

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“LA DECELLULARIZZAZIONE DI ORGANI SOLIDI:
IL CASO DEL FEGATO”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Sara Costalonga

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 28/09/2023

Indice

Abstract	pagina 4
Introduzione	pagina 5
Capitolo 1: Anatomia del fegato	pagina 7
1.1 Anatomia generale del fegato	pagina 7
1.1.1 Lobi del fegato	pagina 8
1.1.2 Segmenti epatici	pagina 8
1.1.3 Vasi	pagina 9
1.2 Anatomia microscopica del fegato	pagina 10
1.2.1 Tratti portalì	pagina 11
1.2.2 Sinusoidi	pagina 11
1.2.3 Epatociti	pagina 12
1.2.4 Spazio di Disse	pagina 13
1.2.5 Dotti e canalicoli biliari	pagina 13
1.2.6 Vascolarizzazione e innervazione	pagina 14
1.3 La matrice extracellulare epatica	pagina 15
1.3.1 Morfologia e distribuzione dei componenti della ECM	pagina 15
Capitolo 2: Decellularizzazione	pagina 19
2.1 Metodi fisici	pagina 19
2.1.1 Sonicazione	pagina 19
2.1.2 Cicli di congelamento-scongelo	pagina 20
2.2 Metodi chimici	pagina 20
2.2.1 Detergenti chimici	pagina 20
2.2.2 Soluzioni ipertoniche e isotoniche	pagina 22
2.2.3 Acidi e basi	pagina 22
2.2.4 Alcoli	pagina 22
2.2.5 Agenti chelanti	pagina 23
2.2.6 Immersione e agitazione in reagenti	pagina 23
2.3 Trattamenti enzimatici	pagina 23
2.4 Combinazione dei metodi e valutazione della ECM decellularizzata	pagina 24
2.4.1 Combinazione dei metodi	pagina 24
2.4.2 Valutazione della decellularizzazione	pagina 25

Capitolo 3: Ripopolamento dello scaffold	pagina 28
3.1 Ripopolamento parenchimale: gli epatociti primari	pagina 29
3.2 Ripopolamento parenchimale: cellule staminali e cellule progenitrici	pagina 29
3.2.1 Cellule fetali	pagina 30
3.2.2 Cellule staminali pluripotenti indotte umane	pagina 31
3.2.3 Cellule staminali mesenchimali	pagina 32
3.2.4 Conclusioni sui diversi tipi di cellule	pagina 32
3.3 Rigenerazione vascolare	pagina 33
3.3.1 Cellule endoteliali macrovascolari	pagina 34
3.3.2 Cellule endoteliali sinusoidali epatiche	pagina 34
3.4 Co-coltura di cellule parenchimali e non parenchimali	pagina 35
Capitolo 4: Principali problematiche da affrontare	pagina 36
4.1 Trombogenicità	pagina 36
4.1.1 Eparinizzazione vascolare	pagina 37
4.2 Anoikis	pagina 38
4.3 Immunogenicità	pagina 39
4.3.1 Genipina e glutaraldeide	pagina 40
4.3.2 Scarsità di fegati umani	pagina 40
4.4 Considerazioni finali	pagina 41
Conclusioni	pagina 42
Bibliografia	pagina 44

Abstract

Il trapianto di fegato è l'unica terapia per molte gravi patologie epatiche, che colpiscono ogni anno sempre più persone. Tuttavia, il divario tra il numero di organi disponibili per il trapianto e il numero di pazienti in lista d'attesa, oltre alle limitazioni legate all'incompatibilità immunologica, sottolinea la necessità di terapie alternative. Tra gli approcci emergenti, si sta facendo sempre più strada l'ingegnerizzazione di organi interi: il ripopolamento di scaffold decellularizzati di fegato offre una soluzione promettente alle limitazioni del trapianto tradizionale, consentendo una disponibilità affidabile e tempestiva di organi.

La decellularizzazione è un processo che permette di eliminare completamente il materiale cellulare, inclusi i nuclei delle cellule, da un tessuto o da un organo biologico, lasciando intatta la matrice extracellulare. Si ottiene così uno scaffold biologico acellulare, che può essere utilizzato come supporto per il successivo processo di ricellularizzazione, mediante il quale si reintroducono cellule vitali, parenchimali e non parenchimali, in modo da ripristinare la funzionalità dell'organo.

Questa tesina comprende un'analisi approfondita della struttura anatomica del fegato e della composizione della sua matrice extracellulare. L'attenzione si sposta successivamente sui metodi e i protocolli utilizzati per la decellularizzazione dell'organo, sulla varietà di cellule che vengono impiantate durante il processo di ripopolamento, presentando infine i principali ostacoli riguardanti la compatibilità del neo-fegato.

Introduzione

Il fegato è l'organo interno più grande nel corpo umano. Oltre a funzioni vitali come la sintesi delle proteine, la detossificazione del sangue e la biotrasformazione dei farmaci, ha una notevole capacità rigenerativa. Il lavoro di epatociti, cellule non parenchimali del fegato e matrice extracellulare circostante (ECM) mantiene queste funzioni metaboliche nelle normali condizioni di omeostasi. Tuttavia, le lesioni epatiche esterne come le infezioni virali, i farmaci tossici, l'abuso prolungato di alcol e alcuni disturbi metabolici e genetici possono interrompere l'omeostasi del fegato. Quando tali lesioni epatiche persistenti superano la capacità rigenerativa del fegato, si giunge all'inizio della degenerazione epatica progressiva. La degenerazione epatica progressiva si verifica a seguito di danni cronici o danni acuti, che possono causare insufficienza epatica. La successiva perdita di funzione, definita malattia epatica in fase terminale (End-Stage Liver Disease, ESLD), provoca due milioni di morti all'anno in tutto il mondo, ammontando al 4% di morti globali [1]. Inoltre, a causa della continua crescita mondiale di casi di obesità, che provoca la steatoepatite non alcolica (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH) e la relativa steatoepatite non alcolica associata, è possibile che il tasso di mortalità epatica aumenti nei prossimi anni.

Oltre all'alta mortalità, le malattie epatiche in fase terminale causano una varietà di morbosità extraepatiche, riducono la qualità della vita e gravano sul sistema sanitario in tutto il mondo.

Sebbene siano stati sviluppati diversi farmaci candidati per invertire e/o prevenire la progressione della degenerazione epatica, non esiste ancora un trattamento approvato per contrastare questi processi [2]. La mancanza di farmaci efficaci lascia come unica terapia per i pazienti con ESLD il trapianto d'organo completo, procedura che presenta in sé numerose limitazioni. Purtroppo, questa opzione è limitata solo a una piccola frazione di pazienti a causa della scarsità di organi da donatori disponibili (dati recenti affermano che la richiesta di fegati trapiantabili, in alcuni Stati, è quasi tre volte superiore al numero di trapianti effettuati [3]) e dell'incompatibilità immunologica dopo il trapianto. Inoltre, molti pazienti muoiono quando sono ancora in lista d'attesa per il trapianto, attestando un bisogno crescente di sviluppo di terapie alternative nel campo della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale. Ciò include strategie come sistemi di supporto epatico esterno, trapianto di cellule, impianti tridimensionali di mini-tessuti e, soprattutto, l'ingegnerizzazione di interi organi [4]. Quest'ultimo è un approccio emergente che mira a generare organi completamente funzionali, clinicamente rilevanti e impiantabili ex vivo. La novità di questo approccio sta nel fatto che gli organi nativi provenienti da una fonte xenogenica (come maiali, pecore e bovini) o allogena possono essere

privati delle cellule ospiti attraverso tecniche di decellularizzazione, lasciandone solo la struttura tridimensionale della matrice extracellulare dell'organo da donatore. I metodi di decellularizzazione includono metodi fisici (sonicazione, cicli di congelamento-scongelo), metodi chimici (detergenti, soluzioni ipertoniche e isotoniche, acidi e basi, alcoli, agenti chelanti, e immersioni e agitazioni in reagenti) e trattamenti enzimatici, o una combinazione di questi.

La struttura tridimensionale rimanente contiene componenti specifici della matrice extracellulare dell'organo, fattori di crescita, nonché una rete vascolare e una microarchitettura che possono fungere da ottimo ambiente per l'insediamento, la proliferazione e il mantenimento delle cellule specifiche dell'organo [5,6]. Gli scaffold decellularizzati vengono, infatti, ripopolati con epatociti primari, cellule endoteliali e cellule staminali, in modo da sviluppare nuovi fegati che possono essere trapiantati nei pazienti affetti da malattie epatiche in fase terminale per sostituire i fegati decompensati originali [7].

Questa tesina analizza la struttura anatomica del fegato e la composizione della sua matrice extracellulare, esaminando inoltre i metodi di decellularizzazione, il ripopolamento dello scaffold epatico con diverse cellule e le principali problematiche ad essi associate. Gli argomenti trattati forniscono una visione d'insieme delle ricerche attuali nel campo della medicina rigenerativa epatica.

Capitolo 1: Anatomia del fegato

1.1 Anatomia generale del fegato

Il fegato è l'organo interno più ampio del corpo umano e, in media, ha una massa di 1500 grammi. È notevolmente vascolarizzato; in qualunque momento, contiene approssimativamente il 25 % della gittata cardiaca totale.

Il fegato è posizionato nel quadrante destro superiore dell'addome (occupa quasi interamente l'ipocondrio destro, una gran parte dell'epigastrio e l'ipocondrio sinistro fino alla linea mammaria) ed il suo lobo destro è quasi interamente protetto dai traumi dalla gabbia toracica. La proporzione tra lobo destro e lobo sinistro è circa 6:1 (Figura 1.1) [8]. La zona che si espande sotto la gabbia toracica è in prossimità della parete addominale anteriore, sotto il margine costale destro. La porzione del fegato che è in diretto contatto con la faccia inferiore del diaframma è detta *bare area* (o area nuda), poiché è l'unica porzione non rivestita dal peritoneo. La *bare area* è circondata da una riflessione dei foglietti che costituiscono gli strati superiori e inferiori del legamento coronarico e i legamenti destro e sinistro, che fissano il fegato al diaframma. Il peritoneo, inoltre, in determinate regioni si solleva in pliche, che formano i numerosi legamenti che uniscono il fegato agli altri visceri e alle pareti della cavità peritoneale dell'addome [9].

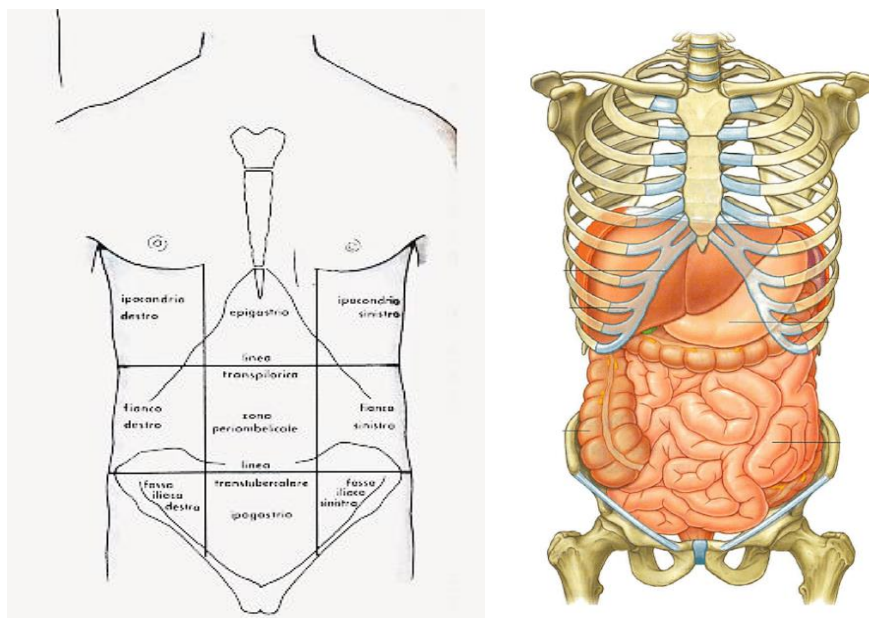


Figura 1.1: suddivisione delle regioni addominali e disposizione degli organi dell'addome.

La vera e propria superficie dell'organo è costituita da un sottile ma denso strato di tessuto connettivo con rare fibre elastiche, che forma una capsula fibrosa in cui decorrono vasi sanguigni, linfatici e nervi, cioè la capsula fibrosa di Glisson. La capsula di Glisson è strettamente aderente al tessuto parenchimale sottostante, in cui si approfonda con brevi e robusti setti connettivali; a livello dell'ilo epatico, il tessuto connettivo si ispessisce e penetra all'interno dell'organo, sostenendo e seguendo la ramificazione progressiva dei vasi sanguigni e linfatici, dei dotti biliari e dei nervi, senza peraltro identificare con setti connettivali ben distinte zone autonome di parenchima, quali lobi o lobuli.

1.1.1 Lobi del fegato

Indipendentemente dalle funzioni che svolge, il fegato è suddiviso in quattro lobi anatomici: destro, sinistro, quadrato e caudato. Anteriormente, il fegato è ripartito in lobo destro e sinistro dal legamento falciforme, che lo connette alla parete addominale. La superficie viscerale del fegato è divisa dal legamento rotondo (ligamentum teres), un residuo della vena ombelicale contenuto nell'estremità inferiore del legamento falciforme, e dal legamento venoso, un residuo del dotto venoso che permetteva al sangue materno di bypassare il fegato del feto durante la gestazione. Il lobo quadrato e il lobo caudato sono contigui a quello destro e visibili solamente sulla superficie viscerale del fegato. Il lobo quadrato è demarcato dalla fossa della colecisti, la porta epatica e il legamento rotondo, mentre quello caudato dalla vena cava inferiore, l'ilo epatico e il legamento venoso [9].

1.1.1 Segmenti epatici

Un altro modo per suddividere le diverse parti del fegato è basato sui modelli di diramazione di arteria epatica, vena porta e dotti biliari, che dividono l'organo in due lobi funzionali. Questi sono separati da un piano, chiamato linea di Cantlie, che si estende dal letto della colecisti al lato destro della vena cava. Il lobo destro è ulteriormente diviso in segmento anteriore e segmento posteriore, mentre quello sinistro in segmento mediale e segmento laterale. Ognuno di questi segmenti contengono due sottosegmenti, superiore e inferiore (Figura 1.2).

Nonostante le più piccole ramificazioni dei dotti biliari e dei vasi sanguigni afferenti in un segmento epatico abbiano molte connessioni con le strutture corrispondenti in segmenti adiacenti, i dotti biliari e i vasi sanguigni afferenti principali non sorpassano i confini del proprio segmento. Questa caratteristica ha un'importante rilevanza patologica in quanto un'alterazione di un particolare diramazione della vena porta o di un dotto biliare può causare la degenerazione

di un segmento epatico. Questa conoscenza risulta fondamentale nella preparazione di un intervento chirurgico al fegato, anche se può risultare difficile la distinzione dei diversi segmenti a causa dell'assenza di setti connettivali intersegmentali. Inoltre, sebbene i rami dell'arteria epatica, della vena porta e dei dotti biliari percorrano insieme i vari segmenti, le vene epatiche li percorrono in modo indipendente e ricevono sangue da più di un segmento epatico [9].

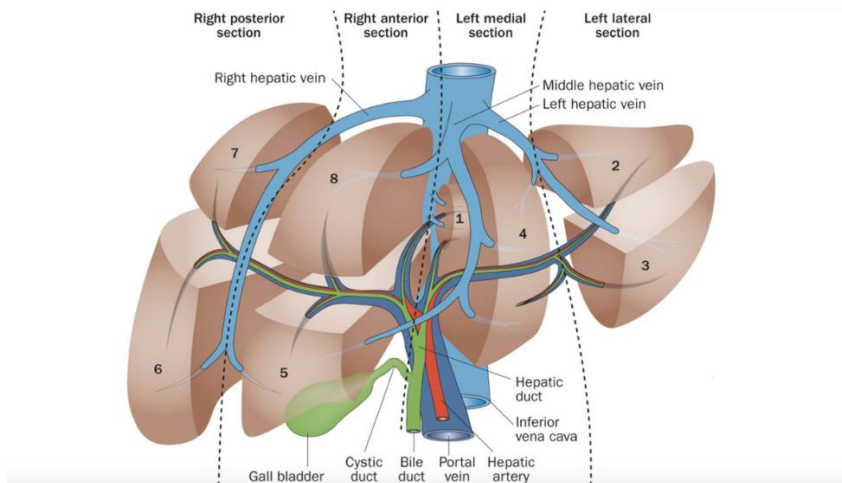


Figura 1.2: rappresentazione di segmenti epatici, dotti biliari, vena porta, arteria epatica e vene epatiche.

1.1.3 Vasi

La vena porta e l'arteria epatica sono i due principali sistemi vascolari che forniscono sangue al fegato (vasi afferenti). La vena porta rifornisce circa il 70% del flusso sanguigno e il 40% dell'ossigeno, mentre l'arteria epatica rifornisce il 30% del flusso sanguigno e il 60% dell'ossigeno. Il sangue della vena porta, che drena le vene mesenteriche, gastriche, spleniche e pancreatiche, viaggia verso il fegato, dove si ramifica nei lati destro e sinistro del fegato. Il sangue proveniente dai vari segmenti del tratto gastrointestinale nel sistema portale è mescolato in modo incompleto e le quantità relative di nutrienti, tossine e altri elementi possono variare. L'arteria epatica, che ha origine più comunemente dal tronco celiaco, accompagna la vena porta all'ilo epatico, dove entra nel fegato e si ramifica nei lati destro e sinistro. Piccole ramificazioni dell'arteria epatica e della vena porta alimentano i sinusoidi e le diramazioni biliari. Il flusso sanguigno sinusoidale è regolato con cura e si raccoglie nelle venule epatiche terminali prima di svuotarsi in vene epatiche più grandi e, alla fine, nella vena cava inferiore (IVC). Le vene epatiche sono quindi il sistema efferente del fegato [9].

1.2 Anatomia microscopica del fegato

L'assenza di setti connettivali chiaramente identificativi delle unità strutturali nel fegato rende la definizione della sua unità morfofunzionale oggetto di diverse interpretazioni. Il lobulo classico, descritto da Kiernan, è organizzato con una vena centrale (terminale della vena epatica) nel mezzo e i tratti portalici (che consistono nel dotto biliare, vena porta terminale e arteriola) in tre angoli (Figura 1.3). Un'altra schematizzazione è quella di Mall del lobulo portale, con i tratti portalici al centro e le vene centrali agli angoli (Figura 1.3). Questo modello ha come centrali il dotto di "drenaggio" e il flusso sanguigno, come si trova comunemente nel caso delle ghiandole, ma è di poca importanza a livello funzionale. Il modello di Rappaport propone un'unità alternativa al lobulo portale, l'acino epatico, tentando di descrivere la struttura dell'unità epatica in relazione alla funzione. L'acino epatico è un raggruppamento sferico di epatociti attorno a un piccolo tratto portale contenente un dotto biliare, una vena portale terminale e un'arteriola epatica; queste ultime due forniscono al gruppo di epatociti il sangue. Alla periferia dell'acino epatico si trovano le vene centrali (provenienti dal lobulo classico), che drenano l'area. A seconda della loro funzione e perfusione, gli epatociti sono divisi in tre zone (Figura 1.3):

- la Zona I è la regione periportale degli epatociti. In questa zona gli epatociti sono maggiormente irrorati e sono i primi a rigenerarsi a causa della loro vicinanza con il sangue ossigenato e i nutrienti. La zona I svolge un ruolo chiave nei metabolismi ossidativi come la beta-ossidazione, la gluconeogenesi, la formazione di bile e di colesterolo e il catabolismo di aminoacidi, grazie alla sua alta perfusione;
- la Zona II è chiamata regione pericentrale (o zona intermedia) degli epatociti ed è posta tra la zona I e la zona III;
- la Zona III è la regione con la più bassa perfusione a causa della sua distanza dal tratto portale, ed è detta regione perivenulare. I suoi ruoli più importanti sono la detossificazione, la biotrasformazione dei farmaci, la chetogenesi, la glicolisi, la lipogenesi, la sintesi di glicogeno e la formazione di glutammina.

Il concetto dell'acino epatico, che incorpora una schematizzazione sia strutturale che funzionale, è molto utile perché facilita la descrizione di importanti caratteristiche istologiche e patologiche.

Matsumoto e Kawakani, invece, basandosi su studi dell'angioarchitettura epatica, propongono un'altra unità strutturale e funzionale [9]: il lobulo primario; sei od otto lobuli primari a forma conica costituiscono un lobulo secondario, che riprende approssimativamente l'unità del lobulo classico proposta da Kiernan.

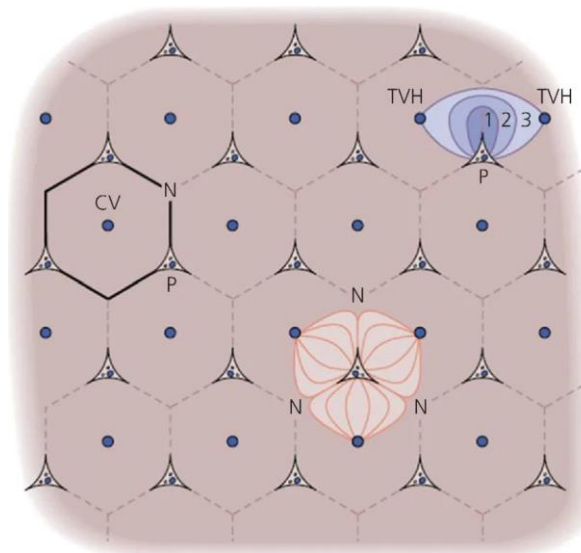


Figura 1.3: rappresentazione schematica dei lobuli epatici. Sulla sinistra, il lobulo classico di Kiernan. Al centro in basso, il lobulo portale di Mall. Sulla destra in alto, l'acino epatico di Rappaport, in cui sono individuabili le zone I, II e III. CV, vena centrale; N, punto nodale; P, tratto portale; TVH, vena terminale epatica.

1.2.1 Tratti portalì

I tratti portalì sono dei canali che originano dall'ilo epatico e scorrono per il fegato in uno schema diramato. Le strutture presenti all'interno dei tratti portalì includono dotti e piccoli dotti biliari, arteria epatica, vena porta, vasi linfatici, fibre nervose e alcune cellule infiammatorie. Queste strutture sono circondate da una capsula di tessuto connettivo di supporto, contenente principalmente collagene di tipo I, che si estende dalla capsula di Glisson e crea la struttura di base del parenchima del fegato [11]. Il parenchima epatico che circonda lo spazio portale, l'area periportale, non è in diretto contatto con le strutture portalì. Il *limiting plate*, una barriera continua di epatociti che attorniano l'area portale, ha delle piccole aperture che permettono il trasporto di sangue arterioso e portale ai sinusoidi attraverso le arteriole e venule portalì terminali. Le arteriole epatiche si diramano per formare una densa rete di capillari (*periductal plexus*) che accerchiano i piccoli dotti biliari e drenano nei sinusoidi [9].

1.2.2 Sinusoidi

I sinusoidi epatici sono una rete complessa di spazi vascolarizzati compresi tra strati di epatociti (le cellule principali del fegato). Questi sinusoidi sono composti da quattro tipi di cellule: cellule endoteliali, cellule di Kupffer, cellule stellate e *pit cells*.

Le cellule endoteliali sono la barriera di separazione principale tra il sangue e gli epatociti. Queste cellule endoteliali contengono numerose piccole aperture, non presentano una membrana basale e possono trasportare molecole tramite endocitosi. Le cellule endoteliali filtrano fluidi, soluti e particelle tra sangue e spazio di Disse, che si estende davanti allo strato

di cellule epatiche e contiene sangue ultrafiltrato. La porosità delle cellule endoteliali è superiore nell'area perivenulare in quanto le aperture sono molto più numerose e larghe in prossimità della vena centrale.

Le cellule di Kupffer sono dei macrofagi interni al lumen sinusoidale attaccati alle cellule endoteliali. Queste cellule fagocitarie ripuliscono il sangue dai globuli rossi invecchiati e dalle sostanze tossiche. Le cellule di Kupffer sono più larghe e più attive nelle aree periportali, nelle quali agiscono come prima linea di difesa contro i patogeni. Possono proliferare localmente e sono anche le cellule responsabili della maggior parte della produzione di citochine, che fungono da segnali di comunicazione fra le cellule del sistema immunitario tra di loro o con diversi organi e tessuti.

Le *pit cells* sono cellule *natural killer* specifiche del fegato. In particolare, sono cellule linfoidi contenenti granuli specifici, che le classificano come grandi linfociti granulari (Large granular Lymphocytes, LGL). Queste cellule originano dal midollo osseo e si accumulano nel fegato, dove rimangono per circa due settimane a carico delle cellule di Kupffer. Possono proliferare anche localmente se stimolate e aderiscono alle cellule tumorali bersaglio per la loro eliminazione, che è potenziata sinergicamente quando le cellule Pit attaccano le cellule tumorali insieme alle cellule di Kupffer [13].

Le cellule stellate, note anche come cellule di Ito, sono cellule mesenchimali poste nello spazio di Disse tra gli epatociti e le cellule endoteliali; sono responsabili del metabolismo dei grassi. In un fegato normale, le cellule stellate si trovano in uno stato quiescente. Ogni cellula ha lunghe protrusioni che raggiungono i sinusoidi epatici; se attivate in seguito ad un danno subito, queste cellule vanno incontro a proliferazione e a transizione miofibroblastica, diventando miofibroblasti in grado di attivare processi infiammatori. Inoltre, possono secernere e produrre la matrice extracellulare insieme al collagene [14].

1.2.3 Epatociti

Gli epatociti sono cellule poliedriche e costituiscono fino all'80% del complessivo numero di cellule del fegato umano. Presentano un nucleo (o due; circa il 25% degli epatociti sono binucleati) tondeggianti di varie dimensioni, circondato da citoplasma ricco di organelli che facilitano la sintesi e la secrezione proteica e lipidica. La superficie di scambio degli epatociti è aumentata dalla presenza di numerosi microvilli. La maggior parte del parenchima epatico è composto da una rete interconnessa di epatociti che sono organizzati in modo tale da formare degli strati cellulari. Questi strati hanno una superficie laterale e una superficie sinusoidale. La superficie laterale è in contatto con un altro strato di epatociti e forma con questo una piastra

cellulare (*cell plate*); le piastre sono organizzate radialmente rispetto alla vena centrale. Inoltre, una porzione della superficie laterale è modificata per formare dei canalicoli biliari. La superficie sinusoidale di epatociti invece fronteggia i sinusoidi vascolarizzati. Questa disposizione fa in modo che ogni epatocita sia in diretto contatto con un altro epatocita, un canalicolo biliare e con lo spazio di Disse. Inoltre, assicura che gli epatociti siano tra le prime cellule esposte ai nutrienti o alle tossine riassorbite dall'intestino. Le piastre epatiche sono sostenute da una rete di fibre reticolari, che formano lo scheletro del parenchima del fegato ed è in continuità con la capsula fibrosa perivascolare che circonda i vasi nell'area portale.

Gli epatociti manifestano una certa eterogeneità strutturale che riflette la loro diversità funzionale. Perciò, gli epatociti periportali sono diversi da quelli perivenulari nella proporzione delle loro superfici di scambio con i corrispondenti volumi dei sinusoidi adiacenti, e anche nelle caratteristiche subcellulari (come il numero di apparati del Golgi, di lisosomi e di quantità di reticolo endoplasmatico liscio). La diversità degli epatociti potrebbe essere causata dal microambiente in cui sono posti, invece di essere l'espressione di una differenza nel loro sviluppo [9,15].

1.2.4 Spazio di Disse

Lo spazio di Disse è un compartimento tra le cellule endoteliali e gli epatociti contenente il microambiente per gli scambi che avvengono tra il sangue e gli epatociti. Lo spazio contiene il plasma, che passa liberamente dal lumen sinusoidale attraverso le aperture nelle cellule endoteliali, il tessuto connettivo, che forma la struttura delle fibre reticolari, e le cellule stellate. Il plasma circola nello spazio di Disse e scorre verso la vena centrale; tuttavia, una parte di questo plasma viene assorbito dagli spazi linfatici nell'area periportale e può rientrare nel sangue sinusoidale [9,12].

1.2.5 Dotti e canalicoli biliari

I dotti biliari sono presenti nei tratti portali e sono formati dai colangiociti, cellule epiteliali cuboidali nel caso di piccoli dotti e colonnari in quelli più grandi. Il più piccolo tratto portale contiene almeno un dotto biliare, accompagnato da un'arteria e una vena. Il diametro del dotto è approssimabile a quello dell'arteria.

Il sistema biliare intralobulare è formato dai canalicoli biliari, piccoli spazi collocati tra due epatociti adiacenti e formanti una rete di canali interconnessi ramificati e anastomizzati che attraversano tutto il parenchima del fegato, i duttuli biliari. La parete dei canalicoli è formata da una porzione specializzata della membrana cellulare epatica ricoperta di microvilli e il lumen

è completamente isolato dallo spazio intercellulare (compreso anche lo spazio di Disse) da complessi giunzionali. La bile scorre dai canalicoli attraverso i duttoli di Hering, che sono delle fessure nel *limiting plate*. Questi piccoli dotti spesso proliferano a seguito di danni al fegato, in particolare quando sorgono dei problemi a livello del flusso biliare.

I canalicoli si uniscono a formare dotti interlobulari e successivamente dotti settali. Diversi dotti settali consecutivi, infine, si uniscono a formare i dotti epatici destro e sinistro, che a loro volta formano il dotto epatico comune, che si trova vicino all'ilo epatico. I piccoli dotti biliari, i dotti interlobulari e i dotti settali di prima e seconda generazione costituiscono le piccole vie biliari; i dotti settali più grandi, i dotti epatici e il dotto epatico comune costituiscono le grandi vie biliari [9,12,15].

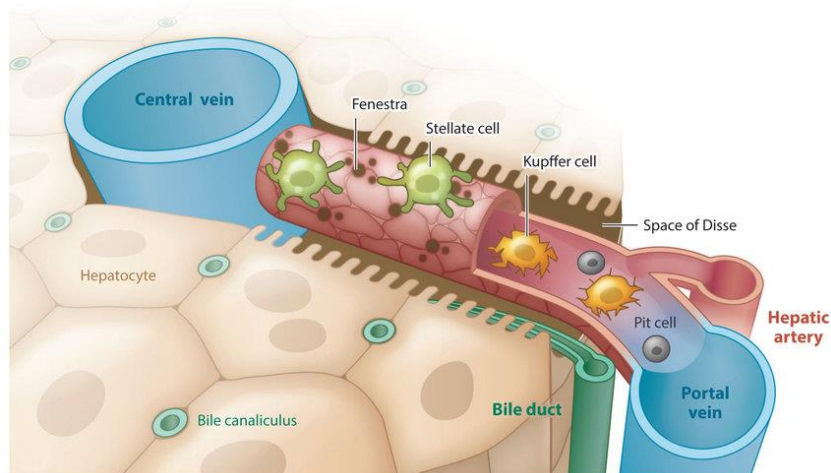


Figura 1.4: sinusoido epatico circondato da piastre di epatociti.

1.3.6 Vascolarizzazione e innervazione

Come già accennato, l'afflusso di sangue dell'arteria epatica finisce in tratti più piccoli chiamati arteriole terminali epatiche, mentre quello della vena porta finisce nelle venule portalì terminali. Sia il sangue arterioso che quello venoso proveniente dai tratti portalì scorre attraverso il *limiting plate* e i sinusoidi per essere drenato nella sezione terminale della vena epatica, chiamata vena centrale in quanto posizionata al centro del lobulo classico. Queste venule non presentano una capsula fibrosa come i vasi portalì e, quindi, non sono isolate dal parenchima del fegato. Le piccole vene centrali si fondono in rami intersegmentali più grandi delle vene epatiche (destra, sinistra e media). Queste, a loro volta, portano il sangue deossigenato alla vena cava inferiore. Solitamente, la vena epatica destra si aggiunge alla vena cava inferiore separatamente, mentre la vena epatica sinistra e quella media condividono un tronco comune nell'85% dei casi. C'è anche un numero variabile di vene epatiche minori (accessorie),

soprattutto nel lobo destro. La conoscenza delle varianti anatomiche di queste vene è importante in caso di operazioni al fegato [9,11].

È di fondamentale importanza riconoscere che il flusso di bile e quello di sangue nei tratti portalici avvengono in direzioni opposte. Infatti, il fegato produce la bile, che avrà quindi bisogno di uscire dal fegato, mentre il sangue arterioso e venoso dei tratti portalici sta entrando nel fegato per irrorarlo [16].

Il drenaggio linfatico nel fegato, invece, può seguire diversi percorsi. La linfa che si forma nello spazio di Disse viene drenata nei vasi linfatici portalici. Questi vasi creano dei plessi che accompagnano vene, arterie e dotti, ed escono dall'ilo epatico per entrare nell'arteria epatica e nei linfonodi celiaci. Il drenaggio linfatico può avvenire anche attraverso la creazione di plessi attorno alla vena epatica e all'interno della capsula del fegato. I plessi sono interconnessi e seguono molteplici vie di drenaggio; questi rendono il fegato la più grande fonte di linfa nel corpo umano.

Infine, il fegato è innervato da fibre pregangliari parasimpatiche derivanti dal nervo vago e fibre postgangliari simpatiche derivanti dai gangli celiaci. Queste fibre nervose raggiungono il fegato attraverso due vie, in comunicazione tra di loro, attorno alla vena porta e all'arteria epatica.

L'importanza funzionale del sistema nervoso epatico è ancora incerta, in quanto gli alloinnesti di fegati ortotopici denervati funzionano correttamente anche se scarsamente reinnervati [9].

1.3 La matrice extracellulare epatica

Nonostante la matrice extracellulare (ECM) costituisca solo una piccola porzione del fegato, ha comunque un ruolo cruciale nel fornire la struttura di base del fegato e mantenere lo stato differenziato dei suoi epatociti. Questo ruolo è stato largamente dimostrato in colture cellulari, nelle quali è stato possibile osservare che il fenotipo differenziato degli epatociti dipende dalla natura della ECM in cui è coltivato. Inoltre, essa modula la riparazione di molti tessuti, tra cui quello epatico; quindi, è importante lo studio della sua distribuzione nel fegato normale e la sua espressione fenotipica nei vari stadi di riparazione [10].

1.3.1 Morfologia e distribuzione dei componenti della ECM

Siccome la distribuzione degli elementi che compongono la ECM epatica varia a seconda della porzione considerata, è conveniente compartimentalizzare il fegato in quattro parti: la capsula di Glisson, i tratti portalici, l'interstizio lobulare e lo spazio centrale (della vena centrale) (Figura 1.5).

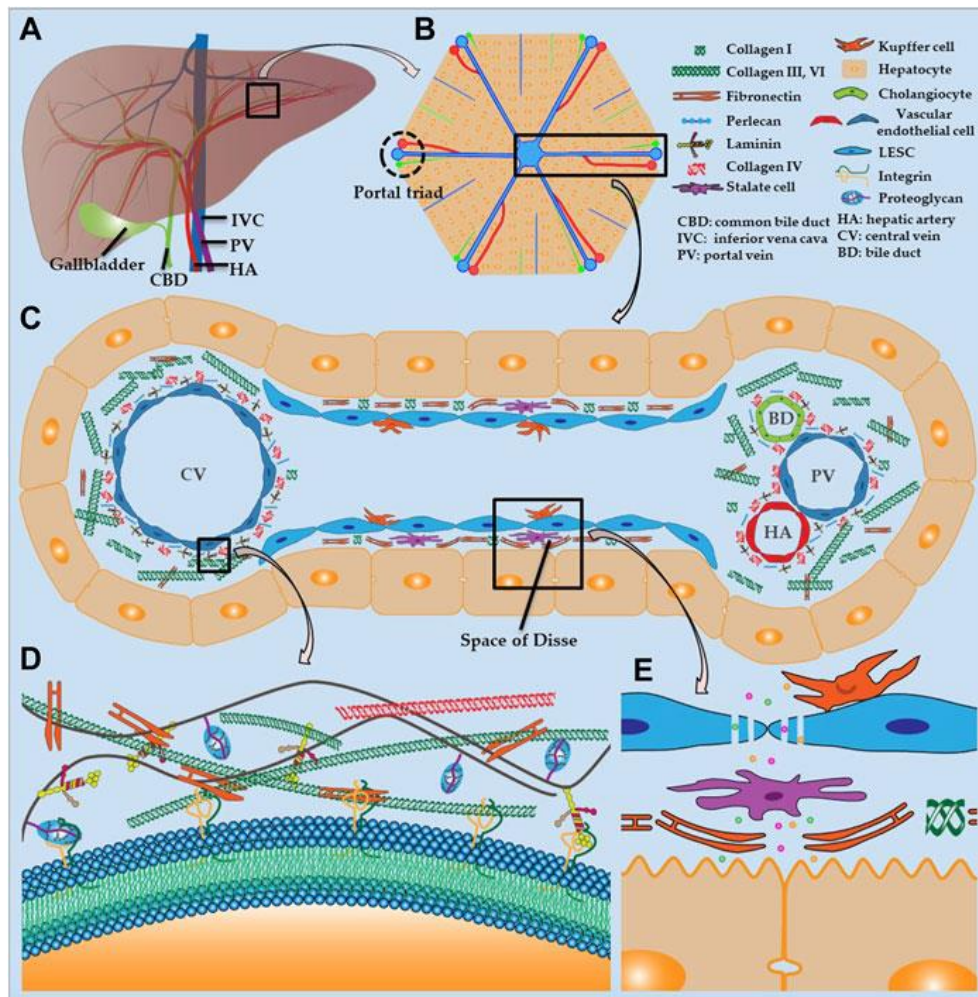


Figura 1.5: distribuzione della matrice extracellulare epatica, con focus sui tratti portal, sullo spazio di Disse e sulle vene centrali.

La capsula di Glisson è una membrana semitrasparente che contiene collagene di tipo I, III, V e VI, fibronectina (FN) e proteoglicani (anche se questi non sono stati dimostrati nello specifico). La base strutturale consiste in un unico strato di cellule mesoteliali poste sopra una membrana basale delicata, che contiene laminina, entactina, collagene di tipo IV e perlecano. Sotto questa membrana basale è presente una matrice formata da fibre di collagene di tipo I cross-banded, nelle quali sono inserite sottili fibre e filamenti di collagene di tipo III, V, VI e FN. Infine, la ECM capsulare è dotata di sporgenze in continuità con la ECM lobulare.

Nei tratti portal, i dotti biliari, le arterie e le vene sono immersi in una matrice extracellulare. Inoltre, le cellule epiteliali dei dotti biliari sono separate dal parenchima circostante da una membrana basale; sono le cellule epiteliali stesse ad essere responsabili della creazione e della secrezione della propria membrana basale. Anche arteriole e venule dello spazio portale sono circondate da una membrana basale, composta da laminina, collagene di tipo IV, entactina, e proteoglicani eparan solfato. La ECM dei tratti portal contiene collagene di tipo I, III, V, VI,

FN e fibre elastiche (Figura 1.5C). Fibre di collagene di tipo I cross-banded provenienti dal tratto portale sono in continuità con fibre simili del lobulo interstiziale adiacente, che a loro volta sono in continuità con quelle negli spazi centrali. In tal modo, le fibre e i fasci di collagene di tipo I formano lo scaffold strutturale del lobulo.

Per descrivere al meglio la matrice extracellulare lobulare e il modo in cui cambia in condizioni patologiche, è necessario mettere in relazione le differenze nella sua distribuzione in tutti e tre i componenti del lobulo (sinusoidi, spazio di Disse ed epatociti). I sinusoidi sono contraddistinti dalla presenza di larghe aperture citoplasmatiche, di fessure tra le cellule endoteliali e dall'assenza di membrana basale; quindi, sono particolarmente adatti allo scambio bidirezionale di macromolecole che avviene tra plasma ed epatociti. Anche gli epatociti mancano di una membrana basale; quindi, il fegato è l'unico tra gli organi epiteliali a non avere una barriera contigua (né endotelio, né membrana basale) tra il plasma e la superficie delle cellule epiteliali. Lo spazio di Disse, che sostanzialmente rappresenta l'interstizio epatico, se analizzato al microscopio elettronico, sembra non avere né una membrana basale, né una matrice extracellulare, se non per alcune fibre di collagene. Se viene invece analizzato tramite immunistoichimica, sono osservabili in esso grosse fibre cross-banded di collagene di tipo I, in ogni punto tra i tratti portali e la vena centrale. Nelle zone in cui le cellule epatiche si diramano o cambiano direzione, sono presenti dei piccoli filamenti di collagene di tipo I, distribuiti in modo simmetrico. La presenza di filamenti è maggiore nelle regioni dello spazio di Disse prossime ai tratti portali e alla vena centrale. Il collegamento di questi da una porzione all'altra può essere paragonato ad un sistema di cavi che fornisce supporto fisico al lobulo. Il componente della ECM che viene trovato in maggiore quantità nello spazio di Disse è la fibronectina: compare sia in lunghe linee continue che attraversano i sinusoidi, che in depositi individuali. La FN forma delle strutture sulla superficie dei microvilli degli epatociti, in modo da ricoprire le fibre di collagene di tipo I intervallate da collagene di tipo III, V, VI. Inoltre, la FN è in contatto con la superficie interstiziale delle cellule endoteliali. La connessione che questa glicoproteina crea tra le superfici delle cellule endoteliali e degli epatociti unisce i diversi elementi del lobulo epatico in una singola unità fisica. Infine, anche nello spazio di Disse, non è identificabile una membrana basale (Figura 1.5D).

La peculiarità di non avere una membrana basale si estende anche agli epatociti, il che li rende l'eccezione alla regola, in quanto tutte le altre cellule epiteliali nell'organismo ne hanno una che le separa dallo spazio interstiziale.

Le vene centrali consistono, invece, in un unico strato di cellule endoteliali poggiato sopra una membrana basale contenente laminina, collagene di tipo IV e perlecano. Al di fuori di questa membrana, è presente una matrice che si integra con quella dello spazio di Disse (Figura 1.5C). Riassumendo, la ECM epatica nella capsula di Glisson, nei tratti portalì e nelle vene centrali è comparabile a quella di altri organi epiteliali (reni, polmoni, ecc); è degna di nota l'unicità della matrice extracellulare lobulare, causata dalla mancanza di una membrana basale nello spazio di Disse e dalla prevalenza di FN tra i componenti della ECM [10].

Capitolo 2: Decellularizzazione

La preparazione dello scaffold tridimensionale della matrice extracellulare di un organo intero, ottenuto dall'organo di un mammifero, richiede diverse fasi di lavorazione, ognuna delle quali può influenzare la struttura e la composizione dello scaffold risultante. Inoltre, la preparazione dello scaffold può avere degli effetti sulla risposta che lo stesso può provocare durante il suo utilizzo per la ricostruzione dell'organo. La procedura di rimozione di tutte le cellule dall'organo, mantenendo la struttura della matrice extracellulare, comporta l'esposizione delle cellule parenchimali a detergenti, enzimi e agenti chimici tramite la perfusione del sistema vascolare.

È necessario rimuovere efficacemente gli epitopi antigenici associati alle membrane cellulari e i componenti intracellulari di organi e tessuti per evitare, o almeno minimizzare, una risposta immunitaria avversa da parte del ricevente. Antigeni allogenici o xenogenici sono normalmente riconosciuti come estranei dall'ospite e causano una risposta infiammatoria distruttiva o un evidente rigetto immunomediato. Tuttavia, le molecole che costituiscono la matrice extracellulare sono ampiamente conservate da una specie all'altra e sono ben tollerate anche da riceventi xenogenici. Il fine ultimo della decellularizzazione è quindi quello di rimuovere tutto il materiale cellulare senza andare a colpire la composizione, l'attività biologica e l'integrità meccanica della rimanente matrice tridimensionale extracellulare. Inoltre, tutte le caratteristiche strutturali, come il sistema vascolare e l'albero biliare, devono restare intatte.

Rimane estremamente difficile effettuare la completa decellularizzazione di un tessuto o di un organo; la maggior parte degli scaffold presentano residui di DNA o di materiale citoplasmatico e nucleare [17,18].

Di seguito vengono presentati i principali metodi usati nella decellularizzazione; alcune combinazioni di questi metodi sono utilizzate, in particolare, per massimizzare l'efficacia della procedura di decellularizzazione del fegato.

2.1 Metodi fisici

2.1.1 Sonicazione

La sonicazione è un metodo che utilizza un bagno o una sonda a ultrasuoni per trasferire potenza acustica in un solvente contenente tessuti o organi, in modo tale da perturbare e distruggere le membrane cellulari. I sonicatori sfruttano l'effetto della cavitazione: l'implosione delle microscopiche bolle generate durante la sonicazione rilascia forti onde d'urto che tagliano la cellula; i residui cellulari vengono successivamente rimossi tramite perfusione. L'energia

generata dalla collisione delle onde sonore scalda la soluzione e di conseguenza diventa necessario monitorarne la temperatura durante il processo, se necessario raffreddando con un refrigeratore (*chiller*), per evitare il riscaldamento e la denaturazione di molecole e proteine [7]. I risultati di uno studio effettuato sull'aorta di suino nel 2014 dimostrano che la sonicazione ha alterato minimamente la struttura della matrice extracellulare, ed è stata efficace nella rimozione di materiale cellulare (rispetto alla sola tecnica di agitazione) e nella riduzione dei tempi di decellularizzazione, ma ha abbassato il pH della soluzione in cui era immerso il tessuto [19,20].

2.1.2 Cicli di congelamento-scongelo

I cicli di congelamento-scongelo (*freeze-thaw cycles*) consistono in variazioni rapide di temperatura in grado di lisare le cellule e permetterne la successiva rimozione. La lisi cellulare avviene poiché le cellule si gonfiano durante il processo di raffreddamento e si contraggono durante lo scongelamento (seguendo il comportamento dei cristalli di ghiaccio che si formano al loro interno), e il continuo stress a cui sono sottoposte porta alla rottura delle pareti cellulari. La tecnica *freeze-thaw* viene generalmente applicata, in combinazione con detergenti, come primo step nella procedura di decellularizzazione, in modo da ridurre la quantità di reagenti chimici utilizzati. Tuttavia, anche un solo ciclo di congelamento-scongelo può avere un impatto negativo, dovuto alla formazione dei cristalli di ghiaccio, sulla struttura e sulle proprietà meccaniche della matrice extracellulare. Per questo, alcuni ricercatori hanno proposto l'uso di crioprotettori durante la decellularizzazione per mitigare gli effetti negativi del ciclo senza però avere un impatto sulla lisi cellulare. Lo studio di Pulver del 2014 documenta che pretrattare i campioni con trealosio al 5% porta gli stessi benefici di un ciclo di congelamento-scongelo della durata di una notte, ma con minori danni microstrutturali [7,21].

2.2 Metodi Chimici

2.2.1 Detergenti chimici

I detergenti sono i trattamenti maggiormente utilizzati per la decellularizzazione di tessuti e organi, in quanto molto efficaci nella distruzione della membrana fosfolipidica cellulare, il che permette la rimozione delle cellule e del loro contenuto dal tessuto. Tuttavia, i detergenti possono influenzare negativamente il processo di ripopolamento della matrice extracellulare decellularizzata [19]. Tra i detergenti ionici più comunemente usati c'è il laurilsolfato di sodio (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) e, in uno studio effettuato nel 2018, si è potuto osservare come i residui di SDS nella matrice extracellulare decellularizzata fossero sufficienti a causare

risposte infiammatorie e fibrosi, sia in vitro che in vivo. Lo studio segnala, inoltre, che usare CaCl_2 per precipitare il laurilsolfato di sodio ne aumenta notevolmente la quantità rimossa e limita la risposta infiammatoria [22]. Un altro studio del 2021 ha dimostrato che anche minimi residui di SDS risultano in una ridotta sopravvivenza delle cellule seminate, a causa della resistenza del fenotipo delle cellule al detergente. In questo studio, il saggio colorimetrico con il blu di metilene viene usato come metodo diretto e non invasivo per rilevare i residui di SDS e aiuta anche a preservare l'integrità della matrice extracellulare [23].

Un'alternativa al laurilsolfato di sodio è il Triton X-100, un detergente non ionico in grado di indebolire i legami lipide-lipide, lipide-proteina e DNA-proteina. Il Triton X-100 è considerato un detergente meno aggressivo rispetto al SDS. Confrontando l'efficacia della decellularizzazione tra fegati decellularizzati con una combinazione di SDS e Triton X-100 e altri decellularizzati solo con Triton X-100, è possibile osservare che, nonostante non ci siano differenze nella rimozione di DNA, il protocollo con solo il Triton X-100 conserva 1,5 volte di collagene e 2,5 volte di glicosamminoglicani in più rispetto al protocollo con entrambi i detergenti [24].

L'Agenzia Europea delle Sostanze Chimiche (ECHA) ha inserito il Triton X-100 nell'elenco dei candidati di sostanze di elevata preoccupazione ai sensi del regolamento REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). Il detergente è stato identificato come una sostanza con potenziali rischi per la salute umana o l'ambiente che richiedono un'attenzione speciale e una regolamentazione più rigorosa. In particolare, un sottoprodotto del Triton X-100, il 4-terz-ottilfenolo, è stato scoperto essere un interferente endocrino: può interferire con il sistema endocrino degli organismi, influenzando la produzione, il rilascio, il trasporto e l'effetto degli ormoni [47]. È oggetti di studio la ricerca di detergenti alternativi.

Un altro tipo di detergenti sono quelli zwitterionici, che presentano caratteristiche sia ioniche che non ioniche e sono meno dannosi verso le proteine a causa della loro carica netta nulla. Siccome sono poco permeabili, questi detergenti vengono utilizzati principalmente nella decellularizzazione di tessuti o organi sottili [7].

Molto spesso diversi tipi di detergenti vengono combinati per ottimizzare la decellularizzazione: la loro efficacia non dipende solo dalla combinazione, ma aumenta linearmente al tempo di esposizione e alla concentrazione dei detergenti e inversamente rispetto allo spessore e alla densità del tessuto. Alte concentrazioni e alti tempi di esposizione assicurano che lo scaffold raggiunga una decellularizzazione completa o quasi. Tuttavia, questi alti livelli possono danneggiare la struttura della matrice extracellulare e lasciare dei residui, fattori che possono determinare effetti citotossici e trombogenici dopo il ripopolamento e il trapianto.

Questo è di particolare rilevanza nel caso del fegato, in quanto organo ampiamente irrorato e fondamentale dal punto di vista metabolico [7].

2.2.2 Soluzioni ipertoniche e isotoniche

Le soluzioni ipertoniche e isotoniche promuovono la contrazione e il rigonfiamento delle cellule grazie all'osmosi. Questo porta nel tempo alla lisi cellulare, anche se l'effetto osmotico da solo non è in grado di smaltire i residui delle cellule e, quindi, viene raramente usato come unico metodo per la decellularizzazione. Viene utilizzato più spesso, invece, in combinazione con detergenti ed enzimi [25].

Una ricerca del 2018 ha documentato che trattare un fegato murino con soluzione ipotonica e successivamente Triton X-100 porta ad uno scaffold completamente privo di cellule, che conserva una buona integrità strutturale, diversamente da quanto succede nei trattamenti con detergenti ionici [7].

2.2.3 Acidi e basi

Sebbene gli acidi rimuovano il DNA sciogliendo il citoplasma e rompendo gli acidi nucleici durante la decellularizzazione, al giorno d'oggi sono più comunemente e popolarmente utilizzati come disinfettanti perché sono forti ossidanti. In una soluzione altamente basica, invece, il DNA a doppia elica denatura in DNA a singola elica a bassa viscosità, che può essere facilmente rimosso per perfusione. Studi a questo riguardo hanno dimostrato che una soluzione altamente alcalina di NaOH-PBS (Idrossido di Sodio-tampone fosfato salino) può ottenere lo stesso effetto di SDS e CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane-sulfonate), un detergente zwitterionico, durante la decellularizzazione, migliorando anche la biocompatibilità e la rigenerazione vascolare degli scaffold. Inoltre, soluzioni altamente alcaline con un pH di 12 o superiore possono inattivare batteri e virus convenzionali, così come prioni non convenzionali, che sono patogeni spesso associati all'uso di materiali da fonti animali. Tuttavia, acidi e basi possono danneggiare il collagene e compromettere i legami proteina-proteina, portando a una distruzione microstrutturale e a una diminuzione della viscoelasticità. Inoltre, l'idrossido di sodio taglia quasi tutti i fattori di crescita, come il fattore di crescita dei fibroblasti e il fattore di crescita vascolare endoteliale [7].

2.2.4 Alcoli

A causa dei loro gruppi idrossili polari, gli alcoli possono diffondere nelle cellule e, di conseguenza, disidratarle e lisarle. Inoltre, gli alcoli (come il glicerolo) vengono spesso

utilizzati per estrarre i lipidi dal tessuto adiposo. Possono, però, fare precipitare le proteine e distruggere la struttura della matrice extracellulare; pertanto, è necessario fare attenzione quando vengono utilizzati per rimuovere i componenti cellulari. Rispetto agli acidi, gli alcoli vengono utilizzati più regolarmente per sterilizzare le matrici extracellulari decellularizzate. L'etanolo (4%) e l'acido peracetico (0,1%) vengono spesso utilizzati per sterilizzare gli scaffold decellularizzati epatici [7].

2.2.5 Agenti chelanti

Gli agenti chelanti, come l'acido etildiamminotetraacetico (EDTA) e l'acido etilenglicoletetraacetico (EGTA) si legano agli ioni metallici in grado di interferire con l'attività proteica cellulare, causando la disconnessione delle proteine integrali intercellulari e la compromissione dell'adesione cellulare alla matrice extracellulare. Tuttavia, i chelanti da soli non sono in grado di rimuovere completamente le cellule e dovrebbero essere combinati con detergenti o enzimi. Infine, l'utilizzo di EDTA nella decellularizzazione riduce il DNA residuo e produce una matrice extracellulare più integra [7,19].

2.2.6 Immersione e agitazione in reagenti

Uno dei metodi più diretti nella decellularizzazione di organi e tessuti è quello dell'immersione in reagenti chimici e, quando a questo si unisce l'agitazione, ne vengono ulteriormente migliorati gli effetti. L'efficacia della reazione dipende dal tipo di reagente, dalla durata dell'immersione e dall'intensità dell'agitazione. È importante cercare di minimizzare la durata del processo per evitare il danneggiamento della matrice extracellulare. Questo approccio è tipicamente utilizzato per decellularizzare tessuti epidermici e organi di piccole dimensioni. Nel caso del fegato, tramite questo metodo è possibile ottenere un'accettabile quantità di residui di DNA solo quando la sezione di fegato da decellularizzare ha uno spessore inferiore a 5 mm [7].

2.3 Trattamenti enzimatici

La decellularizzazione enzimatica è uno dei metodi più frequentemente utilizzati per la rimozione delle cellule, spesso impiegato in combinazione con la decellularizzazione chimica per favorire una più efficace rimozione delle cellule e la completa degradazione dei componenti nucleari [26]. Gli enzimi più comuni sono la nucleasi, la tripsina, la dispasi, la lipasi e la collagenasi. In particolare, le nucleasi e la tripsina sono le più regolarmente impiegate nella decellularizzazione del fegato. Gli enzimi possono rimuovere con precisione i componenti

cellulari, prevenire risposte immunitarie avverse e migliorare l'efficacia della decellularizzazione basata su detergenti [7].

Le nucleasi sono enzimi che rompono i legami fosfodiesterici tra i nucleotidi negli acidi nucleici. Tipicamente, esse facilitano la rimozione dei nucleotidi e minimizzano il rischio di risposte immunitarie durante la decellularizzazione. Le endonucleasi, come la DNasi e la RNasi, riescono a degradare il materiale genetico tramite idrolisi e vengono spesso utilizzate per rimuovere gli acidi nucleici durante la decellularizzazione del fegato. La tripsina è una serina proteasi che idrolizza e smaltisce le proteine coinvolte nell'adesione cellulare; di conseguenza, la tripsina dissocia le cellule dai tessuti. È necessaria la regolare sostituzione della tripsina perché gli inibitori delle proteasi, rilasciati dalle cellule danneggiate, limitano l'attività della tripsina dopo una circolazione prolungata. Inoltre, gli enzimi possono penetrare più a fondo nei tessuti in condizioni di pressione per aumentare la reazione tra l'enzima e il substrato, il che aiuta nella rimozione delle cellule e accorcia il tempo di reazione [7,19].

2.4 Combinazione dei metodi e valutazione della ECM decellularizzata

2.4.1 Combinazione dei metodi

Ognuno dei metodi (fisici, chimici e biologici) utilizzati per la decellularizzazione di tessuti e organi presenta vantaggi e svantaggi. I metodi fisici sono meno aggressivi e dannosi per la microstruttura del tessuto, però non riescono a rimuovere completamente i residui cellulari. Gli agenti chimici e i trattamenti enzimatici, invece, pur rimuovendo efficacemente i componenti cellulari, distruggono la microstruttura e diminuiscono la qualità della matrice extracellulare.

Il protocollo ideale di decellularizzazione varia notevolmente tra i diversi organi e tessuti, e dovrebbe includere due o più metodi in modo da controbilanciarne gli effetti. Attualmente, il protocollo più frequentemente utilizzato per la decellularizzazione del fegato prevede un ciclo di congelamento-scongelo seguito da una combinazione di detergenti, enzimi e agenti chelanti [7].

La decellularizzazione di un fegato umano è stata effettuata, per la prima volta, nel 2015. I tessuti epatici sono stati congelati a -80°C e scongelati a 4°C . Il protocollo di perfusione utilizzato dai ricercatori ha comportato l'infusione del tessuto epatico con diverse soluzioni, tra cui acqua distillata, tripsina/EDTA, SDS, Triton X-100 e soluzione salina per la decellularizzazione, e acido peracetico ed etanolo per la sterilizzazione, in un protocollo che è durato 14 giorni per il solo lobo sinistro del fegato e 6 settimane per l'intero organo; in particolare, il protocollo del lobo sinistro è stato ripetuto tre volte per decellularizzare l'organo

intero (Figura 2.1). Un'analisi istologica è stata condotta per valutare la presenza di cellule e la quantificazione del DNA ha rivelato una completa rimozione cellulare, mentre l'analisi immunohistochimica ha mostrato che i principali componenti della matrice extracellulare sono stati preservati [27,28].

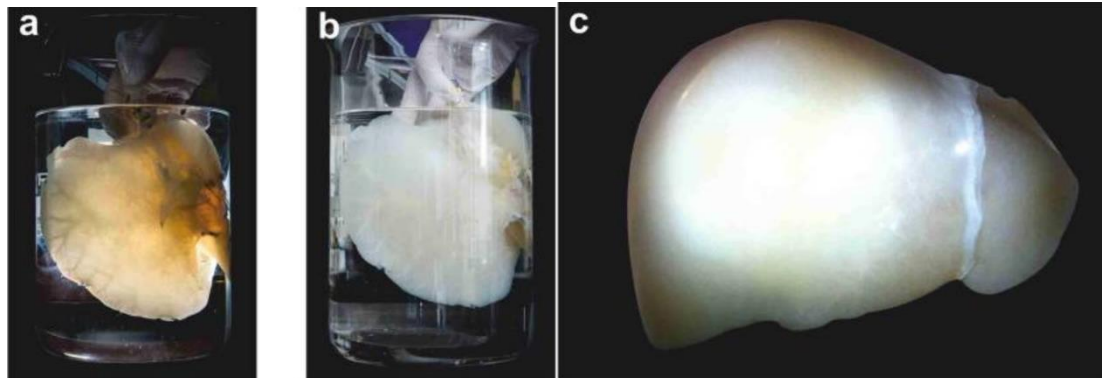


Figura 2.1: lobo sinistro del fegato (a, b) e fegato intero (c) decellularizzati [28].

Nuovamente, nel 2017, gli stessi ricercatori hanno migliorato la tecnica di decellularizzazione basandosi sull'oscillazione della forza-g e su un alto sforzo di taglio. Il fegato ha subito un ciclo di congelamento-scongelo-congelamento, è stato sezionato e i cubetti sono stati successivamente scongelati in un bagno d'acqua (37°C) per 1 ora e coperti con PBS al 1%. Dopo essere stati scongelati, sono stati trasferiti in tubi da 2 ml, ai quali sono stati aggiunti detersivi, e sono state testati diversi valori di forza-g. Le analisi hanno mostrato un aspetto traslucido e trasparente, la rimozione del materiale nucleare con conservazione della matrice extracellulare e una quantità accettabile di DNA residuo. Inoltre, il tempo del protocollo è stato drasticamente ridotto da 36 ore a circa 3 ore [27].

2.4.2 Valutazione della decellularizzazione

Il fine ultimo della decellularizzazione, come già sottolineato, è quello di rimuovere tutti i componenti cellulari dall'organo mantenendo intatta la matrice extracellulare poiché, a seguito del ripopolamento, i residui cellulari nella ECM sono responsabili di reazioni avverso (anche il rigetto) e l'alterazione della ECM compromette la bioattività delle cellule impiantate [7].

Una delle considerazioni importanti nella scelta delle tecniche di decellularizzazione è il controllo di qualità, che garantisce che sia stata ottenuta una decellularizzazione sufficiente. Sono stati proposti parametri minimi per raggiungere una decellularizzazione adeguata, che

sono stati ampiamente accettati. L'efficacia della decellularizzazione può quindi essere valutata utilizzando tre criteri standard:

- assenza di materiale nucleare visibile nelle sezioni di tessuto colorate con ematossilina ed eosina (H&E) o 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI);
- contenuto di dsDNA (double stranded DNA) < 50 ng/mg di ECM (peso secco);
- dimensione dei frammenti di DNA < 200 paia di basi.

Alcuni ricercatori, in uno studio del 2022, hanno stabilito un protocollo che utilizza la spettroscopia di assorbimento per monitorare il progresso della decellularizzazione in tempo reale, misurando l'assorbimento del contenuto di DNA nell'effluente a 260 nm [19].

Per una valutazione complessiva della qualità dello scaffold, è necessario anche analizzare il contenuto di proteine e polisaccaridi complessi: a differenza degli acidi nucleici che devono essere rimossi, c'è la necessità di preservare proteine strutturali, fattori di crescita e altre molecole complesse nella matrice extracellulare. In particolare, la presenza dei fattori di crescita è fondamentale per la proliferazione e il differenziamento cellulare. Molti studi riportano misure qualitative e quantitative delle proteine strutturali come il collagene, la laminina, l'elastina, la fibronectina, così come dei glicosamminoglicani. Altri quantificano il contenuto prima e dopo la decellularizzazione per noti fattori di crescita associati alla matrice extracellulare, tra cui il fattore di crescita degli epatociti (Hepatocyte Growth Factor, HGF), il fattore di crescita basico dei fibroblasti (Basic Fibroblast Growth Factor, BFGF), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e il fattore di crescita insulino-simile I (Insulin-Like Growth Factor I, IGF-I) [21].

I metodi di valutazione dello scaffold sopra menzionati richiedono un campionamento fisico e la distruzione dello scaffold decellularizzato, impedendo il suo successivo utilizzo per il ripopolamento. Pertanto, per soddisfare la necessità di stabilire metodi di valutazione dello scaffold che lo lascino intatto per ulteriori sperimentazioni, sono stati esplorati alcuni metodi non distruttivi di valutazione, tra cui la tomografia computerizzata e l'analisi del fluido di perfusione della decellularizzazione [21,29].

Infine, è necessario che sia mantenuta l'integrità strutturale dell'albero vascolare: la vascolarizzazione riveste un'importanza particolare nel ripopolamento dello scaffold, in quanto le cellule parenchimali dipendono in modo critico da un affidabile afflusso di sangue. La rete vascolare decellularizzata deve essere in grado di sopportare il flusso di liquido che entra attraverso un vaso d'ingresso centrale, si ramifica in un ampio letto capillare e si riunisce in un unico vaso di uscita [21,30]. È importante che la rete vascolare sia intatta anche perché può essere utilizzata per fornire supporto microcircolatorio per ossigeno, nutrienti e fattori di

crescita alle cellule seminate, nonché per la rimozione dei prodotti di degradazione. Inoltre, il sistema vascolare intatto dell'organo decellularizzato consente il collegamento al sistema circolatorio del destinatario, una volta che l'organo sia stato ripopolato [6].

Capitolo 3: Ripopolamento dello scaffold

La creazione di uno scaffold epatico bioingegnerizzato trapiantabile e funzionale prevede che le cellule impiantate ripopolino non solo lo spazio parenchimale, ma anche il rivestimento macrovascolare, i sinusoidi e l'albero biliare (Figura 3.1). Ciò richiede:

- la disponibilità dei tipi di cellule pertinenti per il ripopolamento di ciascun compartimento cellulare;
- l'espansione in vitro delle cellule in quantità sufficienti per ripopolare tutti i compartimenti cellulari;
- metodi di semina e perfusione per un massimo attecchimento e ripopolamento cellulare.

È necessario puntualizzare che un ripopolamento parziale del parenchima epatico potrebbe essere sufficiente, poiché anche gli epatociti completamente differenziati possono sottoporsi a divisione cellulare in vivo, come si osserva in caso di lesioni epatiche o dopo epatectomia parziale. Di conseguenza, ciò potrebbe verificarsi anche nel caso di un trapianto di fegato decellularizzato in cui solo una frazione del parenchima contenga epatociti. D'altra parte, un ripopolamento incompleto del letto vascolare causerebbe problemi di coagulazione quando i vasi dell'organo trapiantato siano esposti al sangue del ricevente.

Negli ultimi dieci anni, sono stati condotti diversi studi per valutare la fattibilità e le attuali limitazioni del ripopolamento degli scaffold di fegato, principalmente nei fegati di roditori. Ciò ha portato a progressivi miglioramenti nelle strategie di semina utilizzate [6]. Di seguito vengono esaminate le fonti cellulari utilizzate per la ricellularizzazione del fegato, con alcune considerazioni sui vantaggi della co-coltura di cellule.

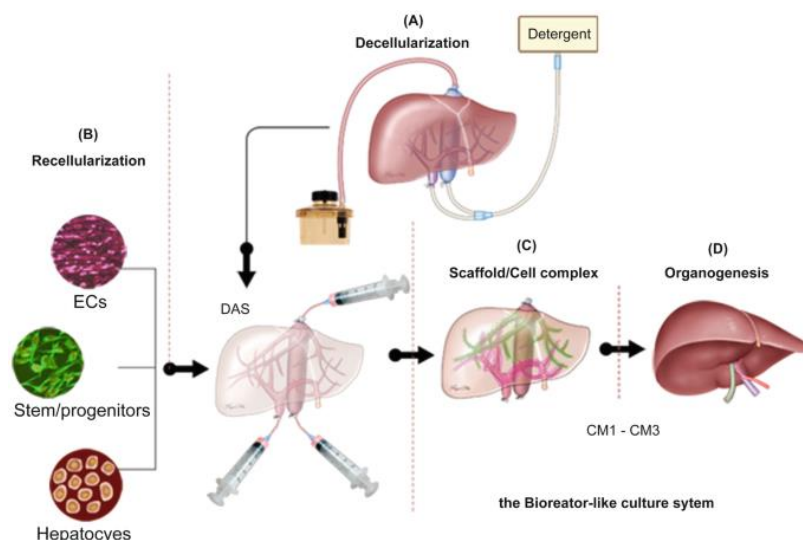


Figura 3.1: schematizzazione della procedura di ripopolamento di un fegato umano decellularizzato.

3.1 Ripopolamento parenchimale: gli epatociti primari

Gli epatociti primari sono chiaramente le cellule ideali per il ripopolamento del parenchima epatico acellulare, in quanto costituiscono fino all'80% del complessivo numero di cellule del fegato umano. Sono stati pubblicati diversi studi in cui gli epatociti primari sono stati utilizzati per ripopolare fegati di topo e di ratto decellularizzati [31,56]. L'obiettivo di questi studi è stato quello di determinare se gli scaffold di fegato acellulari forniscano i necessari segnali biologici per fare in modo che gli epatociti primari infusi aderiscano efficientemente e mantengano le loro funzioni essenziali dopo la coltura in vitro in perfusione. Quando gli epatociti primari vengono coltivati in 2D sui piatti di coltura classici, perdono molto rapidamente il loro fenotipo epatocellulare maturo e la loro funzionalità, in parte a causa della coltura su superfici rigide e della mancanza di segnali dall'ambiente microscopico epatico circostante [6].

È stato scoperto che, quando gli epatociti primari sono stati introdotti in uno scaffold decellularizzato di fegato di ratto, l'attività di CYP1A2 (un enzima coinvolto nello smaltimento delle sostanze estranee al corpo) e la metabolizzazione dell'ammoniaca degli epatociti primari murini potevano essere mantenuti fino al massimo a una settimana [31].

Nel 2020, è stata pubblicata una ricerca nella quale si è dimostrato che gli epatociti primari di ratto possono ripopolare i fegati decellularizzati di ratti Wistar e rimanere vitali per 14 giorni [56]. Anche se la secrezione di albumina (ALB) è diminuita a partire dal terzo giorno dalla semina (seguendo una tendenza simile a quella degli epatociti coltivati in 2D come controllo), le cellule impiantate hanno comunque espresso marcatori come la citocheratina 19 (KRT19), che indica la presenza di cellule biliari e suggerisce la formazione di una struttura biliare funzionale, e l'albumina, che indica la presenza e la funzionalità degli epatociti, in quanto proteina principalmente prodotta da queste cellule [6].

Questi modelli hanno fornito informazioni su come seminare ottimamente gli epatociti primari negli scaffold decellularizzati di fegato e hanno dimostrato che, almeno nei fegati di ratto, gli epatociti rimangono vitali e funzionali per 1 settimana. Tuttavia, non è ancora chiaro come consentire una sopravvivenza e stabilità a lungo termine degli epatociti primari negli scaffold decellularizzati.

3.2 Ripopolamento parenchimale: cellule staminali e cellule progenitrici

I principali vantaggi dell'utilizzo di cellule simili a epatociti, derivate da cellule staminali o progenitrici, sono dovuti alla capacità proliferativa e plasticità delle cellule progenitrici presenti nel fegato. In un fegato sano, la proliferazione degli epatociti maturi è responsabile della rigenerazione del parenchima. Tuttavia, danni gravi al fegato superano la capacità rigenerativa

degli epatociti maturi e attivano le cellule progenitrici epatiche quiescenti (Hepatic Progenitor Cells, HPC) per il ripristino dell'omeostasi parenchimale. Sebbene il meccanismo con cui le HPC contribuiscono alla rigenerazione del fegato non sia ancora completamente compreso, la loro capacità di proliferare e differenziarsi in epatociti maturi e/o cellule biliari è considerata cruciale per la rigenerazione del fegato.

Un'altra motivazione per l'utilizzo di queste cellule deriva dalla difficoltà di isolamento delle cellule epatiche non parenchimali umane (ad esempio, cellule stellate), causata dalla mancanza di marcatori affidabili. Inoltre, anche l'espansione in vitro delle cellule isolate e il mantenimento delle loro caratteristiche specifiche, è ancora una sfida. Pertanto, le cellule non parenchimali derivate da cellule staminali o progenitrici possono potenzialmente superare le difficoltà legate all'isolamento e all'espansione in vitro [6].

È anche possibile generare HPC da fonti extraepatiche come le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) o le cellule staminali pluripotenti embrionali e indotte umane (Human Embryonic Stem Cells, hESC; Human Induced Pluripotent Stem Cells, hiPSC). Le HPC derivate da cellule staminali si differenziano in cellule chiamate "cellule simili a epatociti" (Hepatocyte-Like Cells, HLC), poiché non riproducono completamente tutte le caratteristiche degli epatociti maturi [33].

3.2.1 Cellule epatiche fetali

Diversi gruppi hanno utilizzato HPC fetali murine o umane per gli studi di ripopolamento. Sono state confrontate, ad esempio, le capacità di insediamento e ripopolamento di epatociti murini adulti o fetali di E14,5 (embryonic day 14) in scaffold decellularizzati di fegato di ratto. Entrambi i tipi di cellule si sono insediati efficacemente quando sono stati infusi attraverso i dotti biliari, dando origine a un ripopolamento iniziale di circa l'80%. Due giorni dopo l'infusione, la percentuale di cellule positive per Ki-67 (una proteina usata per determinare il grado di proliferazione) era significativamente più alta nei fegati decellularizzati seminati con epatociti fetali rispetto a quelli postnatali; di conseguenza, il ripopolamento è stato significativamente maggiore dopo l'infusione di epatociti fetali [6].

Un altro studio ha utilizzato le HPC fetali, sovraesprimendone il fattore di crescita dell'epidermide. L'esperimento ha dimostrato che la modifica delle cellule progenitrici epatiche fetali ha migliorato i loro tassi di sopravvivenza e proliferazione quando sono state trapiantate in scaffold decellularizzati di fegato, evidenziando l'importanza dei fattori di crescita nel potenziare il successo di tali procedure di ripopolamento [34].

3.2.2 Cellule staminali pluripotenti indotte umane

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) possono essere generate da qualsiasi cellula nucleata mediante riprogrammazione cellulare e successivamente ri-differenziate in cellule simili a epatociti. Il principale vantaggio delle hiPSC è che hanno una capacità di auto-rinnovamento molto estesa, consentendo la creazione di dosi cellulari molto grandi che possono essere successivamente differenziate in un numero sufficiente di HLC per la ricellularizzazione di un fegato decellularizzato di dimensioni umane. Alcuni ricercatori hanno generato cellule simili a epatociti da hiPSC e le hanno infuse nel fegato di ratto decellularizzato tramite il dotto biliare [55]. Due giorni dopo la coltura di perfusione, le cellule insediate hanno colorato positivamente per l'albumina, l'Alpha-Fetoproteina (AFP) e il CYP3A4 (enzima coinvolto nel processo di metabolizzazione di farmaci) e i livelli di mRNA del CYP3A4 erano più alti rispetto a quelli misurati nelle colture di controllo 2D. Il fegato ottenuto, inoltre, mostrava alcune delle normali funzioni epatiche, come la sintesi proteica e lo smaltimento di farmaci. Tuttavia, i livelli cumulativi di albumina nei supernatanti delle colture erano significativamente più bassi nei fegati trapiantati rispetto alle colture di controllo 2D [6,7].

Più recentemente, altri ricercatori hanno seminato uno scaffold di fegato decellularizzato con le iPSC non differenziate, in modo da massimizzare l'esposizione delle iPSC alla matrice del fegato prima della differenziazione [35]. Dopo una settimana, hanno scoperto che queste cellule si sono trasformate in HLC più mature perché erano circondate dalla struttura del fegato. È stato osservato anche che il profilo di espressione genica durante le diverse fasi di differenziazione era più simile allo sviluppo naturale, dimostrando ulteriormente che questa tecnica può essere utile per creare nuove cellule epatiche in modo più efficace.

Va tenuto presente, però, che al momento le HLC derivate da hiPSC non sono completamente mature. Inoltre, la presenza di iPSC non differenziate può dare origine a teratomi. Un punto a favore delle HLC derivate da iPSC è che queste ultime potrebbero essere autologhe, eliminando la necessità di trattamenti immunosoppressivi dopo il trapianto. Tuttavia, il tempo necessario per generare iPSC autologhe, l'espansione delle iPSC, la differenziazione verso le HLC e la valutazione della qualità prima che diventi possibile trapiantare le cellule in scaffold di fegato decellularizzato, può superare il periodo in cui è necessario un nuovo organo per supportare/trattare i pazienti con malattia epatica in fase terminale. In tale scenario, potrebbero essere considerati fegati pronti per il trapianto ricoperti di iPSC-HLC allogene, anche se i riceventi richiederebbero quindi una terapia immunosoppressiva [6].

3.2.3 Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) derivate da varie fonti, tra cui midollo osseo e tessuto adiposo, possono sostenere la funzione e la rigenerazione del fegato in pazienti con cirrosi epatica. Tuttavia, il meccanismo principale per l'effetto terapeutico delle MSC è il supporto trofico del fegato endogeno, migliorando la rigenerazione parenchimale attraverso la prevenzione dell'apoptosi, la stimolazione della proliferazione degli epatociti e l'angiogenesi e l'attivazione delle cellule staminali residenti [33].

Ci sono, però, anche studi che indicano che le MSC potrebbero essere utilizzate per ripopolare i fegati decellularizzati. In uno studio, alcuni ricercatori hanno perfuso dei fegati di topo decellularizzati con MSC derivate dal midollo osseo di topo, e successivamente hanno indotto una risposta epatica dopo il trapianto [57]. Rispetto alla differenziazione in colture 2D, l'ambiente microscopico del fegato decellularizzato ha migliorato l'espressione di marcatori specifici degli epatociti a livello di mRNA (come i fattori di trascrizione HNF-1/4A e HNF-1B) e a livello proteico (come ALB e CK19). In un altro studio, le cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo di suino sono state seminate su pezzi di fegato di suino decellularizzati (senza perfusione) [58]. Sebbene sia stata dimostrata la vitalità delle cellule seminate dopo 10 giorni di coltura statica in vitro, non è stata testata la possibile induzione di una risposta epatica negli scaffold decellularizzati [6].

3.2.4 Conclusioni sui diversi tipi di cellule

Nel contesto complessivo, è possibile affermare che le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono di grande valore quando si tratta di studiare quanto gli scaffold di fegato decellularizzato possano simulare l'ambiente naturale del fegato. In particolare, il contributo dell'architettura della ECM intatta e senza residui, che può essere raggiunto solo mediante decellularizzazione per perfusione, sarebbe ideale per lo studio della possibile differenziazione epatica delle cellule staminali mesenchimali insediate. È fondamentale tenere presente, però, che il successo degli scaffold di fegato ripopolati dipende in gran parte dal grado di differenziazione epatica raggiunto dalle cellule trapiantate. In questo senso, le cellule staminali epatiche, le cellule progenitrici epatiche (HPC) o le cellule simili agli epatociti derivate da cellule staminali pluripotenti (iPSC-HLC) (e/o eventuali cellule non parenchimali) rappresentano probabilmente candidati molto più promettenti. Infine, resta importante sottolineare che le MSC hanno dimostrato di avere effetti trofici positivi, cioè di promuovere la crescita e la funzionalità delle cellule circostanti. Questa caratteristica potrebbe essere sfruttata per migliorare il

ripopolamento delle cellule epatiche. Studi futuri potrebbero quindi investigare l'effetto sinergico delle MSC co-infuse con epatociti e/o cellule non parenchimali [6,7].

Per quanto riguarda il metodo migliore per seminare le cellule, l'utilizzo del sistema biliare per l'insediamento degli epatociti potrebbe essere più efficace rispetto all'uso del sistema vascolare. Inoltre, anche l'iniezione diretta nel parenchima potrebbe potenziare il ripopolamento parenchimale, nonostante sia un metodo più invasivo, poiché l'iniezione con ago potrebbe danneggiare localmente i capillari nel sito di iniezione. Utilizzare differenti tratti vascolari degli scaffold epatici tramite semina sequenziale potrebbe ulteriormente migliorare l'efficienza dell'adesione parenchimale. Poiché il trapianto di scaffold di fegato ripopolati richiede anche che il rivestimento endoteliale sia ripopolato, la via di infusione per gli epatociti o le HLC deve essere selezionata con attenzione: l'approccio deve garantire che il lume dei principali tratti vascolari, ad esempio la vena porta e la vena centrale e le arterie epatiche, così come i tratti sinusoidali, rimangano accessibili per l'impianto di cellule endoteliali [6].

3.3 Rigenerazione vascolare

Il ripopolamento efficace del parenchima con epatociti, cellule staminali epatiche (HPC) o cellule simili agli epatociti (HLC) è essenziale per la funzionalità epatica dello scaffold ripopolato. Tuttavia, un criterio altrettanto importante per generare un organo ripopolato trapiantabile è la rigenerazione del sistema vascolare, in modo che l'organo possa essere collegato al sistema vascolare del ricevente e i vasi endogeni rimangano pervi. Inoltre, la barriera endoteliale impedisce il contatto del sangue con i componenti della matrice extracellulare sottostante. Se la ECM è esposta al lumen vascolare, le piastrine circolanti aderiscono ad essa tramite integrine principalmente mediate dal fattore di von Willebrand associato alla parete vascolare. Sebbene questa cascata di eventi rappresenti un meccanismo di difesa utilizzato per fermare il sanguinamento causato da lesioni, un'eccessiva deposizione di piastrine nel lumen vascolare causa trombosi e ostacola il normale flusso sanguigno.

Nel lumen dei grandi tratti vascolari nei fegati decellularizzati, le fibre di collagene sono abbondantemente esposte, creando un substrato eccellente sia per la deposizione di piastrine che per l'adesione delle cellule endoteliali tramite un processo mediato dalle integrine. Pertanto, per poter trapiantare con successo un organo ripopolato in vivo e prevenire la coagulazione del sangue, è necessario dare priorità all'endotelizzazione del sistema vascolare. Per realizzare ciò, le cellule endoteliali vengono perfuse attraverso il tratto venoso o arterioso dei trapianti decellularizzati [6]. Per l'applicazione umana, lo scaffold ripopolato richiede essenzialmente

cellule endoteliali di origine umana, incorporando cellule endoteliali macrovascolari e cellule endoteliali sinusoidali epatiche.

3.3.1 Cellule endoteliali macrovascolari

Al momento, le cellule utilizzate per ripopolare e rigenerare il sistema vascolare di un fegato decellularizzato sono le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC). Vari gruppi hanno utilizzato le HUVEC per rivestire il lume della parete macrovascolare di fegati decellularizzati di ratti, suini e umani, adottando strategie leggermente diverse [36]. Testando le diverse portate di perfusione sul comportamento angiogenico delle HUVEC innestate nei fegati decellularizzati di ratti, è stato dimostrato che le proprietà sia dei tratti macrovascolari che di quelli sinusoidali, così come l'orientamento delle HUVEC nel lumen vascolare, dipendono fortemente dalla portata di flusso applicata. Questi risultati hanno aperto la strada per la re-endotelizzazione degli scaffold, ma rimane di fondamentale importanza testare questi parametri in fegati delle dimensioni umane, come quelli dei suini. Uno studio del 2020, invece, ha dimostrato che le HUVEC, che inizialmente aderivano al lumen macrovascolare, hanno anche ripopolato il letto capillare all'interno del parenchima degli scaffold decellularizzati di fegati suini [39]. È interessante notare che ciò era associato a un'apparente transizione da cellule endoteliali macrovascolari caratterizzate dalla presenza di CD31+ (una molecola multifunzionale con diversi ruoli nella modulazione dell'adesione cellulare mediate dalle integrine) a cellule con un fenotipo simile alle cellule endoteliali sinusoidali epatiche, caratterizzato dalla presenza di LYVE1 (un altro marcatore specifico), indicando che i segnali per la formazione delle cellule endoteliali sinusoidali epatiche potrebbero essere conservati nell'albero vascolare del scaffold decellularizzato [6].

3.3.2 Cellule endoteliali sinusoidali epatiche

L'endotelizzazione dei sinusoidi parenchimali è tanto importante quanto quella del lumen macrovascolare, dato che i sinusoidi costituiscono una barriera tra il sangue sinusoidale e gli epatociti. Questo è particolarmente importante se il parenchima degli scaffold è anche ripopolato da epatociti. Infatti, il contatto diretto tra gli epatociti e il sangue può causare una reazione infiammatoria istantanea mediata dal sangue (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction, IBMIR), tramite l'attivazione di cellule infiammatorie, tra cui monociti, granulociti e cellule NK. L'insorgenza dell'IBMIR può essere prevenuta mediante un rivestimento endoteliale dei sinusoidi negli scaffold [6]. In una ricerca del 2018, in cui sono stati perfusi sia epatociti che LSEC in uno scaffold decellularizzato, è stato osservato che le LSEC hanno

sostenuto la vitalità degli epatociti sotto perfusione sanguigna, mantenendo la loro funzione e sopprimendo la formazione di trombi nello scaffold ripopolato [37].

3.4 Co-coltura di cellule parenchimali e non parenchimali

La funzionalità generale del fegato in vivo si basa sull'attività e l'intercomunicazione di diversi tipi cellulari, tra cui gli epatociti, le cellule endoteliali macrovascolari, le cellule endoteliali sinusoidali, le cellule stellate e i periciti. Idealmente, i fegati ripopolati dovrebbero includere sia il parenchima che tutte le cellule non parenchimali nella loro posizione anatomicamente corretta in tutto il lobulo epatico.

Diversi studi hanno dimostrato che la co-semina di cellule epatiche ed endoteliali ha portato a livelli più elevati di specifici marcatori epatici, come l'albumina, il CYP3A4 e il GPX1, rispetto alla semina di cellule epatiche da sole. Questi risultati indicano che la co-semina e la co-coltura di epatociti e cellule endoteliali possono migliorare la funzionalità e la risposta del fegato ripopolato [6,49].

Per quanto riguarda il ripopolamento delle cellule di Kupffer, studi condotti su topi hanno dimostrato che i macrofagi derivati da cellule staminali ematopoietiche adulte possono acquisire le proprietà delle cellule di Kupffer e sostituirle quando queste ultime vengono eliminate tramite decellularizzazione [48].

Infine, come discusso in precedenza, le cellule staminali pluripotenti offrono una promettente fonte per il ripopolamento del fegato poiché possono differenziarsi in diverse tipologie cellulari, inclusi gli epatociti e altre cellule non parenchimali come colangiociti, cellule endoteliali e cellule stellate. Un esperimento condotto con iPSC ha dimostrato che queste cellule possono essere seminate insieme a cellule mesenchimali e a fibroblasti epatici primari in fegati decellularizzati di ratto, ottenendo un ripopolamento significativo dei compartimenti vascolare, biliare e parenchimale, con funzionalità epatica confermata dalla produzione di acidi biliari, urea e A1AT umana [50].

Capitolo 4: Principali problematiche da affrontare

La compatibilità di scaffold ricellularizzati nei confronti dell'organismo ricevente è un aspetto critico da considerare nelle procedure di trapianto e riguarda la capacità del fegato ripopolato di interagire con l'organismo ospite senza causare reazioni avverse o complicazioni. Il problema della compatibilità sorge, come già discusso, durante il processo di decellularizzazione, in quanto la qualità dello scaffold decellularizzato influisce direttamente sulla capacità del tessuto/organo di essere accettato dal ricevente in un'applicazione clinica. L'eliminazione delle cellule e la minimizzazione del danno alla matrice extracellulare, però, non bastano ad assicurare che, una volta ricellularizzato il tessuto o l'organo, questo non presenti altri fattori che lo facciano risultare incompatibile con l'organismo ricevente. I principali punti chiave relativi alla compatibilità di uno scaffold di fegato ricellularizzato, che verranno affrontati in questo capitolo, sono la trombogenicità, l'Anoikis, l'immunogenicità e il funzionamento delle cellule impiantate con l'organismo del ricevente. Altri temi importanti riguardano la scarsità di scaffold umani disponibili e la sicurezza a lungo termine dell'organo trapiantato. Affrontare queste sfide è fondamentale per il successo dei fegati ricellularizzati che vengono trapiantati. Gli sviluppi nella tecnologia e nella ricerca medica mirano ad estendere l'applicabilità di tali procedure, in modo da aprire nuove opportunità nella medicina rigenerativa e nel trattamento delle malattie epatiche.

4.1 Trombogenicità

Il termine trombogenicità si riferisce alla tendenza o alla capacità di un materiale di promuovere la formazione di coaguli di sangue e trombi. Questi coaguli portano all'ostruzione di vasi sanguigni ed eventualmente all'interruzione del flusso di sangue, il che può causare gravi problemi di salute.

Il vantaggio di avere uno scaffold decellularizzato, che preservi una rete vascolare intatta, va a scapito dello strato di cellule endoteliali. In assenza di questo strato, i componenti della matrice extracellulare esposti al flusso sanguigno, in particolare il collagene, attivano le piastrine e ne favoriscono l'aggregazione, generando trombina e successivamente fibrina, enzimi responsabili della formazione di trombi (Figura 4.1A) [7]. Inoltre, anche il DNA residuo dovuto ad un'incompleta decellularizzazione può attivare le piastrine ed indurre effetti che favoriscono l'infiammazione e la formazione di coaguli di sangue nello spazio extracellulare, promuovendo così lo sviluppo di immunotrombosi. Questo contribuisce a una fornitura inadeguata di nutrienti e di ossigeno alle cellule impiantate, il che ostacola la sopravvivenza a lungo termine del neo-

fegato. Pertanto, ripristinare il flusso sanguigno dell'organo richiede l'inibizione dei fattori che causano trombosi e la costruzione di un nuovo strato endoteliale [7].

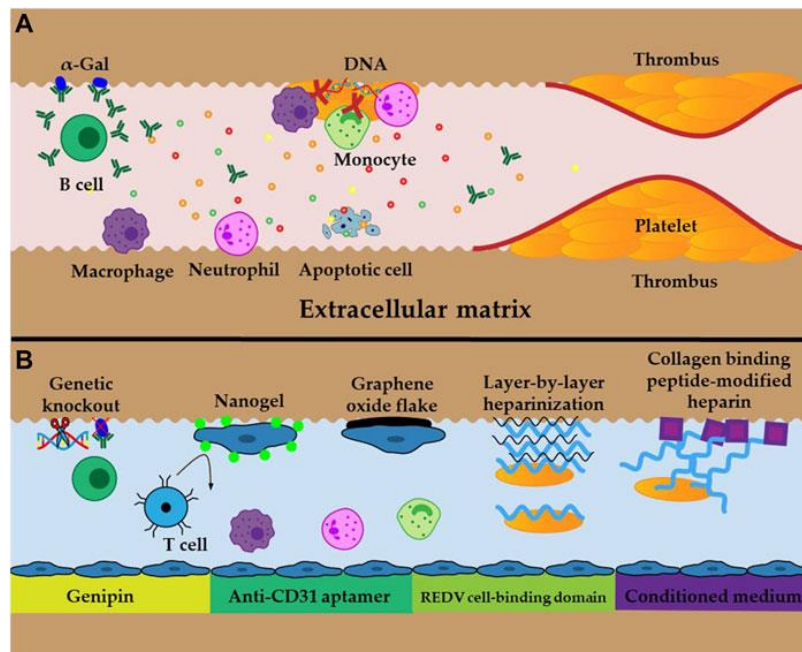


Figura 4.1: Rappresentazione schematica delle problematiche principali che si riscontrano nell'innesto di scaffold ricellularizzati, tra cui trombogenicità, Anoikis e immunogenicità (A), e i principali approcci per la loro risoluzione (B).

4.1.1 Eparinizzazione vascolare

La eparinizzazione vascolare è stata suggerita da diversi gruppi di ricercatori perché in grado di ridurre le proprietà pro-trombogene del collagene e migliorare l'emocompatibilità generale degli scaffold. Grazie alle sue proprietà anticoagulanti, l'eparina è utilizzata ampiamente e con successo per rivestire protesi a contatto con il sangue [51]. Il rivestimento di eparina sulle superfici vascolari degli scaffold decellularizzati di fegato può essere ottenuto mediante un processo di immobilizzazione elettrostatica strato su strato o tramite coniugazione covalente con EDC-NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimmide) - (N-idrossisuccinimide) (Figura 4.1B) [6].

Studi sia in vivo che in vitro hanno dimostrato che il deposito strato per strato di eparina sugli scaffold decellularizzati immobilizza l'eparina, prevenendo efficacemente la trombosi, rispetto agli scaffold non trattati; inoltre, né la ricellularizzazione né la funzione degli epatociti vengono influenzate [52]. Una strategia simile è stata applicata anche a fegati di maiale decellularizzati. Tuttavia, oltre all'immobilizzazione elettrostatica, l'eparina è stata anche coniugata in modo covalente al lumen vascolare degli scaffold [53]. Quando questi sono stati trapiantati in suini, si è osservata una massiccia formazione di trombi nel tratto portale degli scaffold non modificati

nei primi venti minuti, mentre non sono stati osservati segni visibili di trombosi per un'ora nei fegati eparinizzati covalentemente ed elettrostaticamente. Tuttavia, il flusso sanguigno è diminuito progressivamente dall'afflusso all'efflusso dopo un'ora nei fegati eparinizzati. L'assenza di endotelio continuo ha causato la fuoriuscita di sangue nel parenchima, ostacolando, quindi, il flusso sanguigno in tutto lo scaffold, a partire dai sinusoidi. Pertanto, anche se l'eparinizzazione potrebbe prevenire l'insuccesso del trapianto dovuto alla deposizione di piastrine, la re-endotelizzazione è essenziale per il funzionamento a lungo termine dei fegati ricellularizzati [6,7].

Fino ad oggi, nessuno studio ha raggiunto una perfusione in vivo a lungo termine a causa di una rivascularizzazione imperfetta, il che dunque rimane un problema critico da affrontare.

4.2 Anoikis

Con Anoikis si intende un tipo di morte cellulare programmata (apoptosi) che si verifica quando le cellule staccate dalla loro matrice extracellulare perdono la capacità di aderirvi e si trovano in uno stato di mancato ancoraggio. Le cellule, infatti, devono essere ancorate al loro ambiente circostante per sopravvivere e funzionare correttamente.

La perfusione ex vivo e il ripristino del flusso sanguigno dopo il trapianto generano specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), molecole altamente reattive contenenti ossigeno, che possono causare danni cellulari. I ROS ostacolano l'adesione delle cellule all'interno della matrice extracellulare e inducono l'Anoikis, che può portare ad un basso tasso di successo dell'impianto e di sopravvivenza delle cellule impiantate. Inoltre, l'accumulo di ROS e lo stato infiammatorio che ne consegue possono sopprimere la proliferazione cellulare e aumentare la senescenza cellulare e la morte, riducendo ulteriormente la vitalità residua delle cellule impiantate. Di conseguenza, è stata avanzata la proposta di integrare il trapianto con antiossidanti per neutralizzare i ROS, migliorando così la capacità delle cellule di resistere all'apoptosi.

Oltre agli antiossidanti, sono stati sviluppati approcci di *cross-linking* per migliorare l'adesione cellulare alla matrice extracellulare e aumentare il successo dell'innesto. Il cross-linking si riferisce alla formazione di legami chimici tra le molecole, che possono rinforzare e stabilizzare la struttura della ECM, perché contribuiscono a mantenere l'ancoraggio delle cellule ad essa e migliorano l'adesione delle cellule impiantate. Questi approcci includono l'uso di nanogel, fogli di ossido di grafene, induttori anti-CD31, terreni condizionati (*conditioned media*) e domini di legame cellulare REDV (Figura 4.1B). Sono approcci molto promettenti per quanto riguarda la

sopravvivenza a lungo termine dell'impianto e delle cellule, oltre ad accelerare e migliorare la ricostruzione della vascolarizzazione nei fegati bioingegnerizzati [7].

4.3 Immunogenicità

L'immunogenicità è la capacità di un determinato materiale, sostanza o impianto di attivare una risposta immunitaria da parte del sistema immunitario dell'organismo ospite. In altre parole, è la misura di quanto il sistema immunitario del paziente reagisce contro una sostanza estranea o un impianto. Un materiale con alta immunogenicità è propenso a scatenare una forte reazione immunitaria, mentre è raro che succeda con un materiale a bassa immunogenicità. Il trapianto allogenico tradizionale tende a essere altamente immunogenico, poiché il sistema immunitario del ricevente riconosce l'impianto come estraneo e cerca di respingerlo. La decellularizzazione, che mira ad eliminare del tutto il materiale genetico della fonte allogenica o xenogenica, attenua significativamente la risposta immunitaria dell'ospite nei confronti dell'impianto. Tuttavia, la rimozione incompleta dei componenti cellulari durante il processo di decellularizzazione può provocare gravi risposte immunitarie; rispettare i criteri standard proposti per la valutazione dello scaffold decellularizzato è un buon punto di partenza per minimizzare la risposta immunitaria.

La chiave per garantire che i fegati ricellularizzati sopravvivano a lungo termine all'interno dell'organismo sta, quindi, nella riduzione dell'immunogenicità, che è influenzata da indicatori critici, come i residui di xenoantigeni. Questi includono il DNA residuo e il galattosio- α 1,3-galattosio (α -Gal) (Figura 4.1A). Per ridurre il DNA residuo, è possibile migliorare il protocollo di decellularizzazione; per la riduzione di α -Gal, invece, si propone di utilizzare approcci genetici per eliminare il gene responsabile della sua produzione. Questi approcci hanno mostrato un abbassamento della risposta immunitaria dopo il trapianto [7].

Quando sezioni dello scaffold epatico vengono impiantate sottocute in animali (sia della stessa specie che di specie diversa), la risposta immunitaria è inizialmente elevata. Nonostante ciò, è stato osservato che, col passare del tempo, questa risposta diminuisce notevolmente perché il corpo si adatta alla presenza dell'innesto. Ciò ha confermato la somiglianza dei componenti dello scaffold tra le diverse specie e ridotto le preoccupazioni future riguardo alle proprietà della matrice quando si valuta la risposta immunitaria dell'ospite a uno scaffold ricellularizzato [38].

Un esempio del successo degli immunosoppressori, invece, è presentato in uno studio del 2020, in cui viene confrontata l'immunogenicità di innesti di fegati ricellularizzati con HUVEC, trattati e non con immunosoppressori [39]. Lo scaffold impiantato senza immunosoppressori è

stato perso entro 3 giorni dall'innesto; la sopravvivenza, però, è aumentata di più di 15 giorni quando è stato applicato un regime immunosoppressivo al fegato decellularizzato, e può potenzialmente durare più a lungo se il trattamento immunosoppressivo viene mantenuto [6].

4.3.1 Genipina e glutaraldeide

Tra le strategie adottate per ridurre l'interazione delle cellule del sistema immunitario con la matrice extracellulare e favorire l'adesione delle cellule impiantate a quest'ultima, rientra l'uso del processo di cross-linking mediante l'impiego di genipina e glutaraldeide (Figura 4.1B). In una ricerca condotta nel 2016, sono stati decellularizzati fegati suini (noti per la loro immunogenicità), e successivamente trattati con genipina o glutaraldeide [40]. Il trattamento con genipina ha permesso di controllare il modo in cui le cellule del sistema immunitario si comportano e proliferano, rendendo le matrici meno inclini a scatenare una risposta immunitaria quando vengono utilizzate in trapianti con un diverso antigene (xenoantigenici). In altre parole, il trattamento con genipina sembra rendere le matrici meno riconoscibili come estranee al sistema immunitario del ricevente, riducendo così il rischio di rigetto quando vengono impiantate in un organismo diverso da quello di origine. Inoltre, è stato scoperto che, rispetto alla glutaraldeide, la matrice extracellulare del fegato trattata con genipina ha migliori biocompatibilità e caratteristiche meccaniche, e le risposte immunitarie in vivo dell'ospite sono state inferiori [7].

4.3.2 Scarsità di fegati umani

La scarsità di fegati umani da cui ottenere scaffold decellularizzati rappresenta una sfida significativa nella ricerca sulla rigenerazione epatica. Ciò è dovuto principalmente alla limitata disponibilità di fegati umani donati per scopi di ricerca, oltre alla necessità di fegati umani per scopi di trapianto clinico. Alcuni ricercatori hanno proposto, come alternativa per la ricerca, di colonizzare con cellule umane l'interno di scaffold di fegato animale, al fine di imitare le caratteristiche dei fegati umani; questo approccio sta alla base dello xenotrapianto [54]. A differenza della microstruttura inaccettabile dei fegati umani non utilizzabili nei trapianti tradizionali, i fegati animali sono ideali e facilmente disponibili per la proliferazione e differenziazione di cellule umane [6].

L'uso di fegati xenogenici nel trapianto umano solleva, però, delle preoccupazioni, legate all'immunogenicità e alla compatibilità con il sistema immunitario del ricevente, dovute alla presenza di α -Gal. È stato dimostrato che, quando trapiantati in primati non umani, tessuti di maiali decellularizzati in cui è stato ridotto il gene per la produzione di α -Gal esibiscono

comportamenti fisiologicamente simili a tessuti suini non trattati, con il vantaggio di una ridotta risposta immunitaria avversa [41]. Tuttavia, questi metodi presentano problemi di regolazione e di complessità, e sono molto dispendiosi sia a livello di tempo che di risorse. È stata, inoltre, espressa una notevole preoccupazione per la possibilità di trasmissione di retrovirus endogeni suini al ricevente e al personale medico [7].

Un altro approccio per ridurre l'immunogenicità dell'organo consiste nella decellularizzazione di tessuti umani alternativi con componenti strutturali o chimici simili all'organo che devono sostituire. Ad esempio, scaffold ottenuti da ECM splenica decellularizzata hanno mostrato risultati promettenti per la bioingegnerizzazione del fegato e del pancreas [7].

4.4 Considerazioni finali

Nell'utilizzo di scaffold di fegato decellularizzato e ripopolato, sorgono questioni rilevanti relative all'immunogenicità, alla trombogenicità e all'apoptosi, che richiedono un'attenta valutazione e risoluzione. In particolare:

- la mancanza di un rivestimento endoteliale sulla matrice extracellulare esposta può favorire l'attivazione di piastrine e la formazione di trombi, ostacolando la perfusione sanguigna e minacciando la sopravvivenza delle cellule;
- la perfusione e l'ossidazione durante il trapianto possono generare ROS, inducendo l'Anoikis, una forma di apoptosi causata dalla mancanza di adesione delle cellule alla matrice extracellulare;
- la presenza di residui cellulari può innescare una reazione immunitaria indesiderata, compromettendo l'integrità e la funzionalità dell'organo trapiantato.

Affrontare queste sfide richiede il concorso coordinato di diversi approcci, compresi il miglioramento delle tecniche di decellularizzazione, l'uso di agenti anticoagulanti come l'eparina, l'impiego di antiossidanti per mitigare i danni da ROS, e strategie di cross-linking per migliorare l'adesione cellulare. Inoltre, la continua ricerca su scaffold da fonti alternative, come la milza, potrebbe offrire soluzioni promettenti per diversificare la disponibilità di organi destinati all'ingegnerizzazione del fegato.

Conclusione

In questa tesina sono stati approfonditi gli aspetti principali che riguardano la bioingegnerizzazione del fegato, partendo dall'anatomia macroscopica e microscopica dell'organo, e portando successivamente il focus sui metodi di decellularizzazione e ripopolamento. È stato possibile concludere che la decellularizzazione e il ripopolamento di scaffold di fegato rappresentano una promettente area di ricerca nell'ambito della medicina rigenerativa e della ingegneria tissutale e potrebbero risolvere i problemi relativi alla scarsità di fegati trapiantabili disponibili da donatore.

Tuttavia, ci sono sfide significative ancora da affrontare, come la standardizzazione delle procedure di decellularizzazione, l'ottimizzazione delle tecniche di ripopolamento, il miglioramento delle capacità di differenziazione delle cellule ripopolanti, e la gestione delle possibili reazioni immunitarie nel caso di trapianto di scaffold ripopolati. Oltre ad affrontare queste sfide, la ricerca futura verterà su tre nuove prospettive: la Bio-Stampa (Bioprint) 3D di Tessuto Epatico, l'utilizzo di organoidi tridimensionali e l'applicazione delle matrici extracellulari nei test farmacologici [42].

La Bio-Stampa 3D è una combinazione di stampa 3D e ingegneria tissutale mediante l'uso di biomateriali, fattori biochimici e cellule viventi come "inchiostro". Nel caso della Bio-Stampa di tessuto epatico umano, i ricercatori stanno tentando di utilizzare la matrice extracellulare del fegato, ottenuta tramite tecniche di decellularizzazione, come Bio-Inchiostro (Bio-Ink). L'inchiostro biologico viene depositato in strati successivi, in modo analogo alla stampa 3D tradizionale, per creare una struttura tridimensionale del tessuto epatico. Questo approccio potrebbe offrire diverse applicazioni in campo biomedico e farmacologico, consentendo la produzione di tessuti epatici funzionali in laboratorio per scopi di ricerca, sviluppo di farmaci, modellazione delle malattie e potenzialmente anche per scopi terapeutici [43].

Lo scaffold decellularizzato può essere usato anche come substrato o ambiente tridimensionale per le colture e la crescita di organoidi epatici. Gli organoidi sono definiti come strutture tridimensionali organizzate derivate da diverse cellule staminali, in cui le cellule si auto-organizzano in molteplici tipi cellulari funzionali o progenitori, acquisendo alcune funzioni caratteristiche del tessuto nativo. In questo modo, gli organoidi mimano la struttura e la complessità di un organo.

Tra i metodi per produrre gli organoidi si distingue l'auto-assemblaggio di cellule su superfici rivestite da matrice extracellulare, ottenuta tramite decellularizzazione. Le tecniche basate sugli organoidi potrebbero essere utili in diverse applicazioni cliniche, come la modellazione delle

malattie, lo screening dei farmaci e gli impianti clinici. Finora, diversi studi relativi all'efficacia e alla sicurezza dei farmaci sono stati condotti su modelli animali. Recentemente, lo sviluppo di colture cellulari staminali epatiche 3D organizzate in organoidi ha aperto nuove opzioni in questo campo, consentendo la valutazione di alcuni aspetti patologici senza l'uso di modelli animali più onerosi in termini di tempo e costi [44]. Ad esempio, è stato osservato che le cellule ottenute da pazienti con malattie genetiche del fegato hanno mantenuto il fenotipo della malattia in coltura, permettendo ai ricercatori di studiarla [45].

Infine, le matrici extracellulari derivate da fegati decellularizzati possono essere applicate come nuovo strumento per il test dei farmaci. Un modello ideale per i test farmacologici dovrebbe avere due caratteristiche: assomigliare il più possibile a un essere umano e, allo stesso tempo, preservare l'integrità del soggetto testato. I modelli animali sono stati costantemente utilizzati, ma a causa della notevole variabilità interspecifica, insieme a questioni etiche e economiche, non sono risultati ideali per i test tossicologici e farmacologici. Al momento attuale, il golden standard riconosciuto per i test in vitro dei farmaci sono le colture primarie di epatociti umani. Per ricreare le condizioni istologiche e fisiologiche degli epatociti, che permettono uno studio della risposta ai farmaci, sono state testate diverse configurazioni di ECM e di terreno di coltura. Tuttavia, la riproduzione di un ECM simile a quello naturale è una sfida a causa della grande varietà di componenti prodotti da diversi tipi cellulari del fegato. Per superare queste limitazioni, si potrebbero utilizzare fegati bioingegnerizzati. L'architettura tridimensionale preservata e la composizione nativa dello scaffold del fegato decellularizzato sono in grado di guidare la differenziazione delle cellule staminali seminate verso le destinazioni degli epatociti adulti. Gli scaffold epatici rappresentano al meglio l'ambiente naturale in vivo in un sistema ex vivo e offrono enormi opportunità per lo sviluppo e i test di farmaci. Inoltre, l'uso di cellule staminali derivate dai pazienti consente la possibilità di testare le risposte specifiche dei pazienti ai farmaci [46].

In sintesi, l'utilizzo di tessuto epatico decellularizzato e/o ripopolato rappresenta un campo promettente per la ricerca biomedica e farmacologica, con il potenziale per rivoluzionare la capacità di studiare il fegato in vitro, sviluppare farmaci più efficaci e persino fornire soluzioni personalizzate per le malattie epatiche.

Bibliografia

- [1] Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol.* 2023 Aug;79(2):516-537.
- [2] Fallowfield JA, Jimenez-Ramos M, Robertson A. Emerging synthetic drugs for the treatment of liver cirrhosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2021 Jun;26(2):149-163.
- [3] Marinho A. Um estudo sobre as filas para transplantes no Sistema Unico de Saúde brasileiro [A study on organ transplantation waiting lines in Brazil's Unified National Health System]. *Cad Saude Publica.* 2006 Oct;22(10):2229-39.
- [4] Mirdamadi ES, Kalhori D, Zakeri N, Azarpira N, Solati-Hashjin M. Liver Tissue Engineering as an Emerging Alternative for Liver Disease Treatment. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020 Apr;26(2):145-163.
- [5] Peloso A, Dhal A, Zambon JP, Li P, Orlando G, Atala A. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Research & Therapy.* 2015;6(1):1-12.
- [6] Toprakhisar B, Verfaillie CM, Kumar M. Advances in Recellularization of Decellularized Liver Grafts with Different Liver (Stem) Cells: Towards Clinical Applications. *Cells.* 2023 Jan 13;12(2):301.
- [7] Dai Q, Jiang W, Huang F, Song F, Zhang J, Zhao H. Recent Advances in Liver Engineering with Decellularized Scaffold. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Feb 10; 10:831477.
- [8] Barbone S, Infortuna T. *Il corpo umano 1, Anatomia, Fisiologia e Igiene.* Lucisano. 2020 Mar 9;174.
- [9] Long MT, Friedman LS. Hepatic structure and function. In *Gastrointestinal Anatomy and Physiology* (eds J.F. Reinus and D. Simon). 2014
- [10] Martinez-Hernandez, A., Amenta, P.S. The hepatic extracellular matrix. *Vichows Archiv A Pathol Anat* 423. 1993;1–11.
- [11] Saxena R, Theise N, Crawford J. Microanatomy of the human liver—exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 1999;30(6):1339-1346.
- [12] Krishna, M. (2013), Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease*, 2: S4-S7.
- [13] Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis.* 1997;17(4):265-86.
- [14] Kamm DR, McCommis KS. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *J Physiol.* 2022 Apr;600(8):1825-1837.
- [15] Schulze RJ, Schott MB, Casey CA, Tuma PL, McNiven MA. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol.* 2019 Jul 1;218(7):2096-2112.

- [16] Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, et al. *Physiology, Liver*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
- [17] Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011; 13: 27-53
- [18] Willemse J, Lieshout R, van der Laan LJ, Verstegen MM. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2017; 31(2), 151-159.
- [19] McInnes AD, Moser MAJ, Chen X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. *J Funct Biomater*. 2022 Nov 14;13(4):240.
- [20] Azhim A, Syazwani N, Morimoto Y, Furukawa KS, Ushida T. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds. *J Biomater Appl*. 2014 Jul;29(1):130-41.
- [21] Afzal Z, Huguet EL. Bioengineering liver tissue by repopulation of decellularised scaffolds. *World J Hepatol*. 2023 Feb 27;15(2):151-179.
- [22] Friedrich E, Lanier S, Niknam-Bienia S, Arenas G, Rajendran D, Wertheim J, Galiano R. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018; 12(3), e1704-e1715.
- [23] Ghorbani F, Ekhtiari M, Moeini Chaghervand B, Moradi L, Mohammadi B, Kajbafzadeh A. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix. *Cell and Tissue Banking*. 2022; 23(1), 119-128.
- [24] Willemse J, Verstegen M, Vermeulen A, Schurink I, Roest H, van der Laan L, de Jonge J. Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure-controlled perfusion. *Materials Science and Engineering: C*. 2020.
- [25] Kim JK, Koh Y-D, Kim JO, Seo DH. Development of a Decellularization Method to Produce Nerve Allografts Using Less Invasive Detergents and Hyper/hypotonic Solutions. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg*. 2016; 69 (12), 1690–1696.
- [26] Das P, Singh Y, Mandal B, Nandi S. Tissue-derived decellularized extracellular matrices toward cartilage repair and regeneration. *Methods in cell biology*. 2021; 157, 185-221.
- [27] Rossi EA, Quintanilha LF, Nonaka CKV, Souza BSF. Advances in Hepatic Tissue Bioengineering with Decellularized Liver Bioscaffold. *Stem Cells Int*. 2019 May 6; 2019: 2693189.

- [28] Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A, Urbani L, Vinh Luong T, Al-Akkad W, Longato L, Brown D, Maghsoudlou P, Dhillon AP, Fuller B, Davidson B, Moore K, Dhar D, De Coppi P, Malago M, Pinzani M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep.* 2015 Aug 7; 5: 13079.
- [29] Geerts S, Ozer S, Jaramillo M, Yarmush M, Uygun B. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2016.
- [30] Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology.* 2011 Feb;53(2):604-17.
- [31] Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, Fukumitsu K, Faulk D, Jiang H, Badylak SF. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2011; 17(6), 677-686.
- [32] Wu Q, Bao J, Zhou YJ, Wang YJ, Du ZG, Shi YJ, Li L, Bu H. Optimizing perfusion-decellularization methods of porcine livers for clinical-scale whole-organ bioengineering. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:785474.
- [33] Tricot T, De Boeck J, Verfaillie C. Alternative Cell Sources for Liver Parenchyma Repopulation: Where Do We Stand? *Cells.* 2020 Feb 28;9(3):566.
- [34] Wang, X, Cui, J, Zhang, B-Q, Zhang, H, Bi, Y, Kang, Q, Wang, N, Bie, P, Yang, Z, Wang, H, Liu, X, Haydon, RC, Luu, HH, Tang, N, Dong, J, He, T-C. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. *J Biomed Mater Res Part A* 2014; 102A: 1017–1025.
- [35] Acun A, Oganessian R, Jaramillo M, Yarmush ML, Uygun BE. Human-Origin iPSC-Based Recellularization of Decellularized Whole Rat Livers. *Bioengineering (Basel).* 2022 May 19;9(5):219.
- [36] Watanabe M, Yano K, Okawa K, Yamashita T, Tajima K, Sawada K, Yagi H, Kitagawa Y, Tanishita K, Sudo R. Construction of sinusoid-scale microvessels in perfusion culture of a decellularized liver. *Acta Biomater.* 2019 Sep 1; 95:307-318.
- [37] Kojima H, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Miyauchi Y, et al. Establishment of Practical Recellularized Liver Graft for Blood Perfusion Using Primary Rat Hepatocytes and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Am. J. Transpl.* 2018; 18 (6), 1351–1359.
- [38] Mirmalek-Sani SH, Sullivan DC, Zimmerman C, Shupe TD, Petersen BE. Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue. *The American journal of pathology.* 2013; 183(2), 558-565.

- [39] Shaheen MF, Joo DJ, Ross JJ, Anderson BD, Chen HS, Huebert RC, Li Y, Amiot B, Young A, Zlochiver V, Nelson E, Mounajjed T, Dietz AB, Michalak G, Steiner BG, Davidow DS, Paradise CR, van Wijnen AJ, Shah VH, Liu M, Nyberg SL. Sustained perfusion of revascularized bioengineered livers heterotopically transplanted into immunosuppressed pigs. *Nat Biomed Eng.* 2020 Apr; 4(4): 437-445.
- [40] Wang Y, Bao J, Wu X, Wu Q, Li Y, Zhou Y, Li L, Bu H. Genipin crosslinking reduced the immunogenicity of xenogeneic decellularized porcine whole-liver matrices through regulation of immune cell proliferation and polarization. *Sci Rep.* 2016 Apr 21; 6:24779.
- [41] Stahl EC, Bonvillain RW, Skillen CD, Burger BL, Hara H, Lee W, Trygg CB, Didier PJ, Grasperge BF, Pashos NC, Bunnell BA, Bianchi J, Ayares DL, Guthrie KI, Brown BN, Petersen TH. Evaluation of the host immune response to decellularized lung scaffolds derived from α -Gal knockout pigs in a non-human primate model. *Biomaterials.* 2018 Dec; 187:93-104.
- [42] Croce S, Peloso A, Zoro T, Avanzini MA, Cobianchi L. A Hepatic Scaffold from Decellularized Liver Tissue: Food for Thought. *Biomolecules.* 2019 Dec 2; 9(12):813.
- [43] Du X. 3D Bio-Printing Review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 2018; 301(1), 6.
- [44] Sibuea, C, et al. Liver Decellularization as Liver Organoid Reconstruction Scaffold. *Buletin Farmatera.* 2021.
- [45] Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development.* 2015 Sep 15; 142(18):3113-25.
- [46] Vishwakarma SK, Bardia A, Lakkireddy C, Nagarapu R, Habeeb MA, Khan AA. Bioengineered humanized livers as better three-dimensional drug testing model system. *World J Hepatol.* 2018 Jan 27; 10(1):22-33.
- [47] European Chemical Agency (ECHA): 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenol, ethoxylated (Triton X-100)
- [48] Guilliams M, Bonnardel J, Haest B, Vanderborgh B, Wagner C, Remmerie A, Bujko A, Martens L, Thoné T, Browaeys R, De Ponti FF, Vanneste B, Zwicker C, Svedberg FR, Vanhalewyn T, Gonçalves A, Lippens S, Devriendt B, Cox E, Ferrero G, Wittamer V, Willaert A, Kaptein SJF, Neyts J, Dallmeier K, Geldhof P, Casaert S, Deplancke B, Ten Dijke P, Hoorens A, Vanlander A, Berrevoet F, Van Nieuwenhove Y, Saeys Y, Saelens W, Van Vlierberghe H, Devisscher L, Scott CL. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell.* 2022 Jan 20; 185(2):379-396.e38.

- [49] Hussein KH, Park KM, Kang KS, Woo HM. Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers. *Acta Biomater.* 2016 Jul 1; 38:82-93.
- [50] Takeishi K, de l'Hortet AC, Wang Y, Handa K, Guzman-Lepe J, Matsubara K, Soto-Gutierrez, A. Assembly and function of a bioengineered human liver for transplantation generated solely from induced pluripotent stem cells. *Cell reports.* 2020; 31(9).
- [51] Noishiki Y, Miyata T. A simple method to heparinize biological materials. *J Biomed Mater Res.* 1986 Mar; 20(3):337-46.
- [52] Bruinsma BG, Kim Y, Berendsen TA, Ozer S, Yarmush ML, Uygun BE. Layer-by-layer heparinization of decellularized liver matrices to reduce thrombogenicity of tissue engineered grafts. *J Clin Transl Res.* 2015 Jul 19;1(1):48-56.
- [53] Bao J, Wu Q, Sun J, Zhou Y, Wang Y, Jiang X, Bu H. Hemocompatibility improvement of perfusion-decellularized clinical-scale liver scaffold through heparin immobilization. *Scientific reports.* 2015; 5(1), 10756.
- [54] Lu T, Yang B, Wang R, Qin C. Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front Immunol.* 2020 Jan 23; 10:3060.
- [55] Minami T, Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ogiso S, Miyauchi Y, Kojima H, Kawai T, Yamaoka R, Oshima Y, Kawamoto H, Kotaka M, Yasuda K, Osafune K, Uemoto S. Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold. *Regen Ther.* 2019 Mar 30; 10:127-133.
- [56] Debnath T, Mallarpu CS, Chelluri LK. Development of Bioengineered Organ Using Biological Acellular Rat Liver Scaffold and Hepatocytes. *Organogenesis.* 2020 Apr 2;16(2):61-72.
- [57] Jiang WC, Cheng YH, Yen MH, Chang Y, Yang VW, Lee OK. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials.* 2014; 35(11), 3607-3617.
- [58] Ansari T, Southgate A, Obiri-Yeboah I, Jones LG, Greco K, Olayanju A. c Liver Scaffold. *Stem. Cells Dev.* 2020; 29, 314–326.