

Indice prognostico del danno epato-cellulare acuto in rapporto alla rigenerazione epatica



Ann. Ital. Chir., 2007; 78: 169-176

Cataldo Doria****, Giorgio Nicotra**, Grazia Maria D'Antona***, Salvatore Travali**, Angelo Messina**, Ignazio Marino****, Giuseppe Gruttadauria*

* Dipartimento di Chirurgia Sezione di Chirurgia Generale e Fisiopatologia Chirurgica, Università di Catania.

** Dipartimento di Scienze Biomediche Sezioni di Patologia Generale e Patologia Molecolare, Università di Catania.

*** Servizio Centralizzato di Stabulazione, Università di Catania.

**** Jefferson Medical College Div. Trapianti Organi Addominali Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, USA.

Prognostic index of acute hepato-cellular damage

INTRODUCTION: *Fulminant hepatic failure is the end result of many different acute damage to the liver. In the present study we compared the clinical to the experimental experience and we postulated the usage of Vascular Endothelial Growth Factor in the clinical arena as a potential treatment in alternative to liver transplantation.*

MATERIALS AND METHODS: *Twelve patient diagnosed with fulminant hepatic failure have been enclosed in the present study. Each patient underwent trans-jugular liver biopsy in order to assess the degree of liver necrosis as well as the following biochemical investigation: AST, ALT, Total Bilirubin, γ -gt, alkaline phosphatase, prothrombin time.*

RESULTS: *Twenty-five percent of those patients required support in the Intensive Care Unit without need for transplantation. Forty-one percent of those patients underwent liver transplantation, and 36% of them died before the liver become available. These results were compared with an experiment, previously performed by our group, where 260 rats were poisoned with CCl₄ and subsequently treated with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).*

CONCLUSION: *The rate of the hepatic regeneration has been found to be critical in the prognosis of patients diagnosed with fulminant hepatic failure.*

Key words: Endothelium, Fulminant hepatitis, Growth factors, Liver transplant, Regenerative activity.

Introduzione

Nell'ambito del complesso e vasto quadro evolutivo dell'insufficienza epatica a diversa base eziologica e genetica, si possono evidenziare lesioni degenerative acute o addirittura fulminanti che possono essere irreversibili. Per definizione l'epatite fulminante è una condizione caratterizzata da coagulopatia rappresentata da un valore di INR ≥ 1.5 e da alterazioni del livello di coscienza (encefalopatia epatica) in pazienti senza cirrosi preesistente e con durata della malattia inferiore a 26 settimane¹. In molti di questi casi il trapianto di fegato è la principale indicazione per superare la grave crisi di insufficienza epatica. Pertanto, la selezione dei pazienti da avviare a tale tipo di trattamento, deve essere estremamente rigida.

Le cause principali di insufficienza epatica acuta sono rappresentate dall'overdose di farmaci, epatiti virali, epatiti autoimmuni e lo shock emodinamico con ipoperfusione epatica. In circa il 20% dei casi non è possibile stabilire l'eziologia dell'insufficienza epatica acuta².

La valutazione clinica e biochimica di un soggetto con sospetta epatite fulminante tende a definire l'eziologia e la gravità della stessa. A parte la determinazione dei valori della coagulazione del sangue è necessario procedere con uno screening biochimico di base che valuti anche la presenza di un'eventuale ipoglicemia che, se riscontrata, va corretta adeguatamente. Inoltre, l'emo-gas-analisi arteriosa, l'esame emocromocitometrico, la determinazione del gruppo sanguigno, il calcolo dei livelli ematici di acetaminofene e di altre tossine, lo screening per l'epatite virale (soprattutto la A e la B), il test per la malattia di Wilson, la ricerca degli autoanticorpi (anticorpi anti-nucleo, anticorpi anti-muscolo liscio), il test di gravidanza, l'ammonemia arteriosa e la biopsia transjugulare sono tra i primissimi esami/procedure necessari per un'iniziale valutazione di un sospetto di epatite fulminante.

Pervenuto in Redazione Settembre 2006. Accettato per la pubblicazione Ottobre 2006.

Per la corrispondenza: Prof. Giuseppe Gruttadauria, Via Passo Gravina 185, 95125 Catania (CT) (e-mail: dichige@unict.it).

Il trapianto del fegato rimane la sola terapia definitiva per quei pazienti in cui la rigenerazione epatica non sia sufficiente a creare una massa epatocitaria adeguata a sostenere tutte le funzioni vitali. Infatti il trapianto del fegato ha consentito di aumentare la sopravvivenza dei pazienti diagnosticati con epatite fulminante dal 15% a più del 60% ². Inoltre, i progressi raggiunti in tema di trattamento dei pazienti in terapia intensiva ed una tendenza verso forme più "benigne" di epatite fulminante, come ad esempio quella da overdose di acetaminofene, sono fattori che hanno contribuito al miglioramento dei risultati in termini di sopravvivenza. A conferma di ciò, ad esempio, la sopravvivenza spontanea dopo epatite fulminante, al momento attuale, è del 40% ² paragonata al 15% dell'era pre-trapianto.

A parte la terapia medica di supporto ed il trapianto del fegato, è importante ricordare l'uso di "presidi ponte" quali il fegato artificiale, al fine di consentire al paziente di sopravvivere per il tempo necessario alla rigenerazione epatica oppure sino all'arrivo di un fegato adeguato al trapianto. Si tratta di sistemi di depurazione del sangue basati sull'uso di filtri extracorporei analoghi a quelli della dialisi. Esistono diversi sistemi di fegato artificiale, che genericamente possono essere divisi in artificiali e bioartificiali, dove questi ultimi utilizzano epatociti umani od animali al fine di depurare il sangue dai prodotti tossici del metabolismo ³⁻⁸.

In base alla nostra esperienza, riteniamo che un mezzo per valutare se è necessario procedere con il trapianto del fegato, deve fondarsi su dati funzionali e morfologici.

Studio clinico

Il problema di maggior impegno per lo studio del danno epatocitario in rapporto con l'inizio della rigenerazione epatica sembra essere il momento determinante per le deduzioni prognostiche e terapeutiche. Differenziare morfologicamente lesioni necrotico-degenerative e il loro successivo andamento in base alle terapie è indicativo del decorso evolutivo.

Nello stesso tempo va sottolineato che esiste un noto rapporto di parallelismo fra i dati morfologici e l'andamento degli esami di laboratorio: Aspartato Amino Trasferasi (AST), Aspartato Alanina Trasferasi (ALT), Fosfatasi Alcalina (FA), GammaGlutamyl Transpeptidasi (γGT), Tempo di Prototrombina (PT), bilirubinemia.

La selezione dei pazienti da trapiantare e il relativo timing rappresentano i punti fondamentali per determinare le scelte definitive.

I soli dati di laboratorio, quasi sempre, sono insufficienti e incompleti per permettere una adeguata decisione. Infatti la decisione di inserire un individuo in lista di attesa per il trapianto del fegato si basa sull'analisi di molti fattori predittivi della gravità dell'episodio di epatite fulminante. Questi includono l'età, l'eziologia, il tempo intercorso tra l'insorgenza dell'ittero e quella dell'ence-

falopatia, il tempo di prototrombina, la bilirubinemia ⁹, ed il livello plasmatico del fattore V che se inferiore al 20% del valore normale costituisce un fattore prognostico negativo ¹⁰. Nello studio originale sull'uso del trapianto di fegato come rimedio terapeutico in corso di epatite fulminante, l'uso di questi criteri ha consentito di identificare il 95% dei casi ad evoluzione fatale. Tuttavia in uno studio successivo l'accuratezza di questi criteri è risultata essere pari all'80% ¹¹; nonostante ciò gli stessi continuano a mantenere la loro validità.

Studio sperimentale

LA RIGENERAZIONE EPATICA IN RAPPORTO CON IL VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Attualmente, però, i criteri proposti dal King's College ed i criteri Clisby non sembrano spesso sufficienti per una obbiettiva e certa valutazione della evoluzione del quadro clinico dello stato di insufficienza epatica fulminante. Tutto ciò viene confermato dalle recenti ricerche sperimentali da noi condotte in tema di rigenerazione epatica sui ratti ¹² dove il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), un importante fattore mitogeno endoteliale, nonché stimolatore della crescita delle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici, si è dimostrato in grado di proteggere il fegato dall'insorgenza di epatite fulminante quando i ratti venivano inoculati con tetracloruro di carbonio (CCl₄).

Gli epatociti sono cellule quiescenti, altamente differenziate ed a lunga sopravvivenza ¹³. Infatti in un fegato normale si osserva approssimativamente 1 mitosi ogni 20000 epatociti. Tuttavia, il fegato ha una grande capacità di rigenerazione a seguito di danni quali quelli secondari ad agenti tossici, virali od a seguito di resezione epatica. In realtà il fegato piuttosto che una vera rigenerazione va incontro a processi di ipertrofia ed iperplasia cellulare al fine di riprodurre una massa epatica sufficiente a sostenere le funzioni vitali in base alla massa corporea di ciascun individuo. La massa epatica viene ricostituita a seguito di un insulto a mezzo di tre principali meccanismi di seguito elencati:

1. Proliferazione delle rimanenti cellule differenziate.
2. Proliferazione e differenziazione di cellule staminali.
3. Iperptrofia degli epatociti periportal.

In situazioni in cui la proliferazione epatocitaria è insufficiente a ricostruire la massa epatica necessaria a sostenere le funzioni vitali, nuovi epatociti si differenziano a partire dalle cellule staminali ¹⁴. Se anche questo secondo meccanismo è insufficiente la massa epatica originale viene ricostruita a mezzo di un processo di ipertrofia degli epatociti periportal ¹⁵. Sebbene tutte le cellule epatiche mature (epatociti, cellule epiteliali biliari, cellule

endoteliali dei sinusoidi epatici, cellule di Kupffer, cellule epatiche stellate) rigenerano a seguito della perdita di massa epatica, gli epatociti sono i primi ad iniziare il processo rigenerativo. Pochissimi minuti dopo la resezione del 70% del fegato gli epatociti iniziano il processo rigenerativo accompagnato dall'espressione di un gran numero di geni che controllano fattori di crescita cellulare. La sintesi del DNA negli epatociti di un fegato resecato inizia a partire da 12-16 ore dopo il completamento dell'intervento chirurgico e raggiunge il picco dell'attività a 24-48 ore di distanza^{16,17}. La proliferazione degli epatociti ha inizio nell'area peri-portale e procede verso la zona peri-centrale del lobulo epatico. L'inizio della proliferazione delle cellule epatiche non-epatiche avviene con circa 24 ore di ritardo ma segue un andamento simile per quanto concerne la sintesi del DNA e l'attività mitotica.

Nei topi, in 7-10 giorni da una resezione epatica maggiore, la massa epatocitaria è completamente ricostruita ed il processo di rigenerazione epatica è completato^{18,19}. La ricerca degli ultimi dieci anni ha dimostrato che la rigenerazione epatica non è il risultato della risposta ad un unico fattore di crescita è bensì l'evoluzione di un delicato meccanismo di coordinazione di numerosi eventi cellulari. Infatti, numerosi fattori di crescita sono stati individuati come responsabili della rigenerazione epatica. Tra quelli con maggiore efficacia di stimolo sulla sintesi del DNA ricordiamo l'Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- α (TGF α) e l'Epatocyte Growth Factor (HGF) mentre è stato dimostrato che il Trasforming Growth Factor- β (TGF β 1) e l'Activin sono potenziali inibitori della proliferazione cellulare²⁰. Inoltre, svariate citokine sono coinvolte nel processo rigenerativo. L'Interleuchina-6 (Il-6), l'Interleuchina-1 (Il-1) ed il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) sono considerati fattori cruciali per l'invio del segnale proliferativo nella fase iniziale della rigenerazione epatica. Al esempio il TNF- α stimola la secrezione di Il-6 da parte delle cellule di Kupffer a seguito di una resezione epatica. Queste citokine, a loro volta, inducono per lo meno due fattori di trascrizione, di seguito elencati:

1. Post hepatectomy factor/nuclear factor KappaB' (PHF/NF-KB)
2. Signal trasducer and activator of transcription-3' (STAT 3)

Inoltre è stato dimostrato che nei topi privi dei recettori per l'Il-6 ed il TNF- α il processo di rigenerazione epatica è compromesso e l'attivazione dello STAT 3 non avviene^{21,22}. La normale architettura del fegato viene persa durante i processi rigenerativi a causa di una replicazione cellulare sbilanciata tra gli epatociti e la matrice extracellulare di cui, gli stessi, sono circondati (ECM). Inizialmente gli epatociti neoformati si associano in cluster in assenza di sinusoidi epatici, successivamente, entro quattro giorni da una resezione epatica le cellule stellate penetrano all'interno delle isole di epatociti neoformati. Quindi le cellule endoteliali fenestrate provvedo-

no alla separazione degli epatociti in lamine rigettando la normale architettura vascolare epatica²³. La proliferazione delle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici in corso di rigenerazione epatica è indotta dal Vascular Endothelial growth factor (VEGF). L'angiogenesi è una fase fondamentale dello sviluppo degli organi e della riparazione delle ferite; inoltre, la stessa gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo delle neoplasie e delle metastasi. Pertanto, i fattori che stimolano la replicazione delle cellule endoteliali sono alla base dei processi di rigenerazione epatica. Il VEGF si è dimostrato un potente fattore di crescita per le cellule endoteliali, Sono numerosi i fattori di crescita vascolari descritti in letteratura. Ad esempio ricordiamo il fattore di crescita della placenta (PlGF), il VEGF-A, il VEGF-B il VEGF-C ed il VEGF-D²⁴. Il Vascular Endothelial Growth Factor esercita la sua azione per mezzo di tre differenti recettori VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1), e VEGFR3 (Flt-4); di questi il VEGFR2 sembra essere il principale mediatore dell'effetto di crescita e di permeabilità del VEGF. Gli effetti del VEGF sono numerosi; il primo descritto in letteratura consiste in un aumento della permeabilità vascolare²⁵, questa a sua volta facilita il passaggio al di fuori dei vasi di proteine plasmatiche con la conseguente formazione di un gel di fibrina extravascolare che costituisce un pabulum adeguato per la proliferazione di cellule endoteliali dei vasi arteriosi, venosi e linfatici, stimola il processo di fenestrazione delle cellule endoteliali ed induce vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico e promuove la chemiotassi monocitaria²⁵. Infine, il VEGF esercita un'azione di inibizione sulla maturazione delle cellule dendritiche; pertanto, la sua azione di induzione della crescita tumorale potrebbe essere secondaria ad una attenuazione della risposta immunitaria²⁶. È stato dimostrato che nella maggior parte dei tumori l'mRNA del VEGF è presente in quantitativi superiori alla norma e che la sua produzione aumenta in special modo nella massa neoplastica e nel suo stroma^{26,27}. È solo di recente, però, che l'attività del VEGF è stata rilevata anche in corso di necrosi e di rigenerazione epatica. Infatti, la necrosi epatocitaria è seguita da un aumento dell'mRNA per il VEGF negli epatociti, cellule di Kupffer, nelle cellule epatiche stellate e nelle cellule infiammatorie localizzate nelle aree perinecrotiche^{28,29}. Shimizu e collaboratori³⁰ hanno dimostrato che a seguito di una resezione epatica l'espressione del VEGF e l'mRNA per lo stesso, aumentano nel fegato residuo. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che gli effetti appena descritti iniziano a partire da 72 ore dopo la resezione del fegato. Inoltre, utilizzando tecniche di immunoistochimica è stato dimostrato che gli epatociti periportal sono i primi a produrre VEGF e che le cellule sinusoidali sono le prime nell'esprimere i recettori VEGF-1 (Flt-1), VEGF-2 (KDR/Flk-1). Infine, la proliferazione delle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici ha luogo a partire da 24-48 ore dopo l'inizio della proliferazione degli epatociti. Il picco di attività

dell'mRNA per il VEGF si registra, invece, 72 ore dopo la resezione epatica al pari dell'espressione dei recettori VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Numerosi altri fattori, quali ad esempio l'ipossia e le citokine EGF, TGF- α , Il-1 ed Il-6 contribuiscono ad aumentare l'efficacia del VEGF³¹. Anche le cellule stellate epatiche del ratto esprimono i recettori VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) per il VEGF; lo stimolo ipossico induce il VEGF, l'mRNA per il VEGFR-1 (Flt-1) e la secrezione del VEGF da parte delle stesse³¹. Condizioni quali il danno epatico acuto da alcool, la fibrosi epatica e lo sviluppo di neoplasie del fegato determinano uno stato di ipossia cellulare che a sua volta agisce stimolando le cellule stellate epatiche. Di recente è stato studiato il contenuto di VEGF nelle cellule di carcinoma epatocellulare ed è stato dimostrato che nelle lesioni ben differenziate lo stesso è alto al contrario di quelle scarsamente differenziate dove l'espressività del VEGF è molto bassa³². I carcinomi epatocellulari di piccole dimensioni e ben differenziati ricevono il sangue dai vasi portali; con l'aumento delle dimensioni e della differenziazione degli stessi si registra un passaggio all'irrorazione di tipo arterioso. In base a queste evidenze è stato postulato che il VEGF rientra nel processo di angiogenesi delle fasi iniziali della crescita neoplastica.

Le applicazioni cliniche

La conoscenza delle capacità rigenerative del fegato rappresenta ancora un argomento affascinante e al centro di svariate ricerche. Enormi progressi sono stati realizzati in questo campo negli ultimi anni che hanno permesso di sfruttare le capacità rigenerative del fegato da donatore vivente e da donatore cadavere con lo *split liver*. La premessa clinica sulla potenziale definizione di come selezionare i pazienti affetti da Insufficienza Epatica Acuta riguarda la effettiva entità e quindi l'evolubilità del coma epatico. Attualmente questi pazienti sono contenuti in un *range* variabile dal III al IV grado della scala di sorveglianza elaborata per questo tipo di coma. La nostra recente ricerca sperimentale che ha documentato una impressionante similarità tra i processi degenerativi e rigenerativi negli animali da esperimento e nelle osservazioni cliniche di analoga patologia umana, ci hanno convinto della sua applicabilità, in questo particolare ambito di selezione in cui si deve muovere una adeguata attività decisionale. Alcuni autori sostengono che il fattore di crescita degli epatociti è il fattore di crescita mitogeno più potente che stimola la rigenerazione del fegato. Molti altri fattori di crescita, come sopra ricordato, e citokine quali EGF, TGF- α , interleuchina -6 e TNF, sembrerebbero stimolare la mitogenesi. Alcuni fattori comitogeni quali estrogeno, glucagone e insulina, causano la *up-regulation* dei fattori mitogeni e possono accelerare il processo di rigenerazione epatica. La considerazione su questi processi degenerativi del fegato è basata

essenzialmente sul ruolo della regolazione della angiogenesi fisiologica e patologica. E' stato dimostrato che la proliferazione e la rigenerazione delle cellule endoteliali regolata dalla permeabilità vascolare grazie al VEGF attivano nel fegato necrotico sia l'attività macrofagica che l'attività proliferativa delle cellule sinusoidali endoteliali e pertanto agevolano la fase rigenerativa del fegato in seguito a necrosi. Sulla base di queste osservazioni, seguendo lo studio di analoghi problemi clinici ci aspettiamo di dimostrare questi nuovi concetti utilizzabili nel campo dell'insufficienza epatica acuta

Materiali e metodi

Il nostro studio è stato eseguito su dodici pazienti affetti da coma epatico di III e IV grado, osservati presso la Divisione dei trapianti degli organi addominali del Jefferson Medical College - Thomas Jefferson University Hospital di Philadelphia negli U.S.A. I dati di questa osservazione vengono riportati nella Tabella I.

Dall'analisi dei dati clinici si può rilevare come il 25% (3 casi) sia stato sottoposto solamente a trattamento medico e rianimatore con correttivi metabolici in grado di aiutare il recupero della funzionalità epatica, anche se uno dei tre pazienti presentava un coma di natura complessa in parte dovuto a insufficienza epatica ed in parte dovuto a etilismo cronico. Mentre il 18% dei pazienti (2 casi) sono rimasti nell'area clinica dell'osservazione in attesa di reperire un organo adeguato al trapianto. Un ulteriore 18% (2 casi) è andato incontro ad exitus per insufficienza epatica acuta dovuta in un caso ad overdose di farmaci e nell'altro, trattato per emofiltrazione continua, anch'esso ad andamento fulminante, ad eziologia sconosciuta. I restanti 5 casi, 38% sono sopravvissuti a seguito di trapianto di fegato.

In questo gruppo di pazienti osservati in maniera omogenea gli esami istologici, che sono stati effettuati in un arco di tempo tra 24 e 72 ore dall'osservazione iniziale hanno permesso di individuare segni di necrosi plurifocale periportale che presenta una sostanziale dicotomia nei confronti del rapporto necrosi/rigenerazione.

L'indice prognostico nel rapporto necrosi/rigenerazione, riscontrato nella nostra serie nei casi ad evoluzione favorevole è stato riscontrato < 3 (N - necrosi %, R - rigenerazione %, I.P. - indice prognostico), mentre nei casi ad andamento sfavorevole i valori dell'indice prognostico oscillavano tra 90-100.

Sulla base della valutazione dei dati di laboratorio non riteniamo che esista una correlazione stretta con i dati istologici, in quanto le più alte concentrazioni di ALT e AST non sempre coincidono con il realizzarsi dell'evento degenerativo, restando sempre ancorate all'entità del danno necrotico. Così è stato possibile osservare che casi con indice prognostico favorevole avessero presentato valori elevati di AST e ALT (caso n° 6 I.P. 2, AST 2550, ALT 2788), come viceversa nei casi in cui non è stato

TABELLA I

Caso	Diagnosi	Segni istologici	Esami di lab.	Evoluzione	Trattamento
Caso 1	Epatite fulminante farmacologica	Necrosi epat. alla biopsia t-j 80%, necrosi t.e 100%	AST 2500, ALT 3000 BIL.TOT.5.6 γ GT280, Ph.Al 144	Rigenerazione assente	Trap. Ortopico di fegato
Caso 2	Epatite Acuta su cronica	Necrosi epat.100%	AST 280, ALT 426 BIL.TOT.8 γ GT176, Ph.Al 159	Rigenerazione assente	Emofiltrazione continua (Deceduto)
Caso 3	Epatite Acuta su cronica da peritonite batterica spontanea	Segni di Rigenerazione Epatocellulare alla seconda biopsia t-j	AST 480, ALT 511 BIL.TOT.3.5 γ GT100, Ph.Al 121	Recupero della funzionalità epatica	Terapia semintensiva
Caso 4	Epatite fulminante da funghi	Necrosi epat. alla biopsia t-j 90%, rig. Ass.	AST 3800, ALT 9350 BIL.TOT.8.4 γ GT 76 Ph.Al 311 prot.tro. 25"	Dimissioni in 10a giornata post-operatoria	Trapianto ortotopico di fegato 48h dopo il ricovero
Caso 5	Epatite Acuta su cronica per occasionale anestesia generale	Necrosi epat. alla biopsia 100%, rig. Ass	AST 1120, ALT 815 BIL.TOT.2.8 γ GT 320, Ph.Al 171 prot.tro.21.2"	Dimissioni in 10a giornata post-operatoria	Trapianto epatico
Caso 6	Epatite Acuta su cronica con coma etilico	La Biopsia a 2 settimane dall'evento dimostra rigenerazione epatica	AST 2550, ALT 2788 BIL.TOT.9 γ GT 511, Ph.Al 389 prot.tro. 25"	Esito positivo	Terapia intensiva No Trapianto epatico Per motivi etici
Caso 7	Epatite Acuta su cronica	Dati non disponibili	AST 277, ALT 308 BIL.TOT.3 γ GT 84, Ph.Al 111 prot.tro. 19"	Attesa di trapianto	Terapia intensiva
Caso 8	Epatite sub-acuta	Dati non disponibili	AST 501, ALT 322, BIL.TOT.6.4 γ GT 211, Ph.Al 180, prt.tro. 21,5"	Non in lista Attesa	Terapia intensiva
Caso 9	Epatite fulminante da overdose farmacologica	Necrosi epat. alla biopsia t-j 100% rig. Ass	AST 4388, ALT 7222 BIL.TOT.11 γ GT 341, Ph.Al 88, prot.tro. 25"	Deceduto	Terapia intensiva in attesa di trapianto
Caso 10	Epatite fulminante da causa sconosciuta	Dati non disponibili	AST 7500, ALT 9232, BIL.TOT.4.8, γ GT 78, Ph.Al 98, prt.tro. 23.2"	Dimissioni in 10a giornata post-operatoria	Trapianto dopo 48h dal ricovero
Caso 11	Epatite sub-acuta	Dati non disponibili	AST 501, ALT 322, BIL.TOT.3.8, γ GT 76, Ph.Al 198, prt.tro. 19.2"	Dimissioni in 10a giornata post-operatoria	Terapia intensiva Trapianto
Caso 12	Epatite sub-acuta su cirrosi post alcolica ascite massiva peritonite e trombosi vena porta	Rigen al 25%	AST 776, ALT 511, BIL.TOT.4.8, γ GT 215, Ph.Al 153, prt.tro. 19.8"	Lista d'attesa per trapianto	Terapia intensiva

possibile valutare i reperti istologici pur in presenza di valori medi per le ALT e AST, come ad esempio il caso n° 8 I.P. non definibile AST 501, ALT 322, che ha avuto una evoluzione favorevole con il solo trattamento medico. Il caso n° 7, I.P. non definibile, AST 277, ALT 308 ed il caso n° 11, I.P. non definibile, AST 501, ALT 322, hanno avuto necessità di trapianto pur in presenza di valori di laboratorio uguali o addirittura più favorevoli rispetto al caso precedente.

Per tanto i dati di laboratorio fin ora largamente utilizzati come criteri di valutazione dai protocolli del "King's College" e di "Clichy" hanno dimostrato un bassa accuratezza prognostica rispetto a quanto ci si può aspettare dall'indice di rigenerazione epatica. In riferimento ai nostri studi sulla rigenerazione epatica ¹⁸ troviamo conferma sulla validità di tale convincimento. La ricerca è stata condotta su 210 ratti razza Sprague - Dweley di peso medio 280 (± 30) gr trattati con iniezione intra-

peritoneale con una soluzione di 5ml/kg al 25% di CCl₄ e 75% di olio di paraffina. Gli esemplari sono stati suddivisi in tre gruppi (A,B,C,) il gruppo A è stato sottoposto solo ad intossicazione epatocellulare con CCl₄, il gruppo B è stato sottoposto dopo l'intervallo di 1h dall'intossicazione a somministrazione per via endovenosa attraverso la vena giugulare esterna destra di 200ng di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), mentre il gruppo C considerato di controllo non ha subito alcun trattamento.

I risultati ottenuti da questo esperimento vengono esposti nelle Figg. 1 e 2 per quanto concerne i risultati di laboratorio. È evidente che i livelli sierici degli enzimi epatici sono aderenti all'entità del danno epatico arrecato, ed al ruolo determinante nel gruppo B dalla somministrazione del VEGF.

Tuttavia, solo gli esami istologici, nella nostra esperienza, sono stati in grado di dare un alto valore prognostico nelle ore successive all'avvelenamento.

Infatti in tutto il gruppo A, a partire dalla ventiquattresima ora successiva all'avvelenamento è stato possibile individuare necrosi plurifocale periportale associata ad infiltrati infiammatori. Nel gruppo B nell'esame istologico si è osservata invece una più limitata necrosi plurifocale con flogosi periportale lieve ed una iniziale steatosi periportale. L'indice prognostico è stato calcolato in base al danno istologico le cui manifestazioni più gravi si sono registrate in corrispondenza del picco delle transaminasi (Figg. 3 e 4).

In questo studio che ha utilizzato la rigenerazione epatica come momento determinante per la valutazione prognostica, gli aspetti da noi presi in considerazione sono stati:

- neo angiogenesi,
- flogosi periportale,
- evoluzione dei danni endoteliali,

inoltre, per ridurre il rischio di una eventuale interpretazione anomala (falsi positivi-negativi) la lettura di tutti i preparati istologici è stata effettuata dallo stesso anatomopatologo. Per quanto concerne l'angiogenesi, abbiamo fatto ricorso ai dati sperimentali che hanno dimostrato angiogenesi nei topi trattati con VEGF (gruppo B) a differenza di quanto riscontrato nel 70% dei topi del gruppo A, dove tale attività si è dimostrata insufficiente. Nello stesso gruppo (A) di animali nel 30% dei casi si è registrata angiogenesi lenta ma graduale.

La differenza tra il sottogruppo A (30% sopravvissuti all'avvelenamento), rispetto al gruppo B, topi trattati con VEGF, consiste nel fatto che la rigenerazione epatica è terminata in 12° giornata, a differenza di quelli del gruppo B dove la rigenerazione epatica è terminata in 3° giornata post-avvelenamento. Analogamente abbiamo riscontrato lo stesso andamento a proposito dei dati sulla flogosi periportale. Nei topi del gruppo A, il riscontro di processi infiammatori periportal è stato di grado massimo nel 70% e di grado medio per il restante 30% (animali sopravvissuti).

I fenomeni flogistici periportal più importanti hanno dimostrato un aumento della permeabilità microvascolare dei sinusoidi epatici con infiltrazioni linfo-plasmacellulari tipici dell'epatite acuta fulminante. Negli animali del gruppo B (quelli trattati con VEGF), tale processo necrotico flogistico si è dimostrato di limitate proporzioni, mentre sono prevalse le attività proliferative delle cellule endoteliali sinusoidali tipiche della rigenerazione epatica

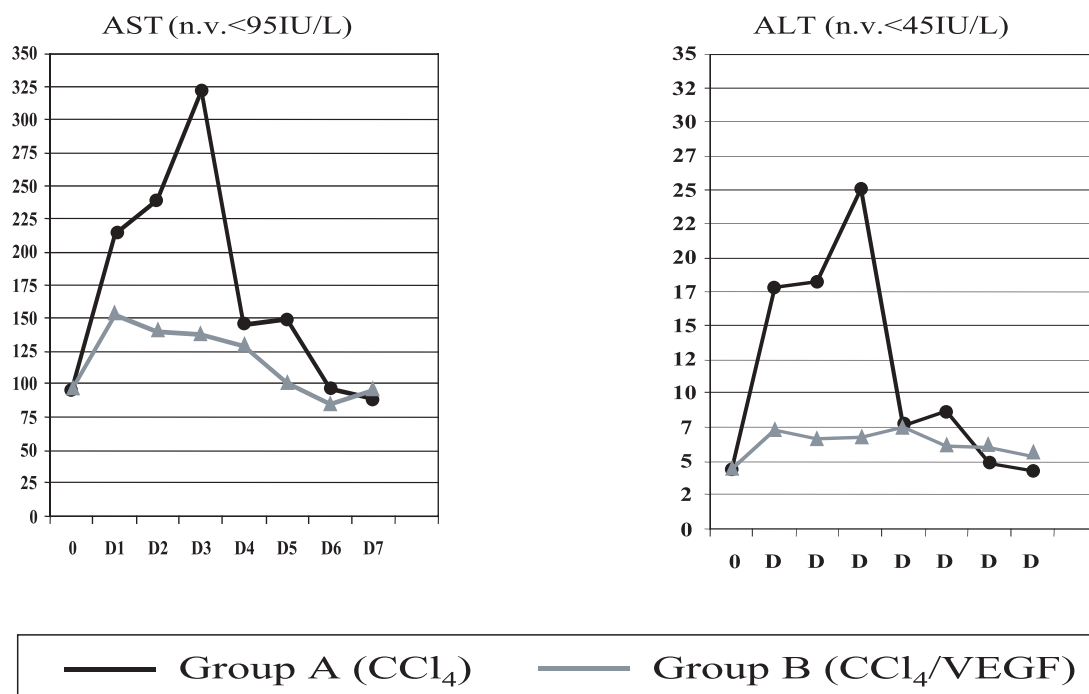


Fig. 1-2

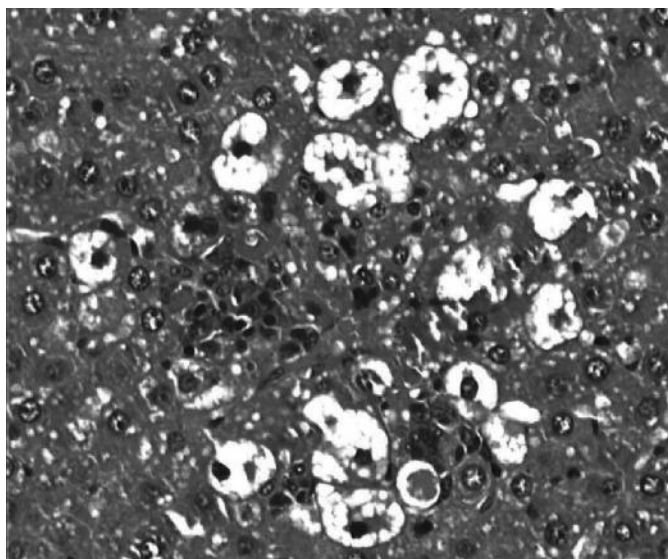


Fig. 3

GRUPPO A 24h - day 1

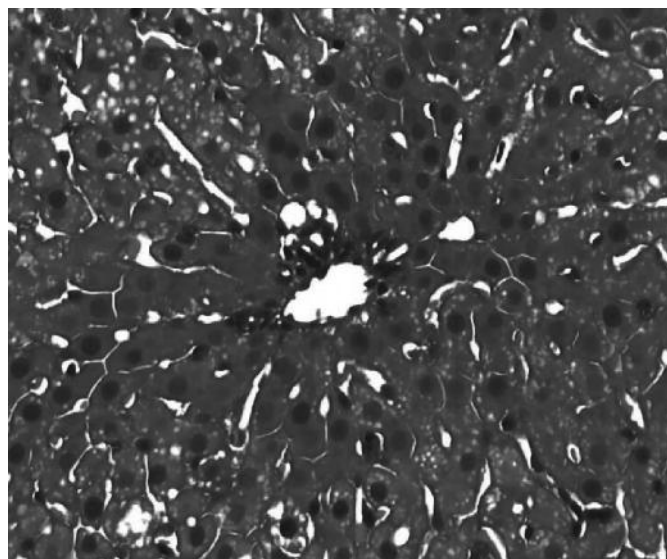


Fig. 3

GRUPPO B 24h - day 1

che sono culminate con un aumento progressivo nella fase di guarigione. A conferma di quanto detto nella parte introduttiva, nel nostro esperimento, ed in entrambi i gruppi di animali all'esame (A-B) il danno epatico istologicamente dimostrato ha raggiunto l'acme a 72 ore dall'inizio dell'esperimento. Dove il gruppo A ha dimostrato necrosi periportale massima ed il gruppo B rigenerazione, come si evince dai relativi preparati istologici. Sulla scorta dei risultati del nostro esperimento e dall'evoluzione clinica dei pazienti osservati in corso di epatite fulminante possiamo affermare che è possibile combinare i risultati degli esami di laboratorio con le evidenze istologiche al fine di predire l'andamento clinico evolutivo dell'epatite fulminante medesima.

Conclusioni

La prognosi dell'epatite fulminante è comunemente affidata ai criteri del King's College (eziologia, età del paziente, la creatinina sierica, la bilirubina, il grado di coma, e il Ph.Arterioso) ed ai criteri del Clichy (fattore V ed età). Al momento attuale in base ai risultati del nostro studio è possibile utilizzare un supporto prognostico che permetta di rilevare la possibilità di una rigenerazione epatica efficace. Questa conclusione è largamente supportata dai dati della letteratura, concernenti l'utilizzo di una angiogenesi terapeutica, quale quella ad esempio ottenuta nelle cardiopatie ischemiche croniche dove tali fenomeni sono ben conosciuti.

Si può inoltre ragionevolmente affermare che le possibilità di controllare i problemi secondari degli endoteli dei sinusoidi, possono essere notevolmente favorite da una serie di citochine endogene, la cui presenza può accelerare o ritardare la rigenerazione. Al momento

attuale rivedendo i dati della letteratura possiamo sostenere che il nostro studio sul VEGF è il primo che riporti l'utilizzo di tale citochina nel trattamento sperimentale nell'insufficienza acuta epatica e come tale lasci intravedere una seria applicazione clinica che inevitabilmente si ripercuoterà nella maggiore conoscenza della fisiopatologia della rigenerazione epatica e nel miglioramento della prognosi dei pazienti affetti da epatite fulminante.

Riassunto

Lo studio clinico del danno epato-cellulare acuto è stato condotto su di un gruppo di 12 pazienti affetti da epatite acuta fulminante sulla base di: segni istologici (necrosi epatica mediante biopsia transgiugulare), esami di laboratorio (AST, ALT, Bilirubina Totale, γ GT, Fosfatasi Alcalina, Tempo di Prototrombina), e dalla valutazione dell'evoluzione. L'evoluzione clinica di questi 12 pazienti, nel 25% dei casi è stata seguita dal recupero della funzionalità epatica dopo terapia intensiva, nei restanti casi nel 41% si è ricorso a trapianto di fegato, e nel 36%, in cui questo non è stato possibile, si è segnalato il decesso.

La sperimentazione sulla necrosi acuta è stata condotta su 260 ratti, sottoposti ad avvelenamento con tetracloruro di carbonio (CCl_4), e successivamente trattati con Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). La sperimentazione ha permesso di evidenziare come il criterio di valutazione dell'Indice di Rigenerazione Epatica, associato ai dati degli esami istologici e ai dati di laboratorio, fino ad ora, lungamente utilizzati, aumenta le possibilità dei criteri prognostici dei protocolli del Clichy e del King's College criteria.

Bibliografia

- 1) Trei C, Davidson CS: *The management of fulminant hepatic failure*. In: Popper H, Schaffner F (eds): *Progress in liver diseases*. New York: Grune & Stratton, 1970:282-98.
- 2) Ostapowicz GA, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al.: *Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centres in The United States*. Ann Intern Med, 2002; 137:947-54.
- 3) Yamazaki Z, Fujimori Y, Sanjo K, Kojimay Y, Sugiura M, Wada T, Inoue N, SaKai T, Oda T, Kominami N, Fujisaki U, Kataoka K: *New artificial liver support system (plasma perfusion detoxification) for hepatic coma*. 1978. The Apher, 2000; (1):23-25.
- 4) Hugges RD, Nicolau N, Langhej PG, Ellis AG, Wendon JA, Williams R: *Plasma citokine levels and coagulation and complement activation during use of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure*. J Artif Organs, 1998; 22(10):854-58.
- 5) Ting PP, Demetriou AA: *Clinical experience with artificial liver support systems*. Canadian Journal of Gastroenterology, 2002; 14[Suppl]D:79D-84D.
- 6) Falckenhagen D, Strobl W, Vogt G, Schrefl A, Linsberger I, Gerner FJ, Schoenhofen M: *Fractionated plasma separation and adsorption system: A novel system for blood purification to remove albumin bound substances*. J Artif Organs, 1999; 23(1):81-86.
- 7) Bismuth H, Figuerio J, Samuel D: *What should we expect from a bioartificial liver in fulminant hepatic failure?* J Artif Organs, 1998; 22(1):26-31.
- 8) Jalan R, Williams R: *Bio-artificial liver support for acute liver failure: Should we be using it to treat patients?* Trasplantation, 2002; 3(2):165-66.
- 9) O'Grady JG, Alexander GJM, Hayllar KM, et al.: *Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 1989; 97:439.
- 10) Bernuau J, Goudeau A, Poynard T et al.: *Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B*. Gastroenterology, 1986; 6:648.
- 11) Pauwels A, Mostefa- Kara M, Florent C, et al.: *Emergency liver transplantation for acute liver failure. Evaluation of London and Clichy criteria*. J Hepatol. 1993; 17:124.
- 12) Marino G, Gruttadauria S, Piazzese E, Nicotra F, et al.: *A novel experimental use of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the treatment of acute acute liver failure (Abstract)*. Liver Transplantation, 2004; 10(6):C-34.
- 13) Fausto N: Liver regeneration. In: Arias IM, Boyer JL, Jakoby WB, Fausto N, Schafritz DA (eds): *The Liver: Biology and pathology*, New York: Raven 1994; 1059-84.
- 14) Thorgeirsson SS: *Hepatic stem cells in liver regeneration*. FASEB J, 1996; 10:1249-256.
- 15) Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, et al.: *Reconstruction of liver mass via cellular hypertrophy in the rat*. Hepatology, 2001; 33:339-45.
- 16) Bucher NL: *Experimental aspect of liver regeneration*. N Engl J Med., 1967; 277:738-46.
- 17) Bucher NL: *Experimental aspect of liver regeneration*. N Engl J Med., 1967; 277:686-96.
- 18) Michalopoulos GK, De Frances MC: *Liver regeneration*. Science, 1997; 276:60-66.
- 19) Steer CJ: *Liver regeneration*. FASEB J, 1995 ;9:1396-400.
- 20) Fausto N, Laird AD, Webber EM: *Liver regeneration*. FASEB J, 1995; 9:1527-536.
- 21) Cressman DE, Greenbaum LE, De Angelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al.: *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996; 274:1379-383.
- 22) Yamada Y, Kirillova, Peschon JJ, Fausto N: *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94:1441-445.
- 23) Martinez-Hernandez A, Amenta PS: *The extracellular matrix in hepatic regeneration*. FASEB J, 1995; 9 1401-410.
- 24) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Weigand SJ, Holland J: *Vascular specific growth factors and blood vessels formation*. Nature, 2000; 407 242-48.
- 25) Ferrara N: *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med, 1999; 77:527-43.
- 26) Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al.: *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cell*. Nat Med, 1996, 2:1096-103.
- 27) Fukumura D, Xavier R, Sagiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al.: *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998; 94:717-25.
- 28) Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H et al.: *Expression of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 1999; 254:587-93.
- 29) Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K: *Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt-1, KDR/flk-1, in regenerating liver*. Biochem Biophys Res Commun, 1999; 258:674-78.
- 30) Schimizu H, Miyazaki m, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, et al.: *Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats*. J Hepatol, 2001; 34:683-89.
- 31) Ankoma- Sey V, Wang Y, Dai Z: *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells*. Hepatology, 2000; 31:141-48.
- 32) Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M: *Expression of vascular endothelial growth factor in human epatocellular carcinoma*. Hepatology, 1998; 28:68-77.