

# Primjena proteina soje u tkivnom inženjerstvu

---

Lač, Hana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:281789>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Hana Lač**

7418/N

# **PRIMJENA PROTEINA SOJE U TKIVNOM INŽENJERSTVU**

## **ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Odabrana poglavlja zelene kemije

**Mentor:** Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### Primjena proteina soje u tkivnom inženjerstvu

*Hana Lač, 0058210551*

**Sažetak:** Porastom svijesti o štetnom utjecaju kemikalija na zdravlje i okoliš, zeleni principi posljednjih godina pronalaze primjenu u multidisciplinarnom području tkivnog inženjerstva. Najnovija dostignuća u tkivnom inženjerstvu temelje se na upotrebi trodimenzionalnih nosača kao kalupa za obnovu oštećenih tkiva i organa. Protein soje dostupan je u izobilju, jeftin, biorazgradiv i ekološki prihvatljiv što ga čini pogodnim za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Zahvaljujući biološkoj strukturi koja potiče staničnu adheziju, migraciju i proliferaciju, a zbog manje imunogenosti od proteina životinjskog porijekla protein soje sve češće nalazi primjenu u obnovi različitih vrsta tkiva. U radu su opisani različiti tipovi nosača koji se koriste za obnovu različitih tipova tkiva u kojima je protein soje upotrijebljen kao osnovni materijal ili kao dio smjese sa sintetskim i prirodnim materijalima.

#### **Ključne riječi:**

**Rad sadrži:** 21 stranicu, 9 slika, 2 tablice, 34 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

**Datum obrane:** 10. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study of Nutrition**

**Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition**

### **Application of soy protein in tissue engineering**

***Hana Lač, 0058210551***

**Abstract:** With the growing awareness of the harmful effects of chemicals on health and the environment, green principles have recently found application in the multidisciplinary field of tissue engineering. The latest achievements in tissue engineering are based on the use of three-dimensional scaffolds as a support for the restoration of damaged tissues and organs. Soy protein is available, inexpensive, biodegradable and environmentally friendly what makes it suitable for use in tissue engineering. Owing to biological structure that promotes cell adhesion, migration and proliferation, and due to less immunogenicity than proteins of animal origin, soy protein is increasingly used in the regeneration of various types of tissues. This thesis describes different types of carriers used for the reconstruction of different types of tissues in which soy protein is used as a basic material or as part of a mixture with synthetic and natural materials.

#### **Keywords:**

**Thesis contains:** 21 pages, 9 figures, 2 table, 34 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Mojca Čakić Semenčić, Assistant Professor

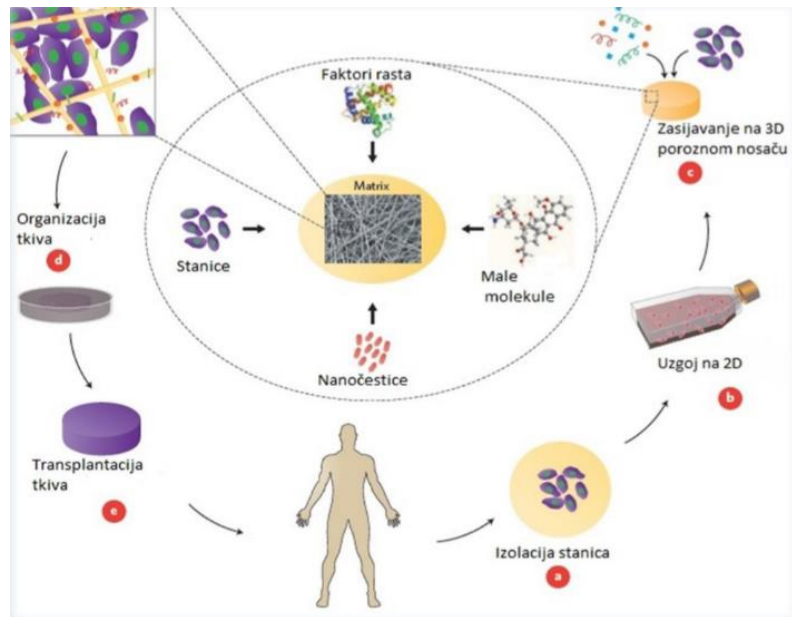
**Defence date:** July 10th 2020

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Nosači .....	3
2.1.1. Zahtjevi za nosače .....	5
2.2. Materijali .....	6
2.3. Biljni proteini .....	8
2.3.1. Sojin protein .....	11
2.3.1.1. Porozni nosači od proteina soje .....	12
2.3.1.2. Vlaknasti nosači od proteina soje .....	15
2.3.1.3. Hidrogelovi od proteina soje .....	17
3. ZAKLJUČAK .....	18
4. POPIS LITERATURE .....	18

## 1. UVOD

Razne bolesti i ozljede dovode do oštećenja i degeneracije tkiva te ona trebaju biti zamijenjena za što se najčešće koriste tehnike transplantacije. Transplantant može biti vlastito tkivo bolesnika (autologna transplantacija), tkivo različite jedinke iste vrste (alogeno transplantacija) ili tkivo jedinke različite vrste (ksenogena transplantacija). Upotreba ovih konvencionalnih transplantanata naišla je na ozbiljne probleme i ograničenja, upotreba vlastitog tkiva izrazito je skupa, bolna, anatomski ograničena te povezana sa smrtnošću bolesnika zbog infekcije, dok alografti i ksenografti imaju rizik od prenošenja bolesti sa donora na bolesnika te također pokreću nepoželjne imunološke reakcije koje mogu rezultirati odbacivanjem transplantanta (Burg i sur., 2000). Zbog navedenih problema, uslijed potrebe za razvojem zamjenskih metoda i materijala, počelo se razvijati područje tkivnog inženjerstva. Pojam tkivno inženjerstvo predstavljen je 1987. te je definiran kao „primjena principa i metoda inženjerstva i prirodnih znanosti za razumijevanje struktura i funkcija normalnog i patološkog tkiva sisavaca i razvoj bioloških zamjena za obnovu, održavanje ili poboljšanje funkcije oštećenih tkiva.“ (Meyer i sur., 2009). Područje tkivnog inženjerstva izrazito je multidisciplinarno te okuplja brojne stručnjake iz područja inženjerstva i prirodnih znanosti. Postoje tri glavna pristupa u tkivnom inženjerstvu: korištenje izoliranih stanica ili staničnih zamjena, korištenje nestaničnih materijala sa sposobnošću obnove tkiva i korištenje kombinacije stanica, materijala, najčešće u obliku nosača i faktora rasta. Tkivno inženjerstvo se ekstenzivno oslanja na uporabu poroznih trodimenzionalnih (3D) nosača kako bi se osiguralo prikladno okruženje za stvaranje tkiva i organa (slika 1). Idealni nosači biološki su kompatibilni i ekonomični za proizvodnju te potiču stvaranje funkcionalnog i čvrstog tkiva. Mnoge tradicionalne metode izrade nosača koriste toksična otapala i polimere koji su štetni za okoliš te nisu u skladu sa zelenom tehnologijom. Brojni prirodni i sintetički materijali proučavaju se kako bi se koristili kao biomaterijali koji sve više pronalaze primjenu u tkivnom inženjerstvu zbog svojih mehaničkih svojstava, stabilnosti i biološke kompatibilnosti. Proteini, posebice oni biljnog porijekla, zbog iznimno povoljnih svojstava predmet su brojnih istraživanja primjene u biomedicinske svrhe. Među biljnim proteinima soja ima najveću količinu izoflavona (Curt i sur., 2009). Izoflavoni poput genisteina i daidzeina su fitoestrogeni koji utječu na signalne puteve u eukariotskim stanicama izazivajući protuupalno djelovanje, stoga se soja sve češće koristi kao materijal za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu.

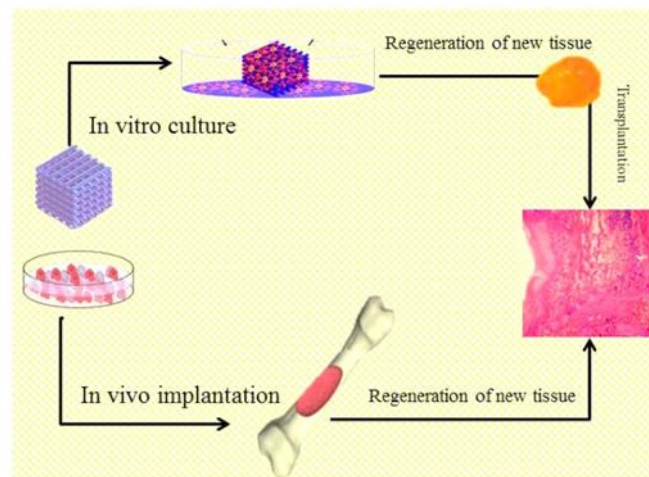


Slika 1. Koncept tkivnog inženjerstva koji uključuje zasijavanje stanica unutar biokompatibilnog nosača (Krpmotić i sur., 2017)

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Nosači

Idealni nosači visoko su porozni materijali s međusobno povezanim porama koji oponašaju prirodni izvanstanični matriks, omogućujući stvaranje krvnih žila te prijenos hranjivih tvari, kisika i metaboličkog otpada. Površinska svojstva nosača moraju biti pogodna za prianjanje, umnažanje i diferencijaciju stanica. Nosač mora imati odgovarajuća mehanička svojstva te se postupno resorbirati kontroliranom brzinom razgradnje koja odgovara stvaranju novog tkiva. (Ivanković i sur., 2019). Nosači sa zasijanim stanicama (slika 2) mogu biti kultivirani *in vitro* te se novo tkivo transplantira na oštećeno područje ili mogu biti direktno implantirani na oštećeno područje gdje će se obnova tkiva ili organa odvijati *in vivo*. (Jahangirian i sur., 2019)



Slika 2. Principi uzgoja i implantacije nosača (Jahangirian i sur., 2019)

Metode izrade trodimenzionalnih poroznih nosača dijele se na konvencionalne metode i metode ubrzanog prototipiranja (Mallick i sur., 2013). Konvencionalne metode, poput elektroispredanja, liofilizacije, separacija faza, plinskog pjenjenja („gas foaming“), lijevanja smrzavanjem („freeze casting“) i lijevanja otapalom („solvent casting“) jeftine su i pružaju širok spektar podešavanja fizikalno-kemijskih svojstava. Međutim, konvencionalne metode nude malu sposobnost preciznog upravljanja veličinom i geometrijom pora, međusobnom povezanošću pora, prostornom raspodjelom pora i izgradnjom unutarnjih kanala u nosaču. (Yeong i sur., 2004). Ubrzano prototipiranje smatra se održivom alternativom za postizanje opsežne i detaljne kontrole nad arhitekturom nosača. Ubrzano prototipiranje koje obuhvaća



postupke poput stereolitografije, selektivnog laserskog sinteriranja, bioprintanja i biplotanja koristi se za izradu trodimenzionalnih i vlaknastih struktura. Glavne prednosti ovih tehnika su njihova sposobnost brze proizvodnje složenih proizvoda izravno s računalnog modela te precizna kontrola inače složene arhitekture nosača: veličine, oblika, međusobne povezanosti, grananja, geometrije i orijentacije (Yang i sur., 2002). Većina procesa ubrzanog prototipiranja ne koriste toksična organska otapala, a neki omogućuju da se stanice i hormon rasta ugrade u nosače već tijekom proizvodnje, no procesi su dugotrajni i uvelike ovise o dostupnosti biomaterijala.

Nosači mogu biti proizvedeni u različitim oblicima (strukturama) od kojih svaki ima prednosti i nedostatke prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Tipovi nosača s prednostima i nedostacima (Chaudhari i sur., 2016)

Tip nosača	Prednosti	Nedostaci
Porozni	Visoka poroznost i odgovarajuća veličina pora	Nehomogena distribucija stanica, potrebne različite veličine pora ovisno o tipu stanica što oduzima mnogo vremena
Vlaknasti	Pogoduje prijanjanju, proliferaciji i diferencijaciji stanica	Potrebna je površinska modifikacija
Hidrogelovi	Iznimno biokompatibilni, kontrolirana degradacija	Slaba mehanička snaga zbog meke strukture
Mikročestice	Laka proizvodnja s kontroliranim fizikalnim svojstvima, omogućeno adekvatno prijanjanje i migracija stanica	Smanjeno preživljavanje stanica
Kompoziti	Iznimna biorazgradivost i mehanička snaga	Degradacijom nastaju kiseli derivati, nizak afinitet za stanice, zamoran proces proizvodnje nosača
Acelularni	Zadržani su nativni izvanstanični matriks i	Potrebna djelomična decelularizacija kako bi se

	anatomska svojstva, blagi upalni i imunوسي odgovor	izbjegla jaka imunosi reakcija
--	--	--------------------------------

### 2.1.1. Zahtjevi za nosače

U dizajnu i tijekom određivanja prikladnosti pojedinog nosača, neovisno o vrsti tkiva, postoje ključni zahtjevi koji trebaju biti zadovoljeni. Od iznimne je važnosti omogućiti isplativost te dobru proizvodnu praksu kako bi se osiguralo uspješno prevođenje inženjerskih strategija na kliničku praksu. Kod upotrebe nosača važna je njihova dostupnost te odsutnost potrebe za dodatnom kirurškom obradom kako bi se izbjegla *in vitro* kultivacija stanica tjednima prije same implantacije, iako je prethodno za pojedine vrste tkiva neizvedivo.

Biokompatibilnost je prvi i ključni kriterij koji mora biti ispunjen neovisno o tipu nosača i tkiva. Stanice moraju imati mogućnost prianjanja, normalnog funkcioniranja, migracije po površini i kroz nosač te proliferacije. Nakon ugradnje u organizam nosač ne smije izazvati imunološku reakciju odnosno upalni proces koji bi mogao smanjiti cijeljenje ili prouzročiti odbacivanje materijala od strane tijela. Prije samog postupka treba obaviti testove citokompatibilnosti i procjenu formiranja tkiva *in vivo* te analizu bioaktivnosti.

Nosači nisu namijenjeni da budu trajni implatanti stoga moraju biti konstruirani od biorazgradivog materijala kako bi stanicama bila omogućena proizvodnja vlastitog izvanstaničnog matriksa. Nusprodukti biološke razgradnje nosača trebaju biti bezopasni i netoksični te se izlučiti bez interferencije s drugim organima. Razgradnja nosača korištenih za inženjerstvo koštanog tkiva treba biti relativno spora jer nosači moraju održavati mehaničku čvrstoću sve dok regeneracija novog tkiva nije pri kraju, dok se kod mekših tkiva oni razgrađuju unutar mjesec dana od implantacije. Prisutnost nosača duži vremenski period od poželjnog može usporiti regeneraciju tkiva, a kinetika apsorpcije materijala može izravno utjecati na uspješnost postupka.

Nosač bi trebao imati mehanička svojstva koja odgovaraju anatomskom položaju ugradnje te trebaju biti dovoljno čvrsti kako bi se njima moglo kirurški rukovati. Pretpostavlja se kako bilo koji nosač čija svojstva odgovaraju svojstvima prirodnog tkiva može izdržati mehanička opterećenja koja normalno tkivo podnosi. Izrada nosača s odgovarajućim mehaničkim svojstvima jedan je od velikih izazova u pokušaju izrade kostiju ili hrskavice. Za ta tkiva implantirani nosač mora imati dovoljnu mehaničku čvrstoću koja će omogućiti funkcioniranje sve do završetka regeneracije tkiva. Nadalje, problem predstavlja razlika u brzini

zarastanja u korist mlađe populacije. Zatim, mnogi materijali koji su se pokazali kao potencijalni u *in vitro* testiranjima, kod implantacije *in vivo* nisu pokazivali dovoljno dobru vaskularizaciju. Ravnoteža između mehaničkih svojstava i porozne arhitekture koja je dovoljna da se omogući infiltracija stanica i vaskularizacija ključ je uspjeha primjene nosača bilo koje vrste. Ako nosač ne može podnijeti naprezanje u rasponu od 10-1500 MPa za tvrda (Goulet i sur., 1994) i 0,4350 MPa za meka tkiva doći će do deformacije zbog djelovanja prevelike sile te formacija tkiva neće biti moguća.

Arhitektura nosača od presudnog je značaja. Nosači moraju imati visoko poroznu strukturu s dobrom međusobnom povezanošću pora kako bi se osigurala migracija stanica, vaskularizacija kroz cijeli volumen nosača te difuzija hranjivih tvari do stanica unutar nosača i otpadnih tvari iz nosača. Nusprodukti razgradnje nosača trebaju biti izlučeni iz tijela bez interferencije s drugim organima i okolnim tkivima. Nedostatak vaskularizacije i uklanjanja otpada iz središta konstrukcije nosača i stanica najveći je problem u području tkivnog inženjerstva. Druga ključna komponenta je prosječna veličina pora. Stanice primarno stupaju u interakciju sa nosačima preko kemijskih skupina (ligandi) na površini materijala. Nosači sintetizirani iz prirodnih materijala (npr. kolagena) prirodno posjeduju ove ligande u obliku vezanih Arg-Gly-Asp aminokiselinskih sekvenci, dok nosači napravljeni od sintetskih materijala mogu zahtijevati naknadnu ugradnju ovih liganada putem, na primjer, adsorpcije proteina. Pore stoga moraju biti dovoljno velike da stanice mogu migrirati u strukturu gdje se na kraju vežu za ligande unutar nosača, ali i dovoljno male kako bi se osigurala velika površina i odgovarajuća gustoća liganada potrebna za vezanje dovoljnog broja stanica na nosač. Za nosače postoji kritičan raspon veličina pora koji mogu varirati ovisno o vrsti stanice i tkiva koje je konstruirano. Optimalna veličina pora je u rasponu između 100 i 500  $\mu\text{m}$  (O'Brien, 2011).

## **2.2. Materijali**

Uobičajeno se za pripremu nosača koriste različite skupine biomaterijala, poput sintetičkih polimera i prirodnih biopolimera. Prirodni biopolimeri poput proteina ili ugljikohidrata životinjskog ili biljnog podrijetla mogu igrati središnju ulogu u oblikovanju ponašanja stanica, uglavnom s obzirom na kemijske signale i biokompatibilnost. Biljke i biljni biopolimeri kao zelene i održive sirovine, sa svojstvima obnovljivosti, niske cijene i lakoćom masovne proizvodnje, ispunjavaju potrebe za inovativnim materijalima s karakteristikama potrebnim za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Nosače izrađene od biljnih biopolimera karakterizira lakoća

proizvodnje, sastavljanja i manipulacije, obnovljivost i relativno niska cijena. Nusprodukti razgradnje nosača ne oštećuju okolna tkiva no, iako je toksičnost malo vjerojatna, postoji mogućnost imunološkog odgovora. Stoga ih treba ispitati na životinjskim modelima te su potrebne detaljnije studije jer opskrba nutrijentima u složenim ljudskim tkivima i dalje predstavlja izazov. Prednosti su velika površina, značajan transport i sposobnost zadržavanja vode, međusobna povezanost pora te postojeće mreže krvožilnog sustava (Iravani i Varma, 2019).

Prilikom odabira materijala od presudne je važnosti odabrati onaj koji udovoljava gore navedenim kriterijima. Kako je biorazgradivost jedan od najvažnijih zahtjeva, izbor materijala ograničen je na metal, keramiku i nekoliko tipova polimera. Keramika se smatra idealnim materijalom zbog svojih osteoinduktivnih svojstava te adekvatne potpore za regeneraciju kostiju, no zbog krhkosti ima lošu mehaničku stabilnost. Također, visoka stopa razgradnje može dovesti do povećane koncentracije kalcija i fosfora što može negativno djelovati na rast kostiju (Guarino i sur., 2008). Zbog nedostataka keramike, materijali koji se koriste u tkivnom inženjerstvu uglavnom su sintetički ili prirodni biorazgradivi materijali.

Prirodni biomaterijali mogu se podijeliti na proteinske, polisaharidne, glikozaminoglikanske biomaterijale (hijaluronska kiselina, kondroitin sulfat, keratan sulfat, heparan sulfat) te biomaterijale dobivene iz tkiva ili organa poput decelulariziranih srčanih zalistaka i krvnih žila. Nedostaci proteinskih i polisaharidnih biomaterijala su slaba mehanička snaga koja ograničava njihovu primjenu u visoko opterećenim tkivima, varijabilnost proizvodnje te potencijalne nečistoće prisutne u materijalima prije implantacije koje mogu biti uzrok imunološkog odgovora (Brovold i sur., 2018).

Sintetički biorazgradivi materijali koji se najčešće koriste u tkivnom inženjerstvu su poli(mliječna kiselina) (PLA), poli(glikolna kiselina) (PGA), poli(mliječna-ko-glikolna kiselina) (PLGA), poli(propilen-fumarat), poli(etilen-glikol) (PEG) i poli(arilati). Svojstva sintetičkih materijala poput brzine razgradnje, mehaničkih svojstava, strukture i poroznosti mogu se bolje kontrolirati, no njihova struktura i sastav nisu slični nativnim tkivima i organima, stoga su njihova biokompatibilnost i sposobnost induciranja remodeliranja tkiva niske. Zbog navedenih prednosti prirodni biomaterijali koriste se za zamjenu ili obnovu strukture i funkcije oštećenih tkiva i organa. Oni omogućuju procese adhezije, migracije, proliferacije i diferencijacije stanica, stoga, implantirani u oštećeno područje, induciraju stvaranje izvanstaničnog matriksa i potiču obnavljanje tkiva (Bao Ha i sur., 2013).

### 2.3. Biljni proteini

Zahvaljujući velikoj zastupljenosti u ljudskom tijelu, proteini su bolji izbor od polisaharida i sintetskih biopolimera upravo zbog iznimne biokompatibilnosti te lakšeg održavanja funkcije nativnog izvanstaničnog matriksa (Reddy i Yang, 2011). Sintetskim polimerima nedostaju funkcionalne skupine prirodno prisutne u proteinima. Prisustvo amino i karboksilnih skupina u strukturi proteina osigurava različit naboj koji ovisi o pH vrijednosti okoline. U ljudskom tijelu prisutan je širok spektar pH vrijednosti te se naboj proteina može lako prilagođavati kako bi odgovarao određenom pH u tijelu (Chen i sur., 2006).

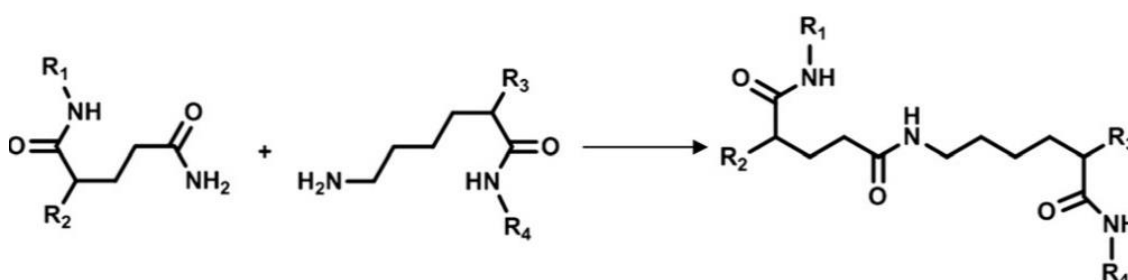
Kolagen i proteini svile su proteini s najširoom primjenom u medicinske svrhe. Kolagen, kao glavni strukturni protein, čini 25-35% ukupnih proteina u ljudskom tijelu. Proizvode ga uglavnom fibroblasti te ima ključnu ulogu u regulaciji stanične morfologije, prijanjanja, migracije i diferencijacije stanica. Goveđi kolagen, koji je ujedno i najčešće korišten tip kolagena, pokazuje imunogeni potencijal prenoseći bolesti poput goveđe spongioformne encefalopatije, poznatije kao bolest kravljeg ludila. Kliničke studije pokazale su da se kod pacijenata koji primaju injekcije kolagena može javiti povećana osjetljivost kože i imunosti odgovor što ukazuje na potencijalnu imunogenost kolagena. Spora razgradnja i poteškoće s otapanjem i pripremom biomaterijala od svile te navedena imunogenost kolagena ograničavaju njihovu upotrebu (Peng i sur., 2010). Biljni proteini iz kukuruza, soje i pšenice dostupni su u izobilju, ekonomični su, biorazgradivi, relativno jeftini te pokazuju znatno manji potencijal za imunogenost i prijenos bolesti u usporedbi sa proteinima životinjskog porijekla. Mogu se oblikovati u hidrogelove, mikro- i nanočestice, vlakna i porozne strukture sa svojstvima pogodnim za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Biljne proteine također karakterizira izuzetna stabilnost u vodenom mediju zbog mnogobrojnih intra- i intermolekularnih disulfidnih veza. Usporedba nekih svojstava proteina životinjskog porijekla (kolagen i svila) i proteina biljnog porijekla (proteini soje, zein, pšenični gluten) prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba određenih svojstava biljnih proteina s kolagenom i svilom (Reddy i Yang, 2011)

Svojstvo	Kolagen	Svila	Zein	Protein soje	Pšenični gluten		
					Gliadin	Gluten	Glutenin
Molekulska masa (kDa)	300	250-450	19-26	26-120	25-55	35-100	32-130
Aminokiseline (g/100g proteina)							
Kisele aminokiseline	18.2	2.9	28.4	30.5	26.8	26.7	30.6
Bazične aminokiseline	13	2.2	3.8	17.6	3.9	4.9	5.7
Nepolarne aminokiseline	62.7	76.7	50.5	39.1	32	34.9	38.4
Polarne aminokiseline	25.6	20.4	39.8	44.6	35.5	37.1	36.9
Ionske aminokiseline	31	4.9	32.2	46.8	37.1	39.2	36.7
Izoelektrična točka	4.7	3.8-3.9	6	4.5-4.8	6.5	6	6.8-7
Potencijalna dostupnost (milijun tona)	/	1.5	6.5	9.1	2.9	8.2	2.5
Biokompatibilnost	Potencijalna imunogenost	Da	Nejasno	<i>In vitro</i>	Ne	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>
Mehanička svojstva	Slaba	Izvrсна	Solidna	Dobra	Solidna	Dobra	Dobra
Topljivost							
Voda	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Etanol	Da	Ne	Da	Ne	Da	Ne	Ne
Org. otapala	Da	Da	Da	Ne	Da	Ne	Ne
Ionska otapala	Da	Da	/	Ne	/	/	/
Biomaterijali							
Film	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Vlakna	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Hidrogel	Ne	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Ne
Mikročestice	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Ne

Nanočestice	Da	Da	Da	Ne	Da	Ne	Ne
-------------	----	----	----	----	----	----	----

Biljni proteini su polarni i prirodno hidrofilni što ih u usporedbi s proteinima životinjskog porijekla čini pogodnijima za stvaranje međumolekulskih veza sa stanicama. Međutim, biljni proteini, posebno protein soje i glutena, se otapaju u ograničenom broju otapala što otežava proizvodnju biomaterijala. Nedostaci biljnih proteina mogu se smanjiti umrežavanjem sa sintetičkim polimerima što poboljšava mehanička svojstva, smanjuje topljivost u vodi te ih čini pogodnijim za upotrebu u medicinske svrhe (Reddy i Yang, 2011). Kao sredstva za umrežavanje najčešće se koriste formaldehid i glutardalehid, no zbog moguće toksičnosti i štetnosti za okoliš kao prirodne alternative proučavaju se galna kiselina i tanini (Jahangirian i sur., 2019). Također, pokazalo se da enzim transglutaminaza (slika 3) može poboljšati mehanička svojstva nosača katalizirajući reakcije stvaranja intra- i intermolekularnih kovalentnih veza. (Jiang i sur., 2007)

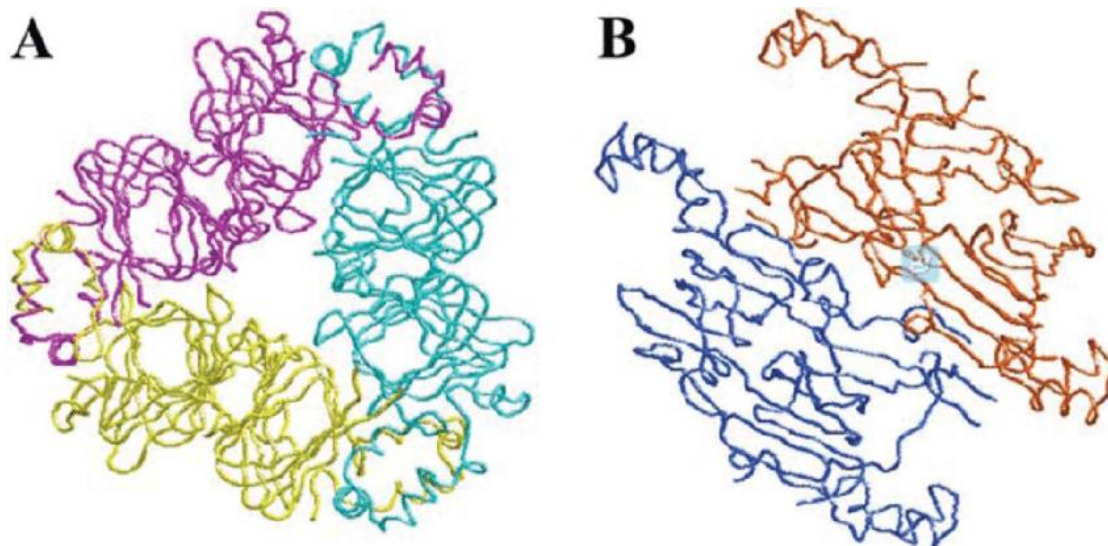


Slika 3. Reakcija između glutamina i lizina katalizirana transglutaminazom (Chien i Shah, 2012)

### 2.3.1. Sojin protein

Sjeme soje bogato je proteinima (40-50%) te se može procesirati u tri oblika bogata proteinima: sojino brašno gdje proteini čine 50% suhe tvari, sojin proteinski koncentrat u kojem proteini čine 70% suhe tvari i sojin proteinski izolat gdje proteini čine 90% suhe tvari. Glavni proteini soje su glicinin (11S) i  $\beta$ -konglicinin (7S) koji čine 34% i 27% proteina koji se nalaze u izolatu (slika 4). Protein soje dostupan je u izobilju, jeftin je i biorazgradiv što ga čini pogodnim za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Za poboljšanje njegovih svojstava uobičajeno je miješanje s drugim polimerima kao što su dekstran, hitozan, želatina, karagenan, škrob i ostali te je moguće formiranje različitih oblika nosača (Malafaya i sur., 2007).

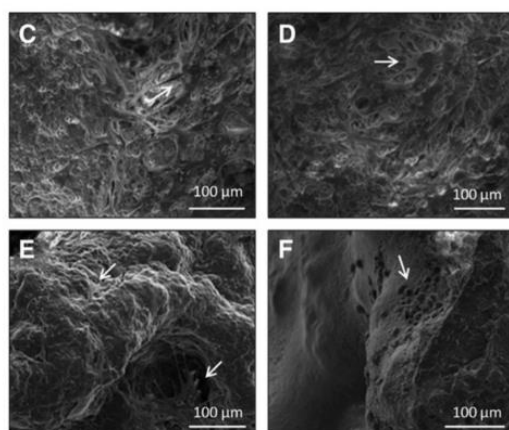




Slika 4. A: glicinin (11S) , B:  $\beta$ -konglicinin (7S) (Lv i sur., 2017 )

### 2.3.1.1. Porozni nosači od proteina soje

Chien i suradnici proizveli su 3D porozni nosač od sojinog proteina metodom 3D bioplota koja spada u metode brzog prototipiranja. Velika prednost ove metode je mogućnost kontrole veličine i geometrije pora. Pripremljena je suspenzija od 20%-tnog izolata sojinog proteina, 4%-tnog glicerola i 7,5 mM ditiotreitola koji uzrokuje pucanje disulfidnih veza te se mjerio maseni protok. Optimalni maseni protok za printanje sojine suspenzije pri 27 °C iznosi  $0,0072 \pm 0,0002$  g/s. Nosači su tretirani različitim postupcima na osnovu kojih su podijeljeni u 4 grupe: netretirani, tretirani dehidrotermalnim tretmanom (DHT), liofilizirani te tretirani dehidrotermalnim tretmanom (FD-DHT) i kemijski umreženi s 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidom (EDC) (slika 5). Kao najčvršći nosač se pokazao onaj tretiran s 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidom s modulom elastičnosti od 4 kPa. Svi nosači podržali su rast i preživljavanje ljudskih mezenhimskih matičnih stanica.

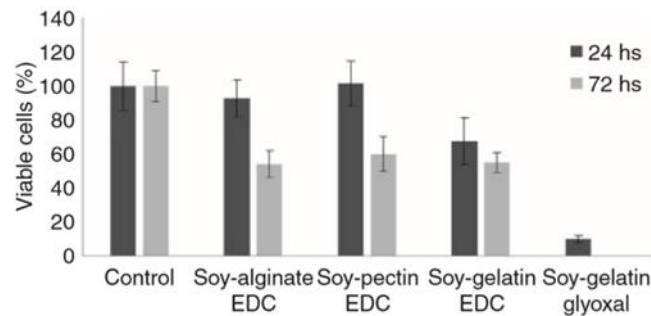


Slika 5. SEM prikaz nosača sa zasijanim stanicama na prvom danu. C: netretirani; D: FD-DHT, E: DHT, F: EDC. (Chien i sur., 2013)

U drugom je eksperimentu Chien i suradnika, protein soje toplinski obrađen i enzimski umrežen transglutaminazom u maltodekstrinu te je korišten za pripremu poroznog 3D nosača liofilizacijom. Pripravljene su kontrolne grupe nosača koji su sadržavali 3% i 5% izolata proteina soje te nosači umreženi s 1U i 20U transglutaminazom. Ljudske mezenhimske matične stanice zasijane su i kultivirane *in vitro* na nosačima te su kroz 2 tjedna proučavane promjene u rastu i morfologiji stanica. Enzimski tretman značajno je smanjio udio vlage posebice kod nosača s 3%-tnim izolatom i 20U transglutaminaze te ubrzao vrijeme degradacije za barem 1 tjedan kod nosača s 5%-tnim izolatom zbog elektrostatskih interakcija soli fosfatnog pufera i negativno nabijenog proteina soje, ali nije znatno utjecao na mehanička svojstva. Nosač s 3%-tnim izolatom umrežen s 1U transglutaminaze omogućio je proliferaciju stanica, a stanice su se integrirale u nosač nakon 2 tjedna.

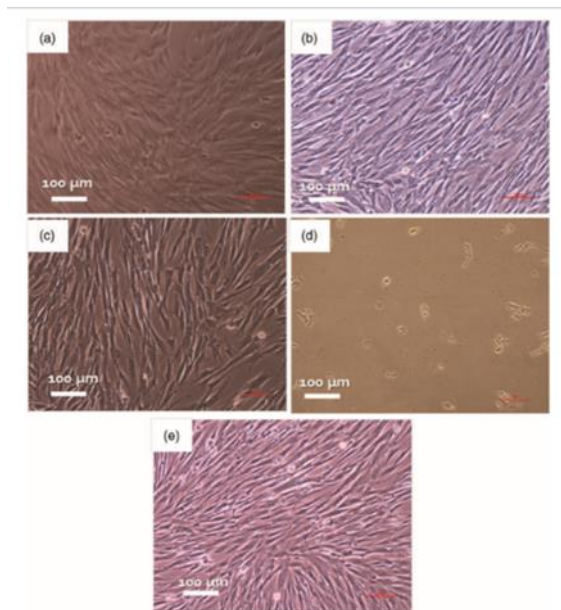
Gan i suradnici su izradili kanale za usmjeravanje aksonske regeneracije, radi olakšavanja regeneracije živaca, od celuloze i izolata proteina soje u obliku filma i spužve. Kao eksperimentalna životinja korišteni su štakori s 10 mm dugačkom prazninom u ishijadičnom živcu. Spužve od mješavine celuloze i izolata proteina soje pokazale su 2,69 puta veću poroznost i 5,07 puta veću apsorpciju vode što osigurava znatno veću permeabilnost. I filmovi i spužve pokazali su uspješnu regeneraciju živaca, no bolja regeneracija je postignuta kod spužvi. Rezultati su pokazali obećavajući potencijal biljnih proteina u obnovi živčanih oštećenja.

Olami i Zilberman kemijski su umrežili protein soje s drugim polimerima (želatina, pektin i alginati) koristeći karbodiimid (EDC) ili glioksal kao sredstva za umrežavanje procesom liofilizacije. Promatrali su parametre biokompatibilnosti i citotoksičnosti *in vitro* zasijavanjem i kultiviranjem humanih fibroblasta na nosače te morfologiju staničnog rasta (slika 6).



Slika 6. Preživljavanje fibroblasta na različitim nosačima nakon 24 i 72 sata (Olami i Zilberman, 2016)

Struktura pora na nosačima od mješavine soje i alginata posjeduje adekvatnu međusobnu povezanost pora u usporedbi sa nosačima od mješavine soje i želatine, dok je kod nosača od mješavine soje i pektina značajno niža poroznost (slika 7). Mješavina soje i alginata je u *in vitro* uvjetima pokazala značajnu citokompatibilnost te bolju infiltraciju i stabilnost od ostalih nosača zbog čega ima potencijal za primjenu u regeneraciji kože.



Slika 7. Kulture fibroblasta nakon 24 sata; a) soja-alginat b) soja-pektin c) soja-želatina d) soja-želatina s dodatkom glioksala e) kontrolna skupina (Olami i Zilberman, 2016)

### 2.3.1.2. Vlknasti nosači od proteina soje

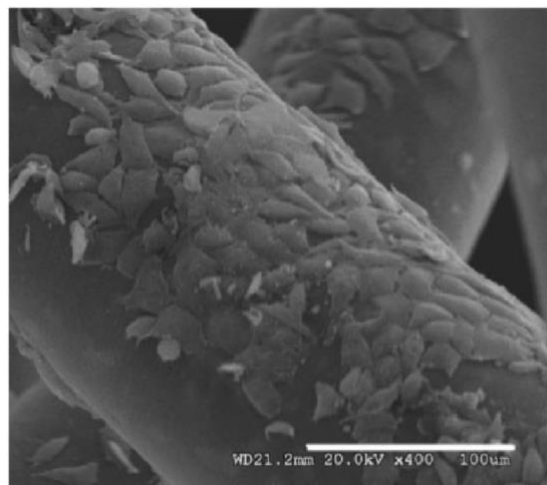
Lin L. i suradnici izradili su vlknaste elektroispredene nosače od izolata proteina soje s dodatkom 0.05% polietilen-oksida (PEO) otopljenog u 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolu. Nosači su pokazali stabilnost u vodenom mediju bez potrebe za dodatkom agenasa za umrežavanje te su podržali prijanjanje, rast i proliferaciju ljudskih dermalnih fibroblasta stoga mogu pronaći primjenu u regeneraciji kože.

Ramji i Shah ispitali su utjecaj parametara obrade poput primijenjenog napona, koncentracija izolata proteina soje i polietilen-oksida te molekulske mase polietilen-oksida na morfologiju elektroispredenih vlakana promjera 50-270 nm. Provedeno je umrežavanje s karbodiimidom kako bi se povećala čvrstoća. Promatrana je mehanička čvrstoća te *in vitro* biokompatibilnost nosača. Ljudske mezenhimske matične stanice uspješno su prijanjale i proliferirale na pripravljenim nosačima što pokazuje da strukturna i biološka svojstva ovih

elektroispredenih nosača od izolata proteina soje pokazuju potencijalnu primjenu u tkivnom inženjerstvu.

U srodnoj studiji Xu i suradnici proizveli su dvodimenzionalne (2D) i trodimenzionalne (3D) elektroispredene vlaknaste nosače za primjenu u inženjerstvu mekih tkiva. Iste koncentracije izolata proteina soje i natrijevog dodecil-sulfata (SDS) otopljene su u 0,3 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  puferu s dodatkom cisteina kao reducensa za cijepanje disulfidnih veza. Nosači su pokazali stabilnost u vodenom mediju do 28 dana u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom. Mezenhimske matične stanice izdvojene iz masnog tkiva bolje su se distribuirale na trodimenzionalnim nosačima u usporedbi sa dvodimenzionalnim zbog čvrstog pakiranja vlakana i nedostatka prostora u dvodimenzionalnim strukturama. Izlučena masnoća mezenhimskih matičnih stanica na nosačima dokazala je da protein soje može podržati i olakšati adipogenu diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica izdvojenih iz masnog tkiva u usporedbi s 3D komercijalnim nosačima.

Reddy i Yang razvili su vlakna od proteina soje dobre čvrstoće i stabilnosti u vodenom mediju bez dodatka vanjskog sredstva za umrežavanje. Vlakna od proteina soje imaju bolju čvrstoću u vlažnim uvjetima u odnosu na vlakna od kolagena te pogoduju prianjanju, rastu i proliferaciji fibroblasta miševa (slika 8). Vlakna su bolji oblik od filmova za rast i orijentaciju stanica stoga su poželjniji za primjenu u tkivnom inženjerstvu.



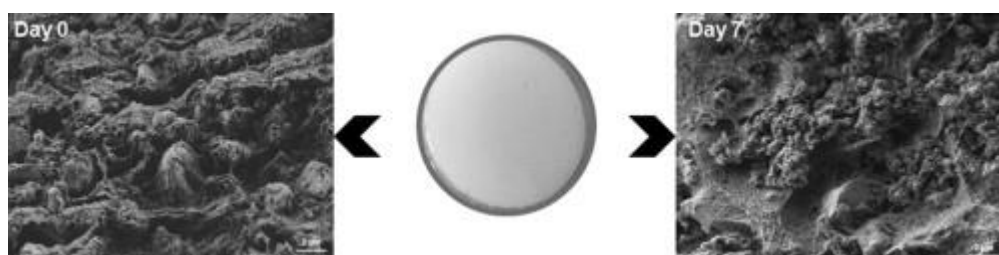
Slika 8. SEM prikaz fibroblasta miša na vlaknima proteina soje (Reddy i Yang, 2009)

Varshney i suradnici proizveli su elektroispredene nanovlaknaste nosače od mješavine izolata proteina soje i fibroina svile. Nanovlakna promjera 71-160 nm tretirana su parama

etanola kako bi se poboljšala vodootpornost strukture. Nosači su pokazali značajnu stabilnost pri 37 °C tijekom dužeg perioda izloženosti fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatima, hranjivom mediju i otopini koja sadrži lizozim. Nadalje, procijenjena je regeneracija kožnog tkiva *in vitro* kulturiranjem fibroblasta i melanocita na elektroispređenim nosačima. Svi ispitani nosači pokazali su netoksičnost prema normalnim stanicama sisavaca. Također je postignuto zacjeljivanje rana u štakora u 14 dana nakon tretmana s nosačima što je pokazalo potencijal za primjenu ovakvih materijala za tretiranje rana. Zanimljivo je da su ova nanovlakna izazvala značajno smanjenje proliferacije B16F10 stanicama melanoma.

### 2.3.1.3. Hidrogelovi od proteina soje

Silva i suradnici izradili su kompozitne hidrogelove od kombinacije alginata, izolata proteina soje i čestica bioaktivnog stakla prosječne veličine: 2 µm. Korišten je sonokemijski pristup i uspješno su dobiveni homogeni kompozitni hidrogelovi koji uključuju dvije koncentracije čestica bioaktivnog stakla. Daljnja fizičko-kemijska karakterizacija provedena je kako bi se procijenio utjecaj svake komponente na svojstva hidrogela. Proces biomineralizacije u simuliranoj tjelesnoj tekućini praćen je tijekom vremena, a rezultati su pokazali da kompozitni materijali mogu stvoriti površinski apatitni sloj nakon 7 dana provedenih u simuliranoj tjelesnoj tekućini (slika 9). Dizajn novih kompozitnih hidrogelova na bazi sojinog proteina, alginata i bioaktivnog stakla može biti prikladan pristup za regeneraciju kostiju.



Slika 9. Stvaranje površinskog apatitnog sloja (prvi i sedmi dan) (Silva i sur., 2014)

Lin H. i suradnici bioprintanjem su izradili nosače od mješavine poli(uretana) i izolata proteina soje u obliku hidrogelova. Printanje i zasijavanje stanica odvijalo se pri 37 °C bez prethodnog zagrijavanja. Provedena je analiza preživljavanja, metabolizma, proliferacije i ekspresije gena zasijanih neurona. Stanice kultivirane na nosačima od mješavine poliuretana i izolata proteina soje pokazale su bolje preživljavanje i proliferaciju u usporedbi sa stanicama

koje su zasijane na nosačima od samog poliuretana. Rezultati ukazuju na potencijal primjene proteina soje u inženjerstvu živčanog tkiva.

### **3. ZAKLJUČAK**

Porastom svijesti o štetnom utjecaju kemikalija zeleni i održivi principi revolucionizirali su brojna područja, no u tkivnom inženjerstvu tek pronalaze svoju primjenu. Najnovija dostignuća u tkivnom inženjerstvu često se baziraju na upotrebi trodimenzionalnih nosača koji služe kao kalupi za obnovu oštećenih tkiva i organa. Teško je pronaći zamjene za postojeće materijale koje će udovoljavati brojnim kriterijima za nosače u tkivnom inženjerstvu. Upotreba prirodnih polimera kao trodimenzionalnih nosača dobiva široku pozornost zahvaljujući svojim povoljnim svojstvima poput biokompatibilnosti, niskih troškova i lakoći obrade. Nastoje se riješiti postojeći problemi biljnih polimera kao što su brza razgradnja i slaba mehanička snaga. Protein soje, kao i proteini životinjskog porijekla, zbog svoje biološke strukture potiče staničnu adheziju, migraciju i proliferaciju, a zbog manje imunogenosti od proteina životinjskog porijekla sve češće pronalazi primjenu u obnovi različitih vrsta tkiva. Moguće je proizvesti različite tipove nosača koristeći protein soje kao osnovni materijal ili kao dio mješavine sa sintetskim i prirodnim materijalima te se ti nosači mogu koristiti za obnovu različitih tipova tkiva. Upotreba proteina soje u tkivnom inženjerstvu uvelike pridonosi ekološkoj prihvatljivosti i održivosti kojoj se u današnje vrijeme sve više teži.

### **4. POPIS LITERATURE**

Bao Ha T.L., Minh Quan T., Nguyen Vu D., Minh Si D. (2013) Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application. U: Regenerative Medicine and Tissue Engineering, Andrades J.A., IntechOpen, str. 247-274.

- Brovold M., Alemida J.I., Pla- Palacín I., Sainz-Arnal P., Sánchez-Romero N., Rivas J.J., Almeida H., Royo Dachary P., Serrano-Aulló T., Soker S., Baptista P.M. (2018) Naturally-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1077**: 421-449.
- Burg K.J., Porter S., Kellam J.F. (2000) Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **21**: 2347-2359.
- Chaudhari A.A., Vig K., Baganizi D.R., Sahu R., Dixit S., Dennis V., Singh S.R., Pillai S.R. (2016) Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International journal of molecular sciences* **17**: 1974-2005.
- Chen L., Remondetto G.E., Subirade M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 272-283.
- Chien K.B, Shah R.N. (2012) Novel soy protein scaffolds for tissue regeneration: Material characterization and interaction with human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* **8**: 694-703.
- Chien K.B., Makridakis E., Shah R.N. (2013) Three-Dimensional Printing of Soy Protein Scaffolds for Tissue Regeneration. *Tissue Engineering: Part C* **19**: 417-426.
- Curt S., Subirade M., Rouabhia M (2009) Production and In Vitro Evaluation of Soy Protein–Based Biofilms as a Support for Human Keratinocyte and Fibroblast Culture. *Tissue Engineering: Part A* **15**: 1223-1232.
- Gan L., Zhao L., Zhao Y., Li K., Tong Z., Yi L., Wang X., Li Y., Tian W., He X., Zhao M., Li Y., Chen Y. (2016) Cellulose/soy protein composite-based nerve guidance conduits with designed microstructure for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering* **13**: 1-17.
- Goulet R.W., Goldstein S.A., Ciarelli M.J., Brown M.B., Feldkamp L.A. (1994): The Relationship between the Structural and Orthogonal Compressive Properties of Trabecular Bone. *Journal of Biomechanics* **27**: 375-389.
- Guarino V., Causa F., Taddei P., Di Foggia M., Ciapetti G., Martini D., Fagnano C., Baldini N., Ambrosio L. (2008) Polylactic Acid Fibre-Reinforced Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **29**: 3662-3700.
- Ikada Y. (2006) Challenges in Tissue Engineering. *Journal of the Royal Society Interface* **3**: 589-601.



Iravani S., Varma R.S. (2019) Plants and plant-based polymers as scaffolds for tissue engineering. *Green Chemistry* **21**: 4839-4867.

Ivanković M., Bauer L., Ressler A., Rogina A., Antunović M., Ivanković H. (2019) Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva. *Kemija u Industriji* **68**: 437–447.

Jahangirian H., Azizi S., Rafiee-Moghaddam R., Baratvand B., Webster T.J. (2019) Status of Plant Protein-Based Green Scaffolds for Regenerative Medicine Applications. *Biomolecules* **9**: 619-659.

Jiang Y., Tang C.H., Wen Q.B., Li L., Yang X.Q. (2007) Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**: 218-225.

Krmpotić E., Tominac P., Izrada i karakterizacija elektroispređenih nosača s uzorkovanom topografijom za uzgoj ljudskih stanica kože (ili oka), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.

Lv C., Zhao G., Ning Y. (2017) Interactions Between Plant Proteins/Enzymes and Other Food Components, and Their Effects on Food Quality. *Critical reviews in food science and nutrition* **57**: 1718-1728.

Lin H., Hsieh F., Tseng C., Hsu S. (2016) Preparation and Characterization of Biodegradable Polyurethane Hydrogel and the Hybrid Gel With Soy Protein for 3D-cell-laden Bioprinting. *Journal of Materials Chemistry B* **4**: 6694-6705.

Lin L., Perets A., Har-el Y., Varma D., Li M., Lazarovici P., Woerdeman D.L., Lelkes P.I. (2012) Alimentary 'green' proteins as electrospun scaffolds for skin regenerative engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **7**: 994-1008.

Malafaya P.B., Silva G.A., Reis R.L. (2007) Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**: 207-233.

Mallick K.K., Cox S.C. (2013) Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in Bioscience, Elite* **5**: 341-360.

Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H.P. (2009) Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Springer. str. 9.

O'Brien F.J. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* **14**: 88-95.

- Olami H., Zilberman M. (2016) Microstructure and in vitro cellular response to novel soy protein-based porous structures for tissue regeneration applications. *Journal of Biomaterials Applications* **30**: 1004–1015.
- Peng Y.Y., Glattauer V., Ramshaw J.A.M., Werkmeister J.A. (2010) Evaluation of the Immunogenicity and Cell Compatibility of Avian Collagen for Biomedical Applications. *Journal of biomedical materials research. Part A* **93**: 1235-1244.
- Ramji K., Shah R.N. (2014) Electrospun soy protein nanofiber scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Applications* **29**: 411-422.
- Reddy N., Yang Y. (2009) Soyprotein Fibers with High Strength and Water Stability for Potential Medical Applications. *Biotechnology progress* **25**: 1796-1802.
- Reddy N., Yang Y. (2011) Potential of Plant Proteins for Medical Applications. *Trends in Biotechnology* **29**: 490-508.
- Silva R., Bulut B., Roether J.A., Kaschta J., Schubert D.W., Boccaccini A.R. (2014) Sonochemical processing and characterization of composite materials based on soy protein and alginate containing micron-sized bioactive glass particles. *Journal of Molecular Structure* **1073**: 87-96.
- Varshney N., Sahi A.K., Poddar S. (2020) Soy protein isolate supplemented silk fibroin nanofibers for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* **160**: 112-127.
- Xu H., Cai S., Sellers A., Yang Y. (2014) Intrinsically water-stable electrospun threedimensional ultrafine fibrous soy protein scaffolds for soft tissue engineering using adipose derived mesenchymal stem cells. *Royal Society of Chemistry* **4**: 15451–15457.
- Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K. (2002) The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. *Tissue Engineering* **8**: 1-23.
- Yeong W.Y., Chua C.K., Leong K.F., Chandrasekeran M (2004) Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology* **22**: 643-652.