

Primjena diferencijalne pretražne kalorimetrije u karakterizaciji materijala iz biogenog izvora

Fučak, Sabina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:016309>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Sabina Fućak

**Primjena diferencijalne pretražne kalorimetrije u karakterizaciji
materijala iz biogenog izvora**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Gordana Matijašić
doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović
izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

Zagreb, rujan 2023.

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

ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Gordani Matijašić na neizmjernej pomoći i strpljenju pri pisanju ovog završnog rada.

Zahvaljujem asistentici Teodori Prebeg, mag. ing. cheming. na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela i pisanju rada. Veliko hvala za sav uloženi trud, vrijeme, svaki savjet, lijepoj riječi i prenesenom znanju.

Zahvaljujem mami Sanji, tati Goranu, baki i Tataju na neizmjernej ljubavi, podršci i svim savjetima kroz cijeli život i školovanje bez kojih ništa ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem sestri, cimerici i najboljoj prijateljici Katarini koja je uvijek bila tu uz mene i bila u brizi i panici za svaki moj ispit.

Zahvaljujem svom dečku Teu na neizmjernej podršci tijekom cijelog studiranja, svakoj riječi utjehe i strpljenju u stresnim trenucima pripremanja i polaganja ispita.

Zahvaljujem i svojoj kolegici Lauri koja je sa mnom prošla sve lijepe, a i teške trenutke na faksu, bila mi podrška pri polaganju svakog ispita i uljepšala mi studentske dane.

SAŽETAK

Porast štetnih životnih navika uzrokuje sve veći broj jetrenih oboljenja što povećava potrebu za transplantacijom ili popravkom oštećenog tkiva. Decelularizacija prirodnih tkiva obećavajuća je metoda za dobivanje trodimenzionalne mreže za regeneraciju tkiva jer se zadržavaju prirodna struktura i komponente što predstavlja bitni čimbenik za preživljavanje stanica. Vrlo je bitno razviti metodu decelularizacije koja će dovoljno dobro ukloniti stanice, a opet sačuvati komponente izvanstanične matrice.

Za decelularizaciju jetrenog tkiva korištena su dva detergenta, natrijev lauret sulfat (SLES) i natrijev lauril sulfat (SDS). U protokolima decelularizacije ispitan je utjecaj vremena izmjene medija i koncentracije detergenata te je uključena i dodatna obrada ultrazvukom u trajanju od 1, 2, 4 i 8 sati. U uzorcima su nakon decelularizacije kvantificirane biološke komponente: DNK, kolagen i glikozaminoglikani. Uzorci su nakon decelularizacije podvrgnuti digestiji te liofilizaciji. Razlikovna pretražna kalorimetrija provedena je na uzorcima nakon decelularizacije i digestije te su utvrđene vrijednosti normalizirane entalpije te početne i maksimalne temperature denaturacije.

Dobiveni rezultati pokazuju da je uzorak SDS 1a, obrađen natrijevim lauril sulfatom koncentracije 1 % s vremenom izmjene medija 30 minuta, najpogodniji za daljnja ispitivanja primjene u 3D tisku. Unatoč literaturnim podacima koji ukazuju na povezanost entalpije i temperatura denaturacije s udjelom kolagena, u provedenim mjerenjima nije uočena direktna povezanost što može biti posljedica prisutnosti drugih tvari osim kolagena.

Ključne riječi: decelularizacija, natrijev lauret sulfat, natrijev lauril sulfat, izvanstanična matrica

ABSTRACT

Application of differential scanning calorimetry in the characterization of biogenic material

The prevalence of unfavorable lifestyle habits is leading to a growing incidence of liver disease, increasing the need for transplantation or repair of damaged tissue. Decellularization of natural tissue is a promising method to maintain a three-dimensional network for tissue regeneration, as the natural structure and components are preserved, which is an essential factor for cell survival. It is of utmost importance to develop a decellularization method that removes the cells well enough and still preserves the components of the extracellular matrix.

Two detergents have been used for decellularization of liver tissue – sodium laureth sulfate (SLES) and sodium lauryl sulfate (SDS). In the decellularization protocols, the influence of medium exchange time and detergent concentration was investigated and additional ultrasound treatment was included for 1, 2, 4, and 8 hours. After decellularization, the biological components in the samples were quantified: DNA, collagen, and glycosaminoglycans. After decellularization, the samples were subjected to a digestion process and freeze-dried. After decellularization and digestion, the samples were subjected to differential scanning calorimetry and the values of normalized enthalpy and initial and maximum denaturation temperatures were determined.

The results obtained show that the sample SDS 1a, treated with sodium lauryl sulfate at a concentration of 1% with a medium change of 30 minutes, is the most suitable for further testing for application in 3D printing. Despite evidence of a relationship between enthalpy and denaturation temperatures with collagen content, no direct relationship was found in the measurements, which could be due to the presence of substances other than collagen.

Key words: decellularization, sodium laureth sulfate, sodium lauryl sulfate, extracellular matrix

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Inženjerstvo tkiva	2
2.2. Biomaterijali	3
2.3. Nosači	6
2.4. Izvanstanična matrica	7
2.5. Metode karakterizacije materijala na temelju ECM-a	9
2.6. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Priprema hidrogelova	12
3.1.1. Decelularizacija jetre	12
3.1.2. Digestija tkiva.....	13
3.2. Metode karakterizacije	14
3.2.1. Kvantifikacija bioloških komponenata	14
3.2.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Kvantifikacija bioloških komponenata	15
4.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija	17
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA	26

1. UVOD

Danas se pacijenti s bolesnim i oštećenim organima često liječe transplantacijom organa. Međutim, broj donatora organa se smanjuje dok se broj novih slučajeva oboljenja organa povećava. Tkivno inženjerstvo je novo znanstveno područje koje kombinira znanost o materijalima sa staničnom biologijom i jedno je od glavnih područja regenerativne medicine. Bavi se razvojem bioloških nadomjestaka koji mogu zamijeniti oštećena ili bolesna tkiva, čime se smanjuju problemi s kojima se suočava tradicionalna transplantacija, kao što je imunološko odbacivanje. Kako bi se pripravilo tkivo potrebno je osigurati odgovarajuće stanice, trodimenzionalno okruženje što sličnije prirodnom, najčešće u obliku poroznog nosača, i faktore rasta. Stanica sintetizira novo tkivo dok nosač osigurava odgovarajuće okruženje. Biomaterijali imaju važnu ulogu u inženjerstvu tkiva, proizvode se kao zamjena prirodnom tkivu, oponašajući biološke i mehaničke funkcije prirodne izvanstanične matrice (ECM, eng. *extracellular matrix*). ECM se sastoji od strukturnih i funkcionalnih molekula koje izlučuju stanice svakog tkiva te je stoga trodimenzionalna struktura i biokemijski sastav ECM-a različit za svaki tip tkiva. [1]–[3] Decelularizacija prirodnih tkiva jedan je od obećavajućih načina dobivanja biomaterijala odgovarajućih svojstava jer se zadržava anatomska struktura te komponente živućeg tkiva. Glavni cilj je iz ECM-a ukloniti prirodne stanice i genetski materijal, kao što je DNK, uz očuvanje strukturnih, biokemijskih i biomehaničkih svojstava ECM-a. [4] Vrlo česta vrsta biomaterijala koja se koristi u tkivnom inženjerstvu su hidrogelovi, visoko hidratizirani materijali koji zadržavaju posebnu trodimenzionalnu strukturu i mogu se dobiti iz decelulariziranog tkiva. Zbog sposobnosti upijanja velikih količina vode i specifičnih mehaničkih svojstva imaju fizikalno-kemijska i mehanička svojstva usporediva s mnogim mekim tkivima. [5,6] Jedna od metoda karakterizacije biomaterijala je toplinska analiza, diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC, eng. *differential scanning calorimetry*) kojom se proučava promjena svojstava uzorka s temperaturom dok se on kontrolirano grije ili hladi. Pomoću te metode određuju se fizikalne i kemijske promjene uzorka tj. fazni prijelazi pri kojima se mijenja vrijednost entalpije. [7,8] Cilj ovog rada je istražiti mogućnost primjene diferencijalne pretražne kalorimetrije u analizi materijala pripremljenog iz biogenog izvora.

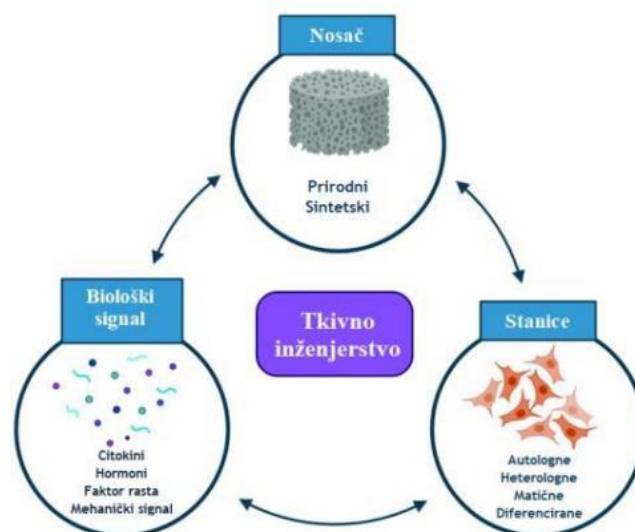
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inženjerstvo tkiva

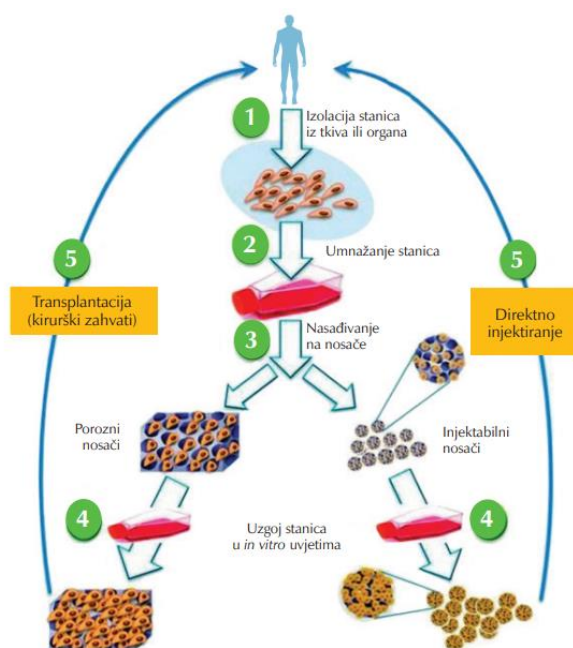
Otkazivanje tkiva i organa zbog bolesti i ozljeda jedan je od glavnih zdravstvenih problem. Postojeće rješenje je korištenje donorskih tkiva i organa, ali zbog manjka darivatelja sve je veći broj ljudi na listama čekanja. Inženjerstvo tkiva predstavlja obećavajuće rješenje za ovaj medicinski problem. [9] To je interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i biomedicinskih znanosti za razvoj bioloških nadomjestaka koji služe za obnavljanje ili poboljšavanje funkcija tkiva te njegovu zamjenu. Omogućuje regeneraciju tkiva i organa pacijenta što dovodi do smanjene potrebe za transplantacijom donorskih organa čime se smanjuje i problem loše biokompatibilnosti te imunološkog odbacivanja. [1]

Glavni cilj inženjerstva tkiva je razviti funkcionalni materijal za izradu trodimenzionalnih poroznih nosača koji će omogućiti obnavljanje oštećenog ili nastanka novog tkiva. [10] U tkivnom inženjerstvu postoje različiti pristupi i strategije za razvoj funkcionalnih zamjena tkiva. Glavni pristupi uključuju korištenje biomaterijala koji predstavljaju materijal za zamjenu bilo kojeg tkiva ili organa i od kojih se izgrađuju nosači. Postoje različite tehnike izrade nosača koji moraju posjedovati određene karakteristike kako bi se koristili kao materijal za inženjerstvo tkiva. [2]

Kako bi se dobila funkcionalna 3D tkiva kombiniraju se nosači, stanice i biološki aktivne signalne molekule čineći trijadu tkivnog inženjerstva (slika 1). [11]



Slika 1. Trijada tkivnog inženjerstva



Slika 2. Glavni koraci u tkivnom inženjerstvu

Na nosače se nasađuju stanice i hranjive tvari te odgovarajući biofizički podražaji koji potiču diferencijaciju i proliferaciju nasađenih stanica. Stanica sintetizira novo tkivo, a nosač osigurava odgovarajuće okruženje za provedbu svih vitalnih funkcija stanica. [2] Nosač nasađen stanicama ili tkivo uzgojeno *in vitro* implantira se na mjesto ozljede nakon čega se inducira regeneracija tkiva *in vitro* (slika 2). [11]

2.2. Biomaterijali

Biomaterijal je materijal prirodnog ili sintetskog podrijetla koji se koristi i prilagođava za medicinsku primjenu, tj. inženjerstvo različitih tkiva, kako bi se poboljšalo ljudsko zdravlje i kvaliteta života. Koriste se za obnovu oštećenih dijelova tijela kroz interakciju sa živim sustavima, za zamjenu komponenti ljudskog tijela te za podršku fiziološke funkcije. Kao takvi u stalnoj su interakciji s čovjekovim stanicama, tkivima ili organima. [12] Osnovna uloga je osigurati privremenu mehaničku podršku, poticanje stanične adhezije, proliferacije i diferencijacije te za kontrolu veličina i oblika regeneriranog tkiva. [13] Biomaterijali se dijele na: metale, keramiku, polimere (prirodni i sintetski) i kompozite. [6] Svaka pojedinačna skupina ima specifične prednosti i nedostatke, no najčešća je upotreba kompozita. [14]

Metali imaju dobra mehanička svojstva, visku otpornost na zamor te duktilnost, ali su kruti, teški, imaju lošu biokompatibilnost te su skloni koroziji. Nakon implantacije metali su izloženi tjelesnim tekućinama pri čemu neki metali otpuštaju ione koji mogu biti otrovni. Najčešće se koriste nehrđajući čelici, CoCrMo, titan, nitinol, nikal, platina i tantal. Primjenjuje se u ortopedske, ortodonske te kardiovaskularne svrhe. [6]

Keramika je anorganski nemetalni materijal koji ima dobru biokompatibilnost, kemijski je inertan i otporan na koroziju, ali je krut, ima malu vlačnu čvrstoću i lomljiv je te ga je teško obrađivati. Najčešće se koriste glinica, cirkonij, hidroksiapatit, beta trikalcijev fosfat i pirolitički ugljik. Primjenjuje se za zubnu restauraciju i poboljšanje fiksacije kosti zbog izvrsne biokemijske i biomehaničke kompatibilnosti s koštanim tkivom. [6]

Polimerni materijali mogu biti prirodnog ili sintetičkog podrijetla. Nedavno su ušli u područje biometarijala, a prva je upotreba bila za omotavanje krvnih žila kako bi se spriječilo širenje aneurizme. Postoji veliki broj polimernih materijala koji se proizvode u različitim oblicima s različitim fizičkim značajkama poput granula, vlakana, tankih listića, debelih ploča, od inertnih do bioaktivnih proizvoda. [6]

Biomaterijali sintetičkog podrijetla imaju nekoliko ključnih prednosti u odnosu na prirodne, a to su kontrola oblika, strukture i sastava za imitiranje izvanstanične matrice (ECM *eng. extracellular matrix*) ljudskog tkiva. Najkorišteniji sintetski polimeri za regeneraciju su poli(alfa-hidroksi) kiseline koje uključuju polimljiječnu kiselinu (PLA), poliglikolnu kiselinu (PGA) i poli(mliječna-koglikolu) kiselinu (PLGA). Oni pokazuju fizikalno-kemijska i mehanička svojstva slična biološkim tkivima, ali im nedostaju mjesta stanične adhezije što zahtijeva kemijske modifikacije kako bi se poboljšalo stanično pričvršćivanje. Kako bi se izbjegla ova ograničenja, koriste se biološki materijali poput kolagena, proteoglikana, fibrina, kitozana i agaroze. Prirodni polimeri su biološki aktivni i pospješuju dobro prianjanje i rast stanica. Nedostatak je taj što pokazuju loša mehanička svojstva. Sintetski i prirodni polimeri se vrlo često koriste za razvoj hidrogelova koji se sastoje od hidrofilnih polimernih lanaca umreženih kovalentnom ili nekovalentnom vezom. Fizikalno-kemijska i mehanička svojstva usporediva su onima prirodnog tkiva te se koriste za regeneraciju kostiju ili mekih tkiva. Prikladni su materijal zbog mogućnosti prilagođavanja mehaničkih svojstava, modificiranja kemijskog sastava i umrežavanja. [6]

Prirodni polimeri su ključni podskup biomaterijala koji se koriste kao predlošci za inženjerstvo tkiva zbog bioaktivnosti, biokompatibilnosti, razgradnje, mehaničke kinetike te strukture slične

izvanstaničnoj matrici (ECM) prirodnog tkiva. Nakon primjene, unutar bioloških sustava ne otpuštaju toksične produkte tijekom razgradnje, a brzine razgradnje se prilagođava uvjetima obrade. Velika prednost ovih materijala je njihova sposobnost odgovora na biomehaničke i biokemijske podražaje. Biomaterijali prirodnog podrijetla podijeljeni su u dvije skupine: biomaterijali na bazi proteina i biomaterijali na bazi polisaharida. Biomaterijali na bazi proteina dobiveni su iz životinjskih i ljudskih izvora, a biomaterijali na bazi polisaharida većinom se dobivaju iz algi ili iz mikrobnih izvora. Druga skupina biomaterijala su decelularizirani biomaterijali dobiveni iz tkiva koji se dobivaju eliminacijom svih stanica i genetskog materijala iz prirodnih tkiva. Nedostaci prirodno dobivenih biomaterijala su slaba mehanička čvrstoća i nedosljednost u sastavu i svojstvima. [13]

Morski resursi imaju ogroman potencijal za razvoj biomaterijala na bazi polisaharida. Ti materijali su lako dostupni te posjeduju izvrsnu biokompatibilnost, biorazgradivost i bioaktivna svojstva. Biomaterijali temeljeni na morskim resursima primjenjuju se u medicinske svrhe, prehrambenoj i kozmetičkoj proizvodnji. [15] Otpad životinjskog podrijetla može se prevoditi u biomaterijale s raznolikom primjenom. Otpad od perja i ljuske jajeta mogu se koristiti za proizvodnju keratinoznih proteina odnosno kompozita. Ostaci goveđe mesne industrije mogu se koristiti za proizvodnju hidroksiapatita za razvoj nosača. Kolagen dobiven iz svinje može se koristiti za razvoj transplantata kože. Ovčji zubi mogu se koristiti u proizvodnji hidroksiapatita. [16]

Bitna svojstva biomaterijala su biokompatibilnost, biorazgradnja i odgovarajuća mehanička svojstva. [14] Biokompatibilnost je ključna stavka svih biomaterijala i njezina je procjena složen postupak koji za cilj ima provjeriti sposobnost materijala da ispravno izvrši predviđenu funkciju dok je u kontaktu s biološkim okolišem. To je sposobnost materijala da se koristi u kontaktu sa živim tkivom bez da izazove štetne učinke. [17] Biomaterijal mora biti biorazgradiv kako bi se nakon nekog vremena razgradio na tvari koje nisu toksične i koje se lako mogu izlučiti iz tijela kako bi se na njegovom mjestu razvilo novo tkivo. Struktura biomaterijala mora biti visoko porozna da se omogući rast, migracija stanica te difuzija tvari i produkata. Mora se paziti na veličinu pora koje moraju omogućiti migraciju stanica, ali i zadržati interakciju između stanica. [18] Mehanička svojstva biomaterijala moraju biti u skladu s funkcijom koja se obavlja. Moraju imati odgovarajuću mehaničku čvrstoću da izdrže sile i opterećenja kako ne bi došlo do loma te visoku otpornost na koroziju da se izbjegne otpuštanje nekompatibilnih metalnih iona u tijelo. [14]

2.3. Nosači

Nosači koji se koriste u tkivnom inženjerstvu predstavljaju trodimenzionalne strukture čija je osnovna funkcija adhezija stanica te njihova diferencijacija i proliferacija. Služe kao privremene podloge za rast stanica dok se ne regeneriraju biološki funkcionalna tkiva. [19] Nosači imitiraju funkciju izvanstanične matrice, ECM, nasaduju se stanicama i izlažu biofizičkim podražajima u bioreктору. [11] Nosači moraju omogućiti transport hranjivih tvari potrebnih za adheziju stanica, proliferaciju i diferencijaciju, rast i migraciju, mehaničku potporu i kontroliranu razgradnju bez nastajanja toksičnih tvari. [20] Nosači koji se primjenjuju moraju zadovoljavati određene uvjete. Moraju biti biokompatibilni što podrazumijeva kompatibilnost materijala s biološkim sustavom što znači da stanice moraju normalno funkcionirati, prianjati na materijal, migrirati po površini i kroz nosač te ne smiju izazvati upalni proces nakon ugradnje u organizam. Nosači moraju biti biorazgradivi i njihova razgradnja treba ići brzinom kojom nastaje novo tkivo te produkti nastali razgradnjom ne smiju biti toksični. Mehanička svojstva moraju odgovarati položaju ugradnje te moraju biti dovoljno čvrste strukture za kirurško rukovanje tijekom ugradnje. Struktura nosača iznimno je bitna. Moraju imati visoko poroznu strukturu s dobrom povezanošću pora koje moraju biti odgovarajuće veličine. [11] Porozna struktura mora omogućavati difuziju otpadnih tvari iz nosača te migraciju stanica kroz cijeli nosač. Ovisno o vrsti stanica i tkiva za koje se nosač proizvodi postoje različiti kritični rasponi veličina pora. [21]

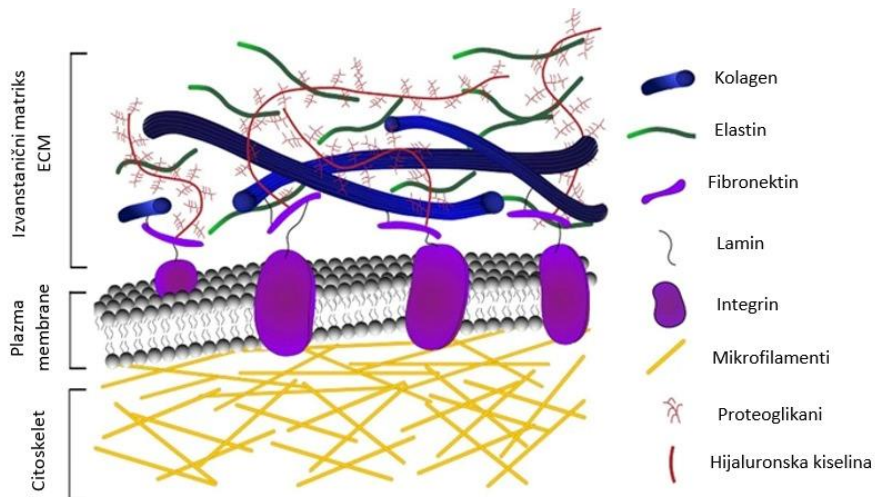
Nosači se mogu podijeliti na nosače direktno izdvojene iz živih organizama i na nosače izrađene od biomaterijala prirodnog i sintetičkog podrijetla. [22] Prirodni nosači najčešće su od kolagena, fibrina, hitina i dr. i izrazito su biokompatibilni. Sintetski nosači najčešće su polimerni ili kompozitni od polilaktido-glikolida (PLGA), polikaprolaktona (PCL), poliglikolida (PGA) i dr. [23] Razvoj tehnologija za izradu nosača sve je intenzivniji, a cilj je dobivanje najbolje tehnologije za proizvodnju trodimenzionalne strukture koja će omogućiti adheziju, rast stanica i formiranje novog tkiva. Ključni faktor koji omogućuje regeneraciju i formiranje novog tkiva je odgovarajuća okolina. [24] Postoji mnogo tehnika izrade nosača, a neke od njih su: ispiranje čestica, liofilizacija, plinsko pjenjenje, odvajanje faza, a u novije vrijeme 3D ispis i elektroispredanje. 3D ispis je proizvodni proces koji stvara trodimenzionalni objekt sloj po sloj. Tehnike ispisa mogu biti na bazi tekućina, krutog materijala ili praha, ovisno o obliku materijala.

Hidrogelovi su od posebnog interesa za tkivno inženjerstvo zbog posebnih svojstava i strukture. Sastoje se od trodimenzionalne mreže koja može apsorbirati veliku količinu vode i bubriti zbog hidrofilnih skupina koje ima. Mreža je najčešće izgrađena od umreženih polimernih lanaca. Mogu biti fleksibilni i mekani što ovisi o sposobnosti upijanja vode. Zbog takvih svojstava hidrogelovi osiguravaju prikladno mikrookruženje za rast stanica. Elastično ponašanje i bubrenje čini hidrogelove poželjnim za injekcijske svrhe i tehnologiju 3D bioispisa, pomoću koje se pripravlja trodimenzionalna struktura za izgradnju funkcionalnih tkiva ili umjetnih organa jer zbog visokog udjela vode, mekane strukture i poroznosti hidrogelovi vrlo nalikuju živom tkivu. [20,25]

2.4. Izvanstanična matrica

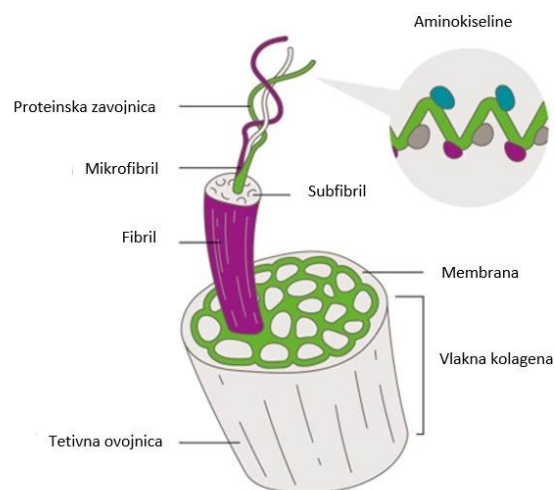
Prirodna izvanstanična matrica (ECM) izvedena iz prirodnih tkiva ili kultiviranih stanica koristi se u raznim oblicima nakon procesa bioproizvodnje za izradu nosača ili trodimenzionalnih staničnih kultura za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Proizvodi koji se temelje na ECM-u proizvedeni su s namjenom regeneracije tkiva poput srčanih zalistaka, mišića i krvnih žila te pružaju ubranu obnovu funkcije tkiva i brzu integraciju s tkivima domaćina. Glavni izvori ECM-a su prirodna ljudska i životinjska tkiva te primarne stanice. Svako tkivo ima specifično 3D-okruženje strukturne i funkcionalne ECM mreže što pruža jedinstvene proteinske "otiske" za stanice. [26]

ECM je složena trodimenzionalna mreža čiji se elementi sastoje od više od 300 proteina koji pomažu pri regulaciji adhezije, proliferacije, apoptoze, diferencijacije i fizičke podrške stanica. Mreža se sastoji od vlaknastih proteina kolagena, elastina, fibronektina, laminina, nevlaknastih proteina proteoglikana (PG) i glikozaminoglikana (GAG) te mnogih drugih molekula (slika 3). [27] Kolagen i elastin pružaju strukturnu potporu i otpornost na mehaničko opterećenje, a PG i GAG pomažu u staničnom razvoju interakcije s okolinom. Zbog konstrukcijske složenosti ECM pruža sveobuhvatnije i biokompatibilnije mikrookruženje stanicama i tkivima nego prirodni polimeri ili sintetički materijali. [26]



Slika 3. Struktura ECM-a [28]

Kolagen je najzastupljeniji vlaknasti protein u prirodi i tkivima kao što su vezivo tkivo, tetive, koža, kosti i hrskavica. Građen je od polipeptidnih lanaca koji se raspoređuju u trostruke uzvojnice pri čemu se oblikuju makromolekularne strukture od kojih je najčešće fibril (slika 4). [29] Pruža mehaničku potporu te kontrolira staničnu adheziju, migraciju stanica te regeneraciju tkiva. [30] Do danas je poznato najmanje 29 različitih vrsta kolagena koji se grupiraju u tri kategorije ovisno o njihovoj sposobnosti stvaranja fibrila.



Slika 4. Struktura kolagena

Elastin čini elastična vlakna čija se struktura sastoji od pojedinačnih podjedinica tropoelastina koje su umrežene vanjskim slojem fibrilinskih mikrofibrila. On tkivu daje elastičnost i otpornost. Koristi se kao biomaterijal u inženjerstvu tkiva kože i tetiva.

Fibronektin je jedinstveni dimerizirani protein koji formira fibrilarne mreže unutar ECM-a. Ima ključnu ulogu u staničnoj adheziji, migraciji, proliferaciji, diferencijaciji te u zacjeljivanju rana. Lamini su vrsta glikoproteina koja se sastoji od triju lanaca smještenih unutar stanične membrane. Ključni su u staničnoj adheziji, regulaciji diferencijacije te migracije stanica putem intigri. [31]

Proteoglikani (PG) su molekule koje imaju proteinsku osnovu na koju je nadodan jedan ili više glikozaminoglikana koji su polisaharidni lanci koje tvore disaharidi. Topivi su, nalaze se u ECM-u ili kao integralni membranski proteini te djeluju poput ljepila u povezivanju izvanstaničnih i unutarstaničnih funkcija stanica. [32]

Glikozaminoglikani (GAG) su vrlo važna komponenta ljudskog glikoma. Oni su negativno nabijeni nerazgranati polisaharidi koji su kovalentnim vezama vezani za protein tvoreći tako zajedno proteoglikane. Imaju ključnu ulogu u brojnim biološkim procesima te se primjenjuju kao terapeutici zbog svoje izvanredne bioaktivnosti i univerzalne uključenosti u napredovanju bolesti. [33] Na temelju razlike ponavljajućih disaharidnih jedinica koje GAG sadrži može se podijeliti u četiri skupine: heparin/heparan, sulfat, kondroitin sulfat/dermatan sulfat/keratan sulfat i hijaluron. [34]

2.5. Metode karakterizacije materijala na temelju ECM-a

Kvantifikacija bioloških komponenata koristi se za mjerenje prisutnosti, koncentracije ili aktivnosti bioloških molekula. Ova analiza omogućuje razumijevanje bioloških svojstava hidrogelova na bazi ECM-a. Neke od kvantifikacija su: koncentracija proteina, DNA/RNA analiza, aktivnost enzima, sadržaj kolagena, sadržaj sulfata, glikozaminoglikana i dr.

Geliranje je stvaranje trodimenzionalne mreže kemijskim ili fizičkim umrežavanjem. Glavni koraci geliranja su: hidratacija sredstva za geliranje, miješanje s ostalim sastojcima, zagrijavanje i hlađenje u kalupima kako bi se gel stvrdnuo. Tijekom geliranja razrijeđena ili viskozija otopina polimera se pretvara u sustav beskonačne viskoznosti tj. gel koji se definira kao vrlo elastična kruta tvar. [35] Kinetika geliranja proučava kako se gel formira u ovisnosti o vremenu i koji čimbenici utječu na brzinu tog procesa. Glavni faktori koji utječu su temperatura,

pH vrijednost i koncentracija. Opisuje se različitim modelima i pristupima ovisno o vrsti geliranja i sustavu koji se promatra. Razumijevanje kinetike geliranja omogućava kontrolu nad procesom geliranja i optimizaciju svojstava gelova za određenu primjenu. [36]

Reološka svojstva imaju veliki utjecaj na mogućnost obrade i konačna svojstva proizvoda pa je važno proučiti protok, deformacijsko ponašanje materijala i njihova svojstva u cilnom okruženju ovisno o njegovoj konačnoj namjeni. Reologija je prikladna metoda za karakterizaciju mehaničkih svojstava hidrogelova jer je brza, osjetljiva, zahtjeva male veličine uzorka i otkriva razlike u strukturi kao što su stupanj umreženosti, blizina staklastog prijelaza, strukturna homogenost/heterogenost i molekulska masa makromolekula. Glavna reološka tehnika za karakterizaciju hidrogelova je ispitivanje oscilatornog smicanja male amplitude (SAOS). Mjerenje viskoelastičnih svojstava provodi se korištenjem rotacijskog reometra gdje uzorak oscilira oko svojeg ravnotežnog položaja tj. stanja mirovanja. [37]

U inženjerstvu hidrogelova ključno je poznavanje mikrostrukture hidrogela, odnosno strukture i raspodjele veličina pora. Za vizualizaciju nabubrenih hidrogelova često se upotrebljavaju kriogene ili skenirajuće elektronske mikroskopije visokog vakuuma (cyo-SEM ili HVSEM). [38] SEM koristi fokusirani snop visokoenergetskih elektrona za generiranje različitih signala na površini krutih uzoraka koji otkrivaju informacije o uzorku uključujući vanjsku morfologiju, teksturu, kemijski sastav i kristalnu strukturu te orijentaciju materijala koji čine uzorak. Podaci se prikupljaju na određenom području površine uzorka te se generira dvodimenzionalna slika. [39]

Kultura stanica je tehnika koja uključuje inkubaciju stanica unutar hidrogelova kako bi se procijenila njihova biološka aktivnost unutar hidrogela. Ova tehnika omogućuje proučavanje kompatibilnosti hidrogela i živih stanica.

2.6. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna (razlikovna) pretražna kalorimetrija (DSC) temelji se na mjerenju razlike temperatura između ispitivanog i referentnog uzorka. DSC izravno mjeri toplinu koja je potrebna da se ispitivani i referentni uzorak održavaju na istoj temperaturi bez obzira na promjene koje se unutar uzorka događaju.

Referentni uzorak ne prolazi kroz nikakve promjene u temperaturnom ili vremenskom intervalu mjerenja, a može se koristiti prazni lončić jer količina i vrsta materijala ne utječu na temperaturu

uzorka. Lončići mogu biti od različitih materijala: aluminijski, nikla, platine, nehrđajućeg čelika i dr. čiji odabir ovisi o temperaturi i tlaku mjerenja i kemijskoj kompatibilnosti s uzorkom. Dno lončića mora biti potpuno ravno kako bi došlo do toplinskog dodira lončića s termoparom preko cijele površine. Kako bi se osigurao dobar dodir između uzorka i lončića, uzorci se trebaju dobro stisnuti uz dno za što se najčešće koriste aluminijske posudice.

Za dobivanje pouzdanih iznosa entalpije ključno je točno određivanje površine maksimuma tj. povlačenje baznih linija. Bazna linija funkcija je toplinskog kapaciteta koja se za uže intervale može smatrati linearnom. Za integriranje površine najjednostavnije je povući liniju od početka do kraja maksimuma, međutim to nije pouzdano zbog moguće promjene toplinskog kapaciteta tijekom reakcije ili faznog prijelaza. Stoga je pouzdaniji način povlačenje linija iterativno.

Postoje dvije vrste DSC instrumenata: DSC na principu toplinskog toka (HF-DSC) kod kojeg se određuje toplinski tok između uzoraka i DSC na principu kompenzacije snage (PC-DSC) kod kojeg se izravno mjeri razlika snaga mikrogrijača koji održavaju stalnu temperaturu uzorka. U HF-DSC-u kroz senzor prolazi toplinski tok čija je razlika iz rezervoara prema mjernom i referentnom uzorku proporcionalna razlici temperatura koja je izmjerena i koja se uzima kao DSC signal. Zbog toplinskog rezervoara bolja je kontrola temperature okoline zbog čega je i bazna linija stabilnija. U PC-DSC-u nema toplinskog rezervoara, nego se grije ili hladi samo okolina uzorka. Objе vrste instrumenta daju iste informacije i svaka od njih ima prednosti i nedostataka. Prednosti HF-DSC-a su rad s većim uzorcima, robusnost, viska osjetljivost, dobra razlučivost te rad pri vrlo visokim temperaturama dok je nedostatak nemogućnost rada pri velikim brzinama zagrijavanja. Prednosti PC-DSC-a su rad pri velikim brzinama zagrijavanja i to što nije potrebna kalibracija dok su nedostaci potreba za vrlo osjetljivom elektronikom te osjetljivost na promjene u okolišu.

DSC se primjenjuje za praćenje toplinske, oksidacijske i redukcijske degradacije i fizikalno-kemijskih promjena te za analizu kinetike odvijane kemijske reakcije. Koristi se i za određivanje specifičnog toplinskog kapaciteta ispitivanog materijala, tališta čistih tvari, kompatibilnosti polimernih mješavina, čistoće uzorka i faznih dijagrama različitih tvari. [8]

U slučaju proteina, DSC se može koristiti za određivanje: ravnotežne termodinamičke stabilnosti, mehanizma savijanja, odnosno određivanje sekundarne i tercijarne strukture, toplinske stabilnosti kao pokazatelja za vezanje liganada ili uvjeta koji pogoduju rastu kristala. DSC se može koristiti i za određivanje visine barijere za brzo-organizirajuće proteine i za proučavanje složenih proteinskih smjesa kao što je ljudska plazma.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprema hidrogelova

3.1.1. Decelularizacija jetre

Za pripremu hidrogelova korištena je svinjska jetra nabavljena u mesnici. Uzorak je prvo narezan na približno jednake komade veličine $1 \times 1 \times 0,2$ cm koji su zatim tri puta isprani destiliranom vodom. Pripremljeni uzorci miješani su mehaničkom miješalicom s lopatastim miješalom promjera 5 cm pri $400 - 450 \text{ min}^{-1}$ u fiziološkoj otopini koja je zamijenjena svaka dva sata ukupno tri puta. Nakon provedenog miješanja na mehaničkoj miješalici uzorci su prebačeni na magnetnu miješalicu s fiziološkom otopinom. Miješanje je provedeno pri 200 min^{-1} tijekom noći koristeći trbušasti magnet dug 5 cm.

Decelularizacija dijela uzorka otopinom SLES detergenta masenog udjela 0,5 % provedena je uz korištenje ultrazvučne kupelji (Sonorex digital 10 P, Bandeln, Njemačka). Ocijedećim uzorcima dodana je otopina SLES-a te je svaki od četiri uzorka stavljen u ultrazvučnu kupelj, koja je termostatorirana na $32 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, na 1, 2, 4 i 8 sati uz korištenu snagu kupelji od 120 kW i frekvenciju od 35 Hz.

Ostali dobiveni uzorci su ocijedeći te zatim miješani na magnetnoj miješalici pri 200 min^{-1} u otopini detergenata masenog udjela 0,5 % i 1 %; natrijev lauret sulfat (SLES, eng. *sodium lauryl ether sulphate*) i natrijev lauril sulfat (SDS, eng. *sodium dodecyl sulfat*). Otopina se svakih 30 (uzorci označeni s „a“) ili 60 (uzorci označeni s „b“) minuta zamjenjuje svježom, a proces se provodi dok se uzorci ne obezboje. Uzorci se potom ocijede, isperu destiliranom vodom te miješaju u destiliranoj vodi dva puta po 60 min. Miješanje se zatim provodi u 400 mL 96 %-tne otopine etanola 30 min kako bi se iz uzorka uklonile masnoće, a preko noći se miješa na magnetnoj miješalici u destiliranoj vodi. Sljedeći se dan miješanje provodi u fosfatnom puferu (PBS, eng. *phosphate buffer saline*) koji se zamjenjuje 6 puta svakih jedan sat te ponovo preko noći miješa u destiliranoj vodi.

Nakon što su svi uzorci pripremljeni, ocijede se, zamrzavaju u tekućem dušiku te se provodi liofilizacija pri $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ i 0,2 mbar 48 sati.

U tablici 1 prikazane su oznake uzoraka i uvjeti provedbe decelularizacije.

Tablica 1. Oznake uzoraka i uvjeti njihove pripreme

Oznaka uzorka	Detergent	Maseni udio detergenta/ %	Vrijeme izmjene/ min	Vrijeme djelovanja ultrazvuka/ h
SDS 1a	SDS	1	30	-
SDS 1b	SDS	1	60	-
SDS 0.5a	SDS	0,5	30	-
SDS 0.5b	SDS	0,5	60	-
SLES 1a	SLES	1	30	-
SLES 1b	SLES	1	60	-
SLES 0.5a	SLES	0,5	30	-
SLES 0.5b	SLES	0,5	60	-
SLES 0.5a 1h	SLES	0,5	30	1
SLES 0.5a 2h	SLES	0,5	30	2
SLES 0.5a 4h	SLES	0,5	30	4
SLES 0.5a 8h	SLES	0,5	30	8

3.1.2. Digestija tkiva

Digestija je provedena uz korištenje enzima pepsina koji aktivno sudjeluje u procesu digestije pri pH vrijednosti 2 na prethodno pripremljenim uzorcima jetre koji su decelularizirani te liofilizirani. Uzorci su prvo usitnjeni i prebačeni u staklene posudice nakon čega je izvagano 200 mg uzorka decelularizirane izvanstanične matrice jetre kojemu je dodano 20 mg enzima pepsina te 20 mL 0,01 M otopine klorovodične kiseline (pH = 2). Tako pripremljeni uzorci mučkaju se 48 sati na tresilici pri 300 min^{-1} , a nakon 24 sata provedene digestije provjerava se pH-vrijednost pomoću univerzalnog indikatora i po potrebi namješta na 2. Nakon digestije, pH se dovodi do 7 kako bi se zaustavila aktivnost enzima, odnosno digestija, te se uzorci centrifugiraju pri čemu dolazi do odvajanja supernatanta od precipitata kako bi se supernatant liofilizirao na prethodno opisan način, a dobiveni liofilizat dalje koristio u pripremi hidrogelova.

3.2. Metode karakterizacije

3.2.1. Kvantifikacija bioloških komponenata

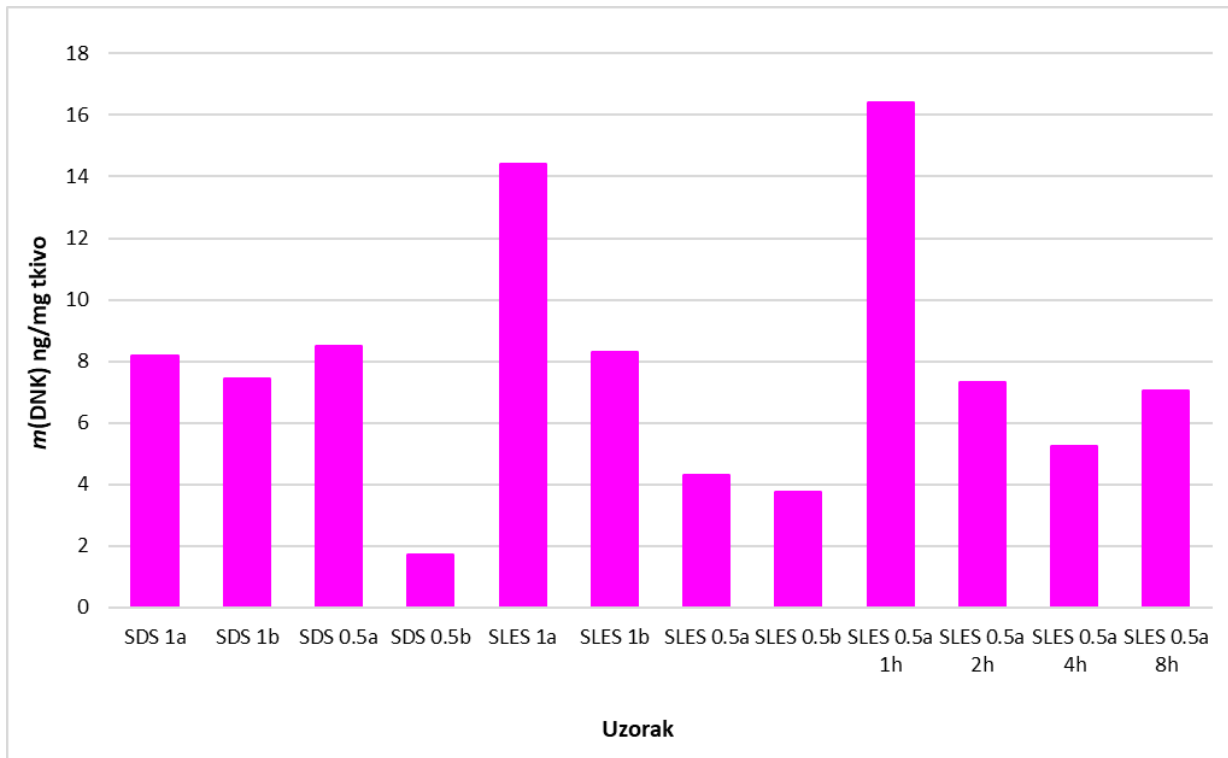
Provedena je kvantifikacija bioloških komponenata: DNK i kolagena na Odjelu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za kvantifikaciju DNK korišten je pribor *QuantiFluor dsDNA Sample Kit* (Promega, SAD) te je kvantifikacija provedena prema protokolu proizvođača.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

3.2.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija

Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) provedena je na liofiliziranim uzorcima nakon decelularizacije i digestije. U staklene je posudice odvagano oko 10 mg uzoraka. Za mjerenje na DSC-u korišteni su aluminijski lončići koji se sastoje od dva dijela, posudice i poklopca na kojemu se pomoću igle na sredini napravi rupica. U donji dio lončića se stavlja uzorak, poklopi poklopcem te hermetički zatvara. Tako pripremljeni lončići s uzorkom se važu te stavljaju u DSC uređaj (DSC 823/TSO Mettler Toledo) na kojem su prethodno namješteni uvjeti mjerenja. Mjerenje se provodilo u struji N₂ (60 mL/min) od 0 – 240 °C brzinom zagrijavanja 10 °C/min u samo jednom ciklusu grijanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

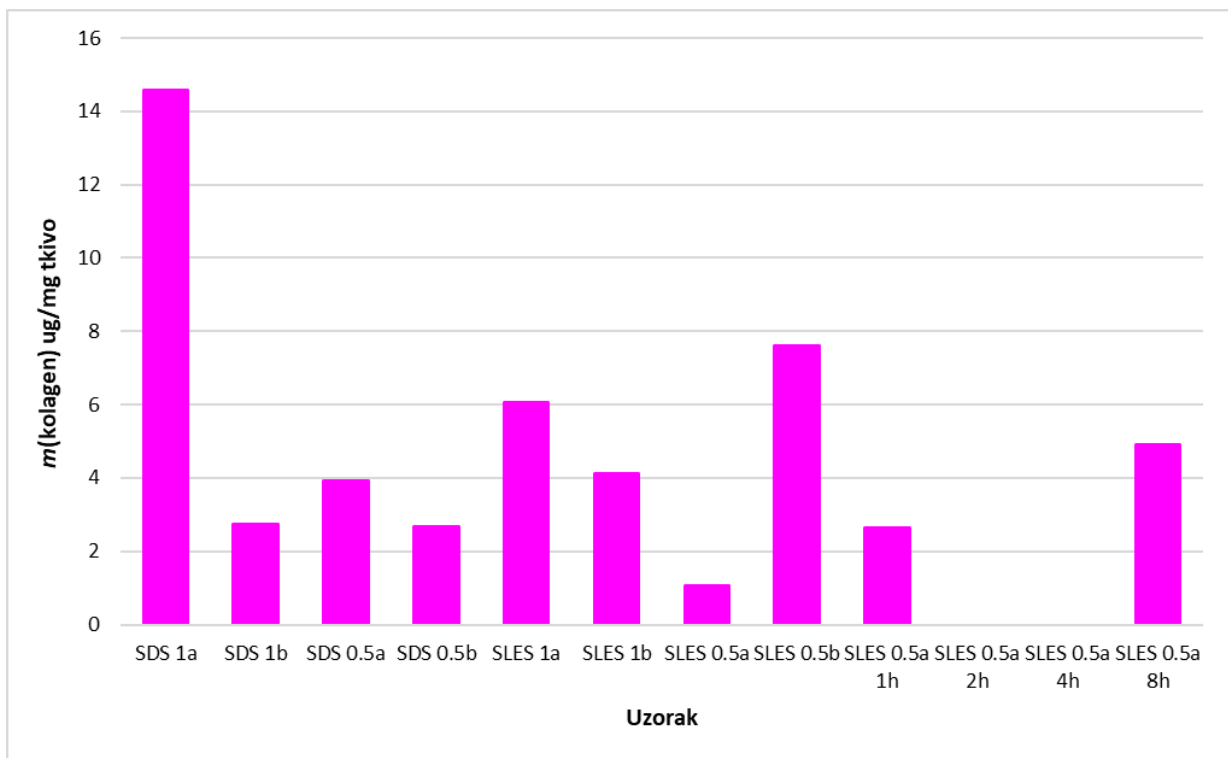
4.1. Kvantifikacija bioloških komponenata



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti količine DNK zaostale u tkivu nakon decelularizacije provedene različitim metodama

Nakon postupka decelularizacije provedena je kvantifikacija DNK u uzorcima tkiva te su dobivene vrijednosti mase DNK po jedinici mase decelulariziranog tkiva prikazane grafički na slici 5. Promotri li se uzorci obrađeni SDS-om, najveća količina DNK, tj. najlošije uklanjanje vidljivo je kod uzorka SDS 0.5a (8,5 ng/mg) čijoj je vrijednosti vrlo bliska i količini DNK kod uzorka SDS 1a (8,2 ng/mg) dok je najmanja količina određena kod uzorka SDS 0.5b (1,7 ng/mg). Kod uzoraka obrađenih SLES-om najveća je količina DNK kod uzorka SLES 1a (14,4 ng/mg) dok je kod uzorka SLES 0.5b najmanja (3,8 ng/mg). Vidljivo je da se smanjenjem koncentracije detergenta povećava uspješnost uklanjanja DNK jer su se decelularizacije s manjom koncentracijom vodile duže. Kod oba se detergenta uočava da uzorci s duljim vremenom zadržavanja, odnosno duljim vremenom bez izmjene medija imaju manju količinu DNK. Promatranjem uzoraka koji su dobiveni kombiniranjem detergenta SLES-a te ultrazvuka najveća količina zaostalog DNK se uočava kod SLES 0.5a 1h (16,4 ng/mg), a najmanja kod uzorka SLES 0.5a 4h (5,2 ng/mg). Vrijeme izloženosti ultrazvuku ima utjecaj na uklanjanje

DNK, ali za dobivanje najmanje količine potrebno je optimalno vrijeme. Usporedbom decelularizacije koja je provedena samo kemijski (uzorak SLES 0.5a) s onom koja je provedena fizički i kemijski (uzorci SLES 0.5a 1, 2 ,4 i 8h) vidljiva je manja količina zaostalog DNK kod uzorka koji je obrađen samo fizičkom decelularizacijom. Uspoređujući uzorke obrađivane SDS-om s onima koji su obrađivani SLES-om vidljivo je da je kod uzorka SDS 1 zaostala manja količina nego kod onih tretiranih sa SLES 1. Kod uzorka tretiranih sa SDS 0.5 vrijeme zadržavanja u istom mediju značajno utječe na količinu DNK koja se smanjuje povećavanjem vremena zadržavanja. Kod uzorka SLES 0.5 uočen je isti trend, ali je on manje izražen.

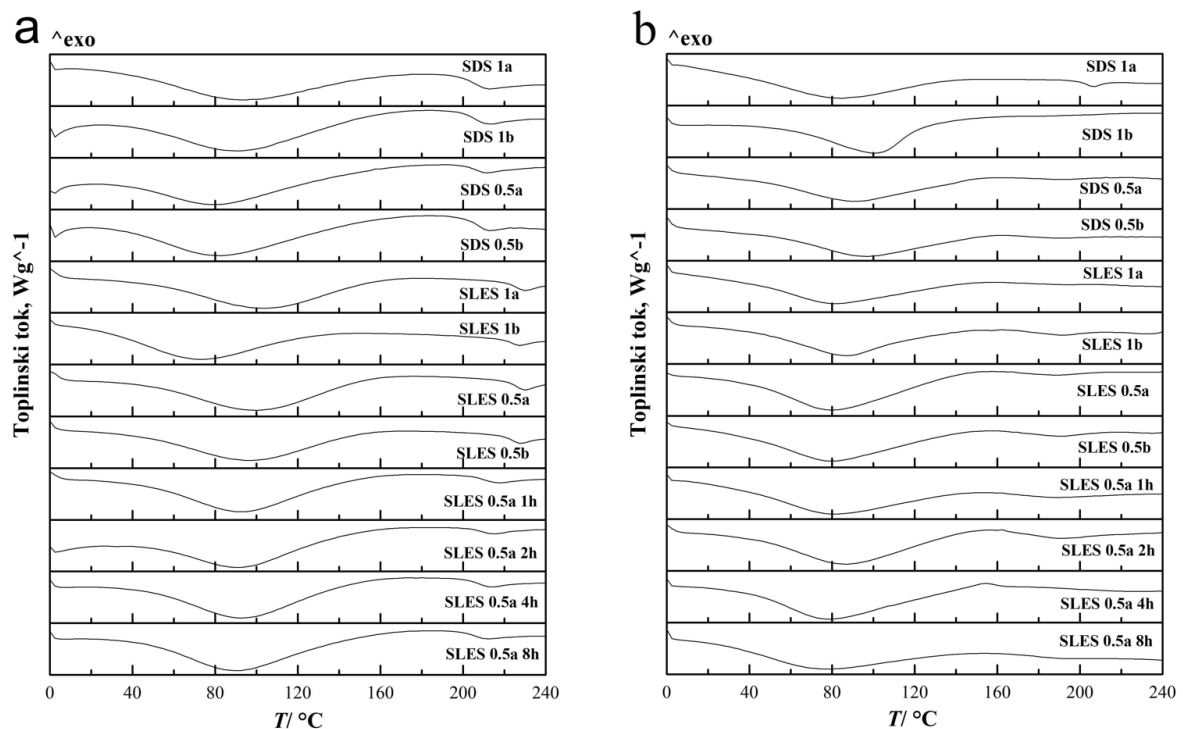


Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti količine kolagena očuvane u tkivu nakon decelularizacije

Nakon kvantifikacije DNK provedena je i kvantifikacija kolagena čije su dobivene vrijednosti izražene kao masa kolagena po jedinici mase tkiva. Očuvana količina kolagena u uzorcima tkiva prikazana je grafički na slici 6. Iz dobivenih rezultata vidljivo je najveće očuvanje kolagena kod uzorka SDS 1a (14,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) zbog ukupno najkraćeg vremena decelularizacije dok je kod ostalih uzoraka obrađenih SDS-om očuvana mala količina kolagena ($< 4 \mu\text{g}/\text{mg}$). Kod uzoraka obrađenih SLES-om do najvećeg je očuvanja kolagena došlo kod uzorka SLES 0.5b (7,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$), a najmanjeg kod SLES 0.5a (1,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Kod ostalih uzoraka obrađenih

SLES-om uočava se veća količina očuvanog kolagena nego kod onih obrađenih SDS-om (osim SDS 1a). Kod uzoraka obrađenih decelularizacijom koja je potpomognuta ultrazvukom do bolje očuvanosti kolagena došlo je kod uzoraka SLES 0.5a 1h i SLES 0.5a 8h dok kod ostalih nije detektiran kolagena. Usporedbom s istim uzorkom čija je decelularizacije provedena bez ultrazvuka uočena je veća količina očuvanog kolagena što znači da predobrada ultrazvukom pomaže u očuvanju kolagena, ali pri određenom vremenu provođenja. To se slaže s prethodnim istraživanjima koja su dokazala da korištenje ultrazvuka pri decelularizaciji pomaže u selektivnom odvajanju stanica od ECM-a uz očuvanje glavnih proteina uključujući kolagen. [40]

4.2. Razlikovna pretražna kalorimetrija



Slika 7. DSC termogrami (a) uzorci nakon decelularizacije i (b) uzorci nakon decelularizacije i digestije

Tablica 2. Vrijednosti normalizirane entalpije nakon decelularizacije i digestije dobivene DSC-om

Uzorak	Normalizirana entalpija nakon decelularizacije/ J g ⁻¹	Normalizirana entalpija nakon digestije/ J g ⁻¹
SDS 1a	-259,86	-164,44
SDS 1b	-282,59	-270,75
SDS 0.5a	-278,03	-162,42
SDS 0.5b	-314,03	-269,33
SLES 1a	-293,19	-248,46
SLES 1b	-217,69	-205,76
SLES 0.5a	-289,27	-194,98
SLES 0.5b	-270,62	-257,89
SLES 0.5a 1h	-218,01	-189,02
SLES 0.5a 2h	-253,34	-260,72
SLES 0.5a 4h	-183,58	-279,88
SLES 0.5a 8h	-173,52	-321,62

Na slici 7 prikazani su DSC termogrami na kojima su vidljivi endotermni prijelazi koji odgovaraju denaturaciji kolagena, a u tablici 2 prikazane su vrijednosti normalizirane entalpije dobivene pomoću DSC-a nakon decelularizacije te nakon digestije tkiva. Promjena entalpije uzorka u odnosu na referentnu posudicu je oslobođena ili apsorbirana energija koja je potrebna da se obje posudice održavaju na istoj temperaturi zbog razlike toplinskih kapaciteta. Ta je energija povezana s atomskim i molekulskim gibanjima te s energijom veze koje održavaju protein u presavijenoj konformaciji. [41]

Uspoređujući vrijednosti dobivene kod uzoraka nakon decelularizacije vidljivo je da je kod uzoraka tretiranih SDS-om entalpija najmanja kod uzorka SDS 1a, a najveća kod SDS 0.5b. Uočava se da dolazi do povećanja entalpije smanjenjem koncentracije detergenta te da se kod uzoraka iste koncentracije entalpija povećava povećanjem vremena zadržavanja u istom mediju. Kod uzoraka tretiranih SLES-om najmanju entalpiju ima uzorak SLES 1b, a najveću SLES 1a. Kod ovog detergenta uočava se da povećanjem vremena zadržavanja dolazi do smanjenja entalpije, obrnuto od uzoraka obrađenih SDS-om. Usporedi li se uzorak SLES 0.5a s uzorcima kod kojih je decelularizacija potpomognuta ultrazvukom (SLES 0.5a 1, 2, 4 i 8h) kod svih je vremena djelovanja ultrazvuka vidljiva niža vrijednost entalpije te je uočen trend opadanja vrijednosti porastom vremena izloženosti ultrazvuku.

Trend promjene entalpija nakon digestije isti je kao i kod entalpije nakon decelularizacije uz iznimku uzoraka SLES 0.5a 1, 2, 4 i 8h kod kojeg je uočen porast vrijednosti entalpije porastom vremena izloženosti ultrazvuku. Usporede li se vrijednosti entalpije za uzorke nakon decelularizacije i nakon digestije, svi su uzorci nakon digestije pokazali manje vrijednosti entalpija. Kako tijekom digestije, dodatne obrade koja slijedi nakon decelularizacije dolazi do prijelaza u gelasto stanje i dodatnog razaranja proteina očekuje se manja normalizirana entalpija u usporedbi s onom nakon decelularizacije. [42] Izuzetak su uzorci obrađeni ultrazvukom tijekom 2, 4 i 8 sati (SLES 0.5a 2, 4 i 8h). Razlog toga može biti formacija strukture za koje je potrebno dovesti veću energiju kako bi popucale veze, a protein se denaturirao. [42] Time bi se moglo zaključiti da povećanje vremena izloženosti ultrazvuku povoljno utječe na uzorke nakon digestije. Uspoređujući to s djelovanje ultrazvuka na uzorke nakon decelularizacije uočava se da ultrazvuk kod uzoraka nakon decelularizacije smanjuje entalpiju.

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) vrlo je koristan alat za proučavanje toplinskih svojstava proteina, a posebice za proces denaturacije, tj. termičke razgradnje. Kad se uzorak bogat proteinima zagrijava pojavljuju se endotermni vrhovi čije je područje mjera stabilnosti proteina i karakterizira se DSC parametrima: početnom i maksimalnom temperaturom. [43]

Tablica 3. Vrijednosti maksimalne i početne temperature uzoraka dobivene na DSC-u nakon decelularizacije

Uzorak	Maksimalna temperatura/ °C	Početna temperatura/ °C
SDS 1a	91,3	43,6
SDS 1b	93,6	45,1
SDS 0.5a	93,0	47,5
SDS 0.5b	93,3	41,8
SLES 1a	96,8	40,4
SLES 1b	99,6	44,3
SLES 0.5a	72,3	22,6
SLES 0.5b	103,8	49,6
SLES 0.5a 1h	82,2	33,6
SLES 0.5a 2h	82,1	36,9
SLES 0.5a 4h	92,2	41,6
SLES 0.5a 8h	92,7	49,7

U tablici 3 prikazane su vrijednosti početne i maksimalne temperature kod decelulariziranih uzoraka tkiva. Početna je temperatura ona pri kojoj započinje denaturacija. Iz literature je poznato kako denaturacija proteina kreće pri 41 °C, kako ta temperatura nije puno viša od tjelesne temperature od 37 °C nepovoljno je da denaturacija kreće pri temperaturi nižoj od 37 °C. [44] Početna temperatura kod uzoraka tretiranih SDS-om približno je jednaka kod svih uzoraka, a kreće se u rasponu od 41,8 do 47,5 °C. Kod uzoraka tretiranih SLES-om također je početna temperatura približno jednaka (40,4 do 49,6 °C) izuzev uzorka SLES 0.5a kojem je početna temperaturu 22 °C, što ga čini nepovoljnim za print. Usporedi li se taj uzorak (SLES 0.5a) kod kojeg je provedena samo decelularizacija s istim uzorkom kod kojeg je korišten ultrazvuk vidljivo je da su početne temperature više pri djelovanju ultrazvuka. Također, može se uočiti da kako raste vrijeme izloženosti ultrazvuku raste i početna temperatura uzoraka. Djelovanje ultrazvuka imalo je za posljedicu porast početne temperature do potrebne vrijednosti, iznad 37 °C, kod uzoraka SLES 0.5a 4h i SLES 0.5a 8h.

Maksimalna temperatura je maksimum denaturacije i na njega utječu brzina zagrijavanja, koncentracija proteina i veličina uzorka te je te varijable potrebno održavati konstantnima. Prati se njegov pomak i što je njegova vrijednost veća, materijal će denaturirati pri većoj temperaturi i bit će stabilniji prilikom printa. [43] Najviša je maksimalna temperatura postignuta kod uzorka SLES 0.5b (103,8 °C) prema čemu je on najstabilniji za print. Kod uzoraka tretiranih SDS-om maksimalna temperatura slična je kod svih uzoraka (91,3 do 93,6 °C), a minimalno raste porastom vremena zadržavanja u istom mediju na temelju čega se može zaključiti da vrijeme izmjene nema značajan utjecaj na maksimalnu temperaturu denaturacije. Kod uzoraka kod kojih je korišten SLES maksimalne temperature denaturacije su više, osim kod uzorka SLES 0.5a. U usporedbi s uzorkom SLES 0.5b, koji ima dulje vrijeme zadržavanja u istom mediju, a istu koncentraciju, uočava se da vrijeme zadržavanja ima vrlo velik i pozitivan utjecaj na povišenje maksimalne temperature.

Tablica 4. Vrijednosti maksimalne i početne temperature uzoraka dobivene na DSC-u nakon digestije

Uzorak	Maksimalna temperatura/ °C	Početna temperatura/ °C
SDS 1a	74,3	26,1
SDS 1b	79,0	36,0
SDS 0.5a	87,0	38,1
SDS 0.5b	79,7	29,5
SLES 1a	80,4	32,0
SLES 1b	80,4	36,0
SLES 0.5a	86,3	44,2
SLES 0.5b	80,3	32,2
SLES 0.5a 1h	95,6	46,6
SLES 0.5a 2h	90,6	36,7
SLES 0.5a 4h	101,0	55,2
SLES 0.5a 8h	82,3	22,6

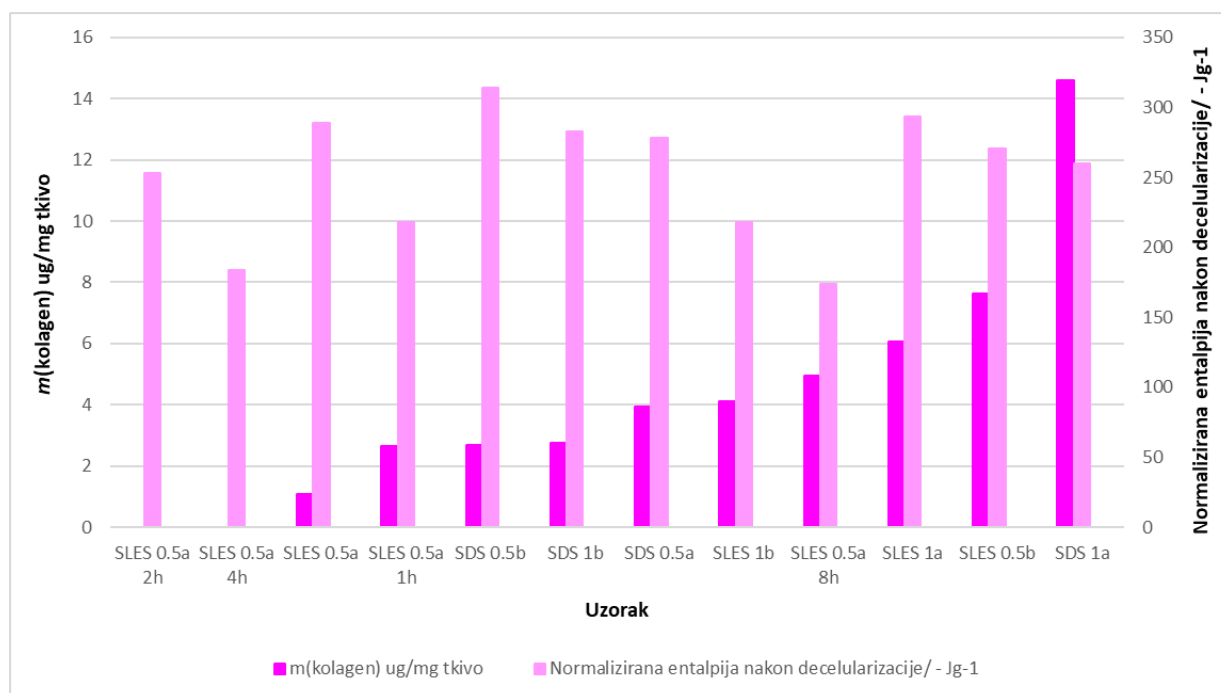
U tablici 4 prikazane su vrijednosti maksimalne i početne temperature kod uzoraka tkiva nakon digestije. Kod uzoraka tretiranih SDS-om početna temperatura kod čak tri uzorka niža je od 37 °C što nije pogodno za print. Uočava se i da promjena vremena zadržavanja u istom mediju nema isti utjecaj na temperaturu kod uzoraka različite koncentracije. Kod uzorka veće koncentracije (SDS 1) produljenjem vremena zadržavanja temperatura raste dok je kod uzorka manje koncentracije (SDS 0.5) obrnuto. Isti trend uočen je i kod uzoraka tretiranih SLES-om. Uočava se i da gotovo svi uzorci tretirani SLES-om imaju temperaturu nižu od 37 °C osim uzorka SLES 0.5a. Isti taj uzorak, kod kojeg je decelularizacija potpomognuta, ima i povećanje i smanjenje temperature tako da nije uočena direktna povezanost početne temperature denaturacije i vremena izloženosti ultrazvuku. Promjena maksimalne temperature denaturacije slijedi isti trend kao i početna temperatura te nije uočena direktna povezanost s koncentracijom, vremenom zadržavanja ili izloženosti ultrazvuku.

Uspoređuju li se vrijednosti dobivene kod uzoraka nakon decelularizacije i nakon digestije vidimo da su kod uzoraka koji su obrađivani uz pomoć SDS-a temperature više kod onih koji su prošli samo decelularizaciju. Isto se to vidi i kod većine uzoraka koji su obrađivani sa SLES-om, iznimka je SLES 0.5a. Kod uzorka SLES 0.5a gdje je decelularizacija potpomognuta ultrazvukom vidljiv je isti trend osim kod SLES 0.5a 8h. Uočava se da digestija, kao dodatna

obrada, nema pozitivan utjecaj na početnu i maksimalnu temperaturu denaturacije jer pridonosi njenom snižavanju. Mogući razlozi zbog kojih dolazi do razlike temperatura između uzoraka koji su prošli samo decelularizaciju i onih koji su prošli decelularizaciju i digestiju su promjena strukture i molekulske mase uzorka. Tijekom procesa decelularizacije iz tkiva se uklanjaju stanice i dio komponenata ECM-a se uništava dok tijekom digestije još dolazi do razgradnje bioloških makromolekula na manje segmente pomoću enzima. Smanjenjem broja većih makromolekula može doći do smanjenje intenziteta termičkih prijelaza što dovodi do smanjenja vršne temperature. [45]

Početna temperatura denaturacije je kod decelulariziranih uzoraka viša od 37 °C što ih čini pogodnima za print osim uzoraka SLES 0.5a, SLES 0.5a 1h i SLES 0.5a 2h. Najveća vršna temperatura kod uzoraka nakon decelularizacije postignuta je kod uzorka SLES 0.5b i iznosi 103,8 °C, dok je kod uzorka nakon digestije postignuta kod uzorka SLES 0.5a 4h i iznosi 101,0 °C što znači da ti uzorci denaturiraju pri najvišim temperaturama i da su stabilniji za 3D ispis.

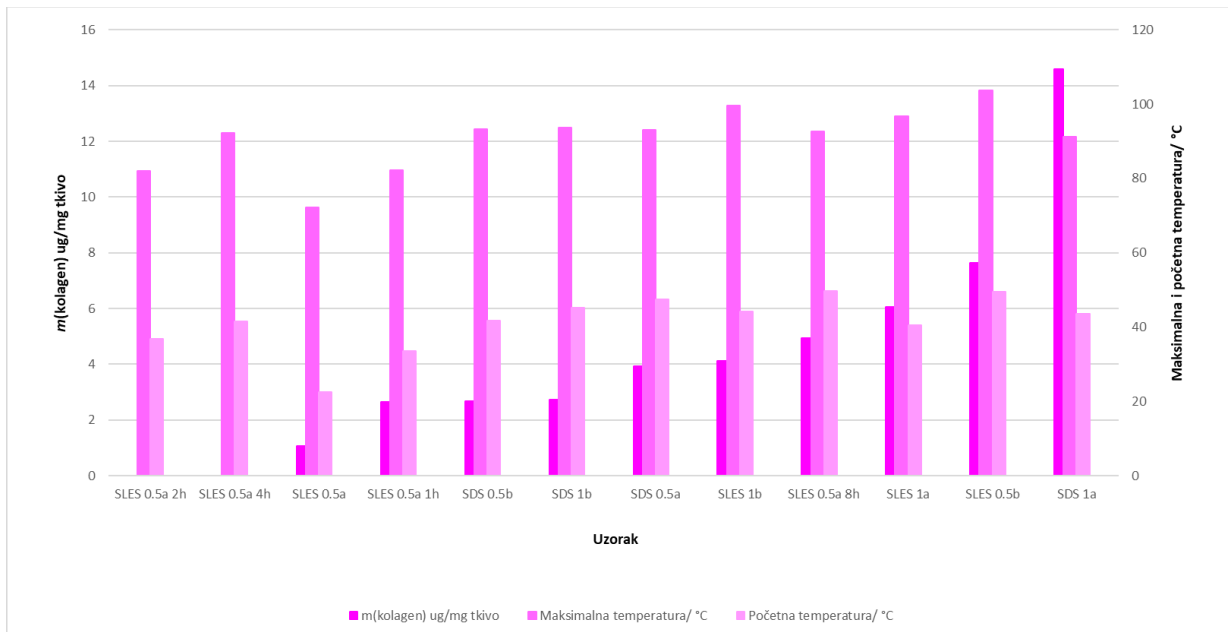
Postoji potencijalna povezanost između normalizirane entalpije te zaostale količine kolagena. Normalizirana entalpija je toplina koja se apsorbira ili oslobađa tijekom denaturacije dok je kolagen glavni protein u tkivu te ima važnu ulogu u mehaničkoj čvrstoći. Veća količina kolagena može značiti više denaturiranih kolagenih molekula što može dovesti do veće oslobođene ili apsorbirane topline tj. normalizirane entalpije tijekom procesa. [46,47] Na slici 8 prikazane su vrijednosti zaostale količine kolagena i normalizirane entalpije nakon decelularizacije. Nije uočena direktna povezanost količine kolagena i normalizirane entalpije.



Slika 8. Usporedba zaostale količine kolagena i normalizirane entalpije nakon decelularizacije

Vrijednosti entalpija značajno variraju, a posebno kod malih količina kolagena. Mogući razlog tome je prisutnost drugih tvari koje mogu utjecati na normaliziranu entalpiju, a ne samo kolagen. Te tvari mogu termički reagirati i time povećati entalpiju što dovodi do veće entalpije kod uzoraka s manjom količinom kolagena. [48] Budući da je potrebna veća vrijednost entalpije i što veća količina očuvanog kolagena, moglo bi se zaključiti da je uzorak SDS 1a onaj koji ima najveći udio kolagena te jednu od viših entalpija najpogodniji uzorak za daljnja ispitivanja.

Također postoji i potencijalna veza između zaostale količine kolagena i maksimalne i početne temperature denaturacije. Moguće je da veća količina kolagena znači i veću količinu kolagena koji je denaturirao, što pak znači veću promjenu topline, a time i višu vršnu temperaturu. Veće količine kolagena mogle bi povećati temperaturnu stabilnost što moguće rezultira višom početnom temperaturom denaturacije. [49]



Slika 9. Usporedba zaostale količine kolagena te početne i maksimalne temperature denaturacije nakon decelularizacije

Na slici 9 usporedno su prikazane zaostale mase kolagena te početne i maksimalne temperature denaturacije uzoraka nakon decelularizacije. Kao i u slučaju entalpije, niti ovdje nije uočena direktna povezanost količine kolagena i temperature denaturacije. Takvo odstupanje moguće je zbog prisutnost drugih tvari u uzorku što znači da u analiziranoj masi uzorka nije prisutan samo kolagen već i druge tvari koje mogu utjecati na termičke karakteristike uzorka, smanjiti stabilnost i time smanjiti temperature.

Kako je ranije pokazano, prema količini kolagena i vrijednostima entalpije, najprihvatljiviji je uzorak SDS 1a. Također, s obzirom na temperature denaturacije (početna 43,6 °C, maksimalna 91,3 °C) uzorak se smatra dovoljno stabilnim za 3D print pa bi ga trebalo uzeti u obzir za daljnja istraživanja.

5. ZAKLJUČAK

Provedena je decelularizacija jetrenog tkiva uz pomoć dva detergenta (SLES i SDS), digestija te liofilizacija. Uzorci su potom analizirani razlikovnom pretražnom kalorimetrijom čime su određene normalizirana entalpija te početna i maksimalna temperatura denaturacije.

Dobivene vrijednosti entalpije variraju te nije uočena direktna povezanost između količine kolagena i normalizirane entalpije, a mogući razlog je prisutnost drugih tvari koje utječu na entalpiju.

Nije uočena direktna povezanost količine kolagena i temperature denaturacije, a mogući razlog također je prisutnost drugih tvari koje utječu na termičke karakteristike uzorka.

Iz dobivenih rezultata zaključeno je da je uzorak SDS 1a najpogodniji za daljnja istraživanja i potencijalnu primjenu za 3D tisak jer ima najviše očuvanog kolagena, jednu od viših entalpija te dovoljno visoke temperature denaturacije.

6. LITERATURA

- [1] F. Akter, What is Tissue Engineering?, u Tissue Engineering Made Easy, Elsevier Inc., 2016, str. 1–2.
- [2] F. Akter, Principles of Tissue Engineering, u Tissue Engineering Made Easy, Elsevier Inc., 2016, str. 3–16.
- [3] J. L. Olson, A. Atala, and J. J. Yoo, Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions, Chonnam Med J, vol. 47, no. 1, p. 1, 2011, str. 1-13.
- [4] A. Gilpin and Y. Yang, Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications, BioMed Research International, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017, str. 1-10.
- [5] J. Kopeček, Hydrogel biomaterials: A smart future?, Biomaterials, vol. 28, no. 34, Dec. 2007, str. 5185–5192.
- [6] S. Todros, M. Todesco, and A. Bagno, Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration, Processes, vol. 9, no. 11. MDPI, Nov. 2021.
- [7] D. E. Albert, A practical approach to analytical chemistry of medical devices, u Biocompatibility and Performance of Medical Devices, Elsevier, 2019, str. 49–100.
- [8] J. Macan, Metode toplinske analize, Interna skripta za student poslijediplomskog studija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
- [9] P. K. Chandra, S. Soker, and A. Atala, Tissue engineering: Current status and future perspectives, u Principles of Tissue Engineering, Elsevier, 2020, str. 1–35.
- [10] M. S. Elitok, E. Gunduz, H. E. Gurses, and M. Gunduz, Tissue engineering: Towards development of regenerative and transplant medicine, in Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life, Elsevier Inc., 2018, str. 471–495.
- [11] M. Ivanković, H. Ivanković, M. Antunović, A. Rogina, A. Ressler, and L. Bauer, Preparation of 3D Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Kemija u industriji, vol. 68, no. 9–10, 2019, str. 457–468.
- [12] S. J. Gobbi, V. J. Gobbi, and Y. Rocha, Requirements for Selection/Development of a Biomaterial, Biomedical, vol. 14, no. 3, Brazil, Feb. 2019, str. 10674-10679.
- [13] F. M. Chen and X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, Progress in Polymer Science, vol. 53. Elsevier Ltd, Feb. 2016, str. 86–168.
- [14] F. J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today, vol. 14, no. 3. Elsevier B.V., 2011, str. 88–95.
- [15] M. Chen Wan., Biomaterials from the sea: Future building blocks for biomedical applications, Bioactive Materials, vol. 6, no. 12. KeAi Communications Co., str. 4255–4285, Dec. 2021.
- [16] A. Tarafdar, Advances in biomaterial production from animal derived waste, Bioengineered, vol. 12, no. 1. Taylor and Francis Ltd., 2021, str. 8247–8258.

- [17] S. Todros, M. Todesco, and A. Bagno, Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration, *Processes*, vol. 9, no. 11. MDPI, Nov. 2021.
- [18] E. Troy, M. A. Tilbury, A. M. Power, and J. G. Wall, Nature-based biomaterials and their application in biomedicine, *Polymers*, vol. 13, no. 19. MDPI, Oct. 2021.
- [19] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 3, May 2010, str. 325–347.
- [20] S. Pina, Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications, *Materials*, vol. 12, no. 11. MDPI AG, Jun. 2019.
- [21] M. M. Hasan, K. A. Nayem, M. B. Hossain, and S. Nahar, Production of Tissue Engineering Scaffolds from Poly Caprolactone (PCL) and Its Microscopic Analysis, *International Journal of Textile Science*, vol. 2014, no. 3, 2014, str. 39–43.
- [22] L. Suamte, A. Tirkey, and P. J. Babu, Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications, *Smart Materials in Medicine*, vol. 4. KeAi Communications Co., Jan. 2023, str. 243–256.
- [23] G. Tarun, B. Ajay, K. Bhawna, K. Sunil, J. Ravi, and S. G. L. Bihani, Scaffold: tissue engineering and regenerative medicine, *International research journal of pharmacy*, vol. 2, no. 12, 2011, str. 37-42.
- [24] F. M. Chen and X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Progress in Polymer Science*, vol. 53. Elsevier Ltd, Feb. 2016, str. 86–168.
- [25] T. C. Ho, Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine, *Molecules*, vol. 27, no. 9. MDPI, May. 2022.
- [26] Q. Xing, Z. Qian, W. Jia, A. Ghosh, M. Tahtinen, and F. Zhao, Natural Extracellular Matrix for Cellular and Tissue Biomanufacturing, *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 3, no. 8, Aug. 2017, str. 1462–1476.
- [27] J. C. Valdoz, The ECM: To scaffold, or not to scaffold, that is the question, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 23. MDPI, Dec. 2021, str. 1-23.
- [28] J. J. A. Poole and L. B. Mostaço-guidolin, Optical microscopy and the extracellular matrix structure: A review, *Cells*, vol. 10, no. 7. MDPI, Jul. 2021, str. 1-30.
- [29] K. Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner, Collagens - Structure, function, and biosynthesis, *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 55, no. 12, Nov. 2003, str. 1531–1546.
- [30] https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1574-4_2. (pristup 23.5.2023.)
- [31] J. K. Kular, S. Basu, and R. I. Sharma, The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering*, vol. 5. SAGE Publications Ltd, Jan. 2014.
- [32] H. Jakubowski, P. Flatt, Glycoconjugates - Proteoglycans, Glycoproteins, Glycolipids and Cell Walls, College of St. Benedict and Western Oregon University, 2023, <https://bio.libretexts.org/@go/page/14957> (pristup 23.5.2023.)

- [33] Y. Song, F. Zhang, R. J. Linhardt, Glycosaminoglycans, u G. Lauc, I. Trbojević-Akmačić, *The Role of Glycosylation in Health and Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1325. Springer, Cham., 2021, str. 103-116.
- [34] F. Zhang, Z. Zhang, and R. J. Linhardt, Glycosaminoglycans, u *Handbook of Glycomics*, Elsevier Inc., 2010, str. 59–80.
- [35] M. Mulder, Phase Inversion Membranes, u L.T. Rozelle, J.E. Cadotte, R.D. Corneliusen and E.E. Erickson , *Development of new reverse osmosis membranes for desalination*, 2000., str. 3331-3346.
- [36] P. R. Avallone, Gelation kinetics of aqueous gelatin solutions in isothermal conditions via rheological tools, *Food Hydrocoll*, vol. 111, Feb. 2021., str. 1-7.
- [37] D. K. Baby, Rheology of hydrogels, u *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites: Theory, Modelling and Applications*, Elsevier, 2019, str. 193–204.
- [38] Z. Kaberova, E. Karpushkin, M. Nevoralová, M. Vetrík, M. Šlouf, and M. Dušková-Smrcková, Microscopic structure of swollen hydrogels by scanning electron and light microscopies: Artifacts and reality, *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 3, Mar. 2020., str. 1-18.
- [39] https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html. (pristup 26.5.2023.)
- [40] C. H. Lin, Sonication-assisted method for decellularization of human umbilical artery for small-caliber vascular tissue engineering, *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 11, Jun. 2021., str. 1-21.
- [41] <https://www.jove.com/v/5559/using-differential-scanning-calorimetry-to-measure-changes-in-enthalpy>. (pristup 16.7.2023.)
- [42] U. Scholarworks, C. A. Becker, The Effect of Pepsin Digestion on Protein Composition in Decellularized Lung Alveolar Extracellular Matrix Hydrogels, *Undergraduate Theses*, University of Vermont, 2022., str- 1-47.
- [43] Konieczny, P., Tomaszewska-Gras, J., Andrzejewski, DSC and electrophoretic studies on protein denaturation of *Anodonta woodiana*, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 126 , 2016, str. 69-75.
- [44] <https://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biochemistry/biochemistry/denaturation> (pristup 17.7.2023.)
- [45] V. Khati, Decellularized liver extracellular matrix as a 3D scaffold for bioengineering applications, *Doctoral thesis*, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, 2022.
- [46] L. Bozec, M. Odlyha, Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy, *Biophysical journal*, vol. 101, no.1, 2011, str. 228-36.
- [47] *Differential Scanning Calorimetry*, Jan. 2023,
<https://chem.libretexts.org/@go/page/1898>. (pristup 17.7.2023.)

- [48] S. Skrzyński, A. Sionkowska, and A. Marciniak, DSC Study of Collagen in Disc Disease, *Journal of Biophysics*, vol. 2009, Feb. 2009, str. 1–4.
- [49] X. Zhang, S. Xu, L. Shen, Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification, *J Leather Sci Eng*, vol. 2, no. 19 , 2020, str. 1-29.