



PREGLEDNI RAD / REVIEW

Postupci obrade i pripreme životinjske izvanstanične matrice za primjenu u tkivnom inženjerstvu

Preparation of animal extracellular matrix for tissue engineering

Teodora Prebeg¹, Tamara Dolenc², Igor Slivac^{3*}, Gordana Matijašić¹¹ Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska² Banka tkiva i stanica, Zavod za transfuzijsku i regenerativnu medicinu, KBC "Sestre milosrdnice", Draškovićeva 19, Zagreb, Hrvatska³ Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska*

*Corresponding author: islivac@pbf.unizg.hr

Sažetak

Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno područje koje isprepliće biomedicinske znanosti te inženjerstvo. Razvojem navedenih grana i sve strožim zahtjevima kliničke medicine, nametnula se potreba za razvojem biokompatibilnih te bioaktivnih implantata koji bi mogli zamjenjivati i poticati regeneraciju oboljelog tkiva. U cilju razvoja biomimetičkih materijala i implantata, decelularizacija se istaknula kao pogodna metoda jer izolira prirodno prisutnu izvanstaničnu matricu sa svim komponentama iz odabranog tkiva te uklanja stanice i genski sadržaj koji bi mogao izazvati reakciju imuniteta pacijenta. Razvijeno je više metoda decelularizacije koje se mogu podijeliti na kemijske, fizikalne, biokemijske te kombinirane. Svaka metoda specifična je i razvija se za pojedino tkivo te se najčešće koriste kombinirane metode jer kombiniraju dobra svojstva pojedinih metoda pa postižu dobro uklanjanje stanica uz minimalna oštećenja komponenti izvanstanične matrice. Na tržištu su već dostupni proizvodi pripremljeni od decelularizirane izvanstanične matrice te se daljnjim razvojem područja očekuje njihov sve veći broj.

Ključne riječi: tkivno inženjerstvo, decelularizacija, izvanstanična matrica

Abstract

Tissue engineering is an interdisciplinary field that combines biomedical sciences and engineering. With the development of the aforementioned scientific fields and the increasingly strict requirements of clinical medicine, the need has arisen to develop biocompatible and bioactive implants that can replace damaged tissue and stimulate its regeneration. Decellularization was a suitable method for developing biomimetic materials and implants, as it isolates the natural extracellular matrix with all its components from the selected tissue and removes the cells and genetic content that could trigger a reaction from the patient's immunity. Several decellularization methods have been developed, which can be divided into chemical, physical, biochemical and combined methods. Each method has been developed for a specific tissue, with combined methods being the most commonly used as they combine the good properties of the individual methods and achieve good cell removal with minimal damage to the components of the extracellular matrix. Commercial products made from decellularized extracellular matrix are already in clinical use and the number is expected to increase with further development in this field.

Keywords: tissue engineering, decellularization, extracellular matrix

Uvod

Usljed bolesti, nezgoda i starenja organizma dolazi do propadanja tkiva, a ponekad i organa u cijelosti. Stoga ih je potrebno liječiti, a u slučaju kada to nije moguće, regenerirati ili u potpunosti zamijeniti. Upravo regeneracija i zamjena oboljelog tkiva fokus je tkivnoga inženjerstva, interdisciplinarnog područja kojega su, u smislu u kojemu ga danas koristimo, prvi definirali Vacanti i Langer 1993. godine. Otada se može uočiti značajan porast broja publiciranih članaka u području tkivnoga inženjerstva, što ukazuje na prepoznavanje važnosti razvoja navedenog područja (Vacanti i Langer, 1999). Pri tome, važno je razlikovati tkivno inženjerstvo od regenerativne medicine koja podrazumijeva poticanje regeneracije tkiva u in vivo uvjetima, odnosno u tijelu pacijenta. Nastojanje da se zamijeni oboljelo ili oštećeno tkivo seže još u doba pretpovijesti, pa se tako među prve implantate ubrajaju umjetni zubi, udovi, povezi za oči te autolozi, presadci s jednog dijela tijela na drugo. U međuvremenu, suvremena tehnološka dostignuća su omogućila transplantaciju tkiva, uzgoj tkiva izvan tijela i dizajn mikromodela organskih sustava tzv. organa na čipu (Ratner i Zhang, 2020). Budući da broj pacijenata kojima je potrebna transplantacija značajno premašuje broj donora organa, pažnja se pridaje razvoju tkivnih konstrukata ili tkivnih surugata in vitro, kako bi se poboljšala kvaliteta života, odnosno produljio životni vijek pacijenata u čekanju doniranog organa.

Cilj tkivnoga inženjerstva je regenerirati tkivo primjenjujući biomedicinske in vitro postupke i biotehnologiju, odnosno laboratorijski proizvesti živo tkivo prikladno za usađivanje u tijelo pacijenta. Kako bi se navedeno i postiglo, razvijeno je nekoliko pristupa koji se mogu svrstati u unutartjelesne i izvantjelesne. Unutartjelesni pristupi oslanjanju se na potencijal organizma pacijenta da uz pomoć implantiranih elemenata tkivnog konstrukta provede obnovu tkiva. Oni obuhvaćaju: injektiranje zdravih stanica, implantaciju nosača zasijanog zdravim stanicama te umetanje embrionalnih organa na mjesto oštećenja tkiva. Izvantjelesno tkivno inženjerstvo podrazumijeva uzgoj tkiva i čitavih organa u kultivacijskim sustavima, tzv. bioreaktorima, u kojima tkivni konstrukt biva potpuno oblikovan prije implantacije. Istraživanjima se dosada postigao značajan napredak: razvijeni

su komercijalno dostupni nadomjesci kože, krvnih žila, srčanih zalistaka i hrskavice, oblozi za njegu i brže zacjeljivanje rana te umjetni organi poput bronhijalne cijevi i mokraćnog mjehura koji su još u fazi razvoja. Glavni nedostatak umjetno dobivenog tkiva je ograničenost stvaranja krvnih žila, odnosno angiogeneza (Langer i Vacanti, 1999, Mastrullo i sur., 2020). Ovaj se problem pokušava riješiti decelularizacijom tkiva, pri čemu prirodna struktura tkiva ostaje očuvana te se potom nasaduju stanice. Do sada su razvijene različite metode decelularizacije koje ovise o namjeni, vrsti tkiva te o mnogim drugim parametrima (Gupta i sur., 2018).

Glavni elementi za proizvodnju tkivnog konstrukta su zdrave, metabolički aktivne stanice specifične za oštećeno tkivo, zatim odgovarajući poticatelji rasta stanica poput bioaktivnih signalnih molekula ili fizikalnih podražaja, te trodimenzionalni stanični nosači od netoksičnog i neimunogenog (bio)materijala (Slika 1). Kombinacijom navedena tri elementa, u uvjetima koji pogoduju staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, postiže se tzv. sazrijevanje tkivnog konstrukta, odnosno obrastanje konstrukcije nosača diferenciranim i metabolički aktivnim stanicama. Takav konstrukt je spreman za implantaciju i njegov cilj nije samo fizički zamijeniti oboljelo tkivo, već i pružati mehaničku potporu okolnom tkivu te obnašati sve funkcije tkiva koje nadomješta. Posljednjih godina se sve više pozornosti daje zamjeni inertnih ili nerazgradivih nosača, nosačima koji su bioresorptivni, odnosno razgrađuju se pri tjelesnim uvjetima i to brzinom koja je u skladu s brzinom kojom stanice proizvode novu izvanstaničnu matricu. Na ovaj način, nakon određenog vremena, tkivo će biti u potpunosti regenerirano, ukazujući na interaktivnu svrhu nosača za navođenje prostorne organizacije i izgradnje tkivu specifične arhitekture, dok pri tome stanicama daje prirodan mikrookoliš, odnosno pogodne uvjete za razvoj (Meyer, 2009). U razmatranju odabira najdjelotvornijeg nosača za stanice, zbog svog porijekla i sastava, svakako se ističe tzv. izvanstanična matrica ili ECM (engl. extracellular matrix). Radi se o složenoj mreži makromolekula koja služi kao potporanj za stanice u tkivima višestaničnih organizama. To je makromolekulski konstrukt neophodan za adheziju, migraciju i fizičku zaštitu stanica, a ima ulogu i u njihovoj diferencijaciji i komunikaciji. U ECM-u animalnog tkiva prevladavaju proteini poput kolagena, elastina i

fibronektina, zatim niz izrazito glikoziliranih proteina tzv. proteoglikani, te neki tkivno specifični sastojci poput kalcijevih minerala u kostima. Udio svake od komponenti ovisi o vrsti tkiva (Mouw i sur., 2014).

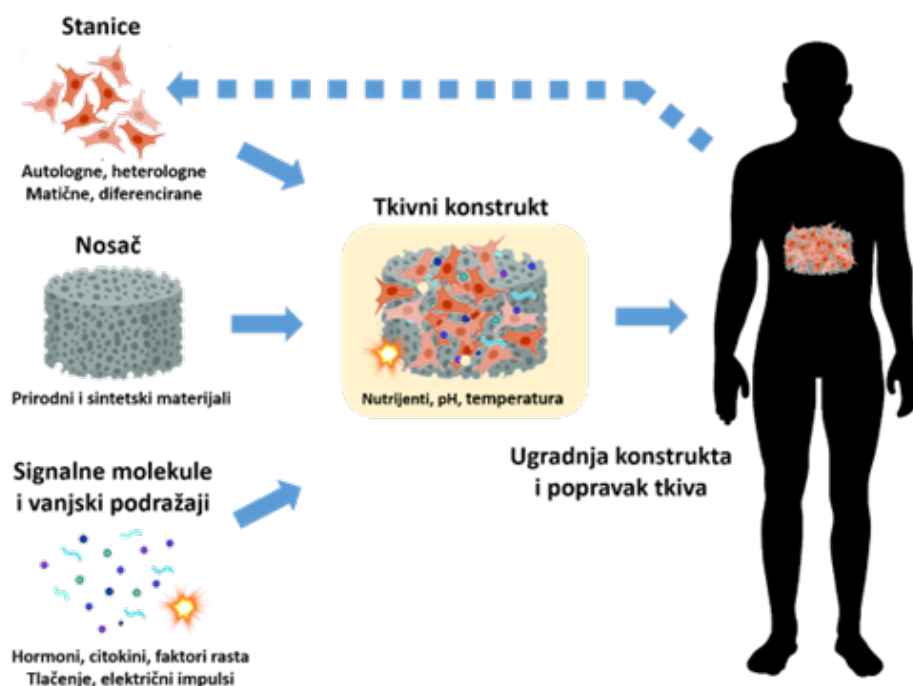
Postupci kojima se dolazi do ECM-a za potrebe tkivnog inženjerstva, a pri čemu se nastoji što više sačuvati izvorni sastav i strukturu matrice, svode se na fizikalno, kemijsko, i/ili biokemijsko uklanjanje stanica i tkivnih epitopa. Proizvod koji tako nastaje naziva se decelularizirani ECM (dECM). Prvo istraživanje decelularizacije opisano je 1948. godine (Poel, 1948), i ono je poslužilo razvoju kasnijih, znatno osjetljivijih i temeljitijih postupaka za gotovo sve vrste tkiva i organa. Uspjeh kliničke primjene decelularizirane podsluznice tankog crijeva iz 1980-tih označio je ulazak ECM-a u terapiju (Badylak i sur., 1989). Od 1990-ih godina bilježi se porast broja tehnika decelularizacije i recelularizacije dECM-a, a time i broj odobrenih auto/kseno-lognih dECM-a za terapijsku primjenu (Ratner i Zhang, 2020). Nadalje, razvojem tehnologije 3D bioispisa uočena je pogodnost uporabe dECM-a za pripremu biotinte u razvoju nove generacije tkivnog inženjerstva (Saldin i sur., 2017). Cilj ovog rada je uputiti na dosege u tehnikama proizvodnje i pripreme životinjskog ECM-a za istraživačku i kliničku primjenu.

Materijali za izradu nosača

Razvijeni su različiti materijali koji udovoljavaju navedene kriterije kako bi se mogli koristiti za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu te se nazivaju biomaterijalima. Mogu se podijeliti na biorazgradive i nebiorazgradive, a prema vrsti materijala, na metale, keramike, polimere i kompozite, pri čemu su kompoziti hibridni materijali u kojima polimer ili smola čine matricu u kojoj se dispergira ojačavalo različitih oblika i materijala (Ratner i sur., 2020).

Metali

Metali se, zbog svojih mehaničkih svojstava, koriste uglavnom kao nadomjesci kostima i zubima, a mogu se koristiti kao šipke, pločice, vijci i slično. Najvažniji uvjet koji metalni nosač mora zadovoljavati, pored netoksičnosti, je nekorozivnost pri tjelesnim uvjetima. Zato se



Slika 1. Temeljna postavka tkivnoga inženjerstva (Biorender)

Figure 1. The basic concept of tissue engineering



najviše koriste titan, tantal, paladij te njihove slitine s drugim metalima i nemetalima (Gilbert, 2020).

Keramike

Keramike su nemetalni, anorganski, porozni, polikristalični materijali koje odlikuje velika čvrstoća, krutost te kemijska inertnost. U skupinu keramičkih materijala koji se koriste u tkivnom inženjerstvu svrstavaju se biokeramike, biostakla te staklokeramike, a dalje se mogu podijeliti u tri skupine. Prva je inertna keramika koja, poput metala, nema interakcija s okolnim tkivom te ju je potrebno ukloniti iz tijela operativnim zahvatom. Budući da su naknadni zahvati nepoželjni za pacijenta te za zdravstveni sustav, razvoj bioaktivne te biorazgradive keramike, kao preostale dvije skupine, je od velike važnosti. Bioaktivna keramika ima odgovarajuću površinsku energiju kako bi se okolno tkivo moglo adherirati na nju te obrastati nosač. Biorazgradiva keramika se može resorbirati pri tjelesnim uvjetima, služeći tako samo kao privremeni nadomjestak te kao smjernica i okvir za razvoj novog, zdravog tkiva (Jones i Gibson, 2020).

Polimeri

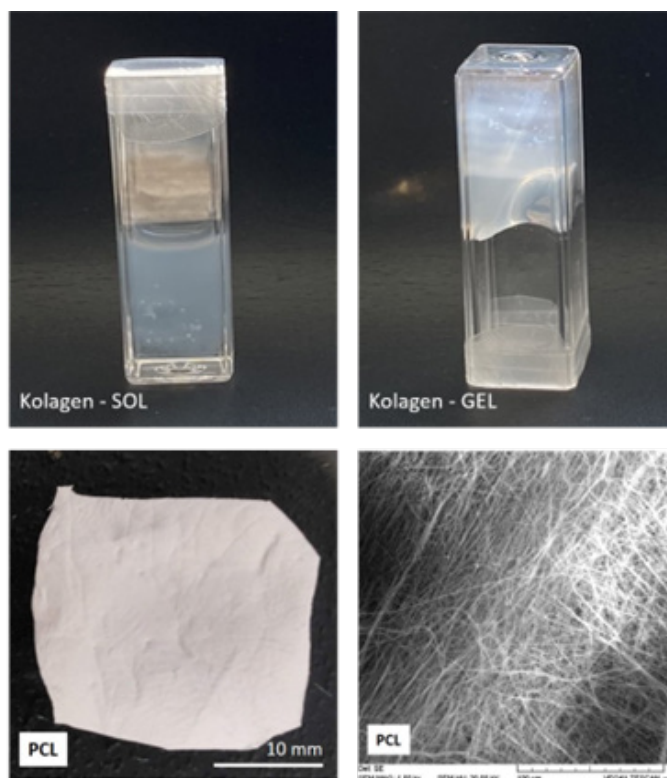
Skupina materijala kojoj se pridaje najviše pozornosti u tkivnom inženjerstvu su polimeri. Sastavljeni su od građivnih jedinica monomera koji se međusobno povezuju kemijskom vezom različitim mehanizmima polimerizacije. Prema porijeklu, polimeri se mogu podijeliti u prirodne i sintetske. Prirodni polimeri dobivaju se izolacijom iz biološkog materijala, bilo da su sastavni dio tkiva organizma (fibronektin, kolagen, biljna celuloza) ili njihov vanjski proizvod (fibroin svile, bakterijska celuloza). Sintetski polimeri dobivaju se kemijskim putem iz derivata ugljikovodika te mogu biti razgradivi i nerazgradivi (Bass i sur., 2020). Polimerni nosači koji najčešće nalaze primjenu u tkivnom inženjerstvu

mogu se klasificirati u dvije skupine: hidrogelovi i nanovlakna (Slika 2). Hidrogelovi su u vodi nabubrene, umrežene polimerne strukture koje nastaju kemijskim ili fizikalnim vezanjem homopolimera, kopolimera, više različitih polimera ili nastankom interpenetrirajućih mreža. Svojstva hidrogelova ovise o načinu povezivanja polimera, pa pored kovalentne veze kojom nastaju kemijska umreženja, može doći i do fizikalnog umreženja prisustvom vodikovih i Van der Waalsovih interakcija te steričkih ispreplitanja pojedinih lanaca (Peppas i Hoffman, 2020).

Najznačajniji postupak za dobivanje polimernih nosača od nanovlakana je elektroispredanje. Postupak započinje otapanjem polimera u hlapivom otapalu te propuštanjem otopine kroz kapilaru u polju visokog električnog napona. U takvim uvjetima dolazi do istezanja viskoelastične polimerne otopine koja s vrha kapilare putuje k suprotnoj elektrodi (kolektoru) pri čemu dolazi do isparavanja otapala te formiranja nano-vlakana. Vlakna se pozicioniraju nasumično, formirajući nanovlaknasti netkani materijal na površini kolektora (John i sur., 2022).

Materijali iz biogenog izvora

U posebnu skupinu materijala spadaju oni dobiveni iz biogenog izvora. 1997. godine White je uočio kako je mikrostruktura koralja slična strukturi mineralnog dijela kosti te da bi mogla poslužiti za regenerativne svrhe u ortopediji (Ewers, 2005). Danas se već mineralni dijelovi morskih organizama koriste kao prekursori ili kao sirovina za pripremu komercijalno dostupnih materijala za regeneraciju kosti i hrskavičnog tkiva (Ressler i sur., 2020). Primjeri su Algipore® dobiven iz algi te ProOsteon® dobiven iz koralja (Rapone i sur., 2022). U skupinu prirodnih polisaharida spada celuloza, linearni polisaharid čiji se derivat metil-celuloza, zbog dobrih gelirajućih svojstava i biorazgradivosti također koristi kao nosač lijekova te hidrogel za inženjerstvo koštanog i hrskavičnog tkiva (Gómez-Florit i sur., 2020). Još jedan predstavnik



Slika 2. Primjeri polimera korištenih u tkivnom inženjerstvu, Gornji red: koloidni sustav otopine kolagena u prijelazu iz sol u gel stanje. Donji red: Uzorak materijala od elektroispredanog poli(ϵ -kaprolaktona) i njegova skenirajuća elektronska mikrofotografija (Slivac i sur., 2021)

Figure 2. Examples of polymers used in tissue engineering, up: colloid suspension of collagen transitioning form sol u gel. Down: Sample of electrospun poly(ϵ -caprolactone) and its scanning electron microscopy image

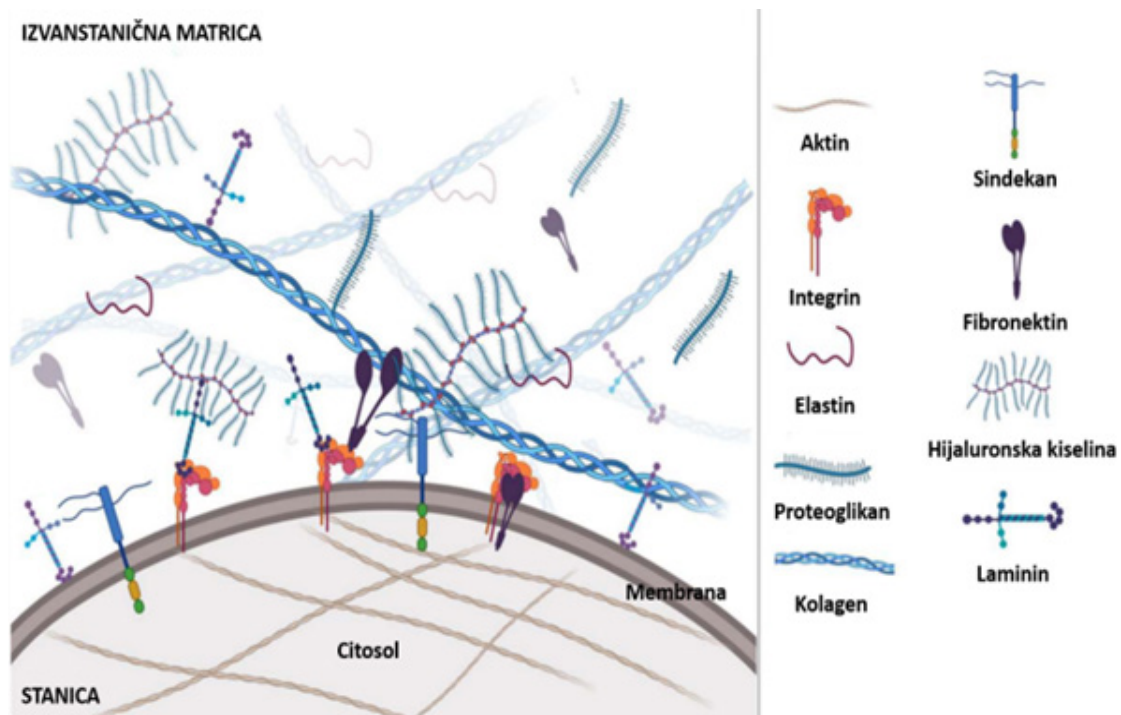
prirodnih polisaharida je i alginat, izoliran iz smeđih algi njihovom obradom lužinama. Alginat pomoću dvovalentnih kationa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) tvori hidrogelove čija svojstva ovise o uvjetima geliranja, a primjenjuju se za obloge i njegu rana, dostavu malih molekula i proteina na ciljano oboljelo mjesto te kao biotinta za 3D bioispis (Lee i Mooney, 2012). Kitozan je polisaharid dobiven iz ljuštura rakova, a otopljen i liofiliziran daje poroznu strukturu koja se primjenjuje u inženjerstvu koštanog tkiva. Najrašireniji i u tkivu najzastupljeniji protein je kolagen te je jedan od glavnih predstavnika ove skupine. Prisutan je u vezivnom tkivu kao sastojak ECM-a, služi za adheziju stanica jer sadrži specifičan slijed od tri aminokiseline arginil-glicin-asparaginska kiselina (RGD) za koji se svojim transmembranskim receptorima usidre stanice. Kolagen prelazi iz sola, odnosno viskozne kapljevine, u gelasto stanje pri fiziološkim uvjetima što se očituje u značajnom povećanju viskoznosti te je posljedica fizikalnog umrežavanja molekula kolagena. Zbog opisanog svojstva pri fiziološkim uvjetima, koristi se kao hidrogel za dopremu lijeka, nasađivanje stanica te regeneraciju tkiva i organa. Može se dobiti izolacijom iz životinjskog tkiva metodom decelularizacije, odnosno uklanjanja stanica raznim metodama. Zbog loših mehaničkih svojstava i visoke cijene, često ga se koristi u kombinaciji s drugim polimerima. Ireverzibilnom termičkom denaturacijom kolagena se dobiva u vodi topiva želatina, a koristi se u pripravi biotinte te regeneraciji tkiva kože. Osim navedenih, u tkivnom inženjerstvu koriste se i sljedeći materijali na bazi proteina specifičnih svojstava: fibrin kao derivat fibrinogena iz krvne plazme, fibroin iz kukuljice dudova svilca te decelularizirana izvanstanična matrica, dECM (Gómez-Florit i sur., 2020).

Životinjska izvanstanična matrica

ECM je nestanična tkivna komponenta, trodimenzionalna mreža makromolekula u vodenom okruženju i dinamičnom odnosu sa stanicama koje se za nju prihvaćaju. Ona tkivima daje oblik i ustroj te joj je uloga strukturalna, zaštitna i signalna. Stanicama kojima je ECM neposredni mikrookoliš, utječe na pokretljivost, umnažanje i diferencijaciju. Sastoji se od proteinskih vlakana, linearnih lanaca ugljikohidrata i međustanične

tekućine, pa razlike u sastavu i zastupljenosti ovih sastojaka doprinose raznolikosti tkiva u organizmu (Slika 3) (Botham i Murray, 2018).

Glavna strukturalna komponenta ECM-a kod životinja, od žarnjaka do sisavaca, je kolagen. U ljudskom organizmu je do sada utvrđeno 28 različitih tipova kolagena koji se označavaju rimskim brojevima kronološki kako su otkriveni. Molekule kolagena imaju molekulska masu od oko 300 kDa te primarnu, sekundarnu i tercijarnu strukturu. Primarnu strukturu čini slijed aminokiselina povezanih peptidnom vezom, a aminokiselinski sastav čini razliku između pojedinih vrsta kolagena. Značajka primarne strukture je prisutnost glicina (G) kao jedne od tri aminokiseline u slijedu (G-X-Y)_n. Pritom X i Y mogu biti bilo koja druga aminokiselina što, radi prostorne stabilnosti, često budu male aminokiseline poput prolina i njegova derivata hidroksiprolina. Navedeni slijed je nužan za tvorbu sekundarne strukture, tj. α -uzvojnice, jer se glicin kao najmanja aminokiselina lako smješta u središte iste te time sterički omogućuje njenu tvorbu. Tri α -uzvojnica prostorno se organiziraju u trostruku uzvojnica, odnosno molekulu kolagena čime je definirana tercijarna struktura proteina (Botham i Murray, 2018, Tracy, Minasian i Caterson, 2016). Ove molekule se dalje slažu u strukture višeg reda, najprije u vlakance, a zatim njih više u kolagenu vlakno. Kao i većinu drugih proteina ECM-a, kolagen proizvode stanice vezivnog tkiva, fibroblasti, te ga u obliku trostruke uzvojnice, a putem Golgijevog aparata, izlučuju u neposrednu blizinu. Tamo se uzvojnice nakupljaju i stabiliziraju poprečnim vezama. Nastala umrežena struktura je mehanički čvrsta i metabolički stabilna, osim u slučaju upalnih procesa, razvoja tumora ili dugih perioda gladovanja (Freeman, 2013, Raskov i sur., 2023). Elastičnost i otpornost tkivu daje molekula elastina, prisutna u većini vezivnih tkiva. To je polipeptidna molekula u kojoj je najzastupljenija aminokiselina glicin, kao i kod kolagena, a inače je sastavljen od niza ponavljajućih hidrofilnih i hidrofobnih sljedova aminokiselina. Oni imaju važnu ulogu u povezivanju molekula elastina i stvaranju umreženih struktura (Tracy i sur., 2016). Redoviti glikoprotein ECM-a vezivnog tkiva je fibronektin. Građen je od dviju istovjetnih podjedinica povezanih dvama disulfidnim mostovima. U



Slika 3. Prikaz strukture izvanstanične matrice (Biorender)

Figure 3. Composition and structure of extracellular matrix



strukturi sadrži RGD slijed aminokiselina, odgovoran za povezivanje sa staničnim transmembranskim receptorima, integrinima. Upravo je ova veza odgovorna za komunikaciju stanice i ECM-a uključujući regulaciju adhezije stanica (Botham i Murray, 2018). U sloju ECM-a epitela, tzv. bazalnoj lamini, ulogu fibronektina obavlja glikoprotein laminin. Zasebnu skupinu makromolekula ECM-a čine proteoglikani. Oni su građeni od središnjeg proteinskog lanca na koji su kovalentno vezani glikozaminoglikani (GAG), ravni polisaharidni lanci sulfatiranih disaharida. Hidrofilni su te djeluju kao polianioni, povezuju se međusobno, s drugim komponentama matrice i stanicama. Proteoglikani znatno doprinose obujmu ECM-a jer absorbiraju veliku količinu vode i time sprječavaju isušivanje tkiva te ublažuju potencijalni mehanički stres. Poznato je sedam vrsta proteoglikana od kojih su neki slobodni, dok su drugi poput sindekana usidreni u staničnu membranu i time dio signalnih puteva stanice. Najveća proteoglikanska struktura ECM-a je hijaluronska kiselina (do 20 000 kDa). To je zapravo ogroman GAG, nekovalentno vezan za velik broj manjih proteoglikana i bez sulfatnih skupina na svojim disaharidnim jedinicama (Botham i Murray, 2018).

Decelularizacija životinjskih tkiva i organa

decelularizacija je postupak uklanjanja stanica i staničnih komponenti iz tkiva ili organa, a pritom se nastoji ne narušiti trodimenzionalnu strukturu ECM-a te zadržati njegovu bioaktivnost i mehanička svojstva. Svrha decelularizacije je u potpunosti ogoliti matricu od nativnih stanica kako bi se dobio prirodan mikrookoliš pogodan za prihvata, proliferaciju i diferencijaciju novih stanica (Gilpin i Yang, 2017). Decelularizaciju je moguće provesti na čitavom organu ili na dijelu tkiva, a odabir sredstva i postupka decelularizacije ovisi o vrsti tkiva te budućoj istraživačkoj ili kliničkoj namjeni. Na primjer, postupak koji vrlo dobro decelularizira šuplje tkivo mokraćnog mjehura neće imati dobar učinak na čvrsto tkivo hrskavice. Također, način na koji se decelularizacijska sredstva dovode u kontakt s tkivom ovisi o izvoru, strukturi, gustoći, vrsti tkiva, sadržaju stanica i masnoća. Odabir i primjena sredstva za decelularizaciju mora se optimirati za svako pojedino tkivo (Gupta i sur., 2018).

Decelularizacijska sredstva

Sredstva za decelularizaciju mogu se podijeliti na kemijska, biokemijska i fizikalna. Važno je napomenuti kako primjena bilo kojeg sredstva ne daje savršen ishod te da svako sredstvo na svojstven način mijenja strukturu ECM-a. Izbjegavanje tih promjena, nakon učinkovitosti uklanjanja stanica, drugi je po važnosti cilj svakog protokola decelularizacije (Gupta i sur., 2018).

Kemijska sredstva

To su kemijski spojevi koji svojom reaktivnošću razaraju stanični integritet te dovode do rastakanja stanica na matrici. Neselektivnost je najveći nedostatak primjene kemikalija za decelularizaciju.

Kiseline i lužine

Kako bi se katalizirala hidrolitička razgradnja biomolekula, koriste se kiseline i baze. Perocetna kiselina djeluje kao dezinficijens i istovremeno uklanja nukleinske kiseline pa ima dvostruko poželjno djelovanje. Octena kiselina, agresivnija od perocetne kiseline, ima nepovoljan učinak na kolagen, ali ne oštećuje sulfatirane glikozaminoglikane (Abaci i Guvendiren, 2020). Lužine se često koriste u prvim koracima decelularizacije dermisa jer uklanjaju dlačice, ali uklanjaju i faktore rasta te značajno narušavaju mehanička svojstva pa je njihovu uporabu potrebno vremenski ograničiti. Jedna od najčešće korištenih lužina je amonijev hidroksid, a korištena je za decelularizaciju jetre i uretre (Baptista i sur., 2009).

Hipertonične i hipotonične otopine soli

Za decelularizaciju se koriste hipertonične i hipotonične otopine soli. Hipertonične otopine izazivaju disocijaciju DNK molekula, dok hipotonične otopine izazivaju bubrenje stanice, a zatim i pucanje membrane bez značajnog lošeg učinka za ECM (Grauss i sur., 2005).

Detergenti

Vrlo efektivni i često korišteni agensi u procesu decelularizacije su detergenti, odnosno surfaktanti. Mogu se podijeliti na ionske, neionske te zwitterionske, a opći mehanizam njihovog djelovanja je otapanje stanične membrane te disocijacija DNK. Djeluju, ovisno o vrsti, blago do agresivno na proteine ECM-a. Razmjeri oštećenja, osim o vrsti detergenta, ovisi o vremenu izlaganja, vrsti tkiva te dobi i spolu jedinice iz koje je uzet organ (Hu i sur., 2021). Najpoznatiji predstavnik ionskih, a i detergenata općenito, je SDS (engl. sodium dodecyl sulfate, natrijev dodecil sulfat, odnosno natrijev lauril sulfat). Djelotvorno uklanja stanične komponente iz gustih tkiva poput hrskavice, no uništava strukturu, GAG-e, faktore rasta te kolagen. Brojna su istraživanja koja pokazuju njegovu uspješnost u decelularizaciji, dok se agresivnost prema komponentama ECM-a optimira skraćivanjem vremena procesa decelularizacije (Bondi i sur., 2015). Još jedan predstavnik ionskih detergenata je SLES (engl. sodium lauryl ether sulfate, natrijev lauret sulfat), strukturno vrlo sličan SDS-u, no nešto blaži prema komponentama ECM-a. SDC (engl. sodium deoxycholate, natrijev deoksikolat) je također ionski detergent, manje agresivan od SDS-a, no i manje djelotvoran pri uklanjanju staničnih komponenti (Simsa i sur., 2018). Djelovanje ionskih detergenata temelji se na disrupciji protein-protein, lipid-lipid i protein-lipid interakcija te interakcija unutar molekule DNK. Mehanizam decelularizacije ionskim detergentom počiva na strukturnoj sličnosti između molekule detergenta s polarnom hidrofilnom grupom na jednoj strani i nepolarnim hidrofobnim lancem na drugoj te molekula fosfolipidnog dvosloja koje posjeduju polarnu "glavu" i dva nepolarna hidrofobna lipidna "repa". Detergent se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj te stvara pukotinu zbog nedostatka dodatnog hidrofobnog repa, a kroz pukotinu izlazi stanični sadržaj (Kalipatnapu i Chattopadhyay, 2005). Triton X-100 je najznačajniji predstavnik neionskih detergenata. Vrlo je blag, kako prema ECM-u, tako i prilikom uklanjanja staničnih komponenti, pa se uglavnom ne koristi samostalno. Učinkovitost decelularizacije ovim detergentom uvelike ovisi o vrsti tkiva. Mehanizam djelovanja mu je kidanje protein-lipid interakcija, a u manjoj mjeri protein-protein, zbog čega je manje agresivan prema ECM-u (Remlinger i sur., 2010). Pored navedenoga, jedini neionski detergenti koji su se koristili za decelularizaciju su Tween 20 i 80, no ni oni nisu dostatni za samostalnu decelularizaciju (Aeberhard i sur., 2020). Cviterionski detergenti pokazuju svojstva ionskih i neionskih detergenata, a najznačajniji predstavnici su CHAPS (engl. ((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate, ((3-kolamidopropil) dimetilamonio)-1-propansulfonat), sulfobetain-10 i sulfobetain-16. Navedeni detergenti ne oštećuju značajno proteine izvanstanične matrice, no njihova učinkovitost u uklanjanju staničnih komponenti nije jednako dobra kao kod ionskih detergenata (Xuefeng Qiu i sur., 2021).

Organska otapala

Decelularizacija organskim otapalima najčešće se provodi alkoholima ili acetonom. Način djelovanja je dehidracija stanica odnosno dekompozicija stanične membrane i posljedična liza stanica (Flynn, 2010). Osim toga, alkoholi poput izopropanola, etanola i metanola otapaju lipide iz tkiva te istraživanja potvrđuju da su djelotvorniji u delipidaciji tkiva od enzima lipaza, no time smanjuju uspješnost decelularizacije tkiva (Crapo i Gilbert, 2012).

Biokemijska sredstva

To su biološki agensi selektivnog djelovanja, poput enzima, te neke njima pomoćne molekule koje razgrađuju stanične veze s matricom i/ili remete proces stanične adhezije.

Enzimi

Uporabom enzima prilikom decelularizacije moguće je postići visoku specifičnost uklanjanja staničnih komponenti i očuvanja ECM-a. Nedostatak ovih metoda je teško uklanjanje enzima iz tkiva koji mogu izazvati imunološku reakciju u pacijentu, kao i nepotpuna decelularizacija ako se ne kombiniraju s drugim metodama. Enzimi koji se obično koriste su nukleaze, proteaze poput kolagenaze, tripsina, dispaze, te lipaze i α -galaktozidaze. Nukleazama se trgažu veze nukleinskih kiselina te zaostaje fragmentirana DNK (Feng i sur., 2020). Lipaze su enzimi odgovorni za razgradnju lipida te se često koriste u prvim koracima decelularizacije dermisa. Proteaze su skupni naziv za sve enzime koji kidaju peptidne veze proteina (Moffat i sur., 2022). Tripsin je jedan od najčešće korištenih enzima u decelularizaciji, ali značajno oštećuje proteine ECM-a, kolagen i elastin te time narušava mehaničku strukturu tkiva (Olsen i sur., 2004). α -galaktozidaza je enzim koji reducira antigen prisutan na staničnoj površini odgovoran za reakciju imunитета pacijenta (Badylak 2008). Poznavanje kinetike enzima te optimalnih uvjeta u kojima enzim djeluje, preduvjet je primjeni ove metode decelularizacije.

Kelati

Decelularizacija kelatima temelji se na kelatnom vezanju agensa na bivalentne metalne ione nužne za staničnu adheziju (Ca^{2+} , Mg^{2+}), time ju onemogućujući. Najčešće korišteni su EDTA (eng. ethylenediaminetetraetic acid, etilendiamineteracetatna kiselina) te EGTA (eng. ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl)tetraacetic acid, etilenglikoltetraacetatna kiselina), no oni samostalno nisu dovoljni za potpunu decelularizaciju te se koriste u kombinaciji s enzimima poput tripsina ili detergenata (Yang i sur., 2010).

Fizikalna sredstva

Radikalna fizikalna promjena nametnuta staničnom okolišu vodi k oštećenju stanica. Preporučena fizikalna sredstva imaju vrlo predvidive i ujednačene učinke na tkivo, no nisu dovoljno učinkovita kao samostalni postupak decelularizacije te ih se koristi u kombinaciji s drugim sredstvima (Moffat i sur., 2022).

Zamrzavanje

Metoda se temelji na izazivanju nekroze tkiva temperaturnim šokom, što skraćuje ukupno vrijeme potrebno za decelularizaciju. Prednost metode je minimalno štetan učinak na ECM, no potrebno je koristiti ovu metodu u kombinaciji s nekom drugom koja će ukloniti ostatke staničnih komponenti (Hsu i sur., 2023).

Hidrostatski tlak

Uporaba tlaka većeg od 150 MPa nužna je za decelularizaciju, a optimalnim se smatraju tlakovi do 500 MPa. Tlakovi veći od 600 MPa izazivaju značajno narušavanje biomehaničkih svojstava uslijed denaturacije proteina (Le i sur., 2020). Primjenom ove metode uočeno je smanjenje broja pojava imunološke reakcije te povećanje uspješnosti recelularizacije (Watanabe i sur., 2019).

Ultrazvuk

Ultrazvuk uzrokuje pojavu kavitacije u decelularizacijskom mediju što uzrokuje pucanje stanične membrane i izlazak staničnog sadržaja. Na intenzitet kavitacije, a time i decelularizacije, utječe pH medija, temperatura, viskoznost te koncentracija otopljenog kisika. Može se primjenjivati kao ultrazvučna kupelj ili uranjanjem ultrazvučne sonde. Forouzes i sur. usporedili su decelularizaciju u kupelji i uranjanjem sonde te su uočili kako se uporabom kupelji manje oštećuju proteini izvanstanične matrice (Forouzes i sur., 2019). Ova metoda koristi se u kombinaciji s drugima, najčešće detergentima i enzimima, jer potiče njihovu dopremu u dublje slojeve tkiva. Dodatno, ultrazvuk se najčešće koristi za tkiva veće mehaničke čvrstoće i elastičnosti poput kosti, hrskavica, živaca i kože (Yusof i sur., 2019).

Superkritični CO_2

Radi se o jednom od novijih sredstava decelularizacije, naročito pogodno za meka tkiva poput masnog tkiva, srčanog mišića ili rožnice. Temelji se na primjeni relativno inertnog plina u stanju iznad kritičnog tlaka i temperature (scCO_2) pri čemu ima bolju difuziju i brzinu prijenosa od standardnih fluida. Prednost scCO_2 je učinkovito i po matricu manje destruktivno uklanjanje tkivnih antigena, a nedostatak je složenost reaktora za provedbu postupka te odabir kootapala koje je najčešće etanol (Topuz i sur., 2020).

Kombinacija sredstava za decelularizaciju

Prilikom opisa pojedinih sredstava, istaknuto je kako se neki od njih ne mogu koristiti samostalno jer nisu dovoljno uspješni u postupku decelularizacije. Iz tog razloga nerijetko se koriste kombinacije različitih sredstava kako bi se postupak ubrzao, pospješila njegova učinkovitost, umanjila količina vrlo agresivnih decelularizacijskih sredstava te konačno dobila što bolje očuvana izvanstanična matrica (Moffat i sur., 2022). Metode decelularizacije koje uzrokuju trganje stanične membrane, tim mehanizmom ispuštaju iz stanice proteaze, enzime koji će razgraditi proteine ECM-a. Kako se to ne bi dogodilo, potrebno ih je koristiti u kombinaciji s inhibitorima proteaza, puferirati medij ili kontrolirati temperaturu i vrijeme procesa (Moffat i sur., 2022). Važan korak decelularizacije je ispiranje decelularizacijskih sredstava, pogotovo detergenata, jer mogu duboko penetrirati u uzorke tkiva te imaju citotoksičan učinak, čak i pri malim koncentracijama. Cebotari i sur. proveli su toksikološka ispitivanja decelulariziranih uzoraka te pokazali da je potrebno provesti minimalno 6 ispiranja tkiva u protokolu decelularizacije kako bi se u potpunosti uklonio detergent, a kada su u pitanju gušća tkiva, i više (Cebotari i sur., 2010).

Postupci decelularizacije ECM-a

U ovom poglavlju opisani su postupci u kojima se decelularizacijska sredstva, uglavnom kemijska i biokemijska, primjenjuju za uklanjanje stanica s ECM-a. Kod svih postupaka težnja je da u što kraćem vremenu što veći broj stanica bude podvrgnut djelovanju odabranog sredstva. Kritični parametri pritom nisu samo veličina i oblik materijala za decelularizaciju, već i gustoća stanica te vaskularizacija. Prožimanje tkiva i organa decelularizacijskim sredstvima postiže se na tri načina: perfuzijom, mehaničkim miješanjem i tlačnim gradijentom.

Perfuzija

Kako bi se decelularizirao čitav organ, najbolja metoda za dovođenje decelularizacijskih sredstava je perfuzija (Slika 4). Ovom se metodom iskorištava prirodno prisutan krvožilni sustav organa koji je vrlo složen i zahvaća sve dijelove tkiva. Naime, sve se stanice nalaze u blizini kapilara kako bi se opskrbile kisikom i hranjivim tvarima, a upravo ova pojava omogućuje veliku uspješnost decelularizacije perfuzijom jer se



aktivna površina procesa decelularizacije povećava bez prekomjernog izlaganja ECM-a decelularizacijskim agensima koji bi ju mogli oštetiti (Ott i sur., 2010).

Mehaničko miješanje

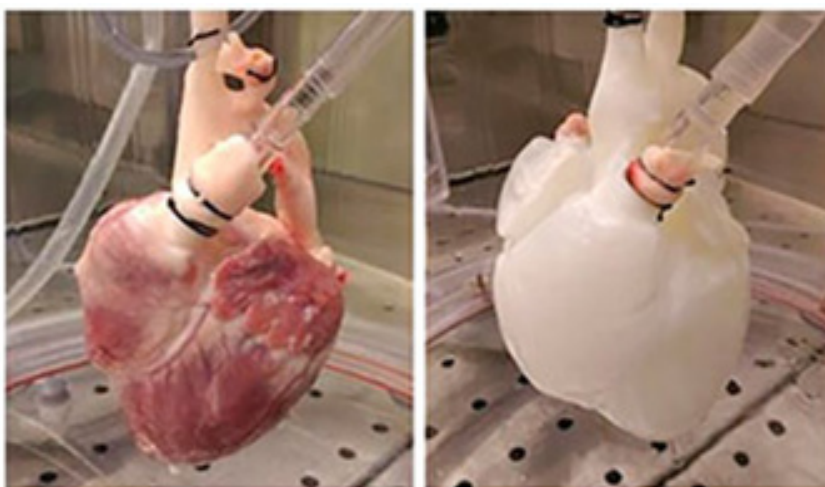
Za decelularizaciju tkiva koje nema razgranati krvožilni sustav potrebno je prvo usitniti tkivo, potom ga uroniti u posudu s otopinom decelularizacijskog sredstva te miješati. Decelularizacija je kod ove metode ograničena difuzijom sredstva s površine tkiva u unutrašnjost te je stoga veličina komadića tkiva od velikog značaja za brzinu decelularizacije. Osim toga, decelularizacija ovom metodom je uvjetovana intenzitetom miješanja, vrstom sredstva te gustoćom i strukturom tkiva (Crapo i Gilbert, 2012).

Tlačni gradijent

Za šuplja tkiva i organe najpogodniji je pristup koji iskorištava tlačni gradijent jer ubrzava dopremu kemijskog ili biokemijskog decelularizacijskog sredstva do tkiva. Pored toga, nametnuta promjena tlaka potiče pucanje stanica i tako povećava učinak uklanjanja staničnih komponenti iz tkiva (Prasertsung i sur., 2008).

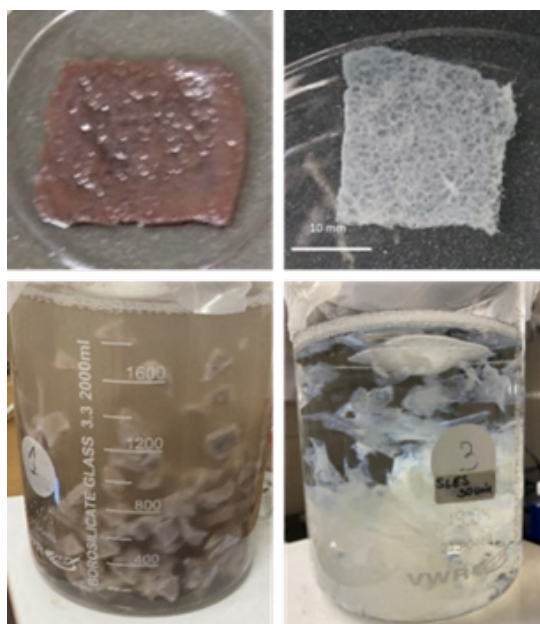
Postupci obrade i evaluacija dECM-a

Završetkom decelularizacije, slijedi faza naknadne obrade dECM-a kako bi materijal bio spreman za eventualnu recelularizaciju, odnosno trajno zadržao željena svojstva. Na putu za komercijalizaciju i terapijsku primjenu matrice, ta je faza gotovo jednako važna kao i sama decelularizacija (Slika 6). S obzirom da je asepticnost dECM-a nužan uvjet za njegovu primjenu, uzorke dobivene decelularizacijom potrebno je dezinficirati i sterilizirati. Time se, ne samo sprječava prijenos



Slika 4. Primjer decelularizacije srca perfuzijom (Krishnan i sur., 2022)

Figure 4. Decellularization of heart using perfusion method



Slika 5. Komadi goveđe jetre (gore) prije i nakon uklanjanja stanica u mediju za decelularizaciju pomoću mehaničkog miješanja (dolje) (Slivac i sur., 2021).

Figure 5. Samples of bovine liver (up) before and after decellularisation using agitation protocol (down)

potencijalnih patogena na novozasijane stanice, već i biokemijska degradacija matrice koju bi uzrokovali mikrobi odnosno preostali enzimi. U tom smislu, već sam proces decelularizacije može se provesti s dodatkom antibiotika i antimikotika. Završna dezinfekcija i sterilizacija provode se etanolom, etilen-dioksidom, peroksiacetatnom kiselinom, gama- i UV-zračenjem ili nekim drugim metodama. Ovi postupci nažalost imaju negativan učinak na ECM, oštećujući proteine te time narušavajući mehanička svojstva kao i biološku aktivnost budućeg nosača. Njegova krajnja namjena ključni je čimbenik u odabiru postupka sterilizacije (Gupta i sur., 2018). Kad je proces decelularizacije i sterilizacije završen, dobiveni materijal je potrebno skladištiti na odgovarajući način kako bi dugoročno zadržao poželjna svojstva. Moguće ga je čuvati u fosfatnom puferu pri temperaturi od -20 °C ili -80 °C, u peracetatnoj kiselini na 4 °C ili je uzorke moguće trajno krioprezervirati u tekućem dušiku (-196 °C), sa ili bez dodanog krioprotektanta. Kad je jedina opcija čuvati uzorke na sobnoj temperaturi, najpogodnije je dECM zamrznuti u tekućem dušiku, a zatim liofilizirati (Gupta i sur., 2018).

Kako se decelularizacijom ne može posve ukloniti stanični materijal, niz kvantitativnih i kvalitativnih analiza služi za evaluaciju učinkovitosti provedenog postupka. Pored analize makrostrukture, koja se određuje provjerom transparentnosti dECM-a, ultrastruktura se najčešće analizira skenirajućom elektronskom mikroskopijom, što daje podatke o poroznosti i mikrotopologiji matrice. Stanična podudarnost i potencijalna imunogenost iste provjerava se nizom biokemijskih testova, citokemijskim bojanjem te kvantifikacijom zaostalih staničnih sastojaka poput DNK i membranskih fosfolipida. Primjerice, gornje ograničenje količine DNK u dECM je 50 ng/mg suhog tkiva, u polinukleotidnim fragmentima manjim od 200 bp. Tkivnu morfologiju, uz ostatke stanica, moguće je odrediti svjetlosnom mikroskopijom nakon bojanja uzorka hematoksilinom i eozinom pri čemu se stanični nukleus oboji plavo, a proteini citosola i matrice raznim nijansama ružičaste (Keane i sur., 2012). Uporabom bojila Massonov trikrom ili pikosirius crveno, dokazuju se proteini ECM-a te time ustanovljuje struktura kolagena i fibrina (Totonelli i sur., 2012). Bojanjem kationskim bojilom alcian plavo može se odrediti sadržaj GAG-ova, odnosno proteoglikana. Fluorescentnim bojilima DAPI i Hoechst u mikroskopkom preparatu dECM-a potvrđuje se prisutnost dijelova nukleusa tj. DNK (Struecker i sur., 2015). Mehanička svojstva matrice, kao što su čvrstoća i elastičnost, važna su osobito za diferencijaciju stanica u kostima i hrskavici. Ispitivanje ovih svojstava obavlja se pomoću mehaničkih testova poput testova rastezanja, određivanjem reoloških svojstava oscilacijskim testovima ili mikroskopijom atomskih sila (Neishabouri i sur., 2022).

Zaključak - prednosti i budućnost dECM-a u tkivnom inženjerstvu

Istraživanja su pokazala kako dECM utječe na staničnu mitogenezu i kemotaksiju, diferencijaciju novozasijanih stanica te inducira procese

remodeliranja i regeneracije tkiva na mjestu u kojemu se usaduje. Svojstva dECM-a koja utječu na prethodno spomenute procese su struktura, topologija površine te kemijski sastav (Stern i sur., 2009). Osnovna prednost uporabe prirodne ECM pored sintetskih materijala u tkivnom inženjerstvu je biokompatibilnost, bioaktivnost i odgovarajuća mehanička svojstva za nasađivanje stanica te poticanje njihove diferencijacije. Naime, polimeri imaju ograničenu mogućnost uporabe zbog veće imunogenosti. Također, sintetski polimeri puno teže imitiraju prirodan okoliš stanice, nemaju mogućnost pružanja mehaničkih i biokemijskih svojstava mikrookoliša kao izvanstanična matrica (Zhang i sur., 2022). Primjerice, Dikici i sur. su uočili da unatoč dobroj biokompatibilnosti polikaprolaktona, adhezija stanica nije ni približno dobra kao na dECM-u (Dikici i sur., 2020). Ratcliffe i sur. su uočili poboljšanje adhezije stanica na polimerne materijale čija je površina funkcionalizirana peptidima s RGD slijedom aminokiselina. Unatoč dobrim mehaničkim svojstvima polimera, dodatna obrada ponekad iziskuje uporabu citotoksičnih kemikalija koje je teško ukloniti što smanjuje mogućnost uporabe takvih materijala u tkivnom inženjerstvu (Ratcliffe i sur., 2019). dECM se može koristiti za pripremu injekcijskih hidrogelova, hidrogelova kao nosača za nasađivanje stanica, pripremu biotinte za 3D bioispis, kao supstrat za staničnu kulturu, u različitim biološkim analizama proteina te za recelularizaciju organa. Kako bi proizvod što bolje odgovarao namjeni, potrebno je odabrati odgovarajuće tkivo, metodu i sredstvo za decelularizaciju (Moffat i sur., 2022). Broj komercijalno dostupnih proizvoda dobivenih metodom decelularizacije polako raste. Iz humanog dermisa dobiveni su nadomjesci za meka tkiva, a neki od njih su AlloDerm® i GraftJacket® te za tetive AlloPatch HD™. Od svinjskog tankog crijeva dobiveni su nadomjesci za meka tkiva Oasis®, Restore™ i drugi. Za zamjenu srčanih zalistaka mogu se koristiti svinjski zalisci Mosaic®, Prima™, SJM Biocor® te proizvodi dobiveni iz govedeg perikarda Perimount®. Za uporabu u stomatologiji se također upotrebljava govede perikard kao CopiOs® (Crapo i Gilbert, 2012).

Ove godine američka regulatorna agencija FDA (engl. Food and Drug Administration) odobrila je uporabu decelularizirane posteljice InovaBurn® za terapiju opekline drugog stupnja (Slika 7). Unatoč razvoju mnogih metoda i protokola decelularizacije, do sada se nije uspjelo pripremiti dECM iste proteomike kao u izvornoga tkiva. Postupak decelularizacije odabire se na temelju vrste tkiva i namjene nastalog dECM-a. Radi očuvanja strukture i sastava mikrookoliša za recelularizaciju, očita je potreba za postupcima s manje toksičnih spojeva kao i boljim tehnikama sterilizacije dECM-a. Noviji postupci uklanjanja stanica uključuju primjenu superkritičnih fluida (scCO₂) ili poticanje stanične samorazgradnje tzv. apoptoze (Cornelison 2018). Uklanjanje stanica iz ECM-a postaje učinkovitija ako primijenjeno sredstvo kemijski ne reagira s matricom, poput superkritičnog fluida, ili je biološki vrlo specifično pa potiče apoptozu. Za razliku od dostupnosti i raznolikosti polimera kojima se standardno izrađuju stanični nosači,



Slika 6. Slijed postupaka u pripremi dECM-a za komercijalizaciju

Figure 6. The dECM production pipeline before the commercialization



Slika 7. Primjeri komercijalno dostupnih terapijskih proizvoda dobivenih metodom decelularizacije

Figure 7. Examples of commercial therapeutic products obtained by decellularization

primjena prirodnog dECM-a je ograničena, naročito zbog nedostupnosti zdravstveno sigurnih izvora. Umrežavanje prirodnih i sintetskih polimera postaje sve popularnije budući da proizvodne tehnike kao što su elektroispredanje i geliranje daju nosače predviđena oblika, poroznosti i rasporeda vlakana. Kako bi prevladali nedostatke postupaka decelularizacije i iskoristili prednosti novih inženjerskih materijala, stručnjaci vide budućnost u kombiniranom pristupu i modificiranju komponenti dECM-a sintetskim ili biogenim polimerima. Slično tome, određene komponente dECM-a koriste za funkcionalizaciju hidrogelova i biotinte za 3D bioispis (Zhe 2023). Daljnjim razvojem tkivnog inženjerstva, svakako će popis komercijalno dostupnih proizvoda na temelju ECM-a biti veći, kao i broj terapija u kojima se koriste.

Kratice

dECM - decelularizirana ECM

ECM - izvanstanična matrica

GAG - glikozaminoglikan

RGD - arginil-glicin-asparaginska kiselina

scCO₂ - superkritični ugljikov dioksid

SDS - natrijev dodecilsulfat

Literatura

- Abaci A., Guvendiren M. (2020) Designing decellularized extracellular matrix-based bioinks for 3D bioprinting. *Advanced Healthcare Materials*, 9 (24) 1–18.
- Aeberhard P.A., Grognez A., Peneveyre C., McCallin S., Hirt-Burri N., Antons J., Pioletti D., Raffoul W., Applegate L.A. (2020) Efficient decellularization of equine tendon with preserved biomechanical properties and cytocompatibility for human tendon surgery indications. *Artificial Organs*, 44 (4) 161–171.
- Badylak S.F.B., T.W. Gilbert (2008) Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*, 20 (2) 109–116.
- Dikici A.B., Reilly G.C., Claeysens F. (2020) Boosting the osteogenic and angiogenic performance of multiscale porous polycaprolactone scaffold by in vitro generated extracellular matrix decoration. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12 (11) 12510–12524.
- Badylak S.F., Lantz G.C., Coffey A., Geddes L.A. (1989) Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *Journal of Surgical Research*, 47 (1) 74–80.
- Baptista P.M., Orlando, G., Mirmalek-Sani S.H., Siddiqui M., Atala A., Soker S. (2009) Whole organ decellularization - A tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Proceedings of the 31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: Engineering the Future of Biomedicine, EMBC 2009, SAD*.
- Bass G., Becker M.L., Heath D.E., Cooper S.L. (2020) *Polymers: Basic Principles*. U: Sakiyama-Elbert S. E., Wagner W. R., Yaszemski M. J., Zhang G. (ed.): *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, str. 85-102, Elsevier Inc. SAD.
- Bondi C.A.M., Marks J.L., Wroblewski L.B., Raatikainen H.S., Lenox S.R., Gebhardt K.E. (2015) Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): Evidence for safe use in household cleaning products. *Environmental Health Insights*, (9) 27–32.
- Botham K.M., Murray R.K. (2018) *The Extracellular Matrix*, u V.W. Rodwell i ostali (ed): *Harper's Illustrated Biochemistry*, 31e. New York, NY: McGraw-Hill Education, USA.
- Cebotari S., Tudorache I., Jaekel, T., Hilfiker, A., Dorfman, S., Ternes, W., Haverich, A., Lichtenberg A. (2010) Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial Organs*, 34 (3) 206–210.
- Cornelison R.C., Wellman S.M., Park J.H., Porvasnik S.L., Song Y.H., Schmidt C.E. (2018) Development of an apoptosis-assisted decellularization

- method for maximal preservation of nerve tissue structure: Apoptosis-assisted decellularization for maximal nerve tissue preservation. *Physiology & behavior*, 1 (77) 116–126.
- Crapo P.M., Thomas W., Gilbert, S.F.B. (2012) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32 (12) 3233–3243.
- Ewers R. (2005) Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: A clinical report of long-term results. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63 (12) 1712–1723.
- Feng H., Xu Y., Luo S., Dang, H., Liu K., Sun W.Q. (2020) Evaluation and preservation of vascular architectures in decellularized whole rat kidneys. *Cryobiology*, 95 72–79.
- Flynn L.E. (2010) The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 31 (17) 4715–4724.
- Forouzes F., Rabbani M., Bonakdar S. (2019) A comparison between ultrasonic bath and direct sonicator on osteochondral tissue decellularization. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 9 (4) 227–233.
- Freeman J. (2013) *Stanica*. 3. izd, (Ed): Sibila Jelaska, Stjepan Gamulin, Draško Šermam. Medicinska naklada, Zagreb.
- Gilbert J.L. (2020) *Metals: Basic Principles*. U: Sakiyama-Elbert S. E., Wagner W. R., Yaszemski M. J., Zhang G. (ed.): *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, str. 103-114 Elsevier Inc, SAD.
- Gilpin A., Yang Y. (2017) Decellularization strategies for regenerative medicine: From processing techniques to applications. *BioMed Research International*, 2017 (4) 1–13.
- Gómez-Florit M., Domingues R.M.A., Bakht S.M., Mendes B.B., Reis R.L., Gomes M.E. (2020) *Natural Materials*. U: Hoffman A.S., Lemons J. E., Ratner B. D., Schoen F. J. (ed): *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, str. 123-133, Elsevier Inc. SAD.
- Grauss R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F., Van Munsteren C.J., Gittenberger-De Groot, A.C., DeRuiter M.C. (2005) Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 27 (4) 566–571.
- Gupta S.K., Mishra N.C. Dhasmana A. (2018) Decellularization methods for scaffold fabrication. *Methods in Molecular Biology*, 1577 1–10.
- Hsu M.W., Chen S.H., Tseng W.L., Hung K.S., Chung T.C., Lin S.C., Koo, J., Hsueh Y.Y. (2023) Physical processing for decellularized nerve xenograft in peripheral nerve regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11(5) 1–6.
- Hu M., Bi H., Moffat D., Blystone M., DeCostanza L., Alayi T., Ye K., Hathout Y., Jin S. (2021) Proteomic and bioinformatic analysis of decellularized pancreatic extracellular matrices. *Molecules*, 26 (21) 1-22.
- John J.V., McCarthy A., Xie J. (2022) Electrospun nanofiber matrix for tissue repair and regeneration, U: Thankam F. G., Sharma C. P., Thomas V. (ed): *Tissue Engineering: Current Status and Challenges*, str. 175-191, Elsevier Inc, SAD.
- Jones J.R., Gibson I.R. (2020) *Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics*. Fourth Edi, U: Sakiyama-Elbert S. E., Wagner W. R., Yaszemski M. J., Zhang G. (ed.): *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, str. 289-305 Elsevier Inc, SAD.
- Kalipatnapu S., Chattopadhyay A. (2005) Membrane protein solubilization: Recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life*, 57 (7) 505–512.
- Keane T.J., Londono R., Turner N.J., Badylak S.F. (2012) Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33 (6) 1771–1781.
- Krishnan A., Wang H., MacArthur J.W. (2022) Applications of tissue decellularization techniques in ventricular myocardial biofabrication. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10 (2) 1–7.
- Langer R.S., Vacanti J.P. (1999) Tissue engineering: the challenges ahead. *Scientific American*, 280 (4) 86–89.
- Le T. M., Morimoto N. L., Nhung T. M., Mitsui T., Notodihardjo S. C., Munisso M. C. Kakudo, N., Moriyama H., Yamaoka T., Kusumoto K. (2020) Hydrostatic pressure can induce apoptosis of the skin. *Scientific Reports*, 10 (1) 1–16.
- Lee K.Y., Mooney D.J. (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37 (1) 106–126.
- Mastrullo V., Cathery W., Velliou E., Madeddu P., Campagnolo, P. (2020) Angiogenesis in tissue engineering: As nature intended? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (3) 1–13.
- Meyer U. (2009) *The history of tissue engineering and regenerative medicine in perspective*. Springer, Berlin, Heidelberg, (7) 5–12.
- Moffat D., Ye K., Jin, S. (2022) Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of Tissue Engineering*, 13(2) 1–29.
- Mouw J.K., Ou G., Weaver V.M. (2014) Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15 (12) 771–785.
- Neishabouri A., Soltani Khaboushan A., Daghigh F., Kajbafzadeh A.M., Majidi Zolbin, M. (2022) Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: Evaluation, modification, and application methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10 (4) 1–21.
- Olsen J. V., Ong S.E., Mann M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3 (6) 608–614.
- Ott H.C., Clippinger B., Conrad C., Schuetz C., Pomerantseva I., Ikonomou L., Kotton D. Vacanti J.P. (2010) Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Medicine*, 16 (8) 927–933.
- Peppas, N.A., Hoffman, A.S. (2020) Hydrogels. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*, (1) 153–166.
- Poel W. (1948) Preparation of acellular homogenates from muscle samples. *Science*, 108.
- Prasertsung I., Kanokpanont S., Bunaprasert T., Thanakit V., Damrongsakkul S. (2008) Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 85 (1) 210–219.
- Rapone B., Inchingolo A.D., Trasarti S., Ferrara E., Qorri E., Mancini A., Montemurro N., Scarano A., Inchingolo A. M., Divalpa G., Inchingolo F. (2022) Long-term outcomes of implants placed in maxillary sinus floor augmentation with porous fluorohydroxyapatite (Algipore® FRIOS®) in comparison with anorganic bovine bone (Bio-Oss®) and platelet rich plasma (PRP): A retrospective study, *Journal of Clinical Medicine*, 11 (9) 2491–2504.
- Raskov H., Gaggar S., Tajik A., Orhan A., Gögenur I. (2023) The matrix reloaded—The role of the extracellular matrix in cancer. *Cancers*, 15 (7) 1–24.
- Ratcliffe J.L., Walker M., Eissa A.M., Du S., Przyborski S.A., Laslett A.L., Cameron N.R. (2019) Optimized peptide functionalization of thiol-acrylate emulsion-templated porous polymers leads to expansion of human pluripotent stem cells in 3D culture. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 57 (18) 1974–1981.
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., Wagner W.R., Sakiyama-Elbert S.E., Zhang G., Yaszemski M.J. (2020) Introduction



- to Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. U: Sakiyama-Elbert S. E., Wagner W. R., Yaszemski M. J., Zhang G. (ed.): Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, str. 103-114 Elsevier Inc, SAD.
- Ratner B.D., Zhang, G. (2020) A History of Biomaterials. U: Sakiyama-Elbert S. E., Wagner W. R., Yaszemski M. J., Zhang G. (ed.): Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, str. 103-114 Elsevier Inc, SAD.
- Remlinger N.T., Czajka C.A., Juhas M.E., Vorp D.A., Stolz D.B., Badylak S.F., Gilbert, S., Gilbert T.W. (2010) Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials*, 31 (13) 3520–3526.
- Ressler A., Gudelj A., Zadro K., Antunović M., Cvetnić M., Ivanković M., Ivanković, H. (2020) From bio-waste to bone substitute: Synthesis of biomimetic hydroxyapatite and its use in chitosan-based composite scaffold preparation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 34 (2) 59–71.
- Qiu X., Lee B. L.-P., Wong S.Y., Xu K., Zhao W., Wang D.R., Dong N., Li S.P. (2021) Cellular remodeling of fibrotic conduit as vascular graft. *Biomaterials*, 268 (1) 565–582.
- Saldin L.T., Cramer M.C., Velankar S.S. White, L.J., Badylak, S.F. (2017) Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 49, 1–15.
- Simsa R., Padma A.M., Heher P., Hellström M., Teuschl A., Jenndahl L., Bergh N., Fogelstrand P. (2018) Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels. *PLoS ONE*, 13 (12) 1–19.
- Slivac I., Zdraveva E., Ivančić F., Žunar B., Grgurić Holjevac T., Gaurina Srček V., Svetec I. K., Dolenc T., Govorčin Bajsić E., Tominac Trein M., Mijović B. (2021) Bioactivity comparison of electrospun pcl mats and liver extracellular matrix as scaffolds for hepG2 cells. *Polymers*, 13 (2) 1–11.
- Smith, J., Fishman M., Ghionzoli M., Turmaine M., Birchall M.A., Atala A., Soker S., Lythgoe M. F, Seifalian A., Pierro A., Eaton S., De Coppi P. (2012) A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials*, 33 (12) 3401–3410.
- Stern, M.M., Myers, R.L., Hammam, N., Stern, K.A., Eberli, D., Kritchevsky, S.B., Soker, S. i Van Dyke, M. (2009) The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. *Biomaterials*, 30 (12) 2393–2399.
- Struecker B., Hillebrandt K.H., Voitl R., Butter A., Schmuck R.B., Reutzel-Selke A., Geisel D., Joehrens K., Pickerodt P.A., Raschzok N., Puhl G., Neuhaus P., Pratschke J. (2015) Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions – A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. *Tissue Eng Part C Methods*, (3) 303–313.
- Topuz B., Günal G., Guler S., Aydin H.M. (2020) Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization. *Methods in Cell Biology*, 49–79.
- Totonelli G., Panagiotis M., Garriboli J., Riegler G., Orlando A.J., Burns N. J, Sebire V. V Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. (2016) Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in Wound Care*, 5 (3) 119–136.
- Vacanti, J.P., Langer, R. (1999) Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354 (SUPPL.1), 32–34.
- Watanabe N. M., Matsuda M., Nakamura J., Otabe N., Katano K., Ozeki H., Kohno N., Kimura Y., Tsuji T., Koga K., Kishida H., Sekiya A.I. (2019) Comparison of high-hydrostatic-pressure decellularized versus freeze-thawed porcine menisci. *Journal of Orthopaedic Research*, 37 (11) 2466–2475.
- Yang B., Zhang Y., Zhou L., Sun Z., Zheng J., Chen Y., Dai Y. (2010) Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 16 (5) 1201–1211.
- Yusof F., Sha'ban M., Azhim A. (2019) Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: Potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5491–5502.
- Zhang X., Chen X., Hong H., Hu R., Liu J., Liu C. (2022) Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive Materials*, 10 (6) 15–31.
- Zhe M., Wu X., Yu P., Xu J., Liu M., Yang G., Xiang Z., Xing F., (2023) Recent advances in engineering bioinks for 3D bioprinting. *Advanced Engineering Materials*, 16 (8) 3197–3228.