

# KONCEPCJA NIEINWAZYJNEJ, PROSTEJ METODY MONITORINGU WSPÓŁCZYNNIKA DECELULARYZACJI Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK WIZYJNYCH

Maciej Gniadek

Kazimierz Wielki University, Faculty of Computer Science  
Kopernika 1, 85-074 Bydgoszcz  
e-mail: maciej.gniadek@ukw.edu.pl

**Streszczenie:** Celem pracy było opracowanie prostej, nieinwazyjnej metody monitorowania postępu procesu decelularyzacji materiałów biologicznych z wykorzystaniem pomiaru zmian transmisji światła widzialnego. Podstawą zaproponowanego rozwiązania jest obserwowany w praktyce wzrost przepuszczalności optycznej tkanek wraz z usuwaniem elementów komórkowych, co odpowiada redukcji efektywnego współczynnika tłumienia  $\mu$ . W artykule przedstawiono trzy warianty konstrukcyjne układu pomiarowego – prototyp z pojedynczym detektorem, wersję laserową oraz moduł oparty na kamerze CMOS – umożliwiające rejestrację zmian współczynnika transmisji  $T$  w trakcie trwania procesu. Zaprezentowana metoda, przy zachowaniu stałych warunków pomiarowych, pozwala na bieżącą ocenę stopnia decelularyzacji bez konieczności niszczenia materiału i może stanowić uzupełnienie klasycznych technik laboratoryjnych. Przedstawiona koncepcja stanowi podstawę do dalszej walidacji eksperymentalnej oraz optymalizacji układu pomiarowego w kierunku jego wykorzystania w warunkach laboratoryjnych i produkcyjnych.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, decelularyzacja, kontrola jakości, metody optyczne, ECM

## CONCEPT OF A NON-INVASIVE, SIMPLE METHOD FOR MONITORING THE DECELLULARIZATION COEFFICIENT USING VISION-BASED TECHNIQUES

**Abstract:** The aim of this study was to develop a simple, non-invasive method for monitoring the progress of tissue decellularization using measurements of changes in visible-light transmission. The proposed approach is based on the empirically observed increase in optical transparency that accompanies the removal of cellular components, which corresponds to a reduction in the effective attenuation coefficient  $\mu$ . Three design variants of the measurement system were presented—a single-detector prototype, a laser-based configuration, and a CMOS-camera module—each enabling detection of changes in the transmission coefficient  $T$  during the process. Under stable measurement conditions, the method allows real-time assessment of the degree of decellularization without damaging the material and can serve as a supplement to classical laboratory techniques. The presented concept provides a foundation for further experimental validation and optimization of the measurement system for use in laboratory and production settings.

**Słowa kluczowe:** biomaterials; decellularization; quality control; optical methods; extracellular matrix (ECM)

### 1. Wprowadzenie

Współczesna inżynieria tkankowa oraz szerzej, nauki medyczne wykorzystują bardzo szeroką gamę różnego rodzaju materiałów. W zależności od potrzeb są to materiały powszechnie stosowane również w innych gałęziach przemysłu, ze szczególnym uwzględnieniem materiałów metalowych (głównie stali) oraz tworzyw sztucznych – jak również materiały dedykowane ściśle do zastosowań biomedycznych. Jedną z kluczowych grup

materiałów dedykowanych są biomateriały, czyli substancje lub ich kombinacje, inne niż leki, pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, przeznaczone do kontaktu z żywymi tkankami w celu ich zastąpienia, regeneracji, wspomaganie lub diagnozy [1, 2]. Wszystkie biomateriały powinny cechować się biokompatybilnością, biozgodnością, biofunkcjonalnością oraz stabilnością w środowisku biologicznym, tak aby mogły spełniać swoje funkcje bez wywoływania niepożądanych reakcji ze strony organizmu [3].

Szczególną grupę spośród nich stanowią biomateriały pochodzenia naturalnego, pozyskiwane z powszechnie występujących struktur biologicznych obejmujących organizmy zwierzęce, roślinne, grzybowe oraz mikroorganizmy (Monera i Protista). Biomateriały te są szczególnie szeroko stosowane w medycynie regeneracyjnej, gdzie pełnią m.in. funkcję rusztowań dla wzrostu komórkowego w hodowlach tkankowych, a także wspierają procesy gojenia ran i odbudowy ciągłości tkanek. Materiały naturalne są szczególnie istotne w rekonstrukcji tkanek, ponieważ zachowują właściwą dla organizmu architekturę trójwymiarową, specyficzny skład biochemiczny oraz mikrośrodowisko sprzyjające adhezji, proliferacji i różnicowaniu komórek. Dzięki temu umożliwiają bardziej fizjologiczne odtworzenie funkcji tkankowych niż materiały syntetyczne, które często wymagają dodatkowej modyfikacji, aby uzyskać podobne właściwości. Jednakże w przypadku wytwarzania takich biomateriałów kluczowy proces, jakim jest decelularyzacja, polegający na usuwaniu elementów komórkowych materiału źródłowego, pozostaje trudny do pełnej kontroli i optymalizacji.

### **1.1. Decelularyzacja**

Proces decelularyzacji polega na usuwaniu elementów komórkowych z tkanki przy jednoczesnym zachowaniu struktury oraz składu macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w postaci niezmienionej lub możliwie zbliżonej do niezmienionej. Podstawowym celem jest eliminacja składników komórkowych, takich jak komórki czy organella, w celu ograniczenia ryzyka wywołania odpowiedzi immunologicznej u biorcy oraz stworzenia przestrzeni umożliwiającej wzrost nowych tkanek. Działanie to można porównać do procesu architektonicznego, w którym podczas gruntownej przebudowy usuwa się wszystkie elementy wnętrza, pozostawiając jedynie szkielet konstrukcyjny, aby przygotować przestrzeń pod ponowne zagospodarowanie[4–6].

Techniki decelularyzacji dzielą się na dwie podstawowe grupy, fizyczne i chemiczne. Metody fizyczne obejmują mrożenie, rozmrażanie oraz homogenizację; mają charakter wspomagający i zazwyczaj nie są wystarczające jako samodzielny sposób usunięcia komórek. Główną rolę pełnią metody chemiczne, w tym detergenty anionowe i niejonowe, metody enzymatyczne oparte na nukleazach i proteazach oraz podejścia wykorzystujące różnice ciśnień osmotycznych [7–9].

### **1.2. Obecnie stosowane metody weryfikacji stopnia decelularyzacji**

Ocena skuteczności procesu decelularyzacji opiera się na metodach pozwalających określić, czy z materiału usunięto elementy komórkowe i materiał genetyczny, przy jednoczesnym zachowaniu integralności ECM. W klasycznym podejściu laboratoryjnym stosuje się głównie cztery techniki: histologię, barwienia fluorescencyjne (np. DAPI), oznaczanie zawartości DNA oraz immunohistochemię. Szczególny nacisk jest kładziony na oznaczenia zawartości DNA.

- Histologia (HE) – proces barwienia materiału hematoxyliną i eozyną, pozwalający ocenić obecność jąder komórkowych oraz strukturę macierzy pozakomórkowej. Prawidłowo zdecelularyzowany materiał nie powinien wykazywać obecności jąder komórkowych, natomiast struktura ECM powinna pozostać zachowana. Metoda ta, poza weryfikacją skuteczności decelularyzacji, umożliwia również ocenę integralności i organizacji ECM[7, 9].
- Fluorescencyjne barwienie DAPI – metoda wykrywająca nawet niewielkie pozostałości jąder komórkowych poprzez wiązanie barwnika DAPI z materiałem genetycznym. Jest to technika wysoce czuła i ustandaryzowana. W prawidłowo zdecelularyzowanym materiale sygnał fluorescencji powinien być minimalny lub całkowicie brakujący[7].
- Oznaczanie zawartości DNA – metoda polegająca na izolacji DNA i pomiarze jego ilości w przeliczeniu na masę suchego materiału. Przyjmuje się, że skutecznie zdecelularyzowany materiał powinien zawierać mniej niż 50 ng DNA na mg suchej masy, a dodatkowym kryterium jakości jest fragmentacja DNA do długości poniżej 200 pz. Jest to jedna z najczęściej stosowanych metod ilościowych[7].
- Immunohistochemia (IHC) - metoda wykorzystująca przeciwciała skierowane przeciwko wybranym antygenom komórkowym lub składnikom ECM. Umożliwia ocenę obecności pozostałych elementów komórkowych, takich jak białka cytoplazmatyczne lub błonowe, a także analizę zachowania wybranych struktur ECM (np. kolagenu czy lamininy) po procesie decelularyzacji. W prawidłowo zdecelularyzowanym materiale sygnał związany z antygenami komórkowymi powinien być nieobecny lub minimalny [8, 10].

Ocena skuteczności procesu decelularyzacji wykonywana za pomocą opisanych metod jest niezbędna, jednakże

posiada liczne wady, które pozwalają na zastosowanie ich wyłącznie po zakończeniu procesu, jako metody kontroli następczej. Ich podstawowe wady to [7, 10]:

- konieczność pobrania fragmentu materiału i związane z tym zniszczenie fragmentu próbki, co uniemożliwia ocenę stopnia decelularyzacji w tkacie procesu;
- czasochłonność procedur obejmujących przygotowanie skrawków, barwienia oraz etapy inkubacji;
- wysoki koszt wynikający ze zużycia specjalistycznych odczynników, użycia odpowiedniej aparatury laboratoryjnej oraz dużego nakładu pracy personelu.

## 2. Proponowana metoda optycznej oceny stopnia decelularyzacji

### 2.1 Koncepcja metody

Stosowane obecnie metody oceny skuteczności procesu decelularyzacji, opierające się m.in. na analizie pozostałego DNA, barwieniach histologicznych oraz technikach immunohistochemicznych, wymagają fizycznej ingerencji w biomateriał i jak wskazano wcześniej uniemożliwiają prowadzenie kontroli w trakcie trwania samego procesu. W praktyce zaobserwowano jednak, że wraz z postępowaniem decelularyzacji zmieniają się właściwości optyczne materiału, staje się on zauważalnie bardziej przezroczysty. Wynika to z faktu, że komórki, ich organelle oraz cytoplazma stanowią główne źródła rozpraszania i absorpcji światła w tkankach, a ich usunięcie prowadzi do wyraźnego obniżenia mętności optycznej [11, 12].

W wyniku inspekcji przeprowadzonej z wykorzystaniem wiązki białego światła widzialnego przepuszczonej przez próbkę oraz prostej analizy natężenia światła rejestrowanego przez układ fotoelektryczny potwierdzono tę obserwację. Materiał po procesie decelularyzacji przepuszczał znacząco więcej światła niż materiał natywny, przy jedynie nieznacznym spadku grubości (ok. 10–20%), co nie wskazuje na dominujący wpływ czynnika grubości na obserwowane zjawisko. Zaobserwowana różnica w transmisji wskazuje na zmianę poziomu przepuszczalności światła przez ośrodek.

Podstawą proponowanej metody jest różnica we właściwościach przepuszczalności widzialnego promieniowania elektromagnetycznego materiału przed i po poddaniu go procesowi decelularyzacji. Natywna tkanka charakteryzuje się dużym rozproszeniem i absorpcją światła, co powoduje jej niską przenikalność świetlną. Wynika to, wedle obserwacji i założeń metody, z obecności struktur komórkowych. W wyniku prowadzenia procesu

decelularyzacji struktury komórkowe ulegają degradacji i ostatecznie są usuwane z biomateriału, pozostawiając rusztowanie kolagenowe o znacznie wyższej przepuszczalności świetlnej.

Niniejsze zjawisko jest możliwe do opisanego poprzez skorzystanie z uproszczonej postaci równania tłumienia światła, analogicznego do prawa Beer-Lambert'a [12, 13], w ramach którego intensywność światła po transmisji przez ośrodek jest opisywana następującą zależnością:

$$I = I_0 e^{-\mu d}$$

gdzie:

$I_0$  – natężenie światła padającego [W/mm<sup>2</sup>, umowne jednostki aparatury lub inne],

$I$  – natężenie światła po przejściu przez ośrodek [jednostki tożsame z  $I_0$ ],

$\mu$  – efektywny współczynnik tłumienia, obejmujący sumaryczny wpływ absorpcji i rozpraszania [mm<sup>-1</sup>],

$d$  – grubość próbki [mm].

Zgodnie z założeniami i obserwacjami opisanymi powyżej, w materiale w trakcie procesu decelularyzacji i po jego zakończeniu w wyniku usunięcia elementów komórkowych wartość współczynnika  $\mu$  jest niższa niż w materiale natywnym [11, 12, 14, 15]. Dla dwóch stanów próbki można zapisać relację  $\mu_0 > \mu_1$ , gdzie 0 oznaczono materiał przed procesem decelularyzacji, a 1 materiał badany w trakcie procesu lub po jego zakończeniu. Relacja współczynnika tłumienia prowadzi wprost do relacji  $I_0 > I_1$ .

W praktyce wskaźnikiem opisującym stopień transmisji jest stosunek:

$$T = \frac{I_1}{I_0}$$

gdzie:

$T$  – współczynnik przepuszczalności [przyjmujący wartości w zakresie 0–1, gdzie 0 to brak przepuszczalności, a 1 to przepuszczalność pełna],

$I_0$  – natężenie światła padającego na próbkę,

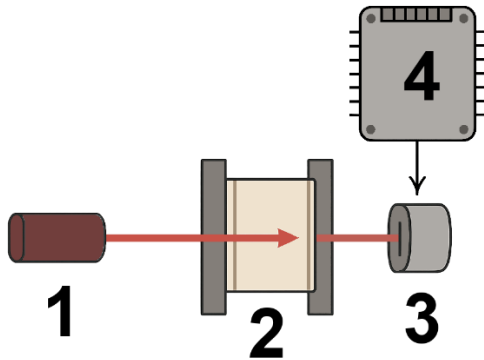
$I_1$  – natężenie światła po przejściu przez próbkę.

Należy jednak uwzględnić założenie, że materiał ma stały stopień uwodnienia podczas całego badania.

W badanym materiale zaobserwowano nieznaczną spadek grubości w trakcie procesu decelularyzacji, wynoszący typowo ok. 10–20%. W ujęciu czysto teoretycznym ma on znaczenie, jednakże ze względu na wyraźną zwiększoną przepuszczalność świetlną oraz na brak praktycznego wpływu tak niewielkiej zmiany grubości, wartość ta jest pomijalna w ramach niniejszego badania.

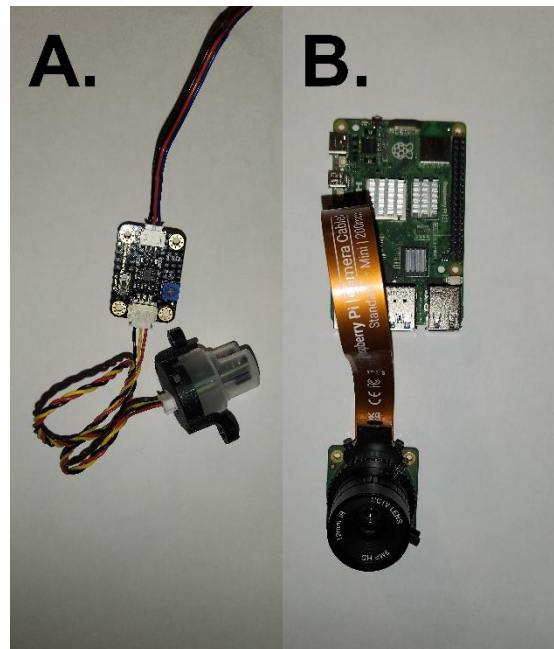
## 2.1. Prototypy

Założenia fizyczne układu pomiarowego opisano wcześniej, a na rys. 1 przedstawiono schematyczną prezentację działania trzech wariantów urządzenia.



Rys. 1. Koncepcja pomiaru współczynnika decelularyzacji, gdzie 1 – emiter promieniowania świetlnego w wariantach A i B lub źródło światła w wariantach C, 2 – płaszcz kalmara, 3 – detektor natężenia oświetlenia w wariantach A i B lub kamera w wariantach C, 4 – urządzenie przetwarzające uzyskane dane.

Zestawienie wariantów układu pomiarowego zaprezentowano również na rys. 2, gdzie ujęto trzy opracowane konfiguracje systemu. Wariant A obejmuje układ z czujnikiem zmętnienia Gravity, wykorzystywany do szybkiej i wstępnej oceny przepuszczalności materiału. Wariant B przedstawia system transmisyjny z wykorzystaniem lasera jako źródła światła oraz fotodiody jako detektora, zapewniający największą precyzję i powtarzalność pomiarów. Wariant C prezentuje układ fotometryczny z użyciem kamerki rejestrującej obraz próbki, co umożliwia przeprowadzenie analizy intensywności światła w wielu punktach materiału oraz ocenę jego jednorodności.



Rys. 2. Prezentacja wybranych elementów wariantów prototypu: A – prototyp oparty o system Gravity, B – system analizy obrazu z wykorzystaniem kamery z sensorem CMOS. Wariant oparty o diodę laserową i fotodiode pominięto ze względu na jego prostą i powszechnie znaną konstrukcję.

Prototyp układu pomiarowego opracowano w trzech różnych wariantach: A z wykorzystaniem czujników zmętnieniowych, B wykorzystującego źródło światła w postaci diody laserowej oraz detektor w postaci fotodiody, oraz C opierającego się na analizie obrazu z kamery CMOS. W każdej konfiguracji czujnik lub urządzenie rejestrujące mocowane jest w ten sam sposób, zarówno dla pomiaru prowadzonego w trakcie procedury, bez jej przerywania, jak i dla pomiaru wykonywanego poza procedurą, przed jej rozpoczęciem i po jej zakończeniu.

Wariant A wykorzystuje czujnik zmętnienia DFRobotGravity[16], który pozwala w prosty i szybki sposób ocenić różnice między materiałem surowym a zdecelularyzowanym. Mimo że system ten został zaprojektowany do pomiarów w cieczach, jego adaptacja do cienkich membran umożliwia wstępne rozpoznanie zmian w przepuszczalności światła, przy czym ograniczeniem pozostaje geometria czujnika nieoptymalnie przystosowana do materiałów stałych. Wariant B stanowi układ transmisyjny z wykorzystaniem diody laserowej jako źródła

światła oraz fotodiody jako detektora; sygnał z fotodiody rejestrowany jest analogowo, następnie przetwarzany i zapisywany z użyciem mikrokontrolera. Wariant B cechuje się najwyższą precyzją i powtarzalnością pomiarów oraz możliwością kalibracji na zestawie wzorcowych etapów procesu decelularyzacji. Wariant C opiera się na rejestracji obrazu z wykorzystaniem kamerki wyposażonej w sensor CMOS oraz jednolite podświetlenie. Analiza obrazu następuje w ramach autorskiego skryptu opartego o bibliotekę OpenCV (Python) [17], z wykorzystaniem Raspberry Pi 5 8 GB[18] jako modułu obliczeniowego. Taki układ umożliwi tworzenie map transmisji i ocenę jednorodności materiału, co czyni ten wariant szczególnie przydatnym do walidacji wariantu B oraz do analizy przestrzennych niejednorodności biomateriału.

W ramach opracowanego układu wyróżniono dwa zasadnicze warianty prowadzenia pomiaru. W wariacie pierwszym pomiar wykonywany jest w trakcie procesu decelularyzacji, w warunkach przepływu hydrodynamicznego medium decelularyzującego. To środowisko pracy zapewnia zbliżone parametry napięcia materiału i powierzchni aktywnej, lecz wprowadza również naturalne ograniczenia związane z dynamicznym charakterem układu. W wariacie drugim pomiar prowadzony jest poza procedurą, po umieszczeniu membrany w uchwycie zapewniającym ustalone naprężenie, stałą grubość oraz stałą powierzchnię aktywną, co pozwala na uzyskanie wysoce powtarzalnych warunków pomiarowych.

Każdy z wariantów wymaga odmiennego podejścia do analizy danych. W wariacie pierwszym, w przypadku prototypów B i C, badane są jednocześnie dwie warstwy materiału znajdujące się w przepływie cieczy, co może powodować niewielkie fluktuacje sygnału. W prototypie A, z uwagi na niewielki rozmiar szczeliny pomiarowej czujnika zmętnieniowego, konieczne jest dostosowanie ukształtowania detektora w sposób nienaruszający przepływu medium. W wariacie drugim warunki są stabilne i powtarzalne, co pozwala na jednoznaczną porównywalność pomiarów niezależnie od zastosowanego prototypu A, B lub C.

W wariacie pierwszym prototypu A oraz w wariacie drugim we wszystkich prototypach światło pada prostopadle na membranę, a następnie jego natężenie po przejściu przez próbkę jest rejestrowane i porównywane z sygnałem odniesienia  $I_0$ , mierzonym bez obecności materiału. Umożliwia to analizę transmisji zarówno dla całych membran, jak i dla wybranych punktów tej samej próbki. W przypadku wariantu pierwszego prototypów B i C jedyną różnicą jest możliwość niewielkiego odchylenia kierunku wiązki, wynikająca z potencjalnego ruchu membrany

w przepływie; odchylenie to nie wpływa jednak na zdolność odróżnienia materiału surowego od zdecelularyzowanego.

Po zarejestrowaniu sygnałów  $I_0$  i  $I_1$ , obliczany jest współczynnik transmisji  $T = \frac{I_1}{I_0}$ , który stanowi podstawowy parametr opisujący zmianę właściwości optycznych materiału w trakcie procesu decelularyzacji. Analiza prowadzona jest dla co najmniej trzech punktów pomiarowych, co umożliwi ocenę jednorodności próbki oraz identyfikację ewentualnych lokalnych różnic strukturalnych. Wzrost wartości  $T$  odpowiada wzrostowi przepuszczalności światła, a tym samym postępowi usunięcia elementów komórkowych.

### 3.1. Współczynnik decelularyzacji

Współczynnik decelularyzacji  $T$  ma charakter skalowalny i zależny, co oznacza, że jego wartości nie są interpretowane w sposób absolutny. Punkt odniesienia  $T = 0$  będzie ustalany na początku pomiarów dla materiału przed procesem decelularyzacji, co pozwala na uwzględnienie indywidualnych różnic między próbkami oraz ich natywnych właściwości optycznych. Wartość  $T = 1$  będzie odpowiadała poziomowi pełnej decelularyzacji ustalonemu eksperymentalnie poprzez porównanie wyników transmisji światła z wynikami uzyskanymi z innych technik oceny decelularyzacji, takich jak analiza DNA czy barwienia histologiczne. W takich warunkach możliwe są wartości  $T$  przekraczające 1, które będą interpretowane jako nadmierny poziom decelularyzacji, przekraczający punkt optymalny określony w ramach walidacji metody.

Metoda ta, przy założeniu stałego uwodnienia oraz pomijalnego wpływu niewielkiej zmiany grubości materiału, pozwala na bieżącą i niedestrukcyjną kontrolę procesu decelularyzacji, a także na końcową ocenę jakości każdej wytworzonej membrany[12].

Zastosowanie opracowanego układu pomiarowego obejmuje przede wszystkim kontrolę seryjną membran ECM uzyskiwanych z płaszczka kalmara, zarówno w trakcie procesu, jak i po jego zakończeniu. Metoda pozwala na ocenę każdej wytworzonej próbki bez konieczności jej niszczenia, dzięki czemu może zostać wykorzystana w produkcji biomateriałów wymagających indywidualnej kontroli jakości. Ze względu na modułową konstrukcję każdy z opracowanych wariantów układu może zostać w przyszłości zminiaturyzowany lub zautomatyzowany, co umożliwi jego montaż bezpośrednio na linii technologicznej procesu decelularyzacji.

Opracowana metoda posiada również pewne ograniczenia wynikające przede wszystkim z właściwości badanego materiału. Grubość i stopień uwodnienia membrany mogą

wpływać na poziom transmisji światła, dlatego konieczna jest standaryzacja uchwytu oraz warunków pomiarowych. Dodatkowo anizotropia strukturalna ECM może prowadzić do kierunkowych różnic w transmisji, co należy uwzględnić przy analizie wyników. Metoda nie zastępuje badań ultrastrukturalnych, takich jak histologia czy analiza DAPI, lecz stanowi ich uzupełnienie w zakresie oceny ogólnego stopnia oczyszczenia. Niezbędna jest również kalibracja współczynnika T dla każdego protokołu decelularyzacji, tak aby wartości odniesienia 0 i 1 odpowiadały rzeczywistemu poziomowi zachowania lub usunięcia materiału komórkowego [11, 12, 14, 15].

### **3. Dyskusja**

Omawiane wcześniej zależności między strukturą materiału a współczynnikiem tłumienia  $\mu$  stanowią podstawę działania proponowanej metody, natomiast w części dyskusyjnej skoncentrowano się na jej praktycznym wykorzystaniu i porównaniu z technikami istniejącymi. Zaproponowana metoda optycznej oceny postępu procesu decelularyzacji wpisuje się w rosnący trend zastąpienia inwazyjnych technik, metodami nieinwazyjnymi. Kierunek ten szczególnie widoczny w naukach związanych z inżynierią mechaniczną, wkracza coraz szerzej w kręgi nauk biologicznych. Dzięki zastosowaniu wielu wcześniej znanych metod, powszechnie wykorzystywanych w informatyce technicznej, możliwym jest zastosowanie tychże metod w ramach technik biotechnologii i inżynierii tkankowej lub szerzej inżynierii biomedycznej w zakresie badań biomateriałów.

Jak przedstawiono w ramach niniejszej publikacji, zaproponowana metoda posiada podstawową zaletę w przeciwieństwie do współcześnie stosowanych metod, takich jak: analiza DNA, histologia czy immunohistemia – nie wymaga pobierania fragmentu próbki do badań, w wyniku czego może być prowadzona w sposób ciągły, także w trakcie trwania procesu. Należy zwrócić uwagę, że takie zastosowanie pozwala na większą „komercjalizację” procesu decelularyzacji. W warunkach komercyjnej, seryjnej produkcji, wysoce nieefektywnym byłyby testy prowadzone post factum, wymagające późniejszego „dokończenia” procesu, poprzez ponowną decelularyzację.

Zaproponowana koncepcja jest wyraźnie prostrza i wymaga niższego nakładu kosztów i mocy obliczeniowej aniżeli przedstawione w literaturze [19–21]. Główna różnica opierają się na wykorzystaniu tanich, powszechnie dostępnych detektorów. Przeprowadzone badania wstępne pozwalają sugerować, że ich dokładność

jest wystarczająco dobra do realizowanego badania. Należy w tym miejscu wytłumaczyć jako czym jest rozumiana „wystarczająco dobra dokładność” – jest to dokładność decelularyzacji, która pozwala na prowadzenie procesu do momentu usunięcia wystarczającej ilości materiału, aby mógł być wykorzystany jako macierz komórkowa, ale jednocześnie przerwana przed nadmiernym osłabieniem struktury rusztowania komórkowego. Celem nie jest precyzyjne wychwycenie momentu idealnego usunięcia komórek z tkanek, a jedynie odnalezienie „okienka czasowego”, które pozwoli osiągnąć wystarczające zbliżenie się do poziomu równowagi stopie decelularyzacji/uszkodzenia rusztowania komórkowego.

Przedstawione trzy warianty, zostały zaprezentowane jako osobne rozwiązania, jednakże nic nie stoi na przeszkodzie, aby były stosowane równolegle w ramach jednego, bardziej skomplikowanego systemu. Zgodnie z literaturą dotyczącą optycznych właściwości tkanek, obecność komórek znacząco podnosi współczynnik rozpraszania i absorpcji, natomiast oczyszczona ECM charakteryzuje się znacznie wyższą przenikalnością [11, 14]. Fakt, że każdy z wariantów – zarówno laserowy, czujnikowy, jak i oparty na kamerze CMOS – wykorzystuje tę samą zależność fizyczną, zwiększa uniwersalność całej koncepcji i daje możliwość jej implementacji w różnych warunkach laboratoryjnych i technologicznych [22].

Należy jednakże wspomnieć o ograniczeniach metody. Proponowana „prosta” wersja, wymaga utrzymania stałych warunków pomiarowych, zwłaszcza w zakresie uwodnienia, grubości membrany oraz geometrii oświetlenia i detekcji. Opisywane parametry wpływają wprost na współczynnik T i powodują, że nie jest on przydatny jako bezwzględna metoda oceny stopnia decelularyzacji, pomiędzy różnymi materiałami, w różnych warunkach procesu. Dostępna literatura, także wspomina o tym problemie, proponując różne metody jego rozwiązania. Jednakże zaproponowane metody zwiększają znacznie koszt metody i nie mają znaczenia w kontekście wykorzystania opisywanej metody do monitoringu w trakcie przebiegu samego procesu, co jest głównym celem niniejszej metody [11, 12, 15].

### **4. Kluczowe kierunki rozwoju**

Kierunki dalszego rozwoju metody obejmują zastosowanie światła spolaryzowanego w celu redukcji odbić powierzchniowych oraz wprowadzenie pomiarów wielospektralnych, obejmujących zakresy VIS, NIR i UV. Rozszerzeniem technicznym może być integracja układu z kamerą hiperspektralną, co umożliwi bardziej

szczegółową ocenę właściwości optycznych membrany. Istotnym kierunkiem rozwoju jest również modelowanie transportu światła z wykorzystaniem metod Monte Carlo, pozwalające na dokładniejsze odwzorowanie zależności między strukturą ECM a mierzonym współczynnikiem T. Dodatkowo dane pomiarowe mogą zostać wykorzystane w algorytmach uczenia maszynowego, co umożliwi automatyczną klasyfikację próbek oraz predykcję stopnia decelularyzacji.

#### 4. Wnioski

Zaproponowana metoda, pomimo znacznej prostoty posiada duży potencjał zastosowania jej zarówno w praktyce badawczej, jak i komercyjnej. Wymaga dalszego dopracowania i kalibracji względem metod obecnie stosowanych, co zostanie opisane w ramach rozprawy doktorskiej, jednakże jest to proces nieskomplikowany i możliwy do zrealizowania w krótkiej perspektywie czasowej. Niniejszy artykuł nie wyczerpuje w żadnym stopniu tematu i stanowi raczej wstęp do samych badań.

#### Literatura

- Ashby MF, Ferreira PJ, Schodek DL. *Material Classes, Structure, and Properties*. Nanomaterials, Nanotechnologies and Design. 2009; :87–146.
- From Definitions to Regulations of Medical devices and Materials - BIOMATDB [Internet]. [dostęp01.11.2025]. Dostępne na: <https://www.biomatdb.eu/2023/08/05/from-definitions-to-regulations-of-medical-devices-and-materials/>
- Wagner WR., Sakiyama-Elbert SE., Zhang Guigen, Yaszemski MJ.: *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press, an imprint of Elsevier; 2020. 1616 s.
- Badylak SF: Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 2004; 12(3–4):367–377.
- Faulk DM, Wildemann JD, Badylak SF: Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. *J Clin Exp Hepatol*. 2015; 5(1):69–80.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF: Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27(19):3675–3683.
- Faulk DM, Wildemann JD, Badylak SF: Decellularization and cell seeding of whole liver biologic scaffolds composed of extracellular matrix. *J Clin Exp Hepatol*. 2015; 5(1):69–80.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, i in.: Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine* 2008 14:2. 2008; 14(2):213–221.
- Moloney MP, Govan J, Loudon A, Mukhina M, Gun’ko YK: Preparation of chiral quantum dots. *Nature Protocols* 2015 10:4. 2015; 10(4):558–573.
- Jacques SL: Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol*. 2013; 58(11):R37.
- Bhatt M, Ayyalasomayajula KR, Yalavarthy PK: Generalized Beer–Lambert model for near-infrared light propagation in thick biological tissues. *J Biomed Opt*. 2016; 21(7):076012.
- LAMBERT JHEINRICH: *LAMBERTS PHOTOMETRIE: (photometria, sive de mensura et gradibusluminis, colorum et umbrae)...* (1760) [Internet]. WENTWORTH PRESS; 2018.
- Huang J, Ou Z: *Refractive Index Engineering: Insights from Biological Systems for Advanced Optical Design*. 2025; .
- Solouma N, Hamdy O: Ex Vivo Optical Properties Estimation for Reliable Tissue Characterization. *Photonics* 2023, Vol 10, Page 891. 2023; 10(8):891.
- Turbidity sensor SKU SEN0189 [Internet]. [dostęp24.11.2025]. Dostępne na: [https://wiki.dfrobot.com/Turbidity\\_sensor\\_SKU\\_SEN0189](https://wiki.dfrobot.com/Turbidity_sensor_SKU_SEN0189)
- opencv-python · PyPI [Internet]. [dostęp24.11.2025]. Dostępne na: <https://pypi.org/project/opencv-python/>
- Raspberry Pi Documentation [Internet]. [dostęp24.11.2025]. Dostępne na: <https://www.raspberrypi.com/documentation/>
- Pereira RHA, Prado AR, Caro LFC Del, Zanardo TÉC, Alencar AP, Nogueira BV: A non-linear mathematical model using optical sensor to predict heart decellularization

- efficacy. *Scientific Reports* 2019 9:1. 2019; 9(1):12211-.
20. Mora-Navarro C, Garcia ME, Sarker P, Ozpinar EW, Enders JR, Khan S, i in.: Monitoring decellularization via absorbance spectroscopy during the derivation of extracellular matrix scaffolds. *Biomed Mater.* 2021; 17(1):10.1088/1748-605X/ac361f.
21. Salgado García MG, Díaz NF, García López G, Álvarez Maya I, Hernández Jimenez C, Roman Maldonado Y, i in.: Evaluation methods for decellularized tissues: A focus on human amniotic membrane. *J Biosci Bioeng.* 2025; 139(2):85–94.
22. He C, He H, Chang J, Chen B, Ma H, Booth MJ: Polarisation optics for biomedical and clinical applications: a review. 2021.