

Agen Crosslink dalam Pembuatan Biomimetic Scaffold Sebagai Material Rekayasa Jaringan Tulang

Fitria Rahmitasari, Sularsih

Departemen Material Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah
Surabaya, Indonesia

ABSTRAK

Kasus kerusakan tulang di bidang kedokteran gigi seperti soket post pencabutan gigi dan periodontitis dapat menimbulkan rasa sakit dan mengganggu fungsi pengunyahan, sehingga dibutuhkan suatu material rekayasa jaringan berupa biomimetic scaffold dengan menirukan struktur dan fungsi asli dari tulang. Bahan material untuk rekayasa jaringan tulang yang telah berkembang secara luas antara lain penggunaan kolagen, gelatin, kitosan, dan hidroksiapatit. Material alami tersebut dapat saling dikombinasikan dengan menggunakan agen crosslink dalam proses pembuatan scaffold. Telaah pustaka ini bertujuan untuk mengetahui peran agen crosslink dalam pembuatan biomimetic scaffold sebagai material rekayasa jaringan tulang di bidang kedokteran gigi. Material pada pembuatan scaffold merupakan polimer alam yang dapat dimodifikasi dengan penggabungan polimer lain. Penggabungan polimer lain dapat dilakukan dengan penambahan agen crosslink dengan cara iradiasi maupun melalui reaksi kimia. Peran agen crosslink dalam suatu kombinasi material dapat meningkatkan resistensi bahan terhadap panas, cahaya, dan sifat fisik lain, serta dapat meningkatkan derajat kestabilan dimensi dan kekuatan mekanik. Simpulannya bahwa bentuk agen crosslink dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan biomimetic scaffold yang baik sehingga dapat mengoptimalkan sifat osteokonduktivitas dari material rekayasa jaringan tulang khususnya pada kasus kedokteran gigi.

Kata kunci: crosslink, scaffold, biomimetic

Crosslink Agents in Biomimetic Scaffold Fabrication as a Material Of Bone Tissue Engineering

ABSTRACT

Case of bone destruction such as socket of post-tooth extraction and periodontitis can cause pain and disrupt the function of mastication, so it takes a tissue engineering material in the form of biomimetic scaffold by mimicking the structure and the original function of bone. Material for bone

Korespondensi:

Fitria Rahmitasari

Email: fitria.rahmitasari@hangtuah.ac.id

tissue engineering that has grown widely include the use of collagen, gelatin, chitosan, and hydroxyapatite. These materials can be mutually combined using crosslink agents in the scaffold fabrication process. Determine the role of crosslink agents in the manufacture of biomimetic scaffolds as bone tissue engineering materials in the field of dentistry. Material in the scaffold fabrication is a polymer which can be modified by the incorporation of other polymers. Additionally, polysaccharides have abundant functional groups such as hydroxyl groups, amino groups and/or carboxylic acid groups, amenable to various types of chemical modifications. Modification with other polymers can be done by adding crosslink agents by irradiation or through chemical reactions. The role of a crosslink agent in a material modification can increase the material resistance to heat, light, other physical properties, and can increase the degree of dimensional stability and mechanical strength so these values are important to consider for the survival of cells in scaffolds at early time points. Different forms of crosslink agents can be utilized to obtain good biomimetic scaffold so that optimize the osteoconductivity properties of bone tissue engineering.

Keywords: Crosslink, Scaffold, Biomimetic

LATAR BELAKANG

Kerusakan tulang merupakan kasus paling umum yang dapat menyebabkan rasa nyeri berkepanjangan dan gangguan fisik pada banyak orang di dunia¹ Fraktur tulang adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling kritis dan dianggap sebagai penyebab utama kecacatan dan morbiditas.^{2,3} Perawatan klinis dengan pemanfaatan bahan autograft and allograft memerlukan biaya yang mahal dan tidak menjamin hasil yang baik. Selain itu, komplikasi sekunder seperti infeksi, penolakan graft, biokompatibilitas yang kurang, dan daya tahan yang terbatas dari bahan yang digunakan untuk regenerasi tulang menimbulkan resiko yang cukup besar bagi pasien. Rekayasa jaringan

tulang berupaya untuk mengembangkan bahan pengganti biologis yang dapat mengintegrasikan tiga karakteristik penting dari tulang alami yaitu osteokonduktif, osteoinduktif, dan osteogenesis.⁴

Pada umumnya material pengganti tulang yang ideal harus memiliki sifat biodegradable, tidak menyebabkan toksik, kompatibel dengan sistem imun host, mendukung perlekatan sel, pertumbuhan, dan diferensiasi sel-sel yang nantinya akan menginisiasi terbentuknya jaringan tulang baru hingga terjadi remodelling tulang.⁵ Scaffold 3D sebagai bahan regenerasi jaringan tulang telah banyak dikembangkan untuk mendukung pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi sel-sel kondrosit dan/atau sel-sel progenitor.⁶ Saat ini telah dikembangkan bahan alternatif pengganti autograft dan allograft yang dapat didesain mirip sesuai komposisi, bentuk, dan strukturnya yang dapat mendukung terbentuknya jaringan baru secara bertahap.⁷ Rekayasa jaringan dikembangkan pada pembuatan biopolimer dalam bentuk scaffold untuk mengurangi kelemahan dari bone graft secara tradisional dengan cara mensubstitusi dan meningkatkan kelebihan seperti osteoinduktivitas dari scaffold.⁸ Bahan biopolimer seperti kolagen, selulosa, pati, dan kitosan memiliki kekuatan mekanik yang lemah dan degradasi yang besar. Agen crosslink dibutuhkan dalam pembuatan scaffold untuk meningkatkan kekuatan mekanik dan degradasi yang lebih baik.⁹

Crosslinking adalah salah satu area terpenting pada pengembangan scaffold untuk regenerasi tulang. Tujuan utama dari crosslinking adalah untuk memperbaiki sifat biomekanik dari scaffold dengan cara membentuk ikatan yang kuat dalam matriks polimer.¹⁰ Crosslink dapat meningkatkan sifat biomaterial namun sebagian besar agen crosslink dapat menyebabkan perubahan yang tidak diinginkan pada fungsionalitas biopolimer dan dapat menghasilkan sitotoksitas.¹¹ Beberapa macam agen crosslink diantaranya adalah dehydrothermal treatment (DHT), radiasi ultraviolet (UV), glutaraldehyde (GTA), genipin, 1-ethyl-3-

(3-dimethylamino propyl) carbodi-imide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), dan ribose.^{12,13,14} Sifat mekanik menjadi faktor penting dalam mendesain scaffold dalam penggunaan rekayasa jaringan dimana scaffold harus memiliki karakteristik yang cocok untuk memfasilitasi penanganan kasus regenerasi tulang pada penanganan in vivo dan in vitro.¹⁵

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan diatas, penulis ingin memaparkan mengenai peran agen crosslink dalam pembuatan biomimetic scaffold sebagai material rekayasa jaringan tulang.

TELAAH PUSTAKA

Crosslink merupakan teknik yang sering digunakan untuk meningkatkan sifat mekanik dari hidrogel-based biomaterial dengan cara membentuk ikatan antar molekul yang dapat memperkuat serat-serat hidrogel dan mencegah terjadinya "long rod-like molecule" dari terlepasnya rantai yang satu dengan yang lainnya di bawah tekanan stress.¹⁶ Tujuan crosslinking antara lain adalah melakukan interkoneksi antar molekul, meningkatkan berat molekul, sifat mekanik, dan aktivitas selular, meningkatkan derajat kestabilan, dan ketahanan bahan terhadap panas, cahaya, dan sifat fisik lain. Meskipun demikian, crosslinking terkadang tidak mudah untuk dilakukan dan memiliki potensi sitotoksik.¹⁷

Teknologi crosslinking dibagi menjadi dua kelompok yaitu chemical crosslinking dan biophysical crosslinking. Chemical crosslinking dapat dilakukan dengan menggunakan bahan glutaraldehid, golongan carbodiimides (misal: 1-ethyl 3-3 dimethyl aminopropyl carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS)), dan genipin. Sedangkan biophysical crosslinking dapat dilakukan dengan cara penyinaran menggunakan sinar ultraviolet (UV) dan dehidrotermal. Pada biophysical crosslinking tidak membutuhkan reagen sitotoksik.¹⁵

Pada Tabel 1 menyebutkan penggunaan agen crosslink yang dapat digunakan untuk material regenerasi tulang berupa scaffold.

Jenis Crosslinking	Material Scaffold Regenerasi Tulang				
	Gelatin	Kolagen	Selulosa	Hidroksiapatit	Kitosan
Glutaraldehid	√	√	√	√	√
Genipin	√	√	√	-	√
1-ethyl 3-3 dimethyl amino-propyl carbodiimide (EDAC)	√	√	-	√	√
N-hydroxysuccinimide (NHS) Biophysical crosslinking	√	√	-	√	√
Sinar UV	√	√	-	√	√
Dehidrotermal (DHT)	√	√	√	√	√

PEMBAHASAN

Chemical crosslinking dapat terjadi secara utama melalui ikatan kovalen amina atau imina.¹⁸ Penggunaan aldehid seperti glutaraldehid atau gliseraldehid dapat meningkatkan sifat mekanik dan mengurangi imunogenisitas, namun memiliki tingkat stabilitas jangka panjang yang rendah dan diketahui sangat sitotoksik.¹⁹ Glutaraldehid adalah agen crosslink yang secara luas digunakan dalam bidang biomedis karena bahan ini dapat secara efektif menstabilkan material kolagen beserta derivatnya.⁹ Crosslinking material kolagen dan derivatnya yang menggunakan agen crosslink glutaraldehid dapat menghasilkan reaksi pembebasan gugus amina dari lisin atau residu asam amino hidroksilis di dalam rantai kolagen peptida dan gugus aldehid dari glutaraldehid menghasilkan ikatan imina.²⁰ Beberapa penelitian menyebutkan bahwa agen crosslink yang paling umum digunakan untuk scaffold gelatin adalah uap glutaraldehid atau larutan glutaraldehid.^{21,22} Penggunaan uap glutaraldehid sebagai agen crosslink membutuhkan waktu yang lama dan dibatasi oleh ketebalan bahan scaffold karena uap glutaraldehid tidak dapat dengan mudah menembus ke bagian dalam scaffold, sehingga menghasilkan derajat ikatan silang yang buruk. Reaksi crosslinking dengan

larutan glutaraldehid jauh lebih cepat dibandingkan dengan cara penguapan, dengan hasil efek ikatan silang yang baik, tetapi residu glutaraldehid sulit untuk dihilangkan sepenuhnya setelah pengikatan silang terjadi. Residu glutaraldehid tersebut menyebabkan sitotoksik sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan sel. Untuk mengurangi toksisitas dan efek samping dari residu glutaraldehid setelah pengikatan silang terjadi, pada umumnya ditambahkan dengan larutan glisin untuk menon-aktifkan gugus aldehyd dari residu glutaraldehid. Namun pada saat proses pencucian berikutnya, molekul glisin dapat jatuh dan menghasilkan paparan gugus aldehyd dari glutaraldehid yang dapat menyebabkan kerusakan sel.²³

Selain itu crosslinking melalui ikatan kovalen juga bisa ditemukan pada penggunaan bahan 1-ethyl 3-(3-dimethyl aminopropyl carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS) dalam air atau larutan etanol.¹⁹ EDAC digunakan untuk bahan crosslink antara polisakarida dan protein. Bahan ini berpartisipasi dalam reaksi antara molekul yang mengandung gugus karboksilat dan amina bebas untuk membentuk ikatan amida, ekstensi, proliferasi, dan diferensiasi. EDAC menunjukkan biokompatibilitas dan toksisitas yang rendah karena tidak dimasukkan ke dalam struktur scaffold. EDAC banyak digunakan dalam berbagai biomaterial berbasis asam amino.^{24,25} Resistensi hidrolisis EDAC yang tidak ideal dapat menghasilkan kekuatan mekanik yang rendah dan pada akhirnya akan mempengaruhi pertumbuhan sel.²³

Genipin adalah salah satu komponen utama buah gardenia (*Gardenia jasminoides* ELLIS) yang dapat menghasilkan ikatan silang secara spontan dengan protein, kolagen, gelatin, kitosan, dan lain-lain. Banyak penelitian telah mencatat bahwa sitotoksitas dan genotoksitas yang ditimbulkan genipin sangat rendah jika dibandingkan dengan aldehyd.^{26,27} Genipin adalah agen crosslink yang terjadi secara alami dan lebih unggul dari chemical crosslinking lain karena memiliki toksisitas 10.000 kali lebih rendah

daripada aldehyd dan crosslink epoksi.²⁸ Genipin bereaksi dengan asam amino dalam kolagen atau derivatnya yang mengandung gugus samping amina, seperti lisin dan arginin, untuk membentuk pigmen biru tua yang digunakan dalam pembuatan pewarna makanan. Bahan gelatin yang di crosslinking dengan genipin akan menjadi warna biru tua, sehingga genipin sering digunakan sebagai pewarna. Bahan gelatin yang memiliki ikatan genipin memiliki porositas tinggi. Dengan porositas yang relatif besar, metabolisme nutrisi lebih mungkin terjadi, sehingga sel-sel dapat masuk ke bagian scaffold. Selain itu, scaffold yang dicrosslinking dengan genipin menunjukkan ketahanan yang baik terhadap hidrolisis dan enzimolisis.²³

Dari keseluruhan agen crosslink yang telah dipaparkan diatas, penggunaan chemical crosslinking pada pembuatan scaffold untuk regenerasi tulang paling dikenal dan terbukti paling efektif meskipun dapat menimbulkan efek sitotoksik.

Berikut ini adalah Tabel 2 yang membandingkan kelebihan dan kekurangan dari agen chemical crosslinking:

Tabel 2. Kelebihan dan Kekurangan Chemical Crosslinkin^{29,30,31,32,33}

Agen crosslink	Kelebihan	Kekurangan
Glutaraldehid	<ol style="list-style-type: none"> 1. Menjadi gold standard agen crosslink untuk pembuatan scaffold 2. Tidak mahal 3. Meningkatkan biokompatibilitas dan ketahanan bahan scaffold 4. Tingkatan agen crosslink yang paling baik dibanding bahan lain 5. Dapat berikatan silang dengan banyak jenis polimer 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toksisitas terhadap sel tinggi 2. Dapat menyebabkan inflamasi yang parah pada tubuh 3. Bahan ini merupakan limbah yang berbahaya bagi masyarakat 4. Perlu larutan spesifik untuk menghilangkan residu hasil crosslinking 5. Scaffold dapat berubah warna menjadi kuning
Golongan Carbodiimide (mis: EDAC, NHS)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toksisitas terhadap sel lebih rendah 2. Dapat dilakukan penghilangan residu hasil crosslinking menggunakan distilled water 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mahal 2. Tingkatan agen crosslink lebih rendah daripada glutaraldehid
Genipin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toksisitas terhadap sel lebih rendah dibandingkan dengan glutaraldehid 2. Biokompatibel 3. Tingkat agen crosslink baik 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sangat mahal 2. Scaffold yang telah di-crosslinking bisa berubah menjadi warna biru.

Biophysical crosslinking dapat dilakukan dengan penggunaan sinar ultraviolet dan dengan cara teknologi dehidrotermal. Dehidrotermal dilakukan dengan cara meningkatkan temperatur (>98°C) di bawah vakum untuk menghilangkan air dari molekul-molekul kolagen sehingga terjadi pembentukan intermolekuler pada ikatan silang melalui reaksi kondensasi.¹⁵ Dehidrotermal (DHT) adalah metode chemical crosslinking yang disertai dengan reaksi kondensasi dengan menghilangkan molekul air dari suatu material di bawah temperatur yang tinggi untuk menghasilkan bahan seperti poliester, poliether, poliamina, poliamida dan lain-lain. Secara teori, DHT dapat dilakukan pada temperatur lebih dari 100°C. Penggunaan DHT pada material kolagen dapat dilakukan pada temperature 130-140°C.²⁹ DHT merupakan metode yang aman dan mudah untuk meningkatkan sifat dan struktur polimer dari scaffold. Pada beberapa kasus lain dibutuhkan adanya modifikasi untuk menghasilkan material yang lebih baik.³⁴

Di bawah ini adalah Tabel 3 yang membandingkan kelebihan maupun kekurangan dari metode crosslinking:

Tabel 3. Kelebihan dan Kekurangan Jenis Metode Crosslinking²⁹

Metode crosslinking	Kelebihan	Kekurangan
Chemical crosslinking	Dapat membentuk ikatan yang sangat kuat	1. Memiliki sifat toksik pada sel 2. Perlu dilakukan penghilangan residu setelah dilakukan crosslinking 3. Lebih mahal daripada physical crosslinking
Physical crosslinking	1. Lebih aman daripada chemical crosslinking 2. Toksisitas terhadap sel rendah 3. Reaksi terhadap jaringan minimal 4. Murah	1. Ikatan jauh lebih lemah daripada menggunakan chemical crosslinking 2. Membutuhkan waktu yang lebih lama untuk proses crosslinking 3. Tingkatan terendah dari crosslinking 4. Kurangnya kontrol dari reaksi kinetik crosslinking

SIMPULAN

Agen crosslink memiliki peran menjanjikan dalam rekayasa jaringan tulang. Untuk menghasilkan biomimetic scaffold dengan sifat mekanik dan aktivitas selular yang baik dibutuhkan agen crosslink untuk menyatukan antar molekul kombinasi polimer satu dengan yang lain. Pemilihan dan perlakuan dalam pemberian crosslink tergantung pada jenis dan sifat dari polimer. Scaffold yang diberi bahan crosslink secara signifikan dapat meningkatkan sifat fisik, kimia, dan mekanik sehingga dapat mengoptimalkan sifat osteokonduktivitas dari material regenerasi tulang khususnya pada kasus kedokteran gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Dhand C, Ong ST, Dwivedi N, Diaz SM, Venugopal JR, Navaneethan B, Fazil MHUT, Liu S, Seitz V, Wintermantel E, Beuerman RW, Ramakrishna S, Verma NK, Lakshminarayanan R. 2016. Bio-Inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. pp.2.
- Borgström F, Lekander I, Ivergård M, Svedbom A, Bianchi ML, Clark P, Cluriel MD, Dimai HP, Jurisson M, Kallikorm R, Lesnyak O, McCloskey E, Sanders KM, Silverman S, Tamulaitiene M, Thomas T, Tosteson AN, Jonsson B, Kanis JA. 2013. The International Costs and Utilities Related to Osteoporotic Fractures Study (ICUROS)-quality of life during the first 4 months after fracture. *Osteoporos Int*. 24(3): 811-23.
- Ensrud KE. 2013. Epidemiology of fracture risk with advancing age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 68: 1236-42.
- Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 30: 546-54.
- Suchý T, Šupová M, Sauerová P, Verdánová M, Sucharda Z, Rýglová Š, Žaloudková M, Sedláček R, Kalbáčová MH. 2015.

- The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds-an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomed Mater.* 10(6): 065008.
6. Jin R, Moreira TLS, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J. 2010. Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 31: 3103-13.
 7. Filardo G, Kon E, Tampieri A, Cabezas-Rodríguez R, Di Martino A, Fini M, Giavaresi G, Lelli M, Martínez-Fernández J, Martini L, Ramírez-Rico J, Salamanna F, Sandri M, Sprio S, Marcacci M. 2014. New Bio-Ceramization Processes Applied to Vegetable Hierarchical Structures for Bone Regeneration: An Experimental Model in Sheep. *Tissue Eng. Part A.* 20 (3-4): 763-73.
 8. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. 2012. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering.* 40(5): 363-408.
 9. Poursamar SA, Lehner AN, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Samadikuchaksaraei A, Antunes AP. 2016. The effects of crosslinkers on physical, mechanical, and cytotoxic properties of gelatin sponge prepared via in-situ gas foaming method as a tissue engineering scaffold. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 63: 1-9.
 10. Daemi H, Barikani M. 2012. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica.* 19: 2023-2028.
 11. Reddy N, Reddy R, and Jiang Q. 2015. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology.* 33(6):362-9.
 12. Shankar KG, Gostynska N, Montesi M, Panseri S, Sprio S, Kon M, Marcacci M, Tampieri A, Sandri M. 2017.
 13. Lin WH, Tsai WB. 2013. In situ UV-crosslinking gelatin electrospun fibers for tissue engineering applications. *Biofabrication.* 5(3): 035008.
 14. Davidenko N, Schuster CF, Bax DV, Raynal N, Farndale RW, Best SM, Cameron RE. 2015. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomater.* 25: 131-42.
 15. Haugh MG, Murphy CM, McKiernan RC, Altenbuchner C, O'Brien FJ. 2011. Crosslinking and Mechanical Properties Significantly Influence Cell Attachment, Proliferation, and Migration Within Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds. *Tissue Engineering: Part A.* 0(0): 1-8.
 16. Lee CR, Grodzinsky AJ, and Spector M. 2001. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials.* 22: 3145.
 17. Jiang Q, Reddy N, Yang Y. 2010. Cytocompatible cross-linking of electrospun fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.* 6: 4042-51.
 18. Walters BD and Stegemann JP. 2014. Strategies for directing the structure and function of 3D collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater.* 10: 1488-501.
 19. Prosecká E, Rampichová M, Litvinec A, Tonar Z, Králíčková M, Vojtová L, Kochová P, Plencner M, Buzgo M, Míčková A, Jančář J, Amler E. 2015. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 103 (2): 671-82.
 20. Furuike T, Chaochai T, Okubo T, Mori T, Tamura H. 2016. Fabrication of nonwoven fabrics consisting of gelatin nanofibers crosslinked by glutaraldehyde or

- N-acetyl-d-glucosamine by aqueous method. *Int J Biol Macromol.* 93: 1530-8.
21. Ito R, Morimoto N, Liem PH, Nakamura Y, Kawai K, Taira T, Tsuji W, Toi M, Suzuki S. 2014. Adipogenesis using human adipose tissue-derived stromal cells combined with a collagen/gelatin sponge sustaining release of basic fibroblast growth factor. *J Tissue Eng Regen Med.* 8: 1000-8.
 22. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Henriques CM, Silva JC. 2013. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 33: 1219-27.
 23. Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. 2018. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports.* 8:1616.
 24. Kabiri M, Emami SH, Rafinia M, Tahriri M. 2011. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications. *Curr Appl Phys.* 11: 457-61.
 25. Cholas RH, Hsu HP, Spector M. 2012. The reparative response to cross-linked collagen-based scaffolds in a rat spinal cord gap model. *Biomaterials.* 33: 2050-9.
 26. Chang Y, Hsu CK, Wei HJ, Chen SC, Liang HC, Lai PH, Sung HW. 2005. Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies. *J. Biotechnol..* 120: 207-19.
 27. Zhang X, Chen X, Yang T, Zhang N, Dong L, Ma S, Liu X, Zhou M, Li B. 2014. The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell Tissue Bank.* 15: 531-41.
 28. De Clercq K, Schelfhout C, Bracke M, De Wever O, Van Bockstal M, Ceelen W, Remon JP, Vervaet C. 2016. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a strategy to prevent postsurgical peritoneal adhesions: In vitro and in vivo characterization. *Biomaterials.* 96: 33-46.
 29. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand A, Daemi H. 2017. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules.* pp.1-34.
 30. Ma B, Wang X, Wu C, Chang J. 2014. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regenerative Biomaterials.* 1(1): 81-9.
 31. Kim SS, Lim SH, Cho SW, Gwak SJ, Hong YS, Chang BC, Park MH, Song KW, Choi CY, Kim BS. 2006. Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells. *Experimental & Molecular Medicine.* 38(3): 273-83.
 32. Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V, Fluss F, Rohde D, Gebert A, Sievers HH. 2009. Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation.* 119(12): 1653-60.
 33. Walmsley GG, McArdle A, Tevlin R, Momeni A, Atashroo D, Hu MS, Feroze AH, Wong VW, Lorenz PH, Longaker MT, Wan DC. 2015. Nanotechnology in bone tissue engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 11(5): 1253-63.
 34. Drexler JW, Powell HM. 2011. Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen. *Tissue Engineering Part C.* 17(1): 9-17.