

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Zuzana Meislová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Decelularizace v tkáňovém inženýrství
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Decellularization in tissue engineering
Bachelor thesis

2023

Zuzana Meislová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana Meislová**
Osobní číslo: **C20243**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Decelularizace v tkáňovém inženýrství**
Téma práce anglicky: **Decellularization In Tissue Engineering**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Bakalářskou práci zaměřenou na decelularizaci v tkáňovém inženýrství zpracujte na základě literární rešerše. Úvodní část práce věnujte tkáňovému inženýrství, definujte jeho pozici v rámci regenerativní medicíny a pokuste se shrnout jeho hlavní směry, cíle a možnosti využití.
2. V hlavní části práce nejprve definujte pojem *scaffold*, shrňte jejich základní typy a věnujte se možnostem jejich přípravy. Zvláštní pozornost věnujte procesu decelularizace tkání. Definujte proces přípravy scaffoldů, uveďte jeho princip, podrobný popis a zaměřte se také na možnosti využití scaffoldů připravených decelularizací. Pokuste se dále vyhledat i aktuální klinické studie, které se využitím scaffoldů připravených decelularizací zabývají. V závěrečné části práce se pokuste definovat, jaké jsou v rámci tkáňového inženýrství limity možného využití základních typů scaffoldů a jaké je jejich potenciál uplatnění v budoucnu.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Štěpánka Jelínková**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Decelularizace v tkáňovém inženýrství jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2023

Zuzana Meislová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych především poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D., mé konzultantce Mgr. Štěpánce Jelínkové. Chtěla bych poděkovat za obrovskou pomoc, trpělivost a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu při studiu.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá problematikou decelularizace a jejím praktickým využitím v klinické praxi. Nejdříve je v práci popsáno tkáňové inženýrství, se zaměřením na výrobu scaffoldů a jejich následné použití. Dále jsou popsány principy jednotlivých decelularizačních metod, které se používají za účelem získání decelularizované extracelulární matrice. Tyto metody jsou rozděleny na základě jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tkáňové inženýrství, regenerativní medicína, scaffold, extracelulární matrix, decelularizace.

TITLE

Decellularization In Tissue Engineering

ANNOTATION

The bachelor's thesis deals with the issue of decellularization and its practical use in clinical practice. First, the work describes tissue engineering, which deals with the production of scaffolds and their subsequent use. The principles of individual decellularization methods which are used to obtain a decellularized extracellular matrix are described. These methods are divided based on their physical, chemical and biological properties.

KEYWORDS

Tissue engineering, regenerative medicine, scaffold, extracellular matrix, decellularization.

Obsah

ÚVOD	12
1. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	13
1.1 Historie tkáňového inženýrství	14
1.2 Regenerativní medicína.....	14
1.3 Transplantace	15
2. SCAFFOLDY	16
2.1 Porézní scaffoldy.....	17
2.2 Enkapsulace buněk.....	18
2.3 Buněčné listy	19
2.4 Decelularizovaná extracelulární matrix	19
2.5 Buňky	20
3. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX.....	23
3.1 Fibrózní proteiny	24
3.1.1 Kolagen.....	24
3.1.2 Elastin	25
3.1.3 Fibronektin.....	25
3.1.4 Fibrilin	25
3.2 Mukopolysacharidy.....	26
3.2.1 Kyselina hyaluronová	26
3.2.2 Glykosaminoglykany se sulfonovou skupinou	27
4. DECELULARIZACE	29
4.1 Imunogenicita.....	30
4.2 Fyzikální metody decelularizace.....	31
4.2.1 Metoda teplotního šoku	31
4.2.2 Metoda perfusní pumpy	32
4.2.3 Metoda ponoření a míchání	33

4.2.4	Metoda využívající superkritickou kapalinu.....	33
4.2.5	Mechanické zatížení a hydrostatický tlak.....	34
4.3	Chemické metody decelularizace.....	35
4.3.1	Surfaktanty.....	35
4.3.2	Kyseliny.....	36
4.3.3	Zásady a alkoholy.....	37
4.3.4	Hypertonické a hypotonické roztoky.....	37
4.4	Enzymatické metody decelularizace.....	38
4.4.1	Proteázy.....	39
4.4.2	Nukleázy.....	40
4.4.3	Lipázy.....	40
4.5	Sterilizace a recelularizace decelularizované tkáně.....	41
	ZÁVĚR.....	43
	POUŽITÁ LITERATURA.....	44

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Schéma oborů zasahující do tkáňového inženýrství	13
Obrázek 2: Přístupy pro tvorbu scaffoldu schéma.....	17
Obrázek 3: Schéma extracelulární matrix	24
Obrázek 4: Disacharidová podjednotka heparan a heparin sulfátu.....	27
Obrázek 4: Disacharidová podjednotka chondroitin sulfátu.....	28
Obrázek 5: Tkáň získaná z prasečí aorty obarvená hematoxylinem a eozinem	30
Obrázek 7: Aparatura perfusní decelularizace	33
Obrázek 8: Aparatura pro zvýšení hydrostatického tlaku.....	35

SEZNAM ZKRATEK

CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
CS	chondroitin sulfát
dECM	decelularizovaná extracelulární matrix
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DS	dermatansulfát
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EO	ethylenoxin
FN	fibronektin
GAGs	glykosaminoglykany
HA	kyselina hyaluronová
HS	heparan sulfát
KS	keratan sulfát
MHC	molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NK	<i>natural killers</i> buňky
RNA	kyselina ribonukleová
scCO ₂	superkritický oxid uhličitý
SD	deoxycholát sodný (<i>Deoxycholate Sodium</i>)
SDS	dodecylsírán sodný (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TGFβ	transformující růstový faktor β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)

ÚVOD

Během posledních dvou desetiletí dochází ke zvýšení civilizačních nemocí, mezi které se řadí choroby kardiovaskulární, které populaci postihují z civilizačních chorob nejvíce. S těmito nemocemi dochází ke zvýšení poptávky po orgánech kardiovaskulárního systému.

Tkáňové inženýrství je jednou z mnoha oborů, které patří pod regenerativní medicínu. Regenerativní medicína je vědní obor, který se zabývá transplantací, buněčnou terapií, genovou terapií a kmenovými buňkami. Tkáňové inženýrství se zabývá tvorbou scaffoldů ze syntetických a přírodních materiálů. Existuje mnoho technik, kterými lze získat scaffold, který se využije při transplantacích. Jednou z možností pro výrobu scaffoldů je metoda decelularizace.

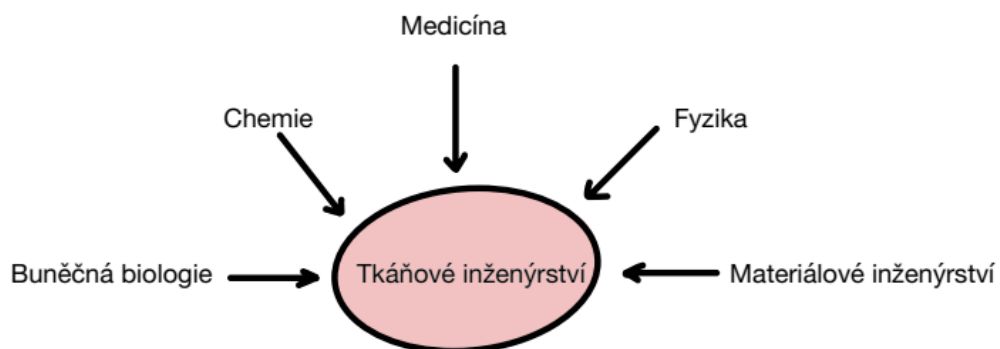
Decelularizace využívá chemických, enzymatických a fyzikálních metod, které umožňují přípravu decelularizované extracelulární matrice. Extracelulární matrix je oporná struktura všech tkání a orgánů, tvořící prostory, biochemickou podporu a homeostázu. Při decelularizaci dochází k odstranění buněk a buněčných zbytků, které by při implementaci do těla pacienta vyvolal nežádoucí imunitní reakci.

Přestože je decelularizace zkoumaná a vyvíjená již několik desetiletí, její použití stále není možné v klinické praxi. Použití decelularizované matrix pro transplantované orgány se nepotýká pouze s praktickými, ale i s etickými problémy, které vznikají se zdrojem tkání určených pro decelularizaci.

1. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Lidský organismus vlivem stárnutí, stresu a poškození, ztrácí schopnost regenerace a není tak schopen navrátit orgánům a tkáním původní vzhled. Tradiční metodou při náhradě poškozených orgánů se stala transplantace štěpů nebo celých orgánů zajištěných z dárců, či z jiné části těla pacienta. Bohužel má tato metoda několik nevýhod. Tímto zákrokem se pacient vystavuje různým komplikacím, jako je například vznik hematomu nebo nežádoucí imunitní reakce na transplantát. Dalším problémem je nedostatek orgánů potřebných pro transplantaci, jelikož poptávka se každým rokem zvyšuje (HABIBZADEH a kol., 2022).

Důležitou součástí regenerativní medicíny se stalo tkáňové inženýrství, jehož první myšlenky byly představeny v 70. letech 20. století. Jedná se o multidisciplinární obor zasahující do medicíny, biochemie, technologického inženýrství, buněčné a molekulární biologie (Obr. 1). Díky svému možnému využití se jedná o jednu z nejrychleji rostoucích disciplín v biomedicínském inženýrství. Cílem tkáňového inženýrství je vytvoření biologicky ekvivalentních náhrad tkání nebo celých orgánů. Tkáně či orgány vytvořené pomocí tkáňového inženýrství jsou složeny ze scaffoldů, buněk a růstových mediátorů (SUN a kol., 2023).



Obrázek 1: Schéma oborů zasahujících do tkáňového inženýrství (SUN a kol., 2023).

Tkáňové inženýrství kromě vytváření bioinženýrsky upravených transplantátů zasahuje do testování *in vitro*. Materiálem pro testování farmaceutik a pozorování průběhu fatálních nemocí jsou geneticky pozměněné zvířecí tkáně, které nemohou dostatečně napodobit lidskou tkáň. Tkáňové inženýrství směřuje k možnosti napodobit prostředí lidského těla zahrnující architekturu, biomechaniku a růstové faktory. Personalizovaná medicína by mohla využít tkáňového inženýrství k individuálnímu testování pro léčebné přípravky nebo vytvoření orgánu z pacientských buněk (HASAN a MHANNA, 2017).

1.1 Historie tkáňového inženýrství

Transplantace kožních štěpů patří mezi první transplantační zákroky. Chirurg Johann Friedrich Dieffenbach sepsal v roce 1822 tezi o tkáňové transplantaci. Popisoval transplantaci per u ptáků a kůže u savců. Dodnes je považován za zakladatele moderní plastické chirurgie. Roku 1858 Rudolf Virchov potvrdil teorii závislosti regenerace tkáně na buněčné proliferaci, což zvýšilo zájem vědecké komunity v oblasti histologie. Mezi oblastmi, do kterých bylo více nahlíženo, patřilo hojení ran a transplantace (SHULTHEISS a kol., 2000).

Úspěšná kultivace buněk a jejich následná transplantace byla provedena roku 1897 C. A. Ljunggrenem. Malé ostrůvky kůže byly uchovány v ascitické tekutině pacienta a poté transplantovány. První úspěšná transplantace ledviny provedená na člověku byla provedena u jednovaječných dvojčat roku 1954 (SHULTHEISS a kol., 2000).

Jako počátek tkáňového inženýrství lze považovat experimenty prováděné dětským ortopedem W. T. Green, M.D. Kolem roku 1970 prováděl pokusy na myších se snahou vytvořit novou chrupavku pomocí chondrocytů a kostních fragmentů. O pár let později Dr. Burke vydal studii zabývající se tvorbou náhrady kůže pomocí kolagenové matrix, která sloužila jako dostačující opora pro růst dermálních fibroblastů (VACANTI., 2006).

V 80. letech Dr. Joseph Vacanti přednesl nápad vytvořit opornou strukturu za účelem vytvoření ideálního prostředí pro buňky, která by nahradila přirozené prostředí. Ve výzkumných pracích se zabýval možnostmi použití různých syntetických a biokompatibilních materiálů (VACANTI, 2006).

1.2 Regenerativní medicína

Medicína se již dlouho snaží pochopit mechanismus pomocí kterého někteří obojživelníci a plazi dokážou regenerovat nebo nahradit chybějící orgán. Například ryba *Danio rerio* se řadí mezi extrémní příklady. Mezi tkáně, které dokáže regenerovat, patří hepatická tkáň a srdeční svalstvo. U lidí při infarktu myokardu dochází k hojení pomocí fibrotického jizvení. Přestože dojde k obnově integrity srdeční stěny, srdce je nevratně poškozeno a dojde ke zhoršení pumpovací funkce a následnému srdečnímu selhání (ALTYAR a kol., 2023).

Nutnost regenerativní medicíny roste díky růstu kardiovaskulárních chorob, nádorových onemocnění, *diabetu mellitu*, respiračním problémům a stárnoucí populaci. Pro řešení takovýchto problému je nutné vytvořit strategie, které zamezí dysfunkci orgánů a zvrátí degradaci tkání. Regenerativní medicína je relativně nový obor v medicíně, pod který spadá buněčná terapie, orgánové transplantace a tkáňové inženýrství (TEZTIC a kol., 2015).

Aktuální směry regenerativní medicíny zahrnují transplantaci zdravých orgánů, povzbuzení organismu pro přijetí orgánu, genovou terapii zaměřující se na dědičné abnormality a patologické defekty, buněčné přeprogramování, využití nanotechnologií pro tvorbu implantátů využívaných primárně při reparaci kostní tkáně, regenerační odpovědi organismu a tvorbu nových tkání a orgánů pomocí tkáňového inženýrství (ALTYAR a kol., 2023; TEZTIC a kol., 2015).

1.3 Transplantace

Úkolem transplantace je výměna nebo regenerace orgánu, který je poškozen nebo došlo k jeho selhání. Raná éra se zakládala na pouhé transplantaci orgánů, kdy docházelo k častému odmítnutí transplantátu organismem pacienta vlivem imunitního systému. Díky novým informacím a technologiím byla vyvinuta imunosupresiva. Pomocí takovýchto farmaceutik bylo umožněno darování orgánů bez navození imunitní reakce. Navíc došlo k rozšíření okruhů dárců. Směrem, kterým se transplantace ubírají, se stala regenerativní medicína (EDGAR a kol., 2020).

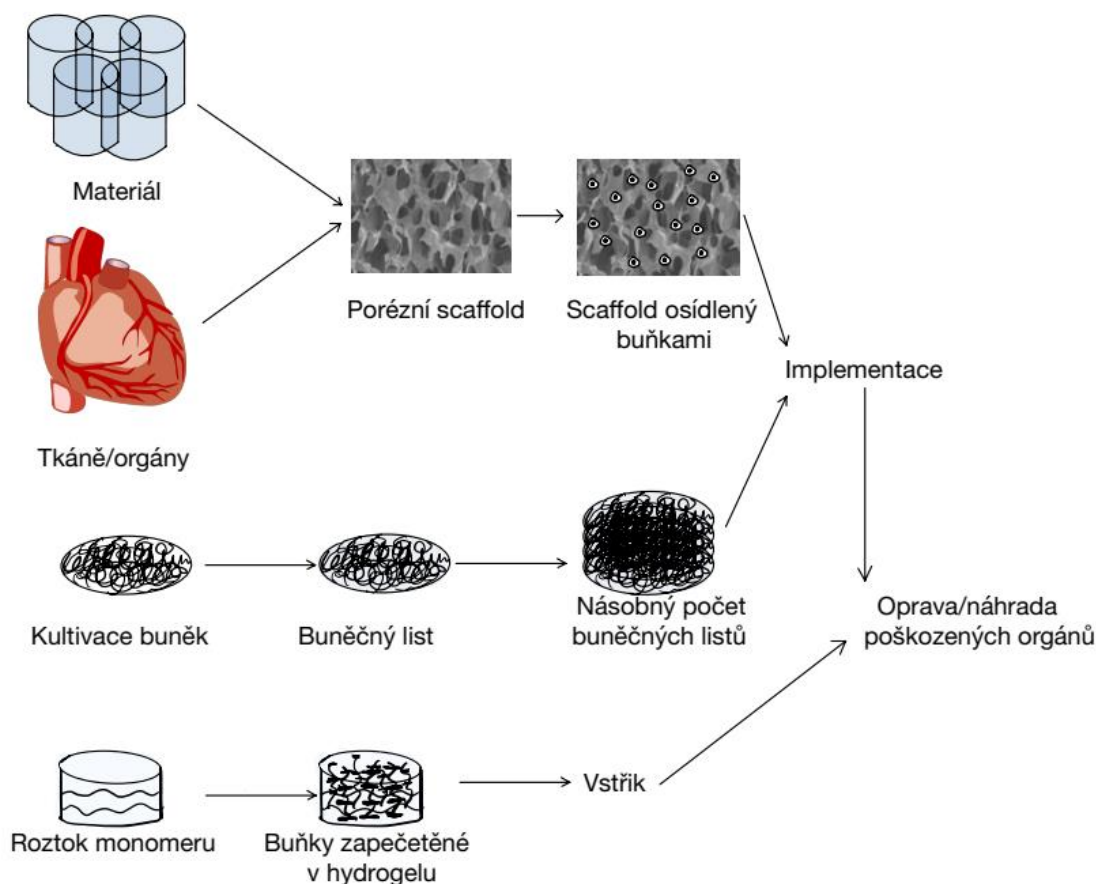
Snahou úspěšné transplantace je zaručení kvalitního života pacienta a vyvážení negativních vlivů imunosupresiv. Farmaceutika používaná pro potlačení imunitního systému se často potýkají s toxickým účinkem vůči orgánům pacienta, kdy nejvíce ohroženým orgánem jsou ledviny. V horizontu 10 let mají transplantované štěpy nefropatických ledvin přibližně 50% pravděpodobnost selhání (EDGAR kol., 2020).

2. SCAFFOLDY

Scaffolds jsou porézní oporné struktury určené pro přípravu náhradních orgánů a tkání. Trojrozměrné porézní scaffolds se rozdělují do kategorií v závislosti na původu materiálu použitého k výrobě těchto nosičů. Využívány jsou syntetické nebo přírodní polymery. Přední vlastností polymerů je jejich biodegradabilita. Materiály diskutované v této kategorii tvoří pevné, stabilní a porézní scaffolds. Nedochozí k jejich rozpuštění v *in vitro* podmínkách. Mezi hlavní syntetické zástupce používaných polymerů se řadí polyestery, polyhydridy, polyacetyony a polyanhydridy. Rozšířeně se používají v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldu chrupavky, kosti a kůže. Přírodní polymery používané v tkáňovém inženýrství zahrnují kolagen, glykosaminoglykany a polypeptidy. Nově vytvořený scaffold je připraven pro implementaci nových buněk (CHEN a kol., 2002).

Další možností je zapečetit buňky ve struktuře scaffoldu během jeho vytváření (Obr. 2). Mezi materiály, které je zde možné použít, jsou řazeny hydrogely. Hydrogely mají výborné biokompatibilní vlastnosti, ale díky špatným mechanickým vlastnostem jsou nepoužitelné pro orgány, jejichž funkcí je opora těla. Scaffoldem může být také decelularizovaný orgán. Při decelularizaci dochází k získání extracelulární matrix (ECM) bez buněk a jejich zbytků, která slouží jako prostor pro osídlování nových buněk. ECM se dá rozdělit na xenogenní ECM získanou ze zvířat, allogenní ECM získanou z lidského dárce a autogenní ECM získanou ze stejného pacienta, kterému bude scaffold transplantován. Biologický materiál pro transplantaci se nejčastěji získává z lidských, prasečích, koňských nebo hovězích tkání, které byly fixované konzervačními látkami. Nejvhodnějším materiálem je tkáň lidská, a to kvůli své malé imunogenicitě. V neposlední řadě je další možností inženýrství buněčných listů. Tato metoda se zbavuje možných problémů způsobených degradací scaffoldů v těle, které jsou nahrazeny tělu vlastní extracelulární matrix (HASAN a MHANNA., 2017).

Scaffolds musí být schopny poskytovat dostatečný volný objem pro vaskularizaci a tvorbu nové tkáně tak, aby byla usnadněna integrace hostitelské tkáně. Dále by měly mít dostatečně porézní strukturu pro prostup živin a transport metabolitů bez významného mechanického poškození scaffoldu. Rychlost degradace použitých materiálů po implementaci musí být úměrná produkci nové matrix při vytváření nové tkáně. Dále je nutné zohlednit kompatibilitu implementovaných buněk a scaffoldu během *in vitro* testování, aby bylo možné využití v *in vivo* systémech. Při vytvoření nového scaffoldu musí být zachována struktura a mechanická stabilita původního orgánu (CHAN a kol., 2008).



Obrázek 2: **Přístupy pro tvorbu scaffoldu:** schéma vyobrazující kroky při vytváření scaffoldu (upraveno dle HASAN a MHANNA, 2017).

2.1 Porézní scaffoldy

Od počátků tkáňového inženýrství bylo usídlování terapeutických buněk v porézních materiálech hlavní představou pro tvorbu funkčních scaffoldů. Trojdimenzionální (3D) scaffoldy skládající se ze syntetického materiálu, který má schopnost biodegradace, musí mít různou velikost a frekvencovanost pórů. Obecně jsou využívány komponenty přirozeně se vyskytující v ECM. Přirozené materiály jsou připravené v malých blocích, které jsou následně aplikovány do scaffoldu. Přestože mezi výhody přirozeně se vyskytujících materiálů jsou řazeny pozitivní aspekty jako je biokompatibilita, tak přirozené materiály zaostávají v mechanických vlastnostech a stabilitě struktury vytvořeného scaffoldu. Toto je důvod, proč dochází k vytvoření syntetických materiálů, které mají lepší mechanické vlastnosti, ale zároveň mají stejné biokompatibilní vlastnosti přirozeně se vyskytujícího materiálu v ECM (CHAN a kol., 2008).

Póry hrají důležitou roli v oblasti proliferace, zásobování živinami a buněčné migraci. Materiály s vysokou porézností umožňují uvolnění biofaktorů, mezi které se řadí proteiny a buňky. Mezi tradiční metody používané pro formaci scaffoldů jsou řazeny výrobní techniky jako použití porogenů, kdy dochází u látek v pevné nebo rozpuštěné formě k vytvoření pórů v materiálech. Příklady technik zahrnují vyluhování v solném roztoku, plynové pění, lyofilizaci a separaci fází. Pomocí těchto metod ale není možné úplné ovládnutí geometrického složení scaffoldu jako nabízí tisk na 3D tiskárnách (LOH a CHOONG, 2013).

Další kategorie technik, vytvářející porézní scaffoldy, využívá sekvenční dodávání materiálu a energie k propojení bodu v prostoru. Patří sem laserové slinování, stereolitografie a 3D tisk. V posledních dvou desetiletích 3D tisk způsobil důležité změny nejenom v oborech letectví a manufaktury, ale také v tkáňovém inženýrství. Scaffoldy vytvořené v tkáňovém inženýrství pomocí 3D tisku zajišťují naprostou kontrolu nad strukturou scaffoldu (CHAN a kol., 2008).

Třetí kategorie využívá tkané a netkané vláknité struktury, které mohou být spojené dohromady pomocí tepelné energie nebo adhesiv k vytvoření porézního pletiva. Vlákna mohou být generována technikou elektrostatického zvláknování. Při této technice dochází k pouštění vysokého napětí do roztoku polymeru, kde elektrostatické síly způsobují v roztoku polymeru překonání povrchového napětí a dochází k vytvoření vláknité struktury. Materiál, který lze použít pro výrobu scaffoldů, je velmi různorodý. Jedná se o materiály od keramiky až po hydrogely. Mechanické aspekty scaffoldů vytvořených pomocí těchto technik jsou rovnocenné s mechanickými aspekty původních orgánů. Díky různorodosti možností materiálů použitých k výrobě, je biokompatibilita scaffoldu a buněk srovnatelná s přirozenými tkáněmi (CHAN a kol., 2008).

2.2 Enkapsulace buněk

Jednou z možných metod pro vytvoření scaffoldu je začlenění buněk do procesu tvorby scaffoldů. Dochází k zachycení buněk v materiálu, což vede po implementaci orgánu do organismu ke skrytí takto zapečetěných buněk před imunitním systémem. Buňky jsou smíchány s materiálem pro tvorbu scaffoldu ještě před tím, než začne scaffold tuhnut a formovat tvar. Aktuálním problémem této metody je často nízká poréznost použitého materiálu, který ovlivňuje distribuci kyslíku a živin k buňkám. Nejpoužívanějším materiálem jsou hydrogely, které jsou kompatibilní s živými buňkami (LOH a CHOONG, 2013).

Principy této metody byly vyvíjeny několik desetiletí a její dominantní použití spočívá v imunoizolaci při transplantaci allogenních nebo xenogenních buněk. Nejběžněji používaným

materiálem pro enkapsulizaci je alginát. Mezi ostatní materiály patří agaróza nebo chitosan, které jsou přírodního původu. Dále jsou používány syntetické láky jako je polyethylenglykol a také polyvinylalkohol. Nejznámější aplikací je xenogenní transplantace při onemocnění *diabetes mellitus*. Aby imunoizolace fungovala, je důležité, aby materiál obklopující buňky nepropustil protilátky a buněčné složky imunitního systému, ale zároveň zůstal propustný pro živiny, jako je kyslík a glukóza, metabolity jako je oxid uhličitý nebo kyselina mléčná. Důležitá je dále sekrece terapeutických biomolekul z enkapsulovaných buněk, jako je například inzulin z pankreatických beta buněk (CHAN a kol., 2008).

2.3 Buněčné listy

Alternativní cestou pro získání implantátu, kdy nedochází k vytvoření scaffoldu pomocí biomateriálů, je vytvoření buněčných listů. Při této metodě je používán kultivační plast potažený polymerem, který umožňuje tvorbu neporušených listů. Mezi takto kultivované buňky jsou řazeny fibroblasty, a to díky své schopnosti sekrece proteinů ECM. Buněčné listy jsou sklizeny bez použití enzymatických metod. Toho je dosaženo pomocí kultivací buněk na termo-responzivním polymeru, jako je například kultivační médium potaženo poly(N-isopropylakrylamidem). Splývající buněčný list je poté oddělen díky tepelně regulující hydrofobnosti polymeru. Opakováním této techniky je docíleno vrstvení jednotlivých buněčných vrstev pro vytvoření tlustší matrice (CHAN a kol., 2008).

Takto připravený materiál je vhodný pro endoteliální epitel a tkáň hojně osídlené buňkami. Vysoká hustota buněk může vytvořit mezi sebou tzv. těsné spoje (*tight junctions*) a sekretovat ECM. Laminované vrstvy vedly k rychlé neovaskularizaci na rozdíl od objemných skeletů buněčně osídlených scaffoldů. Nevýhodou této metody se stala obtížnost vytvořit dostatečně tlustou tkáň pro provedení transplantace. Další nevýhodou nebo limitací této metody je neschopnost vytvořit tkáň s menší hustotou osídlení buněk nebo silnou mechanickou stabilitou. Příkladem použití této metody je rekonstrukce cév a rohovky. Na druhou stranu, tato metoda není vhodná pro kosti, chrupavky a meziobratlové ploténky (JANG a kol., 2007).

2.4 Decelularizovaná extracelulární matrix

Acelulární ECM zpracovaná z alogenních nebo xenogenních tkání je scaffold, který je nejvíce shodný po chemické, mechanické a biologické stránce s původním orgánem. ECM lze použít k opravě a regeneraci poškozené tkáně. Příkladem použití těchto alogenních strukturních tkání jsou decelularizované cévní štěpy (CHAN a kol., 2008). Podstata a metody vedoucí k decelularizované matrix budou popsány detailněji v následujících kapitolách.

Při transplantacích orgánů se může využít orgán jiného živočišného druhu, což je tzv. xenogenní transplantace. Jedním z hlavních faktorů, na který je brán ohled, je genetická a fyziologická podobnost daného orgánu. Mezi zástupce obratlovců využívané pro transplantaci do lidského těla byla v minulosti použita prasata. Reakcí organismu na vložení cizího tělesa do těla je imunitní reakce, která může vést k odmítnutí a v některých případech až ke zničení transplantátu. Rychlost a síla imunitní reakce závisí na vnímavosti imunitního systému daného organismu (MASSARO a kol., 2021).

Xenogenní transplantace mohou ohrožovat organismus možným mezidruhovým přenosem nemocí nebo parazitů. Zvířata určena pro růst orgánů určených pro transplantaci jsou kontrolovaně chována, aby se zamezilo nakažení zvířete. Další metody využívají kontroly projevu epitopu, který by mohl způsobit imunitní reakci. Xenogenní scaffold je připraven *in vitro* a poté transplantován. Celá tkáň je remodelována pomocí degradačních procesů a xenogenní části jsou nahrazeny autologními proteiny (MASSARO a kol., 2021).

2.5 Buňky

Dalším krokem pro vytvoření kvalitního klinického materiálu pro transplantaci je osídlení nově vytvořeného scaffoldu buňkami. Výzkum doposud nedokázal projít celou fází embryogeneze a vytvořit buňky v laboratorních podmínkách. Proto se používají buňky přímo od pacienta, tzv. primární buňky. Buňky jsou následně udržovány v kultuře. Po sklizni kultivovaných buněk jsou aplikovány pomocí bioinženýrských strategií do scaffoldu. Dochází k usazení buněk v místě aplikace nebo na zamýšlené místo (FU a kol., 2014).

Buňky jater, slinivky nebo nervového systému se řadí mezi ty, kde technologie nepokročila do bodu, kdy lze tyto buňky kultivovat mimo tělo ve velkém množství. Dvě vlastnosti obecně definují kmenovou buňku. Mezi tyto vlastnosti patří schopnost dlouhodobé sebeobnovy bez stárnutí a schopnost diferenciaci na jiný typ specializovaných buněk. Tyto buňky mají potenciál poskytnout nevyčerpatelnou zásobu buněk pro transplantaci. Proto je místo primárních buněk předpokládáno použití buněk kmenových (ATHALA, 2012).

Kmenové buňky lze rozdělit na základě toho, ze které fáze vývoje jsou získány. Embryonální kmenové buňky se nacházejí v ranném stádiu embrya. Jedná se pluripotentní buňky, které mají schopnost se diferenciovat v jakýkoliv druh buňky v těle (ATHALA, 2012). Indukované kmenové pluripotentní buňky jsou získávány ze somatických buněk fibroblastů, periferních krvinek a keratinocytů z vlasových stvolů. Účinné zajištění kompatibility je zajištěno tím, že buňky pocházejí přímo od pacienta, kterému budou později aplikovány. Díky časové náročnosti a etické problematice kultivace embryonálních a indukovaných

kmenových buněk je vhodnější použití dospělých kmenových buněk. Využití zde nachází mezenchymální kmenové buňky získané z kostní dřevě nebo kmenové buňky z jater. Tyto buňky jsou označovány jako multipotentní. Multipotentní buňka má schopnost své diferenciaci omezenou na buňky v oblasti dané tkáně nebo orgánů (ALTYAR a kol., 2023; LANZA a kol., 2020).

Dospělé kmenové buňky sídlí ve všech tkáních, kde udržují homeostatické podmínky a reagují na škodlivé podněty. Oblast kmenových buněk v posledním desetiletí stává středem zájmu. Výzkumníci se snaží porozumět regulačním mechanismům, které řídí regeneraci kmenových buněk a tkání (WALKER a kol., 2008). Zásobárny tkáňově specifických kmenových buněk jsou uloženy po celém těle, jako je například kostní dřevě, mozek, játra a kůže, za účelem regenerace tkání (RIPPON a BISHOP, 2004). Z orgánů byly izolovány mezenchymální, epitelální, hematopoetické, endotelové, a trofoblastické buňky zahrnující více než jeden typ progenitorových buněk. Početné zdroje kmenových buněk se potýkají s neúplnými analýzami a stále požadují větší validaci výsledků. Izolace potřebných buněk je založená na přirozené selekci na specializovaných kultivačních médiích (DIONGI a FAUZA., 2012).

Prvními získanými pluripotentními buněčnými liniemi byly buněčné linie embryonálního karcinomu, odvozené z nádoru myši a lidských zárodečných buněk. Tyto buňky mohly být kontinuálně kultivovány a mohly být také diferenciovány do tří zárodečných vrstev endodermu, ektodermu a mezodermu. Myší buňky embryonálního karcinomu pocházejí z rakovinotvorných buněk a jsou obvykle aneuploidní, což je dělá nevhodným kandidátem pro klinickou aplikaci v laboratořích. Přesto skvěle slouží jako modelový systém (RIPPON a BISHOP, 2004).

Terapeutické klonování se využívá k vytvoření embryí v raném stádiu z oocytu a jádra somatických buněk. Ty jsou explantovány v kultuře, aby produkovaly linie embryonálních kmenových buněk jejichž genetický materiál je identický se zdrojem. Tyto autologní kmenové buňky mají potenciál stát se téměř jakýmkoliv typem buněk v dospělém těle, díky čemuž se staly užitečnými při aplikacích náhrad orgánů a tkání. Ačkoliv je technologie přenosu jádra somatických buněk slibná, má řadu omezení, která vyžadují další zlepšení. V budoucnosti je zvažováno možné využití terapeutického klonování v substituční terapii (ATHALA, 2012).

Další možností je transformace dospělých buněk na pluripotentní kmenové buňky prostřednictvím určitého genetického přeprogramování. Přeprogramování je technika, která zahrnuje dediferenciaci dospělých somatických buněk za účelem produkce

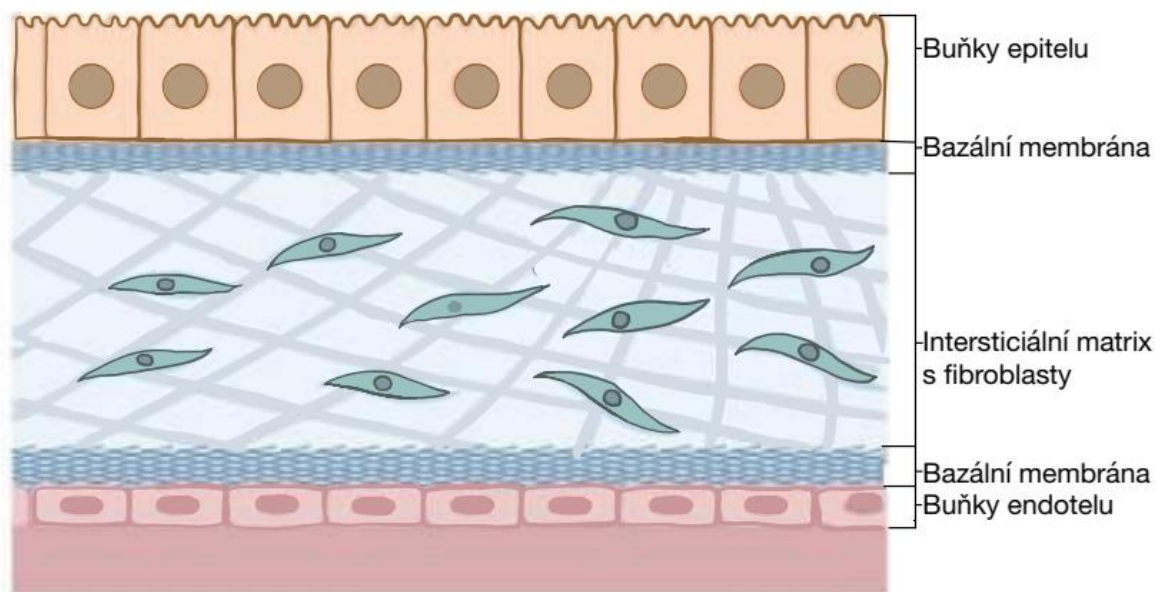
pluripotentních kmenových buněk specifických pro pacienta bez použití embryí. Při výzkumu této metody došlo k závěru, že vzniklé buňky mají nesmrtelné růstové charakteristiky samoobnovujících se embryonálních kmenových buněk, exprimují geny specifické pro kmenové buňky a generují embryonální tělíska *in vitro*. Dalším možným zdrojem pro kmenové buňky je plodová voda a placenta. Typickým znakem pro plodovou vodu a placentu je, že obsahují určité množství různých typů částečně diferenciovaných buněk. Z těchto zdrojů byly izolovány populace kmenových buněk, které exprimují markery embryonálních a dospělých kmenových buněk (ATHALA, 2012).

S ohledem na nedostatky terapeutických metod pro regeneraci životně důležitých orgánů se výzkumné týmy snaží vytvořit strategie, které dokážou překonat nynější přístupy. Nové směry regenerativní medicíny se vydávají k inovacím umělé inteligence, biomateriálů, mikrorobotiky a editace genomu (ALTYAR a kol., 2023).

3. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

ECM je oporou orgánů a skládá se z neživé extracelulární matrix, která obklopuje buňky a podporuje jejich výživu. ECM je nebuněčná složka všech orgánů a tkání v těle. Zajišťuje mechanickou oporu, biochemickou podporu, morfologii a homeostázu. Mezi hlavní složky ECM se řadí fibrózní proteiny a proteoglykany. Hlavními fibrózními proteiny v ECM jsou kolageny, elastiny, fibronektiny a laminy. Proteoglykany vyplňují většinu extracelulárního prostoru v tkáních v podobě hydratovaného gelu. Tkáň musí mít dynamické vlastnosti a dostatečnou pevnost, kterou jim zajišťuje právě ECM. Ztráta elasticity tkáně je nejčastěji způsobena mechanickým stresem způsobeným úrazem, nemocí nebo i stárnutím. Přestože tkáň po krátkém vystavení stresu obnoví svůj vzhled, tak v místě působení síly na ECM nedochází k úplnému plastickému zotavení. Při akutním poranění dochází k tvorbě fibrinové sraženiny, která stimuluje migraci monocytů do ECM. Po navázání zbytků poškozené ECM a zároveň s působením cytokinů se monocyty následně diferencují na makrofágy. Poté teprve začnou fibroblasty syntetizovat novou ECM. Další buňkou schopnou syntetizovat komponenty ECM jsou myofibroblasty, které podporují zesíťování kolagenových svazků zpevňující tkáň. Buňky adherují na povrch ECM pomocí transmembránových proteinů integrinů, receptorů diskoidinové domény a syndekany. Tyto receptory zajišťují nejen adhezi a migraci buněk, ale také komunikaci s ECM a okolními buňkami. Buňky ovlivňují strukturu EMC pomocí kontraktilní síly a zároveň ji biochemicky remodelují nebo degradují (MUTZ a kol., 2022; FRANTZ a kol., 2010).

ECM lze rozdělit na bazální membránu a intersticiální matici (Obr. 3). Bazální membrána je vrstva extracelulární matrix dostávající se do kontaktu s veškerým epitelem a endotelem, které rozdělují všechny tkáně v těle. Tvoří se v tenkých, kompaktních vrstvách kolagenu typu IV, lamininů, nidogenu, perlekanu a dalších proteoglykanů. Naproti tomu intersticiální matrix nejvíce obsahuje buňky, jako jsou fibroblasty, myofibroblasty a řada dalších buněk vylučují proteiny vláknité matrice a glykany a neustále remodelují a udržují ECM (VALDOZ a kol., 2021).



Obrázek 3: **Schéma extracelulární matrix** (Upraveno dle VALDOZ a kol., 2021).

Interakce mezi proteiny ECM a integrity zasazenými v buněčné membráně hraje zásadní roli v buněčné interakci. Integriny jsou proteiny zasazené v buněčné membráně fungující jako receptory umožňující vazbu s proteiny ECM jako jejich ligandy. Dokáží tak reagovat na změny složení ECM nebo na mechanické síly. Existují různé typy integrinů, které se liší svou specifíčností na proteiny a jejich přesné složení se liší pro různé tkáně (VALDOZ a kol., 2021).

3.1 Fibrózní proteiny

V ECM je mnoho proteinů s různou velikostí a schopností ovlivnit buňky obsažené v ECM. Pomocí elektronové mikroskopie lze strukturu ECM pozorovat. Matrice se skládá z fibrilárních sítí obklopující buňky, které poskytují tkáním pružnost a roztažitelnost. Elastické proteiny usnadňují elastogenezi a podílejí se také na hojení ran. Vlákňité proteiny jsou dále důležité pro regulaci transformujícího růstového faktoru β (TGF β) a signalizaci vazeb buněčných spojů pomocí integrinů (ZANG a kol., 2022).

3.1.1 Kolagen

Kolagen se řadí mezi fibrózní proteiny. Fibrózní proteiny tvoří filamentární síť, jejíž složení se liší v závislosti na funkci dané tkáně. Kolagen je dominantní složka v ECM a poskytuje mechanickou podporu většiny tkání. Je často používán v tkáňovém inženýrství, při hojení ran, regeneraci kostí anebo nervů (MUTZ a kol., 2022; LUO a kol., 2017). Jeho strukturu lze popsat jako monomer uspořádaný do trojšroubovice tvořený třemi paralelními polypeptidovými řetězci. Tyto monomery vytvářejí vlákna obsahující N–a D-konce.

Trojšroubovice jsou seřazeny vedle sebe do stupňovitého uspořádání. D-konce jsou charakteristickými rysy pro rozpoznání typu kolagenu pomocí transmisní elektronové mikroskopie, kdy jsou viditelné jako světlé a tmavé pásy. Kolageny se dále vážou na další kolagenní a nekolagenní struktury vytvářející ECM (VARMA a kol., 2016). Doposud bylo objeveno 28 různých typů kolagenů u obratlovců a vyšších bezobratlých. Nejzastoupenější mezi obratlovci je kolagen typu I. Stavebním kamenem kolagenu typu I je 300 nm dlouhý trojitý helix. Kolagen typu II je nejhojněji zastoupen v kolagenních chrupavkách spolu s minoritními kolageny zajišťujícími pevnost. Kolagen typu III je složen z tripletu aminokyselin Gly-Glu-Arg (GER) a Gly-Glu-Lys (GEK) (YANG a kol., 2021; COCCIOLONE a kol., 2017).

3.1.2 Elastin

Tkáně potřebující vysokou elasticitu, jako jsou například kůže a tepny, obsahují zvýšené množství elastinu přítomného ve formě elastických vláken. Vysoká elasticita je zajištěna díky posttranslačnímu zesíťování monomerního prekurzoru tropoelastinu. Tato látka dodává tkáním elasticitu a její hydrofilní části jsou zodpovědné za zesíťování vláken. Elastin se nachází pouze ve tkáních obratlovců. K expresi genu dochází při pozdním embryonálním vývoji a zastavení exprese dochází v pubertálním věku. Časově omezená exprese genu je pro proteiny ECM neobvyklá. Tato nevýhoda je vyrovnána odolností elastinu (MUTZ Iain a kol., 2022; COCCIOLONE a kol., 2017).

3.1.3 Fibronektin

Fibronektin (FN) je glykoprotein všudypřítomný v ECM. Ve všech tkáních je sestaven do fibrilární matrice. Tvoří flexibilní lineární vlákna a rozvětvené sítě umožňující elasticitu tkání. Fibrinogenní polymerizace je proces závisící na integrovaných proteinech buněk. Působící síly vytvořené buňkami působí na fibronektinová vlákna, která odkryjí vazebná místa určená pro buněčnou adhezi. FN se skládá z opakujících se podjednotek typu I, II a III. V ranných kulturách fibroblastů převládají tenké fibrily. Postupem času ECM dozrává a vytvářejí se vláknité sítě. FN obsahuje domény pro interakci s jinými ECM proteiny, buněčnými receptory, mukopolysacharidy a dalšími molekulami FN. Sestavení FN matrice je ovlivněno buňkami prostřednictvím vazby integrinu na doménu FN RGD (Arg-Gly-Asp), (MUTZ a kol.,2022; SINGH a kol.,2010).

3.1.4 Fibrilin

U lidí se nachází fibriliny podílející se na vytváření mikrofibril typu I, II a III. Typ II a III je převážně exprimován během fetálního období. Fibrilin typu I je tvořen neustále během

dospělosti ve tkáních jako je srdce, plíce, nervový systém a kůže. Lidský fibrillin I se skládá z 2781 aminokyselin a obsahuje více domén. *In vitro* experimenty ukázaly, že fibrillin I má schopnost se vázat do sítí sám se sebou. Dále reaguje s heparansulfátem, fibrillinem II a glykoproteiny, které formují elastická vlákna (ZANG a kol., 2022).

3.2 Mukopolysacharidy

Mukopolysacharidy neboli proteoglykany či glykosaminoglykany (GAGs) jsou negativně nabitě heteropolysacharidy, které tvoří dlouhé molekuly obsahující opakující se disacharidové komponenty o hmotnosti 10-100 kDa. Dělí se na GAGs bez sulfonové skupiny zahrnující kyselinu hyaluronovou (HA) a GAGs se sulfonovou skupinou. Mezi sulfonové skupiny obsažené v GAGs patří chondroitin sulfát (CS), dermatan sulfát (DS), keratan sulfát (KS), heparin a heparan sulfát (HS). GAGs jsou uloženy primárně na povrchu buněk nebo v ECM (IANNUZZI a kol., 2015).

ECM proteoglykany přispívají k signalizační dráze růstových faktorů. Proteoglykany selektivně vážou růstové faktory, což umožňuje ECM fungovat jako zásobárna růstových faktorů. Při degradaci ECM dochází k jejich uvolňování do okolí, což je stěžejní aspekt při embryonálním vývoji (VALDOZ a kol., 2021).

3.2.1 Kyselina hyaluronová

Schopnosti polysacharidů se využívají například v regulaci buněčné migrace. Mezi polysacharidy s biologickými funkcemi patří alginát, chitosan, HA a CS. Kyselina hyaluronová má nejjednodušší stavbu ze všech GAGs a nepožaduje sulfataci v Golgiho aparátu. Struktura se skládá ze zbytků kyseliny glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu tvořící nerozvětvený řetězec. Na rozdíl od jiných GAGs, které jsou syntetizovány v buňce v Golgiho aparátu a poté sekretovány exocytózou, HA je syntetizována třemi transmembránovými enzymy. Přes cytoplazmatickou membránu se dostávají difuzí do extracelulárního prostoru pro syntézu HA (RUD a kol., 2010).

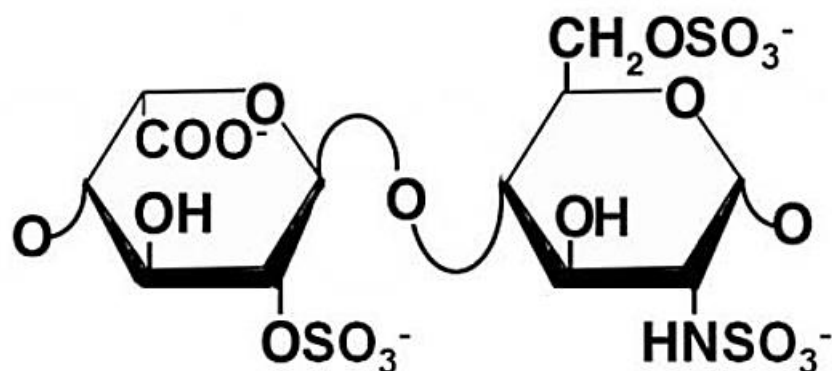
Nachází se u bakterií a obratlovců, kde se v hojném množství nachází především v embryonálních tkáních a ECM dospělých pojivových tkání, sklivci oka a pupeční šňůře. Díky karboxylovým funkčním skupinám je HA vysoce hydrofilní, má záporný náboj a při vysokých molekulových hmotnostech tvoří viskózní síť. V ECM slouží jako hydratační složka a podílí se na tkáňové homeostáze. Proteoglykany vytvářejí s HA molekulové komplexy, které zodpovídají za gelový stav a stabilizaci struktury ECM. Díky svým viskoelastickým

vlastnostem, fyziologické aktivitě a biokompatibilitě nachází využití v revmatologii a dermatologii (ABATANGELO a kol.,2020).

3.2.2 Glykosaminoglykany se sulfonovou skupinou

Glykosaminy jsou polysacharidové postranní řetězce proteoglykanů. Jsou složeny z repetitivních disacharidových podjednotek N-acetylglukosaminu a kyseliny hexuronové. Kyselina glukuronová, se vyskytuje v heparansulfátu, zatímco kyselina iduronová je přítomna v heparinu. Sulfatace na různých hydroxylových koncích nebo umístění aminoskupiny ovlivňuje schopnost interagovat s různými proteiny, cytokiny a růstovými faktory. Polysacharid je navázán na protein pomocí tetrasacharidového linkeru tvořeného ze zbytků xylózy, dvou galaktóz a jednoho zbytku kyseliny glukuronové (RUD a kol, 2010).

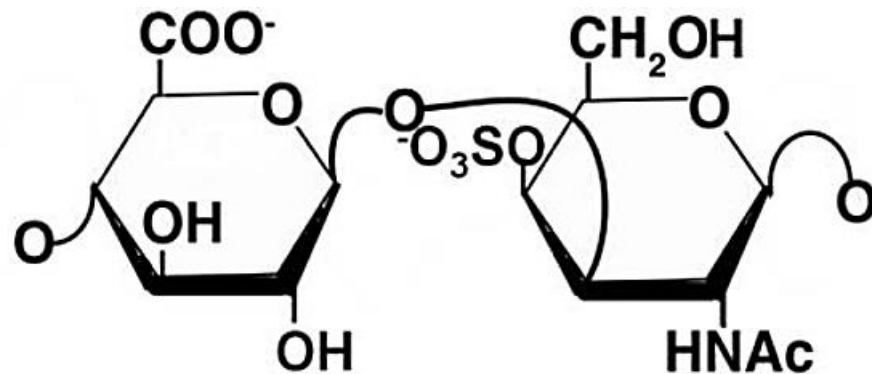
Heparan-sulfátové proteoglykany se řadí do třídy molekul, které mají v těle regulační a strukturní funkce (Obr. 4). Jádro molekuly se skládá z proteinu spojeného kovalentní vazbou k HS. Biologické vlastnosti spojené s heparan-sulfátovým proteoglykanem jsou způsobené interakcí proteinového jádra a ligandy nebo pomocí postranních řetězců HS. Heparan-sulfátový proteoglykan se podílí na mnoha rolích strukturního vývoje ECM pomocí matricových molekul kolagenu IV, fibronektinu a laminu. HS dále řídí obsah růstových faktorů, cytokinů a enzymů vytvořením a uvolněním rezervoárů. Dále v organismu regulují adhezi, migraci buněk, morfogenezi, vaskularizaci, organizaci cytoskeletu a opravy tkáně (ELGUNDI a kol., 2020).



Obrázek 4: Disacharidová podjednotka heparan a heparin sulfátu (IANNUZZI a kol., 2015).

CS je hojně rozšířená makromolekula, která je obsažena mezi bezobratlými i obratlovci. Na základě druhu organismu a umístění molekuly v něm se jeho struktura jemně liší. Struktura CS je lineární řetězec polysacharidů skládající se z až 200 opakujících se disacharidových podjednotek (VOLPI, 2019). Kromě důležité role, kterou hraje v cévách, šlachách a vývoji chrupavky, se chondroitin sulfát podílí na cytokinezi, myogenezi, osteogenezi a důležitých funkcí při zánětu nebo hojení ran (MAJATA a KITAGAWA, 2017).

CS také znám jako chondroitin sulfát (Obr. 5) B je složen z lineární struktury polysacharidů uspořádaných do disacharidových jednotek obsahujících hexoaminy N-acetyl galaktosamin nebo glukuronovou kyselinu. Funkce CS a DS mají zajímavé funkce na vývoj centrálního nervového systému, hojení ran, signalizaci růstových faktorů a morfogeneze. Řetězce CS a DS specificky reagují s proteiny vázajícími heparin (SUGAHARA a kol., 2003).

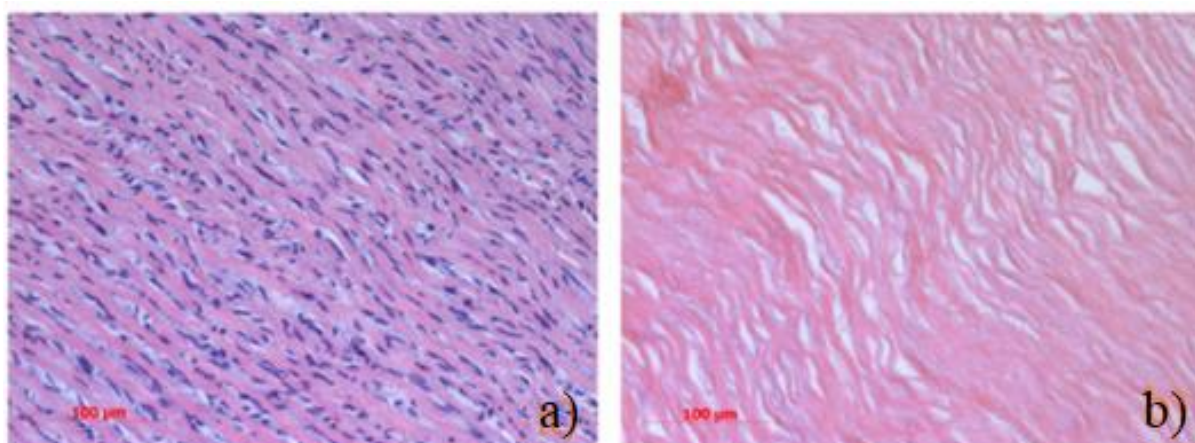


Obrázek 5: Disacharidová podjednotka chondroitin sulfátu (IANNUZZI a kol., 2015).

4. DECELULARIZACE

Dospělé tkáně jsou trojdimenzionální struktury obsahující buňky, které jsou vmezeřeny do extracelulární matrix. Pro využití tkání jako scaffoldu je nejdříve nutné odstranit buňky pomocí decellularizace (Obr. 6). Decellularizace je metoda, při níž dochází k odstranění antigenních epitopů, DNA a *damage-associated molecular patterns*, což jsou molekuly iniciující neinfekční zánětlivou odpověď (BADYAK a GILBERT, 2008). Myšlenka decellularizace byla poprvé popsána v roce 1948, kdy při ranném výzkumu byla pomletá svalová tkáň vložena do dřevěné krabice při -70 °C. Po odstředění bylo zjištěno, že některé buňky byly uvolněny z tkáně. Dalším důležitým milníkem byl rok 1991, kdy Dr. Nrejci zkombinoval decelularizovanou lidskou tkáň, lidské keratinocyty a fibroblasty k vytvoření kožního transplantátu, který byl transplantován pokusné myši. Koncem 90. let došlo k rozvoji decelularizovaných tkání a orgánů. Pokroky byly udělány u implantátů v oblasti dermální medicíny, náhradách srdečních chlopní a regeneraci cév a jícnu. Důležité části, jako jsou složky pro zachování vitality buněk, jsou udrženy v trojrozměrné struktuře orgánu (MENDIBIL a kol., 2020). Při průběhu decelularizačního procesu musí být zajištěna přirozená struktura tkáně a složení její ECM. Výsledkem decelularizačního procesu je získání acelulárních scaffoldů a jejich derivátů. Takto připravený nosič je možné použít jako základ pro osídlení buněk při recelularizaci (KIM a kol., 2021; HINDERER a kol., 2016).

K přípravě scaffoldů existuje několik decelularizačních metod, které jsou v praxi voleny v závislosti na druhu decelularizované tkáně. Dle použitých prostředků je lze rozdělit na metody fyzikální, chemické a enzymatické. Ve většině případů dochází ke kombinaci nejméně dvou metod, které docílí téměř dokonalého výsledku. Metody jsou nejčastěji zkoumány *in vitro*, nicméně metody jako je třeba aplikace hydrostatického tlaku nebo ošetření tkáně detergenty byly také zkoumány *in vivo* a v laboratořích jsou nyní běžně používány (ZHANG a kol., 2022; HINDERER a kol., 2016)



Obrázek 6: Tkáň získaná z prasečí aorty obarvená hematoxylinem a eozinem. a) zobrazuje tkáň před decelularizací; b) zobrazuje tkáň po decelularizaci bez buněk a buněčných jader (ASGNAGI a kol., 2013).

Téměř každá tkáň a orgán byl už decelularizován a použit jako scaffold. Mnohé z decelularizovaných nebo částečně decelularizovaných produktů získaly schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA a jsou v současné době klinicky aplikovány v měkkých tkání, kostí nebo srdce. Dosud byly klinicky úspěšně operované pouze při rekonstrukci relativně jednoduchých tkáních. Nicméně je současný směr výzkumu směřován na reparaci celých orgánů (HEATH, 2019).

4.1 Imunogenicita

Schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď se nazývá imunogenicita. Aby měla částice imunogenní schopnost musí mít velikost větší než 3000 Da. Imunitní reakce je zahájena rozpoznáním antigenů složkami imunitního systému. Imunitu dělíme na vrozenou a získanou. Okamžité a jednoduché imunitní odpovědi jsou klasifikovány jako vrozené, kvůli své nespecifické odpovědi proti cizím antigenům. Nespecifická imunita je zprostředkována fagocyty a *natural killers* (NK) buňkami, které fagocytují buňky neobsahující antigeny tělu vlastní (MASSARO a kol., 2021; BARBOSA a kol., 2021).

Molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) započínají imunitní reakci adaptačního imunitního systému u obratlovců tím, že prezentují extracelulární patogeny. MHC I vystavuje peptidy pro CD8⁺ T lymfocyty. Molekuly MHC II představují peptidy pro CD4⁺ T lymfocyty. MHC je velmi různorodá svou vysokou alelickou diverzitou vyvinutou selekcí (MINIAS a kol., 2021).

Decelularizace zajišťuje odstranění imunogenních komponent, které by mohly zapříčinit imunitní reakci organismu nebo odmítnutí tkáně. Decelularizační metody umožňují téměř dokonalé odstranění těchto komponent. Neutrofilů a NK buňky jsou první buňky, které se dostávají do místa transplantace. Neutrofilů reagují imunogenními komponenty do 48 hodin. Produkuje peptidy, které degradují cizí tkáň. M1 makrofágy jsou zodpovědné za prozánětlivou odpověď, která se vyvine až v zánětlivou reakci. M2 makrofágy generují regenerační odpověď ve tkáni, což je příznivá reakce po transplantaci. B lymfocyty stimulují produkci protilátek a T lymfocyty rozpoznávají antigeny. Na degradaci ECM se podílí metaloproteinázy, které působí na hyalinní složky ECM (MASSARO a kol., 2021).

4.2 Fyzikální metody decelularizace

Ve většině decelularizačních protokolů je zmíněna alespoň jedna forma fyzikální metody, která je součástí daného postupu. Provedení této metody většinou zahrnuje přístroj nebo aparaturu, která umožňuje decelularizačnímu roztoku jednoduší přístup přes tkáň (FERNÁNDEZ-PÉREZ a AHEARNE., 2020). Fyzikální metody zajišťující decelularizaci jsou založeny na změnách teploty a tlaku. To vede k narušení membrán, odstranění imunogenetických buněk nebo odstranění vymývacího detergentu. Mechanické metody dokážou efektivně odstranit husté kolonie buněk, anebo způsobit jejich lyzi. Samostatné použití fyzikálních metod není možné a je kombinováno s enzymatickými či chemickými technikami pro odstranění genetického materiálu z rozložených buněk. Nutností je zamezit nevhodného použití těchto metod, jelikož by došlo k poškození ECM struktury a změně mechanických vlastností (BUCKENMEYER a kol., 2020).

Obecně platí, že rozdíly ve složení ECM vyžadují různé protokoly decelularizace a ošetření v závislosti na typu organismu, tkáni, věku dárce a anatomické oblasti. Fyzikálních metod je celá řada. Jednotlivé druhy těchto metod budou dále popsány v dílčích kapitolách (RABBANI a kol., 2021).

4.2.1 Metoda teplotního šoku

Teplotní šok je metoda, která se zakládá na opakovaném cyklickém snížení teploty pod $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí tekutého dusíku, jež je proloženo zvýšením teploty na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vlivem rozdílných teplot dochází k vytvoření intracelulárních krystalů, poškození membrán buněk, jejich následné lyze a odloučení od ECM. Malé krystalky způsobují jemné poškození ECM čímž ovlivní její mechanické vlastnosti. Tato metoda neodstraní dokonale všechny buněčné složky. 88 % obsahu DNA zůstává ve fibroblastech, což může vyvolat imunitní odpověď organismu. V kombinaci s touto metodou se využívají chemické detergenty nebo vysoký hydrostatický tlak. Působením

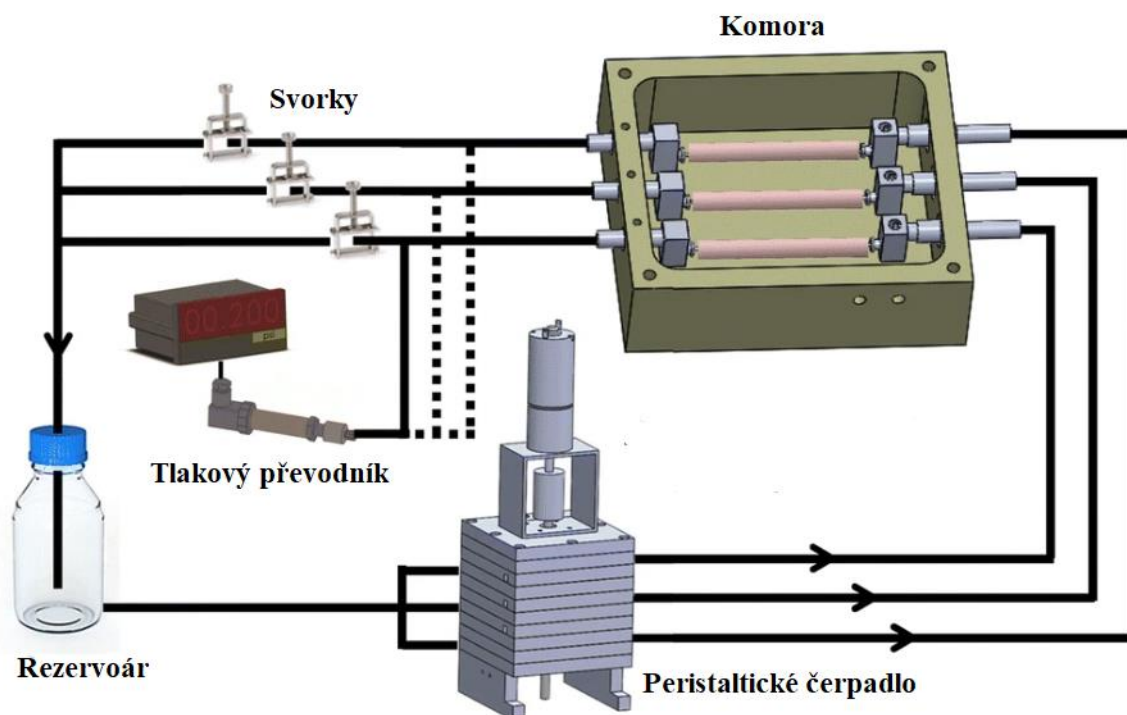
hydrostatického tlaku vyššího než 600 MPa je docíleno podobných výsledků jako při použití chemických sloučenin. Po provedení metody teplotního šoku je obvyklé snížení napětí v tkáni (BUCKENMEYER a kol., 2020).

Nedávná studie zkoumala účinek tepelných šoků na decelularizaci velkých šlach spolu s Tritonem X-100 a dodecylsulfátem sodným (SDS) jako detergenty. Autoři zjistili, že cykly zmrazování a rozmrazování vedly ke snížení DNA na 20 % v ECM. Počty cyklů se liší v závislosti na decelularizovaném materiálu. Pro decelularizaci buněčných listů byl použito tři cyklů a pro bederní obratle jeden cyklus (ZHANG a kol., 2022).

4.2.2 Metoda perfusní pumpy

Pro štěpy z kompozitní tkáně či celé orgány obsahující cévní struktury je vhodné použití metody perfuse. Perfuse je průtok tekutiny orgánem, například srdcem. V přirozeném prostředí orgánu se jedná nejčastěji o krev. V tomto případě bude perfusní tekutinou decelularizační roztok. Pro úspěšné provedení je důležité složení komplexní aparatury (Obr. 7) a zajištění kontrolovaného průtoku decelularizační tekutiny pomocí peristaltického čerpadla zapojeného do decelularizačního okruhu. Pro propojení okruhu s orgánem je využita kanyla, jež má větší průměr než otvor orgánů. Tato metoda je velice často využívána, jelikož zajišťuje rychlý prostup tekutiny do všech vrstev orgánů. Účinnost perfuse závisí na tlaku, průtokové rychlosti a koncentraci decelularizačního činidla. Pro minimální mechanické poškození ECM se při zahájení procesu používá nižších tlaků. Při postupné změně složení ECM a vymývacího detergentu, se používá kontrolovaný, postupně gradující tlak (NICHOLLS a kol., 2022).

Mezi orgány určené pro transplantaci, které jsou pomocí této metody decelularizovány, patří srdce, játra, plíce a slinivka. Kompozitní štěpy jsou náročněji decelularizovány, díky jejich komplexnímu složení z různých typů buněk a velkého množství strukturních elementů v tkáních (NICHOLLS a kol., 2022).



Obrázek 7: Aparatura perfusní decelularizace (TUAN-MU a kol.;2020).

4.2.3 Metoda ponoření a míchání

Metoda zvaná ponoření a míchání je používána pro menší a jemnější orgánové struktury, které nemají velké krevní řečiště. Mezi takovými orgány řadíme močový měchýř a tenké střevo. Tkáň určená pro decelularizaci je ponořena do nádoby s decelularizačním roztokem, jehož interakce s tkání vede k narušení její struktury a izolaci buněk od bazální membrány. Čas a postup procesu závisí na tloušťce tkáně. Pro zlepšení výsledků je možné použití tlaku. Ten zajistí lepší prostupnost pro detergenty, čímž se zkrátí samotný čas decelularizace. Zároveň ale může dojít k poškození ECM. Turbulence v čínidle může být vyvolána magnetickou deskou, zdrojem ultrazvuku, rotační komorou nebo míchadlem na konci komory. Tato metoda je nepoužitelná pro tlustší a strukturně složitější tkáně díky nedostatečné schopnosti distribuce činidla do více vrstev tkání (ZHANG a kol., 2022).

4.2.4 Metoda využívající superkritickou kapalinu

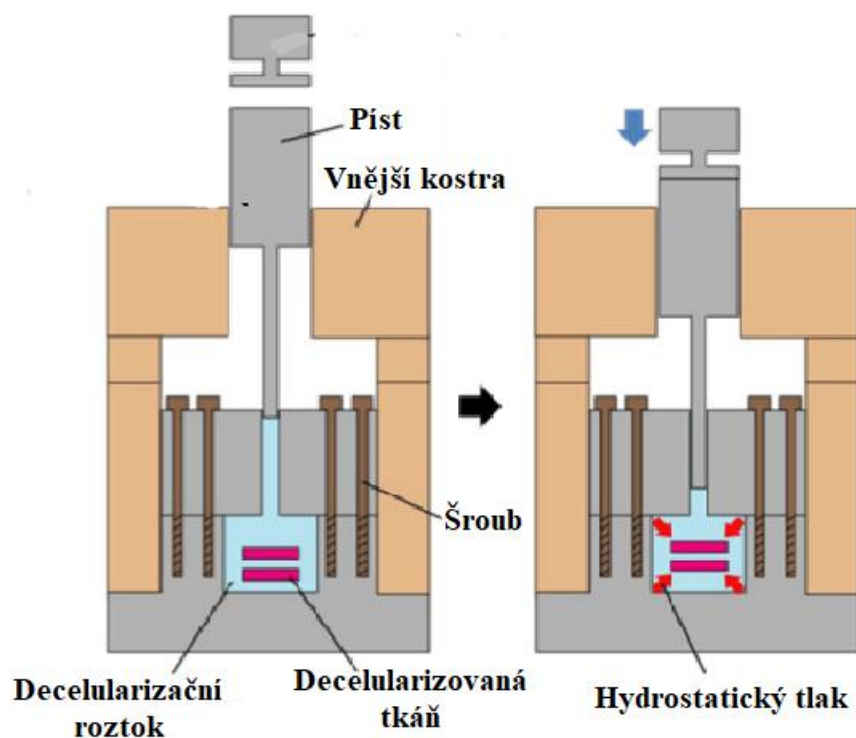
Superkritická kapalina je látka, jejíž hodnoty teploty a tlaku přesahují kritickou úroveň. Nejedná se o plyn ani kapalinu, spíše o kombinaci obou skupenství. Díky své vysoké permeabilitě jsou tyto kapaliny jednoduše odstraněny z tkání, ale zároveň odstraní buněčné částice, aniž by došlo k promytí tkání a jejímu případnému poškození. Nejčastěji používanou superkritickou kapalinou v decelularizaci tkání je superkritický oxid uhličitý ($scCO_2$). Jedná

se o apyrogenní, netoxickou a inertní sloučeninu. Jeho kritický bod má teplotu 31,1 °C při 7,38 MPa, což je ideální teplota a tlak pro neporušení ECM. Difúzi orgánem, dielektrickou konstantu a další fyzikální vlastnosti scCO₂ můžeme dle potřeby měnit pomocí změny teploty nebo tlaku. Chemický charakter scCO₂ zajišťuje extrakci nepolárních složek, zatímco kvadrupólový moment scCO₂ odstraní z tkání komponenty mírně polárního charakteru. Výhodou použití superkritické kapaliny oproti ostatním decelularizačním metodám je rychlejší odstranění buněčných struktur z různorodějších tkání. Zároveň při tomto procesu dochází ke sterilizaci dECM (decelularizovaná extracelulární matrix). Tato metoda ale není univerzální, například ne vždy se dá použít pro jemné cévní systémy (ZHANG a kol., 2022; CHASCHIN a kol., 2022).

4.2.5 Mechanické zatížení a hydrostatický tlak

Buňky na povrchu tkání lze eliminovat mechanickým seškrábáním ostrým nástrojem doprovázeným enzymatickým detergentem nebo solnými roztoky. Mechanické odstranění svrchních buněčných struktur dokáže zvýšit účinnost decelularizace. Nevýhoda je neopakovatelnost a nepřesnost této metody. Příliš velká síla použitá na mechanické odstranění buněk může vést k poškození struktury ECM (RABBANI a kol., 2021).

Při metodě hydrostatického tlaku je voda rozstříkovaná na roztaženou tkáň. Jedná se o metodu časově nenáročnou a vysoce efektivní. Při snížené teplotě hrozí, že vytvořené vodní krystalky mohou poškodit strukturu ECM. Zvýšením teploty během decelularizačního procesu dochází k potlačení tvorby krystalů, ale také ke zvýšení entropie a tím ke zvýšení zranitelnosti ECM. Současná zjištění této studie ukázala, že decelularizace pod tlakem 980 MPa depolymerizovala aktinové cytoskelety v přirozené tkáni dělohy potkana (Obr. 8). Uvádí se také, že tlak změnil morfologii jádra po aplikaci vysokého hydrostatického tlaku na děložní tkáň (RABBANI a kol., 2021).



Obrázek 8: Aparatura pro zvýšení hydrostatického tlaku (ZEMMYO a kol., 2021).

4.3 Chemické metody decelularizace

Chemické metody, jež jsou využívány pro rozrušení buněčných složek a mezibuněčných spojů, se zakládají na použití speciálně upravených detergentů. Mezi chemické sloučeniny používány pro proces decelularizace řadíme surfaktanty, kyseliny a zásady. Další klasifikace je založena na náboji činidla a dělíme je na iontová, neiontová či zwitteriontová. Tyto roztoky dokážou rozrušit interakce v cytoplazmatické membráně buněk, vazbu lipidů, proteinů a DNA. Silné roztoky mohou mít nepříznivé účinky na ECM a způsobit tak její narušení. Neiontové detergenty v porovnání s iontovými detergenty způsobují menší poškození ECM, ale musí být přidán jiný detergent nebo fyzikální metoda, aby bylo zajištěno plné odstranění buněčných složek (ZHANG a kol., 2022, GILPIN a kol., 2017).

4.3.1 Surfaktanty

Surfaktanty jsou amfipatické molekuly s polární a hydrofobní částí se schopností rozrušit hydrostatické vazby. Surfaktanty rozlišujeme dle náboje činidla a dělíme je na iontová, neiontová či zwitteriontová. Jednotlivé použité metody decelularizace mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti decelularizované extracelulární matrix (dECM). Ukázalo se, že použití iontového, spíše než aniontového detergentu, může vést k výrazně poréznějšímu dECM (BEHMEN HANSEN a kol., 2021).

Detergent dodecylsírán sodný (SDS) je jednou z nejvyžívanějších chemických sloučenin v tkáňovém inženýrství, a to díky své vysoké schopnosti odstraňovat buňky a genetický materiál. Dokáže denaturovat proteiny a rozpustit cytoplazmatickou i jadernou membránu. S vyšší koncentrací SDS se zvyšuje odstraněné množství zbytků DNA (ZHANG a kol., 2022). Mezi dopady na extracelulární membránu se řadí odstranění zbylých jaderných a cytoplazmatických proteinů, přičemž velkou negativní vlastností této látky je rozrušení struktury decelularizované tkáně odstraněním kolagenu, mukopolysacharidů a růstových faktorů. Další nepříznivou vlastností SDS je její špatné vymytí z ECM způsobené silnou vazebnou interakcí mezi proteiny ECM s molekulami SDS. Zbytky SDS můžou mít za následek cytotoxický vliv pro recelularizované buňky. Mezi další iontové detergenty se řadí deoxycholát sodný (SD) pracující na stejném principu jako SDS. V porovnání účinnosti jednotlivých látek má SD silnější decelularizační schopnosti než SDS (GILPIN a kol., 2017; ZAMATI a kol., 2017).

Deoxycholát je iontové povrchově aktivní decelularizační činidlo lyzující membránu buněk. SD je jeden z méně agresivních detergentů a nezpůsobuje poškození ECM. Na druhou stranu ale způsobuje aglutinaci DNA na povrchu tkáně. Této aglutinaci je možné zamezit enzymatickou reakcí přidáním deoxyribonukleázy (GILPIN a kol., 2017).

Triton X-100 je neiontová chemická sloučenina rozrušující membránu a DNA, aniž by docházelo k rozrušení vazeb mezi proteiny. Ke zvýšení decelularizačního účinku se používá Triton X-100 v kombinaci s jinými decelularizačními roztoky. Proniknutí roztoku do ECM má za následek snížení obsahu laminu a fibronektinu. Triton X-100 je využíván jako pomocné činidlo pro vymytí zbytkového SDS (ZHANG a kol., 2022; ZAMATI a kol., 2017).

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát (CHAPS) je zwitteriontové nenedenaturující decelularizační činidlo. Roztoky jsou používány v kombinaci s metodou perfuze. Při použití CHAPS je pozorované úplné odstranění buněčných složek. Kolagen, elastin a další proteiny ECM jsou zachovány, což vede k zachování celistvosti a elasticity tkáně. CHAPS má na rozdíl od jiných detergentů sníženou schopnost eliminace DNA (GILPIN a kol., 2017).

4.3.2 Kyseliny

Kyseliny a zásady jsou používány v decelularizaci pro narušení hydrolytických vazeb v cytoplazmatických složkách, DNA a RNA kyselin. Mezi nejvíce používané kyseliny se řadí kyselina peroctová, kyselina chlorovodíková a kyselina octová. Kyselina peroctová je kyselina silné povahy se silným korozivním účinkem. Vlivem kyselin na decelularizovaný

orgán dochází k narušení cytoplazmatických organel a rozpadu nukleových kyselin. Předností použití kyselin pro decelularizaci je jejich antibakteriální, antivirotická a antimykotická aktivita. Kyselina peroctoová je často používaná jako sterilizační činidlo. Při špatném použití kyselin může dojít k oslabení struktury decelularizovaného orgánu snížením obsahu kolagenu. Stěžejním faktorem je výběr vhodné kyseliny a následné naředění na požadovanou koncentraci (ZHANG a kol., 2022; GILPIN a kol., 2017).

Cheláty kyseliny ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctové (EGTA) a kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) mohou být využity jako prostředky pro decelularizaci. EDTA má schopnost navázat se pomocí vazby na kationty dvojmocných kovů v místě buněčné adheze na ECM. Takto dojde k oddělení buněk od samotné ECM. Tohoto procesu lze využít při odstranění buněk kosterního svalstva pomocí latrunculinu A, což vede k narušení aktinu a myosinu (GILPIN a kol., 2017; BEHMEN HANSEN a kol., 2021). Latrucin A je toxin získaný z červené mořské houby *Latrunculia magnifica*, který se používá k depolymerizaci aktinových filamentů v živých buňkách. Zároveň dochází ke snížení obsahu DNA v buňce a buněčné smrti. Vlivem EDTA na dECM dojde k malému zvětšení poréznosti matrix (FUJIWARA a kol., 2018).

4.3.3 Zásady a alkoholy

Zásady reagují hydroxylovou skupinou s kyselinami za vytvoření solí. Nejpoužívanějšími zásadami jsou hydroxid amonný, hydroxid sodný a sulfid sodný. Zásady denaturují buněčnou DNA a způsobují narušení buněčné membrány, což vede k lýze buňky. Pro nejlepší výsledky by bylo teoreticky vhodné použití roztoků, které mají pH vyšší než 11. Překážkou pro použití příliš zásaditého roztoku je vliv vysokého pH na ECM, kdy dochází k narušení struktury, mechanických vlastností, snížení obsahu glykosaminoglykanů a růstových faktorů (ZHANG a kol., 2022; GILPIN a kol., 2017).

Alkoholy jsou používány při decelularizaci díky schopnosti dehydratovat biologický materiál. Nejvíce jsou využívány methanol a ethanol. Tyto látky difundují přes cytoplazmatickou membránu buněk a nahrazují vodu v intracelulární tekutině. V buňce rozruší buněčnou strukturu a degradují genetický materiál (ZHANG a kol., 2022; GILPIN a kol., 2017).

4.3.4 Hypertonické a hypotonické roztoky

Při použití hypertonických a hypotonických roztoků se využívá rozdílného osmotického tlaku. Dochází k lýze buněk nebo jejich dehydrataci a následné buněčné smrti. Tonicita je veličina, která je závislá na rozdílné koncentraci rozpuštěných látek na stranách polopropustné membrány. Díky své velikosti částice nejsou schopné přes tuto membránu

procházet. Hypertonické prostředí obsahuje v rozpouštědle větší množství rozpuštěných látek, které nejsou schopny projít membránou. Tohoto procesu je využíváno při odstranění proteinu. Hypotonické roztoky jsou roztoky, které obsahují oproti sledované buňce menší množství rozpuštěných složek. Tyto roztoky se používají pro odstranění jádra a nukleových kyselin. Při použití hypotonického roztoku přechází rozpouštědlo z okolního prostředí do buňky. Proces má minimálně dva kroky, kdy 11 hodin působí hypotonický roztok na ECM. Dochází ke zvětšení obsahu buňky, což vede k nárustu objemu a jejímu prasknutí. Následujících 11 hodin na ECM působí hypertonický roztok, který spíše zefektivní funkci hypotonického roztoku (GILBERT a kol., 2006; KOUROUKLIS a kol., 2023).

Hypertonické a hypotonické roztoky jsou nejčastěji připraveny z chloridu sodného. Za velkou výhodou při použití těchto roztoků je považováno jejich jednoduché odstranění z tkání po decelularizaci, což vede k snížené hrozbě cytotoxicity pro nově usídlující se buňky. Díky této vlastnosti mohou být hypotonické a hypertonické roztoky použity pro účinné odstranění zbylých chemických detergentů a buněčných složek z decelularizované tkáně. Nevýhodou těchto roztoků je možné rozptýlení antigenů uvolněných z rozpadlých buněk, což může v lidském organismu vést k podráždění tkání (KOUROUKLIS a kol., 2023).

4.4 Enzymatické metody decelularizace

Enzymy se řadí mezi bílkoviny, které mají biokatalytické vlastnosti. Tyto vlastnosti se projevují při určených podmínkách jako je pH, teplota a tlak. Hlavní podstatou těchto bílkovin je urychlení nebo započnutí chemických reakcí, které jsou nezbytné pro vývoj a funkci organismu. Principem enzymu v chemických reakcích je jejich katalýza. Snižují aktivační energii nezbytnou pro chod dané reakce. Enzymy se vážou na klíčová, tzv. aktivní místa molekul. Obvykle jsou vysoce specifické, tzn. určené pro určité reakce a substráty. Bez enzymů by většina stěžejních reakcí probíhajících v organismu trvala mnohem déle což by vedlo ke smrti daného organismu (KHAN a kol., 2021).

Existují dva různé modely vyobrazující mechaniku enzymaticky řízené reakce. První model je založen na zámku a klíči, kdy tvar substrátu je doplněn tvarem aktivního místa enzymu. Což znamená, že v případě, aby reakce proběhla, musí do sebe aktivní místo a substrát perfektně zapadnout. Druhá je teorie indukovaného přizpůsobení aktivního místa, kdy se považuje za nedůležité prostorové uspořádání daných komponent a takzvaného přesného tvaru se dosáhne až po navázání (ROBINSON,2015).

Při použití enzymů pro decelularizační metody je nutné zohlednit povahu dané tkáně. Nukleázy, jako jsou například ribonukleáza nebo deoxyribonukleáza jsou používány

k degradaci nukleových kyselin. Proteázy, mezi něž je řazen trypsin, kolagenáza nebo pepsin, se používají k rozkladu proteinů. K degradaci lipidů jsou určeny lipázy (LANZA a kol., 2020).

Enzymatické roztoky jsou připravovány v roztocích udržující pH a osmolaritu potřebnou pro správnou aktivitu enzymu. Tkáň nebo orgán jsou ponořeny do roztoku nebo je použita metoda perfuse, která je použita pro duté orgány. Doba, na kterou je tkáň ponořena do roztoku, se pohybuje mezi několika hodinami až dny. V průběhu procesu je roztok měněn, aby byly odstraněny buněčné zbytky a ostatní odpadní produkty (LANZA a kol., 2020).

4.4.1 Proteázy

Proteázy mají důležitý úkol v organismu, od buněčné signalizace přes regulaci transmise až po terminaci fyziologických procesů. Mají schopnost katalyzovat hydrolýzu peptidových vazeb v bílkovinách, což jim dává schopnost inaktivovat ostatní proteiny. Takováto schopnost se nazývá proteolýza (FINK a JERALA, 2022).

Trypsin se řadí mezi proteázy, které mají za úkol štěpit peptidové vazby mezi argininem a lysinem. V prvním kroku dochází k navázání postranního aminokyselinového substrátu na aktivní místo trypsinu. Tato vazba je stabilizována vytvořením vodíkových můstků. Následně dochází k hydrolýze esterové vazby, kdy dochází k uvolnění peptidového řetězce a regeneraci aktivního místa serinového hydroxyly. Takto se oddělí celulární komponenty od ECM (SHENA a kol., 2022). Vzhledem k agresivnímu charakteru trypsinu je používán jako samotné decelularizační činidlo zřídka. Zvýšené koncentrace trypsinu v decelularizačním činidle nebo nepřiměřeně dlouhá doba působení roztoku vede k poškození biomechaniky ECM. Trypsin je používán často jako preparační činidlo pro decelularizaci pomocí EDTA (MOFFAT a kol., 2022). Přirozeně se trypsin v organismu nachází v trávicím systému. K sekreci trypsinu dochází ve slinivce břišní jako inhibitor trypsinogenu. Poté trypsin putuje do tenkého střeva, kde je konvertován do aktivní formy trypsinu (SHENA a kol., 2022).

Dispáza je neutrální proteáza odštěpující buňky z bazální membrány od fibronektinu a kolagenu IV. Zároveň tato proteáza zabraňuje případné nechtěné agregaci buněk. Často je používána u tenkých tkání, jako například u tenkého střeva (MOFFAT a kol., 2022).

Další používanou proteázou je kolagenáza, která štěpí kolagen I, II a III v tkáních. Kolagenáza je také používána k metabolizaci kolagenu, za účelem získání materiálu ECM pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (MOFFAT a kol., 2022).

4.4.2 Nukleázy

Nukleázy patří mezi hydrolázy, které štěpí vazby mezi nukleotidy. Jsou nezanedbatelnou součástí při opravě DNA. Předpokládá se, že štěpení fosfodiesterových vazeb probíhá obecnou acidobazickou katalýzou. Nukleázy využívají různé nukleofily ke štěpení fosfátové vazby. Nejběžnějšími nukleofily jsou molekuly vody deprotonované bázi pro přímou hydrolýzu. Nukleofilem může být také hydroxylová skupina 3' konce DNA nebo RNA (JANG, 2010).

Nukleázy jsou různorodou skupinou a zahrnují jak proteiny, tak katalytické RNA. Neexistuje jednoduchý způsob, jak je klasifikovat a rozdělit. Na základě preference substrátu lze nukleázy rozdělit na DNázy a RNázy, přesto je velký počet nukleáz nespecifických pro cukerné složky a může štěpit RNA i DNA (JANG, 2010). Nukleázy jsou schopny díky své vysoké specifitě ulehčit odstranění DNA z tkání. DNáza je často používána po detergentech, které vytvářejí póry v membráně buněk. Dochází k lepšímu prostupu DNázy přes buněčnou membránu a urychlení procesu odstranění nukleových kyselin a reziduálního detergentu (MOFFAT a kol., 2022).

Účinnost této metody dosahuje až 95 %. Pokud ale tento proces trvá příliš dlouho, vede až k narušení ECM. Dochází ke ztrátě mechanické stability, a ztrátě kolagenu IV, mukopolysacharidů a dalších složek ECM. Nukleázami ošetřená ECM musí být dostatečně promyta, aby nedošlo k zamezení recelularizace díky imunogenicitě (MOFFAT a kol., 2022).

4.4.3 Lipázy

Lipáza je enzym, který štěpí triglyceridy na volné mastné kyseliny a glycerol tím, že katalyzuje hydrolýzu esterových vazeb v triglyceridech. Lipázy jsou přítomny v pankreatických sekretech a podílejí se na trávení a metabolismu tuků. Jaterní lipáza v játrech degraduje triglyceridy, které zůstávají v lipoproteinu se střední hustotou. Hormonálně citlivá lipáza se nachází v tukové tkáni a je zodpovědná za hydrolýzu triglyceridů uložených v adipocytech. Lipoproteinová lipáza se nachází ve vaskulárních endoteliálních buňkách a je zodpovědná za degradaci triglyceridů, které cirkulují z chylomikronů a lipoproteinů s velmi nízkou hustotou. Pankreatická lipáza se nachází v tenkém střevě a podílí se na degradaci triglyceridů ve stravě (PARK a PARK, 2022).

Jedním z hlavních představitelů lipáz jsou fosfolipázy hydrolyzující esterové vazby ve fosfolipidech. Fosfolipázy hydrolyzují fosfolipidy v buněčné membráně, ale nedochází k degradaci kolagenu a proteoglykanu. Fosfolipázy odstraňují složky složené z lipidů, ale pro plnohodnotné odstranění buněčných komponent je její samostatné použití nedostatečné.

Jejich použití je kombinováno s chemickými decelularizačními roztoky (MOFFAT a kol., 2022).

4.5 Sterilizace a recelularizace decelularizované tkáně

Po ukončení decelularizačních kroků je scaffold náchylný k patogenním hrozbám zvenčí. Mezi nejčastěji z nich patří mikroorganismy. Aby bylo takové situaci zabráněno dochází ke sterilizaci před implementací tkáně nebo orgánu. Existuje několik sterilizačních technik dECM. Jejich vhodnost závisí na mnoha faktorech, které je nutné vzít v úvahu. Mezi faktory ovlivňující kvalitu materiálu patří vlhkost, doba expozice, teplota a rozsah biologické zátěže (MENDBIL a kol., 2020).

Asepsy znamená, že v prostředí není obsažen žádný živý mikroorganismus, což je předpokladem pro vytvoření dokonalého scaffoldu. Nejběžnějšími způsoby sterilizace jsou ozařování a ethylenoxid. Pokud jsou ovšem biomateriály používány pouze v experimentálním výzkumu, není potřeba splňovat kritéria důležitá pro klinický materiál, kde je aseptický stav materiálů a neporušená struktura scaffoldu stěžejní. Ideální metodou je sterilizace nebo dezinfekce dECM. Kromě odstranění mikroorganismů zajistí také fyzikální a chemickou strukturu a biologickou aktivitu dECM. K ověření bezpečnosti sterilizační techniky se používá technické cesty. Nejdříve se pomocí testu sterility určí, zda je dECM sterilní. Po účinné sterilizaci nebo desinfekci dochází ke kontrole na toxické a škodlivé látky testem cytotoxicity. V posledním kroku jsou kontrolovány fyzikální a chemické vlastnosti dECM (TAO a kol., 2021).

Z fyzikálních metod lze využít tepelné techniky, které mají omezení díky termosenzibilitě molekulárních složek, které mohou vlivem teploty denaturovat a ztratit svou funkčnost. Ozařování účinně eliminuje mikroorganismy. UV záření je běžnou sterilizační metodou používanou ve výzkumných zařízeních, zejména kvůli snadné dostupnosti ve výzkumných laboratořích a zařízeních (HABIBZADEH a kol., 2022). Mezi negativní vlastnosti UV záření patří negativní ovlivnění strukturních proteinů, což může snížit jejich pevnost. Nicméně díky své vysoké penetraci, vhodné teplotě a dobrému zajištění sterilizace je používán v mnoha farmaceutických a výzkumných zařízeních (MENDBIL a kol., 2020; FU a kol., 2014). Ozařování je fyzikální metoda, kdy je používáno gama záření. Podle různého dávkového příkonu zdroje se liší i požadovaná doba sterilizace zářením a obvykle lze sterilizaci provést během pár hodin nebo až několika dnů. Mechanismus této sterilizace spočívá ve zničení nukleových kyselin, enzymů a mikroorganismů. Současně dochází k radiaci molekul vody v organismech, což vede k vytvoření peroxidů a volných radikálů (TAO a kol., 2021).

Sterilizace na bázi alkoholu je v laboratořích běžná, protože je levná a snadno dostupná. Tato metoda je účinnější při zabíjení mikroorganismů ve vodných roztocích, ale může také ovlivnit proteinovou strukturu v kouscích dECM. Fenoly působí tak, že narušují membrány, vysrážejí proteiny a inaktivují enzymy. Jsou baktericidní, fungicidní a mykobaktericidní, ale jsou neúčinné proti sporám a většině virů. Aldehydy jsou alkylační činidla, která poškozují nukleové kyseliny a zabíjejí všechny mikroorganismy včetně spor (MENDBIL a kol., 2020; HABIBZADEH a kol., 2022).

Sterilizace ethylenoxidem je starší sterilizační metoda. ethylenoxid je toxická organická sloučenina. Jedná se o bezbarvou čirou kapalinu. Při pokojové teplotě je ethylenoxid v plynném stavu, jedná se o bezbarvý plyn s éterickým štiplavým zápachem. Protože má dECM silnou adsorpční kapacitu pro ethylenoxid, tak je nutné prodloužit dobu odstraňování ethylenoxid po sterilizaci, čímž se doba sterilizace prodlouží až o několik týdnů. Mechanismus působení spočívá v alkylation proteinů a nukleových kyselin, což vede ke ztrátě aktivity těchto makromolekul (TAO a kol., 2021).

Přestože antibiotika nejsou typickou metodou desinfekce nebo sterilizace, jsou používány jako doplňková složka s jinými sterilizačními technikami. β -laktamy, mezi které je řazen penicilín, a polypeptidová antibiotika inhibují syntézu bakteriální buněčné stěny. Aminoglykosidy a makrolidová antibiotika se vážou na ribozom, čímž znemožňují proteinové translaci bakterií. Chinolony interferují s DNA gyrázou a inhibují syntézu DNA. Dále se používá Amfotericin a další poyenová antifungální antibiotika, které ovlivňují propustnost membrány a inhibují růst hub (TAO a kol., 2021).

Recelularizace je definována jako znovuosídlení dECM scaffoldů buňkami jehož cílem je rekonstruovat mikroanatomii orgánu a tím obnovit jeho specifickou funkci. Buňky používané pro recelularizaci potřebují vedení pro jejich přeskupení a zrání, což je úkol, který lépe provádí ECM a jeho zbytkové složky (HILLEBRANT a kol., 2019).

Existují dvě recelularizační techniky použité v závislosti na typu buňky. První využívá recelularizaci pomocí cévní sítě anebo jinou dutou strukturu (např. žlučovodu, močovodu, střevního lumen nebo dýchacích cest). Alternativně je také možná recelularizace prostřednictvím přímé buněčné injekce do parenchymálního kompartmentu. Pro úspěšný proces recelularizace je nezbytné znovuosídlení vaskulární sítě ECM endoteliálními buňkami, aby se zabránilo trombogenicitě indukované ECM a potenciální následné ztrátě štěpu (HILLEBRANT a kol., 2019).

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je přiblížení problematiky tkáňového inženýrství a decelularizace, která slouží pro tvorbu scaffoldu. Metodou decelularizace dochází k získání decelularizované extracelulární matrix. Decelularizace využívá fyzikálních, chemických a enzymatických metod pro získání extracelulární matrix zbavené buněk. V této práci jsou popsány principy jednotlivých metod.

Fyzikální metody využívají teplotních a tlakových změn působících na ECM, bez toho, aby došlo ke strukturní změně nebo poškození ECM. V práci je popsána metoda teplotního šoku, perfusní pumpy, superkritického plynu, ponoření a míchání a hydrostatického tlaku a mechanického zatížení.

Chemické metody využívají detergentů, které v závislosti na své chemické povaze působí na ECM. Mezi roztoky využívající své chemické vlastnosti patří surfaktanty, kyseliny, zásady a hypotonické a hypertonické roztoky. Enzymatické metody využívají proteinů přirozeně vyskytující se v lidském těle, které katalyzují chemické reakce, za účelem získání decelularizované extracelulární matrix.

Mezi hlavní důvody, proč je decelularizace zkoumána, je tvorba scaffoldů. Mezi výhody této metody získávání scaffoldů, které je vhodné zmínit, patří zachování původní struktury orgánů a potenciální možné využití orgánů zesnulých lidí jako materiálu pro decelularizaci. Vlastností, kterou se liší decelularizace od ostatních metod přípravy scaffoldů je zachování bioaktivních molekul, které se přirozeně vyskytují v ECM. Takovouto výhodu synteticky vytvořené scaffoldy nemohou pro buňky poskytnout. Jedním z důvodů, proč není dECM využívána v klinické praxi, je možné neúplné odstranění buněk a jejich zbytků z ECM. Buňky nebo jejich zbytky by mohly v organismu pacienta po implementaci nového orgánu spustit imunitní reakci. Nutnou podmínkou pro úspěšné získání dECM je zvolit dostatečně silnou metodu, která odstraní buňky z ECM, ale zároveň nedojde k jejímu poškození a znehodnocení daného materiálu. Pro překonání těchto výzev se výzkum zaměřuje na zdokonalování decelularizačních protokolů pro získání bezpečnějších a kvalitnějších scaffoldů.

Potenciálnímu širšímu využití decelularizovaných buněčných scaffoldů v klinické praxi brání vedle některých technických problémů a metodických nedostatků také významné etické otázky spojené zejména se získáváním orgánů pro tyto účely.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABATANGELO, G., V. VINDIGNI, G. AVRUSCIO a kol. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*. 2020, 9(7), 1-20. ISSN: 20734409. DOI: 10.3390/cells9071743.
2. ALTYAR, A. E., A. EL-SAYED, A. ABDEEN a kol. Future regenerative medicine developments and their therapeutic applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023, 158, 5-18. ISSN: 0753-3322. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114131.
3. ATHALA, A. Regenerative medicine strategies. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012, 47(1), 17-28. ISSN: 2766-5577. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013.
4. BADIYAK, S. a T. W. GILBERT. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*. 2008, 20(2), 109-116. ISSN: 1096-3618. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.003.
5. BARBOSA, C. R. R., J. BARTON, A. J. SHEPHERD a kol. Mechanistic diversity in MHC class I antigen recognition. *The Biochemical journal*. 2021, 478(24), 4187–4202. ISSN: 1470-8728. DOI: 10.1042/bcj20200910.
6. BEHMEN HANSEN, R. A., X. WANG, G. KAW a kol. Accounting for Material Changes in Decellularized Tissue with Underutilized Methodologies. *BioMed research international*. 2021, 6696295, 1-15. ISSN: 0976-1683 DOI: 10.1155/2021/6696295.
7. BUCKENMEYER, M. J., T. J. MEDER, T. A. PREST a kol. Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system. *Methods*. 2020, 171, 41-61. ISSN: 1095-9130. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.023.
8. CHAN, B. a K. W. LEONG. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008, 17, 467-479. ISSN: 1432-0932. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3.
9. CHASCHIN, I. S., D. V. BRITIKOV, G. A. KHUGAEV a kol. Decellularization of the human donor aortic conduit by a new hybrid treatment in a multicomponent system with supercritical CO₂ and Tween 80. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2022, 180, 1-12. ISSN: 08968446. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105452.
10. CHEN, G., T. USHIDA a T. TATEISHI. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2002, 2(2), 67-77. ISSN: 1616-5195. DOI: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
11. COCCIOLONE, A. J., J. Z. HAWES, M. C. STAICULESCU a kol. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 2018, 315(2), H189–H205. ISSN: 03636135. DOI: 10.1152/ajpheart.00087.2018.

12. DIONGI, B. a D. O FAUZA. Autologous Approaches to Tissue Engineering. StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. 2012, 1-16. ISSN: 1940-3429. DOI: 10.3824/stembook.1.90.1.
13. EDGAR, L, T. PU, B. PORTER a kol. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. British Journal of Surgery. 2020, 107(7), 793-800. ISSN: 0007-1323. DOI: 10.1002/bjs.11686.
14. ELGUNDI, Z., M. PAPANICOLAOU, G. MAJOR a kol. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. Frontiers in Oncology. 2020, 9, 1-15. ISSN: 2234943X. DOI: 10.3389/fonc.2019.01482.
15. FERNÁNDEZ-PÉREZ J. a M. AHEARNE. Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative. Methods. 2020, 171, 86-96. ISSN: 1095-9130. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.05.009.
16. FINK, T. a R. JERALA. Designed protease-based signaling networks. Current Opinion in Chemical Biology. 2022, 68, 1-18. ISSN: 1879-0402. DOI: 10.1016/j.cbpa.2022.102146.
17. FRANTZ, C., K. M. STEWART a V. M. WEAVER. The extracellular matrix at a glance. Journal of cell science. 2010, 123(24), 4195–4200. ISSN: 1477-9137 DOI: 10.1242/jcs.023820.
18. FU, R., Y. WANG, S. LIU a kol. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. Cell Transplantation. 2014, 23(4-5), 621-630. ISSN: 1555-3892. DOI: 10.3727/096368914x678382.
19. FUJIWARA, I., M. E. ZWEIFEL, N. COURTEMANCHE a kol. Latrunculin A accelerates actin filament depolymerization in addition to sequestering actin monomers. Current biology. 2018, 28(19), 318-192. ISSN. 0960-9822. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.082.
20. GILBERT, T. W., T. L. SELLARO a S. F. BADYLAK. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006, 27(19), 3675-3683. ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
21. GILPIN, A. a Y. YANG. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. Biomed Res Int. 2017, 9831534, 1-13. ISSN: 0976-1683. DOI: 10.1155/2017/9831534.
22. HABIBZADEH, F., S. M. SADRAEI, R. MANSOORI a kol. Nanomaterials supported by polymers for tissue engineering applications: A review. Heliyon. 2022, 8(12), 1-18. ISSN: 2405-8440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12193.
23. HASAN, A. a R. MHANNA. Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine. Smart Diagnostics and Personalized Medicine. 2017, 1-34. ISBN 978-3-527-3383-4. DOI: 10.1002/9783527689934.ch1.

24. HEATH, D. Review of Decellularized Extracellular Matrix Biomaterials for Regenerative Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2019, 5, 155-166. ISSN: 23644133. DOI: 10.1007/s40883-018-0080-0.
25. HILLEBRANT, K., H. EVERWIEN, N. HAEP a kol. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transplant International*. 2019, 32, 571-585. ISSN: 0934-0874. DOI: 10.1111/tri.13462.
26. HINDERER, S., S. L. LAYLAND a K. SCHENKE-LAYLAND. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 97, 260-269. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.019.
27. IANNUZZI, C., G. IRACE a I. SIRANGELO. The Effect of Glycosaminoglycans (GAGs) on Amyloid Aggregation and Toxicity. *Molecules*. 2015, 20(2), 2510-2528. ISSN: 1420-3049 DOI: 10.3390/molecules20022510.
28. JANG, Y., M. YAMATO, T. SHIMIZU a kol. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2007, 28(34), 5033-5043. ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.052.
29. JANG, W. Nucleases: Diversity of Structure, Function and Mechanism. *Quarterly reviews of biophysics*. 2010, 44(1), 1-93. ISSN: 1469-8994. DOI: 10.1017/S0033583510000181.
30. KHAN, K. A., S. A. MEMON a H. NAVEED. A hierarchical deep learning based approach for multi-functional enzyme classification. *Protein science*. 2021, 30(9), 935-1945. ISSN: 1469-896X. DOI: 10.1002/pro.4146.
31. KIM, S., M. UROZ, J. L. BAYS a kol. Harnessing mechanobiology for tissue engineering: Developmental cell. 2021, 56(2), 180-191. ISSN: 1534-5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.12.017.
32. KOUROUKLIS A. P., A. WAHLSTEN, A. STRACUZZI a kol. Control of hydrostatic pressure and osmotic stress in 3D cell culture for mechanobiological studies. *Biomaterials Advances*. 2023, 145, 1-13. ISSN: 2772-9508. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.213241.
33. LANZA R., R. LANGER, J. VACANTI a kol. *Principles of Tissue Engineering*. 5th Edition. 2020, 4-8. ISBN 9780128214015. DOI: 10.1016/C2018-0-03818-9.
34. LOH Q. L. a C. CHOONG. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue engineering. Part B, Reviews*. 2013, 19(6), 485-502. ISSN: 19373368. DOI: doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0437.
35. LUO, Y., D. SINKEVICIUTE, Y. HE a kol. The minor collagens in articular cartilage. *Protein & Cell*. 2017, 8(8), 560-572. ISSN: 16748018. DOI: 10.1007/s13238-017-0377-7.

36. MAJATA S. a H. KITAGAWA. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017, 18661(10), 2420-2434. ISSN: 0304-4165. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.06.010.
37. MASSARO M. S., R. PÁLEK, J. ROSENDORF a kol. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Materials Science and Engineering*. 2021, 127, 1-13. ISSN: 0921-5093. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112203.
38. MENDIBIL, U., R. RUIZ-HERNANDEZ, S. RETEGI-CARRION a kol. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(15), 1-29. ISSN: 1422-0067. DOI:10.3390/ijms21155447.
39. MINIAS P., R. WLODARCZYK, M. REMISIEWICZ a kol. Distinct evolutionary trajectories of MHC class I and class II genes in Old World finches and buntings. *Heredity*. 2021, 126(6), 974-990. ISSN: 0018-067X. DOI: 10.1038/s41437-021-00427-8.
40. MOFFAT, D., K. YE a S. JIN. Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of tissue engineering*. 2022, 13, 1-29. ISSN: 2041731. DOI: 10.1177/20417314221101151.
41. MUTZ I., M. FENU, G. J. V. M. VAN OSCH a kol. The role of cell–matrix interactions in connective tissue mechanics. *Physical Biology*. 2022, 19(2), 1-14. ISSN: 14783967. DOI: 10.1088/1478-3975/ac42b8.
42. NICHOLLS D. L., S. ROSTAMI, G. KAROUBI a kol. Perfusion decellularization for vascularized composite allotransplantation. *SAGE open medicine*. 2022, 19(2), 1-14. ISSN: 2050312. DOI: 10.1088/1478-3975/ac42b8.
43. PARK, J. a K. PARK. Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*. 2022, 7609019, 1-11. ISSN: 2090907.1 DOI:10.1155/2022/7609019.
44. PELLEGGATA A. F., M. A. ASNAGI, I. STEFANI a kol. Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. *BioMed Research International*. 2013, 918753, 1-8. ISSN: 0976-1683. DOI: 10.1155/2013/918753.
45. RABBANI, M., N. ZAKIAN a N. ALIMORADI. Contribution of Physical Methods in Decellularization of Animal Tissues. *Journal of medical signals and sensors*. 2021, 11(1), 1-11. ISSN: 22287477. DOI: 10.4103/jmss.JMSS_2_20.
46. RIPPON, H. J. a A. B. BISHOP. Embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2004, 37(1), 23-34. ISSN: 1365-2184. DOI:10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x.
47. ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. 2015, 59, 1-41. ISSN: 00711365. DOI:10.1042/bse0590001.

48. RUD, T. R., M. A. SKIMORE a M. GUERRINI a kol. The conformation and structure of GAGs: recent progress and perspectives. *Current Opinion in Structural Biology*. 2010, 20(5), 567-574. ISSN: 1879-033X. DOI:10.1016/j.sbi.2010.08.004.
49. SHENA, J. P. PANDEY a D. M. PANDEY. Evaluating the role of trypsin in silk degumming: An in silico approach. *Journal of Biotechnology*. 2022, 359, 35-47. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.09.007.
50. SHULTHEISS, D., D. A. BLOOM, J. E. WEFER a kol. Tissue engineering from Adam to zygote: historical reflections. *World Journal of Urology*. 2000, 18, 84-90. ISSN: 0021-0005. DOI: 10.1007/s003450050015.
51. SINGH, P., C. CARRAHER a J. E. SCHWERZBAUER. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annual review of cell and developmental biology*. 2010, 26, 397-419. ISSN: 1530-8995. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
52. SUGAHARA, K., T. MIKAMI, T. UJAMA a kol. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003, 13(5), 612-620. ISSN: 1879-033X. DOI: 10.1016/j.sbi.2003.09.011.
53. SUN, W., D. A. GREGORY a X. ZHAO. Designed peptide amphiphiles as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2023, 314, 1-21. ISSN: 00018686. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102866.
54. TAO, M., T. AO, X. MAO a kol.. Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. *Bioactive Materials*. 2021, 6(9), 2927-2945. ISSN: 2452199X. DOI:10.1016/j.bioactmat.2021.02.010.
55. TEZTIC, A., M. A. PFENNING, G. J. GORES a kol. Regenerative Medicine Build-Out. *StemCells Transnational Medicine*. 2015, 4(12), 1373-1379. ISSN: 21576564. DOI: 10.5966/sctm.2015-0275.
56. TUAN-MU H., Y. CHANG aj HU. Removal of an abluminal lining improves decellularization of human umbilical arteries. *Scientific Reports*. 2020, 10, 1-13. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-020-67417-4.
57. VACANTI, C. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006, 10 (3),569-576. ISSN: 1582-493. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
58. VALDOZ, J. C., B. C. JOHNSON, D. J. JACOBS a kol. To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23), 1-23. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms222312690.
59. VARMA S., J. P. R. O. ORGEL a J. D. SCHIEBER. Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophysical Journal*. 2016, 111(1), 50-56. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.05.038.

60. VOLPI N. Chondroitin Sulfate Safety and Quality. *Molecules*. 2019, 24(8), 1-13. ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules24081447.
61. WALKER, M. R., K. K. PATEL a T. S. STAPPENBECK. The stem cell niche. *The Journal of Pathology*. 2008, 217(2), 169-180. ISSN: 0002-9440. DOI:10.1002/path.2474.
62. YANG, L., H. WU, L. LU a kol. A tailored extracellular matrix (ECM) - Mimetic coating for cardiovascular stents by stepwise assembly of hyaluronic acid and recombinant human type III collagen. *Biomaterials*. 2021, (276), 1-13. ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121055.
63. ZAMATI, A. H. A., R. ALIPOOR, A. R. SHAHMIRZADI a kol. Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. 2017, 2, 1-8. ISSN: 2474-7750. DOI: 10.24200/imminv.v2i3.63.
64. ZANG, X., Y. F. ALANZI, T. A. JOWITT a kol. Elastic Fibre Proteins in Elastogenesis and Wound Healing. *International Journal of Molecular Science*. 2022, 23(8). ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms23084087.
65. ZHANG, X., X. CHEN, H. HONG a kol. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2022, 10, 15-31. ISSN: 2452199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014.
66. ZEMMYO, D., M. YAMAMOTO a S. MIYATA. Efficient Decellularization by Application of Moderate High Hydrostatic Pressure with Supercooling Pretreatment. *Micromachines*. 2021, 12(12), 1-15. ISSN: 2072666X. DOI: 10.3390/mi12121486.