

Sperimentazione in vitro di un nuovo modello di bioreattore a flusso radiale contenente epatociti isolati



Ann. Ital. Chir., LXXI, 3, 2000

E. MORSIANI, A.C. PUVIANI*,
M. BROGLI*, P. PAZZI**, S. TOSATTI***,
L. VALIERI, P. GORINI, L. FOGLI,
D. GALAVOTTI^{oo}, M. BORRA^{oo},
C. BELLINI^o, P. SQUARZONI^o,
D. RICCI^e, R. REVERBERI[@], G. AZZENA

Patologia Speciale Chirurgica dell'Università di Ferrara ed
Azienda Ospedaliera Arcispedale Sant'Anna, Ferrara,

*Dipartimento di Biologia,

Sezione di Fisiologia Generale dell'Università di Ferrara,

**Servizio di Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera
Arcispedale Sant'Anna, Ferrara,

***Istituto di Anestesiologia e Rianimazione dell'Università
di Ferrara,

^oClinica Veterinaria, Molinella, Bologna,

^{oo}RanD S.r.L., Cavezzo, Modena,

^eDipartimento di Morfologia ed Embriologia,

Sezione di Anatomia Umana dell'Università di Ferrara,

[@]Servizio Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Arcispedale
Sant'Anna, Ferrara

Introduzione

L'insufficienza epatica acuta grave, nelle forme insorgenti in soggetti non affetti da pregressa epatopatia cronica, viene generalmente definita fulminante e comporta una mortalità che si aggira tra il 40 ed il 90% a seconda della eziologia (1, 2). Le cause possono essere infettive, tossiche, metaboliche e, più raramente, vascolari (1). Il trattamento di elezione è oggi rappresentato dal trapianto ortotopico di fegato a carattere d'urgenza, in quanto l'insorgenza di edema cerebrale con erniazione interna, può portare rapidamente al coma irreversibile ed a morte (3, 4). In questi casi vi è la necessità di un trattamento di supporto epatico fino a quando si renda disponibile un fegato per il trapianto, c.d. trattamento di bridging, o si abbia la regressione spontanea del quadro clinico per rigenerazione del fegato. Altra condizione clinica in cui può rendersi necessario un trattamento di supporto epatico è quella di non funzione primaria del fegato trapiantato, la dove è indicato un re-trapianto di fegato in condizioni di urgenza.

I sistemi artificiali di supporto epatico sperimentati in passato si basano sulla rimozione emodialitica dell'ammoniaca (5) o di altre sostanze solubili di peso molecolare medio compreso tra 400 e 1500 Daltons (6). Si è inol-

Riassunto

I sistemi di supporto epatico basati su epatociti sono oggetto di sperimentazione per il trattamento dell'insufficienza epatica acuta con lo scopo di sostenere il paziente fino al trapianto o di promuovere la rigenerazione spontanea del fegato. Le limitazioni nel trasporto ottimale di soluti ed O₂ rendono i bioreattori a fibre cave poco adatti all'impiego con epatociti. Per questo abbiamo sviluppato un bioreattore nel quale il flusso avviene in senso radiale dal centro alla periferia, con completo attraversamento da parte del fluido di perfusione di uno spazio chiuso occupato dalle cellule. Cinque grammi di epatociti isolati di maiale sono stati inoculati nel compartimento cellulare del bioreattore, costituito da una struttura tridimensionale di tessuto-non tessuto di poliestere. Tale struttura è compresa tra due fogli semipermeabili di polietersulfone. Le cellule epatiche sono state perfuse con terreno di cultura senza siero, mantenuto a 37° C ed ossigenato, al quale venivano aggiunti NH₄Cl e Lidocaina alle rispettive concentrazioni finali di 1 mM e 60 µg/ml. La rimozione dell'ammoniaca, la sintesi di urea, la produzione di monoetilglicina-xilidide (MEGX), la pO₂, la pCO₂, ed il pH, sono stati misurati durante i 14 giorni di durata dello studio. In una ulteriore serie di esperimenti, un bioreattore a flusso radiale di maggiori dimensioni, contenente 150 grammi di epatociti, è stato perfuso per 7 ore con plasma umano e la produzione di MEGX è stata testata dopo aggiunta di Lidocaina. Durante le 2 settimane di perfusione con terreno di coltura, abbiamo registrato una costante sintesi di urea, parallelamente alla detossificazione dell'ammoniaca, mentre le concentrazioni di MEGX sono progressivamente aumentate in risposta all'aggiunta di Lidocaina, dato quest'ultimo confermato anche nelle 7 ore di perfusione con plasma umano. L'esame ultrastrutturale al microscopio elettronico ha evidenziato epatociti adesi tra di loro ed al poliestere, con un aspetto tipico di cellule metabolicamente attive. Il nostro studio dimostra che epatociti isolati, perfusi all'interno del bioreattore a flusso radiale possono mantenere a lungo funzioni metaboliche e di biotrasformazione altamente differenziate, suggerendo un potenziale impiego del nostro modello per il supporto extracorporeo di pazienti con insufficienza epatica acuta.

Parole chiave: Epatociti isolati, bioreattore a flusso radiale, sistemi ibridi di supporto epatico, detossificazione dell'ammoniaca, sintesi di urea, metabolismo della Lidocaina, insufficienza epatica acuta.

Summary

A NEW RADIAL FLOW BIOREACTOR IN VITRO INVESTIGATION WITH ISOLATED HEPATOCYTES

Hepatocyte based artificial liver support systems are under investigation to support acute liver failure patients. The main purpose of such systems is to serve as a bridge to liver transplantation, or to promote spontaneous liver recovery. Limitation in mass-transfer capacity makes hollow-fiber bioreactors unsuited for long-term functioning of hybrid devices. We developed a novel radial-flow bioreactor in which the fluid perfuses the module from the center to the periphery, after having diffused through a space occupied by a three-dimensional structure filled with the hepatocytes. Five grams of freshly isolated porcine hepatocytes were seeded into uncoated, woven-non woven, hydrophilic polyester fabric, overlaid by two polyethersulfone membranes. Liver cells were perfused with 37° C-warm, oxygenated, serum-free tissue culture medium, in which NH₄Cl and Lidocaine were added at the final concentration of 1 mM and 60 µg/ml, respectively. Ammonium chloride removal, urea synthesis, monoethylglycinexylide (MEGX), pO₂, pCO₂, and pH were measured throughout the 14 day duration of the study. In a separate set of experiments, a scaled-up version of the radial flow bioreactor containing 150 grams of cells was perfused for 7 h with recirculating human plasma and MEGX production was monitored. During the 2 weeks of the study, an increasing production of urea was paralleled by constant ammonium removal. MEGX concentration after Lidocaine addition increased throughout the 14 days of perfusion with tissue culture medium, as well as after 7 hour perfusion with human plasma. Under transmission and scanning electron microscopy cells appeared attached to the polyester and one to each other, displaying ultrastructural features typical of functioning hepatocytes. Our study showed that liver cells were metabolically active when perfused into the radial-flow bioreactor. This configuration allowed close contact between media, or plasma, and cells at a physiological flow rate, by equalizing the concentration of the perfusing components, including O₂ throughout the module. Our results suggest a potential use of this system for temporary extracorporeal liver support in acute hepatic failure patients.

Key words: Isolated hepatocytes, radial flow bioreactor, liver support systems, ammonium detoxification, urea synthesis, lidocaine metabolism, acute liver failure.

tre sfruttata la possibilità di rimuovere dal sangue circolante la bilirubina od altre sostanze tossiche legate a proteine, utilizzando resine sintetiche a scambio ionico, mentre per la rimozione di sostanze liposolubili, come i polipeptidi, i mercaptani, le endotossine, i fenoli e gli aminoacidi aromatici, si è ricorsi all'uso di particelle di carbone attivato o di resine neutre (7). In generale però, questi sistemi non hanno dimostrato un significativo aumento della sopravvivenza nei pazienti con insufficienza epatica fulminante ed in particolare, scarso o nullo è stato l'effetto terapeutico sulla encefalopatia e sull'edema cerebrale (7, 8).

I sistemi bioartificiali di supporto epatico si basano sull'ipotesi che solamente la cellula epatica può sostituire le molteplici funzioni del fegato, primariamente quelle cosiddette di biotrasformazione, agendo efficacemente sulla encefalopatia e sull'edema cerebrale. Dopo i successi ottenuti con la perfusione extracorporea in circolazione crociata di un fegato isolato (9), tale metodica si scontra oggi con la scarsità di fegati umani a disposizione per il trapianto, con l'impossibilità di utilizzare organi di primati e, qualora si utilizzi un organo di maiale, con le limitazioni legate al rigetto iperacuto. Per queste ragioni, l'orientamento più moderno è quello di mettere a punto sistemi di supporto bioartificiali, od ibridi, in cui cioè la cellula epatica isolata viene utilizzata insieme ad altre componenti artificiali, sia attive che non attive (10).

Materiali e Metodi

Isolamento degli epatociti. Nel fegato bioartificiale (FBA) da noi sperimentato, le cellule epatiche vengono isolate attraverso la digestione collagenasica del fegato di suino. Gli animali donatori sono suini femmina di circa 3 mesi di età e 20 kg di peso, di razza Landrace bianca, specifico patogen-free, allevati e forniti appositamente per questo studio dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia-Romagna e della Lombardia, sede di Brescia. La sperimentazione è stata condotta in accordo con la legislazione vigente in tema di utilizzo degli animali da laboratorio a scopo scientifico e sotto la supervisione di un Medico Veterinario. Tutti gli isolamenti cellulari sono avvenuti tra le 9 e le 12 antimeridiane in animali in anestesia generale, intubati per via oro-tracheale e ventilati meccanicamente. Dopo laparotomia mediana, il fegato è stato dapprima devascularizzato e quindi perfuso *in situ* attraverso la vena porta con una soluzione 2 mM/L di acido etilenediaminotetracetico (EDTA) a 37 °C. Una volta espantato, il fegato è stato perfuso con una soluzione ossigenata a 37 °C, contenente lo 0,1% (peso/volume) di collagenasi (tipo P; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, USA). La soluzione collagenasica è stata fatta ricircolare per circa 20 minuti a 300 ml/min, fino alla disgregazione del parenchima epatico. Il fegato digerito è stato quindi risospeso in terreno MEM, modificato secondo Dulbecco (D-MEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), contenente il 10% di siero di vitello neonatale (NCS; Hyclone Lab. Inc., Logan, USA) a 4 °C, come precedentemente riportato (11). Con un procedimento semiautomatico di lavaggio, separazione, centrifugazione e recupero delle cellule, è stato possibile ottenere epatociti isolati di maiale in tempi rapidi ed in condizioni di sterilità (12). In breve, Il fegato digerito è dapprima filtrato per gravità attraverso 3 griglie in acciaio aventi porosità decrescente e successivamente la sospensione epatocitaria viene purificata ed arricchita utilizzando un processore per cellule ematiche (COBE 2991;

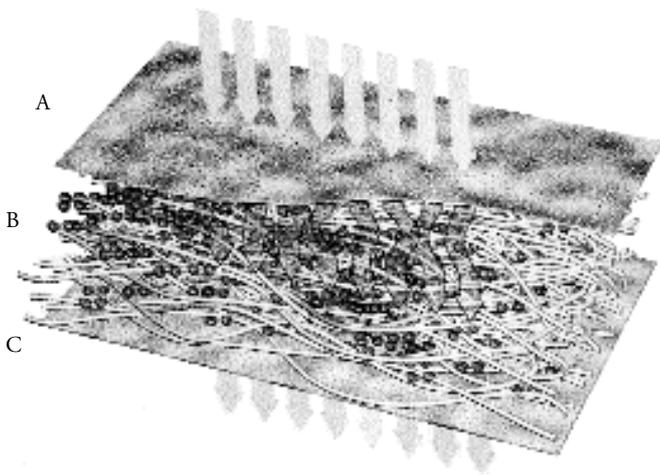


Fig. 1: Rappresentazione schematica della unità funzionale del bioreattore a flusso radiale. Le frecce verticali rappresentano il flusso del plasma, o del terreno di coltura, che avviene rispettivamente attraverso la prima membrana porosa di polietersulfone (A), attraverso lo strato di tessuto non tessuto di poliestere contenente gli epatociti isolati (B) ed infine attraverso la seconda membrana porosa di polietersulfone (C).

COBE Blood Component Technology, Lakewood, USA). Utilizzando questo apparato, gli epatociti vengono lavati due volte in volumi di circa 600 ml di D-MEM contenente il 10% di NCS a 4 °C e centrifugati a 50 X g. Al termine della procedura, il numero e la vitalità degli epatociti sono stati valutati utilizzando una camera di Burker al microscopio invertito, dopo colorazione con soluzione di trypan blue allo 0,4% (13).

Coltura in vitro. Per l'utilizzo del bioreattore per uso clinico da perfondere con plasma umano, le cellule ottenute sono state lavate in soluzione fisiologica. Per esperimenti che prevedevano la perfusione a lungo termine con terreno di coltura, aliquote di 1×10^8 cellule sono state dapprima inoculate in capsule di petri in plastica non rivestite, da 140 mm di diametro (Gibco Co., Milano) ed incubate in vitro per circa 18 ore in 65 ml di D-MEM con 10% di siero fetale di vitello (FBS; Hyclone Lab. Inc., Logan, USA), mantenute in atmosfera umida al 95% aria/5% CO₂, a 37 °C.

Bioreattore. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un bioreattore specificamente progettato per il FBA (14, 15). Il principio secondo cui esso è stato disegnato è quello di permettere il contatto diretto tra il plasma del paziente e le cellule epatiche di maiale. Per questo è stata adottata la geometria del flusso radiale, secondo la quale il plasma diffonde dal centro verso la periferia del bioreattore, dopo aver attraversato il comparto occupato dalle cellule (Fig. 1). Tale comparto è delimitato da due membrane porose di polietersulfone, aventi un cut-off nominale di 0,45 µm, che permette il passaggio massivo dei soluti plasmatici, mass transfer, ma non la fuga degli epatociti. Immediatamente dopo l'iso-

lamento, gli epatociti vengono inoculati nell'ambito di una struttura tridimensionale di microfilamenti di tessuto-non tessuto di poliestere biocompatibile.

Per gli esperimenti di perfusione in vitro di lunga durata, 5×10^8 epatociti di maiale con vitalità al test trypan blue > di 90%, sono stati inoculati in un bioreattore di scala ridotta e successivamente perfusi per due settimane con terreno di coltura senza siero, dopo 18 ore di coltura primaria in capsule petri. Per gli studi che prevedevano l'impiego di un prototipo clinico di bioreattore a maggior capacità cellulare e la perfusione con plasma umano, circa 15×10^9 cellule con vitalità al trypan blue > di 90%, sono state perfuse per un periodo di 7 ore.

Sistema di perfusione. Per gli esperimenti con terreno di coltura, il sistema di perfusione era costituito da una matassa di tubo di silicone gas-permeabile (Masterflex, Cole-Palmer, Chicago, IL, USA) parzialmente immerso in un bagno termostatico mantenuto a 43 °C, connesso al bioreattore e ad un reservoir per il terreno. L'ossigenazione del terreno avveniva per gorgogliamento diretto nel reservoir di una miscela di 95% O₂/5% CO₂, al flusso di circa 10 ml/min. Il ricircolo del mezzo di coltura era assicurato da una pompa peristaltica (Masterflex, Cole-Palmer, Chicago, IL, USA). Il terreno di coltura utilizzato è stato D-MEM senza siero, con aggiunta di 100 µg/L di Insulina, 34,8 µg/L di Glucagone, 67 µg/L di Desametasone (Sigma Aldrich, Milano), 3,2 µg/L di ZnSO₄·7H₂O, 1,2 µg/L di CuSO₄·5H₂O, 0,32 µg/L di MnSO₄·1H₂O, 12 ng/L di CrCl₆H₂O (SIFRA S.p.A., Verona). Il volume totale del terreno che veniva fatto ricircolare nel sistema di perfusione era di 350 ml, con un flusso iniziale di perfusione di 2 ml/min, portato a 4 ml/min dopo 1 ora, ad 8 ml/min dopo 24 ore e mantenuto tale per le due settimane di durata dell'esperimento.

Per gli studi di perfusione con plasma umano, il bioreattore contenente gli epatociti è stato connesso ad un reservoir della capacità di circa 1 litro. Il ricircolo del plasma era assicurato da una pompa peristaltica di un apparato per plasmaseparazione (Performer-BAL; Rand S.r.l., Cavezzo, Modena), che provvedeva anche al riscaldamento a 37 °C ed alla ossigenazione del plasma (Fig. 2). L'ossigenazione del plasma veniva effettuata con un ossigenatore a fibre cave di polipropilene (Oxiphan; Akzo Membrana, Wuppertal, Germania), inserito in serie nel circuito, immediatamente prima del bioreattore, con erogazione di una miscela di 90-95% O₂/5-10% CO₂, al flusso di 70-35 ml/min. Il plasma è stato fatto ricircolare al un flusso iniziale di 100 ml/min, portato a 150 ml/min dopo 1 ora e mantenuto tale per le 7 ore di durata dell'esperimento.

Studio funzionale. Al fine di valutare il mantenimento di funzioni epatocitarie differenziate, quali la detossificazione dell'ammoniaca, la sintesi di urea e la metabolizzazione della Lidocaina, abbiamo aggiunto al terreno 350

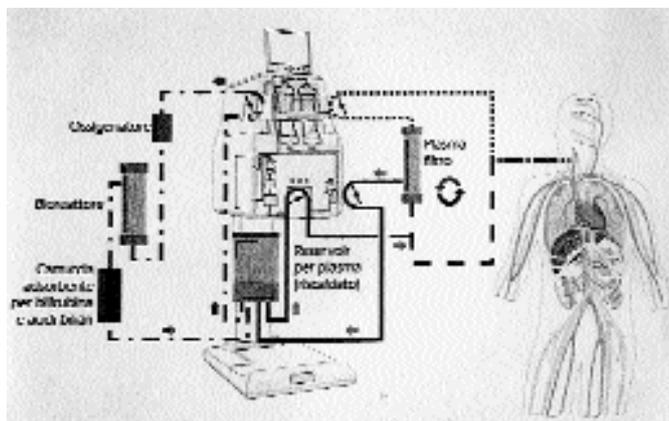


Fig. 2: Rappresentazione schematica del circuito di perfusione del plasma attraverso il modello di fegato bioartificiale in studio. Il plasma ottenuto attraverso il passaggio del sangue attraverso un filtro a fibre cave (Plasma filtro), viene raccolto in un reservoir riscaldato a 37 °C. Un secondo circuito convoglia il plasma attraverso un ossigenatore ed il bioreattore a flusso radiale contenente gli epatociti. Una cartuccia di materiale sintetico poroso assorbe selettivamente dal plasma in uscita dal bioreattore la bilirubina e gli acidi biliari, svolgendo le funzioni di un coledoco artificiale. La gestione della plasmaseparazione, delle 4 pompe peristaltiche con i relativi flussi, dei volumi di perfusione, delle pressioni nel circuito e nei filtri, della ossigenazione e del riscaldamento del plasma, viene effettuata da un apparato completamente integrato e computerizzato.

μl di NH_4Cl , per una concentrazione finale di 1 mM e 60 $\mu\text{g/ml}$ di Lidocaina. Le successive determinazioni della concentrazione di NH_4Cl sono state effettuate con il metodo colorimetrico all'indofenolo (16). Il Monoetilglicina xilidide (MEGX), un metabolita primario della Lidocaina formato ad opera degli enzimi del citocromo P450 epatocitario (17), è stato dosato con la tecnica immunologica a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA), utilizzando un kit diagnostico ed un apparecchio analizzatore (MEGX-TDx/TDxFLx; Abbott Diagnostici, Milano). L'Urea è stata dosata con il metodo quantitativo enzimatico spettrofotometrico (18), utilizzando un kit diagnostico (BUN; Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). I prelievi per la determinazione dei livelli di NH_4Cl , di urea e di MEGX sono stati eseguiti al tempo 0 (t_0), a 5 minuti (t_5), a 30 minuti (t_{30}) a 60 minuti (t_{60}), a 2 ore (t_{2h}), a 4 ore (t_{4h}), ad 8 ore (t_{8h}). L'aggiunta di NH_4Cl e Lidocaina, così come la successiva determinazione di NH_4Cl , urea e MEGX sono state ripetute giornalmente per la prima settimana dello studio, mentre durante la seconda settimana sono stati eseguiti a giorni alterni. Al sesto ed al tredicesimo giorno, il mezzo di perfusione è stato sostituito con due aliquote successive di 130 ml di terreno fresco a distanza di 6 ore l'una dall'altra, al fine di non lasciare a secco il reservoir. Giornalmente sono stati valutati la pO_2 , la pCO_2 ed il pH con prelievi di aliquote di terreno da 1 ml, eseguiti direttamente dal reservoir ed utilizzando un emogasalizzatore clinico.

Per gli studi di perfusione con plasma umano, 60 $\mu\text{g/ml}$

di Lidocaina sono stati aggiunti al reservoir dopo 1 ora, 4 ore e 6 ore di perfusione del bioreattore. Il MEGX è stato dosato con la tecnica immunologica a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA), utilizzando un kit diagnostico ed un apparecchio analizzatore (MEGX-TDx/TDxFLx; Abbott Diagnostici, Milano). I prelievi successivi per la determinazione dei livelli di MEGX sono stati eseguiti al tempo 0 (t_0), a 15 minuti (t_{15}), a 30 minuti (t_{30}) ed a 60 minuti (t_{60}). Durante lo studio si sono monitorizzati la pO_2 , la pCO_2 ed il pH, sia all'ingresso che all'uscita del bioreattore.

Studio morfologico ed ultrastrutturale. Dopo le due settimane di perfusione con terreno di coltura, così come dopo le 7 ore di perfusione con plasma umano, i bioreattori sono stati disassemblati per il recupero delle cellule. Aliquote di epatociti sono state recuperate dalla struttura tridimensionale di poliestere utilizzando soluzione fisiologica a 37 °C, ed è stata effettuata la valutazione della vitalità con il test al trypan blue. Frammenti di poliestere contenenti gli epatociti ad esso adesi, sono stati prelevati e processati per lo studio ultrastrutturale al microscopio elettronico a scansione (SEM) ed a trasmissione (TEM). I campioni sono stati fissati in una soluzione allo 2,5% di glutaraldeide contenente lo 0,1 M di tampone fosfato a pH 7,2 per 3 ore e quindi lavati per circa 12 ore in tampone fosfato. Per il TEM, i campioni sono stati post-fissati in tetrossido di osmio all'1%, disidratati attraverso la serie graduata di etanoli e quindi inclusi in resina epossidica (Durcopan; A.C.M., Milano). Sezioni ultrasottili di 80 nm sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, ed infine esaminate in un microscopio Hitachi H-800. Per la SEM, i campioni sono stati sottoposti a disidratazione, sono stati montati su griglie di alluminio e ricoperti di una pellicola d'oro, per essere infine esaminati in un microscopio Cambridge Instruments-360.

Risultati

L'isolamento degli epatociti di maiale ha richiesto circa 30 minuti e per un fegato di peso medio sui 700 g, si sono ottenute $1,5-2 \times 10^{10}$ cellule con vitalità 92-95% al test al trypan blue.

In Figura 3 è rappresentato l'andamento dei valori dell'ammoniaca nel terreno di coltura durante le due settimane dello studio di perfusione del bioreattore a flusso radiale contenente epatociti suini. L'andamento del grafico dimostra il mantenimento della capacità delle cellule di detossificare l'ammonio aggiunto al terreno, per tutta la durata dello studio. Ad ogni bolo di NH_4Cl corrisponde un picco di concentrazione immediatamente seguito da una sua discesa, dovuta alla detossificazione attuata ad opera delle cellule epatiche. L'incremento progressivo di ammoniaca nel tempo è spiegabile con un

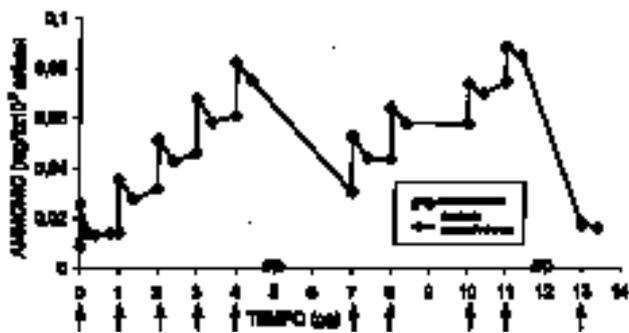


Fig. 3: Rappresentazione grafica dei valori di ammoniaca nel terreno di coltura, espressi in mg di cloruro di ammonio/1 x 10⁶ cellule, durante le due settimane di perfusione del bioreattore a flusso radiale contenente 5 x 10⁸ epatociti di maiale. Le frecce in ascissa rappresentano l'aggiunta di NH₄Cl (1 mM) al terreno. Ad ogni bolo di NH₄Cl corrisponde un picco di concentrazione immediatamente seguito da una discesa, dovuta alla detossificazione attuata ad opera delle cellule epatiche. Il progressivo incremento temporale dei valori è il risultato dell'accumulo di NH₄Cl nel terreno. Al quinto ed al dodicesimo giorno di perfusione del bioreattore (freccia), il terreno è stato parzialmente sostituito con due aliquote successive di 130 ml di terreno fresco, a distanza di 6 ore l'una dall'altra.

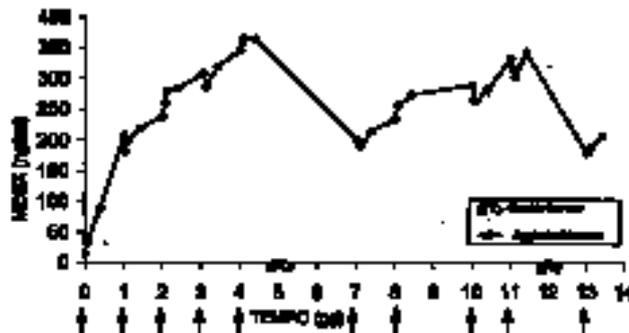


Fig. 5: Rappresentazione grafica della concentrazione di Monoetilglicinaxilidide (MEGX) nel terreno di coltura, espresso in ng/ml, durante le due settimane di perfusione del bioreattore a flusso radiale contenente 5 x 10⁸ epatociti isolati di maiale. Le frecce in ascissa rappresentano l'aggiunta di 60 µg/ml di Lidocaina al terreno di coltura. Ad ogni bolo di Lidocaina ha corrisposto un aumento della concentrazione di MEGX. Al quinto ed al dodicesimo giorno di perfusione del bioreattore (freccia), il terreno è stato sostituito con due aliquote successive di 130 ml di terreno fresco a distanza di 6 ore l'una dall'altra.

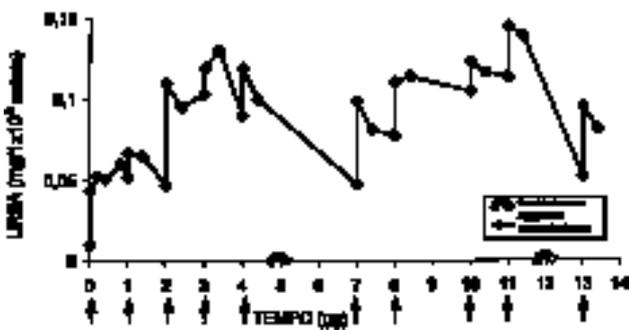


Fig. 4: Rappresentazione grafica dei valori di urea nel terreno di coltura, espressi in mg di urea/1 x 10⁶ cellule, durante le due settimane di perfusione del bioreattore a flusso radiale contenente 5 x 10⁸ epatociti isolati di maiale. Le frecce in ascissa rappresentano l'aggiunta di NH₄Cl (1 mM) al terreno. Ad ogni bolo di NH₄Cl corrisponde un picco della sintesi di urea attuata ad opera delle cellule epatiche. L'incremento temporale dei valori di urea è il risultato dell'accumulo nel terreno. Al quinto ed al dodicesimo giorno di perfusione del bioreattore (freccia), il terreno è stato parzialmente sostituito con due aliquote successive di 130 ml di terreno fresco, a distanza di 6 ore l'una dall'altra.

accumulo dell'NH₄Cl residuo nel terreno. In Figura 4 è rappresentato l'andamento della concentrazione di urea durante le due settimane di studio: alle ripetute aggiunte di NH₄Cl nel terreno di coltura, gli epatociti hanno risposto con incrementi della sintesi di urea a partenza dall'ammoniaca. La sintesi di MEGX a partenza dalla Lidocaina, aggiunta al terreno di coltura, si è mantenuta per le due settimane di perfusione, dimostrando la conservazione della funzione del citocromo P450 (Fig. 5). Il monitoraggio dei gas disciolti nel terreno di coltura durante l'esperimento di perfusione durato due settimane, ha dimostrato il mantenimento di valori di pO₂ variabili tra 190 e 280 mmHg, di valori di pCO₂ compresi tra 7 e 15 mmHg, mentre il pH del terreno si è mantenuto a 7,26-7,35.

Durante lo studio di perfusione del bioreattore contenente 150 grammi di epatociti con plasma umano, abbiamo potuto registrare un consumo medio totale di O₂ corrispondente a 0,6 ml O₂/min, mentre il rilascio di CO₂ è risultato compreso tra 4,7 e 5,1 ml CO₂/min. Nella Tabella I sono riassunti i valori di MEGX otte-

Tab. I – VALORI DI MONOETILGLICINAXILIDIDE (MEGX), ESPRESSO IN NG/ML, DURANTE 7 ORE DI PERFUSIONE CON PLASMA UMANO DI UN MODELLO DI BIOREATTORE A FLUSSO RADIALE CONTENENTE 15 X 10⁹ EPATOCITI ISOLATI DI MAIALE. L'AGGIUNTA DI LIDOCAINA (60 MG/ML) AL PLASMA È STATA EFFETTUATA DOPO LA I ORA, LA IV ORA E LA VII ORA DI PERFUSIONE ED I DOSAGGI DI MEGX SONO STATI EFFETTUATI PRIMA DELL'AGGIUNTA DI LIDOCAINA (T₀) E DOPO 15 MINUTI (T₁₅), 30 MINUTI (T₃₀) E 60 MINUTI (T₆₀).

| Tempi di perfusione | MEGX (ng/ml) | | | |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | t ₀ | t ₁₅ | t ₃₀ | t ₆₀ |
| I ora | 5,15 | 351,46 | 496,92 | 633,04 |
| IV ora | 563,52 | 558,84 | 587,56 | 611,28 |
| VII ora | 458,28 | 515,16 | 521,80 | 524,16 |

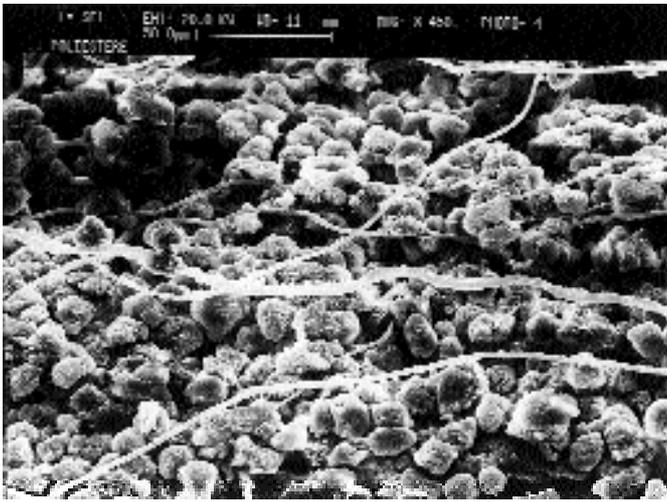


Fig. 6: Microfotografia al microscopio elettronico a scansione di epatociti isolati di maiale all'interno di una struttura tridimensionale di microfibre di poliestere idrofilizzato. Dopo 2 settimane di perfusione con terreno di coltura senza siero, le cellule appaiono saldamente ancorate alle fibre e tra di loro, riproducendo una struttura simile a quella dei piatti epatocitari del lobulo epatico. Ingrandimento originale: 450 X.

nuti durante gli esperimenti di perfusione di un modello clinico di bioreattore a flusso radiale contenente 15×10^9 epatociti isolati di maiale.

Al termine dello studio di perfusione del bioreattore di scala ridotta con terreno di coltura, la vitalità delle cellule estratte è risultata superiore al 90% dopo test al trypan blue. Lo studio ultrastrutturale della struttura di poliestere ha dimostrato la massiva adesione degli epatociti alle fibre ed il ripristino del contatto tra le cellule. La ultrastruttura citoplasmatica si è dimostrata tipica di epatociti metabolicamente attivi, con superficie esterna ricoperta di microvilli. In molte zone, lo spazio compreso tra le fibre di poliestere era completamente occupato dagli epatociti, secondo una morfologia molto simile a quella dei piatti epatocitari del lobulo epatico (Fig. 6). Al termine delle 7 ore di perfusione del bioreattore clinico con plasma umano, la vitalità degli epatociti al test al trypan blue è risultata dell'80% e lo studio ultrastrutturale ha dimostrato aspetti morfologici sovrapponibili a quelli delle cellule perfuse per due settimane nel bioreattore di scala ridotta.

Discussione

I bioreattori a fibre cave utilizzati per i trattamenti dialitici, l'emofiltrazione o la plasmateresi, si sono dimostrati scarsamente efficaci qualora impiegati per la perfusione in vitro di epatociti isolati. Ciò indipendentemente dalla superficie totale e dal cut-off delle fibre, nonché dalla biocompatibilità del materiale utilizzato. Infatti, se si adotta una geometria di flusso assiale, cioè all'interno del lume della fibra cava, il limite di questi bioreattori è rappresentato dalla ridotta capacità di man-

tenere un adeguato flusso trans-membrana per tutta la lunghezza della fibra. Ne consegue la limitata diffusione nel compartimento extrafibre delle sostanze nutritive per le cellule, delle sostanze tossiche da metabolizzare e dei gas disciolti, in primo luogo dell' O_2 . Per ottenere un adeguato flusso attraverso la parete della fibra cava, e quindi una adeguata perfusione della massa cellulare, si deve adottare una geometria di flusso trans-fibra mantenendo aperto almeno uno dei ports laterali dell'involucro esterno, soluzione questa che determinerebbe però la fuga delle cellule all'esterno del bioreattore.

Recentemente, abbiamo dimostrato che l'attività di coniugazione di epatociti isolati di suino, coltivati su microcarriers di destrano rivestiti di collagene ed inoculati all'interno del compartimento extrafibre di bioreattori a fibre cave, era significativamente ridotta dopo 4 ore di perfusione con geometria di flusso assiale (11). Anche se la vitalità delle cellule era risultata buona fino alla quinta ora di perfusione, significativamente ridotta era risultata la capacità di coniugazione della bilirubina e degli acidi biliari da parte degli epatociti, probabilmente a causa della saturazione del comparto extrafibre e degli scambi insufficienti, soprattutto di O_2 e CO_2 , con il plasma circolante (11). Anche aumentando il flusso del plasma fino a 400 ml/min, circa la metà delle cellule contenute nello spazio extrafibre della porzione distale del bioreattore non risultavano adeguatamente perfuse e quindi metabolicamente attive (19).

Per le ragioni sopra esposte, abbiamo disegnato un nuovo modello di bioreattore che tende a risolvere i principali problemi legati al mantenimento di una efficace attività metabolica da parte degli epatociti. Il principio della progettazione è stato quello di permettere il massimo contatto del fluido di perfusione, plasma o terreno di coltura, con gli epatociti, al fine di uno scambio ottimale di soluti e di O_2 . Secondariamente si è studiata una configurazione che consentisse l'impiego di una massa cellulare vicina a quella attualmente ritenuta necessaria e sufficiente per un supporto metabolico efficace, non inferiore cioè al 10-20% della massa epatica totale (10). La sperimentazione di un modulo per la perfusione con sangue intero di sferoidi epatocitari con geometria a flusso radiale è stata originalmente introdotta da Naruse e Coll. (20). Gli stessi autori hanno inoltre riportato che l'efficacia metabolica del sistema era incrementata con l'impiego di epatociti isolati, piuttosto che di sferoidi epatocitari (21). Il nostro modello prevede la semplice perfusione delle cellule con il plasma preventivamente ossigenato e riscaldato, in quanto abbiamo potuto osservare che all'interno del modulo si ha la rapida e spontanea riagggregazione degli epatociti e la loro adesione alle fibre di poliestere in meno di un'ora dal loro inoculamento nel bioreattore. In una serie di studi preliminari, abbiamo confrontato vari sistemi culturali tridimensionali per epatociti isolati, così come la necessità, o meno, di rivestire tali supporti con collagene, al fine di favorire al massimo l'adesione delle cellule. Il preventivo rivestimento delle fibre di poliestere con

collagene tipo I non ha influenzato la capacità di adesione di epatociti isolati di ratto, né la sintesi di urea a partenza dall'ammonio, mentre molto più efficace in termini di adesione delle cellule al supporto è risultato il trattamento di idrofilizzazione del poliestere (22). In particolare, non abbiamo registrato differenze significative nei confronti delle colture epatocitarie su microcarriers rivestiti di collagene tipo I, configurazione questa già adottata per il FBA dal gruppo di ricerca di Demetriou e Coll. (23). A tal proposito, i nostri risultati sono stati in accordo con studi analoghi, nei quali l'attività funzionale di epatociti coltivati su piatti di coltura resi idrofilici veniva confrontata con diversi rivestimenti che utilizzavano costituenti della matrice extracellulare. Nessuno dei componenti studiati, compreso il collagene tipo I e tipo IV, la laminina e la fibronectina sono risultati in grado di migliorare le funzioni metaboliche delle colture epatocitarie (24). Analogamente, è stato dimostrato che il rivestimento di piatti di coltura con collagene o fibronectina non aumentava l'attività biotrasformante di epatociti isolati di pecora (25). È ipotizzabile quindi, che gli epatociti isolati con metodica collagenasica mantengano inalterata la capacità di sintetizzare e scernere nel mezzo di coltura le proteine di adesione, nonché i componenti della matrice extracellulare, qualora perfusi in sistemi tridimensionali di coltura.

Poiché il consumo di O_2 da parte del fegato è elevato, circa 2,5 ml di O_2 /grammo di fegato/ora (26), una adeguata ossigenazione degli epatociti all'interno del bioreattore è fondamentale per il mantenimento delle capacità metaboliche delle cellule. Tre fattori appaiono critici a tale riguardo: 1) la pO_2 nel mezzo di perfusione; 2) la distanza di diffusione tra l' O_2 e le cellule; 3) la densità delle cellule stesse (27). A causa dei problemi derivanti dalla perfusione di moduli a fibre porose con sangue intero, la maggior parte dei ricercatori è attualmente orientata alla perfusione degli epatociti con il solo plasma, metodica questa che richiede la sua preventiva ossigenazione. La capacità di dissoluzione dell' O_2 nel plasma è in funzione della sua pressione parziale, mentre la capacità di trasporto dell' O_2 è assai limitata, a causa dell'assenza dell'emoglobina. Recentemente sono stati proposti due modelli di bioreattore, che prevedono l'integrazione all'interno del modulo di un fascio di fibre cave per l'ossigenazione diretta delle cellule. In un caso, le cellule sono inoculate all'interno di una struttura tridimensionale formata da quattro fasci di fibre cave che si intersecano tra di loro, e sulla cui superficie esterna esse aderiscono; uno dei fasci di fibre cave trasporta l' O_2 (28). Nell'altro modello, gli epatociti vengono immobilizzati all'interno di uno strato di poliestere avvolto a spirale intorno ad un fascio di fibre cave che trasportano l' O_2 (29). Nel nostro modello non abbiamo previsto una ossigenazione integrata e per assicurare lo scambio dei gas disciolti nel plasma con le cellule abbiamo provveduto a ridurre la distanza di diffusione dell' O_2 , mentre per mantenere elevata la densità cellulare e la massa totale di

epatociti all'interno del bioreattore, abbiamo aumentato la superficie utile di perfusione. In uno studio che confrontava il consumo di O_2 e la produzione di CO_2 , da parte di epatociti di maiale perfusi all'interno di bioreattori a fibre cave di diversi materiali, in confronto con il nostro modello di bioreattore a flusso radiale, abbiamo potuto osservare che solamente quest'ultimo si è dimostrato in grado di mantenere le funzioni respiratorie cellulari per le 7 ore dello studio (30).

Nel fegato, gli epatociti vengono perfusi ad un flusso ematico totale elevato, circa 1,2-1,5 ml/grammo di fegato/min (26). Le cellule epatiche parenchimali, isolate con metodica collagenasica, sono grandemente sensibili allo stress pressorio tangenziale. Per questo è molto importante che all'interno del bioreattore il flusso venga costantemente mantenuto intorno a valori fisiologici per le cellule. Il mantenimento di questo parametro fisiologico è teoricamente possibile nel bioreattore a flusso radiale da noi sperimentato, in quanto il flusso del plasma che perfonde le cellule può essere variato in base alla massa cellulare precedentemente caricata al suo interno.

Il presente studio dimostra che l'attività metabolica degli epatociti mantenuti all'interno del bioreattore a flusso radiale si è mantenuta invariata durante le due settimane di perfusione. Lo studio di colture epatocitarie convenzionali con terreno senza siero ha dimostrato il mantenimento di funzioni differenziate per non più di una settimana (31). Coltivando gli epatociti isolati insieme a cellule sinusoidali, è stato possibile estendere la durata delle colture fino a due settimane, anche se è risultato evidente un progressivo declino della capacità di sintetizzare albumina (32). La capacità di scernere albumina, metabolizzare ammoniaca e sintetizzare urea è risultata significativamente prolungata in sistemi di coltura tridimensionale che utilizzavano un supporto di poliuretano (33) od acido poli L-lattico (34). L'utilizzazione di bioreattori che permettono la perfusione continua delle cellule, ha ulteriormente amplificato la capacità di mantenere nel tempo funzioni epatocitarie differenziate. Impiegando un bioreattore a flusso radiale, è stato infatti riportato il mantenimento della sintesi di albumina, della capacità di detossificare l'ammoniaca e di sintetizzare urea per una settimana (20). L'uso di un modulo a fasci di fibre cave intrecciate, ha permesso di prolungare la sintesi di albumina e la funzione del citocromo P450 fino a 21 giorni (28). L'attività del citocromo P450 è stata studiata in un sistema di perfusione basato su un bioreattore a fasci di fibre cave con il mantenimento del metabolismo del Diazepam da parte di epatociti isolati di ratto per 25 giorni (35).

La produzione di MEGX a partenza dalla Lidocaina è un metodo rapido ed efficace per valutare la funzionalità epatica, essendo basato sulla reazione ossidativa di N-dietilazione, catalizzata dal citocromo P450 (3-A4) epatocitario (17). Il nostro studio ha dimostrato che gli epatociti all'interno del bioreattore a flusso radiale hanno mantenuto invariata per le due settimane di perfu-

sione la capacità di produrre MEGX, dopo ripetute somministrazioni di Lidocaina. La produzione di MEGX da parte di epatociti perfusi all'interno di bioreattori è stata dimostrata dopo singola somministrazione di Lidocaina, per un periodo di 3 giorni (28) e di 21 giorni (29), ma al meglio delle nostre conoscenze, il nostro è il primo studio che evidenzia per la durata di 2 settimane il mantenimento degli stessi livelli di produzione di MEGX, da parte di epatociti isolati dopo ripetute somministrazioni di Lidocaina.

In conclusione, la configurazione a flusso radiale permette lo stretto contatto tra il terreno di cultura, od il plasma, e le cellule epatiche, consentendo un flusso di perfusione fisiologico e la distribuzione omogenea di soluti ed O₂ all'interno del modulo. Questa configurazione permette un rapido caricamento di una massa cellulare consistente all'interno del modulo e la sua immediata perfusione con plasma. Lo studio pre-clinico in vitro, effettuato sia con terreno di coltura che con plasma ha permesso la sopravvivenza a lungo termine ed il mantenimento di funzioni metaboliche differenziate da parte di epatociti isolati di maiale. I nostri risultati suggeriscono un potenziale impiego del modello di bioreattore a flusso radiale per il supporto extracorporeo di pazienti con insufficienza epatica acuta.

Bibliografia

- 1) O'Grady J., Alexander G., Hayllar K., Williams R.: *Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 97:439-445, 1989.
- 2) Williams R.: *Classification and clinical syndromes of acute liver failure*. In *Acute Liver Failure*, ed. Lee W.M., Williams R., Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- 3) Bismuth H., Samuel D., Gugenheim J., Castaing D., Bernau J., Rueff B., Benhamou J.P.: *Emergency liver transplantation for fulminant hepatitis*. Ann Intern Med, 107:337-341, 1987.
- 4) Bismuth H., Samuel D., Castaing D., Adam R., Saliba F., Johan M., Azoulay D., Ducot B., Chiche L.: *Orthotopic liver transplantation in fulminant and subfulminant hepatitis*. The Paul Brousse experience. Ann Surg, 222:109-119, 1995.
- 5) Kiley J.E., Welch H.F., Pender J.C., Welch C.S.: *Removal of blood ammonia by hemodialysis*. Proc Soc Exp Biol Med, 91:489-490, 1956.
- 6) Opolon P., Lavallard M.C., Hugué C., Bidallier M., Granger A., Gallot D., Bloch P.: *Hemodialysis versus cross hemodialysis in experimental liver coma*. Surg Gynecol Obstet, 142:845-854, 1976.
- 7) Atillasoy E.O., Berk P.D.: *Extracorporeal liver support: historical background and critical analysis*. In *Acute Liver Failure*, ed. Lee W.M., Williams R., Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- 8) O'Grady J.G., Gimson A.E.S., O'Brien C.J., Pucknell A., Hughes R.D., Williams R.: *Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 94:1186-1192, 1988.
- 9) Hori M.: *Artificial liver: the concept and working hypothesis of hybrid organs from a 25-year-old anedocte to the 21st century model*. ASAIO J, 28:639-641, 1981.
- 10) Rozga J., Morsiani E., LePage H., Moscioni A.D., Giorgio T., Demetriou A.A.: *Isolated hepatocytes in a bioartificial liver: a single group view and experience*. Biotechnology and Bioengineering, 43:645-452, 1994.
- 11) Morsiani E., Pazzi P., Moscioni A.D., Rozga J., Azzena G., Demetriou A.A.: *In vitro morphological and functional characterization of isolated porcine hepatocytes for extracorporeal liver support: bile acid uptake and conjugation*. J Surg Res, 79:54-60, 1998.
- 12) Morsiani E., Rozga J., Scott H.C., Kong L.B., Lebow L.T., McGrath M.F., Moscioni A.D., Demetriou A.A.: *Automated large-scale production of porcine hepatocytes for bioartificial liver support*. Transplantation Proc, 26:4105-4106, 1994.
- 13) Morsiani E., Rozga J., Scott H.C., Lebow L.T., Moscioni A.D., Kong L.B., McGrath M.F., Demetriou A.A.: *Automated liver cell processing facilitates large scale isolation and purification of porcine hepatocytes*. ASAIO J, 41:155-161, 1995.
- 14) Puviani A.C., Tassinari B., Ganzerli S., Lodi A., Pazzi P., Ricci D., Morsiani E.: *Development of radial flow bioreactor for extracorporeal biohybrid liver support system*. Hepatology, 28:395A, 1998.
- 15) Morsiani E., Puviani A.C., Galavotti D., Lodi A., Ricci D., Valieri L., Gorini P., Tosatti S., Pazzi P.: *Oxygen Consumption and carbon dioxide release by porcine hepatocytes cultured in different bioreactors*. Int J Artif Org, 22:407, 1999.
- 16) McCulloch H.: *The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method*. Clin Chim Acta, 17:297-304, 1967.
- 17) Oellerich M., Raude E., Burdelski M.: *Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function*. J Clin Chem Clin Biochem, 25:845-853, 1987.
- 18) Talke H., Schubert G.E.: *Enzymatische Hamstoffbestimmung in Blut und Serum im Optischen Test nach Warburgh*. Klin Wochschr, 43:174-181, 1965.
- 19) Giorgio T., Rozga J., Moscioni A.D., Demetriou A.A.: *Liver support system engineering principles*. In *Support of the acutely failing liver*, Demetriou A.A. ed., R.G. Landes Co., Austin, 1994.
- 20) Naruse K., Sakai Y., Nagashima I., Jiang G.X., Suzuki M., Muto T.: *Development of a new bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes immobilized on non-woven fabric*. Int J Artif Org, 19:347-352, 1996.
- 21) Naruse K., Sakai Y., Nagashima I., Jiang G.X., Suzuki M., Muto T.: *Comparisons of porcine hepatocyte spheroids and single hepatocytes in the non-woven fabric bioartificial liver module*. Int J Artif Org, 19:605-609, 1996.
- 22) Puviani A.C., Lodi A., Tassinari B., Ottolenghi C., Ganzerli S., Ricci D., Morsiani E.: *Morphological and functional evaluation of isolated rat hepatocytes in three dimensional culture systems*. Int J Artif Org, 22:47-51, 1999.
- 23) Kong L.B., Chen S., Demetriou A.A., Rozga J.: *Matrix-induced liver cell aggregates (MILCA) for bioartificial liver use*. Int J Artif Org, 19:72-78, 1996.
- 24) Te Velde A.A., Ladiges N.C.J.J., Flendrig L.M., Chamuleau R.A.F.M.: *Functional activity of isolated pig hepatocytes attached to different extracellular matrix substrates. Implication for application of*

- pig hepatocytes in a bioartificial liver.* J Hepatol, 23:184-192, 1995.
- 25) Van't Klooster G.A.E., van Wortersen-Nijnanten F.M.A., Klein W.R., Blaauboer B.J., Noordhoek J., van Miert A.S.J.P.A.M.: *Effect of various medium formulations and attachment substrata on the performance of cultured ruminant hepatocytes in biotransformation studies.* Xenobiotica, 22:523-534, 1992.
- 26) Brauer W.R.: *Liver circulation and function.* Physiol Rev, 43:115-213, 1963.
- 27) Rotem A., Toner M., Bhatia S., Foy B., Tompkins R.G., Yarmush M.L.: *Oxygen is a factor determining in vitro tissue assembly: effects on attachment and spreading of hepatocytes.* Biotechnology and Bioengineering, 43:654-660, 1994.
- 28) Flendring L.M., la Soe J.W., Jörning G.G.A., Steenbeek A., Karlsen O.T., Bovève W.M.M.J., Ladiges N.C.J.J., te Velde A.A., Chamuleau R.A.F.M.: *In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates.* J Hepatol, 26:1379-1392, 1997.
- 29) Gerlach J.C., Encke J., Hole O., Müller C., Ryan C.J., Neuhaus P.: *Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion.* Transplantation, 58:984-988, 1994.
- 30) Morsiani E., Puviani A.C., Galavotti D., Valieri L., Gorini P., Pazzi P., Azzena G.: *Radial-flow bioreactor outperforms hollow-fiber modules as perfusing culture system for primary porcine hepatocytes.* Transplant Proc, in press.
- 31) Huston S.M., Stinson-Fisher C., Shiman R., Jefferson L.S.: *Regulation of albumin synthesis by hormones and amino acids in primary cultures of rat hepatocytes.* Am J Physiol, 252:E291-E298, 1987.
- 32) Gugen-Guillouzo C., Clement B., Baffet G., Beaumont C., Morel-Chany E., Glaise D., Guillouzo A.: *Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type.* Exp Cell Res, 13:47-54, 1983.
- 33) Sato Y., Ochiya T., Yasuda Y., Matsubara K.: *A new three-dimensional culture system for hepatocytes using reticulated polyurethane.* Hepatology, 19:1023-1028, 1994.
- 34) Kaufmann P.M., Heimrath S., Kim B.S., Mooney D.J.: *Highly porous polymer matrices as a three-dimensional culture system for hepatocytes.* Cell Transplant, 6:463-468, 1997.
- 35) Jaregui H.O., Naik S., Santangini H., Pan J., Trenkler D., Mullon C.: *Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers.* Vitro Cell Dev Biol, 30A:23-29, 1994.
- 36) Nyberg S., Mann H.J., Rimmel R.P., Hu W-S., Cerra F.B.: *Pharmacokinetic analysis verifies P450 function during in vitro and in vivo application of a bioartificial liver.* ASAIO J, 39:M252-M256, 1993.

Autore corrispondente:

Dott. Eugenio MORSIANI
Patologia Speciale Chirurgica, Arcispedale Sant'Anna,
Corso Giovecca, 203
44100 FERRARA
Tel.: (0532)206.677
Fax.: (0532)209.819