

# Ispitivanje različitih uvjeta decelularizacije tkiva u pripravi hidrogelova izvanstanične matrice

---

**Erceg, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:273733>

*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

Valentina Erceg

**Ispitivanje različitih uvjeta decelularizacije tkiva u pripravi hidrogelova  
izvanstanične matrice**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Gordana Matijašić

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

izv. prof. dr. sc. Vesna Ocelić Bulatović

Zagreb, travanj 2024.

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

Kandidatkinja Valentina Erceg

Predala je izrađen završni rad dana: 24. travnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

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

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Igor Dejanović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

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

Završni ispit održat će se dana: 29. travnja 2024.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Matijašić na ukazanoj prilici, strpljenju i korisnim uputama prilikom izrade ovoga rada.*

*Zahvaljujem i asistentici Teodori Prebeg, mag. ing. cheming, na svim savjetima i strpljenju pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem svojim prijateljicama, a posebno svojim roditeljima na svojoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog mog školovanja.*

## SAŽETAK

Inženjerstvo tkiva je grana inženjerstva koja u novije vrijeme poprima sve veći značaj jer pruža alternativu transplantaciji organa iz ljudskih donora. Zbog rastuće potrebe za transplantacijom organa i dugim listama čekanja te sve starijom populacijom očekuje se da će potreba za transplantacijom organa u budućnosti rasti. Inženjerstvo tkiva bi također moglo riješiti pitanje etičnosti ispitivanja lijekova na životinjama jer bi nosači nastali ovim tehnologijama trebali bolje oponašati ljudsko tkivo. U tu svrhu razvijeni su nosači napravljeni od različitih biokompatibilnih materijala koji posjeduju različita fizička i kemijska svojstva. Od tih biomaterijala, poseban se značaj pridaje decelulariziranoj izvanstaničnoj matrici jer ona ima manju mogućnost izazivanja imunološke reakcije te joj trodimenzionalna arhitektura početnih tkiva ostaje bolje očuvana nakon decelularizacije.

U ovom radu ispitano je šest različitih uvjeta decelularizacije svinjske jetre kako bi se utvrdio njihov utjecaj na strukturu i sastav biomaterijala. Korištene su 1 %-tne i 0,5 %-tne otopine natrijeva lauret sulfata (SLES), kao i 0,5 %-tna otopina detergenta SLES-a u kombinaciji obrade ultrazvukom u vremenskom periodu od 1, 2, 4 i 8 h. Kako bi se procijenila očuvanost strukture dobivene izvanstanične matrice provedena je karakterizacija bioloških komponenata i analiza strukture tkiva svjetlosnim mikroskopom te stereomikroskopom.

Dobiveni rezultati pokazuju da je decelularizacija uspješno provedena u svim uzorcima jer se udio DNK značajno smanjio. Vrlo dobri uvjeti decelularizacije postižu se s 0,5 %-tnom otopinom SLES-a i 0,5 %-tnom otopinom SLES-a u ultrazvučnoj kupelji u vremenskom trajanju od 1 h. Prilikom decelularizacije u ovim uvjetima postignut je najmanji udio DNK, a struktura izvanstanične matrice je ostala očuvana. Povećanje koncentracije SLES-a imalo je blago djelovanje na strukturu tkiva te je značajan udio bioloških komponenata ostao očuvan. Nadalje, duljom ultrazvučnom obradom uzoraka nastala su značajna oštećenja strukture izvanstanične matrice. Iz dobivenih rezultata također je vidljivo da je u svim uzorcima tijekom decelularizacije udio glikozaminoglikana pao ispod granice detekcije.

**Ključne riječi:** inženjerstvo tkiva, nosač, decelularizirana izvanstanična matrica, biomaterijal, SLES

## **ABSTRACT**

### ***Influence of different decellularization parameters in the production of hydrogels from extracellular matrix***

Tissue engineering is a branch of engineering that has recently become increasingly important because it offers an alternative to organ transplantation from human donors. Due to the growing demand for organ transplants and the long waiting lists, as well as the aging population, the need for organ transplants is expected to increase in the future. Tissue engineering could also solve the ethical problem of drug testing on animals, as the scaffolds produced by these technologies should better mimic human tissue. To this end, scaffolds made of various biocompatible materials with different physical and chemical properties have been developed. Among these biomaterials, decellularized extracellular matrix is of particular importance because it has a lower potential to induce immune responses and its three-dimensional architecture is better preserved after decellularization.

In this study, six different conditions for decellularization of porcine liver were investigated to determine their effects on the structure and composition of the biomaterial. 1 and 0.5 wt% solutions of sodium lauryl sulfate (SLES) and a 0.5 wt% solution of SLES detergent in combination with sonication for 1, 2, 4, and 8 hours were used. To evaluate the preservation of the structure of the obtained extracellular matrix, the biological components were characterized, and the tissue structure was analyzed using a light microscope and a stereomicroscope.

The obtained results show that decellularization was successfully performed in all samples, as the DNA content decreased significantly. Very good decellularization conditions were obtained with a 0.5% SLES solution and a 0.5% SLES solution with 1-hour sonication. Under these conditions, the lowest DNA content was obtained, and the structure of the extracellular matrix was preserved. Increasing the SLES concentration had only a minor effect on tissue structure, as a significant portion of the biological components remained intact. Moreover, prolonged ultrasonic treatment of the samples resulted in significant damage to the extracellular matrix structure. It is also evident from the results obtained that the content of glycosaminoglycans in all samples fell below the detection limit during decellularization.

**Key words:** tissue engineering, scaffold, decellularized extracellular matrix, biomaterial, SLES

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Inženjerstvo tkiva .....	2
2.2. Biomaterijali .....	3
2.3. Nosači .....	8
2.4. Izvanstanična matrica .....	11
2.5. Decelularizacija .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Kemikalije .....	16
3.1.2. Mehanički instrumenti.....	16
3.2. Decelularizacija .....	16
3.3. Metode karakterizacija .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
5. ZAKLJUČAK .....	23
6. LITERATURA.....	24
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA .....	29



# 1. UVOD

Tkivo je vitalno za organizaciju višestaničnih organizama jer tvori različite organe te ono služi kao glavni nosač oblika tijela [1]. No tkivo se može oštetiti zbog pogrešaka prilikom njegova razvoja ili kao posljedica različitih bolesti, ozljeda, starenja ili akumulacije štetnih tvari. To može rezultirati odumiranjem tkiva te na kraju odumiranjem cijelog organa. Ljudsko tijelo može popraviti i obnoviti neke organe kao što su koža, kost ili jetra. Iako se jetra može obnoviti do svoje originalne veličine, ona nikada više neće imati isti oblik. Kost se ne mogu obnoviti same ako su značajno oštećene, kao u slučaju osteoporoze koja zbog životnog stila i sve starije populacije postaje sve učestalija. Drugi organi, kao što su bubrezi ili srce se ne mogu obnoviti i u krajnjem se slučaju moraju zamijeniti doniranima kako bi pacijent preživio.

No zbog nedostatka donora organa, rastućeg broja ljudi koji čekaju na transplantaciju i sve stariju populaciju, ovisnost o doniranom tkivu i organima postaje nepraktična [2]. Zbog kratkog vremenskog okvira, organi se većinom ne mogu uspješno transplantirati i mnogi ljudi ne dočekaju novi organ. Od kronične bolesti bubrega 2017. godine umrlo je 1,23 milijuna ljudi [3]. Pacijenti koji dočekaju i prežive transplantaciju moraju cijeli život uzimati imunosupresivne lijekove koji narušavaju kvalitetu života kako bi spriječili odbacivanje organa te usprkos tomu uvijek može doći do imunološkog odgovora pacijenta i posljedičnog odbacivanja primljenog organa.

U novije vrijeme se također ispituje etičnost ispitivanja lijekova na životinjama te se ulažu značajna sredstva kako bi se pronašla njihova adekvatna zamjena. Iako su ispitivanja na životinjama doprinijela razvoju medicine, one ne predstavljaju učinkovitu zamjenu za ljudski organizam te neki lijekovi koji su uspješno testirani na životinjama ne djeluju na ljude. Pored toga, otkriveno je da u 2D staničnim modelima monokultura koje se koriste u kliničkim ispitivanjima nedostaje interakcija između stanica i izvanstanične matrice koje su prisutna u 3D modelu živog organizma, a koje značajno utječu na rast stanica i njihovo propadanje. Kako bi se nosili s tim problemima razvijene su nove metode, materijali i nove znanstvene discipline kao inženjerstvo tkiva te regenerativna medicina.

Cilj ovoga rada je ispitati različite uvjete decelularizacije svinjske jetre. Provedena je kemijska metoda (upotreba detergenata) kao i kombinacija kemijske i fizičke metode (upotreba ultrazvuka), a djelotvornost decelularizacije procijenjena je na temelju analize strukture tkiva i udjela preostalih bioloških komponenata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Inženjerstvo tkiva

Langer i Vacanti [4] su definirali inženjerstvo tkiva kao interdisciplinarno polje koje primjenjuje principe inženjerstva i znanosti kako bi se razvila biološka zamjena koja može potpuno zamijeniti tkivo ili poboljšati njegovo funkcioniranje. Ono povezuje znanja iz nanotehnologije, stanične biologije, znanosti o materijalima i medicine s idejom stvaranja *in vitro* zamjenskog tkiva ili organa iz stanica pacijenta kako bi se izbjegao imunološki odgovor organizma.

Inženjerstvo tkiva definirano je s tri glavna principa: 1) usmjeravanje regeneracije tkiva koristeći samo matrice, 2) ubrizgavanje samo autoložnih, alogenih ili ksenogenih stanica i/ili 3) stvaranje nakupina stanica koje se stavljaju u ili na matricu.

Autologne stanice su stanice dobivene iz pacijenta, koje se nakon složene obrade vraćaju u pacijentovo tijelo, a njihova velika prednost je nedostatak imunološke reakcije. One imaju ograničeni životni vijek, malu brzinu staničnog rasta te je teško izdvojiti dovoljno stanica za njihovu uporabu. Alogene stanice su stanice dobivene od druge osobe koja imaju kompatibilna krvna tijela s pacijentovim. Kod ovih vrsta stanica može doći do imunološkog odgovora, iako se to rijetko događa. Matične stanice su nespecializirane stanice koje se mogu same obnoviti. One mogu biti i autogene i alogene stanice, a najčešće se koriste zbog svoje velike mogućnosti da se pretvore u druge vrste stanica. Ksenogene stanice su stanice dobivene iz druge životinjske vrste. Zbog nekompatibilnosti često dolazi do odbacivanja ovih stanica.

Prema prvom principu nosač se usađuje na željeno mjesto i stanice iz okolnog tkiva se gomilaju kao bi popunile nosač. Prednost drugog principa je što ima minimalnu invazivnost te stanice mogu biti manipulirane tehnologijom rekombiniranih gena ili se mogu proširiti kloniranjem prije ubrizgavanja. Trećim principom (metodom) nakupine stanica su nasađene na biorazgradive nosače, koji su dizajnirani kao sintetičke izvanstanične matrice, a nasađuju se na potrebno mjesto u tijelu [5].

Tkivo je teško regenerirati i svaki organ ima složenu morfologiju te se svaki sastoji od različitih struktura čija je svojstva teško replicirati. Kako bi se tkivo uspješno regeneriralo potrebno je nasaditi žive stanice na odgovarajuću 3D podlogu od biomaterijala koja mora svojim mehaničkim i strukturnim svojstvima biti ekvivalentna tkivu, a predstavljat će nosač u

kojem će se tkivo razvijati i rasti. Nakon nasađivanja stanica one se u bioreaktoru podvrgavaju biomehaničkim podražajima koji svojim djelovanjem utječu na stanice kao bi poboljšale diferencijaciju stanica i njihov prostorni položaj, a predstavljaju *in vivo* podražaje kao što su stres ili osmotski tlak, koji utječu na razvoj stanica, izmjenu nutrijenata i otklanjanje toksičnih tvari.

## 2.2. Biomaterijali

Biomaterijal je tvar osmišljena da preuzme takav oblik, kako bi se sama ili kao dio složenog sustava koristila pri usmjeravanju tijeka bilo kojeg terapijskog ili dijagnostičkog procesa [6]. Važno svojstvo biomaterijala je njihova biokompatibilnost, odnosno nedostatak imunološke reakcije, ali i ispravno funkcioniranje u biološkom okruženju. Primjer potonjeg je Teflon (politetrafluoretilen) koji je biološki kompatibilan. Međutim, kada je ugrađen u čeljust pacijenta može doći do loma materijala što posljedično dovodi do značajne imunološke reakcije koja oštećuje okolna tkiva [7]. Kako bi bili sigurni za pacijenta, biomaterijali moraju zadovoljiti mnoge preduvjete. Ne smiju biti kancerogeni, korozivni, produkti njihove razgradnje ne smiju biti toksični, moraju biti kompatibilni sa krvlju i moraju imati mehanička svojstva sukladna njihovoj namjeni, ne smiju uzrokovati upale u tijelu, grušanje krvi, nakupljanje bakterija te ne smiju proizvesti alergijsku reakciju.

Biomaterijali se mogu podijeliti prema vrsti materijala na resorbirajuće i neresorbirajuće, prirodne i sintetske kao i na bioinertne, bioresorbirajuće i bioaktivne i mnoge druge. Bioinertni materijali uzrokuju minimalnu imunološku reakciju tako što okolno tkivo stvara neprijanjajuću kapsulu oko površine implantata. Kod bioresorbirajućih materijala površina implantata se kroz niz složenih metaboličkih procesa resorbira i tkivo popunjava mjesto na kojem je bio implantat. Kod bioaktivnih materijala površina implantata tvori vezu s mekim tkivom čime se potiče njegova obnova i zacjeljivanje.

Najčešća podjela biomaterijala je prema njihovoj kemijskoj strukturi i to na:

- Metale i njihove legure
- Keramiku i staklo
- Polimere
- Kompozite.

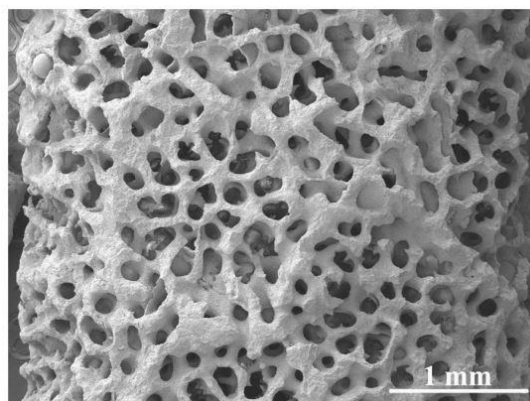
Metali i legure posjeduju izvrsna mehanička svojstva, izuzetno su otporni na lomljenje i zamor materijala. U medicini se koriste u obliku proteza za kukove, koljena te za izradu žica i vijaka, a zbog svoje čvrste strukture koriste se u inženjerstvu tkiva kao nosači za kosti. Metali koji se tradicionalno koriste u medicini i inženjerstvu tkiva su neresorbirajući, a koriste se jer su antikorozivni, biokompatibilni i lako se oblikuju. Nehrdajući čelik, čisti titan i njegove legure te legure kobalta i kroma imaju veliki Youngov modul elastičnosti zbog kojega mogu uzrokovati smanjenje gustoće kosti budući da na sebe preuzimaju njezino opterećenje (engl. *stress shielding*). Nakon nekog vremena potrebno ih je ukloniti iz tijela pacijenta. Nakon ugradnje metalnih implantata dolazi do njihovog kontakta s tjelesnim tekućinama, zbog čega metali oksidiraju. Korozija metala može utjecati na njegovo fragmentiranje, otpuštanje kancerogenih iona te odbacivanje implantata. Neke od prvih titanijevih legura otpuštanjem iona aluminijskih i vanadijskih uzrokovale su toksičnu reakciju [8]. Materijali bazirani na željezu i magneziju, kao i njihove legure, koriste se kao nosači za kosti [9]. Ovi metali i legure su resorbirajući i potiču formiranje kostiju. Kako postoje naznake da su željezni implantati toksični *in vivo*, velika pozornost se pridaje magnezijevim legurama. Youngov modul magnezijevih legura puno je bliži bioinertnim medicinskim materijalima, kao što su titan i njegove legure, nehrđajući čelik i kobaltne legure, no njihova čvrstoća je manja od bioinertnih metala, ali je veća od bioresorbirajućih polimera [10]. Na slici 1 prikazani su nosači napravljeni od titana.



Slika 1. Nosač napravljen od titana [11]

Keramika je anorganski, nemetalni materijal koji je građen od oksida, nitrida, sulfata i karbida metala i metaloida. Biomaterijali od keramike otporni su na koroziju i trošenje, imaju manju gustoću, bolju poroznost i tvrdoću, veliki modul elastičnosti te nižu cijenu od biomaterijala izrađenih od metala i njihovih legura. No oni se loše sinteriraju, imaju loša

mehanička svojstva i imaju lošu električnu i toplinsku vodljivost. Keramika se upotrebljava u medicini za izradu proteza za kukove, u dentalnoj medicini za izradu zubnih implantata, a u tkivnom inženjerstvu za izradu nosača za kosti. Bioinertna keramika može se sastojati od aluminijeva oksida, djelomično stabiliziranog cirkonijeva nitrida ili karbida. Ona je nekorozivna, ne stupa u biološku reakciju s tkivom te samim time nije pogodna za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu već se koristi u obliku implantata u ortopedskim pripravcima. Bioaktivna keramika posjeduje svojstva bioinertne i bioresorbirajuće keramike [12]. Najčešće se primjenjuje u obliku biostakla na bazi  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  i  $\text{P}_2\text{O}_5$ . U doticaju s tjelesnim tekućinama otpušta ione što potiče nastanak sloja kalcija i fosfora na površini biomaterijala. To potiče nastanak sloja hidroksikarbonat apatita koji povezuje implantat sa kosti. Biostaklo-keramika ima bolja mehanička svojstva, ali lošija biološka svojstva od biostakla. Bioresorbirajuća keramika se koristi za zacjeljivanje kostiju nakon loma. Nakon ugradnje polako se zamjenjuje s tkivom jer se kemijski raspada na manje čestice. Ona može biti građena od hidroksiapatita, kalcijeva fosfata, kalcijeva sulfata dihidrata i koralja jer se oni uglavnom sastoje od kalcijeva karbonata. Wang i suradnici [13] su od prirodnih koralja (slika 2) napravili nosače oko kojih su omotali stanične listove napravljene od adipoznih stanica novozelandskih zečeva. U deset golih miševa su usađeni stanični listovi, a u drugih deset koraljni nosači sa staničnim listovima. Iz dobivenih rezultata utvrđeno je da stanični listovi, kada se upotrebljavaju sami, ne mogu popraviti velika oštećenja kostiju jer nemaju potrebna mehanička svojstva. Međutim, u kombinaciji sa koraljima, koji imaju poroznu strukturu pogodnu za prihvaćanje i rast stanica te izmjenu nutrijenata, nastaju tvrđe i gušće kosti te su neke kosti nastale i unutar nosača.



Slika 2. Struktura koraljnog nosača na kojoj su vidljive pore prosječne veličine od 400  $\mu\text{m}$  [13]

Polimerni biomaterijali se najčešće dijele na prirodne i sintetičke. Sintetički polimeri mogu sadržavati komponente keramike, metala, bionerazgradivih i razgradivih polimera. Mogu se proizvoditi u velikim količinama po niskoj cijeni, njihova tražena svojstva se lako podešavaju tijekom proizvodnje, no oni se svojom strukturom značajno razlikuju od tkiva i organa što može utjecati na njihovu biokompatibilnost i mogućnost regeneracije tkiva. Zbog procesa dobivanja postoji mogućnost da su toksični i da u tijelu izazovu neželjenu reakciju. Brzina raspada polimera ovisi i o njihovom stupnju kristalnosti, kao i o molekulskoj težini [14]. Polimeri s većom molekulskom masom, tj. duljim lancem sporije će se razgrađivati. Ovi polimeri se koriste u medicini za intraokularne leće i dobave lijekova, kao dodatak metalnim implantatima za kukove, a u inženjerstvu tkiva se od njih izrađuju nosači za kosti, kralježnicu, mišiće i mnoge druge. Najčešće se upotrebljavaju polietileni i polistireni: polietilen glikol (PEG), politetrafluoro etilen (PTFE), poliglikolna kiselina (PGA), poli(mliječno-glikolna) kiselina (PLGA), polimliječna kiselina (PLA), polimetil metakrilat (PMMA), polikaprolakton (PCL). Polietilen glikol se može sintetizirati kao ravnolančasti ili razgranati polimer koji u svom sastavu sadrži hidroksilnu grupu. On je dobro topljiv u organskim otapalima i vodi te ne izaziva imunološku reakciju unošenjem u tijelo. PEG se odupire adsorpciji proteina, što omogućava da se stvore nosači koji će se na točno željenom mjestu moći povezati sa stanicama [15]. Njegova biorazgradivost se može prilagoditi s reaktivnim grupama tiola, amina, vinil sulfona i mnogih drugih. PEG se najčešće koristi u obliku hidrogelova. Hidrogelovi su hidrofilni polimeri sličnih fizičkih svojstava tkivu, sposobni upijati i zadržavati vodu, čak i tisuću puta veće težine nego koju oni imaju u suhom stanju [16]. Poliglikolna kiselina ima visoku temperaturu taljenja koja iznosi oko 200 °C, veliku vlačnu čvrstoću, brzo se razlaže što utječe na njezina mehanička svojstva. Tijekom razgradnje može doći do značajnog nastanka glikolne kiseline koja uzrokuje snažnu imunološku reakciju. Ovaj polimer podložan je enzimatskoj razgradnji kao i hidrolizi bez vanjskog utjecaja zbog esterske veze u glavnom lancu. Poli(mliječno-glikolna) kiselina sastoji se od poliglikolne kiseline i polimliječne kiseline u različitim omjerima što utječe na svojstva novonastalog polimera. PLGA se lako može optimizirati na potrebnu veličinu, brzinu raspadanja i mehanička svojstva te je biokompatibilna, iako njenom razgradnjom nakon implantacije može doći do imunološke reakcije. Raspadom PLGA nastaju glikolna i mliječna kiselina, koje snižavaju pH okolnog tkiva što potiče upalne procese [17]. Brzina raspadanja PLGA direktno je proporcionalna s udjelom glikolne kiseline, a ovisi i o veličini i obliku. PLGA ima brzinu raspadanja veću od mnogih polimera zbog čega se često koristi za dobavu lijekova, a nosači napravljeni od ovoga polimera potiču stanice na rast i diferencijaciju.

Prirodni polimeri mogu biti polinukleotidi (RNA, DNK), polisaharidi (hitin, alginat, glikozaminoglikan, amiloza, škrob, celuloza) ili proteini (keratin, miozin, kolagen, fibrinogen, aktin, svila, želatina, elastin i drugi). Oni posjeduju veliku biokompatibilnost i bioaktivnost zbog koje mogu potaknuti stanice na prijanjanje, rast i zacjeljivanje tkiva [9]. No, iako imaju mnogo prednosti biomaterijali mogu uzrokovati imunološku reakciju nakon implantacije, imaju loša mehanička svojstva, svojstva im variraju od serije do serije što može utjecati na kemijska i mehanička svojstva, raspadaju se pri temperaturama nižim od njihovih temperatura taljenja, teško ih je pročistiti i ukoliko su izdvojeni iz životinja mogu prenijeti bolesti na ljude. Svila je vlakno koje proizvode neki člankonošci za izgradnju mreža i kukuljica. Svileni fibroin, prirodni protein domesticiranog dudova svilca *B.mori* pruža važan skup opcija za biomaterijale i nosače zbog svoje visoke vlačne čvrstoće, kontrolirane biorazgradivosti, hemostatskih svojstava, netoksičnosti, niske antigenosti, i protuupalnih karakteristika [18]. Vlakna svile moraju se prije primjene pročistiti od sericina jer on prilikom ugradnje uzrokuje imunološku reakciju. Svila se lako proizvodi i oblikuje u prah, hidrogel, gel ili nosač. Neke od primjena svile u medicini su kao strukturni implantat, za kirurške šavove jer uzrokuju manje upala i infekcija nego bilo koji drugi materijal te inženjerstvu koštanog tkiva, ligamenata i hrskavica. Paukova svila posjeduje vrlo raznolika kemijska i strukturna svojstva, kako zbog velikog broja vrsta pauka, tako i zbog njihove sposobnosti da rade i do sedam različitih vrsta mreža. Paukova svila ima zanimljiva svojstva za inženjerstvo tkiva jer je jedan od najsnažnijih biomaterijala te ne proizvodi sericin kao dudov svilac. Međutim, zasad ju je nemoguće proizvesti u velikim industrijskim količinama. Paukova svila je puno elastičnija od svile insekata i može podnijeti više mehaničkog stresa uzrokovanog savijanjem, koja uz svoju memoriju oblika, omogućuje paukovoј svili da nadmaši mnoga prirodna i sintetska vlakna u određenim biomedicinskim primjenama [19]. Dastagir i suradnici [20] koristili su glavnu konstrukcijsku mrežnu nit svile ženki pauka *Nephila edulis* koju su paralelno ispleli unutar okvira od nehrđajućeg čelika. Na njih su nasadene stanice te je sve smješteno u bioreaktor na tri tjedna kako bi se simulirali stvarni uvjeti. Ovim istraživanjem dobiveni su nosači svojstvima slični krvnim žilama. U posljednje vrijeme velika se pozornost pridaje polimerima iz morskih organizama kao što su hitozan i fukoidan jer su biokompatibilni, ne mogu prenijeti bolesti na ljude, dostupni su u velikim količinama te ne postoji vjerska skepsa kao po pitanju korištenja svinjskog tkiva. Hitozan je polimer polukristalične prirode koji nastaje uklanjanjem proteina iz hitina i otapanjem kalcijeva karbonata. Ima loša mehanička svojstva i lošu topljivost u vodi i organskim otapalima zbog jakih vodikovih veza koje formira. Dobre je kompatibilnosti s tkivom, a njegovi su produkti razgradnje bezopasni. Djeluje antibakterijski zbog pozitivno nabijenih amino-grupa koje mogu reagirati s negativno nabijenom površinom

bakterija. Postoji mnogo dokaza da je hitozan sposoban boriti se sa *Streptococcus mutans*, *Actinomyces actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* [21]. Zbog ovog svojstva postoji interes za primjenu hitozana u antibioticima za bakterije koje su otporne na uobičajene antibiotike te u dentalnoj medicini. Lako se oblikuje za različite namjene te se zbog toga koristi kao nosač za kosti, središnji živčani sustav i zglobne hrskavice. Prilikom izrade biomaterijala obično se koriste mješavine različitih polimera jer biomaterijal izrađen od samo jednog polimera ne posjeduje sva željena mehanička i biološka svojstva. Svojstva polimerne mješavine ovise ne samo o polimerima koji se koriste već i o njihovom udjelu što je vidljivo u istraživanju Perez-Puyana i suradnika [22] koji su koristili mješavine kolagena i hitozana. Carvalho i suradnici [23] koristili su kolagen dobiven iz meduze *Rhizostoma pulmo*, fukoidan iz smeđe alge *Fucus vesiculosus*, hitozan iz gladiusa lignje *Dodiscus gigas*, a kondroitin sulfat iz hrskavice morskog psa. Pripremali su različite vrste kriogelova i ispitivali njihova svojstva. Pokazali su da se kombinacijom različitih komponenata može utjecati na strukturu pora unutar materijala kao i na reološka svojstva gelova.

Pojam *kompozitni materijal* se odnosi na kombinaciju, na mikroskopskoj razini, dva ili više materijala, koji se razlikuju po sastavu ili morfologiji, kako bi se dobila specifična kemijska, fizička i mehanička svojstva [24]. Oni se sastoje od barem dvije faze, od kojih je jedna kontinuirana i ponaša se kao matrica, a druga je diskontinuirana i djeluje kao pojačanje. Kompoziti uključuju metal-metal, metal-polimer, keramika-keramika, keramika-polimer nosače, keramika-hidrogel i funkcionalne kompozitne nosače na osnovi keramike [9]. Neke od primjena kompozitnih materijala su u inženjerstvu koštanog tkiva, inženjerstvu srčanog tkiva i inženjerstvu krvnih žila.

### **2.3. Nosači**

Nosači su privremene trodimenzionalne strukture koje služe kao izvanstanična matrica, trodimenzionalno organizirajući stanice i potičući rast i nastanak željenog tkiva [25]. Svojom strukturom te biološkim i mehaničkim svojstvima nosači moraju osigurati prijanjanje, migraciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica sličnu izvanstaničnoj matrici kako bi se nakon ugradnje u ljudsko tijelo mogli sigurno uklopiti u okolno tkivo bez neželjene imunološke reakcije. Ovisno o tkivu za koje je nosač potrebno primijeniti, mogu biti kruti izrađeni od keramike i sposobni podnijeti veliko opterećenje ili fleksibilniji izgrađeni od polimera koji mogu podnijeti tlak i protok kapljevine. Nosači moraju biti biokompatibilni i netoksični kako tijekom njihove



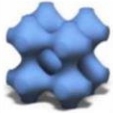

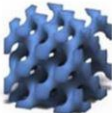
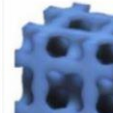

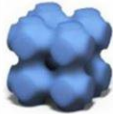
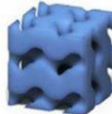


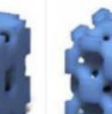
interakcije s okolnim tkivom i razgradnje ne bi uzrokovali nepoželjne posljedice po pacijenta. Biomaterijali od kojih su građeni nosači mogu imati biološke signale kako bi se poboljšalo prianjanje stanica ili njihova morfologija. Nosači također mogu služiti kao prenositelji ili rezervoari egzogenih signala koji simuliraju rast kao faktori rasta koji ubrzavaju regeneraciju [26]. Otpuštanje biomolekula i raspad nosača moraju biti vremenski kompatibilni s nastankom novog tkiva. Na migraciju i organizaciju stanica te transport nutrijenata i otpadnih produkata značajan utjecaj ima arhitektura nosača, a prije svega poroznost koja utječe na rast stanica.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_s}{\rho_b} \quad (1)$$

gdje su  $\rho_s$  i  $\rho_b$  gustoća čvrste tvari i nasipna gustoća materijala. Biomaterijali premalih veličina pora ograničavaju infiltraciju stanica i migraciju do rubova, time ograničavajući izmjenu hranjivih tvari i opskrbu kisikom, što rezultira mogućnošću stvaranja nekrotične regije [27]. Nasuprot tomu, prevelike pore smanjuju mogućnost prianjanja stanica na nosač, a velike nepravilnosti u poroznosti uzrokuju nedosljednosti u raspodijeli stanica. Mehanička svojstva kao žilavost i vlačna čvrstoća bitni su kako bi nosač mogao oponašati željeno tkivo. Stoga je nužno provesti kompresijske i vlačne testove, kako bi se spriječio lom materijala koji nastaje zbog razlike u svojstvima između kostiju i implantata. Deformacija staničnih materijala mjeri se Youngovim modulom elastičnosti ( $E_s$ ) koji je definiran kao:

$$E_s = E_b \left( \frac{\rho_s}{\rho_b} \right) \quad (2)$$

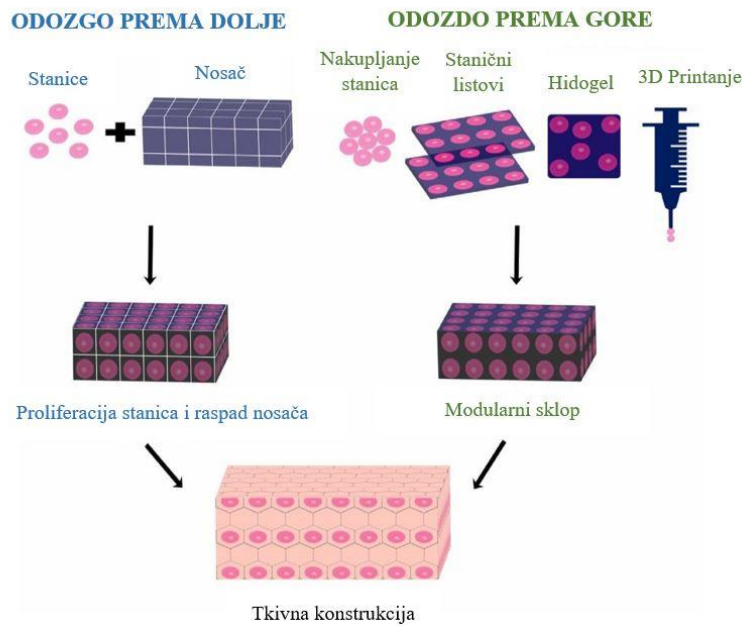
gdje je  $E_b$  Youngov modul nasutog materijala. Iz jednadžbi (1) i (2) vidljivo je da je povećanje poroznosti popraćeno smanjenjem Youngovog modula, što povećava prijenos nutrijenata no smanjuje mehanička svojstva nosača. Nosači s velikom poroznosti mogu imati manju proliferaciju zbog manje gustoće stanica, a oni s manjom poroznosti imaju veću površinu što pogoduje početnom prianjanju stanica. Zbog toga je potrebno optimirati nosač kako bi se dobila željena svojstva te se u tu svrhu mogu dizajnirati jedinične ćelije složene geometrije (slika 3).

Arhitektura pora					
Gustoća	38%	29%	33%	29%	34%
Arhitektura pora					
Gustoća	63%	66%	68%	66%	51%

Slika 3. Primjeri jediničnih ćelija s različitim omjerom gustoća kao potencijalni nosači [14]

U većini *in vitro* istraživanja zaključeno je da je optimalna veličina pora od 100 do 700  $\mu\text{m}$ , no polarizaciji makrofaga koji uzrokuju upalnu reakciju pogoduju pore veličine veće od 80  $\mu\text{m}$ , što dovodi u pitanje prenošenje ovih modela u *in vivo*. Također poželjno je da se nosači mogu sterilizirati zračenjem, toplinom ili kemijskom obradom kako bi se izbjegle infekcije. Sterilizacija utječe na poroznost nosača kao i na nasađene stanice. Proizvodnja nosača mora biti isplativa kako bi se mogli proizvoditi u velikim količinama te kako bi se mogli proizvesti u različitim oblicima i veličinama.

Nosači se uglavnom izgrađuju pomoću dva pristupa, odozgo prema dolje (engl. *top-down*) i odozdo prema gore (engl. *bottom-up*) (slika 4) [28]. U odozgo prema dolje pristupu prvo se izrađuje nosač, nakon čega se dodaju stanice kako bi nosač svojom strukturom i mehaničkim svojstvima mogao oponašati željeno tkivo. U odozdo prema gore metodi je fokus na mikroskopsku arhitekturu nosača kako bi mogao oponašati funkcionalnu jedinicu tkiva.

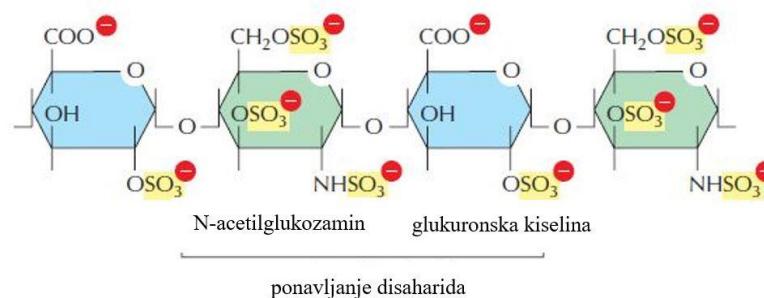


Slika 4. Dva pristupa izgradnji nosača [28]

## 2.4. Izvanstanična matrica

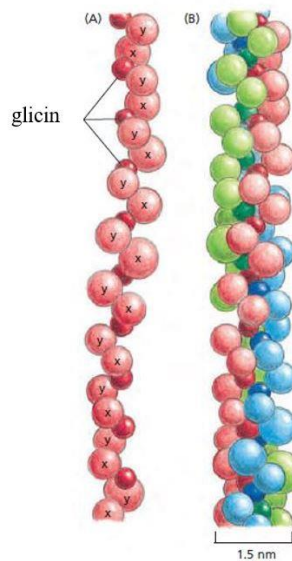
Izvanstanična matrica je trodimenzionalna struktura nalik gelu koju izlučuju stanice u obliku složene mreže proteina i lanaca polisaharida. U trajnom je ili privremenom kontaktu sa stanicama te ima izravan utjecaj na njihov razvoj, proliferaciju i rast te na njihovu funkciju, pomažući u stvaranju i strukturnoj potpori tkiva i organa te održavanju njihove cjelovitosti. Izvanstanična matrica sastoji se od različitih članova skupina glikozaminoglikana (GAG, engl. *glycosaminoglycans*), kolagena i glikoproteina.

Glikozaminoglikani su nerazgranati lanci polisaharida koji se sastoje od ponavljajućih disaharidnih jedinica (slika 5) [29].



Slika 5. Lanac ponavljajućih disaharidnih jedinica GAG-a [29]

Kolagen je osnovna komponenta izvanstanične matrice te je jedan od najčešćih proteina koji se može pronaći kod sisavaca. Sastavljen je od tri spiralne zavojnice koje su najčešće izgrađene od aminokiselina, glicina, prolina i hidroksiprolina. Te aminokiseline zajedno čine jedan  $\alpha$ -lanac (slika 6). Neke vrste kolagena se nakon sekrecije mogu udružiti u fibrile kolagena koji se odupiru vlačnim silama, a zatim u još veće nakupine koje se zovu vlakna kolagena. Kolagen je biokompatibilan i u ljudskom tijelu razgrađuje ga enzim kolagenaza.



Slika 6. Struktura kolagena, (A) jedan  $\alpha$ -lanac u kojem je svaka treća molekula glicina, a najčešće su x prolin i y hidroksiprolin, (B) molekula kolagena izgrađena od tri  $\alpha$ -lanaca koji su svaki prikazani različitom bojom [29]

Elastin je elastični hidrofobni protein koji se sastoji od glicina i prolina. Elastin zajedno s mikrofibrilom gradi vlakna elastina koja daju izvanstaničnoj matrici rastezljivost. On je dominantan protein u arterijama.

Fibronektin je glikoprotein koji posjeduju svi kralježnjaci. On je dimer koji se sastoji od dvije podjedinice spojene na posljednjim ugljikovim atomima s disulfidnim vezama. Fibronektin ima značajnu ulogu u prianjanju stanica na izvanstaničnu matricu, njihovoj proliferaciji, migraciji i diferencijaciji.

Ljudske se izvanstanične matrice svojom strukturom i funkcionalnošću razlikuju od životinjskih, ali se i svako pojedino tkivo razlikuje svojim sastavom izvanstanične matrice u ljudskom organizmu. Pošto se tkiva razlikuju ovisno o svojoj funkciji neka će imati više elastina kao aorte, a druga pak više GAG-a te će se osim razlike u komponentama, ona razlikovati i u

njihovoj organizaciji i podvrsti. Obradom različitih tkiva mogu se dobiti izvanstanične matrice drukčijih svojstava koja kasnije, ovisno o svojim svojstvima, mogu poslužiti kao nosači. Uobičajeno, izvorno tkivo je odvojeno od neželjenoga, decelularizirano, dezinficirano, isušeno (ponekad), i sterilizirano kako bi se dobili izvanstanični matrični nosači [30]. Nosači izrađeni od izvanstanične matrice zbog uklanjanja svih stanica imaju manju mogućnost od izazivanja imunološke reakcije i imaju bolju površinu prijanjanja stanica od sintetičkih biopolimera. Trodimenzionalna arhitektura decelularizirane izvanstanične matrice ostaje očuvana iz početnih organa/tkiva nakon decelularizacije, što pruža biomimetičkim nosačima stabilnu fizičku strukturu i signale za naknadne stanica-stanica i stanica-izvanstanična matrica interakcije [31]. Zbog ovih svojstva, ona se koristi u kliničkim testiranjima lijekova te su neke njene primjene u inženjerstvu tkiva kao nosači za kožu, pluća, živce i bubrege.

## 2.5. Decelularizacija

Decelularizacija je proces uklanjanja alogenskih ili ksenogenskih staničnih antigena iz tkiva koji bi pokrenuli imunološku reakciju, istovremeno ostavljajući netaknutu izvanstaničnu matricu [32]. Kako bi se umanjila imunološka reakcija potrebno je decelularizacijom ukloniti stanice i DNK, dok mehanička svojstva moraju biti očuvana. Djelotvornost uklanjanja ovih komponenata se procjenjuje na temelju analize izvanstanične matrice koja mora sadržavati [33]:

- (1) Manje od 50 ng dvolančanog DNK (dsDNA) po mg suhe izvanstanične matrice.
- (2) Manje od 200 bp duljine fragmenata DNK.
- (3) Stanične jezgre ne smiju biti vidljive bojanjem s 4', 6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI).

Nekoliko parametara utječe na kvalitetu procesa decelularizacije tkiva, poput gustoće stanica, debljine matrice i morfologije tkiva [34]. Karakteristike tkiva značajno se razlikuju zbog čega ne postoji jedna univerzalna metoda decelularizacije. Do sada je razvijen i korišten veliki broj tehnika decelularizacije koje uključuju fizičke/mehaničke, kemijske, enzimatske/biološke tehnike ili njihove kombinacije. Svaka od ovih metoda decelularizacije može u većoj ili manjoj mjeri narušiti strukturu izvanstanične matrice.

Fizičke/mehaničke metode uklanjaju neželjeno tkivo i stanice promjenom određene fizičke karakteristike te uzrokuju poremećaj plazme stanične membrane. Ove metode koriste se kako bi se izbjegle kemikalije, koje mogu djelovati toksično, i kako bi se sačuvali proteini izvanstanične matrice. Kako bi ove metode bile djelotvorne, najčešće se moraju kombinirati s upotrebom kemikalija. Zemmy i suradnici [35] su proveli decelularizacije fibroblasta kože

upotrebom visokog hidrostatskog tlaka od 250 MPa. Ova je metoda uklanja DNK bolja od upotrebe detergenata te ujedno sterilizira uzorke jer uslijed visokog tlaka uništava membrane bakterija i virusa. Međutim, može oštetiti vlakna elastina i kolagena, a time i strukturu izvanstanične matrice ako je tlak previsok. Ne može se koristiti za tkiva s gustom izvanstaničnom matricom jer uzrokuje lomljenje staničnog materijala. Da Palma i suradnici [36] proveli su decelularizaciju zamrzavanjem dušikom pri -80 °C te odmrzavanjem pri 37 °C u vodenoj kupelji. Proveli su četiri ciklusa u kombinaciji sa SDS-om kako bi se uklonile stanične krhotine. Ovom metodom stanice se uklanjaju iz izvanstanične matrice nastankom kristala leda unutar stanica. Struktura, funkcija i komponente izvanstanične matrice ostaju sačuvane ovom metodom. Velike brzine promjene između temperatura hlađenja i odmrzavanja kao i ispiranje s detergentom mogu oštetiti izvanstaničnu matricu i smanjiti njezinu vlačnu čvrstoću. De Wit i suradnici [37] su proveli decelularizaciju svinjskih dušnika upotrebom superkritičnog fluida, ugljikova dioksida pri temperaturi od 37 °C, tlaku od 250 bara tijekom 12 sati. Ova metoda je brza, jeftina i jednostavna, a ugljikov dioksid je inertan i minimalno oštećuje izvanstaničnu matricu.

Kemijske metode uklanjaju stanice iz tkiva pomoću blagih detergenata, otapala za ekstrakciju i drugih kemikalija. Cilj kemijske decelularizacije je odabrati najblažu tvar koja će očuvati strukturu izvanstanične matrice. Bez obzira koja se tvar koristi, nakon ove metode izvanstanična matrica se mora isprati kako bi se uklonile zaostale kemikalije. Yamanaka i suradnici [38] su decelularizirali arterije laboratorijskih štakora uz pomoć 0,1 % peroctene kiseline i koktela 0,1 % i 0,3 % peroctene kiseline i dezoksiribonukleaze I. Peroctena kiselina ima snažno dezinfekcijsko djelovanje te je uklonila stanice, no na implantatima su se pojavile rupture i rascjepi. Hassanpour i suradnici [39] su uz pomoć 1 % ionskog detergenta natrijeva lauret-sulfata decelularizirali ljudske jajnike tijekom 48 sati. Izvanstanična matrica zadržala je svoju strukturu, te su njezine komponente poput laminina, kolagena IV i fibronektina ostale sačuvane. Zbog njihove polarnosti ionski detergentsi se teško uklanjaju iz izvanstanične matrice. Willemse i suradnici [40] su koristili neionski detergent triton X-100 za decelularizaciju ljudske jetre pri tlaku jetrene arterije od 120 mm Hg. Sve stanice i stanične krhotine su uklonjene, a struktura i mehanička svojstva izvanstanične matrice ostala su očuvana. Decelularizacijom se nisu uspjele ukloniti kapljice masti. Duarte i suradnici [41] su decelularizirali svinjsku trabekularnu kost pomoću 1 % tri-n-butil fosfata (TnBP, engl. *tri-n-butyl phosphate*), superkritičnog ugljikova dioksida i kombinacijom ovih dviju metoda. TnBP nije uspio ukloniti

u potpunosti stanice, no poboljšao je mehanička svojstva izvanstanične matrice. Pretpostavlja se da je došlo do umrežavanja vlakna kolagena.

Biološke metode koje mogu biti enzimatske (proteaze, esteraze, nukleaze) ili neenzimatske (kelati i toksini). Dezoksiribonukleaze su nukleaze koje imaju sposobnost hidrolize DNK, kombiniraju se s detergentima ili ostalim kemijskim tvarima kako bi se poboljšalo uklanjanje DNK, preostalih staničnih krhotina i ostataka kemikalija. Vrijeme korištenja dezoksiribonukleaze mora biti optimirano kako ne bi došlo do uništavanja komponenata izvanstanične matrice kao što su GAG, kolagen IV i laminin. Također, tkivo se mora dobro isprati nakon tretmana jer ovi enzimi mogu uzrokovati imunološku reakciju nakon implantacije. Tripsin je proteaza koja selektivno odvaja proteine pričvršćene na stanicama tako što napada peptidne veze na karbonilnim skupinama arginina i lizina što uzrokuje odvajanje stanica od tkiva. Pretpostavlja se da prevelika količina ili predugo izlaganje tripsinom mogu umanjiti mehanička svojstva izvanstanične matrice. Tripsin se često koristi s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) što je vidljivo u istraživanju Kamalvanda i suradnika koji [42] su za decelularizaciju kože ribe amura prvo koristili zamrzavanje pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 30 min i odmrzavanje na sobnoj temperaturi. Zatim su komade kože ispirali otopinom tritona X-100 ili tripsin-EDTA nakon čega je slijedila liofilizacija. EDTA veže divalentne katione na mjestu prijanjanja stanica na izvanstaničnoj matrici, a koristi se jer ima sposobnost deaktiviranja enzima proteaza koje svojim djelovanjem mogu oštetiti izvanstaničnu matricu.

Decelularizacija ultrazvukom je fizička/mehanička metoda koja ultrazvučnim valovima uklanja stanice upotrebom sonde ili u kupelji. Što je frekvencija ultrazvučnih valova niža to je veći utjecaj valova na stanice [43]. Forouzes i suradnici [44] decelularizirali su koljena i kukove ovaca u 7 grupa. Prva grupa decelularizirala se 55 h s PBS-om, druga i treća s 0,1 % i 1 % SDS-a tijekom 5 h, četvrta i peta s 0,1 % i 1 % SDS-a u ultrazvučnu kupelji koja ima snagu 170 W i frekvenciju 42 kHz tijekom 5 h, šesta s 0,1 % SDS-a upotrebom sonde snage 80 W i frekvencije 12 kHz tijekom 1 h i sedma s 0,1 % SDS-a upotrebom sonde snage 80 W i frekvencije 24 kHz tijekom 2 h. Decelularizacija se poboljšala upotrebom ultrazvučne kupelji i sonde, s time da su bolji rezultati dobiveni s ultrazvučnom kupelji, kolagen i GAG ostali su više očuvani. Također, bolji rezultati dobiveni su pri nižim frekvencijama rada sonde (12 kHz u odnosu na 24 kHz) čime je potvrđena činjenica da niže frekvencije ultrazvuka prodiru dublje u tkivo.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Natrijev lauret-sulfat ( $M = 288,38$  g/ mol, Biosynth, Slovačka) (engl. *sodium lauryl ether sulphate*, SLES) je anionski surfaktant. To je natrijeva sol koja se dobiva etoksilacijom natrijeva lauril-sulfata (engl. *sodium lauryl sulphate*, SLS) [45]. SLES je jedan od komercijalno najčešće korištenih ionskih surfaktanata jer se njegova svojstva mogu poboljšati dodatkom polimera i aditiva. U kozmetičkoj industriji koristi se jer ne iritira značajno kožu te je njegova proizvodnja jeftina.
- Destilirana voda
- Etanol
- Fiziološka otopina fosfatnog pufera (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*)

#### 3.1.2. Mehanički instrumenti

- Tehnička vaga (PB602-S, Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka
- Magnetska miješalica C-MAG HS 7 digital, IKA, Staufen, Njemačka

### 3.2. Decelularizacija

Prije decelularizacije svinjska jetra nasjeckana je na komade debljine 1 mm te je ispirana fiziološkom otopinom kako bi se uklonila krv. Uzorci su podijeljeni u pet grupa koje su obrađivani različitim postupcima. Prva i druga grupa uzoraka stavljeni su u 1 %-tnu otopinu i 0,5 %-tnu otopinu SLES-a (oznake SLES 1 i SLES 0.5). Treća, četvrta i peta grupa uzoraka stavljene su u 0,5 %-tnu otopinu SLES-a i prenesene u ultrazvučnu kupelj SONOREX DIGITAL. Uzorci su obrađivani u kupelji snage 120 W pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  tijekom 1 sata (SLES 0.5 1), 2 sata (SLES 0.5 2), 4 sata (SLES 0.5 4) i 8 sati (SLES 0.5 8). Nakon ultrazvučne obrade uzorci su stavljeni u 1,6 L 0,5 %-tne otopine SLES-a. Svi uzorci su miješani 30 minuta pomoću magnetske miješalice pri 200 o/min. Izmjena medija ponavljana je toliko dugo dok komadi jetre nisu postali bijeli. Kako bi se uklonio detergent uzorci su ispirani destiliranom vodom tijekom 16 sati. Zatim se uzorci ispiru s 96 %-tnim



etanolom 30 minuta kako bi se uklonile sve organske tvari te se ponovno ispiru u destiliranoj vodi 16 sati. Nakon toga, jetra se ispiru otopinom PBS-a tijekom 8 sati. Uzorci se zamrzavaju za daljnju analizu.

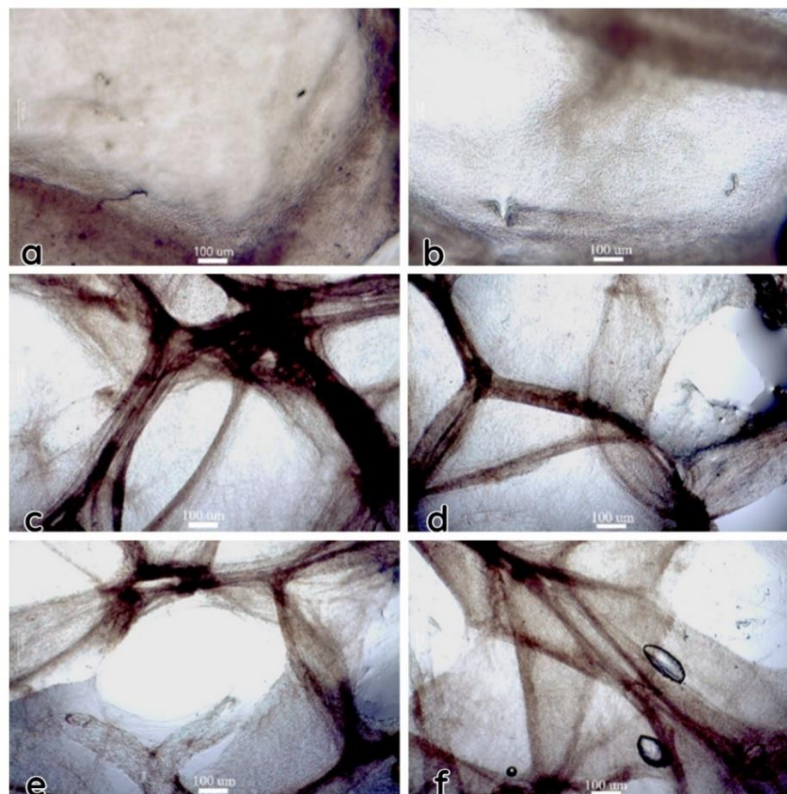
### **3.3. Metode karakterizacija**

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, bilo ju je potrebno prethodno izolirati. Izolacija je provedena pomoću pribora Monarch Genomic DNA Purification Kit (BioLabs, Engleska) prema uputama proizvođača. Kako bi se kvantificirao kolagen, korišten je pribor Total Collagen Assay Kit (Abcam, UK) te je postupak proveden prema uputama proizvođača. Za kvantifikaciju glikozaminoglikana korišten je pribor Total Glycosaminoglycans Assay Kit (Abcam, UK) te je kvantifikacija slijedila upute proizvođača.

Struktura uzoraka karakterizirana je svjetlosnim mikroskopom BA 200 Motic, Kina, te stereomikroskopom SZX 16 Olympus, Japan.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

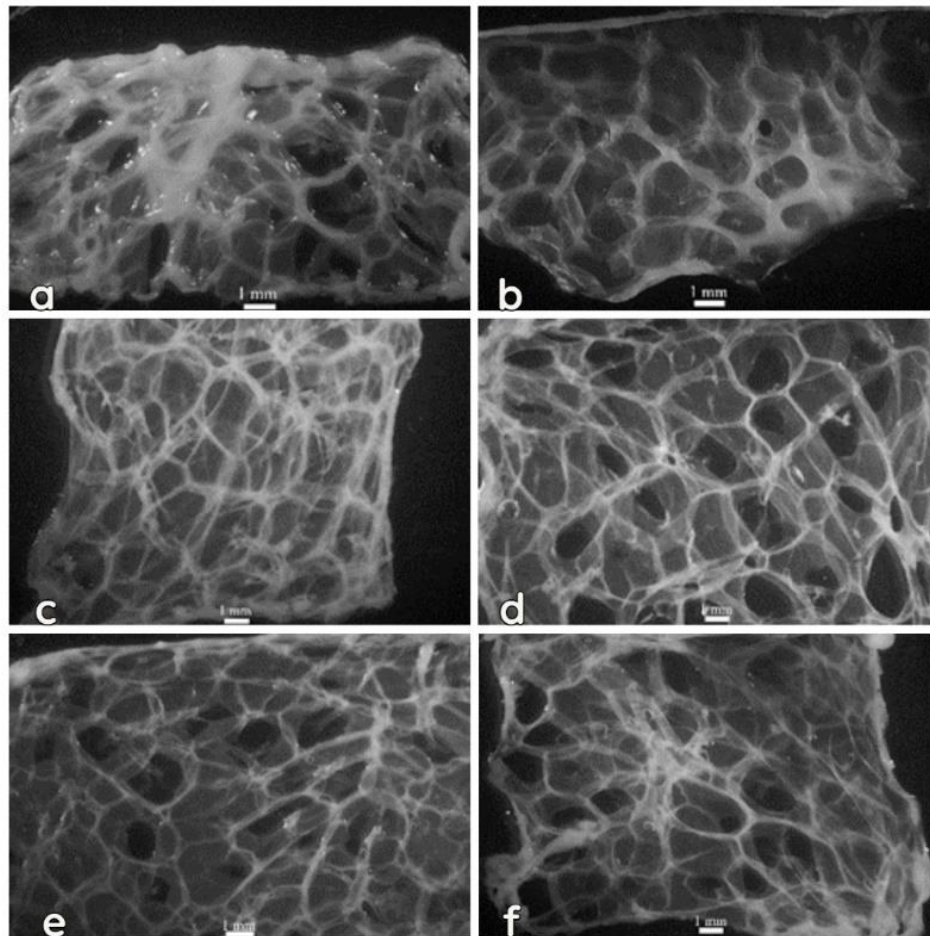
Svrha rada je pripremiti biomaterijal koji će nakon različitih uvjeta decelularizacije svinjske jetre pokazati najbolja svojstva. Primijenjene su dvije metode decelularizacije: kemijska uz upotrebu dvije koncentracije detergenta SLES-a (0,5 i 1 %) i kombinacija kemijske metode s fizičkom metodom koja uključuje primjenu ultrazvuka frekvencije 35 kHz. Analiza mikrografija uzoraka SLES 0.5 2 (slika 7d), SLES 0.5 4 (slika 7e) i SLES 0.5 8 (slika 7f) pokazala je mjestimično oštećenje i gubitak tkiva. Na uzorcima SLES 1 (slika 7a), SLES 0.5 (slika 7b) i SLES 0.5 1 (slika 7c) nisu vidljiva oštećenja. Svi uzorci su smeđe boje, a u strukturi tkiva uzorka SLES 0.5 8 (slika 7f) vidljivi su mjehurići vode što može biti posljedica dugog izlaganja ultrazvuku.



Slika 7. Mikrografije strukture tkiva dobivene svjetlosnim mikroskopom za različite uvjete decelularizacije: (a) SLES 1, (b) SLES 0.5, (c) SLES 0.5 1, (d) SLES 0.5 2, (e) SLES 0.5 4 i (f) SLES 0.5 8

Ionski detergents, poput SLES-a, uklanjaju stanice tako što narušavaju protein-protein interakcije i otapaju stanične membrane [46]. Iako se SLES smatra blagim detergentom, on

narušava strukturu kolagena, a samim time sastav, strukturu i funkcionalnost izvanstanične matrice.



Slika 8. Mikrografije strukture tkiva dobivene stereomikroskopom za različite uvjete decelularizacije: (a) SLES 1, (b) SLES 0.5, (c) SLES 0.5 1, (d) SLES 0.5 2, (e) SLES 0.5 4 i (f) SLES 0.5 8

Na slici 8 prikazane su mikrografije strukture tkiva za različite uvjete decelularizacije, dobivene stereomikroskopom. Vidljivo je da decelularizacija sa SLES 0.5 (slika 8b) nije značajno oštetila strukturu izvanstanične matrice. Međutim, povećanjem koncentracije SLES-a došlo je do slabljenja strukture izvanstanične matrice što je uzrokovala pucanje tkiva (slika 8a). Ultrazvučna kupelj koristila se kako bi se poboljšalo prodiranje i kako bi se smanjila količina upotrijebljenog SLES-a zbog toksičnog djelovanja njegovih ostataka nakon ispiranja. Učinak ultrazvuka u decelularizaciji prvenstveno ovisi o fenomenu kavitacije, u kojem se stvaraju mjehurići koji fizički odvajaju molekule [47]. Kavitacija uzrokuje fizičke i kemijske efekte. Kemijski efekt uključuje pirolizu vode i molekula surfaktanata čime nastaju slobodni

radikali koji svojim djelovanjem dodatno oštećuju stanice. U fizičkom efektu, urušeni kavitacijski mjehurići uzrokuju intenzivne šok valove koji se prenose u okolnom tekućem mediju i uzrokuju smično naprezanje na površini membrane tkiva [48]. Promotri li se uzorci obrađeni ultrazvukom, vidljivo je da je tkivo SLES 0.5 1 (slika 8c) zadržalo svoju strukturu, dok je dulja decelularizacija u ultrazvučnoj kupelji oštetila strukturu izvanstanične matrice (slike 8d, 8e i 8f). Manja oštećenja koja su vidljiva u strukturama tkiva SLES 0.5 i SLES 0.5 1 mogla su nastati zbog velike brzine miješanja na magnetskoj miješalici tijekom decelularizacije. Svi uzorci su tanki i kroz njih je vidljiva podloga, te su krvne žile ostale mjestimično očuvane.

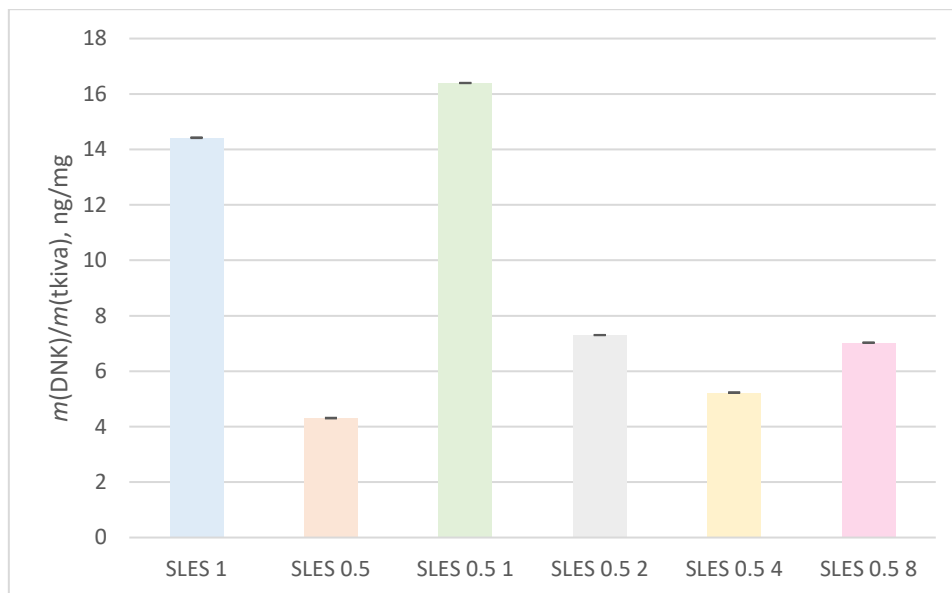
Vrijednosti masenog udjela i standardnih devijacija DNK, kolagena i GAG-a nakon decelularizacije uzoraka prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Sastav decelularizirane izvanstanične matrice uzoraka (udjeli i standardne devijacije)

IME UZORKA	DNK	KOLAGEN	GAG
	$m(\text{DNK})/m(\text{tkiva}),$ ng/mg	$m(\text{kolagen})/m(\text{tkiva}),$ μg/mg	$m(\text{GAG})/m(\text{tkiva}),$ μg/mg
SLES 1	$14,423 \pm 0,013$	$6,065 \pm 0,012$	0
SLES 0.5	$4,309 \pm 0,012$	$1,073 \pm 0,284$	0
SLES 0.5 1	$16,397 \pm 0,007$	$2,658 \pm 0,280$	0
SLES 0.5 2	$7,304 \pm 0,005$	$0 \pm 0$	0
SLES 0.5 4	$5,229 \pm 0,005$	$0 \pm 0$	0
SLES 0.5 8	$7,029 \pm 0,005$	$4,932 \pm 0,258$	0

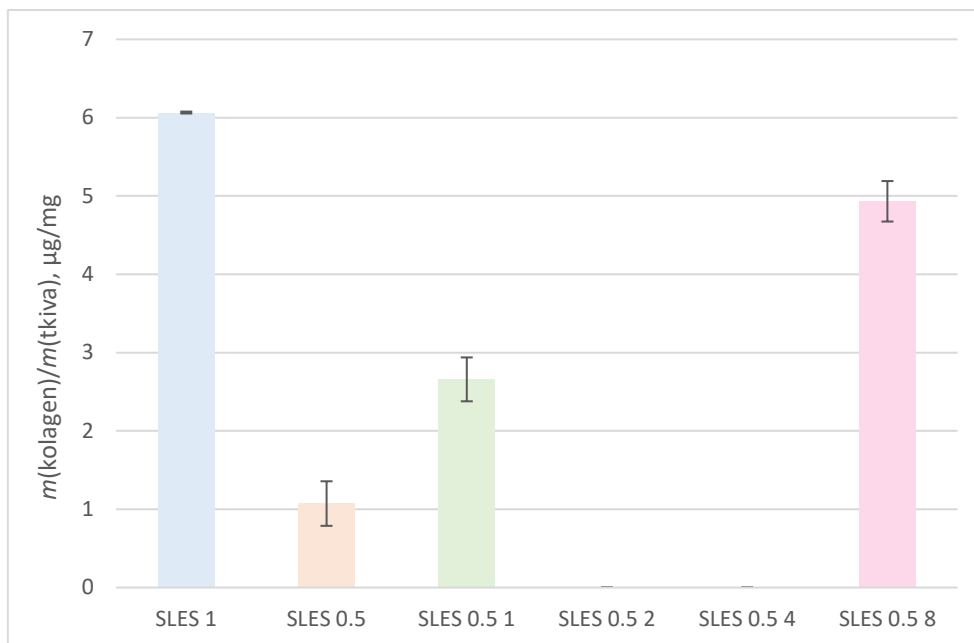
Decelularizacija tkiva sa SLES 0.5 pokazala se najdjelotvornijom po pitanju uklanjanja DNK (masa DNK iznosi  $4,309 \pm 0,012$  ng/mg suhog tkiva). U uzorcima SLES 0.5 1 i SLES 1 zaostalo je najviše DNK materijala ( $16,397 \pm 0,007$  i  $14,423 \pm 0,013$  ng/mg suhog tkiva). Ostali uzorci imaju bliske vrijednosti DNK (slika 9). Jedan od često spominjanih kriterija ocjene uspješnosti decelularizacije je količina DNK po mg suhe izvanstanične matrice. Smatra se da količina DNK mora biti manja od 50 ng kako bi se spriječila imunološka reakcija [33]. Međutim, Padma i suradnici [49] dokazali su da je moguće uspješno transplantirati tkivo s više od 50 ng DNK po mg suhe izvanstanične matrice, što omogućuje manju uporabu kemikalija i posljedično veće očuvanje strukture i funkcionalnosti izvanstanične matrice. Rezultati karakterizacije svih uzoraka pokazali su znatno manju količinu DNK od one spomenute u kriteriju. Iako bi veće koncentracije detergenta trebale ukloniti više DNK, pokazalo se da je kod

uzorka SLES 1 uklonjeno manje DNK nego kod uzorka SLES 0.5. Ovo odstupanje moguće je objasniti većim brojem izmjene medija koje su bile potrebne prilikom obrade sa SLES 0.5 kako bi tkivo postalo bijelo. Iz priloženih podataka također je vidljivo da je produljeno vrijeme ultrazvučne obrade smanjilo količinu DNK jer je ono omogućilo dublje prodiranje detergenta.



Slika 9. Grafički prikaz dobivenih vrijednosti DNK i standardne devijacije za svih šest uvjeta decelularizacije

Kolagen je glavni strukturni element izvanstanične matrice koji osigurava vlačnu čvrstoću, regulira prianjanje stanica, podržava kemotaksiju i migraciju stanica, usmjerava razvoj tkiva, a njegov gubitak može oslabiti angiogenezu [50]. Kod uzorka SLES 1 ostalo je očuvano najviše kolagena u izvanstaničnoj matrici,  $6,065 \pm 0,012 \mu\text{g}/\text{mg}$  suhog tkiva. Značajna količina kolagena ostala je sačuvana i kod uzorka SLES 0.5a 8,  $4,932 \pm 0,258 \mu\text{g}/\text{mg}$ . U uzorcima SLES 0.5 2 i SLES 0.5 4 količina kolagena se smanjila ispod granice detekcije što se može objasniti duljim ultrazvučnom obradom ovih uzoraka ili većim brojem izmjena medija. Iz dobivenih podataka vidljivo je da SLES 1 imala blaže djelovanje na strukturu tkiva jer je ostala veća količina DNK i kolagena, nego prilikom upotrebe manje koncentracije SLES-a. Nadalje, iako je očekivano da će daljnja obrada ultrazvukom (SLES 0.5 8) rezultirati smanjenjem količine kolagena ispod razine detekcije i slijediti prethodni trend, u izvanstaničnoj matrici ostala je očuvana značajna količina kolagena. Moguće je da je dulja ultrazvučna obrada smanjila količinu enzima proteaze koji može narušiti strukturu vlakna kolagena ili su prilikom decelularizacije uklonjeni ostali stanični proteini, poput GAG-a, zbog čega je povećan udio kolagena kao postotni iznos po masi suhe tvari [48].



Slika 10. Grafički prikaz dobivenih vrijednosti kolagena i standardne devijacije za svih šest uvjeta decelularizacije

GAG omogućava izvanstaničnoj matrici da podnese velike tlačne sile, te utječe na prianjanje stanica i njihovu migraciju i proliferaciju [29]. Uklanjanje GAG-a prati smanjenje faktora rasta, ometajući naknadnu migraciju i diferencijaciju stanica [51]. Međutim, uklanjanje GAG-a može povećati poroznost decelulariziranog tkiva i potaknuti migraciju stanica u nosač. Svi uvjeti decelularizacije uzrokovali su potpuni nestanak ili smanjenje koncentracije GAG-a ispod granice detekcije. Moguće je da je tijekom decelularizacije SLES poremetio proteinske veze GAG-a, te da je zbog njegove velike topljivosti u vodenoj otopini detergenta došlo do njegovog značajnog uklanjanja [48].

Gubitak kolagena i GAG-a mijenja strukturu i uzrokuje slabljene mehaničkih svojstva izvanstanične matrice [41]. Oštećenja tkiva vidljiva na slikama 7 i 8 mogla su nastati tijekom decelularizacije kao posljedica gubitka ove dvije komponente.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu korišteno je šest različitih uvjeta decelularizacije kako bi se usporedila struktura izvanstanične matrice i kako bi se odabrala ona najefikasnija.

Najučinkovitijom se pokazala decelularizacija uzoraka s 0,5 %-tnom otopinom SLES-a kod koje je postignut najmanji udio DNK, a struktura izvanstanične matrice je ostala očuvana.

Upotreba ultrazvučne kupelji tijekom jednog sata pokazala je očuvanje strukture izvanstanične matrice decelulariziranog uzorka uz očuvanje kolagena, ali i DNK. Duljim izlaganjem materijala ultrazvuku nastala su vidljiva oštećenja strukture izvanstanične matrice.

Kako bi se potvrdila uspješnost decelularizacije s 0,5 %-tnom otopinom SLES-a, kao i djelovanjem ultrazvuka u trajanju od 1 h potrebna su daljnja istraživanja po pitanju mehaničkih i strukturnih svojstava izvanstanične matrice. Također, potrebno je ispitati brzinu njezinog raspadanja te mogućnost prijanjanja stanica, kao i toksičnost zaostalih molekula SLES-a na stanice te općenito biokompatibilnost dobivenog biomaterijala.

## 6. LITERATURA

- [1] Eivazzadeh-Keihan, R., Bahojb Norouzi, E., Khanmohammadi Chenab, K., Jafari, A., Radinekiyan, F., Hashemi, S., Ahmadpour, F., Behboudi, A., Mosafer, J., Mokhtarzadeh A., Maleki, A., Hamblin, M., Metal-based nanoparticles for bone tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regener. Med.*, **14** (2020) 1687-1714.
- [2] Chandra, A., Soker, S., Atala, A., Tissue engineering: Current status and future perspectives, u: Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P., Atala, A., *Principles of Tissue Engineering*, vol. 5, Cambridge, Academic Press, 2020., str. 1-35.
- [3] Aune, D., Sun, X., Nie, J., Huang, W., Liao, B., Wang, Y., Self-reported chronic kidney disease and the risk of all-cause and cause-specific mortality: outcome-wide association study of 54 causes of death in the National Health Interview Survey, *BMC Nephrol.* **23** (2022) 1-8.
- [4] Caddeo, S., Boffito, M., Sartori, S., Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **5** (2017) 1-22.
- [5] Kuo, C.K., Tuan, R.S., Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **22** (2003) 52-56.
- [6] Hudecki, A., Kiryczyński, G., Łos, M.J., Biomaterials, definition, overview, u: Łos, M. J., Hudecki, A., Wiecheć, E., *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, Cambridge, Academic Press, 2019., str. 85-98.
- [7] Lee, K., Eisig, S., Perrino, M., Foreign Body Giant Cell Reaction to a Proplast/Teflon Interpositional Implant: A Case Report and Literature Review, *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **76** (2018) 1719-1724.
- [8] Shanmugam, K., Sahadevan, R., *Bioceramics-An introductory overview*, *Fundamental Biomaterials: Ceramics*, Sawston, Woodhead Publishing, 2018., str.1-46.
- [9] Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., Jayasekhar Babu, P., Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications, *Smart Mater Struct.*, **1** (2023) 1-16.
- [10] Chen, J., Tan, L., Yu, X., Etim, I.P., Ibrahim, M., Yang, K., Mechanical properties of magnesium alloys for medical application: A review, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **87** (2018) 68-79.



- [11] Arjunan, A., Baroutaji, A., Praveen, A.S., Robinson, J., Wang, C., Classification of Biomaterial Functionality, u: Olabi, A.G., Encyclopedia of Smart Materials, Amsterdam, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2021, str. 86-102.
- [12] Punj, S., Singh, J., Singh, K., Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future perspectives, *Ceram. Int.*, **47** (2021) 28059-28074.
- [13] Wang, Z., Han, L., Sun, T., Wang, W., Li, X., Wu, B., Construction of tissue-engineered bone with differentiated osteoblasts from adipose-derived stem cell and coral scaffolds at an ectopic site, *Br J Oral Maxillofac Surg*, **59** (2021) 46-51.
- [14] Lutzweiler, G., Halili, A., Vrana, N., The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation, *Pharmaceutics*, **12** (2020) 1-29.
- [15] Willerth, S., Synthetic biomaterials for engineering neural tissue from stem cells, u: Willerth, S., Engineering Neural Tissue from Stem Cells, Cambridge, Academic Press, 2017., str. 127-158.
- [16] Hoffman, A., Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64** (2012) 18-23.
- [17] Manoukian, O.S., Sardashti, N., Stedman, T., Gailiunas, K., Ojha, A., Penalosa, A., Mancuso, C., Mancuso, C., Kumbar, S.G., Biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine, u: Narayan, R., Encyclopedia of Biomedical Engineering, Amsterdam, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2019., str. 462-482.
- [18] Murugesh Babu, K., Silk from silkworms and spiders as high-performance fibers, u: Bhat, G., Structure and Properties of High-Performance Fibers, Sawston, Woodhead Publishing, 2017., str. 327-366.
- [19] Troy, E., Tilbury, M.A., Power, A.M., Wall, J.G., Nature-based biomaterials and their application in biomedicine, *Polymers (Basel)*, **13** (2021) 1-37.
- [20] Dastagir, K., Dastagir, N., Limbourg, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P.M., In vitro construction of artificial blood vessels using spider silk as a supporting matrix, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **101** (2020) 1-9.
- [21] Wan, M., Qin, W., Lei, C., Biomaterials from the sea: Future building blocks for biomedical applications, *Bioact. Mater.*, **6** (2021) 4255-4285.
- [22] Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., Guerrero, A., Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **139** (2019) 262-269.

- [23] Carvalho, D., Gelinsky, M., Williams, D.S., Mearns-Spragg, A., Reis, Rui, L., Silva, T.H., Marine collagen-chitosan-fucoidan/chondroitin sulfate cryo-biomaterials loaded with primary human cells envisaging cartilage tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, **241** (2023) 1-18.
- [24] Guo, Z., Poot, A.A., Grijpma, D.W., Advanced polymer-based composites and structures for biomedical applications, *Eur. Polym. J.*, **149** (2021) 1-13.
- [25] Arruda, A., Shimojo, M., Rodrigues, I.C.P., Perez, A. G. M., Souto, E.M.B., Gabriel, L.P., Webster, T., Scaffolds for Tissue Engineering: A State-of-the-Art Review Concerning Types, Properties, Materials, Processing, and Characterization, u: Bingyun Li, B., Moriarty, T. F., Thomas Webster, T., Xing, M., *Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering*, Cham, Springer Cham, 2020., str. 647-676.
- [26] Chan, B., Leong, K., Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations, *Eur. Spine J.*, **17** (2008) 467–479.
- [27] Ullah, S., Chen, X., Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering, *Appl. Mater. Today.*, **20** (2020) 1-22.
- [28] Indurkar, A., Pandit, A., Jain, R., Dandekar, P., Plant-based biomaterials in tissue engineering, *Bioprinting*, **21** (2021) 1-12.
- [29] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, vol. 6, Garland Science, New York, str.1035-1090.
- [30] Xing, Q., Qian, Z., Jia, W., Ghosh, A., Tahtinen, M., Zhao, F., *Natural Extracellular Matrix for Cellular and Tissue Biomanufacturing*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **3** (2017) 1462-1476.
- [31] Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., Liu, C., Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering, *Bioact. Mater.*, **10** (2022) 15-31.
- [32] Srokowski, E., Woodhouse, K., Decellularized scaffolds, u: Ducheyne, P., *Comprehensive Biomaterials II*, Amsterdam, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2017., str. 452-470.
- [33] Gilpin, A., Yang, Y., Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications, *BioMed Res. Int.*, **1** (2017) 1-13.
- [34] Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A.M., Majidi Zolbin, M., Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine:

- Evaluation, Modification, and Application Methods, *Front. bioeng. Biotechnol*, **10** (2022) 1-21.
- [35] Zemmyo, D., Yamamoto, M., Miyata, S., Fundamental Study of Decellularization Method Using Cyclic Application of High Hydrostatic Pressure, *Micromachines*, **11** (2020) 1-14.
- [36] da Palma R, Nonaka P, Campillo, N., Uriarte, J.J., Urbano, J.J., Navajas, D., Farré, R., Oliveira L.V.F, Behavior of vascular resistance undergoing various pressure insufflation and perfusion on decellularized lungs, *J. Biomech.*, **7** (2016) 1230-1232.
- [37] de Wit, R.J.J., van Dis, D.J., Bertrand, M.E., Tiemessen, D., Siddiqi, S., Oosterwijk, E., Verhagen, A.F.T.M, Scaffold-based tissue engineering: Supercritical carbon dioxide as an alternative method for decellularization and sterilization of dense materials, *Acta Biomater.*, **155** (2023) 323-332.
- [38] Yamanaka, H., Morimoto, N., Yamaoka, T., Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid, *J. Artif. Organs*, **23** (2020) 156-162.
- [39] Hassanpour, A., Talaei-Khozani, T., Kargar-Abarghouei, E., Razban, V., Vojdani, Z., Decellularized human ovarian scaffold based on a sodium lauryl ester sulfate (SLES)-treated protocol, as a natural three-dimensional scaffold for construction of bioengineered ovaries, *Stem Cell Res. Ther.*, **9** (2018) 1-13.
- [40] Willemse, J., Verstegen, M.M.A., Vermeulen, A., Schurink, I. J., Roest, H. P., van der Laan, L.J.W., de Jonge J, Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure controlled perfusion, *Mater. Sci. Eng. C*, **108** (2020) 1-12.
- [41] Duarte, M., Ribeiro, N., Silva, I.V., Dias, J.R., Alves, N.M., Oliveira A., Fast decellularization process using supercritical carbon dioxide for trabecular bone, *J. Supercrit. Fluids*, **172** (2021) 1-13.
- [42] Kamalvand, M., Biazar, E., Daliri-Joupari, M., Montazer, F., Rezaei-Tavirani, M., Heidari-Keshel S, Design of a decellularized fish skin as a biological scaffold for skin tissue regeneration, *Tissue Cell*, **71** (2021) 1-7.
- [43] Rabbani, M., Zakian, N., Alimoradi, N., Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues, *J. Medical Signals Sens.*, **11** (2021) 1-11.
- [44] Forouzesh, F., Rabbani, M., Bonakdar, S., A comparison between ultrasonic bath and direct sonicator on osteochondral tissue decellularization, *J. Medical Signals Sens.*, **9** (2019) 227-233.

- [45] Barra Caracciolo, A., Cardoni, M., Pescatore, T., Patrolecco, L., Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling, *Environ. Pollut.* (Oxford, U. K.), **226** (2017) 94-103.
- [46] Moffat, D., Ye, K., Jin, S., Decellularization for the retention of tissue niches, *J. Tissue Eng.*, **13** (2022) 1-29.
- [47] Lin, C.H., Hsia, K., Su, C.K., Chen, C.C., Yeh, C.C., Ma, H., Lu, J.H., Sonication-assisted method for decellularization of human umbilical artery for small-caliber vascular tissue engineering, *Polymers (Basel)*, **13** (2021) 1-21.
- [48] Yusof, F., Sha'ban M., Azhim, A., Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: Potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications, *Int. J. Nanomed.*, **14** (2019) 5491-5502.
- [49] Padma, A.M., Alsheikh, A.B., Song, M.J., Akouri, R., Akyürek, L.M., Oltean, M., Brännström, M., Hellström, M., Immune response after allogeneic transplantation of decellularized uterine scaffolds in the rat, *Biomed. Mater.*, **16** (2021) 1-11.
- [50] Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., The extracellular matrix at a glance, *J. Cell Sci.*, **123** (2010) 4195-4200.
- [51] Kasravi, M., Ahmadi, A., Babajani, A., Mazloomnejad, R., Hatamnejad, M.R., Shariatzadeh, S., Bahrami, S., Niknejad, H., Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine, *Biomater. Res.*, **27** (2023) 1-25.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### Simboli

$E_b$	Youngov modul razasutog materijala
$E_s$	Youngov modul staničnog materijala
$\varepsilon$	poroznost
$\rho_b$	nasipna gustoća materijala
$\rho_s$	gustoća čvrste tvari

### Kratice

EDTA	etilendiamin tetra-octena kiselina, engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GAG	glikozaminoglikani, engl. <i>glycosaminoglycans</i>
PBS	fiziološka otopina fosfatnog pufera, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCL	poli( $\varepsilon$ -kapolakton), engl. <i>poly <math>\varepsilon</math>-caprolactone</i>
PEG	polietilen glikol, engl. <i>polyethylene glycol</i>
PGA	poliglikolna kiselina, engl. <i>polyglycolic acid</i>
PLA	polilaktatna kiselina, engl. <i>polylactic acid</i>
PLGA	poli(laktično-glikolna) kiselina, engl. <i>poly lactic-co-glycolic acid</i>
PMMA	polimetil metahidrat, engl. <i>polymethyl methacrylate</i>
PTFE	poltetrafluoroetilen, engl. <i>polytetrafluoroethylene</i>
SLES	natrijev lauret-sulfat, engl. <i>sodium lauryl ether sulphate</i>
SLS	natrijev lauril-sulfat, engl. <i>sodium lauryl sulphate</i>
TnBP	tri-n-butyl fosfat, engl. <i>tri-n-butyl phosphate</i>