

DOI: <https://doi.org/10.51922/2074-5044.2024.3.23>

Е. А. Примакова¹, Д. Ю. Ефимов¹, Д. Н. Садовский¹, Е. А. Назарова¹,
А. А. Сыманович¹, Е. Г. Юркина¹, И. А. Романова¹, Н. И. Дедюля¹,
А. И. Куреева², С. И. Кривенко¹, А. Е. Щерба¹, О. О. Руммо¹

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии,
трансплантологии и гематологии»¹

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»²

На сегодняшний день в мире для терапии терминальной стадии печеночной недостаточности параллельно с органной трансплантацией активно ведется разработка технологий создания «биоискусственной печени». Такие тканеинженерные конструкции, полученные методом девитализации, могут сохранять как нативную структуру, так и трехмерную архитектуру печени, гарантируя биосовместимость для последующей рецеллюляризации. Однако важно соблюсти баланс между удалением клеток и сохранением качества экстрацеллюлярного матрикса, так как чрезмерная девитализация может привести к деградации микроархитектуры скаффолда. Целью настоящего исследования явилась оценка качества проведенной перфузионной децеллюляризации печени человека, а также возможность рецеллюляризации полученного бесклеточного матрикса.

Разработанный алгоритм децеллюляризации печени человека с применением машинной перфузии позволяет в минимальный временной промежуток получить бесклеточный матрикс, который соответствует основным критериям контроля качества (отсутствие клеточного компонента, минимальное содержание остаточной ДНК в ткани, сохранность внеклеточного матрикса, стерильность, отсутствие цитотоксического эффекта).

Ключевые слова: децеллюляризация, бесклеточный матрикс печени человека, цитотоксичность.

E. A. Primakova, D. Y. Efimov, D. N. Sadowski, E. A. Nazarova,
A. A. Symanovich, E. G. Yurkina, I. A. Romanova, N. I. Dedyulia, A. I. Kireeva,
S. I. Krivenko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo

THE QUALITY AND CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF THE ACELLULAR HUMAN LIVER SCAFFOLD AFTER DECELLULARIZATION

Currently the technologies for the treatment of liver failure to create a “bioartificial liver” are actively being developed in a parallel with the organ transplantation. Such tissue-engineered constructs obtained by devitalization can preserve both the native structure and the three-dimensional architecture of the liver, ensuring biocompatibility for subsequent recellularization. However, it is important to maintain a balance between cell removal and the quality of the extracellular matrix, since excessive devitalization can lead to degradation of the scaffold microarchitecture. Thus, the aim of the study was to assess the quality of the human liver scaffold after machine decellularization process.

The developed algorithm for decellularization of the human liver using machine perfusion makes it possible to obtain an acellular matrix in a minimum time period, which meets the main quality control criteria (absence of a cellular component, minimal content of residual DNA in the tissue, preservation of the extracellular matrix, sterility, absence of a cytotoxic effect).

Key words: decellularization, human liver scaffold, cytotoxicity.

В настоящий момент наиболее эффективным методом лечения как декомпенсированных хронических заболеваний печени, так и острой печеночной недостаточности

является трансплантация печени [1]. Однако все возрастающее количество пациентов в листах ожидания и нехватка качественных донорских органов заставляет исследователей

разрабатывать экстракорпоральные технологии «искусственной печени» [1–3]. Предложен ряд вариантов экстракорпоральной биоискусственной печени, в которой бы сочетались культура клеток гепатоцитов и внеклеточный матрикс (в виде микросфер, нанофибрилл, гидрогелей). Однако их клиническое применение крайне ограничено [2]. Многие исследования показали возможность децеллюляризации печени мелких животных, например, грызунов [3, 4]. Однако, об эффективных процедурах децеллюляризации печени больших размеров, которые потенциально могут быть использованы в клинических целях, сообщается реже [5, 6]. 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.

Непригодные для трансплантации и невозможные в клинической практике печеночные графты являются оптимальным ресурсом для создания аллогенного децеллюляризованного внеклеточного матрикса печени человека, однако важно соблюсти баланс между удалением клеток и сохранением качества матрикса, так как чрезмерная девитализация может привести к деградации микроархитектуры скаффолда.

Различные методы девитализации, которые применяются для получения бесклеточных матриксов, могут влиять на последующую рецеллюляризацию скаффолдов. Эти эффекты могут быть обусловлены не только изменениями в структуре и составе самого скаффолда, происходящими в результате девитализации, но и присутствием остаточного количества детергентов, которые широко применяются в данном процессе. Так Гратцер и соавт. обнаружили, что уровень репопуляции и жизнеспособности клеток при ревитализации скаффолда были одинаковыми независимо от метода девитализации и уровня остаточной ДНК в тканях. Полученные ими данные свидетельствовали о том, что использование SDS (додецил сульфат натрия) в качестве детергента приводит к низкой клеточной репопуляции девитализованного скаффолда [7]. Похожие резуль-

таты были получены Ридером и соавт. Они показали, что рецеллюляризация скаффолдов, полученных с использованием SDS, не эффективна из-за токсического воздействия данного ионного детергента, тогда как скаффолды, полученные с использованием 0,25% TritonX-100 в сочетании с дезоксихолатом натрия были успешно рецеллюляризованы [8].

Так как успешная девитализация достигается лишь сочетанием нескольких методов, включая заморозку/разморозку ткани, а также использованием различных ионных детергентов, ферментов, кислот и их комбинаций, возникает необходимость оценки цитотоксичности полученного скаффолда для оценки пригодности к последующей рецеллюляризации [9].

Даже остаточное количество детергента в скаффолде может иметь потенциальный цитотоксический эффект на клетки после рецеллюляризации, оказывая влияние на их жизнеспособность и долгосрочную дифференцировку [10]. Кроме того, в процессе девитализации детергент может связываться с липидами, образуя нерастворимые комплексы. Как показало исследование *in vitro*, при неполном удалении данных комплексов они могут оказывать потенциальное цитотоксическое действие, из-за чего засеянные клетки не прикрепляются к матриксу [8, 11].

Одним из самых распространенных способов оценки способности девитализованного матрикса поддерживать клеточный рост, является культивирование клеток в его присутствии. Данный метод используется в качестве простого исследования цитотоксичности в течение короткого периода времени *in vitro*. Если клетки погибают в течение первых нескольких дней, то процесс ревитализации будет неэффективным.

Ранее был разработан алгоритм перфузионной децеллюляризации печени человека с применением устройства для динамической консервации органов, разработанное в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» совместно с ЗАО «СоларЛС» [12]. Положительной характеристикой разработанного алгоритма с применением машинной перфузии явилась возможность получения скаффолда оптимальных характеристик без использования дополнительных вспомогательных устройств и в минимальный временной промежуток.

Цель работы. Оценить качество проведенной перфузионной децеллюляризации печени человека, а также возможность рецеллюляризации полученного бесклеточного матрикса.

Материал и методы

Материалом для оценки качества проведенной перфузионной децеллюляризации явились 2 образца бесклеточного матрикса целой печени человека, полученных согласно описанного ранее алгоритма [12]. Суть процесса децеллюляризации заключалась в следующем: после принятия решения о непригодности донорской печени для трансплантации во время выполнения операции по забору органов у умершего донора, печеночный графт эксплантировался по стандартной методике, печень промывалась физиологическим раствором натрия хлорида 0,9 % и затем помещалась в холодильную камеру с температурой минус 18 – минус 22 °С; после размораживания печень помещалась в резервуар устройства для машинной перфузии с подключением канюль к перфузионному контуру универсальной перфузионной системы с насосами перистальтического типа с максимальным давлением в перфузионной линии печеночной артерии не более 120 мм. рт. ст. После длительной непрерывной перфузии донорского органа дистиллированной водой и 4 % раствором «Тритон-Х-100» с периодическим изменением положения, орган помещался в холодильную камеру на 7 суток в специальном контейнере с дистиллированной водой, которая ежедневно обновлялась. По истечении указанного времени орган перфузировался раствором, содержащим ДНК-азу, хлорид кальция и хлорид магния, при температуре 37–38 °С на протяжении 6–8 часов.

Эффективность девитализации оценивалась методом электронной сканирующей микроскопии, морфологическим исследованием, методом определения остаточной ДНК в экстрацеллюлярном матриксе (выделение геномной ДНК из ткани печени на колонках), а также методом оценки цитотоксичности скаффолда на приборе прижизненной визуализации IncuCyte S3 (Sartorius, США).

Определение остаточной ДНК в экстрацеллюлярном матриксе (выделение геномной ДНК из ткани печени на колонках).

Выделение геномной ДНК из тканей печени проводили набором GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, США). Для этого 20 мг гомогенизированной ткани печени (нативная $n = 6$, девитализированная $n = 2$) обрабатывали раствором протеиназы К и РНКазы А. Лизат переносили в колонку для очистки геномной ДНК GeneJET. После нескольких циклов центрифугирования очищенную ДНК использовали для определения её концентрации с помощью набора AccuBlue™ Broad Range dsDNA Quantitation Kits with 9 DNA Standards (Biotium, Inc., США). Концентрацию измеряли по флуоресценции образцов и стандартов ДНК с помощью микропланшетного ридера с длиной волны возбуждения 350 нм/эмиссией 460 нм. Концентрация остаточной ДНК показана в 50 мкл элюированной ДНК.

Оценка цитотоксичности скаффолда на приборе прижизненной визуализации IncuCyte S3 (Sartorius, США).

Для оценки цитотоксичности девитализированного матрикса и пригодности его к ревитализации использовали культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани. Для этого МСК ЖТ высевали в 24-луночные культуральные планшеты. По достижению клетками 60 % конфлюэнтности, 2 небольших фрагмента 3×4 мм девитализированного матрикса (1 – капсула печени, 2 – паренхима) были внесены в лунки. Контрольные лунки не содержали фрагментов девитализированной печени. Цитотоксичность оценивали по апоптозу МСК ЖТ в культуре, а также по скорости образования монослоя. Оценка проводилась с использованием системы прижизненной клеточной визуализации IncuCyte S3 (США) и программного обеспечения IncuCyte 2020A.

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 парен-

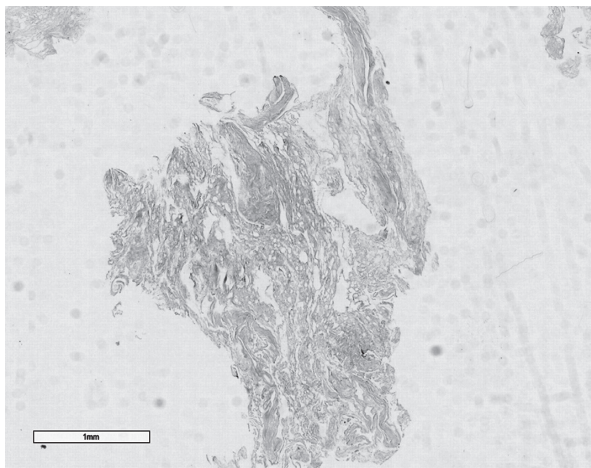


Рис. 1. Гистологическая картина донорской печени после завершения процесса децеллюляризации: ткань печени с волокнами матрикса, портальными трактами, окраска гематоксилин-эозин, × 100

химе контурируются на разной глубине от капсулы, паренхима имела оливковый цвет, артерии и вены левого латерального сектора упругие и эластичные, без повреждений (рис. 1).

В результате анализа было установлено, что девитализированные фрагменты печени не только не замедляли образование монослоя в культуре, но и через 24 часа даже стимулировали клеточный рост в культуре. На рис. 2 представлен график образования монослоя в контроле и эксперименте с матриксом.

Количество апоптотических клеток в культурах МСК ЖТ при добавлении фрагментов девитализированной печени спустя 24 часа также было существенно меньше, чем в контроле. Апоптотические клетки окрашивались при взаимодействии с реагентом «Annexin V Green Reagent for Apoptosis» в зеленый цвет (рис. 3).

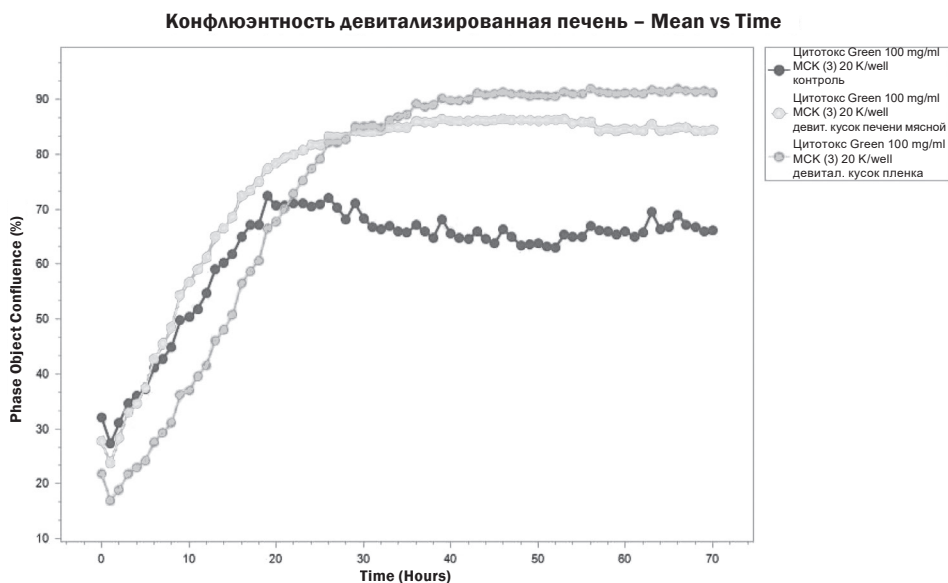
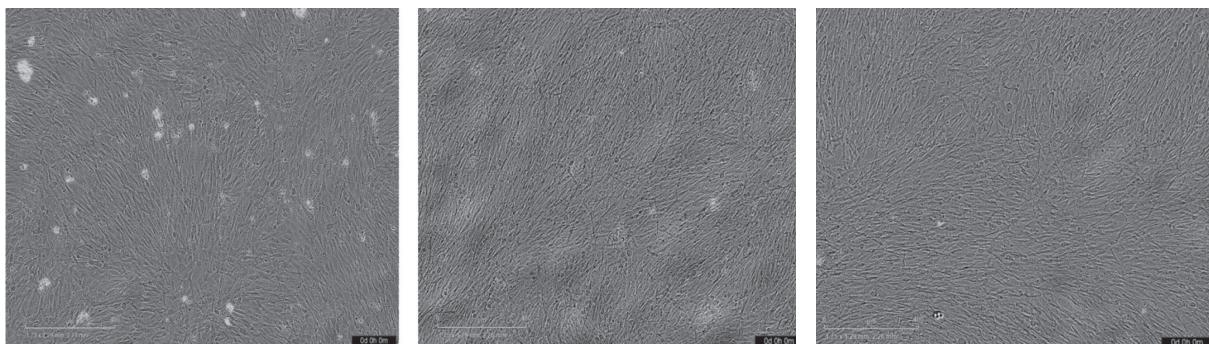


Рис. 2. Конфлюэнтность в культурах МСК в течение 70 часов с девитализированным матриксом



а) контроль

б) с добавлением фрагмента девитализированной капсулы печени

в) с добавлением фрагмента девитализированной паренхимы печени

Рис. 3. Апоптоз МСК ЖТ в культурах с добавлением фрагментов девитализированной печени спустя 24 часа

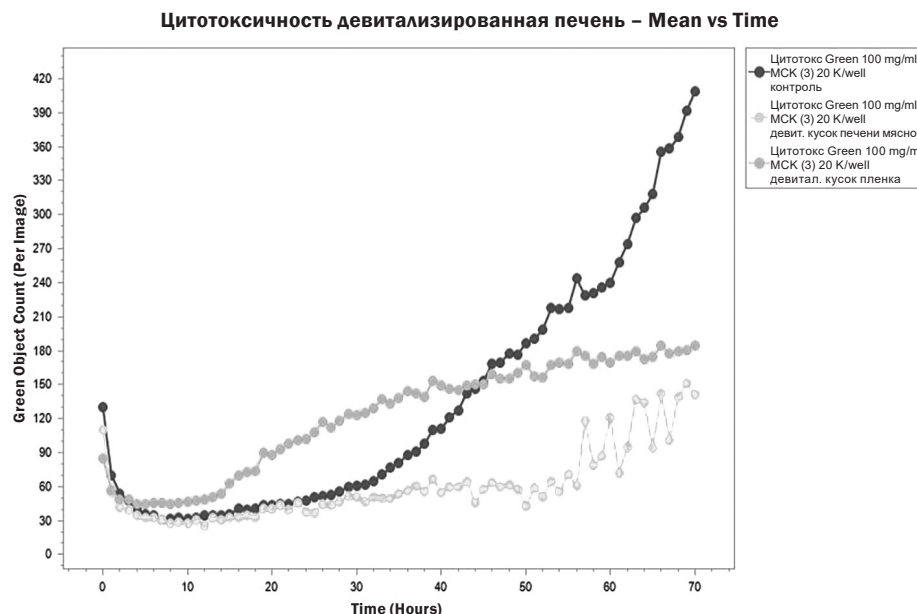


Рис. 4. Апоптотическая активность мезенхимальных стволовых клеток в различных условиях в динамике за 70 часов

Изменение апоптотической активности МСК ЖТ в динамике за 70 часов в культурах с фрагментами матрикса и контроле представлено на рис. 4, на котором зафиксирована статистически значимо более низкая апоптотическая активность МСК жировой ткани в присутствии бесклеточного матрикса печени человека в сравнении со стандартной средой. Девитализированный скаффолд был не только не цитотоксичен (за 48 часов МСК достигали 90 % конфлюэнтности в его присутствии, в контроле – 67 %), но и стимулировал клеточный рост; количество нежизнеспособных клеток через 48 часов, подсчитанных программой на 1 изображение было в 3 раза меньше в присутствии скаффолда (50 по сравнению со 150 в контроле). Таким образом, полученный девитализированный фрагмент печени не является цитотоксичным в отношении мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и может быть использован для последующей ревитализации *in vitro*.

При определении концентрация остаточной ДНК в исследуемой группе и контрольных образцах печени установлено, что в девитализированных печеночных скаффолдах последняя была значительно ниже, чем в нативной печени и составила 3,3 нг/мкл и 3,7 нг/мкл по сравнению с 70,885 нг/мкл в группе контроля (рис. 5). Что подтверждает то, что опытный образец печени после процесса децеллюляри-

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

По результатам изложенных исследований выполнена оценка качества проведенной перфузионной децеллюляризации печени человека, на основании которой можно сделать следующие выводы: а) при гистологическом исследовании с окрашиванием гематоксилин-эозином девитализированного скаффолда регистрировалось практически полное удаление клеточного компонента из нативной ткани без повреждения экстрацеллюлярного матрикса; б) концентрация остаточной ДНК в девитализированных печеночных скаффолдах была значительно (более чем в 20 раз, а также ниже



Рис. 5. Определение остаточной ДНК в образцах печени (нативная и после перфузионной машинной децеллюляризации)

необходимого порогового значения) по сравнению с контролем; в) девитализированный скаффолд был не только не цитотоксичен, но и стимулировал клеточный рост, бактериологический посев был стерилен.

Таким образом, непригодные для трансплантации и не востребуемые 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. Разработанный алгоритм децеллюляризации печени человека с применением машинной перфузии позволяет в минимальный временной промежуток получить бесклеточный матрикс, который соответствует основным критериям контроля качества (отсутствие клеточного компонента, минимальное содержание остаточной ДНК в ткани, сохранность внеклеточного матрикса, стерильность, отсутствие цитотоксического эффекта). Децеллюляризованный с применением данного алгоритма скаффолд может быть использован для создания тканеинженерной конструкции на его основе.

Литература

1. *Blachier, M.* [et al]. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – № 3. – P. 593–608.
2. *Lanza, R.* [et al]. Engineering universal cells that evade immune detection // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – № 19. – P. 723–733.
3. *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. – P. 836–851. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.27613>.
4. *Toprakhisar, B.; Verfaillie, C.M.; Kumar, M.* Advances in Recellularization of Decellularized Liver Grafts with Different Liver (Stem) Cells: Towards Clinical Applications // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 301. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12020301>.
5. *De Kock, J.* [et al]. Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bio-engineering tool? // *Arch Toxicol*. – 2011. – Vol. 85. – P. 607.
6. *Hillebrandt, K.* [et al]. Strategies based on organ decellularization and recellularization // *Transplant International*. – 2019. – Vol. 32. – P. 571–585. DOI: <https://doi.org/10.1111/tri.13462>.
7. *Gratzer, P. F., Harrison, R.D., Woods T.* Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix // *Tissue Eng*. – 2006. – Vol. 12. – № 10. – P. 2975–2983.
8. *Rieder, E.* [et al]. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2004. – Vol. 127. – № 2. – P. 399–405. DOI: [10.1016/j.jtcvs.2003.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.06.017).

9. *Timothy, J.* [et al]. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance // *Methods*. – 2015. – Vol. 84. – P. 25–34.

10. *Geerts, S.* [et al]. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2015. – Vol. 22. – P. 671–678.

11. *Ansari, T.* [et al]. Development and characterisation of a Porcine Liver Scaffold. *Stem Cells and Development* // *Stem Cells Dev*. – 2020. – Vol. 29. – № 5. – P. 314–326. DOI: [10.1089/scd.2019.0069](https://doi.org/10.1089/scd.2019.0069).

12. *Садовский Д. Н., Ефимов Д. Ю., Назарова Е. А., Примасова Е. А., Сыманович А. А., Петровская Е. Г., Федорук А. М., Федорук Д. А., Рябцева С. Н., Кривенко С. И., Щерба А. Е., Руммо О. О.* / Использование машинной перфузии при децеллюляризации непригодной для трансплантации печени человека для создания бесклеточного матрикса // *Медицинский журнал* № 4 (86) / 2023С. 114–120. DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2023.4.114>.

References

1. *Blachier, M.* [et al]. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – № 3. – P. 593–608.
2. *Lanza, R.* [et al]. Engineering universal cells that evade immune detection // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – № 19. – P. 723–733.
3. *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. – P. 836–851. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.27613>.
4. *Toprakhisar, B.; Verfaillie, C.M.; Kumar, M.* Advances in Recellularization of Decellularized Liver Grafts with Different Liver (Stem) Cells: Towards Clinical Applications // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 301. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12020301>.
5. *De Kock, J.* [et al]. Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bio-engineering tool? // *Arch Toxicol*. – 2011. – Vol. 85. – P. 607.
6. *Hillebrandt, K.* [et al]. Strategies based on organ decellularization and recellularization // *Transplant International*. – 2019. – Vol. 32. – P. 571–585. DOI: <https://doi.org/10.1111/tri.13462>.
7. *Gratzer, P. F., Harrison, R.D., Woods T.* Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix // *Tissue Eng*. – 2006. – Vol. 12. – № 10. – P. 2975–2983.
8. *Rieder, E.* [et al]. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2004. – Vol. 127. – № 2. – P. 399–405. DOI: [10.1016/j.jtcvs.2003.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.06.017).
9. *Timothy, J.* [et al]. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance // *Methods*. – 2015. – Vol. 84. – P. 25–34.
10. *Geerts, S.* [et al]. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2015. – Vol. 22. – P. 671–678.
11. *Ansari, T.* [et al]. Development and characterisation of a Porcine Liver Scaffold. *Stem Cells and Development* // *Stem Cells Dev*. – 2020. – Vol. 29. – № 5. – P. 314–326. DOI: [10.1089/scd.2019.0069](https://doi.org/10.1089/scd.2019.0069).
12. *Sadovskij D. N., Efimov D. Yu., Nazarova E. A., Primakova E. A., Symanovich A. A., Petrovskaya E. G., Fedoruk A. M., Fedoruk D. A., Ryabceva S. N., Krivenko S. I., SHCHerba A. E., Rummo O. O.* / Ispol'zovanie mashinnoj perfuzii pri decellyulyarizacii neprigodnoj dlya transplantacii pečeni cheloveka dlya sozdaniya beskletchnogo matriksa // *Medicinskij zhurnal* № 4 (86) / 2023S. 114–120. DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2023.4.114>.

Поступила 12.03.2024