

Epatociti isolati e loro potenziale uso terapeutico



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

A.C. PUVIANI, C. OTTOLENGHI,
P. PAZZI*, E. MORSIANI**

Dipartimento di Biologia, Sezione di Fisiologia Generale,
Università di Ferrara

*Servizio di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva,
Arcispedale Sant'Anna, Ferrara

**Dipartimento di Chirurgia,
Sezione di Patologia Speciale Chirurgica
Università di Ferrara, Arcispedale Sant'Anna, Ferrara

Introduzione

Trent'anni fa, Howard e Pesch per la prima volta isolarono epatociti integri di ratto e ne studiarono la fisiologia (1). Sin da questo primo isolamento e dopo che la tecnica è stata perfezionata da Berry e Friend (2) e da Seglen (3), la metodica ha dimostrato tutta la sua efficacia e versatilità nello studio di molti aspetti delle varie funzioni epatiche. Quasi dieci anni dopo la prima preparazione di epatociti venne sperimentato il trapianto di epatociti isolati allo scopo di trattare sperimentalmente l'insufficienza epatica acuta e le carenze enzimatiche congenite in piccoli animali di laboratorio (4-7). Questi primi studi furono presto seguiti da vari tentativi al fine di migliorare e prolungare la vitalità e l'attività metabolica degli epatociti trapiantati (8-10). Attualmente gli epatociti trapiantati hanno la capacità di mantenersi vitali ed attivi per tutto il tempo di sopravvivenza dei piccoli animali riceventi, e numerosi disordini metabolici epatici ereditari, indotti da mutazioni spontanee, sono stati trattati con successo mediante il trapianto di epatociti (11).

Recentemente, i progressi compiuti nella ingegneria genetica, nella terapia genica e nello sviluppo di sistemi artificiali di supporto epatico basati sull'impiego di epatociti per il trattamento dell'insufficienza epatica acuta (9, 12, 13) hanno riacceso l'interesse intorno alle tecniche di isolamento e di coltura delle cellule epatiche. La realizzazione di sistemi extracorporei di supporto epatico richiede la capacità di isolare e coltivare epatociti su larga scala, senza che vadano perdute le funzioni differenziate essenziali delle cellule; questo rende necessario il ricorso alla bioingegneria per ottenere la massima fun-

Riassunto

Gli epatociti isolati rappresentano un sistema idoneo per lo studio della fisiologia e del metabolismo epatico. Essi vengono inoltre utilizzati in ricerche di carattere farmacologico e tossicologico correlate ad assunzione, metabolismo, escrezione e tossicità a livello epatico di sostanze xenobiotiche, e per valutare gli effetti morfologici e metabolici indotti nel fegato da farmaci o da sostanze tossiche. In questo capitolo sono passati in rassegna i metodi enzimatici per l'isolamento degli epatociti in alcune specie di mammiferi; sono inoltre riportati alcuni metodi per valutare la purificazione delle cellule epatiche, il loro aspetto morfologico e la loro funzionalità. Di recente è aumentato l'interesse intorno al trapianto di epatociti e alla sperimentazione clinica di sistemi di supporto epatico basati sull'impiego di epatociti. Da un punto di vista clinico, l'impiego di epatociti isolati potrebbe rivelarsi utile per supportare un fegato gravemente danneggiato oppure affetto da una patologia cronica, ed ancora per correggere alterazioni genetiche che sfociano in stati di carenza metabolica. I risultati conseguiti con il trapianto di epatociti allogeneici isolati o con l'impiego di epatociti xenogeneici in sistemi di supporto epatico bio-artificiali, sono promettenti ed accrescono l'interesse intorno alle metodiche di isolamento e di purificazione degli epatociti. Parole chiave: Digestione collagenasica del fegato, epatociti isolati, trapianto di epatociti, fegato artificiale basato sull'impiego di epatociti.

Summary

ISOLATED HEPATOCYTES AND THERAPEUTICAL POTENTIAL USAGE

Isolated hepatocytes in culture represent an idoneous system for the study of liver physiology and metabolism. Furthermore, they are also widely utilized in pharmacological and toxicological study, in evaluating xenobiotic substance effects on the liver. In this paper, we reviewed the enzymatic methods for liver cell isolation in some mammalian species, as well as the techniques for qualitative and quantitative evaluation of cell number, vitality, purity, morphology and function. Recently, there has been a renewed interest in hepatocyte transplantation and hepatocyte-based liver support systems. From a clinical point of view, isolated hepatocytes could be useful in temporarily substituting an acutely damaged liver, a liver affected by a chronic pathology, or to correct an inherited liver disease carrying a severe metabolic derangement. Early experimental results of allogeneic hepatocyte transplantation, as well as the fir-

st clinical trials of bioartificial liver support systems employing xenogeneic hepatocytes are promising and contribute to maintain that interest in liver cell isolation and purification methods.

Key words: Collegenase digestion of the liver, isolated hepatocytes, hepatocyte transplantation, hepatocyte-based bioartificial liver.

zionalità delle cellule isolate (14). In questo contesto sono riportati i vari metodi di preparazione degli epatociti isolati in diverse specie di mammiferi; sono inoltre descritte alcune delle tecniche in uso per la purificazione delle cellule e per la valutazione degli aspetti morfologici e di quelli relativi alla funzionalità degli epatociti in vista di un loro potenziale impiego clinico.

Isolamento degli epatociti

Gli epatociti rappresentano la componente morfologica di gran lunga più importante del fegato. Sono presenti, inoltre, quattro tipi principali di cellule non parenchimali: le cellule endoteliali e le cellule di Kupffer, che rivestono i sinusoidi, le cellule di Ito o cellule stellate, che immagazzinano grasso ed infine cellule immunitarie come le *pit cells* ed i linfociti *natural killer* (NK). Nei mammiferi circa il 78% del volume epatico è occupato da cellule parenchimali epatocitarie, il 6% da cellule non parenchimali, mentre il restante 16% è occupato dagli spazi intercellulari, quali lo spazio di Disse, il lume sinusoidale e i canalicoli biliari (15). In termini di numero di cellule, gli epatociti rappresentano una quota superiore al 65% del fegato *in toto*. La discrepanza fra numero di cellule e volume è dovuta al fatto che gli epatociti sono molto più grandi delle altre cellule epatiche, avendo le cellule non parenchimali un diametro medio inferiore ai 10 μm . È noto che durante la vita fetale possono manifestarsi variazioni del volume degli epatociti e della percentuale di cellule non parenchimali, mentre dopo la nascita, gli epatociti aumentano di volume piuttosto che di numero (16). Il volume cellulare, a sua volta dipende dallo stato nutrizionale, per esempio, dopo 48 ore di digiuno, esso può diminuire fino al 45% (17). Il parenchima epatico è permeato da una intricata rete di fibrille di collagene, immerse in una matrice extracellulare, composta principalmente da una miscela di elastina, eparan solfato e di molecole dotate di proprietà adesive, come la laminina e la fibronectina. Una sottile struttura reticolare circonda i sinusoidi e permea gli spazi perisinusoidali. La matrice extra-cellulare, le glicoproteine adesive, gli ioni calcio e i recettori sulla superficie cellulare svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'ancoraggio, della forma, della polarità e della funzionalità cellulari. Ciascun epatocita

è attaccato e comunica con numerosi epatociti contigui per mezzo di complessi giunzionali. La conoscenza di questi aspetti di morfologia e funzionalità epatica ha forgiato i metodi moderni di isolamento e di coltura degli epatociti.

È possibile ottenere sospensioni di epatociti isolati di mammifero con la dissociazione meccanica del parenchima epatico, come è stato proposto originariamente da Schneider e Potter (18), oppure mediante digestione enzimatica. La seconda tecnica può essere applicata immergendo il fegato tagliuzzato in una soluzione di collagenasi (1, 19), oppure perfondendo direttamente l'organo con collagenasi (2, 3). Con la semplice separazione meccanica, meno del 10% del fegato viene convertito in una sospensione di cellule isolate e vitali. Inoltre, queste cellule possono rapidamente perdere la respirazione endogena, la capacità glicolitica e la maggior parte delle attività enzimatiche differenziate (16). Sono stati sperimentati tre diversi metodi di isolamento degli epatociti di ratto, valutando la produzione, la vitalità e l'ultrastruttura cellulare (20). Forzando il tessuto epatico attraverso un crivello in acciaio inossidabile, come originariamente descritto da Kaltenbach (21), per ogni grammo di fegato si ottenevano appena $26 \pm 6 \times 10^6$ cellule, di cui solo il $62 \pm 18\%$ appariva vitale al test di esclusione del trypan blue; osservate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), la maggior parte delle cellule isolate presentava gravi danni alla membrana plasmatica e agli organuli citoplasmatici. Anche il metodo di Fry, che prevede l'immersione di frammenti di tessuto epatico in una soluzione di collagenasi (20) è stato da tempo abbandonato: la produzione di cellule era infatti troppo scarsa ($3,9 \pm 1,7 \times 10^6$ cellule/grammo di tessuto epatico) al pari della vitalità ($52 \pm 24\%$); all'osservazione al TEM gli epatociti mostravano danni alla membrana citoplasmatica, ai mitocondri ed al reticolo endoplasmico. La produzione cellulare ottenuta perfondendo il fegato con collagenasi, utilizzando una metodica a due fasi ideata da Seglen (3) era di $50 \pm 27 \times 10^6$ cellule/grammo di tessuto epatico, con l'88% di vitalità; gli epatociti apparivano morfologicamente intatti, completamente dissociati e di forma rotondeggiante.

Più recentemente, si è tentato, con risultati molto parziali, di riprodurre in animali di laboratorio di grosse dimensioni il metodo di Wang, che prevedeva l'impiego dell'acido etilenediamintetracetico (EDTA) come unico agente chelante dissociativo delle cellule (22). In esperimenti condotti su cani, la vitalità degli epatociti era considerevolmente inferiore al 60% (12). Prevedibilmente, la più alta resa in cellule ($50,5 \pm 26,6 \times 10^6$ /grammo di tessuto epatico), una buona vitalità ($91 \pm 5,6\%$) ed un quadro morfologico pressoché intatto, sono stati ottenuti ripetutamente perfondendo collagenasi attraverso la vena porta (2, 3, 12). In questa rassegna sarà fatto riferimento principalmente a questo metodo enzimatico di isolamento.

Metodo enzimatico di isolamento degli epatociti di ratto

Il ratto è l'animale di laboratorio che viene usato con maggiore frequenza per ottenere sospensioni di epatociti isolati integri. Come già citato, il lavoro pionieristico fu fatto da Howard e Pesch (1), i quali ottennero una sospensione di epatociti integri dopo aver sottoposto a digestione enzimatica il parenchima epatico. Berry e Friend (2) migliorarono questo metodo perfondendo direttamente il fegato con una soluzione salina bilanciata, ossigenata e priva di ioni calcio, supplementata con collagenasi e ialuronidasi. Una modifica importante venne introdotta da Seglen (3), il quale dimostrò che gli ioni calcio devono essere prima rimossi dal fegato tramite una pre-perfusione e quindi di nuovo aggiunti alla soluzione contenente collagenasi. Infatti, la pre-perfusione del fegato con grandi volumi del mezzo povero di Ca^{2+} per almeno 10 minuti comporta una spaccatura irreversibile dei desmosomi. D'altro canto, l'inclusione di Ca^{2+} durante la perfusione con collagenasi potenzia l'attività enzimatica ed accelera la dispersione delle cellule (23). Al presente, la procedura a due fasi di Seglen risulta essere più popolare della tecnica ad una fase proposta da Berry e Friend. Tuttavia, da un confronto approfondito fra questi due metodi non è emersa alcuna differenza significativa in termini di produzione cellulare, vitalità e funzionalità degli epatociti (16).

Nel nostro laboratorio gli epatociti di ratto vengono isolati con la *two-step procedure* descritta da Seglen (3), a cui è stata apportata qualche modifica (24, 25). Dopo l'incannulazione della vena porta, il fegato viene lavato *in situ* senza ricircolo per 10 min con un mezzo fisiologico salino bilanciato e tamponato (HBSS) privo di Ca^{2+} , quindi perfuso con collagenasi allo 0.05% in un mezzo contenente Ca^{2+} . La digestione si completa in 4-5 minuti. L'organo viene rimosso dalla cavità addominale e trasferito in una capsula di Petri, dove l'isolamento degli epatociti viene completato meccanicamente pettinando il parenchima epatico con un pettine in acciaio a denti fitti. Il parenchima digerito viene quindi filtrato, lavato e infine sospeso in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM). In molti casi la vitalità iniziale delle cellule isolate è intorno al 90%. Dopo la semina in capsule di Petri o l'attacco a microcarriers rivestiti di collagene, la perdita di vitalità è di proporzioni trascurabili. Se c'è necessità di ottenere sospensioni cellulari altamente purificate, ad esempio per un trapianto intraportale di epatociti, si può procedere ad una purificazione su gradiente di densità Percoll (26). È anche opportuno filtrare la sospensione finale di cellule attraverso una rete con pori di 50 μm , al fine di scartare grossi ammassi di cellule.

Qualora le cellule debbano essere isolate da fegati di ratto già sottoposti a manipolazioni chirurgiche dell'ilo, è consigliabile il metodo di perfusione retrograda con collagenasi: si incannula la vena cava infraepatica e viene

fatta una legatura intorno al catetere al di sopra della vena renale destra. Quindi, senza individuare la vena porta, l'ilo epatico viene reciso e la cavità toracica aperta al fine di legare la vena cava sovraepatica. Il perfusato viene quindi pompato attraverso le vene epatiche, mentre la vena porta e l'arteria epatica recise funzionano come vie di deflusso (27).

Isolamento degli epatociti in altre specie di mammifero

Maiale. Il fegato porcino è più difficile da dissociare rispetto al fegato di ratto perché contiene più collagene e più tessuto fibroso. Tuttavia, l'isolamento di epatociti porcini perfondendo il fegato prima con una soluzione di EDTA e poi di collagenasi è semplice e altamente riproducibile (12). Al fine di evitare l'utilizzo di porzioni di un fegato adulto, ad esempio il lobo sinistro isolato, è opportuno utilizzare maiali che pesino meno di 30 Kg (28). Il fegato di maiali giovani di 3-4 settimane di età pesa circa 500-600 g e da esso si ottengono fino a 2×10^{10} epatociti vitali. Brevemente, l'addome dell'animale viene aperto con una incisione mediana, il legamento epato-duodenale viene tagliato e tutte le collaterali vengono legate e recise, eccetto la vena porta che viene incannulata con un tubo di silicone. Il fegato viene perfuso con una soluzione di EDTA 2 mM a 4°C (22), ad un flusso di 300 ml/min tramite una pompa peristaltica. La perfusione viene iniziata *in situ* e poi proseguita per 10 minuti sull'organo isolato, con una soluzione di EDTA a temperatura ambiente, preventivamente ossigenata. Si procede quindi alla digestione del parenchima perfondendo il fegato con una soluzione di collagenasi allo 0.05% in tampone Leffert addizionato con Ca^{2+} (29). La soluzione di collagenasi, ossigenata e mantenuta alla temperatura di 37°C, viene fatta ricircolare attraverso il fegato per circa venti minuti; a questo punto si rompe la capsula epatica e si filtra il parenchima digerito attraverso una serie di filtri in acciaio o di reti di nylon con pori di 400, 280 e 100 μm , in sequenza. Frazioni arricchite di epatociti vengono isolate centrifugando per 2 min a 50 X g. Con questo metodo la vitalità cellulare supera abbondantemente il 90%.

Gli epatociti di maiale sono molto più adatti all'uso clinico rispetto a quelli di altre specie animali, offrendo vantaggi quali la disponibilità illimitata e le notevoli somiglianze fisiologiche ed immunologiche con gli epatociti umani (30). Cresce, inoltre, l'interesse riguardo all'uso di epatociti porcini isolati nella realizzazione di un fegato bio-artificiale basato sull'impiego di cellule epatiche, quale supporto terapeutico per pazienti colpiti da insufficienza epatica acuta e fulminante (12, 31-33). Nella sperimentazione clinica in atto vengono utilizzati epatociti porcini primari, i quali possono, a questo riguardo, costituire una fonte ideale di cellule xenogeniche, proprio per la loro stretta rassomiglianza morfo-

gica e funzionale con gli epatociti umani. Nel nostro laboratorio sono stati recentemente eseguiti esperimenti preliminari in cui epatociti porcini isolati venivano seminati all'interno di un bioreattore a flusso radiale che consente uno stretto scambio tra le cellule e il mezzo di perfusione, con una omogenea distribuzione dell'ossigeno e dei componenti del mezzo su tutta la lunghezza del modulo (34).

Coniglio. Alcuni ricercatori hanno utilizzato epatociti isolati di coniglio, perché il complesso del citocromo P450 in questa specie presenta una notevole analogia con quello umano (35). La metodica seguita per l'isolamento è sostanzialmente quella di Seglen (3). Prima della digestione con collagenasi il fegato veniva perfuso con una soluzione tamponata di EDTA 0,5 mM in HBSS privo di Ca^{2+} ed Mg^{2+} (35). È stato anche sperimentato un metodo non enzimatico, utilizzando solo EDTA 10 mM (36). Questo metodo potrebbe essere idoneo per gli esperimenti di trapianto di epatociti, in quanto dopo la perfusione con soluzioni di EDTA altamente concentrate, la contaminazione da parte di cellule endoteliali, cellule di Kupffer ed elementi circolanti del sangue risulta molto bassa. In effetti questa preparazione ha rivelato un basso grado di immunogenicità, come risulta da una scarsa stimolazione dell'attività proliferativa in colture miste di linfociti (37).

Cane. Come già accennato in precedenza, Rozga e Coll. (12) non ottennero risultati positivi con la perfusione epatica di solo EDTA, per cui essi adottarono la perfusione con EDTA/collagenasi, metodo simile a quello riportato per l'isolamento di epatociti porcini (12). Nel caso del metodo con EDTA, il fegato veniva perfuso *in vivo* attraverso la vena porta con una soluzione ossigenata di EDTA 2 mM (22) e successivamente con una soluzione di CaCl_2 1 mM priva sia di EDTA che di bicarbonato. Con questo metodo la vitalità degli epatociti canini isolati era comunque inferiore al 60% e la resa di cellule vitali risultava inferiore ad 1×10^9 cellule (12).

Uomo. L'impiego di epatociti isolati umani per valutare *in vivo* il trasporto, il metabolismo e la tossicità dei farmaci, rappresenta una alternativa per superare la difficoltà di estrapolare dati dalla sperimentazione in animali di laboratorio (38). Disponendo di un metodo per l'isolamento degli epatociti, sarebbe vantaggioso anche mettere a punto tecniche di trapianto di epatociti umani per il trattamento dell'insufficienza epatica acuta, come pure per correggere squilibri ereditari metabolici specifici del fegato (39). Tuttavia, il successo senza precedenti del trapianto ortotopico di fegato e la carenza cronica di donatori riducono alquanto la disponibilità di fegati interi o di frammenti di organo in ottime condizioni e di dimensioni sufficienti per l'isolamento degli epatociti. Per queste ragioni viene considerato non etico l'impiego di

un fegato umano intero e ben conservato, per l'isolamento sperimentale degli epatociti. Ciò nonostante sono state approntate numerose tecniche utilizzando epatociti umani ottenuti con la perfusione dell'intero fegato di donatori per il trapianto di rene (38, 40), o di donatori di più organi mantenuti in vita artificialmente (41). La *two-step procedure* con perfusione di collagenasi è stata usata con buoni risultati sia in termini di produzione cellulare che di vitalità. Mito e Kusano (42) hanno descritto un metodo per l'isolamento di epatociti da piccoli frammenti di fegato ottenuti mediante sub-segmentectomia e resezione parziale. È stato utilizzato un sistema di multi-perfusione simultanea con 6-7 aghi provvisti di numerosi fori laterali e di una punta in grado di auto-aggiungersi al parenchima. Gli aghi venivano inseriti profondamente nel pezzo di fegato sezionato e la perfusione avviata con HBSS privo di Ca^{2+} e contenente glutamina e bicarbonato, quindi continuata con una soluzione contenente collagenasi allo 0,5% e ialuronidasi allo 0,1%. Gli Autori hanno riportato una produzione cellulare fino a 3×10^7 epatociti/grammo di tessuto epatico ed una vitalità del 79%, ottenuta perlopiù con frammenti di fegato cirrotico (42). Quando era disponibile un campione di fegato di maggiori dimensioni, ad esempio dopo segmentectomia o lobectomia, veniva effettuata la perfusione con collagenasi attraverso una branca della vena porta od attraverso la vena ombelicale (42). In alcune ricerche svolte da Moscioni e Coll. su epatociti umani isolati, le cellule sono state ottenute da porzioni di fegato di 350-500 g, provenienti da donatori che erano stati esclusi per il trapianto (43, 44). Numerosi angio-cateteri venivano introdotti in vasi sanguigni prima individuati sulla superficie di taglio del pezzo di fegato e poi suturati *in loco*. Le porzioni di fegato venivano quindi perfuse con tampone Leffert privo di Ca^{2+} e poi con lo stesso tampone contenente CaCl_2 1,8 mM e collagenasi 60 U/ml. Successivamente, le porzioni di fegato venivano lavate con tampone Leffert arricchito con CaCl_2 1,8 mM. La resa in cellule oscillava fra $1,5$ e 2×10^7 epatociti/grammo di tessuto epatico e la vitalità era compresa fra l'80 e il 90%.

Analisi qualitativa e quantitativa di funzionalità cellulare

Vitalità cellulare. Il metodo più ampiamente diffuso per valutare la vitalità degli epatociti dopo isolamento è il test di esclusione al trypan blue. Esso si basa sull'osservazione che le cellule vitali non assorbono il colorante, mentre quelle morte o gravemente danneggiate lo assumono e si colorano intensamente di blu (45). Al fine di mantenere un livello elevato di vitalità cellulare durante la semina in piastre di Petri e l'incubazione successiva, almeno il 90% delle cellule dovrebbe escludere il trypan blue alla prima osservazione microscopica. La percentuale di cellule colorate è influenzata dal pH, nel senso che il

loro numero aumenta quando il pH si abbassa sotto 4 (46). In linea generale, la percentuale di cellule isolate colorate con il trypan blue dovrebbe rimanere costante per almeno 30 minuti.

La valutazione della fuoriuscita dalle cellule di lattico deidrogenasi (LDH) è il metodo di elezione per accertare la presenza di danni agli epatociti mantenuti in coltura. L'esistenza di un alto grado di correlazione positiva fra il rilascio di LDH e l'esclusione del trypan blue lascia intendere che i due metodi di valutazione possiedono un comparabile grado di sensibilità (28). Tuttavia, quando una grossa molecola come l'LDH fuoriesce attraverso la membrana plasmatica, il danno arrecato alla cellula è verosimilmente già grave (47). Un metodo più sensibile per rilevare la presenza di danni epatocellulari in coltura si basa sulla capacità selettiva delle deidrogenasi mitocondriali nelle cellule vitali di ridurre il sale solubile giallo 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in un precipitato insolubile di colore viola detto formazan (48). Il numero di epatociti vitali può perciò essere misurato allo spettrofotometro in termini di concentrazione del prodotto della reazione. Questa tecnica è stata adottata recentemente come metodo per valutare l'attività mitocondriale di epatociti porcini isolati e coltivati per un tempo limitato (49, 50). Le cellule possono essere contate in un emocitometro di Burker o di Neubauer, al microscopio invertito od a contrasto di fase (16), oppure automaticamente per mezzo di un Coulter Counter (51); tuttavia, alcuni Autori sostengono che i dati ottenuti con questi conteggi non sono precisi come quelli ottenuti misurando il peso di un pellet cellulare, umido o asciutto (52).

Purificazione cellulare. Nel ratto la sospensione cellulare finale, ottenuta tramite la perfusione con collagenasi attraverso la vena porta e la successiva centrifugazione a bassa velocità, è rappresentata quasi esclusivamente da epatociti; gli altri tipi di cellule epatiche sono presenti in percentuale probabilmente inferiore allo 0,1-05% (2, 3, 16). Per questa ragione, una procedura di purificazione si rende necessaria solo quando la produzione cellulare è bassa, cioè quando una percentuale di cellule superiore al 15% si colora con il trypan blue (16) o quando è necessario rimuovere selettivamente tutte le cellule non parenchimali.

La contaminazione della preparazione di epatociti con cellule che espongono antigeni classe II del complesso maggiore di istocompatibilità, come le cellule endoteliali, le cellule di Kupffer, le cellule di Ito ed i linfociti residenti come le *pit cells*, può scatenare la risposta immunitaria dopo allo- o xeno-trapianto di epatociti (53). Kremer e Coll. (26) hanno messo a punto un metodo di centrifugazione su un gradiente di iso-densità di Percoll per preparare una sospensione altamente purificata di epatociti di ratto. Questa procedura prevede una centrifugazione a bassa velocità della sospensione iniziale di cellule in un mezzo a bassa densità di Percoll (1,060

g/ml). Il 90-95% degli epatociti vitali di ratto sospesi in un mezzo iso-osmotico di Percoll presenta infatti una densità di galleggiamento superiore a 1,060 g/ml (1,070-1,090 g/ml). Il restante 5-10% degli epatociti vitali di ratto presenta una densità di galleggiamento compresa fra 1,060 e 1,070 g/ml, mentre le cellule non parenchimali rientrano nell'intervallo che va da 1,040 a 1,060 g/ml (26, 28, 54).

In precedenti ricerche, aventi come scopo la realizzazione di un metodo per l'isolamento e la purificazione su larga scala di epatociti porcini (49, 50), il parenchima epatico digerito veniva filtrato in una apposita camera multicompartimentale di acciaio inox, che consentiva una rapida filtrazione delle cellule. Subito dopo la filtrazione, per lavare e purificare gli epatociti veniva utilizzato un processore per emazie (COBE, Blood Component Technology, Lakewood, CO). Questo metodo facilitava ed accelerava i processi di filtrazione, lavaggio e purificazione degli epatociti e, nel contempo, garantiva una condizione di sterilità, in quanto tutti i passaggi avvenivano all'interno di un sistema chiuso sterile. Questo è un aspetto estremamente importante, particolarmente quando gli epatociti isolati devono essere utilizzati per uso clinico nel fegato bioartificiale, per cui si devono trattare grossi volumi di sospensione di epatociti. Gli epatociti processati con questo metodo automatizzato presentano una vitalità e una capacità funzionale superiori a quelle della stessa preparazione cellulare sottoposta ad una procedura manuale standard di purificazione (50).

Funzionalità cellulare. Gli epatociti in sospensione, subito dopo l'isolamento, di norma perdono la loro polarità strutturale citoplasmatica (2). Essi assumono una forma tondeggianti, appaiono coperti di microvilli e privi di aree specializzate di membrana, come i complessi giunzionali ed i canalicoli biliari. Gli epatociti isolati, tuttavia, dopo aver raggiunto la confluenza in sistemi di coltura monostrato, ripristinano la polarità funzionale. Talamini e Coll. (55) hanno valutato il riformarsi della polarità morfologica e funzionale in epatociti posti in coltura dopo l'isolamento, su di un doppio strato a sandwich di gel di collagene. Esaminati al TEM gli epatociti così coltivati hanno rivelato elementi strutturali di polarizzazione e, dopo 24 ore, un forte avvicinamento delle rispettive membrane cellulari. Tuttavia, l'assenza di complessi giunzionali funzionali era attestata dal fatto che il rosso rutenio, un colorante inorganico che non oltrepassa le *tight junctions*, aveva libero accesso agli spazi intercellulari. Solo dopo 5 giorni di coltura *in vitro*, il rosso rutenio veniva escluso ed inoltre risultava evidente la presenza di canalicoli biliari dilatati. Per stimare il recupero della polarità funzionale in epatociti coltivati, è stata usata la fluorescina diacetato (55), un composto non fluorescente che viene assunto dalle cellule vitali, trasformato in fluorescina da una esterasi cellulare e quindi escreto nei canalicoli biliari. Perciò esso può essere utilizzato per saggiare la capacità degli epatociti di inter-

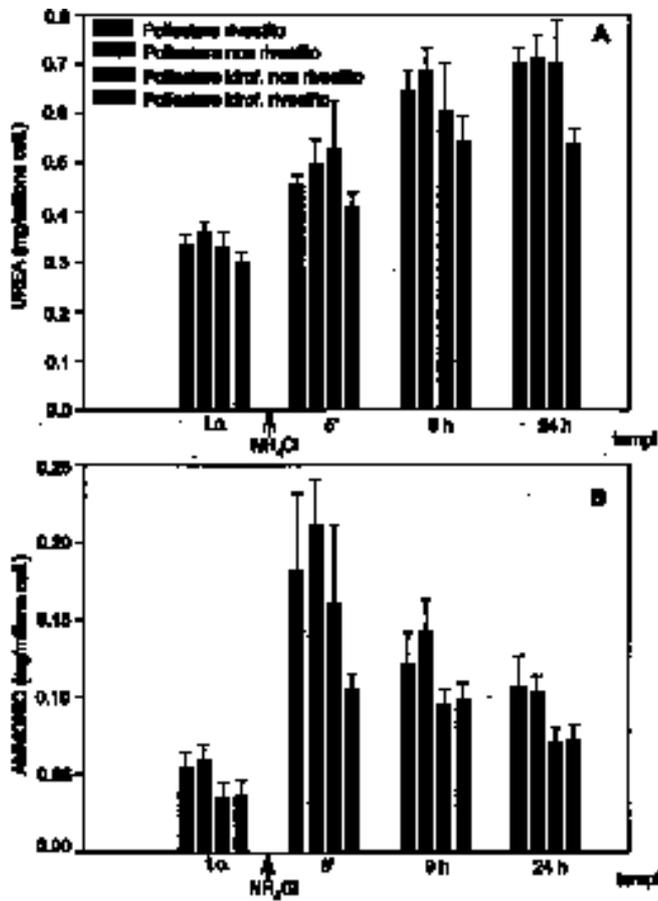


Fig. 1: Andamento temporale della sintesi di urea (A) e della rimozione di ammonio (B) da parte di epatociti isolati di ratto dopo aggiunta di NH₄Cl, alla concentrazione finale di 1mM; le cellule sono state coltivate all'interno di un tessuto di poliestere e di un tessuto-non-tessuto di poliestere idrofilico, sia rivestito di collagene di tipo I, sia non rivestito.

nalizzare, metabolizzare ed eliminare i composti nella bile. Questa polarità funzionale veniva ripristinata dopo 4 giorni.

La funzionalità delle preparazioni di epatociti isolati di mammifero può essere valutata misurando la sintesi di

urea, in un sistema di incubazione privo di siero. In Fig. 1 è rappresentato l'andamento della sintesi di urea (A) e della rimozione di ammonio (B) da parte di epatociti isolati di ratto coltivati *in vitro* alla densità di 6,7 X 10⁴ cellule/cm² in due sistemi tridimensionali di coltura. Gli epatociti erano stati seminati sulle maglie di un tessuto di poliestere e su un tessuto non-tessuto di poliestere idrofilico, sia rivestito di collagene di tipo I sia non rivestito. Lo studio è stato condotto dopo avere aggiunto NH₄Cl concentrazione finale di 1mM al terreno di coltura DMEM addizionato con insulina, glucagone e desametasone, 18 ore dopo l'inizio della coltura (56).

Un costante declino del consumo di O₂ di norma indica un progressivo danno cellulare (16). L'attività delle ossigenasi miste mitocondriali degli epatociti in coltura può essere valutata misurando i livelli di ATP, la fosforilazione ed i potenziali ossidoriduttivi, nonché la capacità delle cellule di mantenere un gradiente di K⁺ (16,52). L'attività metabolica degli epatociti può essere espressa in termini di contenuto di proteine e/o di DNA o come peso secco dopo estrazione con acido (52).

L'incubazione statica o la coltura primaria rappresentano le tecniche più adottate per studiare le attività metaboliche e la funzionalità degli epatociti isolati. Recentemente alcuni Autori hanno studiato il metabolismo epatico perfondendo epatociti isolati di ratto su una colonna di resina (57). Come supporto per le cellule isolate nella colonna di perfusione è stata usata la resina di poliacrilamide Bio Gel-P4. Il nostro gruppo di ricerca si è servito dello stesso sistema di perfusione per indagare le proprietà epatotossiche od epatoprotettive di sali biliari, rispettivamente idrofobici e idrofilici, su epatociti di ratto subito dopo l'isolamento (25). Alcune colonne riempite di resina e contenenti circa 100 mg di epatociti isolati (corrispondenti a circa 1 X 10⁶ cellule) sono state collegate ad una pompa peristaltica a più vie e perfuse ad un flusso di 1,25 ml/min; il liquido effluente è stato raccolto con un collettore di frazioni. In Tab. I è

Tab. I – EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI CONCENTRAZIONI DIVERSE DI ACIDI BILIARI SUL RILASCIO DI LDH, ESPRESSO COME PERCENTUALE DEL RILASCIO MASSIMO DETERMINATO MEDIANTE PERIFUSIONE CON TRITON X-100 0.2%, IN SOSPENSIONI DI EPATOCITI DI RATTO PERIFUSI (25)

Conc. acido biliare (mmol/l)	t-Ca	t-UCDA	t-CDCA	t-DCA
0.1	1.12 ± 0.63	1.66 ± 0.55	1.84 ± 0.76	1.90 ± 0.21*
0.5	1.99 ± 0.86	2.50 ± 0.79	3.63 ± 0.92**	3.94 ± 0.43**
1.0	2.00 ± 0.88 ^φ	3.21 ± 0.69 ^φ	4.53 ± 1.44*	8.65 ± 0.82***
1.5	3.42 ± 0.91 ^φ	3.41 ± 0.66 ^φ	4.99 ± 0.62**, ^φ	15.5 ± 1.57***
2.5	3.50 ± 0.64 ^φ	3.25 ± 0.49 ^φ	36.21 ± 2.92***, ^φ	52.33 ± 2.18***

I valori presentati sono le medie ± SEM di almeno 6 esperimenti; t-CA: acido tauro-colico; t-UCDA: acido tauro-urso-desossi-colico; t-CDCA: acido tauro-cheno-desossi-colico; t-DCA: acido tauro-desossi-colico. Significatività statistica rispetto ai controlli: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. Significatività fra le diverse soluzioni di acidi biliari testate: ^φ P < 0.001.

riportato l'effetto sul rilascio di LDH di diverse concentrazioni degli acidi biliari presi in esame. Gli acidi biliari più idrofilici, cioè il taurocolato e il taurourso-deossicolato, si sono dimostrati assai poco tossici, dato che non provocavano un significativo rilascio dell'enzima rispetto ai controlli fino ad una concentrazione di 5 mM. Al contrario, gli acidi biliari più idrofobici, cioè il taurochenodeossicolato e il taurodeossicolato, provocavano danni significativi alla membrana cellulare anche a basse concentrazioni (0,5 e 0,1 mM, rispettivamente). La perfusione degli epatociti isolati consente di indagare gli effetti epatotossici in condizioni dinamiche, mimando la situazione esistente *in vivo*. Questo sistema che monitorizza il rilascio enzimatico, è particolarmente utile per testare i farmaci e la cinetica dell'azione farmacologica.

Al fine di studiare *in vitro* la funzionalità degli epatociti isolati, vari Autori hanno accentrato la loro attenzione su coppie di epatociti, ottenute da sospensioni di epatociti di ratto (45, 58-61). Le *couplets* di epatociti sono coppie di cellule in cui le giunzioni intermembranarie non sono state completamente spaccate dalla procedura di isolamento, per cui conservano la loro normale polarità ed uno spazio canalicolare chiuso (59). Queste *couplets* sono in grado di trasportare la fluorescina dal mezzo di coltura nel lume canalicolare e gli stessi canalicoli possono rispondere a vari stimoli, applicati con tecniche di elettrofisiologia (58).

Gli epatociti in zone diverse del lobulo epatico presentano differenze funzionali. Sulla base dell'ipotesi morfologica acinare (62, 63), dovrebbero infatti sussistere differenze fra gli epatociti localizzati intorno ai punti di ingresso della vena porta, o zona periportale, e quelli disposti intorno ai punti di efflusso del sangue, o zona pericentrale, all'interno dell'acino. È stato, inoltre, proposto di suddividere l'unità strutturale dell'acino in tre regioni funzionali: periportale (PP) o zona 1, intermedia o zona 2 e perivenosa (PV) o zona 3. Nel decennio scorso, due gruppi di ricerca, rappresentati da Quistorff e Coll. (64) e da Lindros e Pentilla (65), hanno messo a punto metodi per studiare la zonazione epatica, basati su una breve perfusione del fegato con digitonina, la quale distrugge selettivamente gli epatociti PP o quelli PV. Questo dipende dalla direzione in cui viene infusa la sostanza, cioè anterograda, attraverso la vena porta, o retrograda, attraverso la vena epatica. Immediatamente dopo la perfusione con digitonina, la direzione di perfusione veniva invertita e si avviava una *two-step procedure* standard per isolare gli epatociti della zona non danneggiata dalla digitonina. Al termine della digestione, le cellule danneggiate venivano rimosse per centrifugazione su un gradiente di densità di Percoll. Le colture selettive di epatociti PP e PV rappresentano un sistema unico per studiare l'eterogeneità delle cellule epatiche (66).

Valutazione morfologica degli epatociti isolati

L'esame al microscopio ottico degli epatociti in sospensione al termine dell'isolamento consente di valutare la qualità della preparazione cellulare. Gli epatociti integri, osservati al microscopio a contrasto di fase appaiono chiari, traslucidi e di forma sferica con un bordo ben evidenziato. Negli epatociti danneggiati possono essere evidenti formazioni di bolle sulla membrana plasmatica (16). La formazione di *blebs* rappresenta un segnale di assunzione di liquido da parte di cellule iposiche o anosiche, a cui spesso segue la morte cellulare. Questo tipo di alterazione della membrana plasmatica, inoltre potrebbe indicare una sovraesposizione delle cellule alla collagenasi. Al TEM risulta evidente che i singoli epatociti in sospensione dopo l'isolamento hanno perso la loro tipica configurazione poligonale ed hanno assunto una forma sferica. A livello della membrana plasmatica non sono più individuabili le tipiche polarità canalicolari e sinusoidali; inoltre, tutti i complessi giunzionali, le giunzioni serrate, le giunzioni intermedie, le *gap junctions* ed i desmosomi, sono scomparsi. Corti microvilli ricoprono completamente la superficie della membrana plasmatica e l'apparato del Golgi, di norma disposto in prossimità dei canalicoli biliari, i lisosomi ed i mitocondri si presentano sparsi in tutto il citoplasma (Fig. 2). Epatociti di ratto isolati e coltivati in un sistema tridimensionale, costituito da un foglio di tessuto non-tessuto di poliestere idrofilico e biocompatibile al 100%, osservati al TEM dopo 42 ore di coltura, rivelavano una tendenza al ripristino della polarità ed al riformarsi di spazi canalicolari fra due epatociti contigui (Fig. 3). Al TEM gli epatociti danneggiati o troppo digeriti presentano segni di danno a carico della membrana plasmatica e degli organuli citoplasmatici. Nelle cellule isolate con mezzi meccanici non enzimatici (16, 20), si evidenziano spesso il rigonfiamento dei mitocondri e la vescicolazione dell'apparato di Golgi, come pure la vacuolizzazione del citoplasma e la comparsa di corpi densi peribiliari. Al microscopio elettronico a scansione (SEM) gli epatociti isolati integri presentano una forma per lo più tondeggiante ed appaiono coperti di microvilli; dopo una breve coltura su un supporto tridimensionale, essi formano piccoli ammassi cellulari (Fig. 4). Incubati su microcarriers rivestiti di collagene, gli epatociti isolati si riagggregano presto in gruppi di più cellule, ripristinando i contatti intercellulari e recuperano la polarità citoplasmatica.

Prospettive sull'uso clinico degli epatociti isolati

Da quando sono state introdotte le tecniche di isolamento degli epatociti, le preparazioni di cellule epatiche si sono dimostrate particolarmente adatte per lo studio di molti aspetti della fisiologia e del metabolismo epatico. Gli epatociti isolati in sospensione rimangono meta-

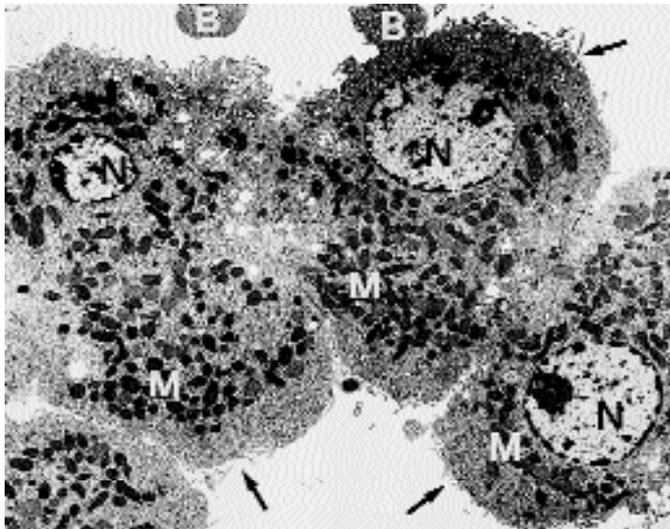


Fig. 2: Microfotografia al microscopio a trasmissione di epatociti di maiale subito dopo l'isolamento con metodica collagenasica. Sono indicati il nucleo (N) con evidenti nucleoli e numerosi mitocondri (M) nel citoplasma. Su tutta la superficie cellulare esterna sono presenti corti microvilli (freccie). Sono inoltre presenti alcune bolle sulla membrana citoplasmatica esterna (B), caratteristicamente prive di microvilli. Fra le cellule adiacenti sono presenti complessi giunzionali di membrana. Ingrandimento originale approssimativo 2100 X.

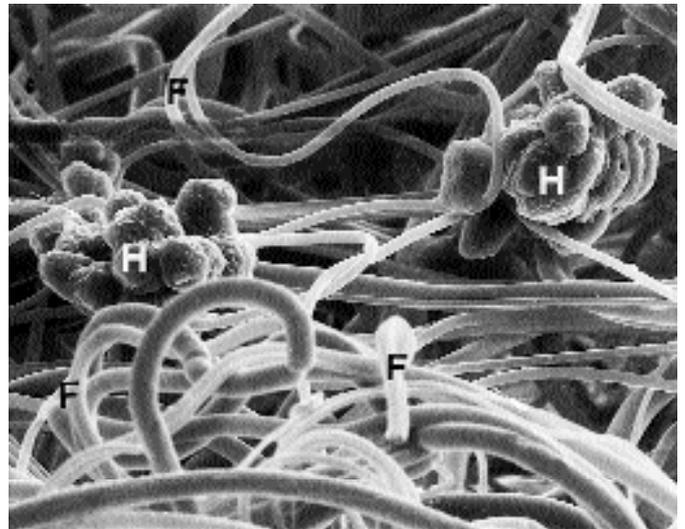


Fig. 4: Microfotografia al microscopio elettronico a scansione di epatociti isolati di ratto coltivati per 42 ore all'interno di un sistema tridimensionale di supporto costituito da un tessuto non-tessuto di poliestere idrofilico. Sono evidenti due piccoli aggregati di epatociti (H) adesi alle fibre di poliestere (F). Ingrandimento originale approssimativo 758 X.

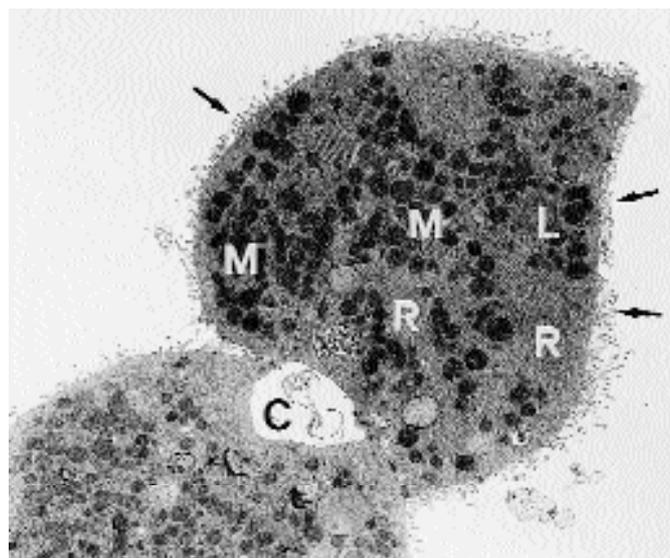


Fig. 3: Microfotografia al microscopio elettronico a trasmissione di epatociti di ratto dopo 42 ore di coltura all'interno di un sistema tridimensionale di supporto in tessuto di poliestere. È evidente la presenza di uno spazio canalicolare (C) fra le due cellule adiacenti. Sono presenti numerosi mitocondri (M), il reticolo endoplasmico rugoso (R) e goccioline lipidiche (L) sparse nel citoplasma. Alla periferia delle cellule sono osservabili corti microvilli (freccie). Ingrandimento originale approssimativo 3.500 X.

bolicamente attivi per parecchie ore, per cui essi sono in grado di svolgere molte funzioni metaboliche e possono conservare la sensibilità agli ormoni. Una valutazione diretta dei processi di detossificazione epatica in animali da laboratorio viene ostacolata dal legame della sostan-

za/farmaco in esame a componenti ematici e tissutali, dal suo assorbimento e dalla sua eliminazione. Per questi motivi, gli epatociti isolati incubati per brevi periodi di tempo o coltivati *in vitro* possono rappresentare un'alternativa agli esperimenti su animali. I primi tentativi di usare epatociti isolati per studiare le vie metaboliche e di detossificazione furono ostacolati in modo particolare dal calo dell'attività del citocromo P450, poco tempo dopo l'isolamento cellulare, come pure dal breve tempo di sopravvivenza delle cellule in coltura. Gli studi sui processi metabolici e di detossificazione condotti su colture monostrate di epatociti adulti erano inoltre fortemente penalizzati dalla condizione statica del sistema di coltura, che comporta un ambiente liquido stagnante in uno stato di semianossia. Recentemente è stata sperimentata la coltura di epatociti di ratto negli spazi extracapillari di bioreattori a fibre cave, perfusi con un mezzo arricchito di O₂. I risultati ottenuti attestano che questa configurazione rappresenta un'alternativa all'uso di piccoli animali di laboratorio, in particolare per gli stimoli a lungo termine dell'attività del citocromo P450 (67).

Nuove prospettive cliniche circa l'impiego di epatociti isolati, allogenici o xenogenici, sono state recentemente proposte, in primo luogo per il trapianto di epatociti e come base biologica di sistemi di supporto per rimpiazzare una funzionalità epatica compromessa. Per quanto riguarda il trapianto di epatociti, le cellule epatiche isolate sono state utilizzate nelle più svariate configurazioni: in sospensione, attaccate ad un substrato, incapsulate singolarmente o in piccoli ammassi cellulari. Per il

trattamento dell'insufficienza epatica acuta indotta sperimentalmente, epatociti isolati xenogenici sono stati trapiantati nella cavità peritoneale, nella milza, o direttamente iniettati nel fegato attraverso la vena porta. È stato accertato che gli epatociti trapiantati si mantengono attivi e vitali per tutto il tempo di sopravvivenza dei piccoli animali di laboratorio riceventi. Mediante il trapianto sperimentale di epatociti in animali da laboratorio sono stati inoltre trattati con successo numerosi disordini metabolici epatici ereditari indotti da mutazioni spontanee. Demetriou e Coll. hanno dimostrato che il trapianto di appena l'1-2% della massa epatica nel ratto iperbilirubinemico di Gunn e nel ratto analbuminemico di Nagase comportava una temporanea correzione del difetto genetico (10, 11, 39). Resta da accertare se una tale percentuale di cellule, trapiantate nell'uomo, sia altrettanto efficace.

Il prolungamento dei tempi di sopravvivenza di ratti anepatici, in cui cioè veniva rimosso tutto il parenchima epatico, ottenuto di recente tramite il trapianto extraepatico di epatociti effettuato presso il Cedar-Sinai Medical Center di Los Angeles (68), depone a favore dell'uso potenziale del trapianto di epatociti per fornire un supporto metabolico nell'insufficienza epatica acuta, mentre il paziente è in attesa di un trapianto ortotopico di fegato. Analogamente, il trapianto di cellule epatiche potrebbe migliorare il metabolismo epatico in pazienti affetti da forme croniche di insufficienza epatica, come la cirrosi. Tuttavia, la crescente riduzione della disponibilità di fegati per il trapianto rende imperativa la ricerca di metodi per moltiplicare gli epatociti umani in coltura, principalmente attraverso tecniche di ingegneria genetica. Una possibile soluzione per il futuro potrebbe essere l'immortalizzazione degli epatociti per produrre cellule che siano sicure per il trapianto e nel contempo sfuggano al rigetto immunologico.

Gli epatociti isolati trovano impiego nella realizzazione di sistemi extra-corporei di supporto epatico per il trattamento di pazienti colpiti da insufficienza epatica fulminante. Il fondamento logico su cui si basano questi sistemi è quello di assicurare ai pazienti in gravi condizioni le funzioni epatiche essenziali per consentire al fegato ammalato di recuperare e di rigenerarsi. Un fegato bio-artificiale può, inoltre, fungere da ponte fino all'allograpianto di fegato, fornendo un supporto epatico sufficiente fino a quando si presenta la disponibilità di un organo. Si ritiene che per supportare un fegato adulto colpito da insufficienza acuta, sia necessario rimpiazzare circa il 10-15% della massa di epatociti, il che significa con buona approssimazione 10-15 miliardi di cellule, cioè circa 100-150 g di epatociti isolati (33). Nell'approccio iniziale alla progettazione ed alla realizzazione di apparecchiature da utilizzare quali fegati bio-artificiali, è stata presto evidenziata la necessità di tener conto di alcuni requisiti importanti, prima di tutto il mantenimento di una sufficiente tensione di O_2 per tutta la lunghezza del bioreattore, quindi la perfusione delle cellule con pla-

ma oppure con mezzo di coltura, ed infine l'isolamento immunologico degli epatociti xenogenici coltivati e le dimensioni del bioreattore (14). I risultati di esperienze cliniche preliminari sono promettenti (13). Tre gruppi di pazienti, affetti da forme gravi di insufficienza epatica acuta, sono stati sottoposti al trattamento con un fegato bio-artificiale presso il Cedar-Sinai Medical Center di Los Angeles. Nel primo gruppo i pazienti erano stati colpiti da insufficienza epatica fulminante; i pazienti del secondo gruppo, sottoposti precedentemente ad un trapianto di fegato, presentavano una carenza primaria di funzionalità dell'organo trapiantato; nel terzo gruppo i pazienti presentavano un forte aggravamento di una malattia epatica cronica. I pazienti dei primi due gruppi, ma non quelli del terzo, nel momento in cui erano entrati nello studio descritto, erano candidati per il trapianto. Nel primo gruppo, 16 pazienti vennero poi portati con successo fino al trapianto di fegato, un paziente si ristabilì senza necessità di trapianto, un altro morì a causa di una concomitante pancreatite acuta. Tutti i pazienti del secondo gruppo furono sottoposti ad un nuovo trapianto di fegato con pieno successo e sopravvissero. Due pazienti del terzo gruppo vennero supportati fino alla guarigione, mentre gli altri decedettero in un secondo tempo a seguito dell'esclusione dalla lista per il trapianto di fegato.

Attualmente è in atto in Europa e negli Stati Uniti una sperimentazione per accertare l'efficacia di vari dispositivi extra-corporei nel fornire un adeguato supporto metabolico in caso di insufficienza epatica acuta. Il nostro gruppo di ricerca ha testato, in una serie di esperimenti preliminari la vitalità e la funzionalità di epatociti porcini isolati caricati in un modello sperimentale di bioreattore a flusso radiale (34). Gli epatociti sono stati seminati su più strati di un tessuto non tessuto di poliestere idrofilico e biocompatibile al 100%, racchiusi all'interno del bioreattore fra due membrane di polietersulfone, con pori aventi un cut-off nominale pari a 0,45 μm . Le cellule epatiche sono state perfuse a bassa velocità di flusso (4 ml/min) con DMEM privo di siero, mantenuto a 37°C ed ossigenato per due settimane. Le cellule si sono mantenute vitali fino alla fine dell'esperimento, come dimostrato dal test dell'esclusione del trypan blue eseguito su un campione di epatociti prelevato dal bioreattore. Proprio la configurazione radiale del flusso, che assicura, senza la necessità di una elevata velocità di perfusione, un buon contatto fra le cellule e il mezzo circolante, con un giusto apporto di ossigeno e di sostanze nutritive, garantendone così la vitalità e la funzionalità per più giorni, sembra perciò fornire al nostro dispositivo le caratteristiche necessarie per un adeguato supporto metabolico epatico.

Infine, parallelamente all'aumentare delle conoscenze riguardo all'importanza della interazione degli epatociti con la matrice epatica e le cellule non parenchimali, sono in corso tentativi per la realizzazione di strutture intracorporee, simili al fegato, che possano garantire una effi-

ciente funzionalità a lungo termine. Per il trattamento di specifiche alterazioni della funzionalità epatica, dovute a difetti genetici, potrebbero essere impiegati epatociti modificati geneticamente. Questa è una delle ragioni per cui l'interesse intorno al trapianto di epatociti è aumentato così rapidamente negli ultimi anni. Molti geni vengono espressi con carattere preferenziale nelle cellule epatiche. Perciò, per applicare la terapia genica ad alterazioni metaboliche ereditarie, dovute a difetti in tali geni, è necessario inserire nelle cellule epatiche coppie normali di questi geni. La trasduzione di epatociti con vettori retrovirali ha avuto un parziale successo, mentre la trasduzione di epatociti con adenovirus e con vettori ad essi associati, quantunque notevolmente efficace, ha avuto una durata limitata (11). I due vettori più comunemente usati nella terapia genica non si sono rivelati ottimali per il trattamento clinico delle malattie genetiche del fegato. Tuttavia, i recenti avanzamenti nel trapianto di epatociti serbano ancora la promessa di un rapido progresso verso la soluzione di questi problemi oggi irrisolti. In effetti, il trapianto di epatociti, rimpiazzando le cellule danneggiate e fornendo un supporto ausiliario ad un fegato colpito da insufficienza acuta, potrebbe essere più efficace della stessa terapia genica.

Bibliografia

- 1) Howard R.B., Pesch L.A.: *Preparation and partial characterization of intact isolated parenchymal cells from rat liver*. Biol Chem, 243:3105-14, 1968.
- 2) Berry M.N., Friend D.S.: *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells*. J Cell Biol, 43:506-20, 1969.
- 3) Seglen P.O.: *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods Cell Biol, 13:29-34, 1976.
- 4) Groth C.G., Arborgh B., Bjorken C., Sundberg B., Lundgren G.: *Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase deficient rats by intraportal hepatocyte transplantation*. Transplant Proc, 9:313-9, 1977.
- 5) Matas A.J., Sutherland D.E.R., Steffes M.W., Mauer S.M., Lowe A., Simmons R.L., Najarian J.S.: *Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats*. Science, 192: 892-4, 1976.
- 6) Makowka L., Falk R.E., Rotstein L.E., Falk J.A., Nossal N., Langer B., Blendis L.M., Phillips M.J.: *Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure*. Science, 210:901-3, 1980.
- 7) Sutherland D.E.R., Numata M., Matas A.J., Simmons R.L., Najarian J.S.: *Hepatocellular transplantation in acute liver failure*. Surgery, 82:124-32, 1977.
- 8) Demetriou A.A., Whiting J.F., Feldman D., Levenson S.M., Roy Chowdhury N.R., Moscioni A.D., Kram M., Roy Chowdhury J.R.: *Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes*. Science, 233:1190-2, 1986.
- 9) Demetriou A.A., Whiting J., Levenson S.M., Roy Chowdhury N.R., Schechner R., Michalski S., Feldman D., Roy Chowdhury J.R.: *New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support*. Ann Surg, 204:259-71, 1986.
- 10) Demetriou A.A., Reisner A., Sanchez J., Levenson S.M., Moscioni A.D., Roy Chowdhury J.R.: *Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats*. Hepatology, 8:1006-9, 1988.
- 11) Demetriou A.A. *Hepatocyte transplantation*. Sci Am Sci Med, 6:58-67, 1994.
- 12) Rozga J., Williams F., Ro M.S., Neuzil D.F., Giorgio T.D., Backfish G., Moscioni A.D., Hakim R., Demetriou A.A.: *Development of bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells*. Hepatology, 17:258-65, 1993.
- 13) Watanabe F.D., Mullon 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, 225:484-94, 1997.
- 14) Yarmush M.L. Dunn J.C.Y., Tompkins R.G.: *Assessment of artificial liver support technology*. Cell Transplant, 1:323-41, 1992.
- 15) Blouin A., Bolender R.P., Weibel E.R.: *Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non hepatocytes in the rat liver parenchyma*. J Cell Biol, 72:441-55, 1977.
- 16) Berry M.N., Edwards A.M., Barrit G.J.: *Isolated hepatocytes. Preparation, properties and applications*. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- 17) Epstein C.J.: *Cell size, nuclear content and the development of polyploidy in the mammalian liver*. Proc Natl Acad Sci USA, 57:327-34, 1967.
- 18) Schneider W.C., Potter V.R.: *Hepatocyte preparation by mechanical disruption*. J Biol Chem, 149:217-23, 1943.
- 19) Fry J.: *Preparation of mammalian hepatocytes*. Methods Enzymol, 77:130-9, 1981.
- 20) Morsiani E., Fogli L., Gorini P., Ricci D., Mazzoni M.: *Preparation and allotransplantation of isolated hepatocytes in partially hepatectomized rats*. Ital J Surg Sci, 15:23-9, 1985.
- 21) Kaltenback J.P.: *Mechanical preparation of isolated hepatocytes*. Exp Cell Res, 7:68-74, 1954.
- 22) Wang S.R., Renaud G., Infante J., Catala D., Infante R.: *Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic function in primary culture*. Vitro Cell Dev Biol, 21:526-30, 1985.
- 23) Seglen P.O.: *Properties of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated perfused liver*. Exp Cell Res, 74:450-4, 1972.
- 24) Puviani A.C., Ottolenghi C., Tassinari B., Pazzi P., Morsiani E.: *An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells*. Comp Biochem Physiol, 121:99-109, 1998.
- 25) Pazzi P., Puviani A.C., Dalla Libera M., Guerra G., Ricci D., Gullini S., Ottolenghi C.: *Bile salt-induced cytotoxicity and ursodeoxycholate cytoprotection: in vitro study in perfused rat hepatocytes*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 9:703-9, 1997.
- 26) Kreamer B., Staecker J.L., Sawada N., Sattler G.L., Hsia M.T.S., Pitot H.C.: *Use of low-speed, iso-density percoll centrifugation method*

- to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparation. *Vitro Cell Dev Biol*, 22:201-11, 1986.
- 27) Renton K.W., Deloria L.B., Mannering G.J.: *Effects of polyriboinosinic acid- polyribocytidylic acid and a mouse interferon preparation on cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems in cultures of primary mouse hepatocytes*. *Mol Pharmacol*, 14:672-81, 1978.
- 28) Tonda K., Hasegawa T., Hirata M.: *Effects of phenobarbital and 3-methylcholantrene pretreatments on mono-oxygenase activities and proportions of isolated rat hepatocyte subpopulations*. *Mol Pharmacol*, 23:235-43, 1983.
- 29) Leffert H., Koch K., Moral T., Rubalcava B.: *Hormonal control of rat liver regeneration*. *Gastroenterology*, 76:1470-82, 1979.
- 30) Sachs D.A.: *The pig as a potential xenograft donor*. *Vet Immunol Immunopathol*, 43:185-91, 1994.
- 31) Morsiani E., Pazzi P., Moscioni A.D., Rozga J., Demetriou A.A.: *Morphological and functional characterization of isolated porcine hepatocytes for bioartificial liver support: bile acid uptake and conjugation*. *J Surg Res*, 79:54-60, 1998.
- 32) Rozga J., Podesta L., LePage E., Morsiani E., Moscioni A.D., Hoffman A., Sher L., Villamil F., Woolf G., McGrath 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*, 219:38-46, 1994.
- 33) Rozga J., Morsiani E., LePage A.D., Moscioni A.D., Giorgio T., Demetriou A.A.: *Isolated hepatocytes in a bioartificial liver: a single group view and experience*. *Biotechnol Bioeng*, 43:645-53, 1994.
- 34) 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.
- 35) Walpole H.E., Lee W.M., Walle T., Walle U.K., Wilson M.J., Kennedy J.W.: *Rabbit hepatocytes in primary culture: preparation, viability and use in studies of propranolol metabolism*. *Hepatology*, 11:394-401, 1990.
- 36) Rivas P., Fabrega A.J., Schwartz D., Pollak R.: *The morphology and function of rabbit hepatocytes isolated using ethylene-diamine-tracetate*. *Transplantation* 55:335-40, 1993.
- 37) Wiedeker J.C., Kondos G.T., Pollak R.: *Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. A study in the Watanabe rabbit*. *Transplantation*, 50:466-76, 1990.
- 38) Fabre G., Rahmani R., Placidi M., Comalbert J., Covo J., Cano J.P., Coulange C., Ducros M., Rampal M.: *Characterization of Midazolam metabolism using human hepatic fractions and hepatocytes in suspension obtained by perfusing whole human livers*. *Biochem Pharmacol*, 37:4389-97, 1988.
- 39) Demetriou A.A., Felcher A., Moscioni A.D.: *Hepatocyte transplantation. A potential treatment for liver disease*. *Dig Dis Sci*, 36:1320-6, 1991.
- 40) Bojar H., Basler M., Fuchs F., Dreyfurst R., Staib W., Broelsch C.H.: *Preparation of the parenchymal and nonparenchymal cells from adult human liver: morphological and biochemical characteristics*. *J Clin Biochem*, 14:527-33, 1976.
- 41) Dou M., De Sousa G., Lacarelle B., Placidi M., Lechene De la Porte P., Domingo M., Lafont H., Rahmani R.: *Thawed human hepatocytes in primary culture*. *Cryobiology*, 29:454-69, 1992.
- 42) Mito M., Kusano M.: *Hepatocyte transplantation in man*. *Cell Transplant*, 2:65-74, 1993.
- 43) Moscioni A.D., Nanney L.B., Brown L.L., Barbour R., Demetriou A.A.: *Transplantation of cryopreserved microcarrier-attached human hepatocytes into Gunn rats*. *Surg Forum*, 38:385-6, 1987.
- 44) Moscioni A.D., Chowdhury J.R., Barbour R., Brown L.L., Chowdhury N.R., Competiello L.S., Lahiri P., Demetriou A.A.: *Human liver cell transplantation. Prolonged function in athymic-gunn and athymic-analbuminemic hybrid rats*. *Gastroenterology*, 96:1546-51, 1989.
- 45) Phillips H.J. *Dye exclusion tests for cell viability*. In: Kruse P.F., Patterson M.K., eds. *Tissue Culture Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1973: 406-408.
- 46) Baur H., Kaspersek S., Pfaff E.: *Criteria of viability of isolated liver cells*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 356:827-38, 1975.
- 47) Schiller C.D., Kainz A., Mynett K., Gesher A.: *Assessment of viability of hepatocytes in suspension using the MTT assay*. *Toxicol In Vitro*, 6:575-8, 1992.
- 48) Oka M., Maeda S., Koga N., Kato K., Saito T.: *A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Biosci Biotech Biochem*, 56:472-3, 1992.
- 49) Morsiani E., Rozga J., Scott M.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*. *Transplant Proc*, 26:4105-6, 1994.
- 50) Morsiani E., Rozga J., Scott M.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*, 41:155-61, 1995.
- 51) Otto D.A., Cook G.A., Reiss P.D. In: Harris R.A., Cornell N.W., eds.: *Isolation, characterization and use of hepatocytes*. New York: Elsevier, 1983:41-48.
- 52) Berry M.N., Halls H.J., Grivell M.B.: *Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions*. *Life Sci*, 51:1-16, 1992.
- 53) Lautenschlager I., Taskinen E., Inkinen R.: *Distribution of the major histocompatibility complex antigens on different cellular components of human liver*. *Cell Immunol*, 85:191-6, 1984.
- 54) Pertoft H., Rubin K., Kjellen L., Laurent T.C., Klingerborn B.: *The viability of cells grown or centrifuged in a density gradient medium, Percoll (TM)*. *Exp Cell Res*, 110:449-58, 1977.
- 55) Talamini M.A., Kappus B., Hubbard A.: *Repolarization of hepatocytes in culture*. *Hepatology*, 25:167-72, 1997.
- 56) 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 Organs*, 22:778-85, 1999.
- 57) Mine T., Kojima I., Ogata E.: *Difference in sensitivity to glucagon action in three different rat liver systems*. *Metab Clin Exp*, 39:321-6, 1990.
- 58) Blitzer B.L., Ratoosh S.L., Donovan C.B., Boyer J.L.: *Effects of*

- inhibitors of Na⁺-coupled ion transport on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol*, 243:G48-53, 1982.
- 59) Boyer J.L., Phillips J.M., Graf J.: *Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets*. *Methods Enzymol*, 192:501-16, 1990.
- 60) Graf J., Gautam A., Boyer J.L.: *Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6516-20, 1984.
- 61) Oshio C., Phillips M.J.: *Contractility of bile canaliculi: implications for liver function*. *Science*, 212:1041-2, 1992.
- 62) Rappaport A.M.: *The structural and functional unit of the human liver (liver acinus)*. *Anat Rec*, 130:637-86, 1958.
- 63) Rappaport A.M.: *The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure*. *Beitr Pathol*, 157:215-43, 1976.
- 64) Quistorff B., Grunnet N., Cornell N.W.: *Digitonin perfusion of rat liver. A new approach in the study of intra-acinar and intracellular compartmentation in the liver*. *Biochem J*, 226:289-97, 1985.
- 65) Lindros K.O., Pentilla K.E.: *Digitonin collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes*. *Biochemistry*, 228:757-76, 1985.
- 66) Jungermann K., Katz N.: *Functional specialization of different hepatocyte populations*. *Physiol Rev*, 69:708-64, 1989.
- 67) Jaregui 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:23-9, 1994.
- 68) Arkadopoulos N., Lilja H., Suh K.S., Detry O., Mullon C., Demetriou A.A., Rozga J.: *Transplantation of isolated hepatocytes prolongs survival and improves blood chemistry in anhepatic rats*. *Hepatology*, 26:252A, 1997.

Autore corrispondente:

Dr. Anna Cristina PUVIANI
Dipartimento di Biologia, Sezione di Fisiologia Generale
Università di Ferrara,
Via L. Borsari, 46
44100 FERRARA