

Modificiranje svojstava hidrogelova dodatkom materijala iz biogenog izvora

Avgustini, Jana

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:149:952128>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ



Jana Avgustini

**MODIFICIRANJE SVOJSTAVA HIDROGELOVA
DODATKOM MATERIJALA IZ BIOGENOG IZVORA**

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

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

Kandidatkinja Jana Avgustini

Predala je izrađen završni rad dana: 2. srpnja 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. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Nenad Bolf, 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: 5. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ



Jana Avgustini

**MODIFICIRANJE SVOJSTAVA HIDROGELOVA
DODATKOM MATERIJALA IZ BIOGENOG IZVORA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

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

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, srpanj 2024.

Želim iskazati iskrene zahvale prof. dr. sc. Gordani Matijašić na prenesenom znanju, strpljenju i marnom vodstvu te otkrivanju nove grane kemijskog inženjerstva u kojoj sam se pronašla.

Zahvaljujem se i Teodori Prebeg, mag. ing. cheming. na svakom savjetu, lijepoj riječi i podršci, pogotovo u onim beskrajnim laboratorijskim danima.

Cijelom Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo, hvala što ste vrijeme provedeno na demonstraturama i izradi završnog rada učinili nasmijanim, zanimljivim i opuštene atmosfere.

Na kraju se zahvaljujem svojim prijateljima i obitelji, posebice baki, što su mi bili uporište i izvor sreće i uljepšali mi studiranje.

SAŽETAK

U inženjerstvu mekog tkiva stavlja se veliki naglasak na proizvodnju strukturnih nosača od biomaterijala. Oni se često proizvode od hidrogelova decelularizirane izvanstanične matrice (dECM) jer se postupkom decelularizacije uklanjaju stanice svojstvene izvornoj matrici uz očuvanje biološko-kemijskih karakteristika iste. Nosači moraju imati odgovarajuću mehaničku čvrstoću i stabilnost kako bi podupirali prijanjanje, rast i razvoj stanica u čemu sam dECM često ne zadovoljava. Stoga se fizikalno-kemijska i mehanička svojstva modificiraju dodatkom prirodnih polisaharida poput natrijeva alginata. Osim toga, geliranje samog natrijeva alginata može se potaknuti dodatkom kalcijeva klorida, čime se neposredno utječe i na njegovu čvrstoću. Takvom pripremom nastaju hibridni hidrogelovi natrijeva alginata uz kalcijev klorid i dECM-a.

Hidrogelovima pripremljenim od natrijeva alginata (3 % i 5 % mas.) uz dodatak kalcijeva klorida (1 – 5 i 8 % mas.) ispitivalo se reološko ponašanje i određivala viskoznost kako bi se istražio utjecaj CaCl_2 na mehanička svojstva gelova. Hidrogelove pripremljene kombiniranjem različitih koncentracija natrijeva alginata uz 5% CaCl_2 s dECM-om karakteriziralo se pomoću razlikovne pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR). Na taj način su se ispitale stabilnost i potencijalne novonastale veze u hibridnim hidrogelovima.

Rezultati reoloških ispitivanja pokazali su da su hidrogelovi natrijeva alginata uz dodatak 5% kalcijeva klorida najprimjenjiviji za daljnja ispitivanja. Rezultati ispitivanja pomoću DSC-e pokazali su da je uzorak 25 dECM/75 5% ALG najstabilniji, a rezultati FTIR analize upućuju da su najčvršće veze u uzorku 50 dECM/50 3% ALG. Dakle, rezultati nisu jednoznačno uputili na uzorak koji se može smatrati najpogodnijim za buduću analizu što se često događa u ispitivanju svojstava hidrogelova. Zahtjevi za *in vivo* primjenu i 3D ispis često su kontradiktorni i potrebno je pomno ugađanje parametara poput viskoznosti, stupnja umrežavanja i termičkih svojstava za pripremu odgovarajućeg hidrogelnog nosača.

Ključne riječi: hidrogel, izvanstanična matrica, natrijev alginat, strukturni nosač, reologija, FTIR, DSC

ABSTRACT

Modification of hydrogel properties by the addition of materials from biogenic sources

In soft tissue engineering, there is a great emphasis on the production of scaffolds from biomaterials. They are often produced from decellularized extracellular matrix (dECM) hydrogels because during the decellularization process native cells are removed with the preservation of biological and chemical characteristics. Scaffolds must meet certain requirements such as mechanical stiffness and stability to support cell adhesion, growth, and development, in which dECM alone frequently does not suffice. Therefore, the physico-chemical and mechanical properties are modified with the addition of natural polysaccharides such as sodium alginate. In addition, the gelation of sodium alginate itself can be stimulated by the addition of calcium chloride, which directly affects its mechanical strength. Such preparation creates hybrid hydrogels of sodium alginate with calcium chloride and dECM.

To characterize the hydrogels prepared from sodium alginate (3% and 5% wt%) and calcium chloride (1-5 and 8% wt%), their rheological behaviour was examined, determining the viscosity to investigate the influence of CaCl₂ on the mechanical properties of gels. Hydrogels prepared by combining different concentrations of sodium alginate with dECM were characterized using differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). In this way, the stability and potential newly formed bonds in the combined hydrogels were tested.

The results of rheological testing showed that sodium alginate hydrogels with 5% calcium chloride were most applicable for further testing, The results of DSC tests showed that the 25 dECM/75 3% ALG sample is the most stable, and the FTIR analysis results indicate that the strongest bonds are in the 50 dECM/50 3% ALG sample. Thus, the results did not unequivocally point to the sample that can be considered the most suitable for future analysis, which commonly happens in testing the properties of hydrogels. Requirements for *in vivo* application and 3D printing are often contradictory and it's necessary to carefully adjust parameters such as viscosity, degree of crosslinking and thermal properties for preparation of the appropriate hydrogel scaffold.

Key words: hydrogel, extracellular matrix, sodium alginate, scaffold, rheology, FTIR, DSC

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Inženjerstvo tkiva | 3 |
| 2.2. Strukturni nosači..... | 4 |
| 2.3. Biomaterijali | 5 |
| 2.4. Izvanstanična matrica | 5 |
| 2.5. Hidrogelovi i njihova primjena u inženjerstvu tkiva | 7 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Priprema hidrogelova | 13 |
| 3.1.1. Priprema alginata | 13 |
| 3.1.2. Priprema otopina kalcijeva klorida | 13 |
| 3.1.3. Priprema dECM-a | 13 |
| 3.1.4. Priprema hidrogelova za reološka ispitivanja | 14 |
| 3.1.5. Priprema hibridnih hidrogelova | 14 |
| 3.2. Metode karakterizacije | 15 |
| 3.2.1. Reološka svojstva | 15 |
| 3.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom | 15 |
| 3.2.3. Razlikovna pretražna kalorimetrija..... | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 4.1. Reološka svojstva | 17 |
| 4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom..... | 20 |
| 4.3. Razlikovna pretražna kalorimetrija | 22 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 26 |
| 6. POPIS KRATICA..... | 28 |
| 7. LITERATURA | 29 |

1. UVOD

Hidrogelovi su polimerni hidrofilni materijali koji zadržavaju značajnu količinu vode u svojoj trodimenzionalnoj strukturi. Zbog visokog sadržaja vode, fizikalno-kemijska svojstva hidrogelova posjeduju određenu fleksibilnost čime mogu nalikovati mnogim mekim tkivima. To ih čini biokompatibilnima, a ujedno su prvi biomaterijali razvijeni posebno s namjerom ljudskog korištenja. [1,2] Biokompatibilnost podrazumijeva sposobnost materijala da postoji u tijelu bez da uzrokuje reakciju koja onemogućuje izvršavanje potrebnih funkcija ili umanjuje djelovanje materijala, poput oštećivanja susjednih stanica. [3] Stanice u organizmu moraju moći komunicirati međusobno, kao i sa prirodnom izvanstaničnom matricom (engl. *extracellular matrix*, ECM). ECM služi kao strukturni nosač (engl. *scaffold*) koji pruža mehaničku potporu prilikom bioloških reakcija i regeneracije tkiva. Kada dođe do narušavanja homeostaze u tijelu, poput ozljeda tkiva ili organa, tkivo se nastoji regenerirati, a kao pomoć u tom procesu potrebni su materijali koji mogu imitirati svojstva ECM-a. Proizvodnja istih područje je interesa regenerativne medicine i inženjerstva tkiva. [4,5] Inženjerstvo tkiva primjenjuje inženjerske tehnologije na žive organizme kako bi se jednog dana mogle izrađivati adekvatne funkcionalne zamjene mekog tkiva ili bolesnih organa. U inženjerstvu mekog tkiva, velika se pozornost pridaje hidrogelovima na bazi natrijeva alginata. [4]

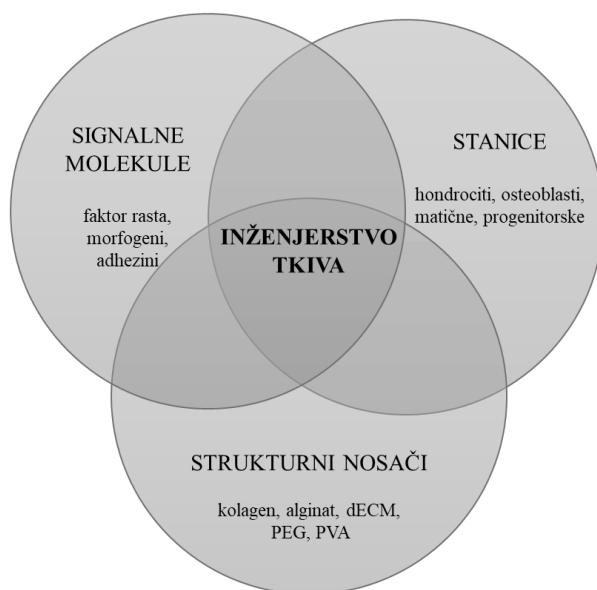
Alginat je anionski polisaharid koji prirodno gelira fizičkim umrežavanjem, ali kao takav često ima nezadovoljavajuća mehanička svojstva. Da bi hidrogel mogao postati strukturni nosač mora imati određenu viskoznost i mehaničku čvrstoću, stoga su hibridni prirodno-sintetski hidrogelovi najčešći predmet istraživanja i razvoja. [6] Anionski polimeri poput alginata se u laboratoriju mogu gelirati dodatkom kalcijevih, magnezijevih ili cinkovih iona (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} redom). Ovakvim ionskim umrežavanjem polimera značajno se ojačavaju mehanička svojstva hidrogelova. [4] Osim toga, hidrogelni strukturni nosači mogu se pripremiti i postupkom decelularizacije prirodnog tkiva, čime se dobiva decelularizirana izvanstanična matrica (engl. *decellularized extracellular matrix*, dECM). Decelularizacija je proces uklanjanja stanica i njihovih komponenata (DNK, RNK) iz ECM-a kako bi se dobila prirodna matrica, što više očuvanih biokemijskih i mehaničkih svojstava. Očuvanje prirodnog staničnog okoliša glavni je razlog zašto dECM ima prednost nad sintetskim hidrogelovima, ali degradacija mehaničkih svojstava česta je posljedica sterilne decelularizacije, što se kompenzira hibridnim hidrogelnim strukturama. [7]

Danas se metode proizvodnje nosača biomaterijala većinom oslanjaju na trodimenzionalni ispis (engl. *3D printing*). 3D ispis proizvodni je proces slojevite depozicije biomaterijala na računalno kontroliranu platformu za izgradnju. Automatizacija koju 3D print pruža znači reproducibilnost u izradi vrlo složenih struktura hidrogelova, što je jedan od glavnih izazova u njihovoj proizvodnji. Struktura, veličina pora i raspodjela veličine pora, mogućnost proizvodnje, kompatibilnost sa stanicom i metoda primjene faktori su o kojima ovisi odabir i proizvodnja hidrogelova. Svaka moguća primjena hidrogelova ograničena je fizikalno-kemijskim karakteristikama istih. [8] Cilj ovog rada je ispitati kako se svojstva hidrogelova iz biogenog izvora, pripremljenih iz decelularizirane izvanstanične matrice, modificiraju dodatkom alginata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva interdisciplinarno je područje koje se najčešće svrstava pod regenerativnu medicinu, a bavi se razvojem i proizvodnjom konstrukcija koje sudjeluju u obnavljanju oštećenog tkiva i organa i poboljšavanju njihovih funkcija. Modernim su se inženjerstvom tkiva uspjele proizvesti ljudske stanice, ali i funkcionalni organi poput hrskavice. 2008. godine je transplantiran prvi potpuno sintetizirani organ, dušnik. Iako cjeloviti organi, osim hrskavice, nisu još uspješno razvijeni, modificirani životinjski organi i žile uspješno se koriste dugi niz godina. Inženjerstvo tkiva područje je ogromnog potencijala i predstavlja alternativno rješenje transplantaciji organa, znači mogućnost zacjeljivanja teških rana, uspješnije tretmane i u kasnijim stadijima bolesti te personalizirane metode liječenja. [9,10]



Slika 1. Trijada inženjerstva tkiva [10]

Tri su osnovne sastavnice pri konstrukciji tkiva; donorske stanice, strukturni nosači i signalne molekule, što je shematski prikazano na slici 1. Odgovarajućom kombinacijom tri ključna elementa u prikladnom okruženju, kroz neko vrijeme dolazi do regeneracije tkiva ili organa.

Donorske stanice moraju biti istovrsne novom tkivu za čiji su razvoj namijenjene, održane strukture i fizikalno-kemijskih svojstva, ali ne smiju sadržavati nikakve informacije svojstvene izvornom organizmu, poput DNK ili RNK. Strukturni nosači (engl. *scaffold*) služe za prianjanje i proliferaciju stanica te se moraju moći ugraditi u organizam, bez da ih tijelo odbaci, kako bi stanice mogle nastaviti s rastom *in situ*. Signalne molekule, u što spadaju faktori rasta, obuhvaćaju proliferaciju, staničnu adheziju i diferencijaciju. Stanice se najčešće uzgajaju *in vitro*, jer su uvjeti blaži nego unutar organizma, ali moguće je primijeniti gelove za popravljjanje defekata *in vivo*, što se radilo s agarozom. [10, 11]

2.2. Strukturni nosači

Ključnu ulogu u inženjerstvu tkiva imaju nosači, jer većina ljudskih stanica zahtijeva strukturnu podlogu kako bi preživjela. Glavne uloge nosača u organizmu su stanična adhezija, rast i razvoj, diferencijacija i regeneracija stanica. Moraju biti biokompatibilni i biorazgrađivi, imati odgovarajuću mehaničku čvrstoću i biti vrlo porozni, velike specifične površine i volumena. To čini proizvodnju odgovarajućeg nosača koji zadovoljava sve kriterije vrlo zahtjevnim i dugotrajnim procesom. [12]

Za izradu nosača u inženjerstvu tkiva koriste se biomaterijali; keramike, sintetski polimeri i prirodni polimeri. Keramički nosači ne koriste se često u inženjerstvu mekog tkiva, ali primjenjivi su za regeneraciju kostiju. Nosače poput hidroksiapatita i tri-kalcijeva fosfata karakterizira visoka mehanička krutost, tvrda krhka površina i niska elastičnost. Time strukturno nalikuju mineralnoj fazi prirodnih kostiju, a kemijska sličnost keramike podržava diferencijaciju i proliferaciju osteoblastskih stanica, bitnih za regeneraciju kostiju. Iako se koriste u stomatologiji i ortopediji kao koštani implantati, klinička je primjena često ograničena zbog lomljivosti, teškog oblikovanja i nemogućnosti sintetiziranih poroznih kostiju da podnesu mehaničko opterećenje u tijelu.

Nosači proizvedeni iz sintetskih materijala pokazali su se vrlo uspješnim zbog jednostavne kontrole karakteristika i strukture. Veliki nedostaci su smanjena bioaktivnost i odbacivanje od stanica domaćina pri ugradnji u organizam. Razgrađuju se hidrolizom, čime nastaje CO₂ koji snižava lokalnu pH-vrijednost tkiva, što može uzrokovati nekrozu tkiva i stanica.

Za razliku od sintetskih, prirodni polimeri kao nosači pokazuju veliku bioaktivnost, potiču izvrsno prianjanje i rast stanica te su biorazgrađivi. Na taj način stanice domaćina s vremenom

počinju proizvoditi vlastiti ECM zamjenjujući nosač koji se degradira, što je upravo cilj strukturnih nosača. [11]

2.3. Biomaterijali

Biomaterijali su svi materijali koji uzajamno djeluju s biološkim sustavima. Glavna podjela je na one prirodnog ili sintetskog porijekla, dok su glavni zahtjevi mogućnost sterilizacije, biokompatibilnost, biodegradacija i bioaktivnost. Materijali koji su biodegradabilni se nakon izvršavanja funkcije raspadaju na spojeve koji ne štete organizmu i iz njega prirodno izlaze, a bioaktivnost se veže uz bilo kakav učinak na živo tkivo, interakciju ili pak odgovor živog tkiva kao posljedicu simulacije. [9]

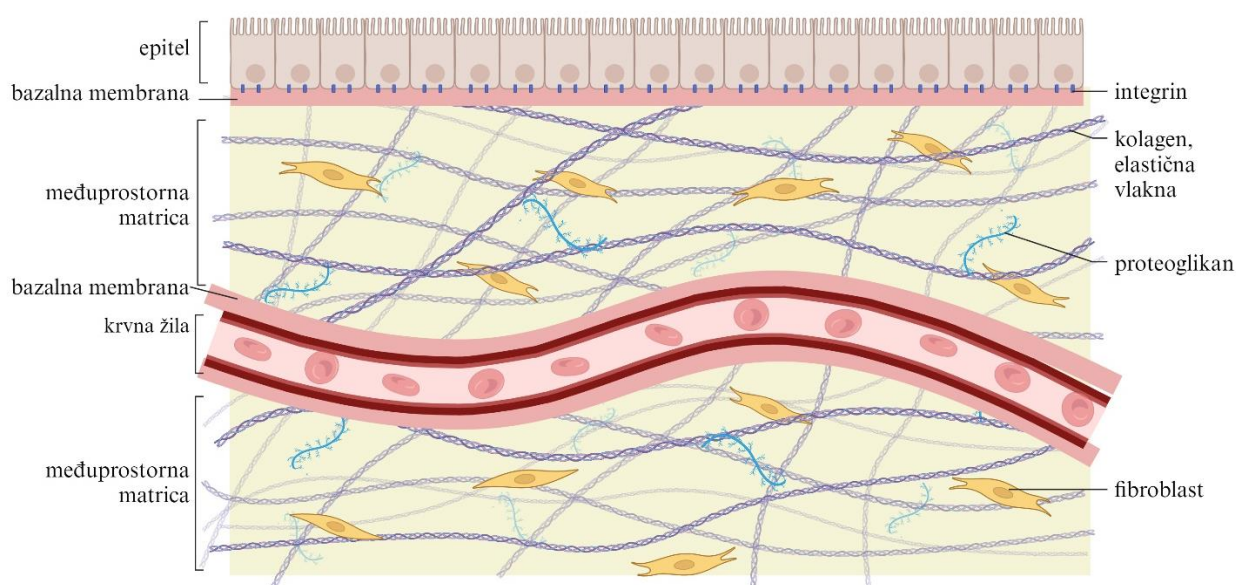
Iako je primjena biomaterijala prirodnog porijekla velika, oni su često skupi, nekonzistentnih svojstava jer ovise o izolaciji iz različitih donorskih tkiva, koja mogu biti i izvor neželjenih virusa i bakterija. Također, razna fizikalno-kemijska ograničenja zahtijevaju modifikaciju, što je dodatan, vrlo zahtjevan i dugotrajan dio proizvodnje. S druge strane, sintetski polimerni biomaterijali mogu se prilagoditi potrebama tkiva tijekom same proizvodnje. Lakša je kontrola fizikalno-kemijskih svojstava i kakvoće, reproducibilnost je viša i moguća je proizvodnja u većim količinama. Kako bi se optimalno iskoristile prednosti različitih vrsta materijala, danas je najčešći razvoj i primjena hibridnih, prirodno-sintetskih biomaterijala. [10]

2.4. Izvanstanična matrica

Kombinacijom natrijeva alginata i želatine moguće je dobiti hidrogel pogodan za 3D ispis, zadovoljavajućih mehaničkih reoloških i bioloških svojstava, ali u kojem su još uvijek odsutne prirodne bioaktivne molekule tkiva ili organa. Iz tog je razloga ECM ključna pri proizvodnji novih hidrogelova.

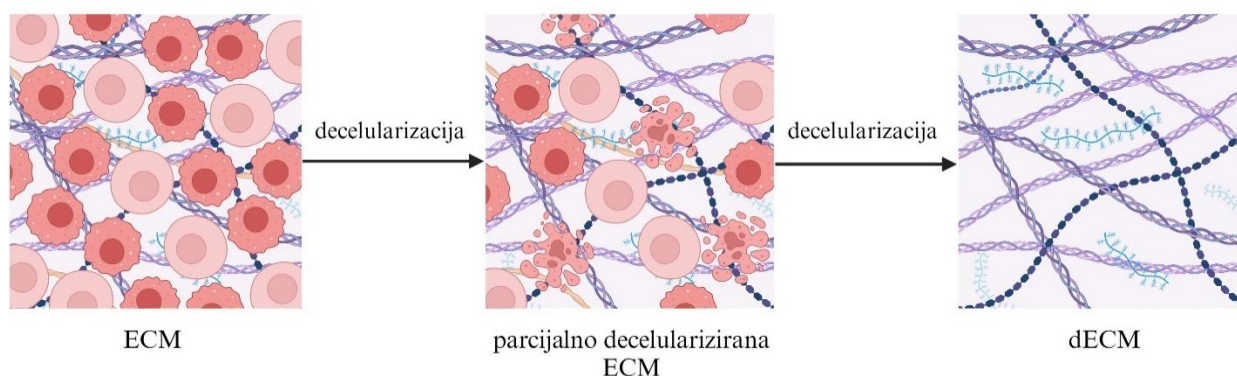
Izvanstaničnu matricu čine složene funkcionalne i strukturne molekule (slika 2), a biokemijski je sastav karakterističan za svako živo tkivo ili organ i kao takva, ECM predstavlja specifičan mikrookoliš svake stanice. Uloge koje ECM obnaša su gotovo neprebrojive. Ono najbitnije za inženjerstvo tkiva je vezano uz strukturni integritet; vezana je uz organizaciju oblika tkiva i odgovorna je za mehanička svojstva stanice. U neprekidnoj je komunikaciji sa stanicama, izvor je signalnih molekula za homeostazu, proliferaciju i diferencijaciju, kao i za faktor rasta. Utječe

na polarnost stanica, njihovo vezivanje prilikom bioloških i kemijskih reakcija, migraciju i skladištenje. [13,14]



Slika 2. Struktura ECM-a [15]

Decelularizacija tkiva dobivanjem hidrogelova, učestali je proces proizvodnje strukturnih nosača od dECM-a. Pojednostavljeni postupak decelularizacije prikazan je na slici 3. Metode decelularizacije su razne, dijele se na kemijske, enzimске te fizičke, a često se kombinira više od jednog postupka. Cilj je proizvesti decelularizirane materijale koji su strukturno i sastavno što sličniji izvornom tkivu, ali uz uklanjanje stanica i njihovog materijala, primarno DNK i RNK. U inženjerstvu tkiva, nosači se proizvode s ciljem nasađivanja stanica na njih, što mora biti omogućeno i u decelulariziranom materijalu. ECM prirodno raste pored i oko stanica, stvarajući osjetljivu i zamršenu mrežu koju je vrlo teško potpuno očistiti od izvornih stanica, bez da stradaju struktura i oblik. Iako je cilj pronaći što prikladniju metodu, u decelularizaciji se često žrtvuje neko od svojstava prirodne matrice, koje se pokušava nadomjestiti daljnjim modifikacijama, kako bi zasijavanje novih stanica bilo što uspješnije. [12,14]

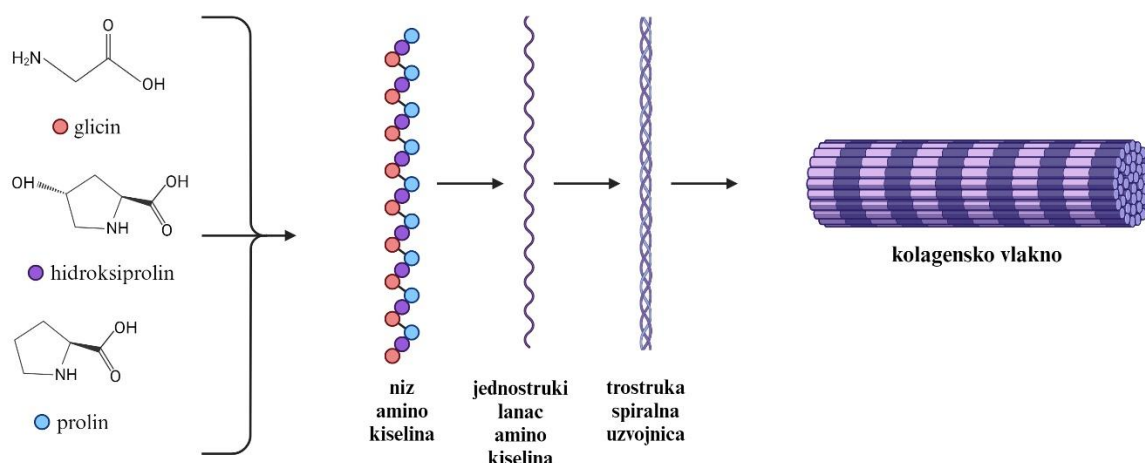


Slika 3. Proces decelularizacije ECM-a [16]

2.5. Hidrogelovi i njihova primjena u inženjerstvu tkiva

Bitna podvrsta biomaterijala su hidrogelovi. Polimerni su hidrofilni materijali, vrlo porozne i fleksibilne strukture zbog visokog sadržaja vode. Primarna podjela hidrogelova je na one prirodnog ili sintetskog porijekla. Istaknuti prirodni hidrogelovi su kolagen, želatina, kitozan, hijaluronska kiselina i alginat, a sintetski polietilen glikol (PEG) i njegovi derivati te polivinil alkohol (PVA). Sintetski se polimeri još dijele na biorazgradive i bionerazgradive. [10, 13]

Kolagen je vlaknasti protein koji je ujedno i glavna sastavnica ECM-a. Najzastupljeniji je u prirodi, a u ljudskom tijelu nalazi se u kostima, ligamentima, koži, tetivama te u hrskavici. Sastoji se od trostruke spiralne uzvojnice polipeptidnih α -lanaca (slika 4). Hidrogelovi se najčešće proizvode iz kolagena tipa I, jer se on samostalno umrežava, a pritom nastaju vodikove veze. Ovakav način umrežavanja rezultira većim porama, koje znače više prostora za stanično vezanje i razvijanje. Slaba mehanička svojstva ograničavaju njegovu primjenu u ortopedskom inženjerstvu tkiva za koje ima najveći potencijal, a negativna je i brza *in vivo* degradacija, jer takva nestabilnost ne ostavlja dovoljno vremena za proliferaciju stanica. Često se priprema uz dodatak glikozaminoglikana (GAG) poput heparina. [8, 10]



Slika 4. Struktura kolagena [16]

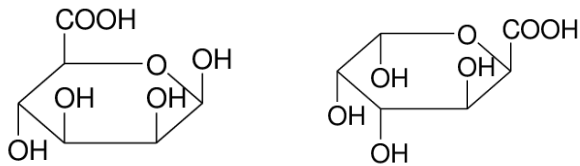
Denaturiranjem trostruke uzvojnice kolagena u jednostruke niti nastaje želatina. Hidrogelovi od želatine zadržavaju kolagenovu netoksičnost i biokompatibilnost, ali odsutnost kemijskih veza uveliko narušava mehaničku stabilnost pri temperaturama živog tkiva. Priprema stoga zahtijeva dodatnu polimerizaciju ili kombinaciju s ostalim prirodnim polimerima.

Kitozan je polisaharid koji se dobiva iz kitina, sastoji se od jednostavnog glukozamonomomera te nalikuje mnogim GAG-ovima i nakon celuloze drugi je najzastupljeniji biopolimer u prirodi. Dobiva se iz ljuštura ljuskavaca i člankonožaca te iako se ne nalazi u ljudskom ECM-u, ima antimikrobno djelovanje, nije antigen te ne izaziva snažnu imunološku reakciju u ljudskom organizmu. Uz odgovarajuću obradu postaje biokompatibilan i biorazgradiv. Pozitivan naboj amino skupina u njegovim lancima potiče adheziju stanica zbog elektrostatskih interakcija, što uklanja potrebu dodavanja vezivnih agensa u pripremi hidrogelova. Najveću primjenu u inženjerstvu tkiva pronalazi kao nosač za 3D ispis hrskavice i kostiju, kao i njihovo zacjeljivanje. [8,10]

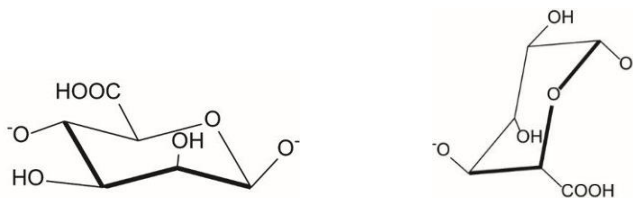
Hijaluronska kiselina linearni je polisaharid čest u vezivnom tkivu, a ima ključnu ulogu u hidrataciji tkiva, diferencijaciji stanica i difuziji. Prisutne raznolike funkcionalne skupine poput aldehidne, tiolne i hidrazidne olakšavaju samo geliranje i modifikaciju svojstava hidrogelova. S druge strane, visok afinitet prema vodi ograničava mogućnost povezivanja s drugim polimerima, posljedično ograničavajući i mehanička svojstva. [8]

Vrlo bitan prirodni polimer je alginat, polisaharid izveden iz smeđih algi. Sačinjen je od β -1, 4-D-mamanske kiseline (M) i α -1, 4-L glukuronske kiseline (G), poredane u homogenim (MM ili GG) ili heterogenim (MG ili GM) sljedovima (slika 5). To dovodi do raznolikosti u strukturama i fizikalno-kemijskim svojstvima molekula.

A

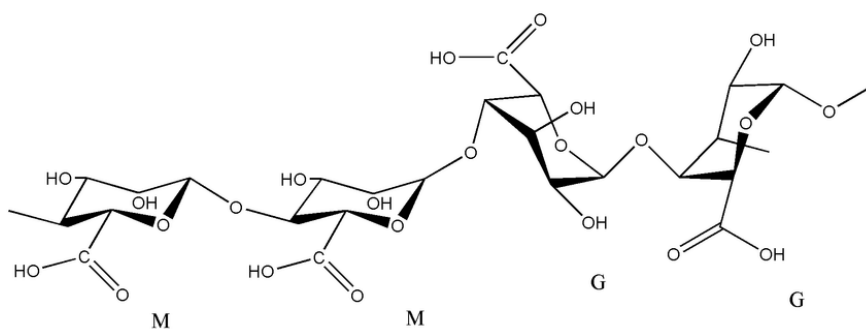


B



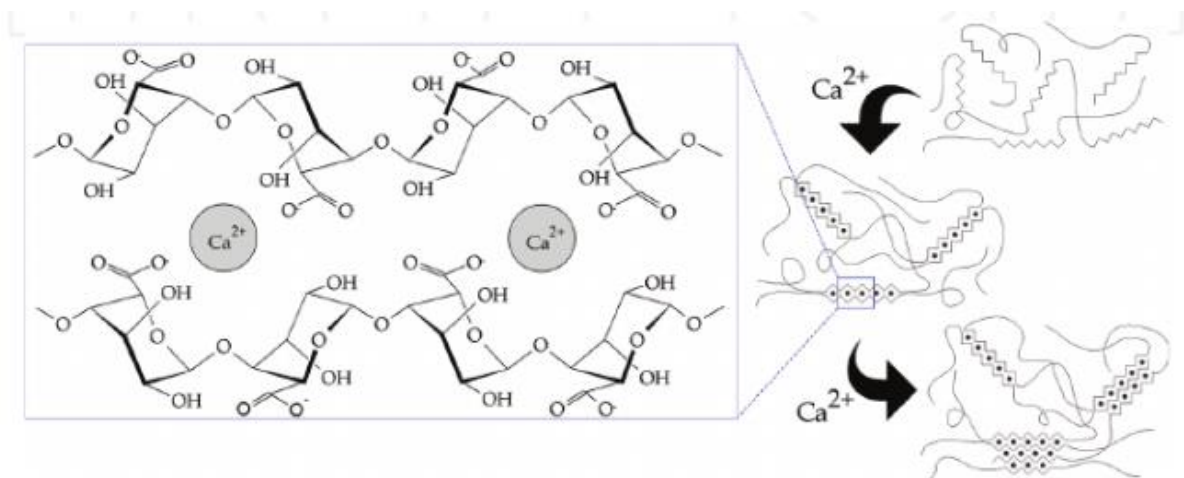
β -D-mamanska kiselina (M) α -L glukuronska kiselina (G)

C



Slika 5. Struktura alginata: (A) alginatni monomeri, (B) strukturna formula monomera, (C) lančana konformacija [17]

Hidrogelovi koji se proizvode iz natrijeva alginata smatraju se savršenima za inženjerstvo tkiva, jer su biokompatibilni, biorazgradivi, hidrofilni, elastični i široko dostupni. Štoviše, imaju mnogo sličnosti s prirodnim ECM-om. Visoki sadržaj vode u njihovoj strukturi obećavajuće je okruženje za razvoj i obnovu stanice, ali ponekad nije kompatibilno za povezivanje i adheziju stanice. Degradacija je postupna i slijedi nakon nastajanja ionskih veza s tkivom u koje je ugrađeno i jednom kada krene ne može se više zaustaviti. Najbitnije ograničenje alginatnih hidrogelova su njihova loša mehanička svojstva. Strukturni nosači ovog tipa su meki, male viskoznosti i kao takvi često neprimjenjivi za zahtjevne uvjete unutar organizma. Da bi se moglo utjecati na karakteristike hidrogelova, potrebno je moći povezati alginat s drugim supstratima, a anionska priroda čini ih vrlo reaktivnim s viševalentnim kationima, poput kalcijevih iona. Ca^{2+} ioni efektivno otapaju alginat u hidrogel, a veze nastaju primarno u G-području, što je prikazano na slici 6. Ionsko povezivanje pruža rješenje lošim mehaničkim svojstvima, a masivna zona umrežavanja nastaje tek nakon apsorpcije vode. Alginatni agregati stabiliziraju se vodikovim vezama i time se dodatno ojačavaju mehanička svojstva. [4, 9]

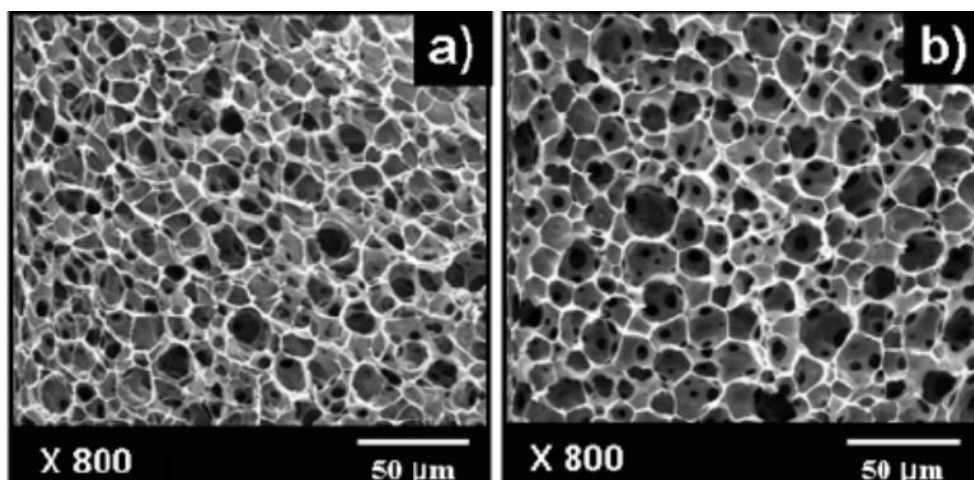


Slika 6. Geliranje alginata pomoću kalcijevih iona [17]

U inženjerstvu tkiva se od sintetskih polimera preferiraju oni biorazgradivi, primjerice PEG, kojeg karakterizira niska citotoksičnost i visoka biokompatibilnost. Proizvodi se anionskom ili kationskom polimerizacijom akrilatnih monomera, a ovisno o duljini pojedinih lanaca izravno se mogu kontrolirati veličine pora u hidrogelu. Prepreku predstavlja odbojnost prema stanicama, što zahtijeva hibridno umrežavanje s peptidima ili sličnim polimerima. Izbor agensa za umrežavanje također izravno kontrolira poroznost, kao i druge fizikalno-kemijske

karakteristike, poput stope degradacije, bubrenja i mehaničke čvrstoće. Polietilen oksid tvori kopolimer s polipropilen oksidom, što je temeljni sastojak termoosjetljivih hidrogelova koji su odobreni za primjenu na opekotinama i u farmaceutskim proizvodima.

PVA nije biorazgradiv. Sintetizira se postupkom saponifikacije iz polivinil acetata, a rezultat je hidrogel koji nalikuje hrskavici s nešto vode, ali velikim kapacitetom zadržavanja iste. Alkoholna funkcionalna grupa vrlo je reaktivna i hidrogel je podložan modifikaciji kemijskim i fizikalnim umrežavanjem, što može poboljšati mehanička svojstva, ali kao i kod hijaluronske kiseline, sposobnost stvaranja jakih vodikovih veza može predstavljati problem. Korišten je u regeneraciji hrskavice, a s obzirom na to da se ne može u potpunosti razgraditi, pri pripremi strukturnih nosača korištena je vrlo mala molarna masa, ~15,00 g/mol, kako bi ju bubrezi mogli apsorbirati. [8, 10, 13] Primjeri uspješno sintetiziranih kombiniranih PVA/PEG hidrogelova prikazani su na slici 7. [18]



Slika 7. Kombinirani PVA/PEG hidrogelovi: (a) PVA/PEG u omjeru 75:25, (b) PVA/PEG u omjeru 50:50 [18]

Primjena hidrogelova u inženjerstvu tkiva vrlo je raznovrsna. Primjerice, razvijanjem metoda liječenja kardiovaskularnih bolesti poput infarkta miokarda, Pourfarhangi i suradnici [19] uspješno su konstruirali srčane flastere koji iniciraju regeneraciju mišića srčanog tkiva. Takav flaster proizveo se pomoću hibridnih hidrogelova dobivenih kombinacijom miokardijalnog dECM-a i kitozana. Nosači pripremljeni na ovaj način oponašali su i mehanička i kemijska svojstva srčanog tkiva, osiguravajući rast srčanih progenitorskih stanica (engl. *cardiac progenitor cells*, CPC), potrebnih za obnavljanje organa. Dodatak kitozana bio je neophodan,

jer je dECM imala nezadovoljavajuću mehaničku čvrstoću. Osim toga, optimizirala se vitalnost stanica i biorazgradivost samih nosača.

Kompozitni hidrogel pogodan za 3D print modela *in vitro* tumora glave i vrata razvili su Kort-Mascort i suradnici [20]. Takav je hidrogel dobiven kombinacijom dECM-a te polisaharida alginata i želatine. Modelom je simulirano mikrookruženje izvornog tkiva što ga čini prikladnim za procjenu malignih fenomena i utjecaja lijekova na iste. Nadalje, ojačavanje polisaharidima čini ga mehanički stabilnim, odgovarajuće krutosti i elastičnosti. Nisu pronađene značajne razlike u usporedbi s tumorima skvamoznog tkiva glave i vrata induciranim u ispitivanjima s miševima, a model je podržao proliferaciju i razvoj ćelija tumora te vitalnost stanica veću od 90 % u periodu od gotovo tri tjedna. Ovakva primjena hidrogelova predstavlja alternativu testiranju na životinjama, reproducibilnost u ispitivanjima te veće mogućnosti modifikacije eksperimenata.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprema hidrogrelova

3.1.1. Priprema alginata

Pripremale su se dvije otopine alginata različitih koncentracija, 3 te 5 g/mL. Prvo je bilo potrebno zagrijati 100mL destilirane vode na magnetskoj miješalici do 50 °C. Zatim se odvagala određena količina (3 g ili 5 g) natrijeva alginata (Natrijeva sol alginske kiseline, niska viskoznost, Alfa Aesar, Njemačka) na tehničkoj vagi i lagano dosipavala u vodu pri radnoj temperaturi. Otopine su se intenzivno miješale 1 h pri 900 min⁻¹. Obje otopine pripremljene su na isti način.

3.1.2. Priprema otopina kalcijeva klorida

Otopine kalcijeva klorida pripremljene su u rasponu koncentracija 1, 2, 3, 4, 5, 8 i 16 g/mL. Pripremile su se tako da se potrebna količina (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,6, 3,2 g redom) CaCl₂ (CaCl₂, bezvodni, GRAM-MOL, Hrvatska) odvagala na tehničkoj vagi te dodala u određeni volumen destilirane vode. Otopine su se homogenizirale mućkanjem.

3.1.3. Priprema dECM-a

Korištena je dECM pripravljena u sklopu prethodnih istraživanja, gdje su se uzorci svinjske jetre decelularizirali te je provedena digestija i liofilizacija. Pripremalo se 10 mL otopine dECM-a koncentracije 0,8 mg/mL. 80 mg praha dECM-a otopilo se u 8,1 mL 0,01 M otopine klorovodične kiseline (pH = 2). Zatim se provodila neutralizacija, dokapavanjem 100 µL 1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH, P.A, Lach-Ner, Češka) i provjerom pH-vrijednosti pomoću univerzalnog indikatora. Nakon neutralizacije dodaje se 10x koncentrirani fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) do oznake 10 mL.

3.1.4. Priprema hidrogelova za reološka ispitivanja

Kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije kalcijeva klorida na viskoznost, hidrogelovi su pripremljeni tako da se uzorak alginata od 8 mL miješao na mehaničkoj miješalici pri 1500 min⁻¹ te se postepeno dokapavalo 100 µL CaCl₂. Isti je postupak ponovljen za sve koncentracije, a u tablici 1 prikazane su oznake uzoraka i koncentracije alginata te kalcijeva klorida.

Tablica 1. Oznake uzoraka i koncentracije otopina od kojih su pripremljeni

| Oznaka uzorka | Koncentracija alginata, g/mL H ₂ O | Koncentracija CaCl ₂ , g/mL H ₂ O |
|--------------------------------|--|--|
| 3% ALG | 3 | 0 |
| 3% ALG + 1% CaCl ₂ | 3 | 1 |
| 3% ALG + 2% CaCl ₂ | 3 | 2 |
| 3% ALG + 3% CaCl ₂ | 3 | 3 |
| 3% ALG + 4% CaCl ₂ | 3 | 4 |
| 3% ALG + 5% CaCl ₂ | 3 | 5 |
| 3% ALG + 8% CaCl ₂ | 3 | 8 |
| 3% ALG + 16% CaCl ₂ | 3 | 16 |
| 5% ALG | 5 | 0 |
| 5% ALG + 1% CaCl ₂ | 5 | 1 |
| 5% ALG + 2% CaCl ₂ | 5 | 2 |
| 5% ALG + 3% CaCl ₂ | 5 | 3 |
| 5% ALG + 4% CaCl ₂ | 5 | 4 |
| 5% ALG + 5% CaCl ₂ | 5 | 5 |
| 5% ALG + 8% CaCl ₂ | 5 | 8 |
| 5% ALG + 16% CaCl ₂ | 5 | 16 |

3.1.5. Priprema hibridnih hidrogelova

Druga skupina hidrogelova bili su oni hibridni, u kojima se kombinirao alginat uz 5% CaCl₂ s dECM-om. Pripremali su se uzorci ukupnog volumena 2 mL, s različitim masenim udjelima alginata uz 5% CaCl₂ i dECM-a; 0 %, 25 %, 50 %, 75 % te 100 % dECM-a, tj. 100 %, 75 %, 50 %, 25 % te 0 % alginata uz 5% CaCl₂, redom. Oznake uzoraka i volumeni otopina od kojih su pripremljeni prikazani su u tablici 2, a radi jednostavnosti označavanja, 5% CaCl₂ izostavljen je u nazivu svih hibridnih hidrogelova.

Tablica 2. Oznake uzoraka i volumeni otopina od kojih su pripremljeni

| Oznaka uzorka | Volumen alginata, mL | Volumen dECM-a, mL |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| 3% ALG | 2,0 | 0 |
| 25 dECM/75 3% ALG | 1,5 | 0,5 |
| 50 dECM/50 3% ALG | 1,0 | 1,0 |
| 75 dECM/25 3% ALG | 0,5 | 1,5 |
| 5% ALG | 2,0 | 0 |
| 25 dECM/75 5% ALG | 1,5 | 0,5 |
| 50 dECM/50 5% ALG | 1,0 | 1,0 |
| 75 dECM/25 5% ALG | 0,5 | 1,5 |
| dECM | 0 | 2,0 |

3.2. Metode karakterizacije

3.2.1. Reološka svojstva

Reološka svojstva uzoraka alginat/CaCl₂ karakterizirana su pomoću rotacijskog viskozimetra DV-III+ Ultra (Brookfield, SAD). Za određivanje reoloških krivulja korišteno je vreteno (engl. *spindle*) SC4-21. Mjerenja su se provodila pri temperaturi od 15 °C i konstantnom volumenu uzorka od 8 mL.

3.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Hibridni hidrogelovi dECM/alginat uz 5% CaCl₂ karakterizirani su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR). Korišten je ATR-FTIR Vertex 70 (Brucker, SAD) spektrometar s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani u apsorpcijskom režimu 4000 do 400 cm⁻¹ 64 puta s rezolucijom 4 cm⁻¹ pri temperaturi od 20 °C.

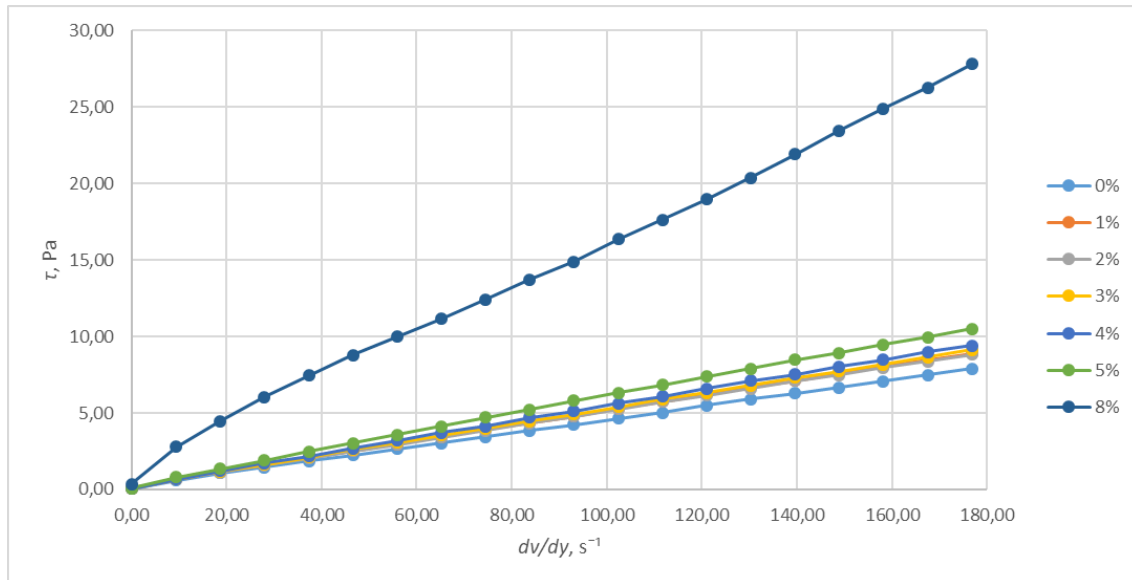
3.2.3. Razlikovna pretražna kalorimetrija

Razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) provodila se na hibridnim hidrogelovima dECM/alginat uz 5% CaCl₂. Korišten je uređaj DSC 823/TSO (Mettler Toledo, Švicarska). Za analizu je bilo potrebno odvagati ~10 mg uzorka koji se zatim stavlja u aluminijske lončiče za DSC. Treba upariti lončić i poklopac, probušiti rupicu na sredini poklopca pomoću igle, uzorak staviti u donji dio lončića te ga poklopiti odgovarajućim

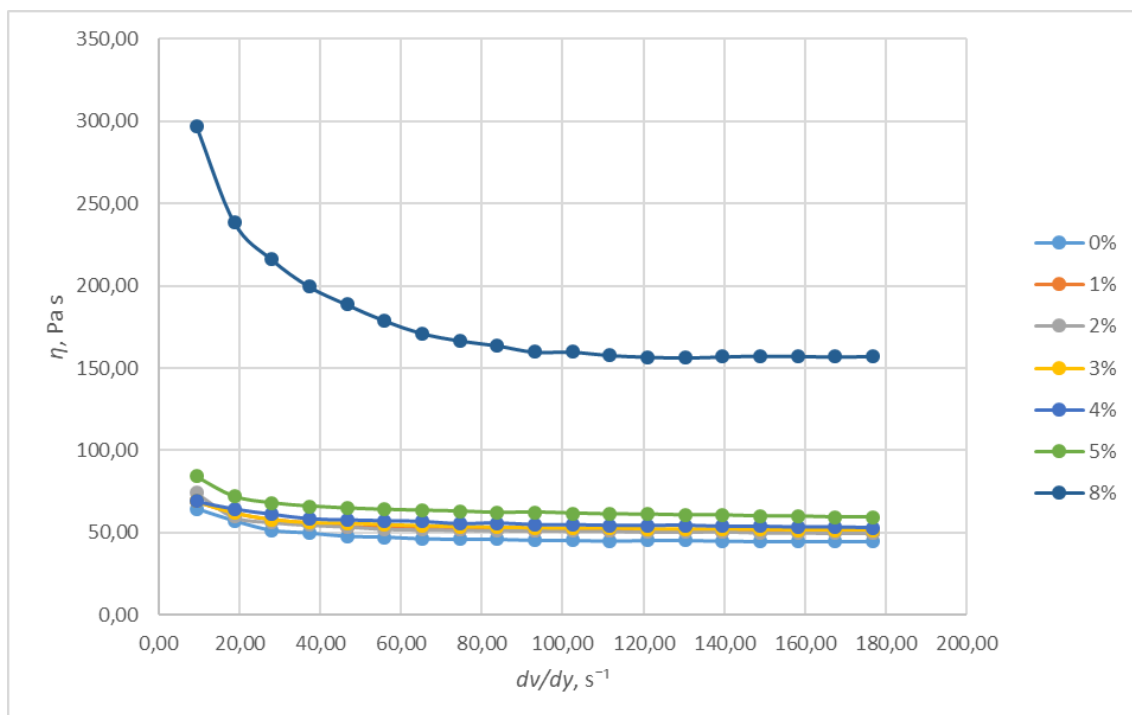
poklopcem, a zatim i hermetički zatvoriti. Uzorak u lončiću se dalje važe i stavlja u DSC uređaj. Mjerenje se provodilo u struji N₂ (50 mL/min) pri temperaturi 0 – 220 °C, brzinom zagrijavanja 10 °C/min u jednom ciklusu grijanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

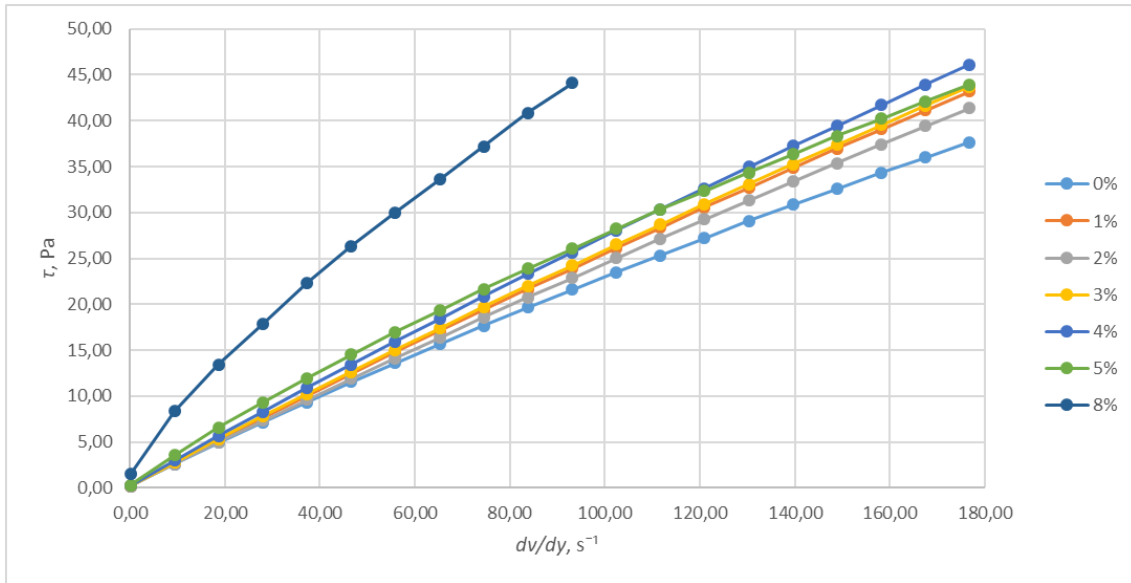
4.1. Reološka svojstva



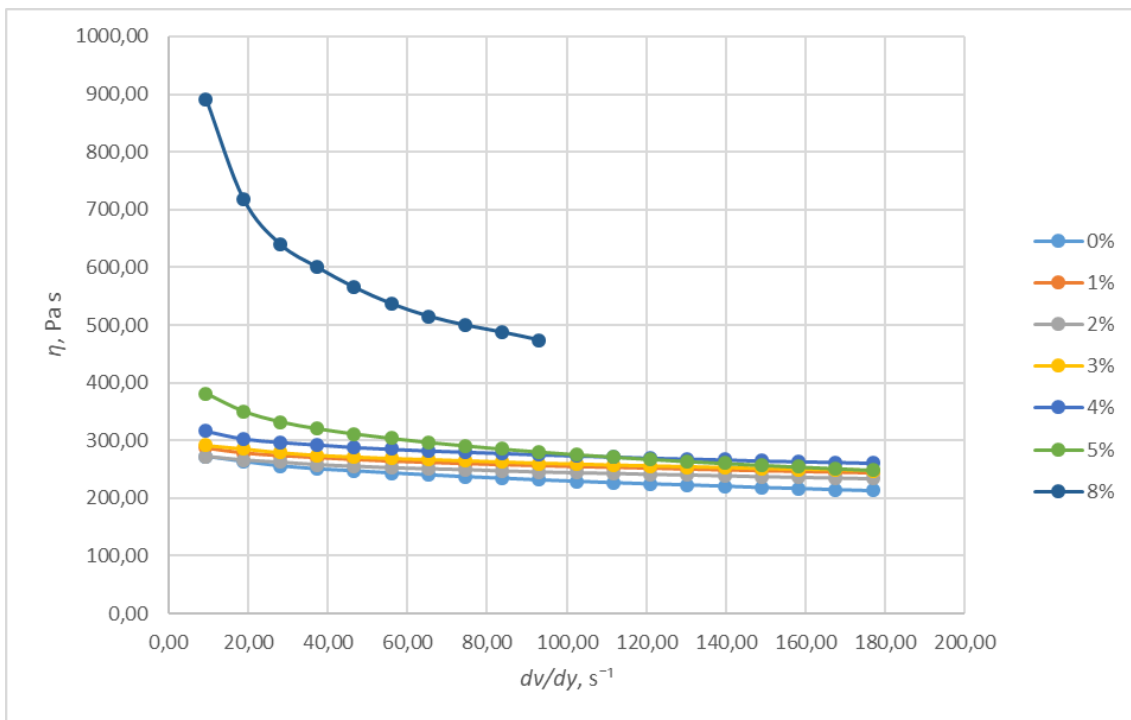
Slika 8. Reološki dijagram uzorka 3% ALG uz dodatak različitih udjela CaCl₂



Slika 9. Promjena viskoznosti za uzorke 3% ALG uz dodatak različitih udjela CaCl₂



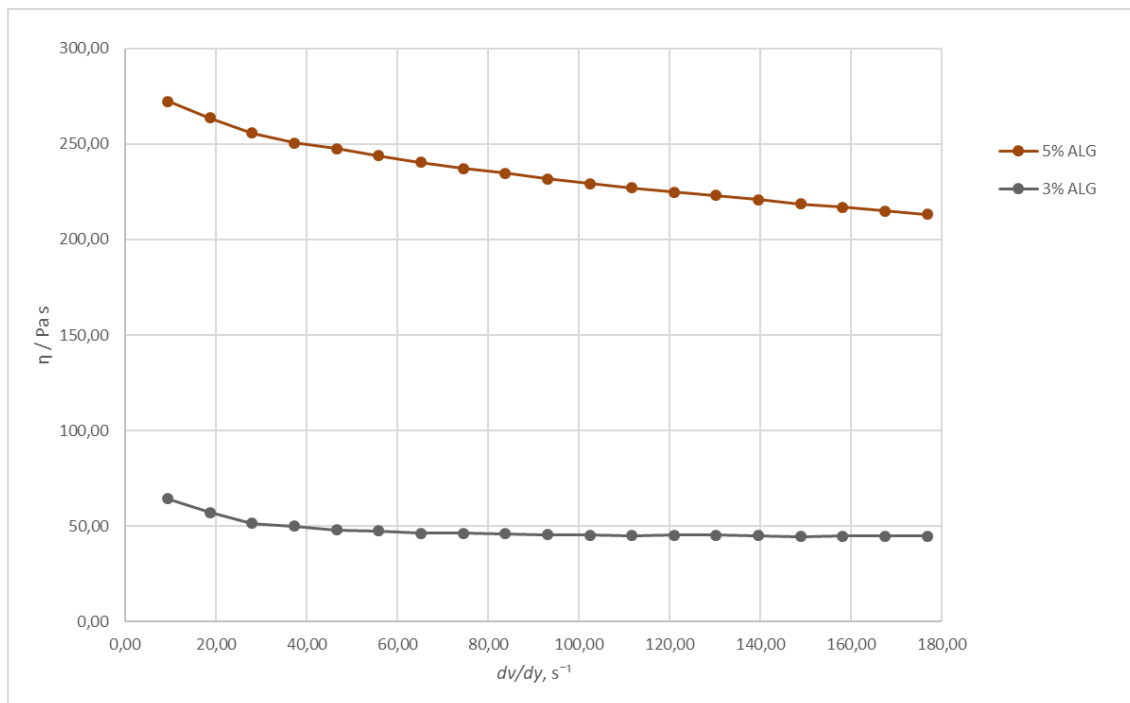
Slika 10. Reološki dijagram uzorka 5% ALG uz dodatak različitih udjela CaCl_2



Slika 11. Promjena viskoznosti za uzorke 5% ALG uz dodatak različitih udjela CaCl_2

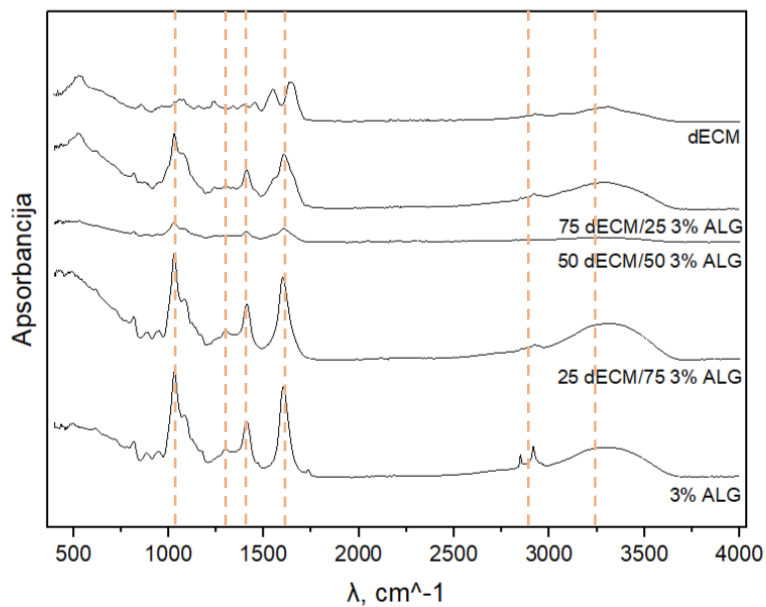
Hidrogelovi prikladni za 3D ispis često imaju kontradiktorne zahtjeve. Idealni gel morao bi biti viskozan kako bi se olakšao homogeni ispis, ali kao takav može uzrokovati oštećenje i smrt nasađenih stanica. S druge strane gel niske viskoznosti bio bi povoljan za vitalnost stanica, no nedovoljno čvrst za ispis te može doći do taloženja ili nastajanja agregata stanica u gelu. Zbog toga su reološka mjerenja jedan od najbitnijih načina karakterizacije hidrogelova. [21]

Na slikama 8 i 10 prikazani su reološki dijagrami svih pripremljenih otopina 3% ALG-a i 5% ALG-a, a na slikama 9 i 11 promjena njihovih viskoznosti sa smičnom brzinom. Prema prikazanim reološkim dijagramima (slike 8 i 10) može se zaključiti da krivulje ne odstupaju značajno od Newtonova zakona što dobivene hidrogelove svrstava u Newtonove kapljive konstantne viskoznosti. To se može potvrditi prikazom viskoznosti u ovisnosti o smičnoj brzini (slike 9 i 11) gdje je vidljivo postizanje konstantne vrijednosti viskoznosti nakon inicijalnog pada u području manjih smičnih brzina (do 20 s^{-1}). Najmanje je viskozan gel 3% ALG (slika 9, krivulja 0%), a postepeno povećavanje udjela CaCl_2 popraćeno je laganim porastom viskoznosti. Najveći skok viskoznosti uočen je kada je udio CaCl_2 veći od 5 %, a za uzorak s 16 % CaCl_2 nije bilo moguće provesti mjerenja zbog prevelikih vrijednosti viskoznosti. Takav trend je smislen, jer s većim brojem Ca^{2+} iona nastaje više ionskih veza s alginatom koje očvršćuju nastali hidrogel te on pruža više otpora miješanju. [22] Kod uzoraka 5% ALG, također se može uočiti porast viskoznosti dodatkom CaCl_2 , ali ne tako jednoznačno kao kod 3% ALG. 5% ALG gel je, i bez dodatnih supstrata, puno viskozniji od 3% ALG-a (slika 12) i moguće je da promjene u čvrstoći dodatkom malih koncentracija CaCl_2 nisu dovoljno značajne da bi se porast čvrstoće u ovim uvjetima mjerenja očitovao postepeno kao kod 3% ALG.

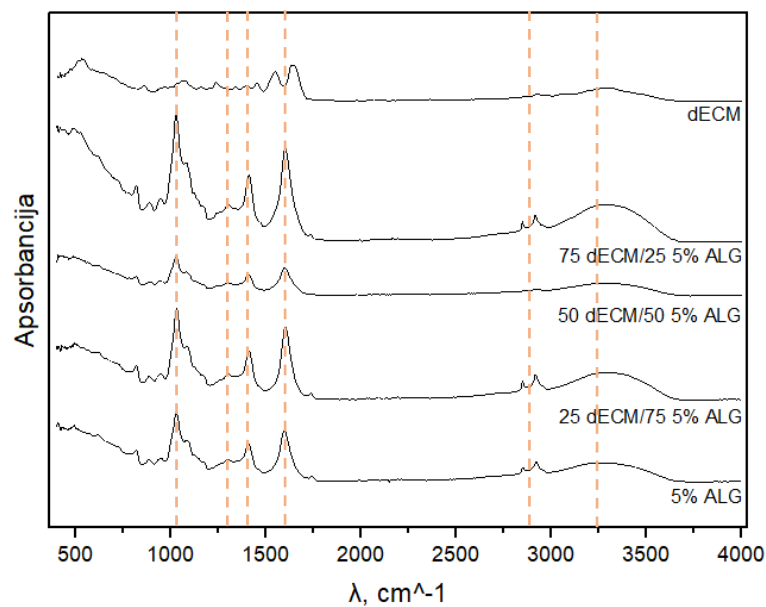


Slika 12. Usporedba viskoznosti 3% ALG i 5% ALG

4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom



Slika 13. FTIR spektri hibridnih uzoraka dECM/3% ALG CaCl_2



Slika 14. FTIR spektri hibridnih uzoraka dECM/ 5% ALG uz CaCl_2

Na slikama 13 i 14 prikazani su FTIR spektri pripremljenih hibridnih uzoraka, u rasponu valnih duljina 400 – 4000 cm^{-1} . FTIR analiza pruža informacije o molekularnoj strukturi i sastavu gelova, kao i o stupnju umrežavanja što neposredno utječe na mehanička svojstva gelova. [23] Spektar za čistu dECM-u prikazan je na obje slike te pokazuje karakteristične vrpce, oko 3300 cm^{-1} , te pri ~1100, 1550 i 1650 cm^{-1} . Te se vrpce pripisuju rastezanjima i vibracijama veza N-H u amidima dECM-a te tercijarnim, sekundarnim i primarnim amidima, redom.

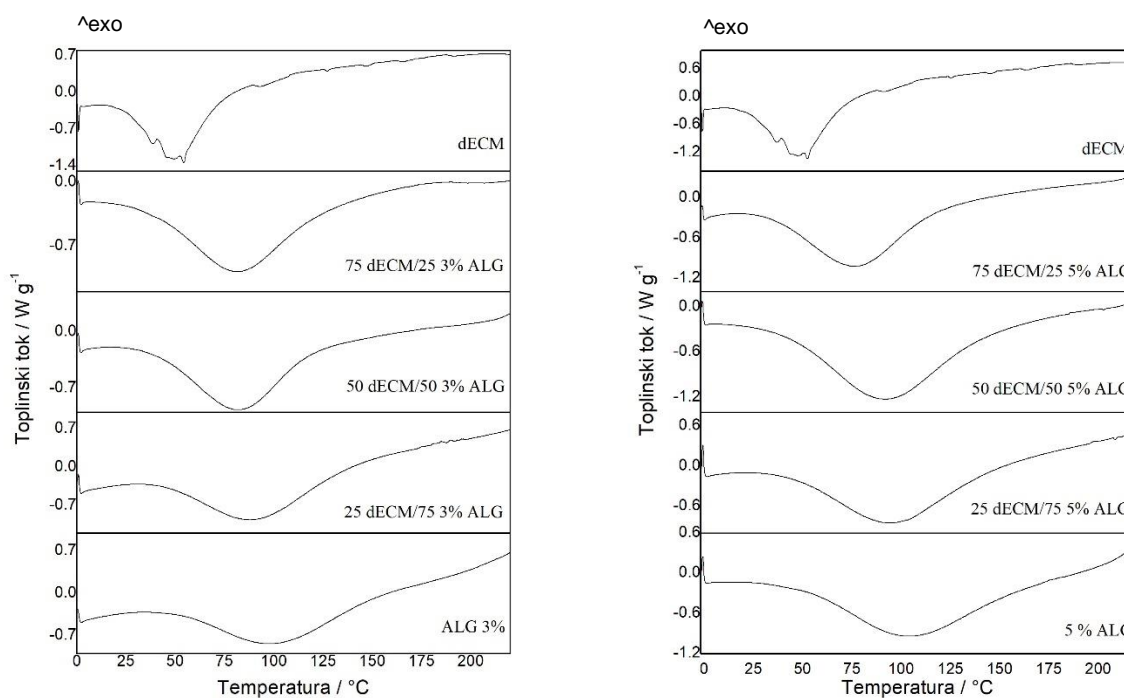
Za uzorak 3% ALG-a spektri pokazuju tipične vrpce natrijeva alginata umreženog pomoću CaCl_2 (slika 13). Široke se vrpce pri približnoj valnoj duljini 3250 cm^{-1} pripisuju prisutnosti i polimernom rastezanju vezane O-H skupine. Rastezanja C-H veze šestočlanog prstena javljaju se kao vrpce u obliku dubleta oko 2900 cm^{-1} . Uske i oštre vrpce oko valne duljine 1600 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim rastezanjima, a oko valne duljine 1400 cm^{-1} simetričnim COO-rastezanjima. [23,24] Ove vrpce izražene su zbog snažne elektrostatske interakcije između Ca^{2+} iona i karbonilne skupine alginata. [22] Slabe vibracije C-O veza vide se na manjoj vrpce pri otprilike 1300 cm^{-1} . Oštre, ali malo šire vrpce na približno 1080 cm^{-1} odgovaraju vibraciji i istežanju C-O-C veza.

Spektri hibridnih uzoraka 25 dECM/75 3% ALG te 75 dECM/25 3% ALG zadržali su vrpce karakteristične za alginat uz CaCl_2 i pokazali širu vrpcu oko valne duljine 1600 cm^{-1} koja odgovara karbonilnim COO- vezama alginata i amidnim skupinama dECM-a, što potvrđuje interakciju i nastanak hibridnog hidrogelnog nosača. Viša vrpca pri približnoj valnoj duljini 3250 cm^{-1} ukazuje na veći broj vodikovih veza u uzorku 25 dECM/75 3% ALG. Za uzorak 50 dECM/50 3% ALG odsutne su gotovo sve karakteristične vrpce, blago se naziru samo one pri 1080, 1400 i 1600 cm^{-1} . [23, 24]

Na slici 14 prikazani su spektri uzoraka dECM-a, 5% ALG-a te njihove kombinacije. Uspoređujući dva spektra, za sve prikazane vrpce postoji malen, ali uočljiv pomak udesno, tj. pomak karakterističnih vrpce prema malo većim valnim duljinama. Takav pomak uzrokovan je razlikom u koncentraciji i ne upućuje na nove funkcionalne skupine. [23] Sve vrpce 5% ALG-a uz CaCl_2 manjeg su intenziteta nego za 3% ALG uz CaCl_2 . Najviše vodikovih veza prisutno je u uzorku 75 dECM/25 5% ALG, što se vidi iz povišene vrpce pri približnoj valnoj duljini 3250 cm^{-1} . Za uzorak 50 dECM/50 5% ALG vrpce su također manje izražene nego za ostale uzorke 5% ALG, ali i dalje izraženije nego za uzorak 50 dECM/50 3% ALG.

Manji broj slabije izraženih vrpca za uzorke miješane u omjeru 50/50 moguće je objasniti time da nastaje čvršće umreženje između dECM-a i alginata. U tom slučaju vibracije C-H veza šestočlanog prstena alginata bile bi ograničene i kao takve slabo uočljive na spektru. Shodno tome, najčvršće je umrežavanje prisutno za uzorak pripremljen miješanjem dECM-a i 3% ALG-a u omjeru 50:50. [23] FTIR analizom potvrđena je dobra međumolekularna interakcija između alginata i dECM-a.

4.3. Razlikovna pretražna kalorimetrija



Slika 15. DSC termogrami hibridnih uzoraka dECM/3% ALG uz CaCl₂ (lijevo) te dECM/5% ALG uz CaCl₂ (desno)

Tablica 3. Vrijednosti normalizirane entalpije hibridnih uzoraka dECM/3% ALG

| Uzorak | Normalizirana entalpija, J/g |
|-------------------|---|
| 3% ALG | -345,74 |
| 25 dECM/75 3% ALG | -345,35 |
| 50 dECM/50 3% ALG | -275,01 |
| 75 dECM/25 5% ALG | -284,95 |
| dECM | -238,81 |

Tablica 4. Vrijednosti normalizirane entalpije hibridnih uzoraka dECM/5% ALG

| Uzorak | Normalizirana entalpija, J/g |
|-------------------|---|
| 5% ALG | -402,78 |
| 25 dECM/75 5% ALG | -363,65 |
| 50 dECM/50 5% ALG | -293,31 |
| 75 dECM/25 5% ALG | -317,24 |
| dECM | -249,76 |

Tablica 5. Vrijednosti početne i maksimalne temperature hibridnih uzoraka dECM/ 3% ALG dobivene na DSC-u

| Uzorak | Početna temperatura, °C | Maksimalna temperatura, °C |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 3% ALG | 49,45 | 163,34 |
| 25 dECM/75 3% ALG | 42,18 | 142,76 |
| 50 dECM/50 3% ALG | 40,12 | 122,74 |
| 75 dECM/25 5% ALG | 37,80 | 131,09 |
| dECM | 41,75 | 63,05 |

Tablica 6. Vrijednosti početne i maksimalne temperature hibridnih uzoraka dECM/ 3% ALG dobivene na DSC-u

| Uzorak | Početna temperatura, °C | Maksimalna temperatura, °C |
|-------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 5% ALG | 48,79 | 180,52 |
| 25 dECM/75 5% ALG | 44,11 | 154,41 |
| 50 dECM/50 5% ALG | 43,73 | 137,29 |
| 75 dECM/25 5% ALG | 34,82 | 123,45 |
| dECM | 41,57 | 63,21 |

Na slici 15 prikazani su DSC termogrami na kojima se vide endotermni i egzotermni prijelazi kod uzoraka hibridnih hidrogelova. Tijekom promjene temperature u određenom vremenu, mjeri se količina energije koju uzorak otpušta ili apsorbira te se ista uspoređuje s referentnom posudicom. Razlika u energiji potrebnoj za usklađivanje temperature uzorka s referencom uzrokovana je različitim toplinskim kapacitetima, koji su posljedica molekularne konfiguracije i veza unutar molekule. DSC analizom dobivaju se korisne informacije o termičkim svojstvima ispitivanih uzoraka. [25]

Dekompozicija polimernih materijala na DSC-u proces je u dva koraka; endotermno pucanje vodikovih veza (očekivano pri 100 °C u standardnim uvjetima) te egzotermni raspad biopolimera (pri 240 – 260 °C ovisno o toplinskom toku), nakon kojeg slijedi nastajanje novih veza. Time se dobiva neurednija struktura, manje razine organizacije, stoga je proces egzoterman. [26] Prvi endotermni prijelaz 3% ALG-a pri 100 °C (slika 15) pripisuje se dehidraciji, tj. otpuštanju vode. Drugi egzotermni prijelaz pri otprilike 240 °C odgovara dekompoziciji biopolimera, kao što je i očekivano. Svi uzorci na slikama 15 i 16 pokazuju endotermne prijelaze koji odgovaraju gubitku vode iz hidrogelne strukture. Očituje se da je termalna stabilnost pod utjecajem sadržaja vode, a razlog tome je što su vodikove veze glavni stabilizatori hidrogelne strukture. [27]

Vrijednosti normaliziranih entalpija prikazane su u tablicama 3 i 4. Endotermni minimumi tj. entalpija dehidracije najveća je za 5% pa 3% ALG, a najmanja za dECM. Mala razlika u iznosu entalpije za isti uzorak dECM-a može se objasniti drugačijom masom uzoraka koji su stavljeni u lončić za DSC analizu. Za obje grupe hibridnih uzoraka uočava se porast entalpije što je više alginata uz CaCl₂ u uzorku s dECM-om, osim za uzorke miješane u omjeru dECM/alginat

75:25. Najveća entalpija potrebna je za razaranje najčvršćih veza, što upućuje na to da je dodatkom alginata i CaCl_2 dECM-u nastao čvršći i stabilniji gel. Povećana termička stabilnost hibridnih hidrogelova posljedica je međumolekularnih interakcija između dECM-a i alginata, što potvrđuje njihovo polimerno umreženje. [28]

Također, pomoću DSC analize mogu se dobiti informacije o stabilnosti uzoraka prateći početnu i maksimalnu temperaturu. [25] U tablicama 5 i 6 prikazane su vrijednosti početne i maksimalne temperature svih ispitivanih uzoraka. Početna temperatura predstavlja početak termičkog raspada gela, stoga gelovi namijenjeni za ljudsko korištenje ne bi smjeli započinjati s raspadom ispod prosječne temperature ljudskog tijela, oko $37\text{ }^\circ\text{C}$ [26, 29]. Najnižu početnu temperaturu ima dECM ($41,57$ tj. $45,75\text{ }^\circ\text{C}$), a najvišu uzorak 3% ALG te nakon njega uzorak 5% ALG-a ($49,45$ te $48,49\text{ }^\circ\text{C}$ redom). Uzorak 75 dECM/25 5% ALG ima početnu temperaturu $37,8\text{ }^\circ\text{C}$ što ga čini granično primjenjivim za 3D ispis i uporabu jer denaturiranje kreće već u slučaju blaže groznice. Jedini preostali zasigurno nepogodan uzorak je 75 dECM/25 3% ALG, čija je početna temperatura $34,82\text{ }^\circ\text{C}$. Dodatkom alginata i CaCl_2 dECM-u, uočava se pozitivan porast početne temperature u svim uzorcima izuzev uzorka 50 dECM/50 3% ALG.

Maksimalna je temperatura maksimum reakcije raspada, a što je njezina vrijednost veća, materijal je stabilniji, jer do najvećeg raspada dolazi pri višoj temperaturi. To čini gel pogodnijim za 3D ispis i povećava mogućnosti primjene istog. [29] Slično kao za početne, najnižu maksimalnu temperaturu ima dECM ($63,05$ tj. $63,27\text{ }^\circ\text{C}$). Najvišu također imaju uzorci čistog alginata; uzorak 5% ALG-a $180,52\text{ }^\circ\text{C}$ te uzorak 3% ALG-a $164,34\text{ }^\circ\text{C}$. Vrijednosti početnih i maksimalnih temperatura svih hibridnih uzoraka leže između vrijednosti za dECM i alginata, što je i očekivano. Trend porasta temperature s porastom udjela alginata uz CaCl_2 uočen je i za maksimalne temperature, upućujući na termičku stabilizaciju dECM-a dodatkom alginata i CaCl_2 . Uzorci u kojima je dECM kombiniran s 5% ALG-om pokazuju najviše početne i maksimalne temperature, što ukazuje na to da porast koncentracije alginata ima značajan povoljan utjecaj na termička svojstva gelova.

5. ZAKLJUČAK

Provedena je modifikacija svojstava hidrogelova, pripremom hibridnih hidrogelova; dECM-a dodatkom 3% i 5% ALG uz CaCl_2 . Svojstva uzoraka su zatim ispitana pomoću reometra, FTIR-a te DSC-a.

Uočen je porast viskoznosti uzorka 3% ALG-a proporcionalno porastu koncentracije CaCl_2 . Za uzorak 5% ALG-a također postoji direktni porast viskoznosti uz dodatak CaCl_2 , ali vrijednosti nisu proporcionalno povezane s koncentracijom dodanog CaCl_2 . Moguće je objašnjenje da je uzorak 5% ALG-a viskoznan do te mjere da male dodane koncentracije CaCl_2 nisu dovoljne za porast viskoznosti kakav se očitovao za uzorak 3% ALG-a. Za pripremu hibridnih hidrogelova odabrani su uzorci alginata uz 5% CaCl_2 . Ta se koncentracija pokazala kao granična pri kojoj dolazi do značajnog povećanja viskoznosti, koje pak nije preveliko da onemogućava daljnje provođenje mjerenja.

Analizom FTIR spektara hibridnih hidrogelova potvrđena je prisutnost karakterističnih funkcionalnih skupina dECM-a i alginata uz CaCl_2 u hibridnim uzorcima te njihova dobra međumolekularna interakcija. Najčvršće su veze u uzorcima 50 dECM/50 3% ALG te 50 dECM/50 5% ALG.

Porast udjela i koncentracije alginata uz CaCl_2 u hibridnim uzorcima povećao je termičku stabilnost dECM-a, što se zaključilo iz porasta vrijednosti entalpija te početnih i maksimalnih temperatura, sukladno većoj količini alginata uz CaCl_2 u uzorku. Prema DSC-i najstabilniji su uzorci 25 dECM/75 5% ALG te 25 dECM/75 3% ALG.

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da je veća količina alginata uz 5% CaCl_2 pozitivno utjecala na mehanička i toplinska svojstva dECM-a. Naposljetku nije moguće izdvojiti jedan hibridni uzorak najpogodniji za daljnji razvoj i istraživanje, bez kompromisa između čvrstoće i stabilnosti.

6. POPIS KRATICA

3D ispis – trodimenzionalni ispis (engl. *3D printing*)

CPC – progenitorske stanice (engl. *cardiac progenitor cells*)

dECM – decelularizirana izvanstanična matrica (engl. *decellularized extracellular matrix*)

DSC – razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*)

ECM – izvanstanična matrica (engl. *extracellular matrix*)

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

GAG – glikozaminoglikani

PEG – polietilen glikol

PVA – polivinil alkohol

7. LITERATURA

- [1] Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Adv. Research J.*, 6(2015) 105-121.
- [2] Kopeček, J., Hydrogel biomaterials: A smart future?, *Biomaterials* 28 (2007) 5185–5192.
- [3] Lee K. Y., Mooney D. J., Hydrogels for Tissue Engineering, *Chemical Reviews J.*, 101 (2000) 1-9.
- [4] Sharma R., Malviya R., Singh S., Prajapati B., A Critical Review on Classified Excipient Sodium-Alginate-Based Hydrogels: Modification, Characterization, and Application in Soft Tissue Engineering, *Gels J.*, 9 (2023) 1-21.
- [5] Khan I., Neumann C., Sinha M, Tissue regeneration and reprogramming, *Wound healing, Tissue Repair and Regeneration in Diabetes, Elsevier eBooksm 2020.*, str.515-534.
- [6] Chaudhary, S., Chakraborty E, Hydrogel Based Tissue Engineering and Its Future Applications in Personalized Disease Modeling and Regenerative Therapy, *Beni-Suef University J of Basic and Applied Sciences*, 11 (2022) 2-14.
- [7] 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, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology J.*, 10 (2022) 1-13.
- [8] Xu F., Dawson C., Lamb M., Mueller, E., Stefanek E., Akbari M. Hoare T., Hydrogels for Tissue Engineering: Addressing Key Design Needs Toward Clinical Translation, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology J.*, 10 (2022) 1-25.
- [9] Eldeeb, A. E., Salah, S., Elkasabgy, N. A., Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech J.*, 23, (2022) 1-18.
- [10] Khang, G., Lee, S. J., Kim, M. S., Lee, H. B., Biomaterials: Tissue Engineering and Scaffolds, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2006., str. 366-382.
- [11] O'Brien, F. J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materialstoday J.*, 14 (2011) 88-94.
- [12] Valdoz, J. C., Johnson, B. C., Jacobs, D. J., et al., The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question, *International journal of molecular sciences*, 22 (2021) 12690–12690.

- [13] Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., Badylak, S.F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function, *Acta Biomater*, 49 (2017) 1-15.
- [14] Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B., Abarategi, A., Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds, *International journal of molecular sciences*, 21(2020) 5447–5447.
- [15] Huang, E. The Extracellular Matrix (ECM), <https://app.biorender.com>, pristup (16.6.2024.)
- [16] Kreirano pomoću aplikacije BioRender, <https://app.biorender.com>, pristup (16.6.2024.)
- [17] Silva Martins J., Vieira, A., Alginate and Sericin: Environmental and Pharmaceutical Applications, *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, InTechOpen, Croatia, 2017., str. 58-85.
- [18] Lee J. Y., Tan B., Cooper A. I., CO₂-in-Water Emulsion-Templated Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Using Poly(vinyl acetate)-Based Surfactants, *Macromolecules J*, 40 (2007), 1955-1961.
- [19] Pourfarhangi, K. E., Mashayekhan, S., Ghanbari Asl S., Hajebrahimi, Z., Construction of scaffolds composed of acellular cardiac extracellular matrix for myocardial tissue engineering, *Biologicals J*, 53 (2018) 10-18.
- [20] Kort-Mascort J. et al., Decellularized Extracellular Matrix Composite Hydrogel Bioinks for the Development of 3D Bioprinted Head and Neck in Vitro Tumor Models, *ACS Biomaterials Science & Engineering J*, 7 (2021) 5288-5300.
- [21] Khati, V., Decellularized liver extracellular matrix as a 3D scaffold for bioengineering applications, Doctoral thesis, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, 2022.
- [22] Li, J., Wu, Y., He, J. and Huang, Y., A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films, *Journal of materials science*, 51 (2016) 5791–5801.
- [23] Huang, C. C., Characteristics and Preparation of Designed Alginate-Based Composite Scaffold Membranes with Decellularized Fibrous Micro-Scaffold Structures from Porcine Skin, *Polymers J*. 13 (2021) 1-9.
- [24] Liu S., Li, Y., Li, L., Enhanced stability and mechanical strength of sodium alginate composite films. *Carbohydrate Polymers J*, 160 (2017) 62–70
- [25] Gill, P., Moghadam, T. T., Ranjbar, B., Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of biomolecular techniques*, 21 (2010) 167–93.
- [26] Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice G. O., Cavalheiro, E. T. G., Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt, *Eclectica Quimica J*, 29 (2004) 57-63.

- [27] Konieczny, P., Tomaszewska-Gras, J., Andrzejewski, W., Mikołajczak, B., Urbańska, M., Mazurkiewicz J., Stangierski, J., DSC and electrophoretic studies on protein denaturation of *Anodonta woodiana* (Lea, 1834), *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 126 (2016) 69-75.
- [28] Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Shah, Y. A., Altoubi, H. W. K., Kotta, S., Sharma, P., Anwer, M.K., Kaithavalappil, D.S., Koca, E., Aydemir, L. Y., Fabrication, Characterization, and Antioxidant Potential of Sodium Alginate/Acacia Gum Hydrogel-Based Films Loaded with Cinnamon Essential Oil, *Gels* J, 9 (2023) 1-14.
- [29] <https://www.encyclopedia.com/science-andtechnology/biochemistry/biochemistry/denaturation> (pristup 18.6.2024.)