

Matrize dezellularizatuak eta zelula amak ehun-ingeniaritzan

Stem cells and decellularized matrices in tissue engineering

Unai Aranguren¹, Gaskon Ibarretxe^{1*} eta Jon Luzuriaga^{1*}

¹Zelulen Biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea
(UPV/EHU-Leioa, Bizkaia)

LABURPENA: Azken urteotan dezellularizatutako matrize estrazelular (dMEZ) eta zelula amek interes handia piztu dute ehun-ingeniaritzaren arloan, ehun eta organoen birsorkuntzarako izan dezaketen erabilgarritasunagatik. Berrikuspen honen helburua, batetik, arlo honen nondik norakoan ezagutzea da, eta bestetik, gizakietan egin diren aplikazioak aztertzea. Ehunak edo organoak dezellularizatzeko, eta dezellularizatutako matrize estrazelularren aldarnio edo "scaffold"-ak eskuratzeko teknika desberdinak daude: fisikoak, kimikoak, biologikoak, tekniken konbinaketak eta azken urteetan garatu diren teknika berriak. Dezellularizatutako matrize horiek, jatorrizko matrize estrazelularren (MEZ) osagaiak eta egitura kontserbatzen dituzte, zeinak beharrezkoak diren zelulen eta matrize estrazelularren arteko elkarrekintzetarako. Dezellularizatu ostean, matrize horiek birzelularizatu egin daitezke, bai zelula somatikoekin, bai zelula amekin, intereseko ehun edo organo espezifikoak eskuratzeko. Ehun-ingeniaritzaren arloan, azken urteetan aurrerapen garrantzitsuak egin dira, eta dezellularizatutako matrize estrazelularren aldarnio mota ugari eratu dira ehun desberdinentzat, hala nola, azal-ehuna, hezur-ehuna, nerbio-ehuna edo bihotz-ehuna. Horrez gain, organo osoen dezellularizazioa ere lortu da, zeintzuk jatorrizko organoaren arkitektura eta osagaiak kontserbatzen dituzten, eta jarraian birzelularizatu egin daitezkeen. Oraindik gizakietan egindako aplikazioak mugatuak badira ere, etorkizunari begira ate ugari zabaldu ditzakeen ikerkuntza arloa da hau.

GAKO-HITZAK: Zelula amak, matrize dezellularizatuak, aldarnioak, ehun-ingeniaritza, organoen birsorkuntza

ABSTRACT: *Decellularized extracellular matrices (dECM) and stem cells have aroused great interest in tissue engineering in recent years because of their potential use for tissue and organ regeneration. The purpose of this review is, on the one hand, to give a global perspective on this topic, and, on the other hand, to examine the applications which have been implemented in human patients. There are different techniques for decellularizing tissues or organs, to generate different scaffolds of decellularized extracellular matrices: physical, chemical, biological, combinations of techniques and new techniques that have been developed in recent years. These decellularized matrices preserve the components and structure of the original tissues, which are necessary for the correct interaction of the seeded cells with extracellular signals involved in tissue development and regeneration. After decellularization, these matrices can be recellularized, either with somatic cells or with stem cells, to acquire specific characteristics of the tissue or organ of interest. In the field of tissue engineering, important advances have been made in recent years, and various types of scaffolding of decellularized extracellular matrices have been developed from different tissues, such as skin tissue, bone tissue, nervous tissue or heart tissue. In addition, the decellularization and recellularization of whole organs preserving the architecture and elements of the original organ has also been achieved. Although human applications are still limited, this is a research field that can open many doors for the future.*

KEYWORDS: *Stem cells, decellularized extracellular matrices, scaffolds, tissue engineering, organ regeneration*

***Harremanetan jartzeko/ Corresponding author:** Jon Luzuriaga Gonzalez, Zelulen Biologia eta Histologia Saila, Farmazia Fakultatea, UPV/EHU. Unibertsitateko ibilbidea, 7 (01006 Vitoria-Gasteiz), <https://orcid.org/0000-0002-1443-7057>, jon.luzuriaga@ehu.eus // Gaskon Ibarretxe Bilbao, Zelulen Biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU. Sarriena auzoa, z/g (48940 Leioa), <https://orcid.org/0000-0002-4961-7402>, gaskon.ibarretxe@ehu.eus.

Nola aipatu / How to cite: Aranguren, Unai; Ibarretxe, Gaskon; Luzuriaga, Jon (2024). << Matrize dezellularizatuak eta zelula amak ehun-ingeniaritzan >>, Ekaia, 47, xx-xx. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.25202>)

Jasoa: urriak 30, 2023; Onartua: ekainak 21, 2024

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2024 UPV/EHU



1. SARRERA

Organo transplantea tratamendu eraginkorra da organo baten gutxiegitasun kronikoa edo hutsegitearen tratamendurako. Alabaina, gehienetan honen atzean emailearen heriotza egon ohi da eta transplantearekin lotuta, errefusa, zoldura edota itxarote-zerrenda luzeegiak bezalako arazoak egon daitezke. Beraz, transplanteen eskuragarritasuna ez da nahikoa behar guztiak asetzeko.

Gaur egun, medikuntza-birsortzailearen arloan ehun-ingeniaritza kontzeptua agertu da. Ehun-ingeniaritzaren helburua kaltetutako organo edo ehunak ordezkatzeko datza. Horretarako, laborategian, zelulak eta biomaterialez osaturiko aldamio edo “scaffold” deritzen egiturak erabiliz ordezeko organo edo ehunak sortzen dira. Aldamioak matrize estrazelularretatik (MEZ) eratorritako produktuekin sor daitezke eta intereseko ehuna garatu bitartean bertan ereindako zelulei sostengua emango diete hiru dimentsiotako (3D) hazkuntza ahalbidetzeko. MEZ-aldamio horiek eskuratzeko modu bat dezellularizazio prozesua da. Horren bidez, dezellularizatutako MEZ-aldamioa birzelularizatu egin daiteke, intereseko ehun edo organoa eskuratzeko eta hau transplantatzeko. Dezellularizatutako MEZ-aldamioak organoaren mikro- eta nanoegiturak mantentzen ditu intereseko ehunan *in vivo* zein *in vitro* hazteko. Gainera, MEZ-aldamioa nahierara atondu daiteke biobateragarritasunaren, biodegradazioaren, immunogenizitatearen eta egiturazko sostenguaren aldetik aplikazio klinikorako egokiena izan dadin. Horrela, zelulen atxikidura, proliferazio, migrazio, desberdintzapen eta epe luzeko bideragarritasuna bermatuz. [1].

Zelula amak ehun-ingeniaritzaren osagai garrantzitsu bihurtu dira, batez ere, dezellularizatutako matrize estrazelularretan (dMEZ) oinarritutako ehun-ingeniaritzaren alorrean, birzelularizatorako erabili ohi baitira [2]. Zelula amak zelula desberdinu gabeak dira, zeinak gai diren leinu zehatz batean desberdintzeko (potentzia), baita zelula ama gehiago sortzeko ere (autoberrikuntza). Jatorrizko ehunean, zelula amak mikroingurune espezifiko batean egoten dira, nitxo deritzona. Mikroingurune horrek, zelula ama horien desberdintzapen eta autoberrikuntzan eragiten du, hainbat seinalizazio mekanismoren bidez [3]. Ondorioz, beharrezkoa da zelula amen desberdintzapen prozesua bideratzen duten mekanismo eta MEZ-en ezaugarriak ezagutzea, dMEZtan oinarritutako ehun-ingeniaritza garatzeko [2].

2. MATRIZE ESTRAZELULARRAK

MEZk zelulen homeostasirako, hazkuntzarako, ehunen osaketarako eta konponketarako beharrezkoa den mikroingurunea eskaintzen duten 3D-tako sareak dira [4]. Ehun edo organo bakoitzak

enbrioi-garapenaren etapa goiztiarretan eratzen den eta etengabe berriztatzen den MEZ propioa du ehunaren homeostasia bermatzeko [5]. Zelulen eta MEZEN arteko interakzioak beharrezkoak dira zelulen portaera, funtzioa, eta bereizketa bideratzeko [6]. Ehunen konponketa ematen denean, aldaketa kuantitatibo zein kualitatiboak gertatzen dira MEZEN osagaietan, eta hori erregulatzeko hainbat entzimek hartzen dute parte [7].

Egoera fisiologikoetan, ehunak dagokien organoetan bereizteko, eta, sintesi eta garapen egokia izateko beharrezkoa da MEZ espezifikoa izatea [8]. Adibidez, birika, ugatzak edo barail-azpiko listu guruinak epiteliua adarkatuz eratzen dira. Adarkatze prozesu horretan, inguruko MEZ enbrionarioetan baneraturaz joaten dira zelulak, eta aldi berean MEZ horiek eraldatuz doaz [9].

2.1. Matrize estrazelularren osaera eta funtzioa

MEZek 3Dtako sare makromolekularra osatzen dute, egiturazko eta seinalizatorako euskarria eskaintzen duena. Horri esker zelulen atxikidura, proliferazio, migrazio eta desberdintzapena bideratzen dituzte. Osaerari dagokionez, MEZak kolagenoz, fibronektinaz (FN), lamininaz, elastinaz, proteoglikanoz (PG), glikosaminoglikanoz (GAG) eta beste hainbat glukoproteinaz osaturik daude [8].

Ugaztunetan, MEZak bi motatan bereizten dira kokapen eta osaeraren arabera. Batetik, interstizioaren MEZa, zeinak estromako zelula gehienak inguratzen dituen horiei sostengua emanen (hezur- edo muskulu-ehunetan). Bestetik, mintz basala, nagusiki epiteliu-zelulei sostengua ematen die, estromako zeluletatik bereiziz, guruinak osatzen dituzten epiteliu zeluletan bezala. Nahiz eta MEZEN osaera eta egitura aldakorak diren organo edota ehunaren arabera, badituzte hainbat makromolekula amankomunean. MEZtan proteina ugariena kolagenoa da [10]. I motako kolagenoak zuntzekak osatzen ditu, II motako kolagenoa ugaria da kartilago ehunetan, eta IV motako kolagenoa mintz basalaren osagai garrantzitsua da [11].

MEZEN funtzioei dagokienez, hauek mikroingurune dinamikoa sortzen dute, zelula amak aktibatzean erreplikatu eta desberdindu daitezten [12]. Zelula eta MEZEN arteko komunikazio horri esker, MEZek zelula amen patua erregulatzen dute, hazkuntza-faktore, osaera biokimiko, egiturazko sostengu eta faktore biomekanikoei esker [6]. MEZek zelulei egiturazko sostengua ematen diete, batetik, MEZEN 3D egiturak egitura porotsu interkonektatua eratzen duelako, eta bestetik, zuntzen zeharkako loturen bidez osatutako sareak zelulei atxikidura gune handiak eskaintzen dizkielako [13]. Egiturazko sostengu hori beharrezkoa da zelulen atxikidura, hazkuntza eta desberdintzapenerako [14].

Gainera, zelulen eta MEZen arteko elkarrekintza mintzean zeharreko hartzaileen bidez ematen da. Zeluletan, hartzaile mota garrantzitsuenak integrinak dira, eta MEZko proteinak zitoeskeletoarekin lotzen dituzte. Integrinek zelulen funtzio ugarian parte hartzen dute: atxikidura, proliferazioa, migrazioa, derberdintzapena eta nidazioa edo “homing” delakoan [8].

FN, kolagenoa eta PGak, bakarrik edo heparin sulfatoarekin konbinatuta, fibroblastoen hazkuntza-faktorera, hazkuntza-faktore baskulo-endotelialera, edo hepatozitoen hazkuntza-faktorera lotu daitezke hauen aktibitatea indartuz, konpartimentu mikroanatomikoak sortuz eta erreserborio bezala jokatuz [15].

3. DEZELULARIZATUTAKO MATRIZE ESTRAZELULARRAK

Zeluletan oinarritutako ehun-ingeniaritzaren helburua 3D hazkuntza ereduak sortzea zein zelula eta MEZ-aldamioen konbinaketa erabiliz kaltetutako ehun edo organoak birsortzea izan daiteke. Ehun birsorkuntzarako aldamio sintetikoak eta MEZ naturalak sortu daitezke. MEZ-aldamio naturalak eskuratzeko MEZ dezelularizatuak (dMEZ) erabiltzen dira [8]. MEZren jatorriaren arabera 2 motatako dMEZ-aldamio bereizten dira: zeluletatik eratorritako dMEZ-aldamioak eta organo edo ehunetatik eratorritakoak. Zeluletatik eratorritako dMEZ-aldamioak lortzeko, zelulak in vitro ereiten dira MEZ espezifikoa jariatzeko eta ondoren dezelularizatu egiten dira. Organo edo ehunetatik eratorritako dMEZ-aldamioen kasuan, ehun edo organoarekiko MEZ espezifikoa duenez, zuzenean dezelularizatzen da dMEZ-aldamioa eskuratzeko [16].

Dezelularizazioa edozein organo edo ehunetatik e zelulak zein hauen elementuak kentzean datza, dMEZ-aldamioak eratzeko. MEZ-aldamio horiek kolagenoa, elastina, GAGk eta FN bezalako proteina funtzional eta egiturazko mantentzen dituzte. Gainera, osagai zelularrak eta antigenoak erauzten direnez, gorputz-arrotzen aurkako erreakzioak, hantura eta errefus-immunitarioa bezalako arazoak murrizten dira [17], [18]. dMEZek ehun-ingeniaritzan duten interesa hauen ezaugarri funtzional eta estrukturaletan datza. Izan ere dMEZ-ak erabiltzeak, zelula eta MEZ arteko hainbat interakzio mantentzea sustatzen du, ehunen antolaketa eta birmoldaketa egokia ahalbidetuz[2]. Aldamio moten artean, dMEZak zelulen ezagutza funtzioa hobekien kontserbatzen dute [19], [20], izan ere, itu-organo edo -ehunaren ezaugarri eta osaera kontserbatuz, zelula-zelula komunikazioa, zelula-matrize atxikipena eta MEZ berriaren eraketa abiarazten dute. Dagoeneko animalietan eta gizakietan emaitza onekin aplikatu diren dMEZ-aldamio ugari dira komertzializatuta daudenak [2]. Gainera, dMEZ-aldamioek elkarrekintza dinamikoa mantentzea bermatzen dute MEZren eta organo edo ehun zehatz bateko zelula-populazioaren artean. Alde batetik, ehun edo organoaren MEZren

osaera eta ultraegitura mantenduz, eta bestetik, zelula-populazioaren aktibitate metabolikoaren, beharren, eta mikroingurunearen egoerari moldatuz [21]. Ikusienez, dMEZ-aldamioak, jatorrizko ehun edo organoaren araberako portaera espezifikoak izango du. Hau da, dMEZ jatorria bihotz-ehuna bada, zelula amentzat bihotz-ehunerantz desberdintzeko substratu gogokoena izango da [22].

Organismoko MEZtan bezala, dMEZ-aldamioek, ereindako zelulekin dituzten interakzioak modulatu ditzakete: atxikidurari eraginez, aldamioko puntu zehatzetaranzko migrazioa ahalbidetuz [23] eta ehun espezifikotaranzko desberdintzapena bultzatuz [24]. dMEZ-aldamioek, pisu- edo karga-indarrak jasan ditzakete kolageno zuntzeka eta zuntzei esker, gainera elastikotasuna dute elastina zuntzei esker, eta hidratazio eta lotura funtzioak betetzen dituzte proteoglikanoei esker [25]. Horretaz gain, ehunetan dauden molekula bioaktiboak ere mantentzen dituzkete, hala nola, hazkuntza-faktoreak eta bestelako proteinak, zeintzuk garrantzitsuak diren zelula-zelula eta zelula-matrize elkarrekintzetarako, eta ondorioz MEZ berriaren eraketarako [26].

Hala ere, abantailatz gain, dMEZ-aldamioek badituzte ere hainbat erronka: MEZetatik zelulak eta material genetikoak guztiz erauztea aldamioren egitura asaldatu gabe, banaketa egokia duen birzelularizazioa lortzea eta MEZren jariaketa egokia lortzea [2].

Aurrez esan bezala, dezelularizazioa, MEZa bertan dauden zelulak garbitzeko eta dMEZ-aldamioa eratzeko bioingeniaritza-teknika bat da. Behin dezelularizatuta, zelula amak erein daitezke dMEZ-aldamio horretan, hauek desberdindu eta iturri-ehuna eskuratzeko. Erabil daitezkeen dezelularizazio tratamenduen artean metodo fisikoak, kimikoak, entzimakoak edo biologikoak zein horien arteko konbinaketak aurkitzen dira. Dezelularizazio fisikoak, ehun edo organoaren ezaugarri fisikoak modulatzeko datza, zelulen mintzak asaldatzeko eta zelularen lisia eragiteko [2], [16]. Teknika fisiokoen artean asko dira erabiliak eta guztiek erakusten dituzte abantaila eta desabantailak. Prozedura hauen artean arraspatzea [27], soluzioaren irabiaketa [28]–[30], sonikazioa [31], presio gradientek [32], [33], ultraizozketa [34], [35], elektroporazio itzulezin ez-termikoa (EIET) [36], fluido superkritikoak [37], murgiltze irabiaketa [38] eta perfusioa daude [39]. Teknika guztien artean perfusioak interes handiko teknika dela erakutsi du [40]–[42]. Dezelularizazioaren efizientzia hobetzen da, konposatu dezelularizatzaileak modu azkar eta homogeen jatorrizko odol-hodietatik hedatuz. Gainera, jatorrizko ehun eta organoen osaera eta baskularizazioa mantentzen da ehun lodiago eta organo osoen dezelularizazioa ahalbidetuz [43]–[45]. Teknika guzti hauen bitartez ehuna dezelularizatzea lortzen bada ere, estandarizazio ezintasuna, MEZren kaltetzea eta organo edo

ehunaren ezaugarriaren araberako efizientzia gutxitzea dira teknika hauek dituzten desabantaila nagusiak.

Zelulak ezabatzeko teknika kimiko egokia aukeratzeko orduan ehun edo organoaren lodiera, MEZaren osaera eta emango zaion erabilera hartu behar dira kontuan. Zelulen osagaiak ezabatzeko erabil daitezkeen produktu kimikoen artean azidoak eta baseak, soluzio hipertonikoak eta hipotonikoak, detergenteak, alkoholak eta beste disolbatzaile batzuk daude. Azidoek eta baseek zelularen zitoplasmako osagaiak, organulua eta hainbat biomolekula disolbatu, azido nukleikoak hidrolizatu eta proteinak desnaturalizatzear gain eragin desinfektatzailea dute [2], [8]. Kontuan izatekoa da MEZeko parte diren kolagenoa, GAGak eta hazkunde-faktoreak ere kaltetu ditzaketela [38]. Soluzio hipertonikoek DNA proteinetatik disoziatu dezaketen bitartean, soluzio hipotonikoek zelulen lisia eragin dezakete osmosi bidez, matrizeko molekulen eta arkitekturan eragin minimoa izanik. Nahiz eta zelulen lisia lortu, ez dituzte deuseztatzen zelulen osagaiak, eta beraz DNA ezabatzeko zailtasuna dute [46]. Zelulen mintzak disolbatzeko eta DNA proteinetatik disoziatzeko gai diren detergente ionikoak, ez-ionikoak eta zwiterionikoak daude [47]. Alkohola eta azetona bezalako disolbatzaileek zelulak deshidratatu eta lipidoak ezabatzen dituzte, proteinak prezipitatu eta erretikulazioa eragin dezaketen bitartean [48].

Tratamendu biologikoak 2 motatako eragileak biltzen ditu: entzimakoak eta ez-entzimakoak (kelanteak). Entzimek espezifikotasun handia ematen diete ECMren osagaiei, baina hondakin-entzimen presentziak birzelularizazioa eragotzi dezake erantzun immunea aktibatuz. Hauen artean kolagenasa, lipasa, tripsina, dispasa, termolisina eta nukleasa daude [38]. Agente kelanteek zelulen eta MEZko proteinen arteko atxikidura puntuen arteko disoziazioa bultzatzen dute, hain zuzen ere, kolagenoaren eta fibronektinaren arginina-glizina-aspartato hartzaileengandik banatuz. Erabiltzen diren kelante ohikoenen artean, azido etilen-diamino-tetraazetikoak eta azido etilen-glikol-tetraazetikoak daude [2].

Tratamendu mota bakarra erabiltzea ez denez nahikoa, horien arteko konbinaketa bat erabil beharko litzateke ahalik eta eraginkorrena izateko, ehun eta organoaren arabera [45], [49], [50]. Ahalik eta dezelularizazio onena lortzeko, MEZko osagai bioaktibo garrantzitsuen galera minimizatu behar da, erantzun immunea ekiditeko material genetikoak kentzen den heinean [18], [51]. Are gehiago, MEZen ezaugarri biokimiko, biologiko eta biofisikoak mantendu ahal izateko, oro har, metodo horien konbinaketa erabili behar da [52], metodo horietako bakoitzak MEZen egitura eta osagaiak kaltetu ditzaketelako [2].

dMEZen prozesamendu osteko esterilizazio, erretikulazio eta eraldaketaren bidez birzelulazioarako ezaugarri gehigarriak lortuko dira. Esterilizazioa beharrezkoa da mikroorganismoak ekiditeko, osagai toxikoak erazteko eta dMEZ-aldamioen biobateragarritasuna lortzeko. Esterilizazio metodo fisikoak, gamma izpien eta elektro-sorten bidezko irradiazioa dira [53], [54] dira. Etilen oxidoa mikroorganismoen proteina eta azido nukleikoen karboxilo taldeen alkilazio bitartez horien inaktibazioa eragiten duen beste esterilizazio metodo bat da [53]. Penizilina, estreptomizina, anfoterizina B eta sodio-antibiotikoa bezalako antibiotiko bidezko desinfekzioak bakterioen hazkuntza, zelula-pareta, proteina sintesia eta DNA sintesia inhibituz eragiten dute [2], MEZaren-aldamioaren egituraren gain eragin hutsala dute [16]. Post-prozesamendu eraldaketak gauzatzeko erretikulazio metodo fisiko eta kimikoak erabiltzen dira dMEZ-aldamioen 3D egitura mantentzeko eta ezaugarri mekanikoak hobetzeko. Eta azkenik, poroen dentsitatea handituz zelulen infiltrazioa hobetzeko eraldaketak egin daitezke. Hau lortzeko laserra, SCLP teknika, eta elektroirutzeta daude [55].

4. BIRZELULARIZAZIOA

Birzelularizazioa dMEZ-aldamio zelula gabea zelula populazio berriekin betetzeari deritzo, egitura eta funtzio espezifikoak dituen produktua eskuratzeko. Horretarako, zelula mota espezifikoak edo zelula amak erabili daitezke. Zelula amak, zelula desberdinu gabeak dira, zeinak, zelula-leinu espezifikoetan desberdinu daitezken edota autoberrikuntza egin dezaketen zelula ama gehiago sortzeko. Zelula amak, orokorrean, zelula ama pluripotenteetan eta zelula ama multipotenteetan banatzen dira [16]. Zelula ama pluripotenteak, bai zelula ama enbrionarioak (ZAE) zein induzitutako zelula ama pluripotenteak (iZAP), teorikoki ia edozein motatako zelula somatikotan desberdinu daitezke. Bestalde, zelula ama multipotenteak, zelula ama mesenkimalak (ZAM) adibidez, hainbat motatako ehunetan aurkitzen dira, hala nola, ehun adipotsuan edota hezur-muinean, eta horiek zelula leinu mugatuagoak eman ditzakete [56]. ZAEak, enbriotik bereizitakoak dira, eta leinu ugaritan desberdintzeko gaitasunagatik eta autoberrikuntza gaitasunagatik, interes handiko zelulak dira ehun-ingeniaritzan [57]. Horregatik, dMEZ-aldamio eta ZAE arteko konbinaketa hainbat ehunekin frogatu da, besteak beste, bihotz-ehuna, kornea edota giltzurrunekin [58]–[61]. Alabaina, zelula mota horiek, eztabaida etikoa sorrarazten dutenez, erabilera oso araututa edo debekatuta daukate. Beste zelula ama pluripotenteen adibidea iZAP da. Zelula somatikoak ZAEek berez dituzten transkripzio-faktoreen geneekin transfektatuz birprogramatzen dira iZAPk lortzeko. Horrela, ZAEk duten proliferazio eta desberdintzapen gaitasun lortzen dute [62], [63]. Aplikazioei dagokienez, iZAPak dMEZ-aldamioekin konbinatu dira, hainbat ehun motetarako, adibidez, bihotza, giltzurrunak, birrikak eta pankreasa [64],

[65]. Ikerketa talde batek, gizaki jatorriko bihotz ehuna dezellularizatuz, eta iZAPetik eratorritako kardiomiotoekin birzelularizatuz, 3D-tako bihotz ehun funtzionala lortu zuen, zeina, miokardioaren konponketa eta ordezkapenerako baliagarria izan daiteken [66]. ZAMak, esan bezala zelula ama multipotentek dira, zeinak ehun-ingeniaritzan erabili diren hainbat arlotan, besteak beste, zaurien sendaketan, lotailuen konponketan, kardiomiogenesian eta hezurren birsorkuntzan [56], [67]–[73].

Nahiz eta, ehunen konponketa eta birsorkuntzarako zeluletan oinarritutako teknika ugari garatu diren, badituzte hainbat oztopo edo desabantaila, esaterako, zelula kutsadura, mentuen transplante osteko bizitza laburra, gaixotasunen transmisioa, mikrobaskulaturaren buxadura eta immunitate sistemaren kitzikapena [74], [75].

5. dMEZ-ak EHUN-INGENIARITZAN

Gaur egun, organo edo ehun transplanteak zenbait desabantaila ditu: emaileak mugatuak direla eta transplantearekin lotutako gaixotasun eta infekzioak. Horregatik, dMEZ-aldamioak erabili dira ehun-ingeniaritzan hainbat ehun mota eratzeko, hala nola, azala, hezurra, bihotza, birika, gibela eta giltzurruna [16].

5.1. dMEZ-aldamioak azal-ehunentzat

Azala, giza-gorputza inguruetik babesten duen organoa da eta atal baskularrez (dermisa) eta baskulatura gabeaz (epidermisa) dago osatuta. Posible da larruazaleko ehunak birsortzea dMEZek jatorrizko arkitektura, hodiak, atxikitze gaitasuna, elastikotasuna eta hazkuntza-faktoreak bezalako biomolekulak kontserbatzen dituztela kontuan izanda [114,121,122]. Besteak beste larruazaleko dMEZetan, keratinozitoen atxikidura ahalbidetzen da mintz basalean, angiogenesisia sustatzen duen dermiseko egitura (papilarra eta erretikularra) mantentzen da [76] eta zaurien orbainak murriztu daitezke askatzen diren fibroblastoen hazkuntza-faktoreei esker [77]. Erabilgarritasun anitza izan dezakete dMEZ mota hauek. Dezellularizatutako dermisaren matrize (DDM) aldamia eratu eta zilbor hesteko zelula peribaskularrekin birzelularizatuz zaurien sendaketa kitzikatzen duen aldamiotik hasita [78], jeiuno dezellularizatutik lortutako dMEZean giza dermiseko fibroblastoak eta keratinozitoak ereinda larruazaleko bi geruza dituen azal-mentua osatzen duen aldamiotik pasatuz [79], eta oin diabetikoak sortutako ultzerak tratatzeko eta granulazio-ehunaren eraketa, epitelioaren birsorkuntza, eta angiogenesisia bultzatzen duen dMEZ-aldamioraino [78], azken hau komertzialki eskuragarri dauden AlloDerm® eta Oasis®, adibidez [80].

5.2. dMEZ-aldamioak hezur-ehunentzat

Hezurra sendatzeko eta birsortzeko gaitasuna duen ehuna da. Hala ere, kalte handien aurrean kanpo laguntza beharrezkoa du sendatzeko. Hori dela eta hezuraren birsorkuntzarako ere garatu dira dMEZk [26]. Hauek hezur-ehunaren ezaugarriak mantentzen dituzte, hala nola, geometria, egitura porotsua (makro eta mikro) eta gainazalaren zurruntasuna, osteoindukzioa ahalmena sustatuz [13], [81], [82]. Gainera, hezur dMEZek osteoidean zelula amak desberdintzapen osteogenikorantz bideratzen dituzten egitura erretikulatua imitatzeaz gain [83], [84], immunomodulaziorako hainbat zitokina, magnesioa eta estrontzioa bezalako elementuak ere mantentzen dituzte [85], [86]. Orain arte, dezelularizatutako hezur-matrizeak eskuratzeko, ganaduarn hezurak erabili izan dira, beraien eskuragarritasuna eta giza-hezurarekin duten antzekotasuna dela eta [81]–[83].

Osifikazio endokondrala hezurren garapenean eta sendaketan ematen den prozesu naturala da. Ikerketen arabera, ikusi da dMEZ-aldamioen bidez hezurra birsortu daitekeela osifikazio endokondralari esker [86]–[90].

5.3. dMEZ-aldamioak nerbio-ehunentzat

Nerbio-sistemaren lesioak bereziki suntsitzaileak dira, neuronen birsortzeko gaitasuna mugatuari so eginez. dMEZ-aldamioek jatorrizko arkitektura [91]–[94] eta osagaiak kontserbatzen dituzte (26), zelulen migrazioa gidatzen duten axoiak eta zelula ama neuralen proliferazioa eta sinapsien eraketa erregulatzen duten GAG eta proteoglikanoak, hurrenez-hurren. Mielina, laminina eta hazkuntza-faktoreak kontserbatzea lortu duen hainbat dezelularizazio metodo aplikatu dira nerbio optiko, bizkarrezur-muin eta garunarentzat. Eraturako aldamio horiek zelulen proliferazioa, migrazioa eta desberdintzapen neurala erregula dezakete [95]. Adibidez, 2011. urtean txerri garuna dezelularizatzea lortu zen, eta iZAPekin erein ostean, ikusi zen dMEZ horrek neuronen hazkuntza eta desberdintzapena bultzatzen zuela in vitro [96].

5.4. dMEZ-aldamioak bihotz-ehunentzat

Bihotz gutxiegitasuna garrantzia handiko osasun-arazoa da gaur egun, eta egoera itzulezina izan ohi da askotan. Bihotz-ehuna imitatzen duten dMEZ-aldamioak, erabilgarriak izan litezke bihotz gutxiegitasunerako [97], [98], hauen 3D egitura, baskulatura eta bihotz-ehunaren funtzioak mantentzea lortu baitute [99], [100] bihotzaren geometria eta balbulen funtzionalitatea kontserbatuz [101]–[103]. Gainera, dMEZ-aldamioek, ehunen topografia eta biomolekulak ere mantentzen dituzte, hazkuntza-

faktore angiogenikoen erregulazioa, mikrobaskulaturaren garapena [103], [104], uzkurgarritasun eta elektrokondukzio gaitasuna [105]–[107] eta ErbB hartzaileen bidezko proliferazioa indusitzen dutelarik [98], [107], [108].

Bihotz-balbulek eta odol-hodiek ez bezala, bihotz-muskuluak ez du birsorkuntza aukerarik, horregatik, interesgarria da bihotzaren ehun-ingeniaritzaren bidez bihotz-ehuna eratzeko gaitasuna bultzatzea [1]. Miokardio-infartua, arteria koronarioen buxaduraren ondorioz odol fluxuaren murrizketak eragindako kardiomiotoen heriotza eta ehunaren nekrosian datzan, bihotzeko gaixotasun iskemikoa da. [109]. Miokardio-infartu baten ostean infartatutako eremua ehun fibrotikoz osatutako orbain batez ordezkatzen da. Ikusienez, miokardio-infartuetan dMEZ-aldamioek orbainaren azalera murriztu eta ehunaren zurruntasuna ekidin dezakete. Gainera, dMEZ-aldamioek, lesionatutako eremuan, birbaskularizazioa, kardiomiotoen proliferazio eta desberdintzapena, eta bihotz-MEZ eraketa bultzatzen dira. Alabaina, oraindik ere, arlo honetan hainbat muga daude, hala nola, eraturako miokardioaren odol perfusioa bermatzea, dezelularizazio teknika idealak garatzea edo mentuaren transplanterako denborak definitzea [16].

5.5. Organo osoen dMEZ-aldamioak ehun ingeniaritzan

Organoen transplantea emaitzagarri mugatuta dagoenez eta dMEZ-aldamioetatik datozen organoen odol-hodi sistema eta arkitektura konplexua duten organo osoak eratzeko zaila denez [110], organo osoen dMEZ-aldamioak garatzen hasiak dira. Hauen abantailak 3D-tako arkitektura makroskopikoa, odol-hodi sistema eta MEZko osagaiak mantentzea dira. Garrantzitsua odol-hodi sistema mantentzea da, odol fluxura konektatzea ahalbidetzen duelako [16]. Organo osoen aldamiak garatzeko, lehenik eta behin organoa dezelularizatu behar da, jarraian zelula autologoekin edo zelula amekin osatu eta azkenik bioerreaktore batean organo funtzional bat garatzeko. Azken urteetan, perfusio bidez, organoen 3D arkitektura anatomikoa osorik mantentzea bermatzen duten dezelularizatzeko protokoloak garatu dira [2]. Jarraian ehun-ingeniaritza bitartez sortutako organo osoen dMEZ-aldamio adibide garrantzitsuenak aurkeztuko dira.

Biriken dMEZ-aldamioei esker, biriken arkitektura espaziala, albeoloen egitura, mintz-basal fina eta geometria adarkatua lortzeaz gain, biriketako zelulen funtzioak atondu ditzaketen biomolekulak mantentzea ere bermatu da [16]. Literatura zientifikoan baskulatura zelula gabea, airebideak, albeoloak, albeoloen-mintza, albeoloen azalera eta MEZko proteinak kontserbatzen zituen sagu birika dezelularizatzeari dagokion lan bat aurki dezakegu. Kasu honetan, birika dezelularizatu

zelula epitelial eta endotelialekin erein ostean, hau gai zen gas elkartrukea mantentzeko bai in vitro zein in vivo, egoera fisiologikoa imitatuz [27].

Behazunaren sintesia eta detoxifikazioa xede duen gibelaren dMEZ-aldamioen bidez hauen ezaugarriak mantentzea lortu da: gibelesko MEZren osagai espezifikoa, gibelaren funtzioak, behazun-hodiak eta odol-hodiak [16]. 2010an, lortu zen dezelularizatutako gibelaren matrizeak, 3Dtako arkitektura, gibel MEZ, eta sare mikrobaskularra kontserbatzen zituen. Birzelularizatu ostean, gibelaren funtzioak (albumina jariapena, urea sintesia eta zitokromo P450 espresioa) in vitro mantentzea, zein hepatozitoen biziraupena eta funtzionalitatea in vivo mantentzea lortu zen [111]. Orduztik, gibelaren dMEZ-aldamioen eraketa prozesua garatuz joan da, dezelularizaziorako denbora murriztuz eta odol-hodiak hobeto kontserbatzea lortuz [16].

Giltzurrunak uraren homeostasirako eta hondakinen irazketarako nefrona du oinarritzko unitate bezala, glomerulua iragazketarako, eta tubulu-sistema birxurgapenerako. Orain arte eratu diren dMEZ-aldamioen bidez giltzurrunen MEZren egitura eta giltzurrunaren funtzioak (iragazketa, irazketa eta birxurgapena) mantentzea ere lortu da [16]. 2013an egin zen ehun-ingeniaritzaz lortutako giltzurrunaren lehen transplantea karraskarrietan. Giltzurrun osoaren odol-hodiak, glomerulua eta tubuluak iragazkor zituen dezelularizatutako aldamia lortu zuten [112].

Bihotzaren ehun-ingeniaritzan, gehien ikertu diren dMEZ-aldamioak, organo osoenak dira [16]. 2008an lortu zen lehen aldiz bihotzeko MEZren osagaiak, eta odol-hodiak kontserbatzen zituen dezelularizatutako txerri- eta sagu-bihotzen dMEZ-aldamia sortzea [102]. Alabaina, bihotz osoen dMEZ-aldamioen garapenari dagokienez, oraindik hainbat erronka daude, hala nola, birzelularizazio optimoa lortzea (zelula mota espezifikoa eta proportzio egokian), bioerreaktore egokiak garatzea, mantenugaien horniketa bermatzea, edo zeluletan elektrokondukzioa abiaraztea [113].

6. ONDORIOAK

Azken urteotan, dMEZek interes handia piztu dute, eta goranzko joera dute gainera, izan ere, 2000. urtera arte ia ez zegoen argitalpenik (urteko bat edo bat ere ez), eta 2022an jada 423 argitaratu ziren.

Azaldu bezala, dezelularizazio teknika ugari daude, eta azken urteetan teknika berriak ere agertu dira. Teknika bakoitza eta horien konbinaketak garatu dira ehun desberdinen dMEZ-aldamioak eratzeko, hala ere, oraindik ikerketa beharrezkoa da ehun eta organo berrien dezelularizazio optimoa lortzeko..

dMEZ-aldamioen birzelularizazioari esker hainbat ehun sortu ahal izan badira ere ikerketa gehiago beharrezkoa da oraindik ehun mota gehiago eta organoekiko fidelagoak sortu ahal izateko.

Gainera, dMEZ-aldamioak laborategiko animalietan aplikatu dira gehienbat orain arte, eta emaitza onak lortu badira ere ikerketa gehiago beharko da hauek zein organo osoen dMEZ aldamiok gizakiengan probatzeko.. Orain arteko entsegu klinikoan emaitzak ikusita badirudi ehun-ingeniaritza alternatiba baliotsua izan daitekeela aipatutako kasuetan zein etorkizunean gaur egun tratatu ezin diren edo tratamendua mugatuta dagoen arloetan, besteak beste, organo transplanteetan.

ESKER ONAK

Artikulu hau UPV/EHUK finantzatutako talde kontsolidatu (GIC21/158) eta lankidetzaren proiektuen (COLAB22/07) deialdiei eskertu nahiko genieke.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Leor, Y. Amsalem, and S. Cohen. 2005. «Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering *Pharmacol Ther*». vol. **105**, no. 2, pp. 151–163, doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.10.003.
- [2] D. Rana, H. Zreiqat, N. Benkirane-Jessel, S. Ramakrishna, and M. Ramalingam. 2017. «Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering». *J Tissue Eng Regen Med*, vol. **11**, no. 4, pp. 942–965. doi: 10.1002/term.2061.
- [3] J. Zhang and L. Li. 2008. «Stem cell niche: microenvironment and beyond». *J Biol Chem*, vol. **283**, no. 15, pp. 9499–9503. doi: 10.1074/jbc.R700043200.
- [4] M. C. Prewitz *et al.* 2013. «Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments». *Nat Methods*, vol. **10**, no. 8, pp. 788–794. doi: 10.1038/nmeth.2523.
- [5] R. O. Hynes. 2009. «Extracellular matrix: not just pretty fibrils». *Science*, vol. **326**, no. 5957, pp. 1216–1219. doi: 10.1126/science.1176009.
- [6] S. Sart, R. Jeske, X. Chen, T. Ma, and Y. Li. 2020. «Engineering Stem Cell-Derived Extracellular Matrices: Decellularization, Characterization, and Biological Function». *Tissue Eng Part B Rev*, vol. **26**, no. 5, pp. 402–42. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0349.
- [7] C. Bonnans, J. Chou, and Z. Werb. 2014. «Remodelling the extracellular matrix in development and disease». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. **15**, no. 12, pp. 786–801. doi: 10.1038/nrm3904.
- [8] C. Liu, M. Pei, Q. Li, and Y. Zhang. 2022. «Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration». *Front Med*, vol. **16**, no. 1, pp. 56–82. doi: 10.1007/s11684-021-0900-3.

- [9] H. Y. Kim and C. M. Nelson. 2012. «Extracellular matrix and cytoskeletal dynamics during branching morphogenesis». *Organogenesis*, vol. **8**, no. 2, pp. 56–64. doi: 10.4161/org.19813.
- [10] S. Ricard-Blum. 2011. «The collagen family». *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. **3**, no. 1, p. a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- [11] V. S. LeBleu, B. Macdonald, and R. Kalluri. 2007. «Structure and function of basement membranes». *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. **232**, no. 9, pp. 1121–1129. doi: 10.3181/0703-MR-72.
- [12] L. Kjellén and U. Lindahl. 2018. «Specificity of glycosaminoglycan-protein interaction». *Curr Opin Struct Biol*, vol. **50**, pp. 101–108. doi: 10.1016/j.sbi.2017.12.011.
- [13] W. Wei *et al.* 2017. «In vitro osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells with a decellularized matrix derived from human adipose stem cells and in vivo implantation for bone regeneration». *J Mater Chem B*, vol. **5**, no. 13, pp. 2468–2482, Apr. 2017, doi: 10.1039/c6tb03150a.
- [14] D. Choudhury, H. W. Tun, T. Wang, and M. W. Naing. 2018. «Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? ». *Trends Biotechnol*, vol. **36**, no. 8, pp. 787–805. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.03.003.
- [15] M. F. Brizzi, G. Tarone, and P. Defilippi. 2012. «Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche». *Curr Opin Cell Biol*, vol. **24**, no. 5, pp. 645–651. doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.001.
- [16] X. Zhang, X. Chen, H. Hong, R. Hu, J. Liu, and C. Liu. 2022. «Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering». *Bioactive Materials*, vol. **10**, pp. 15–31. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014.
- [17] S. F. Badylak *et al.* 1995. «The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model». *J Biomed Mater Res*, vol. **29**, no. 8, pp. 977–985. doi: 10.1002/jbm.820290809.
- [18] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak. 2006. «Decellularization of tissues and organs». *Biomaterials*, vol. **27**, no. 19, pp. 3675–3683. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
- [19] L. Gui, A. Muto, S. A. Chan, C. K. Breuer, and L. E. Niklason. 2009. «Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts». *Tissue Eng Part A*, vol. **15**, no. 9, pp. 2665–2676. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0526.
- [20] S. A. V. Lopes *et al.* 2009. «Decellularized heterografts versus cryopreserved homografts: experimental study in sheep model». *Rev Bras Cir Cardiovasc*, vol. **24**, no. 1, pp. 15–22, 2009, doi: 10.1590/s0102-76382009000100005.
- [21] M. J. Bissell and J. Aggeler. 1987. «Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? ». *Prog Clin Biol Res*, vol. **249**, pp. 251–262.
- [22] T. L. Sellaro, A. K. Ravindra, D. B. Stolz, and S. F. Badylak. 2007. «Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds». *Tissue Eng*, vol. **13**, no. 9, pp. 2301–2310. doi: 10.1089/ten.2006.0437.

- [23] B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D. B. Stolz, and S. F. Badylak. 2006. «The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix». *Tissue Eng*, vol. **12**, no. 3, pp. 519–526. doi: 10.1089/ten.2006.12.519.
- [24] J. Gong, O. Sagiv, H. Cai, S. H. Tsang, and L. V. Del Priore. 2008. «Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors». *Exp Eye Res*, vol. **86**, no. 6, pp. 957–965. doi: 10.1016/j.exer.2008.03.014.
- [25] Y.-C. Fung. 1993. «*Biomechanics*». New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-4757-2257-4.
- [26] M. Pei, J. T. Li, M. Shoukry, and Y. Zhang. 2011. «A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering». *Eur Cell Mater*, vol. **22**, pp. 333–343; discussion 343. doi: 10.22203/ecm.v022a25.
- [27] H. C. Ott *et al.* 2010. «Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung». *Nat Med*, vol. **16**, no. 8, pp. 927–933. doi: 10.1038/nm.2193.
- [28] S. L. M. Dahl, J. Koh, V. Prabhakar, and L. E. Niklason. 2003. «Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation». *Cell Transplant*, vol. **12**, no. 6, pp. 659–666.
- [29] D. O. Freytes, R. M. Stoner, and S. F. Badylak. 2008. «Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds». *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. **84**, no. 2, pp. 408–414. doi: 10.1002/jbm.b.30885.
- [30] K. Schenke-Layland *et al.* 2003. «Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves». *J Struct Biol*, vol. **143**, no. 3, pp. 201–208. doi: 10.1016/j.jsb.2003.08.002.
- [31] A. Azhim, K. Yamagami, K. Muramatsu, Y. Morimoto, and M. Tanaka. 2011. «The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study». *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. **2011**, pp. 2468–2471, 2011, doi: 10.1109/IEMBS.2011.6090685.
- [32] F. Bolland *et al.* 2007. «Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering». *Biomaterials*, vol. **28**, no. 6, pp. 1061–1070. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.005.
- [33] C. V. Montoya and P. S. McFetridge. 2009. «Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization». *Tissue Eng Part C Methods*, vol. **15**, no. 2, pp. 191–200. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0372.
- [34] A. K. Gulati. 1988. «Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve». *J Neurosurg*, vol. **68**, no. 1, pp. 117–123. doi: 10.3171/jns.1988.68.1.0117.
- [35] T. S. Roberts, D. Drez, W. McCarthy, and R. Paine. 1991. «Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients». *Am J Sports Med*, vol. **19**, no. 1, pp. 35–41. doi: 10.1177/036354659101900106.
- [36] M. Phillips, E. Maor, and B. Rubinsky. 2010. «Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization». *J Biomech Eng*, vol. **132**, no. 9, p. 091003. doi: 10.1115/1.4001882.

- [37] K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura, and T. Fujisato. 2008. «Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. **83**, no. 6, pp. 943–949. doi: 10.1002/jctb.1899.
- [38] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak. 2011. «An overview of tissue and whole organ decellularization processes». *Biomaterials*, vol. **32**, no. 12, pp. 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- [39] S.-K. Goh *et al.* 2018. «Development of perfusion bioreactor for whole organ engineering — a culture system that enhances cellular engraftment, survival and phenotype of repopulated pancreas». *Technology*, vol. **06**, no. 03n04, pp. 118–134, doi: 10.1142/S2339547818500085.
- [40] S. M. Park, S. Yang, S.-M. Rye, and S. W. Choi. 2018. «Effect of pulsatile flow perfusion on decellularization». *BioMedical Engineering OnLine*, vol. **17**, no. 1, p. 15. doi: 10.1186/s12938-018-0445-0.
- [41] D. Seetapun and J. J. Ross. 2017. «Eliminating the organ transplant waiting list: The future with perfusion decellularized organs». *Surgery*, vol. **161**, no. 6, pp. 1474–1478. doi: 10.1016/j.surg.2016.09.041.
- [42] R. Simsa *et al.* 2019. «Effect of fluid dynamics on decellularization efficacy and mechanical properties of blood vessels». *PLoS One*, vol. **14**, no. 8, p. e0220743. doi: 10.1371/journal.pone.0220743.
- [43] J. Duisit *et al.* 2018. «Perfusion-decellularization of human ear grafts enables ECM-based scaffolds for auricular vascularized composite tissue engineering». *Acta Biomater*, vol. **73**, pp. 339–354. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.009.
- [44] A.-M. Kajbafzadeh *et al.* 2019. «Whole organ sheep kidney tissue engineering and in vivo transplantation: Effects of perfusion-based decellularization on vascular integrity». *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. **98**, pp. 392–400. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.018.
- [45] M. M. A. Versteegen *et al.* 2017. «Decellularization of Whole Human Liver Grafts Using Controlled Perfusion for Transplantable Organ Bioscaffolds». *Stem Cells Dev*, vol. **26**, no. 18, pp. 1304–1315. doi: 10.1089/scd.2017.0095.
- [46] C. C. Xu, R. W. Chan, and N. Tirunagari. 2007. «A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria». *Tissue Eng*, vol. **13**, no. 3, pp. 551–566. doi: 10.1089/ten.2006.0169.
- [47] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth. 2004. «Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera». *Biochim Biophys Acta*, vol. **1666**, no. 1–2, pp. 105–117. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
- [48] B. Cox and A. Emili. 2006. «Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics». *Nat Protoc*, vol. **1**, no. 4, pp. 1872–1878, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.273.
- [49] N. Nieto-Nicolau *et al.* 2021. «Effective decellularization of human nerve matrix for regenerative medicine with a novel protocol». *Cell Tissue Res*, vol. **384**, no. 1, pp. 167–177. doi: 10.1007/s00441-020-03317-3.

- [50] L.-C. Wu *et al.* 2017. «Optimized decellularization protocol including α -Gal epitope reduction for fabrication of an acellular porcine annulus fibrosus scaffold». *Cell Tissue Bank*, vol. **18**, no. 3, pp. 383–396, Sep. 2017, doi: 10.1007/s10561-017-9619-4.
- [51] L. Li *et al.* 2019. «Biofabrication of tissue-specific extracellular matrix proteins to enhance the expansion and differentiation of skeletal muscle progenitor cells». *Applied Physics Reviews*, vol. **6**, no. 2, p. 021309. doi: 10.1063/1.5088726.
- [52] W. Zhang *et al.* 2016. «Cell-Derived Extracellular Matrix: Basic Characteristics and Current Applications in Orthopedic Tissue Engineering». *Tissue Eng Part B Rev*, vol. **22**, no. 3, pp. 193–207. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0290.
- [53] T. Goecke *et al.* 2018. «In vivo performance of freeze-dried decellularized pulmonary heart valve allo- and xenografts orthotopically implanted into juvenile sheep». *Acta Biomater*, vol. **68**. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.041.
- [54] S. Qiu *et al.* 2020. «Decellularized nerve matrix hydrogel and glial-derived neurotrophic factor modifications assisted nerve repair with decellularized nerve matrix scaffolds». *J Tissue Eng Regen Med*, vol. **14**, no. 7, pp. 931–943. doi: 10.1002/term.3050.
- [55] A. Eltom, G. Zhong, and A. Muhammad. 2019. «Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review». *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. **2019**, p. e3429527. doi: 10.1155/2019/3429527.
- [56] null Kenry, W. C. Lee, K. P. Loh, and C. T. Lim. 2017. «When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine». *Biomaterials*, vol. **155**, pp. 236–250. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.004.
- [57] S. Sart *et al.* 2016. «Crosslinking of extracellular matrix scaffolds derived from pluripotent stem cell aggregates modulates neural differentiation». *Acta Biomater*, vol. **30**, pp. 222–232. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.016.
- [58] X. Hong *et al.* 2018. «Skeletal Extracellular Matrix Supports Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells: a Potential Scaffold for Engineered Cardiac Tissue». *Cell Physiol Biochem*, vol. **45**, no. 1, pp. 319–331. doi: 10.1159/000486813.
- [59] M. Sambhi *et al.* 2017. «Acellular Mouse Kidney ECM can be Used as a Three-Dimensional Substrate to Test the Differentiation Potential of Embryonic Stem Cell Derived Renal Progenitors». *Stem Cell Rev Rep*, vol. **13**, no. 4, pp. 513–531. doi: 10.1007/s12015-016-9712-2.
- [60] J. Schwan *et al.* 2016. «Anisotropic engineered heart tissue made from laser-cut decellularized myocardium». *Sci Rep*, vol. **6**, p. 32068. doi: 10.1038/srep32068.
- [61] J. Yang, Z. Zhao, J. Mu, and Y. Wang. 2018. «Effect of pre-plastic-deformation on mechanical properties of TiZr-based amorphous alloy composites». *Materials Science and Engineering: A*, vol. **716**, pp. 23–27. doi: 10.1016/j.msea.2018.01.042.
- [62] M. Brouwer, H. Zhou, and N. Nadif Kasri. 2016. «Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies». *Stem Cell Rev Rep*, vol. **12**, no. 1, pp. 54–72. doi: 10.1007/s12015-015-9622-8.

- [63] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, and S. Yamanaka. 2017. «Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress». *Nat Rev Drug Discov*, vol. **16**, no. 2, pp. 115–130. doi: 10.1038/nrd.2016.245.
- [64] M. Ghaedi *et al.* 2018. «Bioengineered lungs generated from human iPSCs-derived epithelial cells on native extracellular matrix». *J Tissue Eng Regen Med*, vol. **12**, no. 3, pp. e1623–e1635. doi: 10.1002/term.2589.
- [65] N. Montserrat, E. Garreta, and J. C. Izpisua Belmonte. 2016. «Regenerative strategies for kidney engineering». *FEBS J*, vol. **283**, no. 18, pp. 3303–3324. doi: 10.1111/febs.13704.
- [66] J. P. Guyette *et al.* 2016. «Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix». *Circ Res*, vol. **118**, no. 1, pp. 56–72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306874.
- [67] S. Bhumiratana *et al.* 2016. «Tissue-engineered autologous grafts for facial bone reconstruction». *Sci Transl Med*, vol. **8**, no. 343, p. 343ra83. doi: 10.1126/scitranslmed.aad5904.
- [68] P. Brouki Milan *et al.* 2020 . «Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery». *Methods*, vol. **171**, pp. 62–67. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.07.005.
- [69] M. Gholipourmalekabadi, M. Sameni, D. Radenkovic, M. Mozafari, M. Mossahebi-Mohammadi, and A. Seifalian. 2016 . «Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells». *Cell Prolif*, vol. **49**, no. 1, pp. 115–121. doi: 10.1111/cpr.12240.
- [70] H. Kitahara *et al.* 2016 . «Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart». *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, vol. **22**, no. 5, pp. 571–579. doi: 10.1093/icvts/ivw022.
- [71] F. Paduano *et al.* 2017. «Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration». *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. **28**, no. 8, pp. 730–748. doi: 10.1080/09205063.2017.1301770.
- [72] H. Song *et al.* 2018. «Enhanced Effect of Tendon Stem/Progenitor Cells Combined With Tendon-Derived Decellularized Extracellular Matrix on Tendon Regeneration». *Cell Transplantation*, vol. **27**, no. 11, p. 1634. doi: 10.1177/0963689718805383.
- [73] X. Yuan *et al.* 2017 . «Stem cell delivery in tissue-specific hydrogel enabled meniscal repair in an orthotopic rat model». *Biomaterials*, vol. **132**, pp. 59–71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.004.
- [74] W. Guo *et al.* 2018. «Cell-Free Strategies for Repair and Regeneration of Meniscus Injuries through the Recruitment of Endogenous Stem/Progenitor Cells». *Stem Cells Int*, vol. **2018**, p. 5310471. doi: 10.1155/2018/5310471.
- [75] M. Kasravi *et al.* 2023. «Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine». *Biomater Res*, vol. **27**, no. 1, p. 10. doi: 10.1186/s40824-023-00348-z.
- [76] Y. Takami, R. Yamaguchi, S. Ono, and H. Hyakusoku. 2014 . «Clinical application and histological properties of autologous tissue-engineered skin equivalents using an acellular dermal matrix». *J Nippon Med Sch*, vol. **81**, no. 6, pp. 356–363. doi: 10.1272/jnms.81.356.

- [77] J. S. Choi, J. D. Kim, H. S. Yoon, and Y. W. Cho. 2013. «Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules». *Tissue Eng Part A*, vol. **19**, no. 3–4, pp. 329–339. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0738.
- [78] P. B. Milan *et al.* 2016. «Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells». *Acta Biomater*, vol. **45**, pp. 234–246. doi: 10.1016/j.actbio.2016.08.053.
- [79] F. Groeber *et al.* 2016. «A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation». *ALTEX*, vol. **33**, no. 4, pp. 415–422. doi: 10.14573/altex.1604041.
- [80] M. Parmaksiz, A. Dogan, S. Odabas, A. E. Elçin, and Y. M. Elçin. 2016. «Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine». *Biomed Mater*, vol. **11**, no. 2, p. 022003, Mar. 2016, doi: 10.1088/1748-6041/11/2/022003.
- [81] J. He *et al.* 2020. «Preparation and evaluation of acellular sheep periosteal for guided bone regeneration». *J Biomed Mater Res A*, vol. **108**, no. 1, pp. 19–29. doi: 10.1002/jbm.a.36787.
- [82] A. Kara, S. Tamburaci, F. Tihminlioglu, and H. Havitcioglu. 2019. «Bioactive fish scale incorporated chitosan biocomposite scaffolds for bone tissue engineering». *Int J Biol Macromol*, vol. **130**, pp. 266–279. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.067.
- [83] D. N. Bracey *et al.* 2018. «A Decellularized Porcine Xenograft-Derived Bone Scaffold for Clinical Use as a Bone Graft Substitute: A Critical Evaluation of Processing and Structure». *J Funct Biomater*, vol. **9**, no. 3, p. 45. doi: 10.3390/jfb9030045.
- [84] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. 2006. «Matrix elasticity directs stem cell lineage specification». *Cell*, vol. **126**, no. 4, pp. 677–689. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [85] B. H. Grue and S. P. Veres. 2020. «Use of tendon to produce decellularized sheets of mineralized collagen fibrils for bone tissue repair and regeneration». *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. **108**, no. 3, pp. 845–856. doi: 10.1002/jbm.b.34438.
- [86] A. Mansour, M. A. Mezour, Z. Badran, and F. Tamimi. 2017. «* Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review». *Tissue Eng Part A*, vol. **23**, no. 23–24, pp. 1436–1451. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0026.
- [87] T. A. Einhorn. 1998. «The cell and molecular biology of fracture healing». *Clin Orthop Relat Res*, no. **355** Suppl, pp. S7–21. doi: 10.1097/00003086-199810001-00003.
- [88] M. B. Goldring, K. Tsuchimochi, and K. Ijiri. 2006. «The control of chondrogenesis». *J Cell Biochem*, vol. **97**, no. 1, pp. 33–44. doi: 10.1002/jcb.20652.
- [89] E. Hesse *et al.* 2010. «Repair of a segmental long bone defect in human by implantation of a novel multiple disc graft». *Bone*, vol. **46**, no. 5, pp. 1457–1463, May 2010, doi: 10.1016/j.bone.2010.02.011.
- [90] C. Scotti *et al.* 2010. «Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. **107**, no. 16, pp. 7251–7256. doi: 10.1073/pnas.1000302107.

- [91] S.-Z. Guo, X.-J. Ren, B. Wu, and T. Jiang. 2009 . «Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility». *Spinal Cord*, vol. **48**, no. 7, pp. 576–581, Jul. 2010, doi: 10.1038/sc.2009.170.
- [92] G. M. Harris *et al.* 2017 . «Nerve Guidance by a Decellularized Fibroblast Extracellular Matrix». *Matrix Biol*, vol. **60–61**, pp. 176–189. doi: 10.1016/j.matbio.2016.08.011.
- [93] T. W. Hudson, S. Y. Liu, and C. E. Schmidt. 2014 . «Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing». *Tissue Eng*, vol. **10**, no. 9–10, pp. 1346–1358. doi: 10.1089/ten.2004.10.1641.
- [94] B. Zhao *et al.* 2013 . «Improved preparation of acellular nerve scaffold and application of PKH26 fluorescent labeling combined with in vivo fluorescent imaging system in nerve tissue engineering». *Neurosci Lett*, vol. **556**, pp. 52–57. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.021.
- [95] P. M. Crapo *et al.* 2012 . «Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix». *Biomaterials*, vol. **33**, no. 13, pp. 3539–3547. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.044.
- [96] J. A. DeQuach, S. H. Yuan, L. S. B. Goldstein, and K. L. Christman. 2011 . «Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds». *Tissue Eng Part A*, vol. **17**, no. 21–22, pp. 2583–2592. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0724.
- [97] S. Boroumand, S. Asadpour, A. Akbarzadeh, R. Faridi-Majidi, and H. Ghanbari. 2018 . «Heart valve tissue engineering: an overview of heart valve decellularization processes». *Regen Med*, vol. **13**, no. 1, pp. 41–54. doi: 10.2217/rme-2017-0061.
- [98] Z. Wang, D. W. Long, Y. Huang, W. C. W. Chen, K. Kim, and Y. Wang. 2019 . «Decellularized neonatal cardiac extracellular matrix prevents widespread ventricular remodeling in adult mammals after myocardial infarction». *Acta Biomater*, vol. **87**, pp. 140–151. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.062.
- [99] R. Bai *et al.* 2019. «Combining ECM Hydrogels of Cardiac Bioactivity with Stem Cells of High Cardiomyogenic Potential for Myocardial Repair». *Stem Cells Int*, vol. **2019**, p. 6708435. doi: 10.1155/2019/6708435.
- [100] D. T. Nguyen *et al.* 2018 . «Humanizing Miniature Hearts through 4-Flow Cannulation Perfusion Decellularization and Recellularization». *Sci Rep*, vol. **8**, p. 7458. doi: 10.1038/s41598-018-25883-x.
- [101] P. Kc, M. Shah, J. Liao, and G. Zhang. 2017 . «Prevascularization of Decellularized Porcine Myocardial Slice for Cardiac Tissue Engineering». *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. **9**, no. 3, pp. 2196–2204. doi: 10.1021/acsami.6b15291.
- [102] H. C. Ott *et al.* 2008. «Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart». *Nat Med*, vol. **14**, no. 2, pp. 213–221. doi: 10.1038/nm1684.
- [103] S. Rajabi *et al.* 2018 . «Human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells efficiently colonize in bFGF-tethered natural matrix to construct contracting humanized rat hearts». *Biomaterials*, vol. **154**, pp. 99–112. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.054.

- [104] Z. Qian, D. Sharma, W. Jia, D. Radke, T. Kamp, and F. Zhao. 2019 . «Engineering stem cell cardiac patch with microvascular features representative of native myocardium». *Theranostics*, vol. **9**, no. 8, pp. 2143–2157. doi: 10.7150/thno.29552.
- [105] A. Blazeski *et al.* 2019 . «Engineered Heart Slice Model of Arrhythmogenic Cardiomyopathy Using Plakophilin-2 Mutant Myocytes». *Tissue Eng Part A*, vol. **25**, no. 9–10, pp. 725–735. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0272.
- [106] A. Blazeski, J. Lowenthal, R. Zhu, J. Ewoldt, K. R. Boheler, and L. Tung. 2019 . «Functional Properties of Engineered Heart Slices Incorporating Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes». *Stem Cell Reports*, vol. **12**, no. 5, pp. 982–995. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.04.002.
- [107] J. Jang *et al.* 2017 . «3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair». *Biomaterials*, vol. **112**, pp. 264–274. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.026.
- [108] I. Perea-Gil *et al.* 2018., “Head-to-head comparison of two engineered cardiac grafts for myocardial repair: From scaffold characterization to pre-clinical testing». *Sci Rep*, vol. **8**, no. 1, Art. no. 1. doi: 10.1038/s41598-018-25115-2.
- [109] L. A. Reis, L. L. Y. Chiu, N. Feric, L. Fu, and M. Radisic. 2016 . «Biomaterials in myocardial tissue engineering». *J Tissue Eng Regen Med*, vol. **10**, no. 1, pp. 11–28. doi: 10.1002/term.1944.
- [110] C.-X. Zheng, B.-D. Sui, C.-H. Hu, X.-Y. Qiu, P. Zhao, and Y. Jin, 2018 . «Reconstruction of structure and function in tissue engineering of solid organs: Toward simulation of natural development based on decellularization». *J Tissue Eng Regen Med*, vol. **12**, no. 6, pp. 1432–1447. doi: 10.1002/term.2676.
- [111] B. E. Uygun *et al.* 2010. “Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix». *Nat Med*. vol. **16**, no. 7, pp. 814–820. doi: 10.1038/nm.2170.
- [112] J. J. Song, J. Guyette, S. Gilpin, G. Gonzalez, J. P. Vacanti, and H. C. Ott. 2013. «Regeneration and Experimental Orthotopic Transplantation of a Bioengineered Kidney». *Nat Med*. vol. **19**, no. 5, pp. 646–651. doi: 10.1038/nm.3154.
- [113] J. Morrissey, F. C. P. Mesquita, C. Hochman-Mendez, and D. A. Taylor. 2022 . «Whole Heart Engineering: Advances and Challenges». *Cells Tissues Organs*. vol. **211**, no. 4, pp. 395–405. doi: 10.1159/000511382.