

Na slici 5 shematski je prikazano kemijsko i fizičko umreživanje hidrogelova. Kemijski umreženi hidrogelovi, kao i fizički, su nehomogeni i obično sadrže područja niskog stupnja bubrenja i visoke gustoće umreženja dispergirane unutar područja visokog stupnja bubrenja i niske gustoće umreženja. Osim toga, sredstva za umreživanje koja se koriste u procesima sinteze su vrlo toksična, pa se njihovi neproreagirani ostaci moraju kompletno ukloniti iz hidrogelova prije njihove konačne primjene kao biomaterijala, zbog čega je njihova upotreba ograničena [31,32].



Slika 5. Shematski prikaz fizičkog i kemijskog umreživanja hidrogelova [31]

## 4. PRIMJENA HIDROGELOVA

Polimerni hidrogelovi imaju veliku primjenu u medicini i farmaceutskoj industriji zbog svoje biokompatibilnosti i hidrofилности. Hidrogelovi su sličniji živom tkivu više nego bilo koja druga vrsta sintetskih biomaterijala. Visok sadržaj vode i mekana konstitucija hidrogelova u nabubrenom stanju dovode trenje i iritaciju s okolnim tkivom na najmanju moguću mjeru i poput živog tkiva dozvoljava difuziju proizvoda metabolizma. Hidrogelovi osjetljivi na vanjske podražaje vrlo se često primjenjuju jer se njihova fizičko-kemijska i mehanička svojstva mogu kontrolirati promjenama vanjskih uvjeta (pH vrijednosti, temperature, ionske jakosti, promjenom koncentracije biološki aktivnih tvari, itd.). Oni mogu pokazati svojstva tekućina ili krutih tvari, ovisno o svom stanju.

Najveću primjenu hidrogelovi imaju u medicini. Koriste se za izradu mekih kontaktnih leća, mekih tkiva, kao sredstva protiv opeklina, kod umjetnih hrskavica, umjetnih glasnica i sl. Sposobnost hidrogelova da apsorbiraju i otpuštaju molekule različitih veličina je omogućila njihovu primjenu kao nosača ljekovitih tvari za različite primjene: nazalnu, oralnu, vaginalnu, transdermalnu i oftalmološku. Posljednjih godina veliku pažnju istraživača privlače pH-osjetljivi hidrogelovi koji bi se koristili u genskoj terapiji. Negativan naboj i veličina molekula otežava transport DNK u stanice. Cilj je da se modifikacijom polimera utječe na konformacijske promjene prilikom bubrenja pri promjeni pH vrijednosti od 5 do 7, a rezultat je efikasniji transport DNK u stanice. U tablici 4 dana je primjena određenih hidrogelova u medicini.[35]



Tablica 4. Upotreba sintetskih hidrogelova u medicini [35]

Primjena	Polimer
kateteri	PHEMA
krvni detoksikanti	PHEMA
senzori (elektrode)	PAAm, PHEMA
premošćivači krvnih žila	kalemljeni PHEMA/etilmetakrilat
supstrati za kulture stanica	PHEMA, PNVP
materijali kompatibilni s krvi	PHEMA, PNVP, PAAm
kontaktne leće	PHEMA, PNVP
umjetne rožnice	PHEMA
zamjena za meka tkiva	PHEMA
tkivo za spajanje kostiju	PHEMA
umjetna hrskavica	PVA
membrana za hemodijalizu	PHEMA, PNVP, PVA
nosači za antitijela	PHEMA
proteze za ligamente	PHEMA
umjetne glasnice	PVA
prijenosnici antibiotika	PHEMA
zubne navlake i umjetni zubi	PHEMA

#### 4.1. Kontaktne leće

Kontaktne leće bile su jedno od prvih područja komercijalne primjene hidrogelova. Otkrivanjem (poli-2-hidroksietil-metakrilata) (PHEMA) hidrogela od strane Wichterlea i Lima 1960. industrija kontaktnih leća je procvjetala. Područje istraživanja hidrogelova brzo se proširilo. PHEMA je postala vodeći materijal za proizvodnju kontaktnih leća uz kopolimer P(HEMA / etilen glikol dimetakrilata), koji kada je hidratiziran, sadrži oko 40% vode i vrlo je ugodan za nošenje. Da bi se mogao koristiti za proizvodnju kontaktnih leća, materijal mora biti optički transparentan, kemijski i termički stabilan, biokompatibilan i propustan za kisik. Mora imati odgovarajuća mehanička svojstva, što znači nizak koeficijent trenja za ugodno nošenje kod pacijenta i visoku lomnu čvrstoću u svrhu dugotrajnosti [36].

#### 4.2. Obloge za opekline i rane

Zbog sposobnosti upijanja vode i velike kompatibilnosti s ljudskim tkivom hidrogelovi su danas vrlo zastupljeni u medicini, a trend razvoja hidrogelova još će proširiti njihovu zastupljenost. Upotreba hidrogelova kao obloga za liječenje rana, opekotina ili ozljeda započela je početkom 1980-ih. Zbog svoje hidrofilnosti i visokog sadržaja vode, hidrogel pomaže u

održavanju vlažnosti ozlijeđenog mjesta, sprječava prekomjerni gubitak tjelesne tekućine, omogućava difuziju kisika u oštećeno tkivo i istodobno predstavlja barijeru bakterijama i umiruje bol [37]. Osim vode koju upijaju, u pore mrežaste strukture hidrogelova mogu se ugraditi razne molekule, pa čak i tkiva. Tako se unutar pora ugrađuju žive stanice kože, lijekovi i vitamini. Takvi hidrogelovi iznimno su pogodni za prekrivanje rana na koži kako bi one što prije zacijeljele i kako bi nakon ozljede ostao što manje vidljiv ožiljak. Primjer takvog proizvoda su flasteri za žuljeve *Compeed* ili *herpes simplex*, koji upijaju izlučevine s mjesta ozljede, ali i svojom elastičnošću onemogućuju daljnje širenje ozljede prilikom hoda ili u slučaju *herpes simplex*, štite usnu od vanjskih utjecaja i liječe je kako je prikazano na slici 6. [38]



Slika 6. Prevlaka za kožu[38]

Hidrogelni premazi su mekani, elastični i dobre mehaničke čvrstoće. Omogućuju praćenje zarastanja rane bez uklanjanja obloge. Cilj terapije rana hidrogelnim oblogama je zadržati ranu i mikroorganizme u kontaktu što je moguće kraće kako bi se spriječila infekcija i ubrzalo zacjeljivanje i regeneracija tkiva. Uključivanje lijeka ili antimikrobnog sredstva u hidrogel i njegovo kontrolirano otpuštanje tijekom vremena, protokom tjelesnih tekućina, dovodi do bržeg zacjeljivanja rana [39].

Tehnologija proizvodnje hidrogelnih obloga sastoji se od pripreme vodenih otopina prirodnih ili sintetskih polimera, njihovog pakiranja u hermetičke i mikro nepropusne kutije i konačno zračenja elektronskim snopom akceleratora ili  $\gamma$  zraka iz izvora  $^{60}\text{Co}$ , do nastanka hidrogela. Nakon ozračivanja i sterilizacije hidrogel je spreman za upotrebu [40]

### 4.3. Hidrogelovi kao nosači za sintezu nanočestica

Metalne nanočestice posljednjih godina privlače veliku pažnju zbog svojih optičkih, električnih i magnetskih svojstava koja su potpuno različita od onih koje metal pokazuje svakodnevno, zbog čega se koriste u katalizi, elektronici, fotonici, optici i medicini. Antimikrobna aktivnost srebra poznata je od davnina, a potvrđena su i antimikrobna svojstva nanočestica nekih drugih metala (Cu, Au, Pt). Tako se materijali koji sadrže srebro mogu koristiti u medicini za smanjenje infekcija u liječenju opekлина, za sprečavanje kolonizacije bakterija na protezama, kateterima, zubnim materijalima i koži, za uklanjanje mikroorganizama na tekstilu ili za tretiranje vode [40,41]

Razvijene su brojne metode za sintezu metalnih nanočestica, poput kemijske redukcije metalnih soli pomoću limunske kiseline, borohidrida i drugih organskih spojeva, fotokemijska redukcija, UV i mikrovalno zračenje, primjena lasera, metoda gama-radiolize, upotreba mikroorganizama itd. [40-42]

Za stabilizaciju nanočestica mogu se koristiti različite vrste matrica, poput polimera organskih molekula, mezoporoznih anorganskih materijala, koloidnih sustava. [43] Hidrogelovi kao trodimenzionalne mreže u nekim su slučajevima prikladni kao matrice za proizvodnju nanočestica od gore spomenutih sustava. U nabubrenom stanju slobodni prostor unutar mreže može poslužiti kao nanoreaktor za nukleaciju i rast nanočestice. Stoga se veličinom, morfologijom i raspodjelom nanočestica može kontrolirati modifikacija hidrogela. Pored toga, nanokompozitni hidrogelovi pogodni su za medicinsku upotrebu i zbog izrazite kompatibilnosti s biološkim molekulama, stanicama i tkivima [ 44-46]

### 4.4. Hidrogel kao nositelj tvari kod transplantacije srca

Hidrogelovi mogu biti korisni u presađivanju stanica zahvaljujući jedinstvenoj sposobnosti imunoizolacije uz istovremeno lako difundiranje hranjivih tvari, kisika i metaboličkih proizvoda u njihove matrice. Na primjer, hidrogel na temelju foto-polimeriziraniog poli(etilen glikol)dilakrilata, (PEG diakrilat) razvijen je za transplantaciju Langerhansovih otočića. U ovom istraživanju su stanice otočića bile suspendirane u foto-polimerizirajućoj otopini polimera i otopina je tada korištena za formuliranje mikrosfere na temelju PEG-a koja je ugrađena u otočiće. Ove hidrogelne mikrosfere na temelju PEG-a pokazale su odgovarajuću

imunoizolaciju, ali difuzijska sposobnost hranjivih tvari u zarobljene stanice bila je relativno ograničena. Taj nedostatak je savladan smanjenjem debljine foto-polimerizirane hidrogelne mikrosfere zbog čega oklopljeni otočići dugotrajno ostaju održivi i čestice hidrogela zadržavaju imunoizolaciju.[47]

U drugom istraživanju promatran je potencijal metaloproteinaze (MMP). Istraživanje je provedeno *in vitro*. Ispitivan je hidrogel, mali bioaktivni peptid, timozin beta4 na temelju PEG-a kao bioaktivni sustav inkapsuliran za vaskularne stanice. Istraživanje je pokazalo da ugradnja timozina beta4 u matrici stvara trodimenzionalno okruženje pogodno za adheziju, preživljavanje, migraciju i organizaciju entotelne stanice ljudske pupčane vene (HUVEC). Pored toga, timozin beta4 poboljšao je HUVEC vezanost i izazvao stvaranje vaskularne mreže unutar PEG-hidrogela. Takvi razvijeni PEG-hidrogelovi koji reagiraju na MMP mogu biti prilagođeni tome da služe kao kontrolirani sustav kokapsulacije vaskularnih stanica i bioaktivni agensi za *in situ* regeneraciju tkiva. [48]

#### 4.5.Hidrogel kao skelet

Hidrogelovi se mogu upotrebljavati u tkivnom inženjerstvu izravno nakon pripreme (s ili bez stapanja stanica) ili nakon formiranja skeleta. Skeleti na temelju hidrogelova vrlo su važna klasa skeleta zbog sposobnosti prilagodbe njihovih mehaničkih svojstava onima prirodna tkiva. Hidrogelni skelet koristi se posebno za opskrbu glomaznih i mehaničkih struktura tkivnih konstrukcija, ovisno o tome da li su stanice suspendirane unutar 3D okvira hidrogela ili se stanice drže za okvir. Stanično prianjanje na hidrogel može se poboljšati uključivanjem odgovarajućeg ostatka peptida na površinu hidrogelnog skeleta. [49]

Na primjer jedan od najuspješnijih pristupa za olakšavanje stanične povezanost je ugradnja niza adhezijskih peptida RGD (arginin-glicin-asparaginska kiselina). Uključivanje ovih RGD domena u hidrogelove pokazalo je poboljšanu staničnu migraciju, proliferaciju, rast i organizaciju u primjenama za regeneraciju tkiva. Uz to razne stanice pokazale su povoljno vezanje na RGD-modificirani hidrogelni skelet. Te stanice uključuju endotelne stanice, stanice glatkih mišića (SMCs), hondrocite i osteoblaste. [50]

#### 4.6. Hidrogelovi kao prepreka protiv restenoze

Restenoza je ponovno sužavanje arterija koje može nastati nakon interventne angioplastike ili ugradnje stenta, a javlja se kod oko 40 - 50% bolesnika u periodu od 3 - 6 mjeseci od intervencije. Učestalost restenoza primjenom stentova, nakon balon dilatacije, može se smanjiti na 20 - 30% slučajeva, ali i dalje predstavlja veliki problem u kardiologiji i interventnoj radiologiji.

Hidrogelovi se mogu koristiti za poboljšanje liječenja kod tkivnih ozljeda gdje služe kao prepreka kako bi se izbjegla restenoza ili tromboza zbog postoperativnog stvaranja adhezija. [51] Adhezije su vlaknaste trake koje se formiraju između tkiva i organa, često kao posljedica ozljede tijekom operacije. One se mogu smatrati unutarnjim ožiljkom koji spaja tkiva koja nisu normalno povezana. Utvrđeno je da se umetanjem tankog hidrogelnog filma na temelju poli(etilen glikol-ko-mlječne kiseline) diakrilata intravaskularno kroz međuprostor, može inhibirati restenozu i trombozu smanjenjem intimalnog zadebljanja. Smanjenje intimalnog zadebljanja nastaje djelovanjem tankog filma hidrogela kao prepreke trombocitima, proteinima plazme i faktorima koagulacije od neposrednog kontakta sa stijenkama žila, gdje bi kontakt tih faktora sa stijenkama žila poticao proliferaciju stanica glatkih mišićnih stanica, migraciju, sintezu matrice i posljedično uzrokovao restenozu. [52,53]

#### 4.7. Hidrogelovi kao spremište lijekova

Jedna od najčešćih primjena hidrogelova je njihova upotreba kao lokaliziranih spremišta lijekova. Navedeno je pripisano njihovoj izrazito hidrofilnoj prirodi, biokompatibilnosti i sposobnosti kontrole i oslobađanju lijeka na pametan način interakcijom s biomolekularnim podražajima. [54] Hidrofilni makromolekularni terapijski agensi, poput nekih proteina ili oligonukleotida su kompatibilni s hidrogelnim matricama. Pored toga, mogu upravljati kinetikom isporuke prema željenom rasporedu otpuštanja lijeka pomoću kontrole stupnja bubrenja, stupnja umreženja i brzine biorazgradnje hidrogela.

Foto-polimerizirajući hidrogelovi su posebno atraktivni za lokalizirano davanje lijekova zbog njihove sposobnosti prijanjanja i prilagođavanja ciljanom tkivu kada se formira *in situ*. Uz dostavu lijekova hidrogelovi istodobno funkcioniraju kao pregradni sloj, istovremeno inhibirajući bilo koje postoperativne formacije adhezija. [55]

## 5. KRITERIJI DIZAJNIRANJA HIDROGELNOG SKELETA

Izvanstanična matrica (ECM) je izvan stanična komponenta prirodnog tkiva koja daje strukturalnu podršku stanicama i obavlja razne druge važne funkcije. Dakle, ECM je jedan od najznačajnijih vodiča u dizajniranju skeleta u tkivnom inženjerstvu. ECM je hidrofilna 3D mikro-matrica s dvije glavne čvrste strukture koje čine: kolagenska vlakna i proteoglikanski filamenti. Kolagenska vlakna prisutna su kao snopovi i protežu se kroz međuprostor, pružajući vlačnu čvrstoću i trajnost okolnog tkiva. Proteoglikanski filamenti su zavojitih struktura i napravljeni su od proteina i hijaluronske kiseline, zajedno s uvučenom intersticijskom tekućinom koja je nalik plazmi, poput tekućine, ali s nižom koncentracijom proteina. [56]

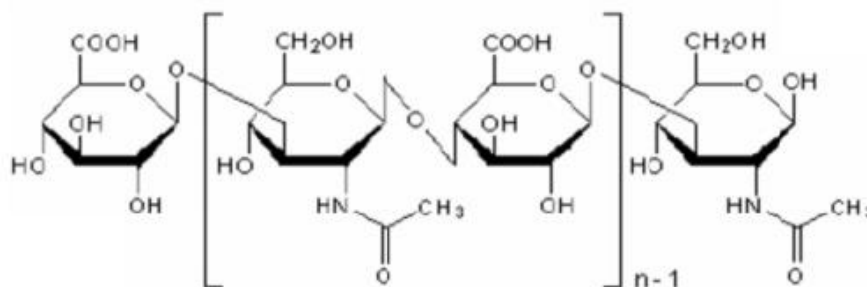
Hidrogelovi u tkivnom inženjerstvu moraju zadovoljiti brojne kriterije dizajna kako bi oponašali ECM i prema tome na odgovarajući način poticali stvaranje novog tkiva. Takav hidrogelni skelet treba osigurati 3D strukturu za rast stanica. 3D struktura bolje oponaša prirodna tkiva i omogućava morfologiju i ponašanje gena koje se ne može postići u 2D strukturama. Kriteriji za formiranje također trebaju sadržavati klasične mehaničke i fizikalno-kemijske parametre (poput biorazgradnje, poroznosti i pogodne kemije površine) i biološke svojstvene parametre (kao što su biokompatibilnost i stanična adhezija), kao i pokaziva pojačane vaskularizacije. Osim toga, pri izradi hidrogelova za potrebe tkivnog inženjerstva trebalo bi razmotriti parametre poput pristupačnosti i komercijalne izvedivosti.

### 5.1. Biorazgradnja

Osnovni zahtjev skeleta u tkivnom inženjerstvu je održavanje stanične proliferacije i željene stanične raspodjele tijekom očekivanog vijeka skeleta. Brzina i stupanj biorazgradnje kritični su parametri razmatranja hidrogelova u tkivnom inženjerstvu.

Na primjer, PEG i PEG-dimetakrilat (PEGDMA) su foto-polimerizirani da se dobije inkapsulirani hidrogelni skelet hondrocita goveda i ovaca, stanica za regeneraciju hrskavice. Nakon foto-polimerizacije, stanice unutar skeleta bile su sposobne održati svoju vitalnost i bile su ravnomjerno raspršene, ali zbog nerazgradljivosti ovih skeleta temeljenih na PEG-u, broj stanica se s vremenom se značajno smanjio. [57]

Unatoč važnosti biorazgradnje kao ključnog čimbenika hidrogelova u tkivnom inženjerstvu, neke tehnike tkivnog inženjerstva možda neće zahtijevati potpunu degradaciju skeleta, kao što je zamjena rožnice ili zglobne hrskavice. Za takve vrste tkiva, polutrajni ili trajni skelet može biti najbolji izbor za zamjenu osnovnih funkcija izgubljenog ili oštećenog tkiva. Općenito, razgradljivi skeleti hidrogelova razvijaju se ugradnjom razgradljivih spojeva i / ili dijelova u polimernu okosnicu. U slučaju biorazgradljivih hidrogelnih skeleta kao važne skupine razgradljivih skeleta, razgradnja se postiže biološkim procesima, uglavnom enzimskom digestijom. Biorazgradljivi skeleti hidrogelova mogu se napraviti i ugradnjom prirodno biorazgradljive ECM komponente, poput hijaluronske kiseline, laminina, fibronektina i kolagena[58]. Na slici 7. prikazana je strukturna formula hijaluronske kiseline.



Slika 7. Strukturna formula hijaluronske kiseline

## 5.2. Biokompatibilnost

Biokompatibilnost je sposobnost materijala da se u organizmu ponaša biološki inertno, to je ključni faktor dizajna konstrukcije tkiva. Drugim riječima pod pojmom biokompatibilnosti podrazumijeva se da se ne smiju odvijati nikakvi ograničavajući, štetni, imunološki, toksični odzivi ili ne smije doći do pojave stranih tijela kao rezultat regenerativne medicinske intervencije. Definicija biokompatibilnosti je posebno relevantna u tkivnom inženjerstvu jer je priroda tkivnih konstrukcija u neprekidnoj interakciji s tijelom tijekom procesa ozdravljenja i stanične regeneracije, a također i tijekom razgradnje skeleta. Ako se ovaj parametar ne uzme u obzir, rezultirajuća hidrogelna matrica može se pokvariti ili može doći do stvaranja ožiljaka na poveznicama tkiva, bilo da su ta tkiva izravno susjedna ili su povezana s krvožilnim sustavom.

Jedan od glavnih izazova za *in vivo* biokompatibilnost skeleta hidrogelova su otrovni ostaci i kemikalije koje se upotrebljavaju pri polimerizaciji ili umreživanju polimera. Ostaci kao što

su neproreagirani monomeri, stabilizatori, inicijatori, organska otapala i emulgatori koji se koriste u priprema hidrogelova, također mogu biti štetni ako procure u zasijane stanice ili tkiva. Na primjer, otkriveno je da često korišteni foto-inicijator slobodnih radikala *Irgacure*, smanjuje vitalnost stanica čak i u ograničenim koncentracijama.

Zbog toga bi hidrogelne skelete razvijene za tkivno inženjerstvo trebalo prije uporabe pročistiti od preostalih nereagiranih opasnih kemikalija. Pročišćavanje se izvodi korištenjem različitih tehnika poput dijalize ili opsežnog pranja otapalom. U nekim slučajevima pročišćavanje hidrogelnih skeleta nije jednostavno ili je čak neizvedivo, kao u slučaju hidrogelova koji se dobivaju geliranjem *in situ*. To je zato što se reaktanti potrebni za sintezu hidrogela ubrizgavaju u tijelo dok su još u prepolimernoj otopini. Stoga, pri postupku *in situ* geliranja treba paziti da su svi sastojci netoksični i razumno sigurni. [59]

### 5.3. Veličina pora i stupanj poroznosti

Hidrogelni skeleti konstruirani za tkivno inženjerstvo moraju biti visoke poroznosti i otvorene međusobno povezane geometrije, kako bi se omogućila velika površina u odnosu na volumen skeleta. Ova visoka, međusobno povezana poroznost će potaknuti rast stanica, ravnomjernu raspodjelu stanica i pomoći obnavljanju staničnih matrica krvožilnog sustava. [60] Na osnovu veličine pora hidrogelovi se dijele na: neporozne (1-10 nm), mikroporozne (10-100 nm), makroporozne (100-1000 nm) [104]. Veličina pora hidrogela predstavlja srednju vrijednost na koju utječu stupanj umreženja hidrogela, kemijska struktura monomera koji ulaze u njihov sastav i vanjski utjecaji kao što su temperatura, pH, tlak i ionska jakost [61], što je prikazano na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz veličine pora u nabubrenom i suhom stanju [61]



Uz stupanj poroznosti važni su i drugi parametri poput veličine pora, volumen pora, raspodjela veličine pora, oblik pora, hrapavost stjenke pora i međusobna povezanost pora. Na primjer, međusobna povezanost pora presudna je za osiguranje da se sve stanice unutar 200  $\mu\text{m}$  opskrbe krvlju kako bi se osigurao prijenos hranjivih tvari i kisika. [98,99] Veličina pora je također vrlo važan parametar, ako su razvijene pore premale, pore blokiraju put stanica, inhibirajući staničnu penetraciju, stvaranje ECM-a i neovaskularizaciju unutarnjeg područja skeleta. Dokazano je da je optimalna veličina pora za neovaskularizaciju 5  $\mu\text{m}$ , 5–15  $\mu\text{m}$  za rast fibroblasta, 20  $\mu\text{m}$  za rast hepatocita, 20–125  $\mu\text{m}$  za regeneraciju kože odraslih sisavaca i 200–350  $\mu\text{m}$  za osteokondukciju. [62]

#### 5.4. Mehanička svojstva

Utvrđeno je da ECM ima određenu razinu izometrijske napetosti između stanica u određenom tkivu, koja varira ovisno o vrsti tkiva i može se mijenjati u procesima bolesti. Također, odgovor pojedinih stanica na promjene u tim napetostima i naprezanjima može varirati od morfoloških promjena do promjena u genskom izražaju. [63] Genski izražaj ili genska ekspresija je ostvarenje informacije iz gena radi proizvodnje genskog proizvoda. Iz tog razloga hidrogelni skelet mora biti dizajniran sa specifičnim mehaničkim svojstvima. Na primjer, zabilježeno je da se krutost hidrogela može koristiti za kontrolu diferencijacije mezenhimskih matičnih stanica. [64]

Jedan od glavnih parametara koji kontrolira mehaničku usklađenost hidrogelnog skeleta je gustoća umreženja. Otkriveno je da promjena gustoće umreženja hidrogela temeljenog na PEG-u uzrokuje promjenu u staničnom rastu i morfologiji. S porastom gustoće umreženja, smanjuje se stupanj bubrenja hidrogela, kao i difuzija molekula otapala i apsorbirane aktivne tvari kroz hidrogel. [65]

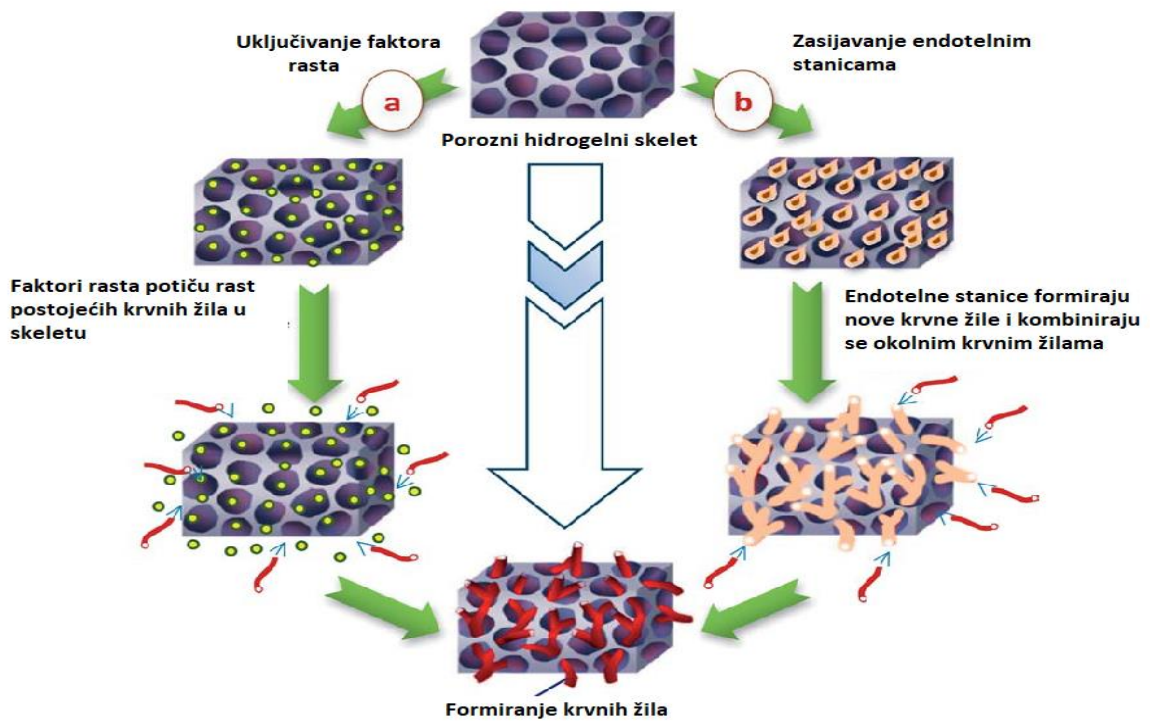
## 5.5.Svojstva površine

Površina skeleta hidrogela početno je i primarno mjesto interakcije s okolnim stanicama i tkivom. Stoga su fizikalno-kemijska i topografska površinska svojstva skeleta glavni parametri u kontroli i utjecaju na staničnu adheziju i proliferaciju. Većina stanica koje se koriste u tkivnom inženjerstvu ovisna je o učvršćivanju i povezanosti koju olakšava hidrogelni skelet. Iz tog razloga, hidrogelni skelet s relativno velikom i pristupačnom površinom je povoljan kako bi se prilagodio broju potrebnih stanica, potreban je kako bi zamijenio ili ponovo uspostavio funkcije tkiva ili organa. Površinska svojstva hidrogela mogu biti selektivno poboljšana raznim pristupima, uključujući taloženje tankih filmova i imobilizaciju adhezivnih molekula poput RGD peptida, faktora rasta (poput bFGF, EGF), inzulina, fibronektina i kolagena. Ovakva izmjena može poboljšati biokompatibilnost hidrogelnog skeleta i prema tome stanice mogu specifično prepoznati skelet. [66]

## 5.6.Vaskularizacija

Vaskularizacija predstavlja raširenost krvnih žila u nekom dijelu tijela, u nekom organu odnosno gustoću krvnih žila i sl. ali i stvaranje krvnih žila na mjestu upale i tumora. Stvaranje novih krvnih žila u odraslom tkivu (neovaskularizacija) je ključni faktor dizajna za većinu inicijativa tkivnog inženjerstva. Međutim, projektiranje odgovarajućeg skeleta koje dopušta i potiče rast novih krvnih žila velik je izazov. Vaskularizirajući skelet trebao bi biti visoke poroznosti, poželjne veličine pora i sadržavati dopuštene dijelove da se vaskularna pregradnja odvija kako tkiva sazrijevaju.

Na primjer, hidrogel na temelju alginata pokazao se vrlo uspješnim pri ponovnoj *in vivo* vaskularizaciji kosti.[67] Općenito postoje dva glavna pristupa za poticanje vaskularizacije skeleta u tkivnom inženjerstvu, kako je prikazano na slici 9. U prvom pristupu, vaskularni čimbenici rasta ugrađeni su u skelet hidrogela da potiču rast krvnih žila u skeletu. Drugi pristup uključuje zasijavanje hidrogelnog skeleta endotelnim stanicama (EC). Koristeći prvi pristup, na primjer želatina, alginat, PEG i hidrogel na temelju hijaluronske kiseline napunjeni s vaskularnim čimbenicima rasta pokazali su uspješno induciran rast mikrožila nakon postupka implantacije. Jedan od ostalih istraženih pristupa za poticanje vaskularizacije skeleta zasnovan je na popunjavanju skeleta novim stanicama endotelnih staničnih gena EPCs.[68]



Slika 9. Shematski prikaz formiranja krvnih žila potaknut: (a) uključivanjem faktora rasta, (b) sjetvom endotelnih stanica u porozni hidrogelni skelet [69]

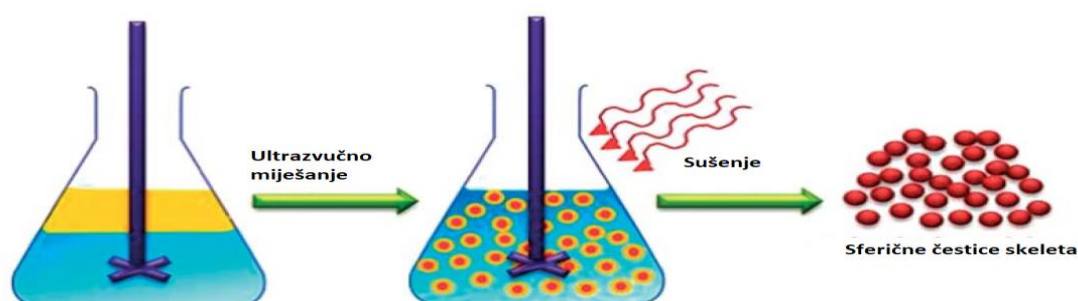
U relativno nedavnoj studiji otkriveno je da hidrogelovi na temelju hijaluronske kiseline mogu održavati ESCs u svom nediferenciranom stanju dok se ne postigne vaskularna diferencijacija.[68]

## 6. METODE IZRADE HIDROGELNOG SKELETA

### 6.1. Emulgiranje

Emulgiranje je najčešće korištena tehnika za proizvodnju hidrogelova nano i mikročestica. Postupak emulgiranja uključuje miješanje višefazne smjese do stvaranja male vodene kapljice preteče hidrogela unutar hidrofobnog medija (poput ulja ili organskog otapala) kako je prikazano na slici 10. Veličina kapljica može se kontrolirati viskoznošću, omjerom mehaničkog miješanja i korištenjem površinski aktivnih tvari koje mogu kontrolirati površinsku napetost između dvije faze kao i sprječavanje agregacije dobivenih hidrogelnih čestica. Kapi preteče hidrogela mogu se umrežiti različitim mehanizmima umreživanja, za proizvodnju sfernih nano ili mikrogelova.

Emulgiranje se može koristiti za razvijanje čestica gela iz širokog spektra prirodnih i sintetskih polimera, kao što su kitozan, polilaktična kiselina, polilaktična ko-glikolna kiselina, kolagen, agaroz i alginat. Čestice gela s inkapsuliranim stanicama mogu se proizvesti dodavanjem stanica u vodenu fazu koja sadrži preteču hidrogela. Emulgiranje se također može upotrijebiti za inkapsuliranje embrijskih matičnih stanica (ESC) unutar hidrogelnih mikročestica kao *in vitro* kulture. Glavna prednost postupka emulgiranja je jednostavnost dobivanja čestica gela. Međutim, emulgiranje također ima niz potencijalnih ograničenja. Na primjer, oblik proizvedenih čestica je sferičan i usprkos mogućnosti kontrole dobivenih veličina, uvijek će postojati široka raspodjela veličine čestica.[70]



Slika 10. Shematski prikaz tehnike emulgiranja za potrebe tkivnog inženjerstva [71]

## 6.2.Liofilizacija

Liofilizacija je proces sušenja u smrznutom stanju radi očuvanja strukture bjelančevina, biološki aktivnih sastojaka ili živih mikrobnih stanica. Proces ovisi o brzini hlađenja uzorka koje uzrokuje termodinamičku nestabilnost unutar uzorka, što dovodi do svojevrsnog razdvajanja faza. Nakon čega slijedi sublimacija otapala (u vakuumu), ostavljajući iza sebe praznine i pore. Taj se pristup široko koristio za proizvodnju poroznih hidrogelnih matrica u tkivnom inženjerstvu.

Razvijena je metoda koja uključuje ponavljanje ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja kako bi se izbjeglo nepotpuno odvajanje faza tijekom početnog koraka zamrzavanja što može dovesti do stvaranja polimerom siromašne faze unutar skeleta. Ponavljanje koraka zamrzavanja omogućava daljnje odvajanje faze siromašne polimerom unutar pora matrice, tvoreći novu razrijeđenu fazu polimera i više koncentriranu fazu bogatu polimerom što posljedično omogućava stvaranje većih pora. [72]

Unatoč pogodnosti liofilizacije za izradu poroznih skeleta, ova tehnika pokazuje poteškoće u preciznom podešavanju veličine pora i zahtjeva relativno dugo vrijeme obrade, a rezultira relativno lošim mehaničkim svojstvima. Uz to, liofilizacija često dovodi do stvaranja površinske lože (engl. surface skin) zbog narušavanja matrice na granici faza skelet- zrak što rezultira promjenom međufazne napetosti koja se javlja tijekom isparavanja otapala. [73]

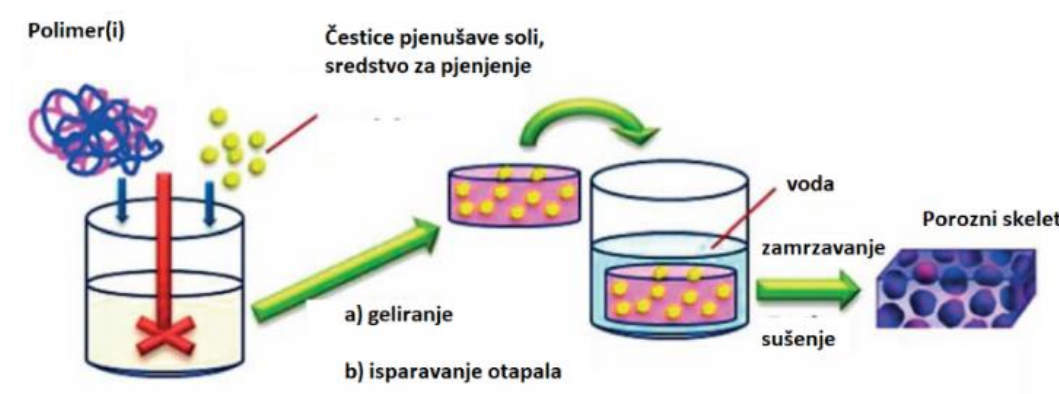
## 6.3. Metoda lijevanja i ispiranja otapala

Metoda lijevanje-ispiranje otapala može se smatrati najjednostavnijom tehnikom za izradu poroznih skeleta gotovo jednakih veličina pora. Postupak uključuje lijevanje organske otopine polimera koja sadrži čestice soli, nakon čega slijedi isparavanje otapala i otapanje uhvaćenih čestica soli u vodi. Ovaj pristup ima i nedostatke jer rezultirajući skelet može sadržavati ostatke soli. Ova se tehnika može koristiti i za izradu skeleta od tankih filmova. Izradom tankih membrana skeleta s morfologijom ostvarenih ćelija zabilježena je relativno visoka poroznost (do 93%). [74]

## 6.4.Plinsko pjenjenje

U ovoj se metodi pjenušava sol koristi kao sredstvo za pjenjenje kako bi se razvila porozna struktura skeleta. Kao što je prikazano na slici 11, polimerni gel koji sadrži homogeno dispergirane čestice soli, poput amonijevog bikromata, lijeva se u prikladan kalup, nakon čega slijedi uranjanje u vruću vodu. Razvijaju se ugljični dioksid i amonijak, nakon čega slijedi ispiranje zaostalih čestica amonij bikromata iz očvrnulog hidrogela što dovodi do stvaranja porozne matrice s velikom međusobnom povezanošću pora.

Skelet koji je rezultat ovog pristupa pokazao je makroporoznu otvorenu ćelijastu strukturu s jednakim veličinama pora u rasponu od 100 do 200  $\mu\text{m}$ . Metoda je dodatno modificirana dodatkom limunske kiseline u vruću vodu prije potapanja gel kalupa. Limunska kiselina reagira s amonij bikromatom olakšavajući razvitak plinova što rezultira stvaranjem makroporoznih skeleta s više od 90% poroznosti i veličine pora do 200  $\mu\text{m}$ . U ovoj modificiranoj metodi poroznost i mehanička svojstva mogu se kontrolirati podešavanjem brzine razvijanja plinova i kontroliranjem brzine reakcije između dvije soli. [75]



Slika 11. Shematski prikaz tehnike plinskog pjenjenja za izradu poroznog skeleta [75]

## 6.5.Fotolitografija

Tehnika fotolitografije razvijena je posebno za primjene mikro i nano-elektronike. U novije vrijeme fotolitografija je korištena na razini biomedicinske primjene za razvoj mikroinženjerskih hidrogelova. Djelomično je to omogućeno pripremom različitih prirodnih i sintetskih foto- umreženih polimera koji se mogu povezati u obliku hidrogela. [76]

Fotolitografija ovisi o izloženosti tankog filma foto- osjetljive smole UV svjetlu kroz masku. Kako svjetlost dospije do fotoosjetljive smole kroz prozirna područja maske dolazi do fotoreakcije koja umreživa polimer. Koriste se i druge slične tehnike za razvijanje hidrogelnih matrica kroz fokusiranje i skeniranje svjetla. Na primjer, razvoj foto- umreženih matrica koje koriste plavo svjetloza umreživanje dodatno je poboljšao i povećao sigurnost ove tehnologije za potrebe tkivnog inženjerstva. [57]

U sličnoj tehnici fotolitografije poznatoj kao *litografija laserskim skeniranjem*, lasersko svjetlo primijenjeno je za umreživanje fotoosjetljivih hidrofilnih polimera na određenim mjestima. Uz pomoć sličnih strategija moguće je konstruirati 3D složeni skelet tkiva jedan po jedan sloj. Nadalje, koncentrirana svjetlost upotrebljena je i za spajanje bioaktivnih dijelova sa i/ ili unutar unaprijed proizvedenim hidrogelnim skeletom. Na primjer, ova se metoda koristi za uzorak fotoaktivnih RGD peptida unutar hidrogela na temelju agaroze za razvoj adhezivnih putova, kako bi se omogućila usmjerenost migracija stanica u hidrogel.

Unatoč značaju fotolitografije kao tehnike izrade hidrogelnih skeleta, ona ima neke potencijalne nedostatke koji uključuju potrebe za foto- umreženim polimerima i štetne učinke UV svjetla na staničnu funkciju. Budući da je fotolitografija u osnovi dvodimenzionalna metoda, ona razvija matrice koje će možda trebati daljnju obradu kako bi se generirano 3D skelet. [77]

## 6.6. Elektropredenje

Elektropredenje je jedna od najznačajnijih tehnika koja se koristi za izradu poroznih skeleta za potrebe tkivnog inženjerstva. Tehnika elektropredenja posebno ovisi o upotrebi vanjskog električnog polja za dobivanje mikrovlakna iz nabijene polimerne otopine na kraju kapilarne cijevi. Punjenje polimera postiže se primjenom visokog napona, a zatim se izvlači kao tanka mlazna nit prema nasuprot nabijenoj ploči ili rotirajućem kolektoru prema željenoj orijentaciji prikupljenog vlakna. Karakteristike rezultirajućih vlakana, poput promjera, morfologije i poroznosti, mogu se kontrolirati podešavanjem parametara obrade uključujući primijenjeni napon, temperaturu, viskoznost i vodljivost polimerne otopine.

Elektropredenje se koristi za razvoj različitih vrsta hidrogelnih skeleta poput ultrafinih (submikronskih) poroznih vlaknastih hidrogelova temeljenih na kombinaciji poliakrilne kiseline i polivinilnog alkohola (PVA). [78] Korištenje elektropredenja u tkivnom inženjerstvu

još je uvijek ograničeno zbog mnogih nedostataka, poput ograničene kontrole poroznosti i veličine pora, relativno loših mehaničkih svojstava i posebno zbog nemogućnosti ove tehnike da izradi 3D hidrogelni skelet. [79]

## 6.7. Mikrooblikovanje

Mikrooblikovanje je još jedna tehnika koja može stvoriti hidrogelove s kontroliranom veličinom i poroznošću. Ova tehnika postala je posebno atraktivna s razvojem lake litografije, koja je omogućila jednostavnu izradu kalupa na temelju poli(dimetil siloksana) iz prefabriciranih silicijskih rezina, kao i razvoj kontroliranih struktura mikro-kalupa nanočestica na temelju fluora. U ovoj tehnici, za razvoj mikro-kalupa hidrogela, polimerni prekursori hidrogela se u početku oblikuju, a zatim geliraju kako bi se dobile strukture različitih oblika, morfologije i veličine. [80]

Mikrooblikovanje se koristi za proizvodnju mikroinženjerskih hidrogelova iz različitih polimera poput kitozana, PEG-a i hijaluronske kiseline. Međutim, ova tehnika nije mogla proizvesti mikroinženjerske hidrogelove kontroliranih karakteristika iz polimera poput fibrina i alginata koji zahtijevaju dodavanje gelirajućih sredstava kao što su dvovalentni i polivalentni ioni.

Kako bi se izbjegao ovaj nedostatak, primjenjena je nova metoda koja uključuje mikrokalupiranje alginatnih hidrogelova koristeći druge gelove kao predloške. U ovoj metodi polimerni gel prekursor se u početku formira uporabom hidrogelnog kalupa, nakon čega se dodaje sredstvo za umreživanje preko kalupa da se dobivene matrice umreže u novi gel. Pomoću ovog postupka izrađene su i postoje alginatne mikrostrukture, otkrivena je sposobnost inkapsuliranja stanica unutar kontroliranih struktura.

Mikrooblikovanje je također uspješna tehnika u razvoju 3D međusobno povezanih makroporoznih hidrogelnih matrica, gdje su hidrogelne strukture nastale oko nabijenih slojeva polimernih kuglica, koje su se nakon toga otopile. Hidrogelovi smikrofluidnim kanalima unutar njihovih struktura razvijeni su uz pomoć predloška na temelju otopljene želatine. [81]



## 6.8. 3D tiskanje organa/ tkiva

Trodimenzionalno (3D) tiskanje organa/ tkiva novi je pristup u tkivnom inženjerstvu, a temelji se na slojevitom ili kapljičnom taloženju hidrogela s inkapsuliranim stanicama. Brz prototip izveden ovom tehnikom je djelotvoran u razvoju 3D skeleta s unaprijed osmišljenim vanjskim oblikom i unutrašnjom morfologijom, a također i s određenim smještajem stanica.

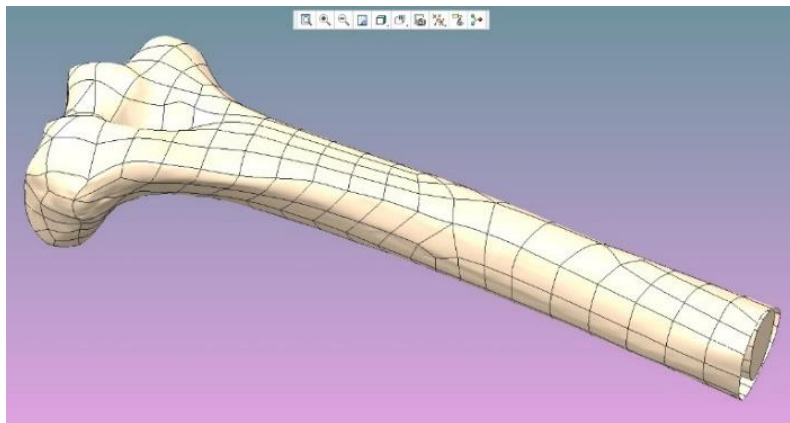
U ovoj tehnici računalno potpomognuto dizajniran implantat, stroj brzo prevodi u slojeviti, stanicama infiltrirani hidrogel s unaprijed definiranim vanjskim oblikom i unutarnjom morfologijom a koristi se za daljnju upotrebu u *in vitro* modelu ili u *in vivo* cijepjenju. To se može postići upotrebom više glava za ispis, a svaka sadrži određenu vrstu stanica i/ ili hidrogela, što omogućava tiskanje hidrogelnih nacrti. [82]

Računalna tehnologija duboko prodire u sferu mehaničkog i biomehaničkog ispitivanja proizvoda pa je tako moguće računalnim pristupom ispitati biomehaničku stabilnost implantata metodom konačnih elemenata. Aditivna proizvodnja popularno se naziva 3D print tehnologija i ona je stvorila revoluciju u proizvodnji medicinskih implantata zbog svoje brzine, točnosti i ekonomičnosti. Ova tehnologija se koristi CAD modelom implantata na osnovi kojeg se izrađuje gotov titanijev proizvod te se upotrebljava u raznim sektorima *hi-tech* industrije, a posljednjih se godina iznimno brzo širi u medicini, odnosno industriji medicinskih proizvoda. Na slici 12. je digitalan prikaz kosti izrađen u CAD-u.[83]

Jedan od izazova suvremene regenerativne medicine koji se nastoji riješiti biotiskanjem jest popravak oštećenja hrskavice koja nastaju kao posljedica osteoartritisa, starenja i ozljeda zglobova. Danas uobičajeni klinički tretmani vrlo su invazivni, komplicirani i ne obnavljaju hrskavicu trajno. Trenutne strategije popravka hrskavice koljena uključuju proces uklanjanja zdravog tkiva oko područja lezije čime se stvaraju umjetni defekti za buduću implantaciju. Taj postupak uzrokuje dodatnu nekrozu postojećeg tkiva te konačnu degeneraciju hrskavice i implantata. Direktni popravak hrskavice na mjestu lezije, bez ikakvog dodatnog oštećenja postojećeg tkiva, projektiranim tkivom koje blisko oponaša i integrira se s prirodnom hrskavicom, predstavlja pogodno rješenje. Takav popravak mora biti prilagodljiv promjenjivim fizičkim dimenzijama i svojstvima tkiva. Te mogućnosti pruža tehnologija biotiskanja temeljena na tintnom ispisu. „Standardni termalni tintni pisač" je modificiran za precizno polaganje hondrocita i polietilenglikol dimetilakrilata (PEGDMA) sloj po sloj na oštećenje hrskavice.

Znanstvenici rade na 3D pisaču koji bi koristio hidrogel što se kod „običnih“ pisača koristi patrona s tintom. Kako tijelo pacijenta ne bi odbacilo umjetno tkivo, u hidrogelovima bi se u idealnom slučaju trebale naći i pacijentove „prirodne“ stanice. U budućnosti bi se mogle koristiti i matične stanice. [84]

Glavni zahtjevi za hidrogelove u uporabi za 3D tiskanje tkiva i organa, uz to što ne smiju biti citotoksični, uključuju: očuvanje tiskanog oblika i unutarnje morfologije nakon taloženja, pružanje adekvatne stabilnosti i mehaničkih svojstava za *in vivo* implantaciju, očuvanje održivosti i funkcionalnosti stanica te jednostavnost rukovanja tiskanim skeletima. Većina tih hidrogelova pokazala je neke nedostatke, poput nedostatka adhezivnosti, ograničenih mehaničkih svojstava i nestabilnosti u kulturi stanica.



Slika 12. Digitalan prikaz kosti u CAD-u [85]

## 7. HIDROGELOVI U INŽENJERSTVU SRČANOG TKIVA

Zbog svoje mekoće i viskoelastičnosti hidrogelovi su korišteni kao potporne matrice u inženjerstvu srčanog tkiva odnosno kao dostavljač stanica u infarktni srčani mišić. Ti hidrogelovi ne samo da održavaju stanice u infarktnom području već nude i podršku za obnavljanje stresa miokardnog zida, opstanak i funkcioniranje stanica.

Kitozan, kolagen, laminin, želatina, matrigel, natrijev alignat i hijaluronska kiselina (hijaluronan) najčešći su korišteni prirodni polimeri u razvoju hidrogela za primjenu u inženjerstvu srčanog tkiva. Ti prirodni polimeri imaju strukture vrlo slične molekulama u biološkim organizmima, čime smanjuju mogućnost imunološkog odziva kada se ugrađuju *in vivo*.

Sintetski polimeri koji se koriste za razvoj hidrogelnih matrica u inženjerstvu srčanog tkiva uključuju polilaktid (PLA), kopolimer polilaktid-ko-glukolne kiseline (PLGA), poli(etilen glikol)9 (PEG), polikaprolaktan (PCL), poliuretan (PU) i poliakrilamid (PAAm). Upotreba sintetskih polimera je povoljnija u odnosu na prirodne polimere zbog jednostavnog prilagođavanja njihovih fizikalno- kemijskih svojstava, poput afiniteta prema vodi, modula i brzine degradacije. Međutim, potencijalna citotoksičnost, glavna je briga kada se koriste sintetski polimeri. Do danas samo PLA, PEG i PLGA su odobreni od FDA ( U.S. Food and Drug Administration) za kliničku primjenu, ali za neke druge polimere kao što su PU i PAAm već je utvrđeno da nisu toksični *in vivo* i *in vitro*. [86]

### Primjer 1.

Tijekom posljednjeg desetljeća razvijene su mnoge hidrogelne matrice za potrebe inženjerstva srčanog tkiva. Stvoren je hidrogel miokarda svinja koji se može injektirati, koji podnosi preživljavanje kardiomiocita i migraciju EC-a i SMC-a *in vivo*. Daljnja *in vivo* studija otkrila je infiltraciju EC-a i SMC-a u hidrogel i pokazala da to poboljšava vaskularizaciju unutar hidrogelnih matrica. [87]

### Primjer 2.

U femoralnu arteriju odraslih štakora u kojoj su naseljeni nenotalni kardiomiociti, ugrađena je šuplja cijev punjena fibrinskim hidrogelom. Hidrogel je 3 tjedna nakon implantacije formirao zrelo srčano tkivo s relativno gustom kapilarnom mrežom. Rezultirajuće srčano tkivo pokazalo je sve normalne srčane funkcije, uključujući kontraktilnost pod električnom stimulacijom i sinkronim kodom s vanjskim električnim signalom. Kontraktilnost s normalnim sposobnostima kod štakora održala se je oko 2 mjeseca. [88]

### Primjer 3.

Matrigel, ECM-oponašajući hidrogel proizveden pomoću mišjih tumora Engelbreth-Holm-Swarm, korišten je kao nosilac za isporuku genetski modificiranih ljudskih MSC-a u infarktno srce. Istraživanje je pokazalo da se preživljavanje MSC-a značajno poboljšalo u ishemijskom i apoptičkom okruženju. [89] Apoptoza je programirana srčana smrt posredovana mehanizmom čije su upute sadržane u genomu, a koja dovodi do skraćivanja i zgušnjavanja stanice, razgradnje citoskelea te uništenja genskog materijala.

## 8. ZAKLJUČAK

Hidrogelovi su polimerni sustavi koji nastaju fizikalnim ili kemijskim umreživanjem polimernih lanaca što dovodi do stvaranja porozne trodimenzionalne strukture. Upotreba hidrogelova na temelju polimera u naprednim terapijskim sustavima s kontroliranim oslobađanjem lijeka sve je veća i sve se više primjenjuje u tkivnom inženjerstvu. Razlog tome je što hidrogelovi imaju zanimljiva svojstva kao što su pseudoplastično ponašanje, sposobnost upijanja i vezanja vode, bubrenje, biorazgradljivost, biokompatibilnost itd. Hidrogelovi s obzirom na svoju konzistentnost nalikuju prirodnom tkivu čovjeka više od bilo kojih drugih sintetičkih biomaterijala zbog čega su pronašli veliku primjenu u biomedicinskom području kod dizajniranja i izrade umjetnog tkiva, umjetne kože, obloga za umjetno srce, membrana za biosenzore, kontaktne leće i slično, ali i omogućuju bolji transport kisika i hranjivih tvari, pospješuju regeneraciju tkiva i potiču brži oporavak nakon ozljede ili transplantacije.

Postoje razne tehnike izrade hidrogelova za potrebe tkivnog inženjerstva, pri čemu se one s vremenom razvijaju i usavršavaju. Najkompleksnija metoda koja će u budućnosti vjerojatno dati najbolje rezultate je metoda 3D tiskanja organa ili tkiva, u kojoj se pomoću „softvera“ osmišljava i dizajnira hidrogel s odgovarajućim svojstvima. Upotreba hidrogelova u medicinskim primjenama dala je do sada dobre rezultate zbog čega će se u budućnosti raditi na njihovom usavršavanju, novim sintezama, otkrićima i primjenama kako u tkivnom inženjerstvu tako i u drugim granama medicine i farmaceutske industrije.

## LITERATURA

- [1] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004; 428:487–492.
- [2] Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. 2001;101(7): 1869–1879.
- [3] Kyung JH, Yeon KS, Jeong KS, Moo LY. pH / temperature-responsive semi-IPN hydrogels composed of alginate and poly(N-isopropylacrylamide). *J Appl Polym Sci*. 2002;83:128–136.
- [4] Rosanne Raftery, Fergal J. O'Brien, Sally-Ann Cryan, Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications *Molecules* 2013
- [5] Rainer Detsch, Bapi Sarker, Tobias Zehnder, Gerhard Frank, Aldo R. Boccaccini, *Advanced alginate-based hydrogels*, 2015.
- [6] Guenet JM. *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers*. New York: Academic Press; 1992;p.89
- [7] In: Markey ML, Bowman ML, Bergamini MY, eds. *Chitin and chitosan*. London: Elsevier Appl. Sci; 1989;p.713.
- [8] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50:27–46.
- [9] Gutowska A, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Heparin release from thermosensitive hydrogels. *J Control Release*. 1992;22:95–104.
- [10] Ferreira L, Vidal MM, Gil MH. Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values. *Int J Pharm*. 2000;194:169–180.
- [11] D'Emanuele A, Staniforth JN. An electrically modulated drug delivery device: I. *Pharm Res*. 1991;8:913–918.
- [12] B. Jeong, S. W. Kim, Y. H. Bae, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 37–51, doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00242-3).
- [13] A. Richter, G. Paschew, S. Klatt, J. Lienig, K. Ardt, H. P. Adler, *Sensors*, 8 (2008) 561–581
- [14] L. Chia-Fen, W. Shia-Jen, L. Chia-Lung, C. Wen-Yen, *Journal of Polymer Science*, 42 (2004) 3029–3037
- [15] N Buehler MJ. Molecular nanomechanics of nascent bone: fibrillar toughening by mineralization. *Nanotechnology*. 2007;18:295102.

- [16] Adams DJ, Holtzmann K, Schneider C, Butler MF. Self-assembly of peptide surfactants. *Langmuir*. 2007;23:12729–12736.
- [17] Guler MO, Stupp SI. A self-assembled nanofiber catalyst for ester hydrolysis. *J Am Chem Soc*. 2007;129:12082–12083.
- [18] Williams BAR, Lund K, Liu Y, Yan H, Chaput JC. Self-assembled peptide nanoarrays: an approach to studying protein-protein interactions. *Angew Chem Int Ed*. 2007;46:3051–3054.
- [19] Guler MO, Soukasene S, Hulvat JF, Stupp SI. Presentation and recognition of biotin on nanofibers formed by branched peptide amphiphiles. *Nano Lett*. 2005;5:249–252.
- [20] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*. 2001;294:1684–1688.
- [21] Klech CM. Gels and jellies. In: Swarbrick J, Boylan JC, eds. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*: Marcel Dekker, New York; 1990:p.415.
- [22] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, *Hydrogels for medical and related applications*, ACS Publications, Washington DC, 1976.
- [23] J.M. Rosiak, P. Ulanski, Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution, *Radiat Phys Chem*, 55 (1999) 139-151.
- [24] Y. Osada, J.P. Gong, Y. Tanaka, Polymer gels, *J Macromol Sci-Pol R*, C44 (2004) 87-112.
- [25] Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y. Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J Neurosurg*. 1997;86:871–875.
- [26] Shantha KL, Harding DRK. Synthesis and evaluation of sucrose-containing polymeric hydrogels for oral drug delivery. *J Appl Polym Sci*. 2002;84:2597–2604.
- [27] El-Sherbiny IM, Lins RJ, Abdel-Bary EM, Harding DRK. Preparation, characterization, swelling and in vitro drug release behaviour of poly[N-acryloyl]glycine-chitosan] interpolymeric pH and thermally-responsive hydrogels. *Eur Polym J*. 2005;41:2584–2591.
- [28] Kunzier JF. Hydrogels. In: Hoboken NJ, ed. *Encyclopedia of polymer science and technology*. vol 2. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey; 2003:p.691.
- [29] Rosiak JM, Ulanski P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. *Radiat Phys Chem*. 1999;55:139–151.
- [30] Jabbari E, Nozari S. Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by g-radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution. *Eur Polym J*. 2000;36:2685–2692.

- [31] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliver Rev*, 54 (2002) 13-36.
- [32] Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y. Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J Neurosurg*. 1997;86:871–875.
- [33] Anal AK, Stevens WF. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm*. 2005;290:45–54.
- [34] Nakashima T, Takakura K, Komoto Y. Thromboresistance of graft-type copolymers with hydrophilic-hydrophobic microphase-separated structure. *J Biomed Mater Res*. 1977;11:787–798.
- [35] Peppas NA, Kim B. Stimuli-sensitive protein delivery systems. *J Drug Del Sci Technol*. 2006;16:11–18.
- [36] S. Dumitriu, *Polymeric biomaterials*, Second ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 2002.
- [37] S. Dumitriu, *Polymeric biomaterials*, Second ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 2002.
- [38] Đurđica Španiček, *Časopis „Polimeri“*, Zagreb, 2011. str. 33.
- [39] Guyton A, Hall J. *Textbook of medical physiology*. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2000:p.1064.
- [40] D.L. Fedlheim, C.A. Foss, *Metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications* Marcel Dekker, Inc, New York, 2002.
- [41] M. Ip, S.L. Lui, V.K.M. Poon, I. Lung, A. Burd, Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison, *J Med Microbiol*, 55 (2006) 59-63.
- [42] K. Szczepanowicz, J. Stefanska, R.P. Socha, P. Warszynski, Preparation of silver nanoparticles via chemical reduction and their antimicrobial activity, *Physicochem Probl Mi*, 45 (2010) 85-98.
- [43] J. Zhang, X.D. Wang, B.H. Zhao, C.X. Li, Facile synthesis of narrowly dispersed silver nanoparticles in hydrogel, *Chem Lett*, 35 (2006) 40-41.
- [44] Y.M. Mohan, K. Lee, T. Premkumar, K.E. Geckeler, Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications, *Polymer*, 48 (2007) 158-164
- [45] Y.M. Mohan, T. Premkumar, K. Lee, K.E. Geckeler, Fabrication of silver nanoparticles in hydrogel networks, *Macromol Rapid Comm*, 27 (2006) 1346-1354.



- [46] Y.Q. Xiang, D.J. Chen, Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly (HEMA-PEGMA-MAA) composite hydrogel, *Eur Polym J*, 43 (2007) 4178-4187.
- [47] Cruise GM, Hegre OD, Lamberti FV, Hager SR, Hill R, Scharp DS, Hubbell JA. In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant*. 1999;8(3):293–306.
- [48] Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31:5536–5544.
- [49] Shin H, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24:4353–4364.
- [50] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24:4385–4415.
- [51] Hill-West JL, Chowdhury SM, Slepian MJ, Hubbell JA. Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(13):5967–5971.
- [52] Hill-West JL, Dunn RC, Hubbell JA. Local release of fibrinolytic agents for adhesion prevention. *J Surg Res*. 1995;59:759–763.
- [53] Sawhney AS, Pathak CP, van Rensburg JJ, Dunn RC, Hubbell JA. Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:831–838.
- [54] Bergmann NM, Peppas NA. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog Polym Sci*. 2008;33:271–288.
- [55] Lu SX, Ramirez WF, Anseth KS. Photopolymerized, multilaminated matrix devices with optimized nonuniform initial concentration profiles to control drug release. *J Pharm Sci*. 2000;89:45–51.
- [56] Guyton A, Hall J. *Textbook of medical physiology*. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2000:p.1064.
- [57] Elisseff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Langer R. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:3104–3107.
- [58] Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14(5):551–558.
- [59] Bryant SJ, Nuttelman CR, Anseth KS. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11:439–457.

- [60] Le´on CA, Le´on Y. New perspectives in mercury porosimetry. *Adv Colloid Interface Sci.* 1998;76-77:341–372.
- [61] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, K. Nawrotek, Drug release from hydrogel matrices, *Ecol Chem Eng S*, 17 (2010) 9-28.
- [62] Whang K, Healy KE, Elenz DR. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng.* 1999;5(1):35–51.
- [63] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006;20:811–827.
- [64] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126:677–689.
- [65] Bryant SJ, Anseth KS, Lee DA, Bader DL. Crosslinking density influences the morphology of chondrocytes photoencapsulated in PEG hydrogels during the application of compressive strain. *J Orthop Res.* 2004;22:1143–1149.
- [66] Elbert DL, Hubbell JA. Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Ann Rev Mater Sci.* 1996;26(1):365–394.
- [67] Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. In vivo engineering of organs. The bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:11450–11455.
- [68] Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:11298–11303.
- [69] Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials.* 2010;31:5536–5544.
- [70] Magyar JP, Nemir M, Ehler E, Suter N, Perriard JC, Eppenberger HM. Mass production of embryoid bodies in microbeads. *Ann NY Acad Sci.* 2001;944:135–143.
- [71] Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78(4):442–453.
- [72] Stokols S, Tuszynski MH. The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials.* 2004;25:5839.
- [73] Ricciardi R, D’Errico G, Auriemma F, Ducouret G, Tedeschi AM, De Rosa C, Laupretre F, Lafuma F. Short time dynamics of solvent molecules and supramolecular organization of poly (vinyl alcohol) hydrogels obtained by freeze thaw techniques. *Macromolecules.* 2005;38:6629.
- [74] Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials.* 1993;14:323–330.

- [75] Yoon JJ, Park TG. Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res.* 2001;55:401–408.
- [76] Peppas N, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in biology and medicine. *Adv Mater.* 2006;18:1–17.
- [77] Luo Y, Shoichet MS. A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat Mater.* 2004;3:249–253.
- [78] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 2006;12:1197.
- [79] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Dhanasopon AP, Rofail F, Smith H, Wu BM, Shemin R, Beygui RE, Maclellan WR. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29:2907.
- [80] Fukuda J, Khademhosseini A, Yeo Y, Yang X, Yeh J, Eng G. Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. *Biomaterials.* 2006;27(30):5259–5267.
- [81] Stachowiak AN, Bershteyn A, Tzatzalos E, Irvine DJ. Bioactive hydrogels with an ordered cellular structure combine interconnected macroporosity and robust mechanical properties. *Adv Mater.* 2005;17(4):399–403.
- [82] Smith CM, Stone AL, Parkhill RL. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng.* 2004;10:1566–1576.
- [83] Topčić Alan i Cerjaković Edin, *Izrada prototipa*, Tuzla, 2014, str. 64;
- [84] Mešić Dino, *Aditivni postupci u medicini*, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2014, str. 214;
- [85] <http://www.izit.hr/novosti/primjena-3d-tehnologija-u-medicini/>, (pristup 24.08.2019.)
- [86] Birla RK, Borschel GH, Dennis RG, Brown DL. Myocardial engineering in vivo: Formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue. *Tissue Eng.* 2005;11:803–813.
- [87] Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30:5409–5416.
- [88] Birla RK, Borschel GH, Dennis RG, Brown DL. Myocardial engineering in vivo: Formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue. *Tissue Eng.* 2005;11:803–813.
- [89] Birla RK, Borschel GH, Dennis RG, Brown DL. Myocardial engineering in vivo: Formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue. *Tissue Eng.* 2005;11:803–81

