

Sistemi ibridi (bioartificiali) di supporto epatico. Cenni storici e sviluppi attuali



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

E. MORSIANI

Sezione di Patologia Speciale Chirurgica,
Azienda Ospedaliera Arcispedale Sant'Anna, Ferrara

L'insufficienza epatica fulminante (IEF) è una grave sindrome caratterizzata dalla presenza di ittero ed encefalopatia, che si sviluppa in soggetti non apparentemente affetti da preesistente patologia epatica, la quale è gravata da elevata mortalità (1, 2, 3). A causa della severità del quadro clinico, da tempo sono stati intrapresi numerosi tentativi di sviluppare sistemi atti a fornire un adeguato supporto metabolico ai pazienti con IEF. Tali sistemi di supporto devono favorire la rigenerazione spontanea del fegato, oppure servire come trattamento temporaneo, c.d. ponte, fino al trapianto di fegato in regime di urgenza (4).

I sistemi di supporto epatico sono classificabili in 1] *non-biologici* o totalmente artificiali, che basano il loro principio di funzionamento sulla detossificazione operata dall'emodialisi, dalla ultrafiltrazione ematica o plasmatica, dalla plasma exchange, dalla plasmaferesi ad alti volumi, dall'emofiltrazione o plasmafiltrazione su resine a scambio ionico, neutre o carboni attivati; 2] *biologici*, cioè basati essenzialmente sulle funzioni biosintetiche e detossificanti del fegato, umano o di origine animale, totalmente perfuso in circolazione crociata extracorporea con il sangue del paziente; 3] *ibridi* o bioartificiali, nei quali cellule epatiche di origine umana od animale, precedentemente isolate con un processo di digestione enzimatica e perfuse *in vitro* grazie a sistemi di circolazione extracorporea del sangue intero o del plasma, sono utilizzate in associazione a componenti artificiali varie, come sistemi di supporto per la coltura cellulare, membrane semipermeabili o colonne per plasma assorbimento. Il sistema di supporto epatico ibrido, anche noto come fegato bioartificiale (FBA), è attualmente oggetto di sperimentazioni cliniche da parte di numerosi gruppi di ricerca. Essi partono dal concetto che solamente la cel-

Riassunto

I tentativi di sviluppare sistemi di supporto epatico extra-corporeo per il trattamento di pazienti affetti da insufficienza epatica acuta, sono andati dall'emodialisi, all'utilizzazione della plasma exchange, all'uso di particelle di carbone attivato o di resine sintetiche, fino all'impiego di bioreattori contenenti tessuto epatico coltivato in vitro. Allo stato attuale delle conoscenze, nessuno dei sistemi fino ad oggi utilizzati, si è comunque dimostrato in grado di incidere significativamente sulla sopravvivenza, nè alcuno di tali sistemi è stato finora testato su larga scala in campo clinico. Il trapianto di fegato risulta attualmente l'unico trattamento efficace in grado di modificare significativamente il decorso clinico dell'insufficienza epatica acuta, ma la scarsità cronica di organi, rende urgente la ricerca di nuovi sistemi di supporto epatico. Nel presente lavoro viene rivista l'esperienza storica nel campo dei sistemi artificiali di assistenza epatica, con particolare riferimento ai cosiddetti sistemi ibridi o bioartificiali, in cui alle componenti artificiali tradizionali, come le membrane selettive, il carbone o le resine, vengono associati epatociti isolati.

Parole chiave: Insufficienza epatica acuta; trapianto di fegato, sistemi di supporto epatico artificiale, fegato bioartificiale.

Summary

HYBRID OUTLINE BIOARTIFICIAL LIVER SUPPORT HISTORICAL AND ACTUAL DEVELOPMENT

Attempts to develop liver support systems for the treatment of acute liver failure patients have ranged in the past, from the use of hemodialysis, or plasma exchange, or activated charcoal particles and synthetic resins, as well as the use of bioreactors loaded with liver tissue. However, no system demonstrated a significant improvement of patient survival, nor has achieved a wide clinical use. Liver transplantation remains the only treatment for severe hepatic failure that can improve patient survival. On the other hands, the chronic scarcity of organs for transplantation, leads to an urgent necessity of liver support systems. In this paper, we reviewed the historical experience and current status of artificial liver support systems, with particular emphasis on the so-called hybrid or bioartificial liver, in which to the traditional artificial components, such as selective membranes, charcoal particles and resins, isolated hepatocytes are used.

Key words: Acute liver failure, liver transplantation, artificial liver support systems, bioartificial liver.

lula epatica può rimpiazzare completamente le funzioni mancanti di un fegato seriamente danneggiato di un paziente affetto da IEF. Per una revisione storica dei sistemi di supporto epatico non-biologici, si consiglia la lettura degli articoli di Malchesky (5), Atillasoy & Berk (6), Kamlot *et al.* (7). Nel presente articolo mi limiterò ad una trattazione dei sistemi di supporto ibridi o bioartificiali.

Takahashi *et al.* (8) e più recentemente Rozga *et al.* (9), hanno esaminato in maniera estensiva lo sviluppo dei sistemi di supporto epatico bioartificiale. È nella prima metà degli anni '50 che Sorrentino introduce il concetto di sistema di supporto epatico biologico, dimostrando che un omogenato fresco di fegato di bue era capace di metabolizzare salicilati, barbiturici e corpi chetonici e di produrre urea a partenza dal cloruro di ammonio (10). Poco dopo le prime esperienze sperimentali di Sorrentino con cellule epatiche di bue, Kimoto mise in atto un sistema di circolazione crociata extracorporea, nel quale il dializzato proveniente da un paziente in coma epatico veniva fatto circolare attraverso il fegato di un cane (11). Il trattamento in oggetto, come riportato da Hori (12), risultò efficace producendo un miglioramento dello stato di coscienza nel paziente, anche se solamente transitorio, ed un significativo decremento dei livelli di ammoniemia. Mikami *et al.* (13) e Nose *et al.* (14), eseguirono una serie di esperimenti *in vitro* ed *in vivo* in quattro pazienti in coma, utilizzando un omogenato disidratato di fegato di cane o fettine di fegato fresco, le quali erano mantenute separate dal sangue del paziente da una membrana semipermeabile di cellophane.

Solamente dopo il successo della prima preparazione di epatociti isolati vitali, ottenuta a mezzo di digestione collagenasica da Howard & Pesh (15), con le successive modifiche attuate da Berry & Friend (16) e da Seglen (17), gli epatociti diventarono di un certo interesse nel campo dei sistemi di supporto epatico. Infatti, utilizzando una metodica originalmente sviluppata per la crescita di linee cellulari e di cellule tumorali (18), venne dimostrato che epatociti isolati, coltivati nello spazio extra-fibre di bioreattori a fibre cave erano in grado di mantenere per alcune ore funzioni differenziate, come la coniugazione della bilirubina (19), la sintesi di urea e di proteine circolanti (20) ed il metabolismo di alcuni farmaci (21, 22). Gli epatociti isolati perfusi in un sistema di circolazione extracorporea, da utilizzare come mezzo per supportare le funzioni metaboliche in corso di IEF vennero studiati in maniera intensiva da Eiseman *et al.* a partire dall'inizio degli anni '70. Egli merita una speciale menzione in quanto introdusse due importanti concetti, cioè l'uso della plasmateresi e quindi l'impiego del solo plasma ossigenato all'interno del circuito extracorporeo e la perfusione ad alto flusso delle cellule epatiche (23). Venne anche utilizzata una macchina per il lavaggio automatico dei globuli rossi, che grazie all'alto flusso ed alla possibilità di ossigenare le cellule, si dimo-

strò una eccellente camera di perfusione per gli epatociti (24). Il concetto di perfondere il FBA con il solo plasma venne adottato anche da Uchino *et al.*, che descrissero un sistema originale composto da colture cellulari monostrato multiple (25).

Il primo impiego clinico del FBA fu riportato da Matsumura *et al.* nel 1987 (26). Circa 100 grammi di epatociti di coniglio, isolati e congelati, vennero introdotti in una cella da emodialisi, nella quale l'originale membrana di Cuprophane era stata sostituita con un foglio di cellulosa delle dimensioni di 1 m², per permettere la diffusione di molecole di peso molecolare intermedio (400-1500 Dalton). Tale sistema venne ripetutamente usato per il supporto metabolico di un paziente in coma con insufficienza epatica acuta ed affetto da colangiocarcinoma inoperabile. Non fu possibile in quella occasione registrare un significativo miglioramento dello stato di coscienza del paziente, ma venne ottenuto un calo del 68% della bilirubinemia totale. Due anni più tardi, Margulis *et al.* riportarono una serie di 59 pazienti affetti IEF, tutti trattati per sei ore a mezzo con emoperfusione attraverso una colonna caricata con 0,5 grammi di epatociti isolati di maiale e particelle di carbone attivato; come controllo, 67 pazienti furono trattati con terapia intensiva tradizionale (27). Questo è il primo studio clinico caso-controllo che abbia dimostrato l'efficacia del FBA, ma i pazienti in questione non avevano una IEF sufficientemente documentata, ad esempio per mezzo di un coma score, così come scarsa era la documentazione dei vari parametri clinici di valutazione, atti a dimostrare un significativo miglioramento dello stato clinico rispetto ai controlli.

Nel 1992, Sussman *et al.* hanno pubblicato una serie di studi sperimentali eseguiti in cani anepatici o con IEF da farmaci, nei quali si è avuto un completo miglioramento del quadro metabolico epatico in due animali su tre, dopo un periodo di trattamento protratto da 42 a 48 ore (28). Il sistema utilizzato consisteva in un bioreattore a fibre cave nel cui spazio extrafibre erano coltivate cellule derivate da una linea di epatoma umano (C3A). I risultati incoraggianti ottenuti in questi studi sperimentali, unitamente a studi clinici preliminari che utilizzavano lo stesso sistema (29), sono stati seguiti da un trial clinico pilota condotto al King's College Hospital di Londra (30). Nel primo gruppo di pazienti affetti da IEF e trattati con il FBA, gruppo composto da casi non in lista per il trapianto di fegato, si è avuta una sopravvivenza del 58% (7 casi su 9), mentre nel braccio di controllo, composto da pazienti non trattati con FBA, la sopravvivenza è stata del 75% (6 casi su 8). Nel secondo gruppo composto da pazienti affetti da IEF in lista per il trapianto epatico, quindi a maggiore gravità, e trattati con il FBA, la sopravvivenza è stata del 33% (1 caso su 3), mentre nel braccio di controllo la sopravvivenza è stata del 25% (1 caso su 4). Questi dati, seppur di notevole interesse, non hanno dimostrato un significativo aumento della sopravvivenza nei pazienti trattati con

FBA, forse per l'esiguità della casistica (30). Questi studi indicano la effettiva possibilità di avere a disposizione una fonte inesauribile di cellule, per di più di origine umana, che rappresenta una alternativa interessante all'uso di cellule di origine animale. D'altra parte, l'impiego clinico di epatociti di derivazione tumorale rappresenta un potenziale pericolo per i pazienti affetti da IEF e trattati con FBA, di per sé già immunosoppressi, a causa della possibile fuga di cellule all'esterno del sistema extracorporeo di supporto e loro successivo impianto intracorporeo e metastatizzazione a distanza (31).

Il FBA che ha ricevuto negli ultimi anni la maggiore attenzione per il successo terapeutico ottenuto in un consistente numero di pazienti trattati è quello sviluppato da Demetriou *et al.* al Cedars-Sinai Medical Center di Los Angeles. Tale sistema si basa su epatociti isolati di suino, coltivati su microcarriers di destrano rivestiti di collagene; tali aggregati cellulari sono racchiusi nello spazio extracapillare di un bioreattore a fibre cave. Il sistema è stato testato estensivamente *in vitro* (32, 33, 34) ed *in vivo* (35, 36, 37), prima della sua applicazione clinica preliminare (38) e dell'inizio dello studio clinico di fase I, i cui risultati sono stati recentemente pubblicati (39). Sono stati presi in considerazione 3 gruppi di pazienti, tutti trattati con FBA: nel I° gruppo di pazienti affetti da IEF, 16 casi sono stati supportati con successo a mezzo di FBA fino al trapianto di fegato, mentre in un caso si è avuta la rigenerazione spontanea del fegato senza la necessità del trapianto; nel II° gruppo, tutti e 3 i pazienti con non-funzione primaria del fegato dopo trapianto ortotopico, sono stati supportati con FBA fino al re-trapianto di fegato; nel III° gruppo di 10 pazienti con insufficienza epatica acuta in corso di cirrosi epatica, solamente 2 casi sono sopravvissuti dopo trattamento con FBA e trapianto epatico (39). In un certo numero di pazienti affetti da IEF con coma allo stadio IV, edema cerebrale ed ipertensione intracranica, il trattamento con FBA ha comportato una rapida normalizzazione della pressione intracranica. In un caso, il controllo della pressione intracranica e dell'edema cerebrale è stato mantenuto con intervento di epatectomia totale e trattamenti ripetuti successivi con FBA, prima dell'esecuzione del trapianto epatico in urgenza (40). Il FBA del Cedars-Sinai Medical Center basa la sua efficacia clinica e la sua sicurezza sulle seguenti caratteristiche tecniche del sistema: 1) l'impiego di epatociti freschi o criopreservati di maiale, che grazie alla preventiva rimozione di cellule nonparenchimali, che presentano antigeni di istocompatibilità di classe II, hanno una immunogenicità ridotta; 2) l'uso di microcarriers per la riagggregazione cellulare, che favoriscono il ripristino della polarità citoplasmatica ed il mantenimento delle interazioni tra cellula e cellula e tra cellula e matrice extracellulare; 3) la circolazione del plasma all'interno del sistema extracorporeo e del bioreattore ad un elevato flusso, che grazie anche all'impiego di fibre cave con un cut-off considerevole (0,2 μm), premette la perfusione del FBA senza la necessità di eparinizzare il paziente; 4) l'uso integrato del carbone atti-

vato nel circuito extracorporeo, che aggiunge una azione detossificante, in particolare proteggendo gli epatociti suini dal plasma tossico del paziente (40).

Alla fine degli anni '80 Gerlach *et al.* hanno proposto un nuovo bioreattore per la coltura e la perfusione degli epatociti (41) e ciò ha costituito un importante passo avanti per lo sviluppo del FBA, poiché questo è stato il primo bioreattore appositamente disegnato e costruito per tale uso. La struttura principale del bioreattore è rappresentata da quattro fasci di fibre cave indipendenti, intersecati tra di loro, in cui ciascun fascio svolge una funzione differente: immissione all'interno del bioreattore di terreno di coltura o plasma, immissione di O_2 e rimozione di CO_2 , estrazione del terreno di coltura o del plasma, eventuale co-cultura degli epatociti con cellule sinusoidali. Ogni fascio di fibre cave è costituito da materiale diverso: poliammide per l'immissione del terreno o del plasma, polipropilene idrofobico o silicone per l'ossigenazione, polipropilene idrofobico per la rimozione del mezzo di coltura e l'eventuale co-cultura con cellule sinusoidali (42). A differenza del FBA di Demetriou, allestibile per un impiego clinico in circa 3 ore ed utilizzato per 6-8 ore di trattamento singolo, il FBA di Gerlach prevede il continuo mantenimento in coltura di bioreattori già pronti, fino ad un massimo di 3-4 settimane per ogni singolo modulo, con impiego immediato in pazienti affetti da IEF. A tal proposito è stato presentato uno studio ultrastrutturale e funzionale che evidenzia il mantenimento di attività metaboliche differenziate da parte di epatociti di maiale coltivati *in vitro* nel bioreattore per 7 settimane (43). Fino ad oggi, questo sistema è stato impiegato con successo alla Virchow Klinikum dell'Ospedale Charité di Berlino in 10 pazienti affetti da IEF; tutti i casi sono stati trattati con FBA fino al trapianto di fegato (J.C. Gerlach, comunicazione personale dell'autore).

Gli svantaggi dei moduli a fibre cave normalmente utilizzati per la dialisi o la plasma separazione e disponibili in commercio, in particolare il ridotto spazio extrafibre e l'insufficiente capacità di scambio attraverso la parete delle fibre cave (mass-transfer), hanno spinto Naruse *et al.* allo sviluppo di un originale modello di bioreattore a flusso radiale (44). Esso consiste in un contenitore di policarbonato riempito con aggregati di epatociti di maiale immobilizzati in tessuto-non tessuto di poliestere (44). Secondo questa configurazione, il perfusato diffonde inizialmente verso la periferia del modulo per poi ritornare al centro, dopo aver attraversato la struttura tridimensionale di poliestere contenente gli epatociti immobilizzati.

È infine da segnalare il recente sviluppo di un bioreattore che permette la perfusione di epatociti coltivati ad elevata densità, creato presso l'Academic Medical Center di Amsterdam (45). Il bioreattore consiste in una struttura tridimensionale di tessuto-non tessuto di poliestere

Tab. I – STORIA DEGLI ESPERIMENTI *IN VITRO* ESEGUITI CON VARI MODELLI DI FEGATO BIOARTIFICIALE BASATO SU EPATOCITI ISOLATI. MODIFICATA DA ROZGA & MORSIANI (9)

<i>Autore</i>	<i>Epatociti</i>	<i>Bioreattore</i>	<i>Effetti</i>
Wolf & Munkelt (19) Hager <i>et al.</i> (21)	Epatoma di Reuber Topo	Fibre cave Fibre cave	Coniugazione bilirubina Sintesi di urea e proteine, metabolismo diazepam, deaminazione citidina
Kasai <i>et al.</i> (14) Demetriou <i>et al.</i> (32)	Cane Ratto, microcarriers	Fibre cave Colonna da cromatografia	Xenocitotossicità, ATP Coniugazione bilirubina, sintesi proteica
Uchino <i>et al.</i> (25)	Ratto e coniglio	Piatti di coltura multipli	Detossificazione ammonio, sintesi di urea,
Sussman <i>et al.</i> (28)	Cellule C3A derivate da epatoma umano	Fibre cave	Metabolismo glucosio, sintesi di albumina
Nyberg <i>et al.</i> (31)	Ratto, gel entrapment	Fibre cave	Sintesi di albumina, urea ed ornitina, consumo di O ₂ , metabolismo lidocaina, clearance arginina
Rozga <i>et al.</i> (36)	Ratto, microcarriers	Fibre cave	Metabolismo ciclosporina e 19- <i>nor</i> -testosterone
Gerlach <i>et al.</i> (42)	Maiale	Fibre cave	Sintesi di albumina, metabolismo midazolam, clearance galattosio e sorbitolo
Naruse <i>et al.</i> (44)	Maiale, tessuto non- tessuto di poliestere	Flusso radiale	Detossificazione ammonio, sintesi di urea e di albumina
Flendrig <i>et al.</i> (45)	Maiale, tessuto non- tessuto di poliestere	Flusso tangenziale	Eliminazione galattosio, detossificazione ammonio, sintesi di urea, metabolismo lidocaina ed aminoacidi, rapporto lattato/piruvato, sintesi proteica

per la immobilizzazione degli epatociti, avvolto a spirale intorno ad un fascio di fibre cave, integrate nel modulo per la ossigenazione e la rimozione dell'anidride carbonica. Tale bioreattore ha dimostrato la sua efficacia sia in esperimenti *in vitro* (45), che in studi sperimentali nell'animale da laboratorio (46) ed è attualmente in fase di utilizzazione in un trial multicentrico europeo che vede presenti anche Centri italiani.

Lo sviluppo dei sistemi di supporto epatico bioartificiale ha una lunga e complessa storia, ma il numero di gruppi di ricerca che si sono occupati dell'argomento è relativamente piccolo. I risultati degli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* eseguiti con vari modelli di FBA basati su epatociti isolati sono riassunti nelle Tabelle I e II.

La storia dei sistemi di supporto epatico bioartificiale è per gran parte caratterizzata dagli sforzi per migliorare le metodiche di isolamento, coltivazione e conservazione di grandi quantità di epatociti vitali, ma anche dal continuo sviluppo di sistemi artificiali, come membrane sintetiche semipermeabili, fibre cave porose ed altri polimeri, che possano essere utilizzati insieme alle cellule per il trattamento di pazienti affetti da IEF. Durante gli ultimi vent'anni, è stato dimostrato che nel fegato la superficie citoplasmatica basale (sinusoidale) è in stretto contatto con la membrana basale, anche se una vera e pro-

pria membrana basale non può essere dimostrata a livello ultrastrutturale (50). Nel fegato, la membrana basale consiste di fibre di collagene, in gran parte del tipo IV e V, glicoproteine tra cui la laminina e la fibronectina ed il proteoglicano eparansolfato (51). In particolare, è stato dimostrato che gli epatociti isolati espongono distinti recettori di superficie per il collagene, la fibronectina, a la laminina (52). Epatociti appena isolati ed incubati in un mezzo di cultura completo sono in grado di ripristinare molte delle caratteristiche morfostrutturali tipiche del fegato *in vivo*, comprese strutture intercellulari che assomigliano a canalicoli biliari. Gli epatociti si sono anche dimostrati capaci di proliferare se coltivati in un terreno senza siero, ma arricchito di ormoni definiti e varie componenti della matrice extracellulare (53). La superficie latero-basale di singoli epatociti aderisce ai substrati del mezzo di coltura, riproducendo le interazioni esistenti tra le cellule e la lamina basale, presenti nel fegato intatto. Mentre il periodo di stabilità funzionale di aggregati epatocitari in sospensione ottenuti da fegati adulti, normalmente non supera le 48 ore, l'uso di componenti della matrice extracellulare nel terreno di coltura, ad esempio quelli estratti dalle cellule della linea tumorale di Engelbreth-Holm-Swarm (Matrigel®), permette la stabilità funzionale delle cellule per almeno 3

Tab. II – STORIA DEGLI ESPERIMENTI *IN VIVO* ESEGUITI CON VARI MODELLI DI FEGATO BIOARTIFICIALE BASATO SU EPATOCITI ISOLATI. IEF: INSUFFICIENZA EPATICA FULMINANTE. MODIFICATA DA ROZGA & MORSIANI (9)

<i>Autore</i>	<i>Epatociti</i>	<i>Bioreattore</i>	<i>Modello animale</i>	<i>Effetti</i>
Matsumura <i>et al.</i> (26)	Ratto e coniglio	Dializzatore	Cirrosi da CCl ₄ nel ratto	Clearance BSP, sintesi bilirubina e albumina
Olumide <i>et al.</i> (24)	Maiale	Membrane Parallele	Maiale anepatico	Riduzione coma, aumento sopravvivenza
Kasai <i>et al.</i> (14)	Cane	Fibre cave	IEF da Galattosamina nel cane	Aumento sopravvivenza
Uchino <i>et al.</i> (25)	Maiale	Piatti cultura in vetro	Maiale anepatico	Aumento sopravvivenza
Yanaghi <i>et al.</i> (47)	Coniglio	Piatti rotanti cellule in idrogel	IEF da ischemia epatica	Clearance ammonio
Arnaut <i>et al.</i> (35)	Ratto, microcarriers	Fibre cave	Ratto iper-bilirubinemico	Coniugazione della bilirubina
Shyna <i>et al.</i> (48)	Ratto, Microcarriers	Colonna	IEF da Galattosamina	Aumento sopravvivenza
Nyberg <i>et al.</i> (49)	Ratto, gel entrapment	Fibre cave	IEF da CCl ₄ , ratto Coniglio anepatico	Sintesi albumina, clearance a. acidi, clearance ammonio ed acido lattico
Sussman <i>et al.</i> (28)	Cellule C3A da epatoma umano	Fibre cave	IEF da acetaminofene nel cane	Aumento sopravvivenza
Rozga <i>et al.</i> (36)	Cane, maiale, microcarriers	Fibre cave	IEF da ischemia epatica nel cane	Clearance ammonio, aumento glicemia, clearance a. lattico
Gerlach <i>et al.</i> (43)	Maiale	Fibre cave	Maiale anepatico	Aumento sopravvivenza, clearance ammonio, sintesi di albumina
Flendrig <i>et al.</i> (46)	Maiale, poliestere	Flusso tangenziale	IEF da ischemia epatica nel ratto	Aumento sopravvivenza

settimane (54). Ciò sembrerebbe essere una diretta conseguenza del ripristino della polarità cellulare nella coltura primaria (55).

Queste interessanti scoperte sono state introdotte rapidamente nelle ricerche miranti alla costruzione del FBA. Un approccio interessante proposto dall'Università di Harvard è stata la creazione di un originale sistema di coltura in cui epatociti adulti isolati, mantenuti tra due strati di gel di collagene (configurazione c.d. a sandwich), hanno mantenuto a lungo funzioni differenziate (56, 57). Nella configurazione a sandwich, la prolina è risultata un componente critico ed essenziale per una coltura ottimale degli epatociti in terreno senza siero (58). All'Università del Minnesota è stato messo a punto un sistema di coltura da utilizzare come FBA, in cui epatociti isolati vengono intrappolati in un gel di collagene all'interno del lume delle fibre cave di un normale bioreattore; dopo contrazione a caldo del gel che avvolge le cellule all'interno del lume della fibra cava si ha la creazione di uno spazio che viene utilizzato per la perfusione diretta delle cellule con mezzo di coltura, mentre il sangue del paziente da trattare scorre nello spazio esterno alle fibre cave (31, 49). Alla Brown University, il

metabolismo del Diazepam è stato estensivamente studiato in un sistema di coltura in cui epatociti isolati di ratto venivano mantenuti nello spazio extrafibre di un bioreattore a fibre cave di polisulfone, rivestite sulla loro superficie esterna a diretto contatto con le cellule con un preparato a base di collagene bovino (Vitrogen®) prima della introduzione delle cellule (59). Con una configurazione colturale simile, è stata eseguito uno studio *in vivo* in conigli intossicati con D-galattosamina, dimostrando un aumento significativo della sopravvivenza, probabilmente dovuto al mantenimento della funzione del citocromo P450 da parte degli epatociti (22). L'uso di sferoidi epatocitari, rappresentati da aggregati di circa 20-30 cellule, ha comportato il mantenimento di funzioni metaboliche differenziate per un periodo di tempo superiore a quello di una sospensione di singoli epatociti (60). Infine, l'interazione tra gli epatociti ed il mantenimento di funzioni metaboliche differenziate fino a 40 giorni è stata resa possibile in una coltura tridimensionale che impiega un reticolato di poliuretano, all'interno del quale gli agglomerati cellulari si annidano ed immobilizzano (61).

La sopravvivenza dei pazienti colpiti da IEF è aumentata

negli ultimi 10 anni. Ciò è molto probabilmente dovuto alle aumentate possibilità di rigenerazione spontanea offerte al fegato seriamente danneggiato, da parte delle varie terapie di supporto messe in atto in ambiente intensivo. Nei pazienti in cui tale possibilità di rigenerazione non si è verificata o non è stata sufficiente a cambiare il quadro clinico, il trapianto di fegato in regime di urgenza ha rappresentato l'unica misura terapeutica efficace. In questo senso, il trapianto di fegato in emergenza ha cambiato in maniera radicale la sopravvivenza in caso di IEF. Il ruolo del FBA di cui si sono brevemente descritti la storia passata e lo stato attuale degli studi, nonché il ruolo di altri sistemi totalmente artificiali di supporto epatico, si inseriscono a questo livello per permettere e forse anche per stimolare la rigenerazione spontanea del fegato colpito da un danno necrotico ancora potenzialmente reversibile, o per supportare il paziente fino al reperimento dell'organo ed al trapianto. Gli studi clinici controllati di fase II e III recentemente iniziati negli Stati Uniti ed in Europa ci diranno nel giro di qualche anno se il FBA manterrà le promettenti aspettative innescate dopo quasi cinquant'anni di affascinanti ricerche.

Bibliografia

- 1) Berneau J., Rueff B., Benhamou J.-P.: *Fulminant and subfulminant liver failure: Definitions and causes.* Sem Liver Dis, 6:97, 1986.
- 2) O'Grady J., Schalm S.W., Williams R.: *Acute liver failure: Redefining the syndrome.* Lancet, 342:273, 1993.
- 3) Wolf G.: *Acute liver failure: Current standards of diagnosis and treatment. Definitions and etiology.* In Demetriou A.A.(Ed.), *Support of the Acutely Failing Liver.* Austin: R.G. Landes, pp. 5-21, 1994.
- 4) Rozga J., Podesta L., LePage E., Morsiani E., Moscioni A.D., Hoffman A., Sher L., Villamil F., Woolf G., Mc Grath M., Kong L., Rosen H., Lanman T., Vierling J., Makowka L., Demetriou A.A.: *A bioartificial liver to treat severe acute liver failure.* Ann Surg, 219:538, 1994.
- 5) Malchesky P.S.: *Nonbiologic liver support: Historic overview.* Artif Org, 18:342, 1994.
- 6) Atillasoy E.O., Berk P.D.: *Extracorporeal liver support: Historical background and critical analysis.* In Lee W.M. and Williams R. (Eds.), *Acute Liver Failure.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 223-244, 1997.
- 7) Kamlot A., Rozga J., Watanabe F.D., Demetriou A.A.: *Artificial liver support systems.* Biotechnology and Bioengineering, 50:382, 1996.
- 8) Takahashi T., Malchesky P.S., Nose Y.: *Artificial liver: state of the art.* Dig Dis Sci, 36:1327, 1991.
- 9) Rozga J., Morsiani E., LePage E., 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, 1994.
- 10) Sorrentino F.: *Prime ricerche per la realizzazione di un fegato artificiale.* Chir Patol Sperim, 4:1401, 1956.
- 11) Kimoto S.: *The artificial liver experiments and clinical application.* ASAIO Trans, 5:102, 1959.
- 12) Hori M.: *Artificial liver. The concept and working hypothesis of hybrid organs. From a 25 year-old anecdote to the 21st century model.* ASAIO Trans, 18:639, 1982.
- 13) Mikami J., Moto M., Nishimuro A., Kasai Y., Nose Y., Sasaki E.: *Surgical treatment of liver failure. II: an experimental study of extracorporeal metabolism in the artificial liver using slices of canine liver.* Jpn J Gastroenterol, 56:1022, 1959.
- 14) Nose Y., Mikami J., Kasai Y., Sasaki E., Agishi T., Danjo Y.: *An experimental artificial liver utilizing extracorporeal metabolism with sliced of granulated canine liver.* ASAIO Trans, 9:358, 1963.
- 15) Howard R.B., Pesch L.A.: *Preparation and partial characterization of intact isolated parenchymal cells from rat liver.* Biol Chem, 243:3105, 1968.
- 16) Berry M.N., Friend D.S.: *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells.* J Cell Biol, 43:506, 1969.
- 17) Seglen P.D.: *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell Biol, 13:29, 1976.
- 18) Knazek R.A.: *Solid tissue masses formed in vitro from cells cultured on artificial capillaries.* Fed Proc, 33:1978, 1974.
- 19) Wolf C.F., Munkelt B.E.: *Bilirubin conjugation by an artificial liver composed of cultured cells and synthetic capillaries.* ASAIO Trans, 21:16, 1975.
- 20) Hager J.C., Carman R., Stoller R., Panol G., Leduc E.H., Thayer W.R., Porter L.E., Galletti P.M., Calabresi P.: *A prototype for a hybrid artificial liver.* ASAIO Trans, 24:250, 1978.
- 21) Hager J.C., Carman R., Porter L.E., Stoller R., Panot G., Galletti P.M.: *Neonatal hepatocyte culture on artificial capillaries: A model for drug metabolism and the artificial liver.* ASAIO Trans, 6:26, 1983.
- 22) Jaregui H.O., Santangini H., Naik S.: *In vitro benzodiazepine metabolism of adult rat hepatocytes seeded in hollow-fiber membrane device.* Hepatology, 8:1387, 1988.
- 23) Eiseman B., Norton L., Kralios N.C.: *Hepatocyte perfusion within a centrifuge.* Surg Gynecol Obstet, 142:21, 1976.
- 24) Olumide F., Eliashiv A., Kralios N., Norton L., Eiseman B.: *Hepatic support with hepatocyte suspension in a permeable membrane dialyzer.* Surgery, 82:599, 1977.
- 25) Uchino J., Tsuburaya T., Kumagai F. Hase T., Hamada T., Kornai T., Funatsu A., Hashimura E., Nakamura K., Kon T.: *A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers.* ASAIO Trans, 34:972, 1988.
- 26) Matsumura K.N., Guevara R., Huston H., Hamilton W.L., Rikimaru M., Yamasaki G., Matsumura M.S.: *Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report.* Surgery, 101:99, 1987.
- 27) Margulis M.S., Erukhimov E.A., Andreiman L.A, Viksna L.M.: *Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency.* Resuscitation, 18:85, 1989.

- 28) Sussman N.L., Chong M.G., Koussayer T., He D., Shang T.A., Whisenand H.H., Kelly J.H.: *Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device*. Hepatology, 16:60, 1992.
- 29) Sussman N.L., Finegold M.J., Barish J.P., Kelly J.H.: *A case of syncytial giant-cell hepatitis treated with an extracorporeal liver assist device*. Am J Gastroenterol, 89:1077, 1994.
- 30) Ellis A.J., Hughes R.D., Wendon J.A., Dunne J., Langley P.G., Kelly J.H., Gislason G.T., Sussman N.L., Williams R.: *Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure*. Hepatology, 24:1446, 1997.
- 31) Nyberg S.L., Rimmel R.P., Mann H.J., Peshwa M.V., Hu W.-S., Cerra F.B.: *Primary hepatocytes outperform Hep G2 as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver*. Ann Surg, 220:59, 1994.
- 32) Demetriou A.A., Whiting J.F., Levenson S.M., Chowdhury N.R., Schechner R., Michalski S., Feldman D., Chowdhury, J.R.: *New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support*. Ann Surg, 204:259, 1986.
- 33) Rozga J., Morsiani E., LePage E., Demetriou A.A.: *Liver support system development*. In A.A. Demetriou (Ed.), *Support of the Acutely Failing Liver*. Austin: R.G. Landes, pp. 60-81, 1994.
- 34) Giorgio T.D., Rozga J., Moscioni A.D., Demetriou A.-A.: *Liver support system engineering principles*. In A.A. Demetriou (Ed.), *Support of the Acutely Failing Liver*. Austin: R.G. Landes, pp. 83-93, 1994.
- 35) Arnaut W.S., Moscioni A.D., Barbour R.L., Demetriou A.A.: *Development of bioartificial liver: bilirubin conjugation in guinea rats*. J Surg Res, 48:379, 1990.
- 36) Rozga J., Williams F., Ro M.-S., Neuzil D.F., Demetriou A.A.: *Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells*. Hepatology, 17:258, 1993.
- 37) Rozga J., Holzman M.D., Ro M.-S., Griffin D.W., Neuzil D.F., Giorgio T., Moscioni A.D., Demetriou A.A.: *Development of hybrid bioartificial liver*. Ann Surg, 217:502, 1993.
- 38) Neuzil D.F., Rozga J., Moscioni A.D., Ro M.-S., Hakim R., Arnaut W.S., Demetriou A.A.: *Use of a novel bioartificial liver in patient with acute liver insufficiency*. Surgery, 113:340, 1992.
- 39) Watanabe F.D., Mullan C.J.-P., Hewitt W.R., Arkadopoulos N., Kahaku E., Eguchi S., Khalili T., Arnaut W., Shackleton C.R., Rozga J., Solomon B., Demetriou A.A.: *Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial*. Ann Surg, 225:484, 1997.
- 40) Rozga J., Podesta L., LePage E., Hoffman A., Morsiani E., Sher L., Woolf G.M., Makowka L., Demetriou A.A.: *Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure*. Lancet, 342:898, 1993.
- 41) Gerlach J.C., Stoll P., Schnoy N., Bücherl E.S.B.: *Membranes as substrate for hepatocyte adhesion in liver support bioreactors*. Int J Artif Org, 13:436, 1990.
- 42) Gerlach J.C., Encke J., Hole O., Müller C., Ryan C.J., Neuhaus P.: *Bioreactor for a large scale hepatocyte in vitro perfusion*. Transplantation, 58:984, 1994.
- 43) Gerlach J.C., Schnoy, N., Encke J., Smith M.D., Müller C., Neuhaus P.: *Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies*. Hepatology, 22:546, 1995.
- 44) 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, 1996.
- 45) Flendring L. la Soe J.W., Jörning G.G.A., Steenbeek A., Karlsen O.T., Bovè 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, 1997.
- 46) Flendring L., Chamuleau R.A.F.M., Maas M.A.W., Daahluisen J., Hasset B., Kilty C.G., Doyle S., Ladiges N.C.J.J., Jörning G.G.A., la Soe J.W., Sommeijer D., te Velde A.A.: *Evaluation of a novel bioartificial liver in rats with complete liver ischemia: treatment efficacy and species-specific a-GST detection to monitor hepatocyte viability*. J Hepatol, 30:311, 1999.
- 47) Yanagi K., Okawa K., Mizuno S., Oshima N.: *Performance of a new hybrid artificial liver support system using hepatocytes entrapped within a hydrogel*. ASAIO Trans, 35:570, 1989.
- 48) Shyna A., Bocharov A., Bochkova N., Spirov V.: *Bioartificial liver using hepatocytes on biosilon microcarriers: treatment of chemically induced acute hepatic failure in rats*. Artif Org, 15:189, 1991.
- 49) Nyberg S.L., Shatford R.A., Peshwa M.W., White J.M., Cerra F.B., Hu W.-S.: *Evaluation of hepatocyte-entrapment hollow-fiber bioreactor: a potential bioartificial liver*. Biotechnology and Bioengineering, 41:194, 1993.
- 50) Ponce P.J., Cordero M., Rojkind M.: *A noncollagenous matrix for attachment of rat hepatocytes in culture*. Hepatology, 1:204, 1981.
- 51) Gordon J.R., Bernfield M.R.: *The basal lamina of the postnatal mammary epithelium contains glycosaminoglycans in a precise ultra-structural organization*. Develop Biol, 74:118, 1980.
- 52) Bissell D.M., Stamaglou S.C., Nermut. M.V., Hughes R.C.: *Interactions of rat hepatocytes with type IV collagen, fibronectin and laminin matrices. Distinct matrix-controlled models of attachment and spreading*. Eur J Cell Biol, 40:72, 1986.
- 53) Enat R., Jefferson D.M., Ruiz-Opazo N., Gatmaitin Z., Leinwand L.A. Reid L.M.: *Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix*. Proc Natl Acad Sci. U.S.A., 81:1411, 1984.
- 54) Bissell M.D., Arenson D.M., Maher J.J., Roll J.: *Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel*. J Clin Invest, 79:801, 1987.
- 55) Musat A.I., Sattler C.A., Sattler G.L., Pitot H.C.: *Re-establishment of cell polarity of rat hepatocytes in primary culture*. Hepatology, 18:198, 1993.
- 56) Dunn J.C.Y., Tompkins R.G., Yarmush M. L.: *Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration*. Biotech Prog, 7:237, 1991.
- 57) Tompkins R.G., Yarmush M.L.: *Prospects for an artificial liver*. Transplantation Reviews, 7:191, 1993.
- 58) Lee J., Morgan J.R., Tompkins R.G., Yarmush M.L.: *The impor-*

- tance of proline in long-term hepatocyte function in a collagen gel sandwich configuration: regulation of proline secretion. *Biotechnology and Bioengineering*, 40:298, 1992.
- 59) Jauregui H.O., Naik S., Santangini H., Pan J., Trenkler D., Mullon C.: *Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 30A:23, 1994.
- 60) Sakai Y., Suzuki M.: *Formation of spheroids of adult rat hepatocytes on polylysine-coated surfaces and their albumin production*. *Biotech Tech*, 4:299, 1991.
- 61) Sato Y., Ochiya T., Yasuda Y., Matsubara K.: *A new three-dimensional culture system for hepatocytes using reticulated polyurethane*. *Hepatology*, 19:1023, 1994.

Autore corrispondente:

Dott. Eugenio MORSIANI
Sezione di Patologia Speciale Chirurgica,
Arcispedale Sant'Anna,
Corso Giovecca, 203
44100 FERRARA