

Д. Н. Садовский¹, Д. Ю. Ефимов¹, Е. А. Назарова¹,
Е. А. Примакова¹, А. А. Сыманович¹, Е. Г. Петровская¹,
А. М. Федорук¹, Д. А. Федорук¹, С. Н. Рябцева²,
С. И. Кривенко¹, А. Е. Щерба¹, О. О. Руммо¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАШИННОЙ ПЕРФУЗИИ ПРИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ НЕПРИГОДНОЙ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии,
трансплантологии и гематологии»¹
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»²

В настоящее время единственным методом, позволяющим заместить все функции печени, является органная трансплантация. Ввиду нехватки донорских органов, для временного замещения различных функций печени разрабатываются различные модели биоискусственной печени. Децеллюляризация непригодной для трансплантации печени от умершего донора является актуальной темой исследования. Приведены данные о технических особенностях подготовки печени к процессу децеллюляризации. Описан алгоритм получения бесклеточного матрикса печени человека и процесс проведения децеллюляризации с помощью устройства для динамической консервации донорских органов с последующей оценкой методом электронной микроскопии.

Ключевые слова: децеллюляризация печени, машинная перфузия, «скаффолд» печени человека.

*D. N. Sadowski, D. Y. Efimov, E. A. Nazarova, E. A. Primakova,
A. A. Simanovich, E. G. Petrovskaya, D. A. Fedoruk, A. M. Fedoruk,
S. N. Rjabceva, S. I. Krivenko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo*

MACHINE PERFUSION FOR DECELLULARIZATION OF UNSUITABLE FOR TRANSPLANTATION HUMAN LIVER

Currently, the only method that can replace all the liver functions is organ transplantation. Due to the donor organs shortage, various bioartificial liver models are being developed. Decellularization of a liver unsuitable for transplantation from a deceased donor is a challenging topic of research. Data on the technical features of the preparation of the liver for the process of decellularization are given. An algorithm for obtaining a cell-free matrix of the human liver and the process of decellularization using a device for dynamic conservation of donor organs with subsequent evaluation by electron microscopy are described.

Key words: decellularization of the liver, machine perfusion, human liver scaffold.

Печень человека является уникаль- тетическую, метаболическую и детоксика-
ным жизненно необходимым орга- ционную функции. Именно комплексность
ном, одновременно обеспечивающим син- функционирования печени человека как

органа создает значительные трудности для создания технологий по ее замещению у пациентов с печеночной недостаточностью [4, 5, 10]. Нарушение синтетической функции печени приводит к нарастанию коагулопатии, отсутствию детоксикационной функции к прогрессирующей энцефалопатии, повреждению нейронов, повышению внутричерепного давления и отеку головного мозга. Всё перечисленное обуславливает высокие цифры летальности пациентов с острой печеночной недостаточностью, достигающие 40–80 % [8]. Ключевым аспектом в лечении данной группы пациентов является невозможность протезирования всех функций печени (метаболической, детоксикационной, синтетической). На данный момент единственным методом, позволяющим адекватно заместить все функции печени, является органная трансплантация.

В мире параллельно с развитием органной трансплантации происходит разработка экстракорпоральных технологий «искусственной печени».

В настоящий момент в международных исследованиях особое внимание уделяется получению внеклеточного матрикса печени человека, который может быть повторно заселён клеточной культурой гепатоцитов. Каждый из трёх компонентов – каркас или «скаффолд», клетки, биохимические характеристики – имеют ключевое значение для функционирования конструкции [7].

Печень человека является уникальным жизненно необходимым органом, одновременно обеспечивающим синтетическую, метаболическую и детоксикационную функции. Именно комплексность функционирования печени человека как органа создает значительные трудности для создания технологий по ее замещению у пациентов с печеночной недостаточностью. Существует ряд вариантов экстракорпоральной биоискусственной печени, в которой бы сочетались культура клеток гепатоцитов и вне-

клеточный матрикс (в виде микросфер, наноприбрил, гидрогелей). Однако их клиническое применение ограничено [3, 6, 9, 11].

В настоящее время применяются различные методики машинной перфузии трансплантата печени и показаны определённые преимущества этого метода по сравнению со статической холодной ишемией [2]. В связи с этим использование машинной перфузии для децеллюляризации непригодной для трансплантации печени является актуальной темой исследования.

Цель работы. Выполнить децеллюляризацию непригодной к трансплантации донорской печени от умершего донора для получения аллогенного скаффолда с использованием машинной перфузии.

Материал и методы

При принятии решения о непригодности донорской печени для трансплантации во время выполнения операции по забору органов у умершего донора, печеночный графт эксплантируется по стандартной методике, упаковывается в пакеты (три стерильных пакета) с консервирующим раствором и помещается в термоизоляционный контейнер со льдом для сохранения в условиях статического холода. На операции «back-table» выполняется поэтапное разделение печени на правую долю и левый латеральный сектор (сегменты 2 и 3) с поэтапным клипированием и перевязкой сосудов, прошиванием желчных протоков, канюлируются долевыми печеночными артериями и ветви воротной вены. Для перфузии через воротную вену использовалась канюля для перфузии органов при эксплантации производства ПУП «ФреБор», имеющая двухпросветную и перфорированную структуру [1]. Для перфузии через печеночную артерию использовалась муфта инъекционная системы инфузионной ПР-01 однократного применения производства ПУП «ФреБор». В дальнейшем децеллюляризация осуществляется согласно разрабо-

танному алгоритму: печень промывается физиологическим раствором натрия хлорида 0,9 % в объеме 2 литра, после этого орган помещается в холодильную камеру с температурой $-18-22$ °С. После размораживания органа выполняется краевая биопсия (2 участка) для контрольного гистологического исследования. Затем печень помещается в резервуар устройства для машинной перфузии с подключением канюль к перфузионному контуру универсальной перфузионной системы.

Для децеллюризации печени от умершего донора использовалось устройство для динамической консервации органов, разработанное в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» совместно с ЗАО «СоларЛС» (рисунок 1). Устройство универсальное, используется для динамической консервации и перфузии печени, почек, поджелудочной железы в различных условиях.

Перфузия осуществляется с помощью насосов перистальтического типа с максимальным давлением в перфузионной линии печеночной артерии не более 120 мм рт. ст. Перфузия донорского органа сначала осуществляется дистиллированной водой в объеме 40–50 литров до изменения цвета эфлюента, затем орган перфузируется 10 литрами раствора 4 % «Тритон-Х» на протяжении 2 часов периодическим изменением с положения органа 1 раз в час при комнатной температуре. После орган промывается дистиллированной водой в объеме 50 литров с последующим помещением в холодильную камеру на 7 суток в специальном контейнере с дистиллированной водой, которая ежедневно обновляется. По истечении указанного времени, орган перфузируется раствором, содержащим ДНК-азу, кальция хлорид и магния хлорид, при температуре $37-38$ °С на протяжении 6–8 часов. По окончании процесса



Рисунок 1. Вид устройства для динамической консервации донорских органов

децеллюляризации печени человека выполняется биопсия для последующего гистологического анализа. В исследовании использовались 2 фрагмента донорской печени – 2 левых латеральных сектора.

Для электронной микроскопии взяты 6 участков печени: 3 контрольных и 3 опытных, до проведения децеллюляризации и после ее выполнения, соответственно. Образцы печени фиксировались в течение 24–48 часов при +4 °С в 2,5 % растворе глутарового альдегида, разбавленном в фосфатном буфере. Далее промывали буферным раствором трижды в течение 60 минут при +4 °С. Постфиксация 2 % тетроксидом осмия проводилась в течение не менее двух часов при +4 °С в защищённом от света месте. Затем образцы дегидратировали в двух порциях 96 °С этилового спирта и двух сменах ацетона и затем заключали в смесь эпоксидных смол. Полимеризацию блоков проводили в термостате при 37 °С в течение 2 суток и при 56 °С в течение 4 суток. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм изготавливали на ультрамикротоме RTPC PowerTome (RMC Воескелер, США).

Исследование одобрено на заседании независимого этического комитета ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» от 11.02.2022 № 1.

Результаты и обсуждение

После выполнения децеллюляризации непригодной для трансплантации донорской печени (двух фрагментов) с использованием машинной перфузии, получен скаффолд мягко-эластичной консистенции с неповрежденной капсулой, элементы сосудов и стромы в паренхиме контурируются на разной глубине от капсулы, паренхима имела оливковый цвет, артерии и вены левого латерального сектора упругие и эластичные, без повреждений. Результат децеллюляризации отражен на рисунках 2, 3.



Рисунок 2. Вид донорской печени (левый латеральный сектор) после разделения ее на операции «back-table» на сегменты 2–3 до децеллюляризации с канюлей для перфузии в ветви воротной вены



Рисунок 3. Вид сегментов 2–3 печени человека после децеллюляризации с использованием устройства для динамической консервации донорских органов

При электронной микроскопии получены следующие данные. Печеночная ткань контрольного образца характеризовалась сохранной ультраструктурой: гепатоциты формировали печеночные балки и желчные протоки, были разделены синусоидными капиллярами (рисунок 4).

В опытных образцах ткань печени была представлена соединительным каркасом

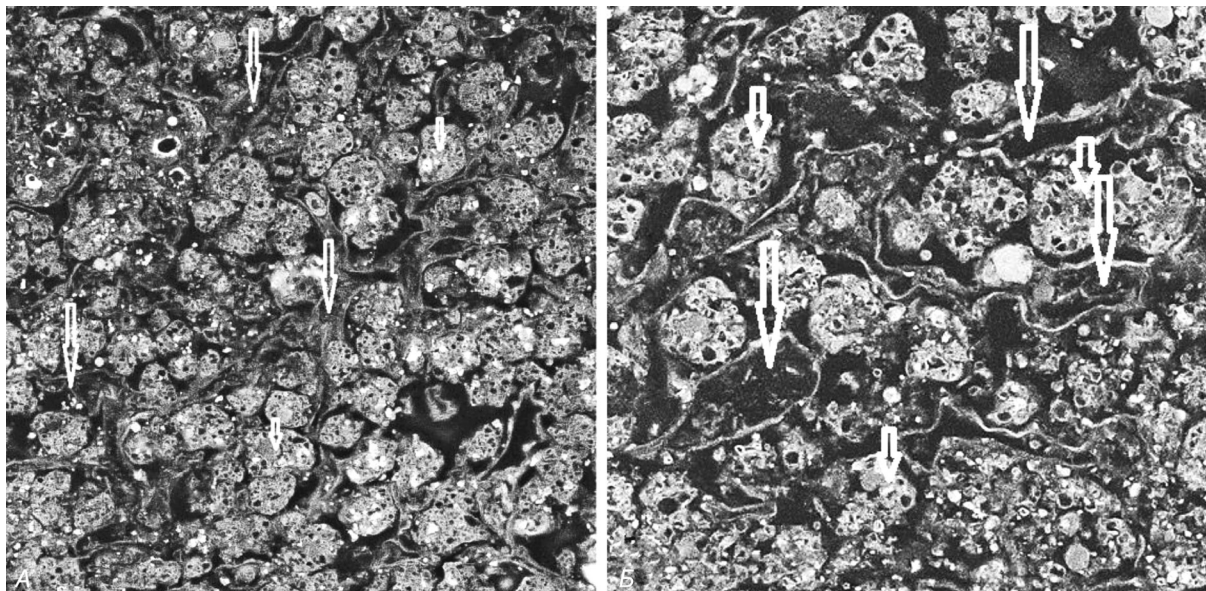


Рисунок 4. Ультраструктурная характеристика ткани печени контрольного образца: гепатоциты (короткие стрелки) печени контрольного образца разделены синусоидными капиллярами (длинные стрелки), увеличение $\times 1000,0$ (А), $\times 2500,0$ (Б), SEM (BSE), электроннограмма

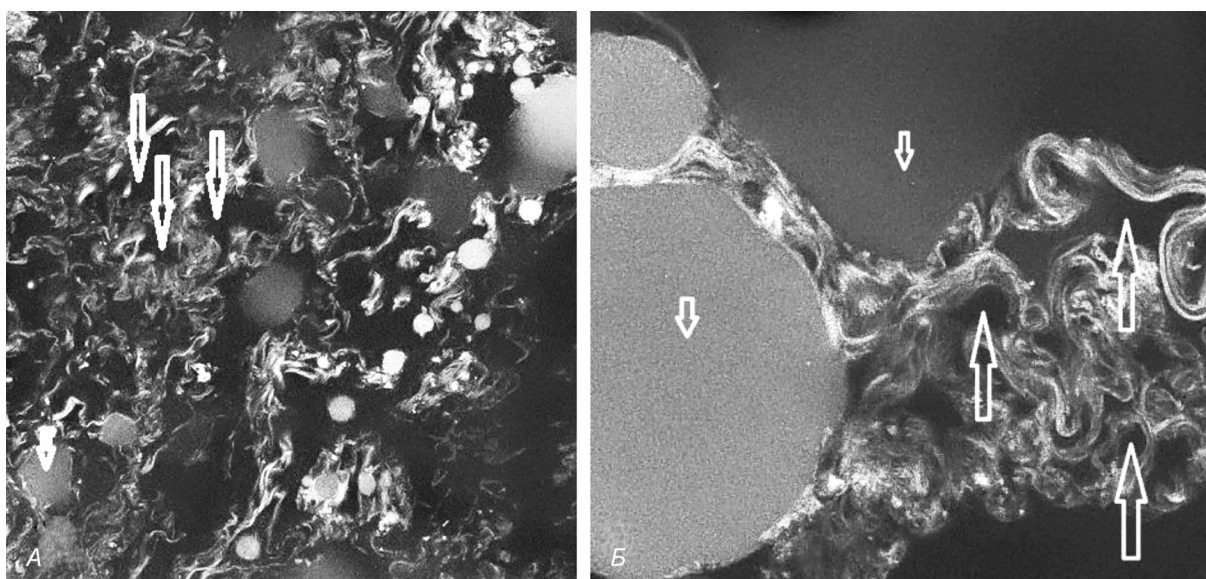


Рисунок 5. Ультраструктурная характеристика ткани печени опытного образца: клетки не определяются, между соединительнотканными волокнами выявлены белково-жировые капли (короткая стрелка), соединительнотканная строма печени формирует полости в виде соты-подобных структур (длинные стрелки), увеличение $\times 1000,0$ (А), $\times 3500,0$ (Б), SEM (BSE), электроннограмма

с белково-жировыми каплями (рисунок 5, А). Тонкие волокна соединительной ткани синусоидов печени переплетались друг с другом, формируя структуры напоминающие соты неправильной формы и размеров (рисунок 5, Б).

Таким образом, опытный образец печени после процесса децеллюляризации

с использованием устройства для динамической консервации донорских органов представлен соединительнотканым каркасом без клеточного компонента ткани печени.

На основе разработанного алгоритма децеллюляризации донорской печени непригодной к трансплантации проведена

машинная перфузия двух фрагментов печени (левый латеральный сектор), получены скаффолды оптимальных характеристик. Положительной характеристикой разработанного алгоритма с применением машинной перфузии при помощи устройства для динамической консервации донорских органов явилась возможность получения скаффолда без использования дополнительных вспомогательных устройств и в минимальный временной промежуток. Методом электронной микроскопии выполнена оценка в динамике и объективизирована эффективность процесса децеллюляризации с применением машинной перфузии. Так, на рисунках 4–5 показано оптимальное состояние скаффолда, который был представлен соединительнотканым каркасом без клеточного компонента ткани печени, что является положительным результатом и потенциалом для последующего заселения культурой клеток гепатоцитов.

Таким образом, поиск методов лечения пациентов с острой печеночной недостаточностью путем разработки и создания экстракорпоральных методов, включающих в себя биоинженерную печень, является важной медицинской научной задачей, решение которой позволит оптимизировать применение современных трансплантационных технологий, снизить госпитальную летальность и повысить выживаемость пациентов с данной патологией. Непригодные для трансплантации и невосстребованные в клинической практике печеночные графты от умерших доноров являются оптимальным ресурсом для создания аллогенного децеллюляризованного внеклеточного матрикса печени человека, имеющего значительный потенциал для использования в качестве скаффолда для целей тканевой инженерии или регенеративной медицины. Разработан алгоритм децеллюляризации печени человека с применением машинной перфузии, позволяющий в ми-

нимимальный временной промежуток получить бесклеточный матрикс оптимальных характеристик.

Литература

1. *Канюля* для перфузии органа при эксплантации: пат. 18199 Респ. Беларусь, МПК А61М31/00 / Д. Н. Садовский, О. В. Калачик; дата публ.: 30.04.2014.
2. Федорук, А. М. Перфузионное кондиционирование аллографтов печени и почек / А. М. Федорук // *Новости хирургии*. – 2018. – № 2. – С. 215–225.
3. *Badylak, S. F. et al. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds // Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2011. – Vol. 13. – P. 27–53.
4. *Baptista, P. M. et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid // Hepatology*. – 2011. – Vol. 53. – P. 604–617.
5. *Crapo, P. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / M. P. Crapo, W. T. Gilbert, F. S. Badylak // Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 3233–43.
6. *Eshmuminov, D. et al. An integrated perfusion machine preserves injured human livers for 1 week // Nature biotechnology*. – 2020. – Vol. 38 (2). – P. 189–198.
7. *Griffith, L. G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities / L. G. Griffith, G. Naughton // Science*. – 2002, – Vol. 295. – P. 1009–1014.
8. *Shah, N. J. Acute Liver Failure / N. J. Shah, A. Royer, J. Savio // StatPearls Publishing*. – 2021.
9. *Rimland, C. A. et al. Regional differences in human biliary tissues and corresponding *in vitro* derived organoids // Hepatology*. – 2020. – P. 247–267.
10. *Willemse, J. et al. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 31. – P. 151–159.
11. *Willemse, J. et al. Scaffolds obtained from decellularized human extrahepatic bile ducts support organoids to establish functional biliary tissue in a dish // Biotechnology and Bioengineering*. – 2021. – Vol. 118 (2). – P. 836–851.

References

1. *Kanyulya dlya perfuzii organa pri eksplantacii: pat. 18199 Resp. Belarus', MPK A61M31/00 / D. N. Sadovskij, O. V. Kalachik; data publ.: 30.04.2014.*

2. Fedoruk, A. M. Perfuzionnoe kondicionirovanie allograftov pecheni i pochek / A. M. Fedoruk // *Novosti hirurgii*. – 2018. – № 2. – S. 215–225.
3. Badylak, S. F. et al. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2011. – Vol. 13. – P. 27–53.
4. Baptista, P. M. et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53. – P. 604–617.
5. Crapo, P. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / M. P. Crapo, W. T. Gilbert, F. S. Badylak // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 3233–43.
6. Eshmuminov, D. et al. An integrated perfusion machine preserves injured human livers for 1 week // *Nature biotechnology*. – 2020. – Vol. 38 (2). – P. 189–198.
7. Griffith, L. G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities / L. G. Griffith, G. Naughton // *Science*. – 2002. – Vol. 295. – P. 1009–1014.
8. Shah, N. J. Acute Liver Failure / N. J. Shah, A. Royer, J. Savio // *StatPearls Publishing*. – 2021.
9. Rimland, C. A. et al. Regional differences in human biliary tissues and corresponding *in vitro* derived organoids // *Hepatology*. – 2020. – P. 247–267.
10. Willemse, J. et al. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. – 2017, – Vol. 31. – P. 151–159.
11. Willemse, J. et al. Scaffolds obtained from decellularized human extrahepatic bile ducts support organoids to establish functional biliary tissue in a dish // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2021. – Vol. 118 (2). – P. 836–851.

Поступила 18.09.2023 г.