

Istraživanje biokompatibilnosti izvanstaničnog matriksa jetre i elektroispredanih nosača od poli- ϵ -kapolaktona

Ivančić, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:672761>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Fran Ivančić 950/BPI

ISTRAŽIVANJE
BIOKOMPATIBILNOSTI
IZVANSTANIČNOG MATRIKSA
JETRE I ELEKTROISPREDANIH
NOSAČA OD
POLI- ϵ -KAPROLAKTONA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-6878 „Custom Tailored Fibrous Scaffold Prototype for Tissue Cells Culture via Combined Electrospinning“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Slivca.

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu, koji mi je pružio mogućnost sudjelovanja na projektu, te na njegovim znanstvenim i stručnim savjetima koji su oblikovali ideju ovog rada.

Poštovani profesore Slivac, hvala Vam na posvećenom vremenu i na trudu potrebnom da mi prenesete znanje nužno za izradu istraživanja. Cijenim strpljenje i povjerenje iskazano u mene.

Također, zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao i voditelju ovog projekta prof. dr. sc. Budimiru Mijoviću i dr. sc. Emiliji Zdravevi, s Tekstilno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji su uložnim vremenom i materijalima doprinijeli istraživanju.

Posebno želim zahvaliti svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na izrazitoj susretljivosti i pomoći koju su mi pružali tijekom trajanja istraživanja. Hvala Vam na trudu da stvorite okruženje u kojem je rad bio istinski užitak.

Najveću zahvalu za sve postignuto prvenstveno dugujem svojoj obitelji, roditeljima Krunoslavu i Tatjani, sestri Janji-Dori te braći Ivanu i Blažu, koji su me u svakom koraku poticali i davali mi snage da nastavim. Posebice zahvaljujem bratu Blažu, na razumijevanju i podršci koje mi je pružao u dobrim i lošim trenucima. Hvala ti na svim šetnjama i ugodnim razgovorima!

Na kraju želim zahvaliti svim prijateljima na riječima potpore i vjerovanju da ću uspjeti. Uz vas mi je studiranje bilo mnogo zabavnije. Hvala ti Z.!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ISTRAŽIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI IZVANSTANIČNOG MATRIKSA JETRE I ELEKTROISPREDANIH NOSAČA OD POLI- ϵ -KAPROLAKTONA

Fran Ivančić 950/BPI

Sažetak: Razvojem tehnika tkivnog inženjerstva omogućila se izrada nosača poželjnih mehaničkih i bioaktivnih svojstava potrebnih za regeneraciju tkiva. Dok alternativu predstavljaju tehnike transplantacijske medicine, metode tkivnog inženjerstva prednjače u *in vitro* modelima za istraživanje raka te razvoja farmaceutika. Cilj ovog rada bio je ispitati i usporediti biokompatibilnost elektroispredanog sintetskog i kompozitnog nosača sa prirodnim nosačem, nacijspljenih s HeLa stanicama. Nosači su bili izrađeni od polikaprolaktona (PCL), PCL-a kombiniranog sa svilnim fibroinom (PCL-SF) te izvanstaničnog matriksa svinjske jetre (ECM). U svrhu istraživanja, testovi biokompatibilnosti nosača sastojali su se od analize uspješnosti nacijspljivanja stanica te dinamike rasta i transfekcije. Kroz sva tri testa, najbolje rezultate je dao nosač od PCL-SF, dok su najmanje uspješni bili oni na ECM nosaču. Rezultati s primjenom kulture HeLa stanica u izradi modelnog tkiva pokazuju da je tehnologija nano-vlakana napredna tehnika u stvaranju staničnih nosača koji uspješno oponašaju potporanj prirodnih tkiva.

Ključne riječi: elektroispredanje, PCL, svilin fibroin, izvanstanični matriks, HeLa

Rad sadrži: 43 stranice, 11 slika, 7 tablica, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Anamarija Štafa, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
2. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
3. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
4. Prof. dr. sc. Budimir Mijović, Tekstilno-tehnološki fakultet (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology and Biotechnology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOCOMPATIBILITY STUDY OF EXTRACELLULAR LIVER MATRIX AND ELECTROSPUN POLI- ϵ -CAPROLACTONE SCAFFOLDS

Fran Ivančić 950/BPI

Abstract: The development of tissue engineering enabled the production of cell scaffolds with superior mechanical and bioactive characteristics needed for tissue regeneration. While regenerative medicine offers an acceptable alternative, current methods in tissue engineering still lead the way in *in vitro* cancer model research as well as drug development. The aim of this study was to test and compare biocompatibility of HeLa seeded, electrospun polymeric synthetic and composite scaffolds with a natural scaffold. The scaffolds were made of polycaprolacton (PCL), PCL composite integrated with silk fibroin protein (PCL-SF) and extracellular matrix isolated from pork liver (ECM). In studying the biocompatibility of scaffolds, three tests were performed: cell seeding efficiency, growth dynamics and transfection efficiency. PCL-SF proved the most successful in all three tests, while porcine ECM performed the worst. HeLa culture results indicate the nano-fibre technology as an advanced technique that is indeed able to successfully mimic the 3D architecture of native tissues.

Keywords: electrospinning, PCL, silk fibroin, extracellular matrix, HeLa

Thesis contains: 43 pages, 11 figures, 7 tables, 50 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD.* Igor Slivac, associate professor

Reviewers:

1. *PhD.* Anamarija Štafa, *Faculty of Food Technology and Biotechnology*, assistant professor
2. *PhD.* Igor Slivac, *Faculty of Food Technology and Biotechnology*, associate professor
3. *PhD.* Višnja Gaurina Srček, *Faculty of Food Technology and Biotechnology*, full professor
4. *PhD.* Budimir Mijović, *Faculty of Textile Technology*, full professor (substitute)

Thesis defended: 23 September 2019

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. STANIČNI NOSAČI..... | 3 |
| 2.1.1. Funkcija nosača | 3 |
| 2.1.2. Biomaterijali za izradu nosača stanica | 4 |
| 2.1.2.1. PCL..... | 8 |
| 2.1.2.2. Svinin fibroin (SF)..... | 9 |
| 2.1.3. Primjena ekstracelularnog matriksa (ECM) za izradu nosača..... | 10 |
| 2.1.3.1. Struktura ECM | 10 |
| 2.1.3.2. Stabilnost ECM-a i antimikrobna svojstva..... | 11 |
| 2.2. STRATEGIJE U IZRADI NOSAČA..... | 12 |
| 2.2.1. Elektroispredanje..... | 13 |
| 2.2.2. Procesi pripreme ekstracelularnog matriksa – decelularizacija..... | 15 |
| 2.3. STANIČNA KULTURA HELA..... | 16 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. MATERIJALI I METODE..... | 18 |
| 3.1.1. Izrada PCL i ECM nosača..... | 20 |
| 3.1.1.1. PCL..... | 20 |
| 3.1.1.2. ECM..... | 21 |
| 3.1.2. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)..... | 23 |
| 3.1.3. Uzgoj stanične linije i pasažiranje..... | 23 |
| 3.1.4. Priprema inokuluma i nacjepljivanje staničnih nosača | 24 |
| 3.1.5. Praćenje rasta i određivanje učinkovitosti prihvaćanja stanica na nosač MTT testom. | 25 |
| 3.1.6. Praćenje prisutnosti stanica na nosačima fluorescentnim bojanjem | 27 |
| 3.1.7. Transfekcija s pcDNA3.1-His-mCherry v1 | 27 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 29 |
| 4.1. SEM..... | 29 |
| 4.2. USPJEŠNOST NACJEPLJIVANJA I PRAĆENJE RASTA STANICA | 31 |
| 4.3. TRANSFEKCIJA I VIJABILNOST STANICA | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 38 |
| 6. LITERATURA..... | 39 |

1. UVOD

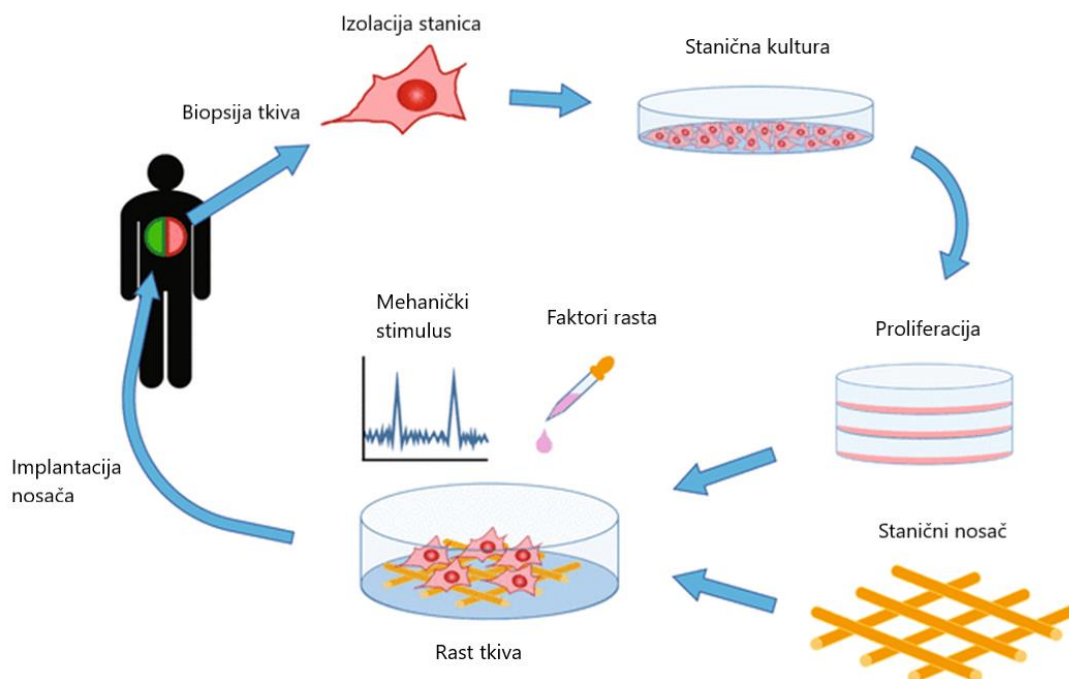
Trenutna tehnološka dostignuća u medicini, posebice mogućnost transplantacije i umjetni organi, omogućili su uspješnu terapiju pacijenata sa stanjem opasnim po život te poboljšanje kvalitete života i produljenje života kod pacijenata čije su potrebe za takvim intervencijama rezultat nesreća, trauma ili bolesti. U vidu mogućnosti tretiranja takvih slučajeva dugo se smatralo kako je zapravo najbolji način zamjena cijelog organa putem donora ili umjetnim organom, no obje metode također karakteriziraju i smrtnost, nastajanje ožiljnog tkiva, infekcije i odbijanje organa (Ikada, 2006). Najveći udio transplantacija obavlja se zbog zatajenja bubrega (Eurotransplant, 2018) koja je posljedica dijabetesa, kroničnog visokog tlaka, kroničnog glomerulonefritisa i policistične bolesti bubrega. Od ukupnog broja transplantacija bubrega, 7 % ih zataji u prvog godini, 17 % u prve tri godine i 46 % u 10 godina od transplantacije. Štoviše, 20 % transplantacija bubrega na godinu čine ponovljene transplantacije zbog komplikacija (National Kidney Transplantation, 2019). Dok zamjena dijelova tijela umjetnim materijalima (npr. silikonski umetci kod rekonstrukcije prsa nakon mastektomije) daje zadovoljavajuće rezultate, za posljedice može imati odbijanje tog elementa zbog nemogućnosti tijela da ga prepozna i psihološku traumu (Ikada, 2006). Uslijed nedostataka klasičnih medicinskih postupaka, tkivno inženjerstvo i regenerativna medicina uzimaju maha sredinom 1980-ih godina kao alternativni pristup dobivanju tkiva, odnosno uzgoj vlastitog tkiva *in vitro*. Oba termina označavaju aspekte razvoja tkiva i organa primjenom umjetnih, biorazgradivih nosača i ljudskih stanica. Dok se regenerativna medicina oslanja na regeneraciju tkiva *in vivo* primjenom matičnih stanica, tkivno inženjerstvo se definira kao interdisciplinarno područje inženjerskih i biomedicinskih znanosti usmjereno razvoju biološkog materijala za obnovu, održavanje i unaprjeđenje funkcija tkiva, odnosno, primjenjuje molekule, stanice, tkiva i organe koji zamjenjuju ili održavaju funkcije oštećenih, oboljelih, ostarjelih ili genetički deficitarnih dijelova tijela (Slivac, 2017a). Drugim riječima, svrha je 3D izgradnja kompleksnog tkiva *in vitro*, naciepljivanjem stanica na nosač (ECM - ekstra celularni matriks) od biomaterijala i transplantacija u pacijenta (Meyer i sur., 2009).

Počeci tkivnog inženjerstva sežu 50 godina unazad kada je prvi puta pokušao razvoj hrskavice primjenom kulture hondrocita u kombinaciji sa nosačem od kosti, dok je prvi uspješan eksperiment proveden koristeći nosač od kolagena sa naciepljenim stanicama dermalnog fibroblasta u tretiranju pacijenta sa opeklinama. Ovo čini prekretnicu, te se istraživanja okreću razvoju materijala naprednijih svojstava. Također, formira se prvo društvo

za tkivno inženjerstvo (TES - Tissue Engineering Society) ranih 1990-ih u SAD-u (Vacanti, 2006).

Potencijal i uspješnost tkivnog inženjerstva vidljivi su u nekoliko primjera. Moguće je regenerirati uretru koristeći acelularne biomaterijale kao PGA (poliglukolna kiselina) ili umjetne kolagene nosače uz zadržavanje funkcionalnosti kroz sedmo godišnji period testiranja. Također, ksenogeni materijali su uspješno korišteni kao zamjena za krvne žile kod kompleksnih kardiovaskularnih lezija. Kod pacijenata sa kongenitalnim deformacijama dušnika, tkivno inženjerstvo nudi moguće rješenje na način da se u fetalnom razvoju izoliraju stanice pacijenta i uzgajaju na ECM tijekom trudnoće prije implantacije. Ovakva terapija dokazana je u eksperimentu s janjadi. Iako je relativno malo pacijenata do sada liječeno ovim putem očito je kako se naizgled nemoguća vizija izgradnje organa pretvorila u stvarnost i usadila u svijest ljudi te broji sve više znanstvenika i društva sa privatnim financiranjem u svrhu daljnjeg razvoja područja tkivnog inženjerstva (Olson i sur., 2011).

Na temelju proših istraživanja, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost izrade i biokompatibilnost nosača načinjenih iz različitih materijala. Korišteni nosači od PCL-a, PCL-SF-a i ECM-a upotrebljavali su se za rast stanica raka grlića maternice, HeLa. S obzirom na nedostatak istraživanja s ovakvim uvjetima, u ovom će se radu pokušati odgovoriti na pitanja u vezi uspješnosti nasađivanja stanica i njihovog rasta kako bi se odredio optimalan nosač HeLa stanica. Također, istraživanje daje uvid u različite postupke nasađivanja stanica kao i potencijal njihove modifikacije nakon uzgoja na spomenutim nosačima.



Slika 1. Shematski prikaz tehnika tkivnog inženjerstva (Noh i sur., 2018).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STANIČNI NOSAČI

Nosači su fundamentalni metodama tkivnog inženjerstva jer predstavljaju analog biološkom matriksu (ECM) koji omogućava stanicama da se prihvaćaju, diferenciraju i proliferiraju. Ujedno, nosači služe i kao osnova za dobivanje željenog, organiziranog oblika raznih tipova tkiva (Sousa i sur., 2013). Kompatibilnost nosača i stanica zapravo je posljedica adhezije stanica na nosač iz razloga što se proliferacija i diferencijacija stanica događa tek nakon što se stanice prihvate na nosač i tvore okolnu potpornu strukturu na kojoj stanice mogu rasti. Veliku ulogu također igra i poroznost nosača te reljef površine koji dozvoljavaju dodatnu adsorpciju hranjivih tvari i bolje prihvaćanje stanica, pospješujući rast tkiva (Mijović i sur., 2012). Strukturno gledano, tkiva se mogu gledati prema prostornom rasporedu te se tako dijele na plošna 2D (jednoslojna kultura, npr. koža) i 3D (na nosačima, organi). Većina istraživanja u području staničnog inženjerstva rađena je na 2D površinama laboratorijskog posuđa. Ovakva istraživanja pojednostavljuju uzgoj i nude visoku vijabilnost stanica, što je dovelo do vrlo dobrog poznavanja opće biologije i ponašanja stanica u kulturama *in vitro*. Međutim, pošto se fiziologija stanica uvelike razlikuje ovisno o tome radi li se o 2D ili 3D kulturi, 2D kultura nosi značajna ograničenja jer ne oponaša 3D uvjete u tijelu. Morfologija, proliferacija i diferencijacija 2D kulture stanica razlikuju je od 3D, što u konačnici može utjecati na rezultate istraživanja zbog promjene metabolizma i smanjene funkcionalnosti kakvu bi inače pokazivale (Liu i sur., 2009).

2.1.1. Funkcija nosača

Danas je dostupna lepeza nosača dobivenih raznim proizvodnim tehnikama, osmišljenim u svrhu poboljšanja regeneracije tkiva i organa. Materijal i 3D struktura staničnog nosača uvelike utječu na staničnu aktivnost. Postoji nekoliko uvjeta koje nosač mora zadovoljiti želi li se osigurati stabilnost i funkcija tkiva (Ikada, 2006):

Struktura- visoko porozna 3D struktura s međupovezanim porama omogućuje dobar rast stanica po cijelom volumenu i brzi tok nutrijenata iz okoline u stanicu (Hutmacher, 2000). Visoka poroznost također dozvoljava difuziju otpadnih metaboličkih produkata u okolinu i naknadno izbacivanje iz tijela. Opskrba nutrijentima unutarnjih dijelova tkiva igra važnu ulogu u održavanju organa te je ograničavajući faktor pri uzgoju tkiva (O'Brien, 2011).

Biokompatibilnost- stanice se moraju prihvatiti, iskazivati normalne biološke funkcije i moći rasti po cijelom nosaču. Važnost se pridaje minimalnom imunološkom odgovoru organizma na novo generirano tkivo kako ne bi došlo do inflamacije i odbijanja tkiva od strane tijela (O'Brien, 2011).

Biorazgradivost- svrha je postupna razgradnja nosača u tijelu kako bi vlastite stanice s vremenom zamijenile implantat i tvorile vlastiti ECM. Podrazumijeva se kako razgradni produkti ne smiju ni na koji način imati utjecaja na tijelo, te se moraju moći lako izbaciti iz tijela bez nakupljanja. Razgradnja mora biti kontrolirana i strogo usklađena s rastom stanica, a brzina resorpcije odgovarati rastu tkiva *in vivo* (Ikada, 2006)

Mehanička svojstva- moraju odgovarati anatomiji mjesta gdje se presađuje i imati integritet kako bi nosač izdržao fizičke manipulacije tijekom operacije presađivanja i u razdoblju remodeliranja *in vivo* (Jones, 2005).

Ukoliko se nosač želi staviti u komercijalnu uporabu nužno je da je isplativ i podložan proizvodnji u malim šaržama, odnosno prijenosu iz laboratorijske proizvodnje na komercijalnu. Na ove uvjete utječe tip proizvodnje kao i odabir materijala od kojeg se proizvodi nosač (Jones, 2005).

Stanični nosači dopunjuju mjesto na kojem se inače nalazi prirodno tkivo i osiguravaju kostur za regeneraciju, a 3D struktura nosača utječe na vaskularizaciju i urastanje tkiva oko implantata *in vivo*. Jednom implantiran, rast tkiva željenog oblika i funkcije ovisi o mehaničkim svojstvima nosača na makro- i mikroskopskoj razini. Mehanička svojstva uključuju elastičnost, stlačivost, viskoelastičnost, naprezanje pri kojem dolazi do loma, otpornost na istezanje i vremenski ovisan zamor materijala (Ikada, 2006).

2.1.2. Biomaterijali za izradu nosača stanica

Termin biomaterijali primjenjuje se na sve materijale koji su 'namijenjeni povezivanju s biološkim sustavima kako bi evaluirali, liječili, pojačali funkciju ili zamijenili tkivo, organ ili funkciju tijela' (Jones, 2005). Svojstva tih materijala ovise o sastavu, strukturi i rasporedu njihovih sastavnih makromolekula, a svrstavaju se u grupe ovisno o strukturi te kemijskim i biološkim karakteristikama (Dhandayuthapani i sur., 2011). Tipično, u tkivnom inženjerstvu najviše se primjenjuju dvije grupe biomaterijala za izradu nosača: sintetski polimeri i prirodni materijali. U današnje vrijeme se sve više upotrebljavaju i kompoziti koji negiraju mane pojedinačnih materijala (Hutmacher, 2000).

Tablica 1. Najčešće korišteni materijali u tkivnom inženjerstvu

| Tip materijala | Vrsta | Struktura | Karakteristike | Primjena u TI | Izvori |
|-----------------------------------|---|--|---|--------------------------------|--|
| Keramike | Hidroksiapatit (HA) i trikalcij fosfat (TCP), koralji | Sinterirani nosači | Neelastičnost, nestlačivost, čvrsta lomljiva struktura, nepogodnost za regeneraciju mekih tkiva, neadekvatna biokompatibilnost i biorazgradivost | Kosti | Jones, 2005 ; Dhandayuthapani i sur, 2011 |
| Sintetski polimeri | | | | | |
| Poli- α -hidroksi kiseline | PGA, PLA, PCL, PTMC | Ponavljajuće $-O-R-CO-$ jedinicama u glavnom lancu R – alifatski lanac | Svojstva se lako mijenjaju promjenom monomera, niska cijena, ujednačena kvaliteta, duga razgradnja, CO ₂ tijekom hidrolize snižava pH, niska hidrofilnost, imunogenost | Kosti | Ikada, 2006; Okamoto, 2019 |
| Kopolimeri | Poli(laktična-ko-glukonska) kiselina | Nadogradnja polimernog lanca dvama različitim polimerima | Hidrofilnost, otpornost na vuču, dugo vrijeme raspada, skupljanje materijala | Sustavi za otpuštanje lijekova | Ikada, 2006 |
| Kompoziti | PCL/HA, PLGA-SF, PCL/HA+PLA, | Kombinacija dvaju materijala različitih svojstava | Kombinacija najboljih svojstava materijala | Kosti, ligamenti, meniskus, | Gloria i sur., 2010 |

Tablica 1. Najčešće korišteni materijali u tkivnom inženjerstvu (nastavak)

| Prirodni materijali | | | | | |
|----------------------------|--|--|--|--|-----------------|
| Proteini | Kolageni (goveđe ili svinjsko vezivno tkivo, krvne žile, crijeva) | Trostruka uzvojnica proteinskih lanaca –Ala–Gly–Pro–Arg–Gly–Glu–4Hyp–Gly–Pro–, povezanih vodikovim vezama | Razgradnja kolagenazama i proteazama | Kosti, živci, hrskavica, ligamenti, vaskularno tkivo | Ikada, 2006 |
| | Želatin (denaturacija kolagena kosti, tkiva, kože) | Heterogena smjesa jedno- i višelančanih polipeptida (struktura trostruke uzvojnice), njihovih oligomera i razgradnih polipeptida | Laka obradivost, geliranje, hidrofilnost, lako modeliranje u razne oblike | Koža, hrskavica, kosti | Ikada, 2006 |
| | Fibrin | Produkt parcijalne hidrolize proteina krvne plazme, fibrinogena | Minimalna imunološka reakcija, visoka efikasnost nacjepljivanja stanica, dobra međustanična interakcija, modeliranje morfologije, stabilnosti i mehaničkih svojstava | Zgrušnjavanje krvi | Li i sur., 2015 |

Tablica 1. Najčešće korišteni materijali u tkivnom inženjerstvu (nastavak)

| | | | | | |
|--------------|---|---|---|--|------------------------------------|
| Polisaharidi | Hijaluronska kiselina (HAc) (krijesta pijetla, <i>Streptococcus</i> i <i>Bacillus sp.</i>) | Anionski, linearni, nesulfirani polimer glikozaminoglukana (GAG) s jedinicama β -1,4-D-glukuronske kiseline (GlcUA) i β -1,3-N-acetil-D-glukozamina (GlcNAc) | Sastavni dio ECM-a, geliranje, održavanje strukture i vlažnosti kože, transport, biokompatibilnost i viskoelastična svojstva, brza razgradnja | Kompozitni materijali, meka tkiva | Sze i sur., 2015; Ikada, 2006 |
| | Alginat (Smeđe alge <i>Phaeophyta</i> i bakterije) | Blok kopolimeri sastavljeni od regija serijski vezanih (1-4 veze) monomera β -D-manuronske kiseline (M-blok), regija α -L-glukuronske kiseline (G-blok) i regija raspršenih M i G jedinica | Biokompatibilnost, biorazgradivost, neimunogenost, kelirajuća aktivnost, teško kontrolirana razgradnja | Zacjeljivanje rana, regeneracija hrskavice i kosti | Sun i Tan, 2013 |
| | Hitozan i hitin (egzoskelet rakova, mekušaca i insekata) | Linearni polisaharidni derivat hitina sastavljen od D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina povezanih (1-4) vezom | Netoksičnost, niska cijena, neimunogenost, antibakterijska svojstva, biorazgradivost, biokompatibilnost | Regeneracija mekog i čvrstog tkiva | Oryan i Sahvieh, 2017; Ikada, 2006 |

2.1.2.1. PCL

PCL je linearni, hidrofobni, alifatski poliester sa širokom primjenom u tkivnom inženjerstvu, industriji hrane i dr. Karakteriziran je niskom toksičnošću, izvrsnom biokompatibilnošću i prosječnom do dugom bioadsorpcijom (biorazgradnjom) *in vivo* zbog visoke kristaličnosti (Liverani i Boccaccini, 2016). Također, posjeduje odličnu termalnu stabilnost te je FDA odobren (Siddiqui i sur., 2010). Zbog ovih je svojstava pogodan za površinske modifikacije i primjenu u kompozitima i kopolimerima čime mu se znatno može utjecati na hidrofobnost i biorazgradivost. PCL je relativno jeftin te se može prerađivati različitim tehnikama elektroispredanja, luženjem porogena, primjenom plina, FDM i separacijom faza.

Što se tiče fizikalno-kemijskih svojstava, molekularna masa poli- ϵ -kaprolaktona može varirati između 530 i 630 000 Da. Talište mu je između 59 i 64 °C, temperatura staklastog prijelaza na -60 °C i prema tome zauzima polukristaličnu strukturu. Stupanj kristaličnosti od 69 % čini ga vrlo otpornim. Pri sobnoj temperaturi, PCL je topiv u većini organskih otapala, npr. diklorometan, kloroform, metilen klorid, benzen, toluen i metanol, što je pogodno kod metoda elektroispredanja gdje se otapa u kootapalima kloroform/metanol, metilen klorid/toluen i dr. Popularan je odabir materijala za izradu nosača zbog mogućnosti uklapanja u druge materijale i mijenjanja njegovih mehaničkih, površinskih, hidrofobnih i biokompatibilnih karakteristika (kopolimeri i kompoziti) (Liverani i Boccaccini, 2016).

Mehanička svojstva PCL nosača ovise o postupku izrade, poroznosti i drugim fizikalnim parametarima, te se ona, npr. otpornost na vuču i elastičnost, mogu mijenjati promjenom poroznosti, odnosno gustoće vlakana.

Usprkos glavnom ograničenju primjene PCL-a kao nosača (hidrofobnost), on ostaje vrlo pogodan materijal za nasadivanje stanica zbog kemijske inertnosti, biokompatibilnosti i niske cijene. Duže vrijeme razgradnje (u nekim istraživanjima čak do 3 ili 4 godine) čini PCL izvrsnim sustavom za otpuštanje lijekova *in vivo*. PCL, uglavnom u formi kompozita, nalazi široku primjenu u inženjerstvu kosti (PCL i hidroksiapatit ili trikalcij fosfat), kože (PCL/poliuretan), hrskavice (četveroslojni model hitozana/PCL-a/kolagena II), živčanog tkiva (nanovlakna PCL/hondroitin sulfat), osteohondralnom inženjerstvu (fibrin/PCL i PCL, PEG-PCL i HA), kardiovaskularnom inženjerstvu (termički osjetljiv metoksi polietilen glikol/PCL), mišićno-koštanom inženjerstvu (PCL nanovlakna presvučena grafen oksidom),

regeneraciji jetre (PCL-om presvučeni PGA nosači) i dentalnoj medicini (PCL/beta kalcijev fosfat) (Siddiqui i sur., 2010).

2.1.2.2. *Svilin fibroin (SF)*

Svilini su kompoziti uvelike proučavani u posljednje vrijeme zbog njihove moguće primjene u tekstilnom inženjerstvu, biosenzorima, tkivnom inženjerstvu, biomedicini i sustavima za otpuštanje lijekova. Svilin fibroin je, uz sericin, prirodni protein koji izgrađuje 70-80 % svilenih vlakana te se primjenjuje u izradi vlakana, slojeva, spužvi i hidrogelova zbog izrazito dobrih mehaničkih svojstava, biokompatibilnosti i razgradivosti. Svilin fibroin može zauzeti četiri različite strukture: svile I, II, III i nasumičnu uzvojnica, koje znatno utječu na njegova svojstva zbog različitih udjela α uzvojnice i β nabrane ploče (Ji i Liang, 2013).

Mehanička i fizikalno-kemijska svojstva svilinog fibroina prvenstveno su rezultat strukture i svojstava jednog od gore spomenutih tipova svile. Visoki udjeli α uzvojnica rezultiraju većom čvrstoćom svile, dok je β nabrana ploča odgovorna za elastičnost. Što se tiče biorazgradivosti SF, ona ovisi o sekundarnoj strukturi proteina. Iako je vrijeme razgradnje relativno brzo u odnosu na sintetske polimere, ono nije striktno određeno te se na njega može utjecati promjenom sekundarne strukture tijekom pripremanja materijala. Osim toga, ono što ga čini zanimljivim za uporabu u svojstvu nosača stanica i implantata u tkivnom inženjerstvu je fleksibilnost, permeabilnost na vodu i kisik te lako oblikovanje u razne oblike poput vlakana, spužvi i membrana (Ikada, 2006). Pošto su razgradni produkti uglavnom amino kiseline i peptidi, biokompatibilnost svilinog fibroina neupitna je. Iako postoje sumnje kako svila može prouzročiti hipersenzitivnost, kao uzrok se ipak indicira protein sericin (Ji i Liang, 2013).

Premda je svilin fibroin adekvatan materijal u tkivnom inženjerstvu jer podržava rast stanica, diferencijaciju i intercelularnu komunikaciju, njegov se razvoj ipak okreće primjeni kompozita za dobivanje optimalnih svojstava. SF sadržava reaktivne karboksilne i amino skupine u bočnim lancima te je zbog tog podložan raznim manipulacijama svojstava. Kompozitni SF nosači dijele se u tri klase: proteinski/SF nosači, polisaharidni/SF nosači i sintetski polimerni/SF nosači. Proteinski/SF nosači kao kolagen ili keratin SF koriste se kako bi se održala normalna fiziološka funkcija nosača. Inkorporiranjem proteina uz SF može se utjecati na diferencijaciju, metabolizam i proliferaciju naciijepljenih stanica. Primjene uključuju inženjerstvo kosti i jetrenog tkiva. Polisaharidni/SF nosači uključuju primjenu

hitina, hitozana, heparina ili hijaluronske kiseline kako bi se poboljšala mehanička svojstva i permeabilnost. Primjene uključuju inženjerstvo hrskavice, vaskularnog i srčanog tkiva. Sintetski polimerni/SF kompoziti upotrebljavaju se za poboljšanje mehaničkih i fizikalno-kemijskih svojstava fibroina te se primjenjuju kod živčanih i vaskularnih tkiva, tetiva te kostiju (SF/PLLA, CL, PEO, PLGA) (Ji i Liang, 2013).

2.1.3. Primjena ekstracelularnog matriksa (ECM) za izradu nosača

ECM je heterogena, bezstanična tekuća, polutekuća ili kruta vlaknasta mreža sastavljena od polisaharida i proteina (Kim i sur., 2016). Uloga ove međustanične tvari je trojaka; strukturna (čvrstoća), zaštitna (stres) i organizacijska (vezanje, interakcije) (Slivac, 2017b). Sam ECM zapravo je sintetiziran od strane lokalnih stanica tkiva i organa te izlučen u okolinu da pruža fizikalnu i biokemijsku potporu. Upravo je iz tog razloga korišten kao materijal u TI stvarajući pogodnu regenerativnu mikrookolinu, promovirajući *in vivo* remodeliranje tkiva i djelujući kao predložak rekonstrukciji raznih tkiva i organa (kosti, srce, jetra, pluća, bubrezi itd.) (Yi i sur., 2017).

2.1.3.1. *Struktura ECM*

Komponente ECM-a su strukturni, fibrozni (kolagen, nidogen, perlekan, elastin, fibrilin i fibulin) i vezni (fibronektin, laminin, tenasin, integrin i trombospondin) glikoproteini i proteoglikani (polisaharidi glikozaminoglikani; GAG) koji tvore specifičnu 3D ultrastrukturu (Slivac, 2017b). Zbog prirode nastanka, ECM je jedinstven u građi različitim tkivima i organima, unatoč istim građevnim blokovima (Frantz i sur., 2010). Tako je, na primjer, omjer kolagena i elastina u koži 9:1, dok je u ligamentima taj omjer 1:9. U hrskavici, hondroitin sulfat (CS) je najzastupljeniji GAG koji čini 20 % ukupne suhe tvari tkiva, dok je glavni GAG u staklovini oka hijaluronat (Ikada, 2006). Prirodni se ECM sastoji od intersticijskog matriksa i bazalne membrane koja razdvaja vanjsko tkivo (epitel, mezotel i endotel) od unutarnjeg vezivnog tkiva (Yi i sur., 2017).

Glikozaminoglikani (GAG) su najrašireniji heteropolisaharidi u ljudskom tijelu i samim time vrlo su važna komponenta ECM-a. Predstavljaju linearne anionske polisaharide sastavljene od jedinica disaharida amino šećera N-acetilglukozamin (GlcNAc) ili N-acetilgalaktozamin (GalNAc) i uronske kiseline (glukuronska ili iduronska kiselina). U GAG ekstracelularnog matriksa se ubrajaju heparan/heparin sulfati, hondroitin sulfat, keratan sulfat, hijaluronska kiselina i dermatan sulfat. Nalaze se blizu površine stanice te im je uloga

vezanje signalnih molekula i zaštita stanica (Frantz i sur., 2010). Osim mehaničke čvrstoće utječu i na međustaničnu interakciju i interakciju stanica-ECM, staničnu proliferaciju i migraciju te regeneraciju i remodeliranje tkiva *in vivo*.

Od proteina ECM-a izdvajaju se kolagen i elastin, dok su od veznih glikoproteina najvažniji laminin, fibronektin i integrin. Kolagen i elastin strukturni su elementi ekstracelularnog matriksa koji formiraju makromolekulsku arhitekturu ECM-a te sudjeluju u održavanju čvrstoće, elastičnosti, izdržljivosti i regulaciji staničnih reakcija (Yi i sur., 2017). Fibronektin je drugi najzastupljeniji protein ECM-a uz kolagen. Organiziran u vlaknastu mrežu, u ECM-u se nalazi u netopivoj formi (za razliku od krvne plazme, gdje je topiv) i izlučen je iz epitelnih i mezenhimskih stanica i fibroblasta. Bogat je tripeptidom Arg-Gly-Asp (RGD) koji sudjeluje u adheziji stanica na ECM preko integrina, no osim očite uloge u vezanju, fibronektin ima funkciju u organizaciji strukture ECM-a, fagocitozi, homeostazi i proliferaciji stanica (Fernandes i sur., 2009). Za razliku od fibronektina, laminin čini dio bazalne membrane samopolimerizirajući se preko N-terminalnih domena uz povezivanje s kolagenom IV, integrinima (receptorima stanične membrane), nidogenima i perlekanom. Važnost laminina proizlazi iz njegove uloge u modulaciji staničnog ponašanja, regulaciji proliferacije, diferencijacije, migracije, adhezije i angiogeneze. Tri strukturna lanca (podjedinice) laminina, α , β i γ , tvore strukturu križa sa globularnim domenama preko kojih ulazi u interakcije s drugim molekulama. Integrini spadaju u skupinu transmembranskih proteinskih receptora, sa repom u citosolu stanice i glavom u vanstaničnom matriksu. Integrin veže ECM ligande (fibronektin, kolagen laminin i dr.) te služi kao transmembranska poveznica između okoline stanice i staničnog citoskeleta (funkcija vezanja). Osim toga, služi i kao medijator signalnih putova transmembranskih protein kinaza, provodeći signale okoline do stanice za rast, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, pa stoga utječe na rast, razvoj i popravak tkiva, angiogenezu i upalne procese (Yi i sur., 2017).

2.1.3.2. *Stabilnost ECM-a i antimikrobna svojstva*

Biološka stabilnost izrazito je važna karakteristika kako ECM-a tako i drugih nosača u TI. Brzina degradacije kritičan je i nužan korak u remodeliranju tkiva, no potreba za razgradnjom ovisi o anatomskoj poziciji nosača u tijelu (Sicari i sur., 2015). Kvantitativni testovi ¹⁴C označenih ECM nosača ukazuju na degradaciju čak 50 % njih nakon 28 dana, dok su praktički svi razgrađeni i zamijenjeni nativnim tkivom domaćina 60-90 dana od implantacije (Sicari i sur., 2015).

Identificirano je preko 70 antimikrobnih peptida izoliranih iz raznih vrsta sisavaca, vodozemaca i insekata. Čini se kako je antimikrobna aktivnost inherentno svojstvo tkiva sisavaca, posebice onih koji su u kontinuiranom kontaktu s bakterijama, koje im omogućava da odgode, smanje ili izbjegnu mikroinfekcije kože, crijeva i usne šupljine. Sarinkaya i sur. uspješno su dokazali antimikrobna svojstva komponenata ECM nosača (derivata tankog crijeva, mjehura i jetre) na Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama (Sarinkaya i sur., 2002). Od velikog je značaja za kliničku primjenu postojana rezistentnost ECM nosača na mikroorganizme uslijed njegove razgradnje. Badylak i sur. dokazali su ovu rezistentnost implantiranjem sintetskih ili prirodnih aortnih presadaka zaraženih mikroorganizmom *S. aureus* u pse. 30 dana od ugradnje, psi s ugrađenim sintetskim presadcima još su uvijek pokazivali znakove infekcije bakterijom, dok su psi s prirodnim presadcima bili zdravi. (Badylak i sur., 1994).

2.2. STRATEGIJE U IZRADI NOSAČA

Generalno gledano, izrada nosača stanica podrazumijeva dva različita pristupa; 'bottom-up' (*hrv.* odozdo prema gore) i 'top-down' (*hrv.* odozgo prema dolje). Dok 'top-down' pristup uključuje naciepljivanje stanica na prethodno dizajniran porozni nosač (i naknadno formiranje tkiva proliferacijom i diferencijacijom stanica), on potencijalno može predstavljati ograničenja u vidu vaskularizacije, difuzije tvari, nejednolikog rasta i niske gustoće rasta. S druge strane, pristup 'bottom-up' omogućava formiranje većih, detaljnijih konstrukcija spajanjem većeg broja manjih naciepljenih modula. Teoretski, ovdje difuzija ne igra ulogu i potencijalno je time poboljšan rast tkiva (Slivac, 2018). Neovisno o pristupu, podrazumijeva se da je svaki nosač koji se primjenjuje u tkivnom inženjerstvu ponajprije biokompatibilan (ne izaziva oštećenja, niti je imunogen), odnosno izaziva prigodnu reakciju domaćina na namijenjenu primjenu. Biorazgradivost je druga važna karakteristika, koja dozvoljava tijelu da se riješi 'stranog tijela' i omogućava novoformiranom tkivu da ispuni prostor i zadaću implantata. Funkcije novog tkiva u velikoj mjeri ovise o mehaničkim naprezanjima nosača *in vivo*, stoga je bitno da se mehanička svojstva nosača prilagode onima nativnog tkiva. Prilikom proizvodnje nosača treba imati na umu da molekulsko okruženje materijala direktno i indirektno utječe na okolna tkiva (adicija funkcionalnih skupina na nosač za modeliranje interakcija). Slično tome, već je spomenuto kako je 3D struktura jedna od ključnih stavki osiguravanja funkcije regeneriranih tkiva te se sve više i više koristi za preinačenje tkivne

anizotropije. Između ostalog, važno je uzeti u obzir i proizvodnu cijenu te vijabilnost tijekom proizvodnog procesa (Viera i sur., 2019). Neke od tehnika proizvodnje opisane su u tablici 2.

2.2.1. Elektroispredanje

Može se reći kako je elektroispredanje tehnika posuđena iz polja tekstilnog inženjerstva, te u današnjici predstavlja najprimijenjeniju tehniku u tkivnom inženjerstvu. Osnova metode je stvaranje električnog polja između otopine polimera (pozitivno nabijen) koji se kontroliranim tokom, pomoću igle, nanosi na kolektor (negativno nabijen) u obliku tankih vlakana.

Kada se polimerna otopina stavi pod napon određene jačine, dolazi do stvaranja kapljice na vrhu igle koja se nabija pozitivnim nabojem zbog utjecaja električnog polja. Povećanjem intenziteta električnog polja kapljica se deformira i isteže prema van te zauzima oblik tzv. Taylorovog konusa. Kao rezultat različitog naboja kapljice polimera i kolektora (nasuprot igli) stvaraju se elektrostatska odbijanja suprotna sili površinske napetosti fluida. Kako se ova odbijanja povećavaju uslijed povećanja razlike naboja, ona postaju veća od sile površinske napetosti polimera te se Taylorov konus i dalje isteže, postaje nestabilan i odvaja u obliku mlaza s površine igle. Kako otapalo isparava i polimer se depozitira na površinu kolektora, formiraju se polimerna vlakna nasumičnog usmjerenja (Zdraveva, 2016).

Unatoč velikoj poroznosti, veličina dobivenih pora je manja u usporedbi s npr. sinteriranjem, što nije nužno i mana. Manja veličina pora dozvoljava uporabu kod membrana poput krvnih žila, gdje je potrebno sav materijal (stanice) zadržati unutar određene strukture. Tehnika je izrazito varijabilna u stvaranju različitih nosača. Promjenom koncentracije, odabira otapala, protoka, vlažnosti, razlike napona, dimenzije mlaznice (igle), udaljenosti između mlaznice i kolektora te reljefa kolektora može se manipulirati debljinom vlakana, debljinom nastalog materijala i njegovim oblikom. Promjenom tih parametara utječe se i na količinu rezidualnog otapala prisutnog u nosaču, koji utječe na jačinu veza između vlakana. Primjenom ventilatora i pokretnog kolektora (npr. rotirajući bubanj) dobiva se jednolična debljina nosača (Viera i sur., 2019). Materijali ispredani ovom tehnikom nalaze široku uporabu u područjima namjene poput pohrane energije, senzora, filtracije, katalizatora, tkivnog inženjerstva i dr. (Zdraveva, 2016).

Tablica 2. Tehnike izrade nosača stanica

| Metoda | Opis | Prednosti | Nedostaci | Izvori |
|--|--|---|--|---|
| Oblikovanje polimera otapalima/luženje porogena (eng. SCPL) | Lijevanje otopine polimera u kalupe s kristalima soli kao porogenom | 3D porozna struktura, jednostavnost, jeftinoća, preciznost kontrole veličine pora i stupnja poroznosti | Nepravilno oblikovane pore, loša međupovezanost pora i tanka struktura | Siddiqui i sur., 2018; Viera i sur., 2019 |
| Separacija faza | Razdjeljivanje termički nestabilnog polimera na polimerno bogatu (vanjska površina) i polimerno siromašnu regiju (pore i potporne strukture unutar nosača) | Dobra poroznost (>90 %), umjerena kontrola procesa u smislu rasporeda i veličine pora, mogućnost inkorporacije bioaktivnih molekula | Dugo vrijeme pripreme, velika potrošnja energije, moguća citotoksičnost otapala, neadekvatna rezolucija nosača | Ikada, 2006; Elton i sur., 2019; Viera i sur., 2019 |
| Izrada pjena-primjena plina (eng. Gas foaming) | Postupak lijevanja otopine polimera primjenom plina koji služi kao porogen | Nedostatak otapala, raznovrsnost dobivenih oblika | Nepravilna poroznost i loša međupovezanost pora | Elton i sur., 2019; Viera i sur., 2019 |
| Aditivna proizvodnja-3D bioispis | Proizvodnja 3D oblika prostorno kontroliranim lijepljenjem materijala sloj po sloj pomoću 3D bioprintera | Nema toksičnih komponenata, jednostavnost, mogućnost promjene mehaničkih svojstava, celularni ili acelularni ispis | Zaostaci materijala korištenog za ispis, zahtjevno za programiranje, skupo, niža vijabilnost stanica | Murphy i Atala, 2014; Siddiqui i sur., 2018 |

2.2.2. Procesi pripreme ekstracelularnog matriksa – decelularizacija

Svako tkivo i organ sastavljeni su od vanstaničnog matriksa na koji su povezane stanice. Prije nego što se nativno tkivo može koristiti kao nosač stanica u TI, ono prolazi kroz proces fizičke i kemijske pripreme zvan decelularizacija. Decelularizacija je proces izolacije ECM-a, odnosno proces uklanjanja stanica i staničnog sadržaja sa njihovih veznih molekula (integrina) i drugih ekstracelularnih ligandnih kompleksa s ciljem očuvanja sastava, mikrostrukture i mehaničkih svojstava te prirodno prisutnih polisaharida i proteina u okolini (biološka aktivnost). Tip tkiva za izradu ECM nosača, vrsta iz koje je izolirano, metoda decelularizacije i naknadna sterilizacija uvelike variraju. Dok su antigeni epitopi asocirani sa staničnim membranama i intracelularnim komponentama tkiva glavni razlog štetnih (za nosač) imunoloških reakcija domaćina izazvanih ksenogeničnim i alogeničnim tkivnim nosačima, komponente ECM-a generalno su tolerirane od strane pacijenta (Badylak i sur., 2012). Dakle, primjeren materijal za nosač (koji potiče od ECM-a ili je ECM) potrebno je predobraditi kako bi se uklonio stanični materijal ili kemijski umrežiti (*crosslinking*) kako bi se onemogućilo djelovanje prisutnih antigena. Predobrada materijala, odnosno decelularizacija ECM-a uglavnom započinje razaranjem stanične membrane izlaganjem tkiva ionskoj otopini, razdvajanjem staničnih komponenta primjenom enzima (tripsin i nukleaze), zatim otapanjem citoplazmatskog sadržaja i jezgrinih komponenta upotrebom detergenta (najčešće) kao natrij dodecilsulfat (SDS), natrij deoksikolat i Triton™ X-100 i u konačnici uklanjanjem staničnih ostataka od ECM-a (Badylak i sur., 2012, Sicari i sur., 2015). Ovi se procesi mogu kombinirati sa fizikalnim, kemijskim i enzimskim postupcima kako bi se povećao učinak predobrade. Fizikalni procesi decelularizacije uključuju sonikaciju, cikluse zamrzavanja i odmrzavanja, struganje ili miješanje. Pod kemijske postupke spadaju tretman kiselinske i lužnate obrade (ujedno i sterilizacija) kao i uporaba detergenata, dok enzimske podrazumijevaju uporabu gore navedenih enzima. Procesi nakon decelularizacije uključuju ispiranje zaostalih sredstava od predobrade i staničnog materijala te sterilizaciju decelulariziranog materijala koja se provodi, između ostalog, radijacijom (gama radijacija i snopovima elektrona) i izlaganju etilen oksidu (ETO). Uvjeti koje decelularizirani matriks mora zadovoljiti su: 1. odsustvo staničnih jezgara (histološki testovi i kemijski testovi bojanja), 2. ukupna količina dvolančane DNA mora biti manja od 50 ng mg⁻¹, 3. ostaci DNA zaostali u ECM-u nakon decelularizacije moraju biti kraći od 200 parova baza (Sicari i sur., 2015).

Slijedeći decelularizaciju, ECM može poprimiti razne oblike i veličine (skuplja se prilikom predobrade). Krajnji rezultat zapravo ovisi ne samo o postupku predobrade, već i o strukturi primijenjenog tkiva, njegovoj masi i veličini. U pokušaju poboljšanja procesa predobrade neka se tkiva (tanko crijevo ili mokraćni mjehur) prevode u formu lista što može rezultirati neadekvatnim mehaničkim svojstva i 3D morfologiji nakon decelularizacije. Druga tkiva, poput organa (srce, jetra i bubrezi) posebice nije moguće manipulirati na ovaj način te su se u tu svrhu razvili postupci perfuzijske decelularizacije (pumpanje otopina detergenata kroz krvožilni sustav organa) koje su se pokazale kao naročito uspješne u održavanju trodimenzionalne strukture i biokemijskog sastava tkiva koje otvaraju put kompleksnijem inženjerstvu organa.

Međutim, unatoč nastojima da se održe spomenute karakteristike, procesi decelularizacije ipak imaju posljedice na strukturu tkiva. Dokazano je da primjena detergenata može poremetiti strukturu kolagena određenog tipa u nekim tkivima što smanjuje mehaničku robusnost nosača. S druge strane odstranjivanje glikozaminoglikana (GAG) iz nosača trajno oštećuje viskoelastična svojstva (Badylak i sur., 2012).

2.3. STANIČNA KULTURA HELA

HeLa stanice su besmrtna, kontinuirano kultivirana linija ljudskih stanica raka maternice. Dobivši ime po pacijentici Henrietti Lacks, koja je bolovala od adenokarcinoma cerviksa, ove se stanice uzgajaju u laboratorijskim uvjetima već 68 godina. Uzgoj jedne stanične linije omogućen je besmrtnošću stanica, odnosno njihovoj mogućnosti da se dijele beskonačan broj puta (u vrlo određenim laboratorijskim uvjetima). Iako je taj broj zapravo 40-50 puta u većini istraživanja, ipak je višestruko puta veći od normalnih somatskih stanica koje preživljavaju tek nekoliko generacija (Waikel, 2019).

Uporaba HeLa stanica se počela širiti u znanosti kada su prvi puta upotrijebljene za testiranje cjepiva za dječju paralizu (poliomijelitis). Od tada služe kao jedan od glavnih ljudskih staničnih modela, te samo nižu uporabu u istraživanjima AIDS-a, raka, radijacije, testovima toksičnosti, tuberkuloze, salmonele i dr. (del Carpio, 2014). Tri glavne karakteristike HeLa stanica su kancerogenost, besmrtnost i brzi rast. Kao i druge tumorske stanice, HeLa stanice sadržavaju mnogobrojne mutacije u svom genomu te se broj kromosoma kod njih penje na 76-80 (ovisno o soju), dok je kod normalnih somatskih stanica to 46 kromosoma (Bottomley i sur., 1969). Razlog tome je inaktivnost proteina p53 koji štiti genom stanice od mutacija i tumora. Besmrtnost stanica osigurana je aktivnim enzimom koji obnavlja telomeraze nakon dijeljenja stanice omogućujući tako neograničenu diobu. Izrazito

brzi rast HeLa stanica, čak i za rak, objašnjava se činjenicom da je H. Lacks imala sifilis i HPV čija prisutnost suzbija imunitet te dozvoljava brzi rast (stanični ciklus traje otprilike 22 h) (Anonymous 1, 2019).

Osim toga, besmrtnost stanica omogućava istraživačima da rade eksperimente na identičnim klonovima, što je izrazito važno. Također, HeLa stanice su poznate po svojoj agresivnosti i relativnoj robusnosti te lako mogu kontaminirati ostale stanične linije. Unatoč njihovim prednostima pred drugim staničnim kulturama, treba imati na umu da su, kao i druge stanice, ipak osjetljive na promjene uvjeta uzgoja (Anonymous 2, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Tablica 3. Sirovine korištene u istraživanju

| Sirovine | Proizvođač |
|-----------------------|---|
| Polikaprolakton (PCL) | Lach-Ner, Češka |
| Svileni fibroin (SF) | Huzhou Xintiansi Bio-tech Co. Ltd, Kina |
| Svinjska jetra (ECM) | lokalni dobavljač |

Tablica 4. Podrijetlo kemikalija i stanica korištenih u istraživanju

| Kemikalije i stanice | Proizvođač |
|--|---|
| HeLa stanična linija | ATCC-CCL2, SAD |
| Fetalni teleći serum (FBS) | Sigma Aldrich, SAD |
| Antibiotik Antimikotik Otopina (100x), Stabilized | Sigma Aldrich, SAD |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Capricorn Scientific, Njemačka |
| Fluorescein diacetat (FDA) | Sigma Aldrich, SAD |
| 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5- difenil-tetrazolijev bromid (MTT) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Tripan plavo, bojilo 0,4 % | Gibco, SAD |
| Tripsin-EDTA | Sigma Aldrich, SAD |
| Dimetil sulfoksid (DMSO) | Carlo Erba Reagents, Španjolska |
| Deionizirana voda | Laboratorij za BI, IM i TSP, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb |
| Etanolni alkohol, 96 % (EtOH) | Kefo, Slovenija |
| Fosfatni pufer (PBS) | Gibco, SAD |
| Triton™ X-100 | PanReac AppliChem, Njemačka |
| Aceton | Sigma-Aldrich, SAD |
| Ledena octena kiselina | Sigma-Aldrich, SAD |

| | |
|---|---|
| Amonijev hidroksid (NH ₄ OH), 14 mol L ⁻¹ | Merck, Njemačka |
| TurboFect™ | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| pcDNA3.1-His-mCherry v1 1 mg mL ⁻¹ | Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb |

Tablica 5. Instrumenti korišteni u istraživanju

| Aparatura i pribor | Proizvođač |
|--|--|
| Neubauerova komorica | Assistant, Bright - Line, Njemačka |
| Vibromikser | MRC Scientific instruments, Izrael |
| Uređaj za elektroispredanje | NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea |
| CO ₂ inkubator stanica ICO105 | Memmert, Njemačka |
| Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) | SEM FEG QUANTA 250 FEI, Thermo Scientific, SAD |
| Inverzni svjetlosni mikroskop | Zeiss, Njemačka |
| Inverzni fluorescentni mikroskop | Fluoid Cell Imaging Station, Life Sciences |
| Svjetlosni mikroskop | Zeiss, Njemačka |

Tablica 6. Sva dodatna korištena oprema

| Ostala oprema i pribor |
|---------------------------------------|
| Falcon epruvete |
| Špatula |
| Petrijeve zdjelice |
| Pinceta |
| Stanične ploče s 24, 12 i 6 jažica |
| Laboratorijske čaše |
| Led |
| Kirurški skalpel i škare |
| Stiroporna kutija |
| Mehaničke pipete |
| Program za obradu slika <i>ImageJ</i> |

3.1.1. Izrada PCL i ECM nosača

U svrhu eksperimenta uzeto je u obzir nekoliko vrsti materijala: polikaprolakton (PCL), svilin fibroin (SF) i ekstracelularni matriks svinjske jetre (ECM). Ovim materijalima pripremljena su tri nosača stanica za usporedbu: homopolimerni čisti PCL (100 % PCL), kompozitni polimer svilinog fibroina i PCL-a (70 % PCL i 30 % SF) te prirodni nosač, ECM. Prva dva nosača izrađena su na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u Zagrebu metodom elektroispredanja, dok je ECM dobiven denaturacijom svinjske jetre.

3.1.1.1. PCL

Sirovine korištene u procesu elektroispredanja uključivale su čisti PCL ($M_r = 80\,000$ Da), SF prah te otapala ledenu octenu kiselinu i aceton. Nosači od čistog PCL-a pripremljeni su otapanjem polikaprolaktona u otopini acetona i ledene octene kiseline (v/v omjera 2:8) do 18 %-tne otopine (w/w) uz konstantno miješanje na vibromikseru kroz 24 h. Kompozitni nosač priređen je otapanjem fibroina u koncentraciji do 30 % ukupne otopljene mase polimera PCL uz neprekidno miješanje i grijanje na 50 °C kroz nekoliko sati. Proces elektroispredanja polimernih nosača rađen je na uređaju za elektroispredanje marke NTSEE uz parametre struje 15-17 kV, udaljenosti igle od kolektora 18 cm, volumnim protokom od 1 mL h⁻¹ i vremenom ispredanja od 4 sata. U procesu je korištena plastična igla tupog vrha veličine 21G (0,8 x 40 mm). Ispredeni polimer sakupljao se na cilindričnom kolektoru presvučenom aluminijskom folijom. Kako bi se osigurala konzistentnost eksperimenta, polimer je izrezan na diskove promjera 8 mm (odgovara promjeru jažice na ploči s 24 jažice). Velika pažnja pridavala se izbjegavanju oštećenja materijala i očuvanju reljefa, stoga su za ovaj korak korištene kirurške škare i pinceta. Prilikom rezanja diskovi su stavljani u individualne jažice sa 70 %-tnim EtOH. Prije uporabe premješteni su pincetom u sterilnu ploču gdje su sterilizirani 24 sata prije inokulacije, u 70 %-tnom EtOH. Trideset minuta prije nacjepljivanja PCL diskovi su sterilizirani dodatno pod UV svjetlom laminara, premješteni u novu ploču te isprani fosfatnim puferom kako bi se uklonio etanol. Neposredno prije inokulacije kondicionirani su u DMEM mediju sa serumom, u inkubatoru.



Slika 2. PCL dobiven elektroispredanjem (lijevo) i uređaj za elektroispredanje NT-ESS-300 (desno), Tekstilno-tehnološki fakultet (Ivančić, 2018).

3.1.1.2. *ECM*

ECM nosači stanica izrađeni su od svježe svinjske jetre prateći standardni protokol za decelularizaciju s ne-ionskim detergentima. Cijela svinjska jetra izrezana je na komade u svrhu bržeg smrzavanja te zamrznuta u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 24 sata, radi lakšeg rezanja. Koristeći metalni rezač za meso, smrznuta jetra narezana je na listove debljine 2 mm te je ponovo zamrznuta. Komadi jetre bez oštećenja razrezani su na kvadrate veličine 2 cm koristeći kirurški skalpel. Isušivanje razrezane jetre spriječeno je namakanjem kvadrata u Petrijevoj zdjelici s deioniziranom vodom. Otopina za decelularizaciju pripravljena je otapanjem, u laboratorijskoj čaši od 1 L, 10 mL hladnog detergenta Triton™ X-100 (koristeći vibromikser) u 300 mL deionizirane vode s dodatkom 1 mL, 14 mol L^{-1} lužine NH_4OH . Radi postizanja boljih rezultata, omjer količine jetre i otopine za decelularizaciju održan je na 1:10, odnosno 1 kvadrat jetre na 10 mL otopine (30 komada po boci). Čaše s komadima jetre postavljene su u kutiju od stiropora, na tresilicu pri 200 rpm. Temperatura se održavala na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću ledenih obloga. Proces decelularizacije odvijao se tijekom dva dana, pri čemu se otopina Tritona mijenjala u slijedećim intervalima: nakon 1 h, 2 h, 4 h te preko noći, pri čem se drugi dan mijenjala svakih 8 sati uz ispiranje između zamjena. Treći dan, otopina za decelularizaciju zamijenjena je istom količinom deionizirane vode, s dodatkom 1 % (v/v) antibiotika, za ispiranje i sterilizaciju jetre, uz periodičnu zamjenu vode. Decelularizirani nosači čuvani su na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u Falcon epruveti u 70 %-tnom EtOH.

Prije nacjepljivanja nosači su premješteni u sterilnu ploču (24 jažice) pincetom gdje su sterilizirani 24 sata prije inokulacije u 70 %-tnom EtOH. Trideset minuta prije nacjepljivanja ECM kvadrati su dodatno sterilizirani pod UV svjetlom laminara, premješteni na novu ploču te isprani fosfatnim puferom kako bi se uklonio etanol. Neposredno prije inokulacije kondicionirani su u DMEM mediju sa serumom, u inkubatoru.



Slika 3. Decelularirani (lijevo) i kondicionirani ECM (desno) (Ivančić, 2018).



Slika 4. Svinjska jetra prije (lijevo) i nakon (desno) decelularizacije (Ivančić, 2018).

3.1.2. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)

Reljef PCL i ECM nosača promatran je pod skenirajućim elektronskim mikroskopom.

Prije promatranja strukture, tanki sloj Au/Pd raspršivao se preko površine nosača u trajanju od 15 sekundi. Svrha ovog sloja je da omogući električnu provodljivost i generira sekundarne elektrone koji se detektiraju na detektoru. Emisija sekundarnih elektrona detektirana je ETD (Everhart–Thornley) detektorom u visokom vakuumu i prevedena u sliku. Povećanje mikroskopa iznosilo je 1000x.

3.1.3. Uzgoj stanične linije i pasažiranje

U svrhu ovog eksperimenta upotrijebljene su eukariotske stanice raka grlića maternice, HeLa stanična linija karakteristične robusnosti i relativno velike brzine rasta. Tijekom eksperimenta, stanice su uzgajane u Petrijevim zdjelicama i T-bocama u DMEM mediju s 10 % fetalnog telećeg seruma i 1 % antibiotika. Kultura stanica inkubirana je na 37 °C u CO₂ inkubatoru. Pasažiranje je rađeno uklanjanjem medija te ispiranjem stanica s PBS-om (fosfatni pufer) nakon čega je korišten enzim tripsin za odvajanje stanica od podloge. Odvajanje stanica pratilo se pod inverznim svjetlosnim mikroskopom te se odvojena suspenzija stanica primjećuje kao zamućenje dna laboratorijske posude u kojoj je uzgoj vršen. Kada su stanice odvojene, dodaje se 2-3 puta više medija nego što je dodano tripsina kako bi se enzim inaktivirao ionima metala prisutnim u DMEM mediju. Takvoj se suspenziji stanica određuje koncentracija metodom tripan plavo u Neubauerovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Postupak brojanja stanica bojom tripan plavo sastoji se od miješanja jednakih volumena bojila tripan plavo i homogenizirane suspenzije stanica te brojanja obojanih, plavih stanica (žive stanice) u mrežici hematocitometra. Nakon brojanja samo živih stanica u sva četiri kvadrata Neubauerove komorice računa se ukupan zbroj stanica koji se množi sa 5000 (broj dobiven kada se uključi volumen komorice i razrjeđenje). Nakon izračuna, koncentracija stanica je razrjeđivanja na željenu koncentraciju svježim medijem i alikvot se prenosio u novu zdjelicu za inkubaciju ili se takva koncentracija koristila za eksperimente. Formula za izračun koncentracije stanica prikazana je niže.

koncentracija stanica = ukupan zbroj stanica u 4 kvadrata · 5000 (st mL⁻¹)

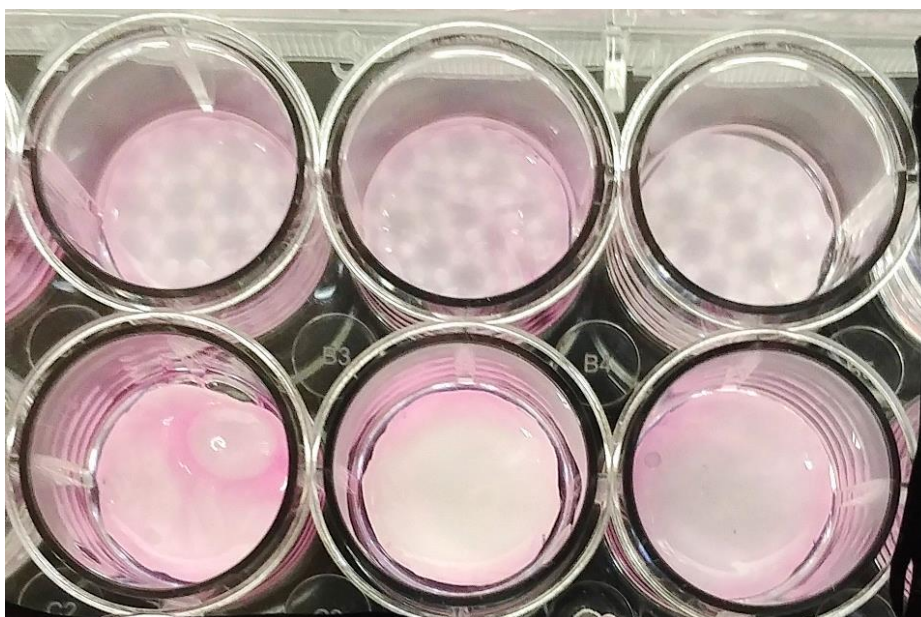


Slika 5. Neubauerova komorica (lijevo) i uvećani prikaz mrežice za brojanje stanica (desno) (Anonymous 3, 2019; Barbedo, 2013).

3.1.4. Priprema inokuluma i naciepljivanje staničnih nosača

Priprema inokuluma za naciepljivanje staničnih nosača započela je prethodno opisanim postupkom određivanja koncentracije stanica poraslih u T-boci. Nakon prikupljanja suspenzije stanica iz boce koristeći tripsin, u Falcon epruvetama priređena je koncentracija stanica od 100 000 st mL⁻¹ (stanica po mililitru) razrjeđivanjem originalne suspenzije. Naciepljivanju svakog staničnog nosača u staničnim pločama prethodila je homogenizacija inokuluma te se suspenzija vrlo polagano ispuštala iz mehaničke pipete pri čemu se vodilo računa o tome da suspenzija bude što ravnomjernije raspoređena po nosaču. Volumen suspenzije ovisio je o željenoj početnoj koncentraciji naciepljenih stanica te o načinu naciepljivanja (statički i dinamički). Inokulirane stanične ploče premještene su u inkubator na 6 h kako bi se stanice prihvatile za površinu. Statička stanična inokulacija podrazumijeva naciepljivanje stanica na nosače u pločama te minimiziranje manipulacija s njima (kako bi se mogućnost ispiranja stanica sa nosača smanjila na najmanju moguću mjeru), odnosno mirovanje nosača tijekom cijelog eksperimenta. Dinamička inokulacija rađena je prebacivanjem stanične ploče na tresilicu namještenu na 75 okretaja po minuti (*rpm*) tijekom perioda inkubacije. Broj okretaja potrebno je namjestiti tako da medij polako kružnim pokretima oplahuje stijenke jažice. Teoretski, miješanje nosača ne bi smjelo utjecati na stanice na način da ih ispiru, te ovakav postupak osigurava ravnomjerno naciepljivanje cijelog nosača bez elementa ljudske pogreške. Također, kako bi se povećala učinkovitost, dinamičko naciepljivanje rađeno je u većim jažicama nego statičko s korekcijom naciepljenog volumena zbog koncentracije stanica.

Po završetku perioda inkubacije, nosači sa prihvaćenim stanicama premješteni su pomoću sterilne pincete i špatule na novu ploču sa 24 jažice. Svakoj jažici dodano je 0,5 mL svježe pripremljenog medija zagrijanog na 37 °C te je dinamika uzgoja praćena redovito zbog potrebe za promjenom medija. Medij je potrebno ispuštati polagano po stjenci jažice kako bi se smanjilo nepotrebno kretanje nosača. Tijekom prva četiri dana od nacjepljivanja nosača, medij je mijenjan jednom na dan, dok je kasnije povećan broj zamjena medija na dvije po danu. Daljnji uzgoj stanica odvijao se u inkubatoru u strogo statičkim uvjetima. Ovakav način osiguravao je mogućnost usporedbe biokompatibilnosti nosača u slijedećim karakteristikama: učinkovitost prihvaćanja stanica, rast i raspršenost stanica te učinkovitost transfekcije.



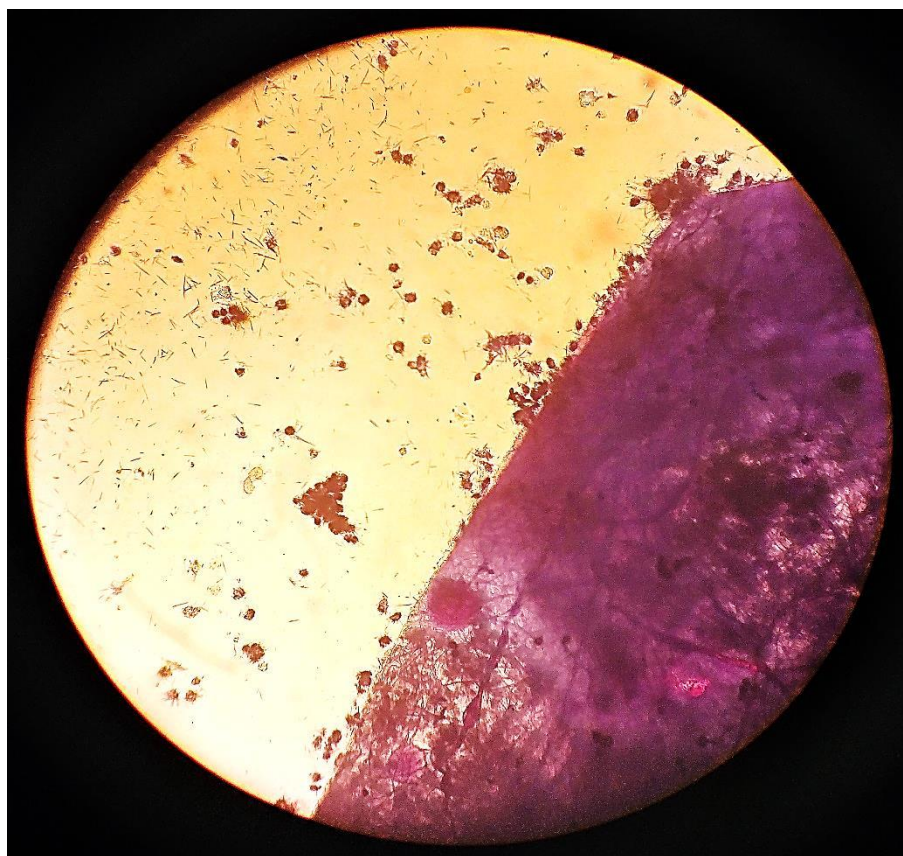
Slika 6. Nacijepljeni nosači PCL-SF (Ivančić, 2018).

3.1.5. Praćenje rasta i određivanje učinkovitosti prihvaćanja stanica na nosač MTT testom

Parametri rasta i prihvaćanja stanica mjereni su standardnim indirektnim MTT testom primjene 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijeva bromida. Princip metode bazira se na redukciji tetrazolijeve soli pri čemu nastaje ljubičasta boja. MTT je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri metabolička aktivnost mitohondrija mjerenjem stupnja redukcije (intenziteta obojenja) žute topive MTT tetrazolijeve soli u tamno plavi (ljubičasti) netopivi kristalični formazan (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Obojenje je moguće pratiti iz razloga što su kristali plavog formazana topivi u organskim otapalima te je u tu svrhu korišten dimetil sulfoksid (DMSO). Intenzitet obojenja, i dakle mitohondrijske aktivnosti, mjeri se spektrofotometrom na 570 nm.

Prvi MTT test za mjerenje prihvaćanja stanica rađen je 6 sati nakon naciepljivanja nosača. Testirani nosači su premješteni u sterilnu ploču i svaki je tretiran sa 1 mL reagensa koji se sastojao od 5 % otopine MTT i ostatka DMEM medija bez PBS pufera. Inkubacija je vršena na 37 °C 4 h kako bi došlo do redukcije. Nakon toga, reagens je zamijenjen s 2 mL otapala DMSO i cijela ploča je premještena na tresilicu na 15 minuta. Ovime se postiglo bolje otapanje kristala formazana. Apsorbancija otopine mjerena je na 570 nm, a rezultat je izražen kao postotak prihvaćenih stanica na nosače u odnosu na stanice prihvaćene u jažice bez nosača. Čisti, bezbojni DMSO služio je kao slijepa proba.

Dinamika rasta stanica praćena je MTT testom u periodima od 48, 96 i 144 sati nakon naciepljivanja. Po četverosatnoj inkubaciji u MTT reagensu, nosači su tretirani sa 10 mL DMSO, pri sobnoj temperaturi, na tresilici. Apsorbancija je mjerena na 570 nm, a kao kontrola je služio nenaciepljeni nosač.



Slika 7. MTT test na naciepljenom PCL nosaču. Kristali formazana vidljivi su pod svjetlosnim mikroskopom (Ivančić, 2018).

3.1.6. Praćenje prisutnosti stanica na nosačima fluorescentnim bojanjem

Fluorescentno bojilo fluorescein diacetat (FDA) korišten je za fizičko promatranje stanica na nosačima PCL i ECM. FDA se može upotrebljavati u procjeni vijabilnosti stanica. Ova tehnika bojanja dozvoljava razlikovanje živih stanica od mrtvih prema slijedećem principu. Fluorescein diacetat u kontaktu sa stanicama prodire u njih te se prevodi iz nefluorescentnog FDA u zeleni fluorescentni metabolit fluorescein koji boji čitav citosol stanice kad je eksitiran plavim svjetlom na 490 nm. Ova reakcija je pod regulacijom enzima esteraze, što indicira na živu stanicu. S druge strane, kod mrtvih stanica, esteraza više nije aktivna te se stanica ne boji. Protokol za bojanje stanica sa FDA preuzet je sa stranica Ibidi® cells in focus (Ibidi®, 2015).

FDA otopina pripremljena je otapanjem 5 mg FDA u 1 mL acetona i čuvana na -20 °C u neprozirnom originalnom pakiranju umotanom u foliju. Priprema radne otopine rađena je prema tablici (volumeni su podešeni prema potrebnoj količini krajnje otopine).

Tablica 7. FDA/PI otopina za bojanje (Ibidi®, 2015)

| Komponenta | Volumen |
|--|---------|
| DMEM medij bez seruma | 5 mL |
| Fluorescein diacetat 5 mg mL ⁻¹ | 8 μL |

Prethodno uzgojenim stanicama na nosačima i jažicama (kontrola) izvađen je medij te je dodan 1 mL radne otopine FDA. Ovakve su stanice inkubirane na 37 °C 5 minuta. Potom je radna otopina zamijenjena PBS-om, za ispiranje, nakon čega se promatrao rezultat na inverznom fluorescentnom mikroskopu pod plavim svjetlom na 490 nm.

3.1.7. Transfekcija s pcDNA3.1-His-mCherry v1

Stanice su transfektirane plazmidnom DNA pcDNA 3.1-His-mCherry v1 (6014 bp). Ovaj konstrukt sadržavao je mCherry reporter gen pod regulacijom CMV promotora (citomegalovirus), te gene za rezistenciju na ampicilin, neomicin i kanamicin (ampR, neoR/kanR) za selekciju stabilnih staničnih linija. TurboFect™ transfekcijski reagens korišten je za transfekciju *in vitro*. Princip transfekcije bazira se na reakciji kationskog polimera s DNA pri čem se tvori stabilni, kompaktni, pozitivno nabijeni kompleks. U ovakvom stanju olakšan je unos pDNA u HeLa stanice.

Procedura za transfekciju stanica rađena je prema uputama Thermo Scientific protokola za transfekciju TurboFect™-om (Thermo Fisher Scientific, 2018). Korištene koncentracije stanica iznosile su 50 000 (za kontrolu) i 200 000 (za nosače) stanica po jažici te se inokulacija vršila tri dana prije transfekcije. Razlog primjene različitih koncentracija stanica je teže prihvaćanje stanica na nosače nego na površinu jažice. Transfekcija je rađena u staničnim pločama sa 24 jažice. Plazmidna DNA (mCherry) pripremljena je razrjeđivanjem suspenzije DNA u PBS puferu do koncentracije od 1 % v/v (1 mg mL⁻¹). Radnu i matičnu je suspenziju prije svake manipulacije potrebno lagano promiješati mehaničkom pipetom da se pDNA ne slegne. Transfekcijski reagens TurboFect™ dodan je suspenziji DNA u fosfatnom puferu u omjeru s DNA 1:5 (5x više reagensa nego mCherry plazmida) i inkubiran 25 minuta na 37 °C. U svaku jažicu otpipetirano je 100 µL radne suspenzije (ukupni volumen u jažici iznosio je 1,1 mL) i lagano promiješano kružnim pokretima. Inkubacija transfektanata odvijala se na 37 °C stupnjeva 4 sata, nakon čega su nosači premješteni u nove ploče s redovnim promjenama medija kroz dva dana.

Učinkovitost transfekcije praćena je pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa 48 sati nakon transfekcije. Žuto-želenim svjetlom (560 nm) obasjana je ploča s jasno vidljivim transfektantima pri povećanju od 400x. Također, kako bi se odredila vijabilnost takvih stanica, nosači su tretirani fluorescein diacetatom netom prije mikroskopije. Ovaj je korak dodatno olakšavao uočavanje živih stanica na neprozirnim nosačima. Kvantifikacija fluorescentnih stanica (transfektanti iskazuju i crvenu i zelenu fluorescenciju) rađena je sa slika stanica pomoću programa za obradu slika *ImageJ*. Kao uzorak uzeto je 10 nasumičnih pozicija na nosaču, odnosno jažici. Učinkovitost je određena kao postotak crvenih fluorescirajućih stanica (koje ekspimiraju RFP- red fluorescent protein) naspram broja vijabilnih stanica (ukupni broj zelenih i crvenih fluorescirajućih stanica). Formula za izračun učinkovitosti transfekcije prikazana je niže.

$$\text{uspješnost transfekcije} = \frac{N_{\text{crvene}}}{(N_{\text{crvene}} + N_{\text{zelene}})} \times 100 (\%)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Važnost istraživanja provedenih na različitim nosačima stanica očituje se u njihovoj sveobuhvatnoj primjeni u terapiji pacijenata kojima je potrebno liječenje na razini zamjene ili obnove tkiva ili čak cijelih organa. Veliko zanimanje za različitim postupcima proizvodnje, kao i tipovima materijala, dovelo je do razvoja biološki kompatibilnih nosača. Ovi nosači ciljano su napravljeni da oponašaju prirodnu okolinu te svojstva tkiva i organa. Iz ovih razloga slijedi da moraju pokazivati određene karakteristike poput biokompatibilnosti, biorazgradivosti, kompleksnosti strukture te mehaničke čvrstoće. Zbog nedostataka klasičnih nosača, poput nemogućnosti modifikacije strukture i održavanja prokrvljenosti, materijali dobiveni iz ECM-a nativnih tkiva predstavljaju adekvatnu zamjenu za njih (Jones, 2005). Nadalje, u pogledu biokompatibilnosti, potrebne manipulacije nosača (ugradnja faktora rasta ili nekih lijekova) moguće su ukoliko struktura takvih nosača dozvoljava njihovo dugoročno otpuštanje. Tehnika elektroispredanja preuzima sve više pozornosti kao budućnost izrade nosača iz prirodnih polimera. Pošto je bazirana na depoziciji vlakana polimera s visokom rezolucijom, dozvoljava mimiku strukture prirodnih ECM materijala na mikro i nano razini. Takva razina oponašanja tkiva omogućuje poboljšano prihvaćanje i proliferaciju stanica, kao i prikladni odgovor okolnog tkiva i organizma na podražaje. Elektroispredanjem analoga tkiva moguće je, u visokom stupnju, utjecati na fizikalno-kemijska svojstva nosača (Fernandes i sur., 2009).

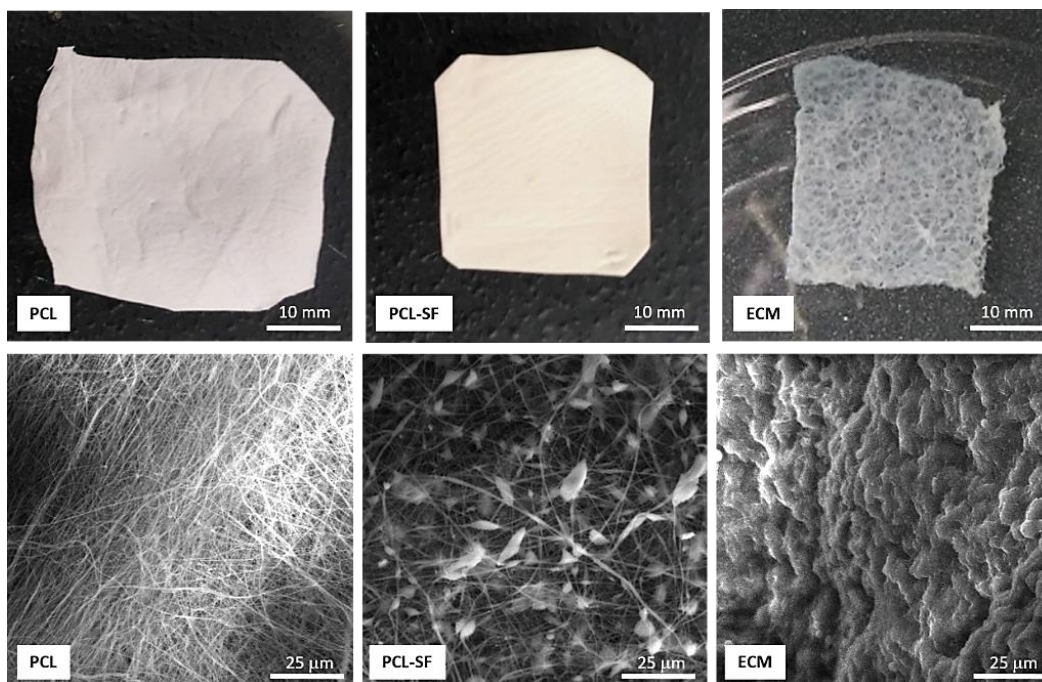
Kako bi bilo moguće uspoređivati različite materijale i nosače, u pogledu prihvaćanja, rasta i održavanja funkcija stanica, korišteni su postupci mikroskopije, MTT testa, fluorescentnog bojanja i transfekcije. Odabrane metode jedne su od najosnovnijih u pristupu rješavanja problema odabira nosača i izvantjelesnoj izradi tkiva i 3D staničnih modela.

4.1. SEM

Topologija pripremljenih nosača PCL, PCL-SF i ECM određivana je skenirajućim elektronskim mikroskopom. Iz SEM analize moguće je vidjeti mikrostruktru i prema tome izvući pretpostavke o strukturnoj čvrstoći diskova. Slika 7. prikazuje reljef nosača korištenih u istraživanju pri povećanju od 1000x. Vidljive su velike razlike u mikrostrukтури materijala. Nosač od čistog PCL-a zapravo se sastoji od vrlo isprepletene mreže vlakana polimera. Struktura vlakana vrlo je gusta, naizgled uniformna i pokazuje visoku razinu međupovezanih pora. U usporedbi s time, kompozitni nosač načinjen od PCL-a uz dodatak svilinog fibroina uzima vrlo neodređenu mikrostrukтуру. Rijetki raspored vlakana doprinosi većoj poroznosti

(veći volumen pora) od one u čistom PCL-u. Također, uočena je prisutnost vretenastih kapljice koje povezuju vlakna međusobno. Za razliku od sintetskih polimera, nosači načinjeni od ekstracelularnog matriksa svinjske jetre sastoje se isključivo od proteina (glikoproteini) i ugljikohidrata (glikana). Vrlo neravne strukture, ECM naizgled ima manju poroznost od preostala dva nosača. Ipak, relativno ravna površina nosača (u odnosu na druge nosače) potencijalno je bolja za rast stanica i međusobnu komunikaciju uz složenu arhitekturu i poroznost, vidljivu na makro razini.

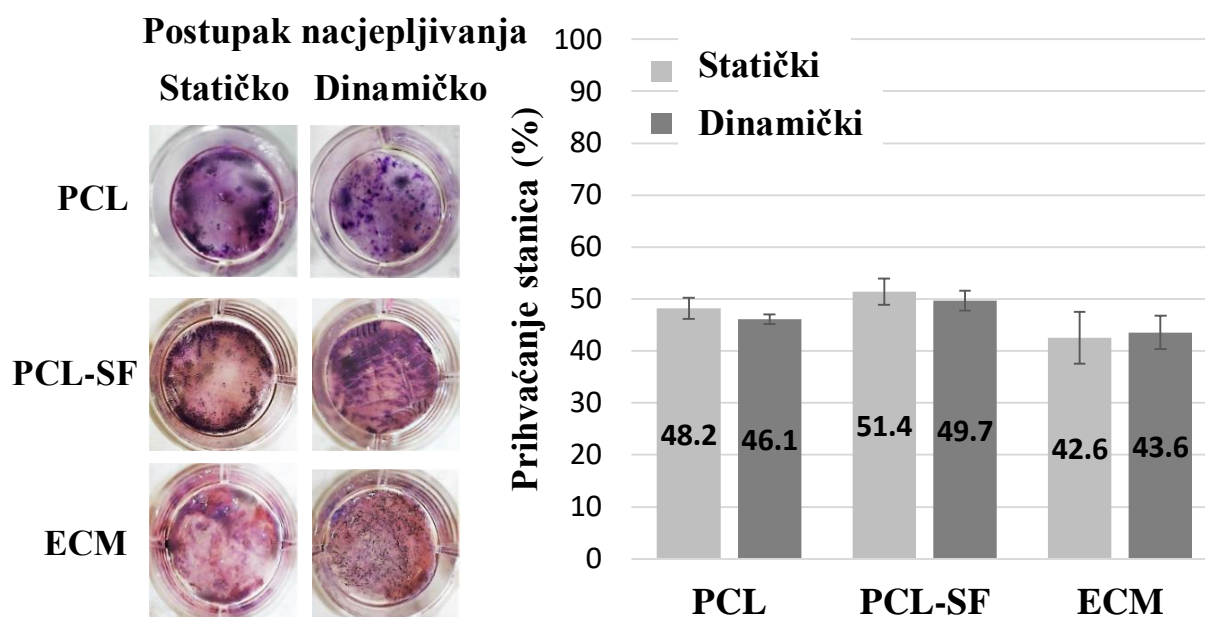
Što se tiče teksture, SEM rezultati podržavaju fizikalna svojstva na makrorazini. Kroz manipulaciju nosačima uočeno je da čisti PCL ima gladu površinu te se čini kompaktnijim i strukturno čvršćim od analoga s fibroinom. Također, karakterizira ga veća elastičnost od PCL-SF, kao i lakša mogućnost utjecanja na strukturu mehaničkom silom. ECM jetre vrlo je hidrofilan te se stoga, poznavajući komponente od kojih je napravljen, može zaključiti kako pokazuje visoku elastičnost u kontaktu s vodom, uz već spomenutu poroznost.



Slika 7. Uzorci materijala od kojih su izrađeni nosači (gornji red). Struktura PCL, PCL-SF i ECM nosača dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom pod povećanjem od 1000x (donji red).

4.2. USPJEŠNOST NACJEPLJIVANJA I PRAĆENJE RASTA STANICA

Po pripremi, rezanju i sterilizaciji, nosači su premješteni u sterilne ploče s 24 i 12 jažica te su kondicionirani u mediju za uzgoj stanica. Nacjepljivanje stanica rađeno je statičkim i dinamičkim postupkom. To znači da nakon što je suspenzija stanica nakapana na nosače oni su inkubirani ili na tresilici ili su ostavljeni da miruju. Nakon prolaska perioda inkubacije, rađena je inicijalna provjera prijanjanja stanica na nosače MTT testom. Izuzet je po jedan uzorak nosača po testiranom parametru i inkubiran u MTT reagensu, prethodno opisanim postupkom. Rezultati MTT testa prikazani na slici 8. ukazuju na zanemarive razlike u uspješnosti inokulacije triju nosača. Međutim, statički način nacjepljivanja često je rezultirao koncentriranjem staničnih klastera na jednom području, zbog nesavršenosti u ljudskom radu, od nejednakog toka suspenzije iz pipete (ovisno o pritisku) kao i malih razlika u dimenzijama nosača uslijed rezanja. Također, primijećeno je da se pri manipulaciji nosači ponekad savijaju, što je posljedica svojstva naročito PCL-a kao prilično hidrofobnog materijala. Tako, lokalizacija stanica može biti posljedica promjene reljefa uslijed inicijalnih manipulacija nosača (čak i slabi stisak pincete kod rezanja stvara udubljenja na nosaču). Kod ECM-a, lokalizacija stanica može biti posljedica utjecaja procesa decelularizacije i posljedičnog djelomičnog razaranja native strukture jetre. S druge strane, dinamički postupak rezultirao je puno ravnomjernijom raspodjelom stanica.

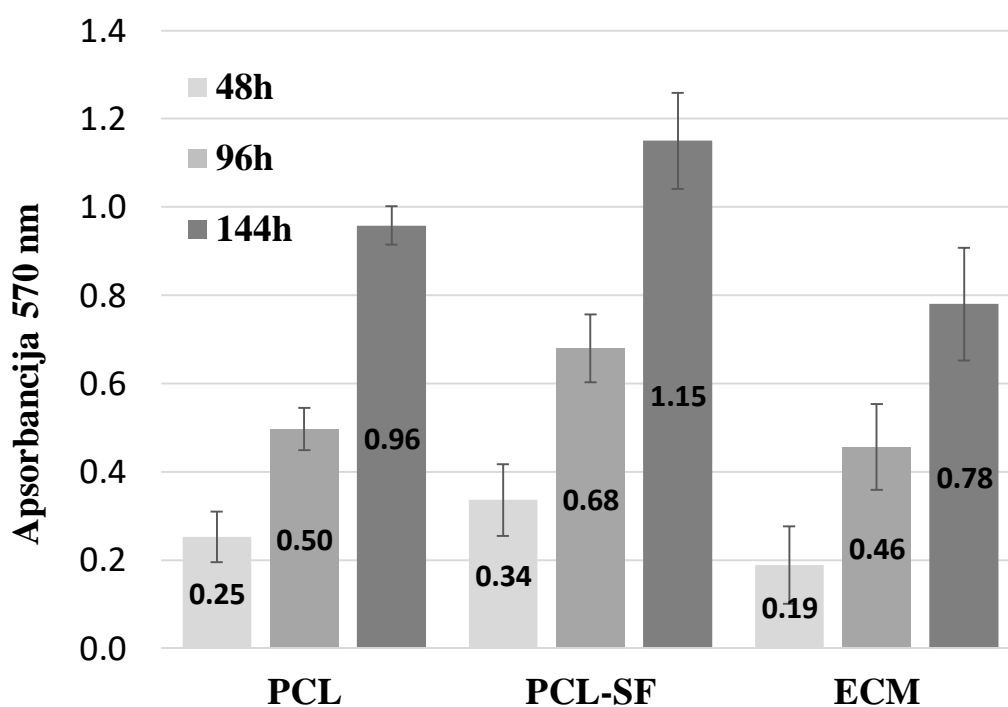


Slika 8. Ishod MTT testa u provjeri učinkovitosti nacjepljivanja HeLa stanica na nosače. Vidljive su razlike u učinkovitosti nacjepljivanja statičkog i dinamičkog postupka (lijevo), dok je uspješnost vezanja stanica na nosače utvrđena MTT testom i izražena grafički (desno).

Sama uspješnost nacjepljivanja, odnosno uspješnost prihvaćanja stanica na nosač dosta je niska. U prosjeku, postotak uspješnosti za PCL nosač iznosio je 47,2 % te 50,6 % za PCL-SF. Iako je postotak vezanih stanica kod ECM-a najmanji i iznosi 43,1 %, varijacija od 4 % u odnosu na PCL i PCL-SF nije dovoljna kako bi se ustanovila preferencija vezanja HeLa na određeni tip nosača. S obzirom da su HeLa stanice osjetljive na promjenu uvjeta uzgoja (Anonymous 2, 2019), manja uspješnost nacjepljivanja očekivana je u odnosu na stanice nacijepljene na površinu jažice. Najveći postotak adhezije stanica na PCL-SF može biti posljedica prisutnosti svilinog fibroina u nosaču (veća hidrofilnost) kao i veće poroznosti ovog nosača u odnosu na druge. Stoga je moguće i stabilnije prihvaćanje stanica unutar pora koje sprečavaju ispadanje stanica iz strukture nosača. Dinamički način nacjepljivanja stanica nije rezultirao boljim prihvaćanjem stanica. Čak suprotno, uspješnost prihvaćanja HeLa na površinu nosača nešto je niža kod dinamičkog nacjepljivanja. Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da je dinamičko nacjepljivanje rađeno u većim jažicama uz slobodno miješanje medija. Ipak, raspoređivanje stanica je ravnomjernije, što je također važan aspekt prilikom odabira adekvatnog nosača stanica. Nježno miješanje medija (do 75 rpm) sprečava preuranjenu adheziju stanica na rubove te održava veću koncentraciju stanica nad nosačem i nasumično prianjanje, naspram prianjanja kod statičkog nacjepljivanja koje je pod utjecajem ljudske pogreške iz gore spomenutih razloga. Tijekom procesa nacjepljivanja, zbog malene

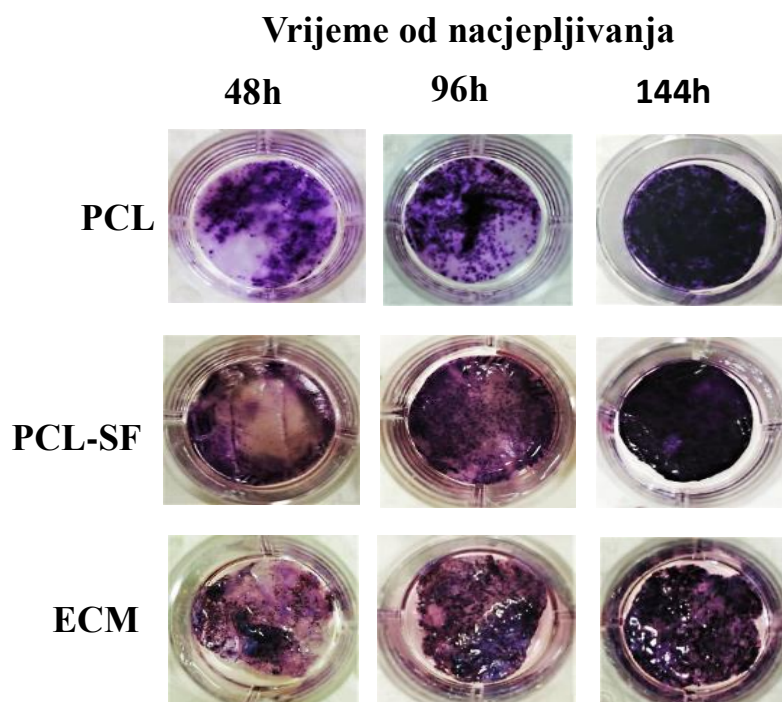
težine i nesavršenog pristajanja nosača u jažice, suspenzija stanica ispunjavala je i dno jažica, odnosno nije se zadržavala na vrhu nosača. To je rezultiralo podizanjem diskova, ponekad i na površinu suspenzije, a utvrđen je i minimalan rast stanica na dnu nosača koji podržava ovu teoriju.

Kako bi usporedba biokompatibilnosti nosača bila još efikasnija, dinamika rasta stanica praćena je tijekom 144 h od nacjepljivanja. Tijekom tog vremena, stanice su uzgajane isključivo statičkim načinom zbog jednostavnosti postupka. Svakih 48 sati, izuzet je uzorak te je određivanje broja stanica rađeno MTT testom na spektrofotometru. MTT testom moguće je odrediti broj stanica na nosačima, no zbog razlika u aktivnosti mitohondrija individualnih stanica teško je dobiti točan rezultat te je ovaj način napušten. Umjesto toga, uzeti su rezultati apsorbancija kao indikatori rasta. Slika 9. prikazuje promjenu apsorbancije izmjerenu na 570 nm tijekom vremena na PCL, PCL-SF i ECM nosačima. Očito je povećanje apsorbancije kod triju nosača, čija se vrijednost povećava otprilike dvostruko svaka dva dana. PCL-SF pokazuje najveće vrijednosti apsorbancija u sva tri izmjerena puta. Još jednom, ovakav rezultat može se pripisati prisutnosti SF u materijalu, no i činjenici da je PCL-SF nosač teži i rigidniji od čistog PCL-a što znači da se lakše zadržava na dnu jažice. Stoga je koncentracija HeLa stanica na površini ovog nosača veća u odnosu na okolinu i druge stanice pri nacjepljivanju. To se odražava na daljnji rast.



Slika 9. Rezultat MTT testa pri istraživanju rasta HeLa stanica na nosačima. Mjerena je apsorbancija proizvedenog formazana (A_{570}) u ovisnosti o vremenu.

Izmjerena početna apsorbancija najmanja je kod ECM-a i iznosi 0,19 jedinica. Usprkos dvostrukom prosječnom povećanju, najmanja je krajnja vrijednost izmjerene apsorbancije upravo kod ovog nosača. Ovaj indirektan znak manje ukupne koncentracije stanica moguća je posljedica većeg prosječnog volumena pora koji rezultira većom permeabilnošću. Također, prisutnost staničnih ostataka i makromolekula nakon decelularizacije može negativno utjecati na rast i razmnožavanje stanica (Crapo i sur., 2011). Spomenuti trend rasta stanica primijećen je i kod čistog PCL nosača, čija je apsorbancija manja od PCL-SF, no veća od ECM-a. U periodu od 96 h nakon nacjepljivanja, površina nosača potpuno je prekrivena stanicama, čiji je pokazatelj tamno obojena površina. Slika 10. prikazuje promjenu obojenja površine nosača u ovisnosti o koncentraciji stanica i vremenu.

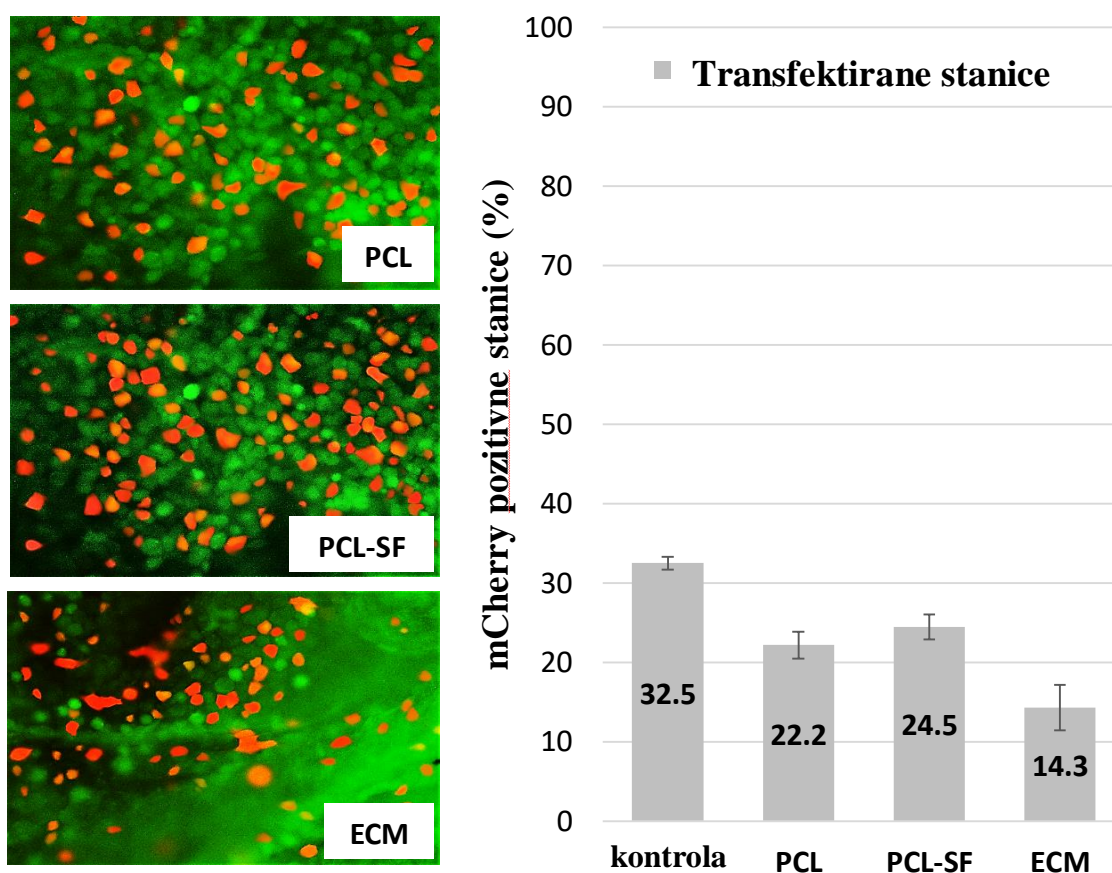


Slika 10. Ishod MTT testa pri praćenju rasta HeLa stanica na nosačima. Zbog porasta broja stanica, nosač tretiran MTT-om postaje tamniji s duljinom trajanja uzgoja stanica.

4.3. TRANSFEKCIJA I VIJABILNOST STANICA

Važnost istraživanja biokompatibilnosti nosača upotpunjena je istraživanjem učinkovitosti transfekcije nacjepljenih stanica, ili tzv. transfektabilnosti. Na ovaj način moguća je daljnja procjena ponašanja stanica i mogućnost unapređenja cijelog konstrukta u medicinske svrhe. Prednost manipulacije tkiva prvenstveno je očita u istraživanjima bolesti i mogućnosti korištenja implantata u svrhu otpuštanja lijekova ili kao tkivnog nadomjeska s promijenjenim/zdravim stanicama. 3D tkivni modeli, tj. nosači obrasli stanicama, također mogu poslužiti i kao sustavi za istraživanje prijenosa transgena u postupcima genske terapije. U tu je svrhu provedena transfekcija HeLa stanica na nosačima, kao i na onima koje su rasle u jažicama i služile kao kontrola. Promijenjeni su parametri procesa, točnije, koncentracija nacjepljenih stanica na nosače udvostručena je zbog prethodnih eksperimenata kod kojih je primijećeno slabije prihvaćanje na površinu nosača. Korišteni plazmid sadržavao je mCherry reporter gen. Transfekcija se smatrala uspješnom ukoliko je stanica ekspimirala navedeni gen, odnosno bila crveno obojana pod fluorescentnim mikroskopom. Prema opisanom postupku, količina pDNA i TurboFect™ transfekcijskog reagensa ostala je ista kroz mjerenja (1:5 v/v), a omjer je odabran zbog niske stope preživljavanja stanica pri većim količinama DNA. Kako bi se odredila uspješnost transfekcije, bilo je potrebno odrediti i postotak živih

stanica, što je određeno pomoću fluorescentnog bojila FDA uz programski paket za obradu slika, *ImageJ*. FDA bojanje uz transfekciju donosi opciju raspoznavanja transfektiranih stanica koje ekspimiraju mCherry gen i svijetle crveno od onih koje nisu primile transgen te svijetle zeleno. Vijabilne stanice koje sadržavaju transgen fluoresciraju na oba (zeleno i crveno) kanala te poprimaju blago narančastu boju kod analize na inverznom fluorescentnom mikroskopu. Na taj je način moguće izračunati uspješnost transfekcije HeLa stanica. Izuzet je po jedan uzorak transfektiranih stanica svakog nosača te je dodano FDA fluorescentno bojilo prema prethodno opisanom postupku. Kao kontrola je služila transfekcija stanica uzgajanih na dnu ploče s 24 jažice.



Slika 11. Rezultati transfekcije nosača provedene s pDNA. Crvene i narančaste stanice ekspimiraju mCherry reporter gen (lijevo). Uspješnost transfekcije prikazana je grafički (desno).

Analiza transfektanata pokazuje da je uspješnost transfekcije kod triju nosača niska. Kako je očekivano, kontrola pokazuje najveću uspješnost transfekcije, koja iznosi 32,5 %. Prosječna transfekcija kod sintetskih PCL nosača iznosi 23,4 %, sa nešto višom uspješnosti kod PCL-SF nosača (24,5 %). Kao i kod prethodnih analiza, prirodni ECM pokazuje

najslabije rezultate. Sa uspješnosti od 14,3 % to iznosi čak 10 % manje od transfekcije PCL-SF. Generalno niska razina transfekcije ukazuje na promjenu ponašanja HeLa stanica u okolini nosača. To može biti stoga što je ovakva stanična kultura namijenjena za uzgoj na ravnoj površini u obliku monosloja stanica. Stresovi stvoreni uslijed manipulacija nosača kao i 3D uzgoj HeLa stanica negativno utječu na stanični ciklus, te je moguće da se njihova brzina rasta (razmnožavanja) smanjuje u odnosu na one uzgajane normalnim postupkom pasažiranja. Osim toga, problem 3D nosača je taj što stvara kompleksnu, zamršenu mrežu vlakana i tešku dostupnost stanicama te samim time uspješnost transfekcije smanjuje. Ipak, niska rezultatna vrijednost ECM-a moguća je posljedica prethodno navedenih zaostalih staničnih komponenata nakon decelularizacije. Postotak uspješnost transfekcije kontrole od 32,5 % ukazuje na nedostatak upotrijebljene metode te označava potrebu za unapređenjem.

5. ZAKLJUČCI

1. Primijenjeni postupci obrade nosača načinjenih od PCL, PCL-SF i ECM kao i sam postupak zasijavanja stanica na nosače, prikladan je za razvoj i istraživanje 3D staničnih kultura.
2. Statički i dinamički postupak nacjepljivanja stanica razlikuju se samo u rasporedu stanica po površini nosača. Dok dinamički postupak rezultira ravnomjernijim rasporedom stanica, odabir samog postupka nacjepljivanja ne utječe na uspješnost prihvaćanja stanica na nosače.
3. Usporedbom biokompatibilnosti testiranih nosača, najbolje rezultate svih provedenih testova (stanične vijabilnosti, prihvaćanja, rasta i transfekcije) pokazuje kompozit polimera poli- ϵ -kapolakton i svilinog fibroina (PCL-SF). Pritom se najnepogodnijim nosačem pokazao ekstracelularni matriks svinjske jetre (ECM).

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2019) B10NUMB3R5- The Database of Useful Biological Numbers, <<https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=2&id=109393>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2019.

Anonymous 2 (2019) MicroscopeMaster. HeLa Cells-Definition, Importance, Medical Breakthroughs, Microscopy, <<https://www.microscopemaster.com/hela-cells.html>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2019.

Anonymous 3 (2019) Laboratory Info. Manual Cell Counting With Neubauer Chamber,<<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>>. Pristupljeno 4. rujna 2019.

Badylak, S. F., Brown, B. N., Gilbert, T. W. (2012) Tissue Engineering with Decellularized Tissues. U: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 3. izd., (Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1316-1331.

Badylak, S. F., Coffrey, A. C., Lantz, G. C., Tacker, A., Geddes, L. A. (1994) Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model. *J. Vasc. Surg.* **19**, 465-472.

Barbedo, J. G. A. (2013) Automatic Object Counting in Neubauer Chambers. *XXXI Brazilian Telecommunications Symposium*. doi: 10.14209/sbrt.2013.34

Bottomley, R. H., Trainer, A. L., Griffin, M. J. (1969) Enzymatic and chromosomal characterization of HeLa Variants. *J. Cell Biol.* **41**, 806-815.

del Carpio, A. (2014) Berkeley Science Review. The good, the bad, and the HeLa, <<https://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2019.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Sakthi Kumar, D. (2011) Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 1-19. doi: 10.1155/2011/290602

Eltom, A., Zhong, G., Muhammad, A. (2019) Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2019**, 1-13. doi:10.1155/2019/3429527

Eurotransplant (2018) Statistics Report Library,
<http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=overview&search_organ=&search_region=&search_period=&search_characteristic=&search_text=&search_collection=>.
Pristupljeno 30. lipnja 2019.

Fernandes, H., Moroni, L., van Blitterswijk, C., de Boer, J.(2009) Extracellular matrix and tissue engineering applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 5474-5484.

Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820

Gloria, A., De Santis, R., Ambrosio, L. (2010) Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Biom.* **8**, 57-67.

Hutmacher, D. W. (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **3**, 2529-2543.

Ibidi® cells in focus (2015) Live/dead staining with FDA and PI,
<https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33_Live_Dead_staining_with_FDA_and_PI.pdf>.
Pristupljeno 2. rujna 2019.

Ikada, Y. (2006) Tissue Engineering: Fundamentals and Applications, 1. Izdanje, Elsevier Ltd, Oksford.

Ivančić, F. I. (2018) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Ji, S. C., Liang, H. (2013) Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Front. Mater. Sci.* **7**, 237-247.

Jones, J. R. (2005) Scaffolds for tissue engineering. U: Biomaterials, artificial organs and tissue engineering, (Hench, L. L, Jones, J. R., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 201-214.

- Kim, Y., Ko, H., Kwon, I. K., Shin, K. (2016) Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int. Neurourol. J.* **20**, 23–29. doi:10.5213/inj.1632600.318
- Li, Y., Meng, H., Liu, Y., Lee, B. P. (2015) Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *Sci. World J.* **2015**, 1-10. doi: 10.1155/2015/685690
- Liu, W., Bergenstock, M. K., Lau, W., Sun, W., Liu, Q. (2009) Novel Poly- ϵ - caprolactone (PCL) Scaffolds for Three-Dimensional Stem Cell Differentiation. *NJ Stem Cell Research Symposium*, Bridgewater.
- Liverani, L., Boccaccini, A. R. (2016) Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials* **6**, 1-15.
- Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J. (2009) Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Springer-Verlag, Berlin.
- Mijović, B., Tominac Trcin, M., Agić, A., Zdraveva, E., Bujić, M., Špoljarić, I., Kosec, V. (2012) Study on Cell Adhesion Detection onto Biodegradable Electrospun PCL Scaffolds. *Journal of Fiber Bioengineering & Informatics* **5**, 23-40. doi:10.3993/jfbi03201202
- Murphy, S. V., Atala, A. (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 773-785.
- National Kidney Transplantation (2019) When a Transplant Fails, <https://www.kidney.org/transplantation/transaction/TC/summer09/TCsm09_TransplantFails>. Pristupljeno 30. lipnja 2019.
- Noh, S., Myung, N., Park, M., Kim, S., Zhang, S. U., Kang, H. W. (2018) 3D Bioprinting for Tissue Engineering. U: *Clinical Regenerative Medicine in Urology*, (Kim, B., ured.), Springer, Singapur, str. 105-123.
- O'Brien, F. J. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **14**, 88-95. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- Okamoto, M. (2019) The role of scaffolds in tissue engineering. U: *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, (Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 23-49.

- Olson, J. L., Atala, A., Yoo, J. J. (2011) Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med. J.* **47**, 1-13. doi: 10.4068/cmj.2011.47.1.1
- Oryan, A., Sahvieh, S. (2017) Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 1003-1011. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F. (2011) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 33-34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
- Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croat. J. Food Biotech. Nutr.* **11**, 169-175.
- Sarikaya, A., Wu, C. C., Badylak, S. (2002) Antimicrobial Activity Associated with Extracellular Matrices. *Tissue Eng.* **8**, 63-71.
- Sicari, B. M., Londono, R., Badylak, S. F. (2015) Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering. U: *Tissue Engineering*, 2. izd., (van Blitterswijk, C., de Boer, J., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 149-175.
- Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., Rao, S. (2018) PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol. Biotechnol.* **60**, 506-532.
- Slivac, I. (2017) Predavanje 1: *Osnove tkivnog inženjerstva*, predavanja, Osnove tkivnog inženjerstva 66748, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, održano 29. studeni 2017.
- Slivac, I. (2017) Predavanje 3: *Izvanstanični matriks i Materijali u tkivnom inženjerstvu*, predavanja, Osnove tkivnog inženjerstva 66748, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, održano 20. prosinac 2017.
- Slivac, I. (2018) Predavanje 5: *Izrada, oblikovanje i priprema staničnih nosača u TI*, predavanja, Osnove tkivnog inženjerstva 66748, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, održano 17. siječnja 2018.
- Sousa, I., Mendes, A., Bártolo, P. J. (2013) PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in Tissue Engineering. *Procedia Engineering* **59**, 279-284.

Sun, J., Tan, H. (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* **6**,1285-1309. doi:10.3390/ma6041285

Sze, J. H., Brownlie, J. C., Love, C. A. (2016) Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* **6**, 67-76. doi:10.1007/s13205-016-0379-9

Thermo Fisher Scientific (2018) TurboFect™ Transfection Reagent, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011815_TurboFect_Transfection_Reag_UG.pdf>. Pristupljeno 2. rujna 2019.

Vacanti, C. A. (2006) The history of tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* [online] **10**, 569-576. doi: 10.2755/jcmm010.003.20

Viera Rey, D. F., St-Pierre, J. P. (2019) Fabrication techniques of tissue engineering scaffolds. U: *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, (Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 109-125.

Waikel, R. L. (2019) AccessScience. HeLa cell, <<https://www.accessscience.com/content/311600>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2019.

Yi, S., Ding, F., Gong, L., Gu, X. (2017) Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr. Stem Cell Res. T.* **12**, 233-246. doi: 10.2174/1574888X11666160905092513

Zdraveva, E., Magovac, E., Mijović, B. (2016) Elektroispredanje – značajna tehnika 21. stoljeća. *Tekstil: časopis za tekstilnu tehnologiju i konfekciju* **65**, 397-409.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fran", written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta