

Insufficienza epatica acuta e fulminante: modelli sperimentali



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

P. GORINI, L. FOGLI*, E. MORSIANI**

Divisione di Chirurgia Generale, Presidio Ospedaliero Cento-Bondeno, Azienda U.S.L. di Ferrara,

*Divisione di Chirurgia Generale, Ospedale Bellaria, Azienda U.S.L. Città di Bologna,

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

Introduzione

La messa a punto di sistemi bio-artificiali di supporto in grado di vicariare la funzione del fegato in corso di insufficienza epatica fulminante (IEF), al fine di permettere la rigenerazione del fegato nativo o fino al reperimento di un fegato trapiantabile, rappresenta uno dei traguardi più significativi della moderna epatologia. La clinica ha da tempo evidenziato in un'infezione virale accidentalmente contratta, nel fortuito contatto con tossici o veleni a spiccato epatotropismo, nell'assunzione massiva di farmaci a scopo suicida o di farmaci ritenuti innocui, ma nei cui confronti il paziente dimostra una abnorme reattività, nella massiva resezione di parenchima epatico, le molteplici eziologie della sindrome da IEF. Inoltre, sono ben noti anche la complessità ed i limiti dell'approccio terapeutico nel paziente colpito da IEF, fondato da una parte sul supporto metabolico al fine di consentire e stimolare la rigenerazione del parenchima epatico residuo e dall'altra sulla rimozione dei tossici o dei farmaci epatolesivi. Baluardo terapeutico estremo, ma di provata efficacia, è attualmente la sostituzione in toto del fegato danneggiato, mediante trapianto di fegato. Da quanto brevemente esposto, si comprende come sia assai importante il potersi avvalere di modelli sperimentali, in relazione ai diversi aspetti eziopatogenetici e terapeutici della IEF (1-4).

In generale, viene considerato adatto un modello sperimentale in cui la somministrazione di un agente epatotossico od un evento epatolesivo siano in grado di determinare lo sviluppo di una IEF ad esito letale, esclusivamente o prevalentemente dipendente dalla défaillance epatica, sia nell'animale sano che nell'animale già portatore di una forma di epatopatia cronica indotta sperimentalmente (5). Più in particolare, un modello soddisfacente

Riassunto

Vengono descritti alcuni dei modelli sperimentali di insufficienza epatica fulminante (IEF) di più frequente impiego. Essi vengono inoltre confrontati fra di loro e con un ipotetico modello ideale. Di quest'ultimo vengono sottolineate le caratteristiche fondamentali che sono: 1) la reversibilità; 2) la riproducibilità; 3) il decesso in dipendenza dalla insufficienza epatica; 4) la presenza di una finestra terapeutica; 5) l'impiego di un animale da laboratorio di dimensioni idonee; 6) la riduzione al minimo dei rischi a cui viene esposto il personale durante lo studio. A fronte della riconosciuta molteplicità eziologica della sindrome da IEF, si documenta l'utilità dello studio dei modelli sperimentali. Infatti, nel tentativo di comprensione dei meccanismi eziopatogenetici, l'aiuto che deriva dall'impiego di modelli differenti risiede principalmente nella possibilità di sviluppare nuovi e più specifici trattamenti terapeutici. Nonostante ciò, il limite più significativo resta la limitata messa in pratica in chiave clinica, dei risultati sperimentali.

Parole chiave: Fegato, insufficienza epatica fulminante, animali da laboratorio, modelli sperimentali.

Summary

FULMINANT HEPATIC FAILURE: EXPERIMENTAL MODELS

Fulminant hepatic failure (FHF) is a complex clinical syndrome, with an invariably high mortality rate, that follows many possible and different infectious, pharmacologic and surgical liver injuries. The appearance of the syndrome is similar whatever the etiology, but the mechanisms which lead to the development of FHF are greatly varied. In order to understand the possible pathways which drive to FHF, experimental animal models have been used for a long time. Six requirements should be fulfilled by any FHF animal model: 1) reversibility; 2) reproducibility; 3) death from liver failure; 4) the presence of a therapeutic window; 5) the need of large laboratory animal; 6) minimal hazard to personnel involved in the study. In the present paper a number of models are reported and described, and advantages and disadvantages are discussed. It is concluded that with respect to the aforementioned criteria, no available experimental model is yet as satisfactory as expected.

Key words: Liver, fulminant liver failure, laboratory animals, experimental models.

di IEF deve possedere caratteristiche ben precise, prima tra tutte la reversibilità del quadro clinico-patologico, dimostrabile con un aumento della sopravvivenza, dopo un trattamento efficace. La sola correzione delle alterazioni biochimiche e neurologiche non è sufficiente, poiché spesso tale correzione non porta all'aumento della sopravvivenza. Inoltre, il modello sperimentale deve essere riproducibile, cioè deve comportare una mortalità pressoché generalizzata in assenza di trattamento e la mortalità osservata deve essere conseguente al danno epatico. Affinché il modello sperimentale sia utile, il danno epatico deve essere selettivo per il fegato ed in grado di provocare la morte dell'animale per insufficienza epatica acuta. Inoltre, l'evento patologico fino all'exitus, deve verificarsi in un intervallo di tempo sufficientemente lungo per poter iniziare il trattamento e poterne verificare gli effetti, fornendo cioè una finestra terapeutica che permetta di intervenire. Nella messa a punto di un modello di IEF, è consigliabile l'utilizzazione di animali da esperimento di taglia media o grossa, in quanto più agevole risulta la monitoraggio seriata clinico-laboratoristica degli effetti del danno epatico, del trattamento di supporto ed infine l'eventuale trasferimento all'uomo delle metodiche studiate. Infine, va ricordato che a causa della estrema tossicità di molte delle sostanze epatotossiche impiegate, nessuna fase sperimentale deve comportare rischi per il personale coinvolto nello studio.

Prima di riportare in dettaglio alcuni dei modelli di IEF di più frequente impiego, può essere utile ricordare che i numerosissimi protocolli sperimentali riportati in letteratura possono essere ricondotti a tre gruppi principali: 1) modelli farmacologici, basati cioè sulla esclusiva somministrazione di una sostanza tossica a spiccato epatotropismo; 2) modelli chirurgici, suddivisibili a loro volta in interventi resettivi, ischemici ed ischemico-resettivi; 3) modelli misti farmacologico-chirurgici, in cui il danno epatico è il risultato della somministrazione di un composto epatotossico, associato ad una parziale demolizione del parenchima epatico o ad ischemia (Tab. I).

Tab. I – RIEPILOGO DEI MODELLI SPERIMENTALI DI INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA NEGLI ANIMALI DA ESPERIMENTO

Modello Farmacologico:	D-Galattosamina
Modelli Chirurgici:	Epatectomia Totale (animale anepatico)
	Epatectomia Sub-Totale (85-90%)
	Devascolarizzazione epatica in 2 stadi
	Epatectomia > 80% + ischemia arteriosa
	Epatectomia < 80% + shunt porto-cavale
Modello Misto:	Fenobarbital (pre-trattamento) + ischemia arteriosa + CCl ₄

Modelli farmacologici

D-Galattosamina. Questa sostanza viene solitamente somministrata in conigli adulti, inbred di ceppo IIIVO/J x

IIIC/J, alla dose di 4,25 mMol/Kg di peso corporeo, disciolta in 9 ml di destrosio al 5% e tamponata in NaOH a pH di 6,8. La soluzione viene somministrata per via endovenosa nella vena marginale dell'orecchio ed in un intervallo di tempo di almeno 2 minuti. Per tutta la successiva durata dell'esperimento, agli animali viene permesso di accedere liberamente all'acqua ed al cibo standard.

La mortalità globale osservabile è intorno al 94%. Entro 20 ore dalla somministrazione del tossico, solo il 6% degli animali va incontro a decesso. Il picco di mortalità si ha tra la 21^a e la 27^a ora, con un incremento del 53%. A distanza di 44 ore dalla somministrazione, la mortalità viene incrementata di un ulteriore 21%, per un totale di 80%. Un altro 10% di mortalità negli animali si aggiunge solitamente entro le 72-96 ore. Il decesso viene preceduto da un periodo di tempo in cui è clinicamente evidente uno stato di encefalopatia, che evolve fino al coma. Esso può essere graduato in 4 stadi: Stadio 1, con letargia; Stadio 2, in cui l'animale sviluppa atassia, nistagmo ed è incapace di camminare o di mantenere la postura del capo; Stadio 3, con l'animale che presenta opistotono, risponde a stimoli algici minori, mantiene il tono degli arti anteriori e posteriori, ma non riesce a raddrizzarsi quando viene posto su di un fianco; Stadio 4, con perdita del tono degli arti e risposta solo a stimoli dolorosi profondi. La durata del coma è in media di 2,6 ore, variabile da 0,7 a 5,8 ore. Nessuno degli animali che manifesta encefalopatia sopravvive ed il decesso è preceduto da elevati valori serici di SGOT e SGPT, fosfatasi alcalina, LDH, bilirubina, tempo di protrombina ed ammoniemia, a conferma del danno epatico. Si osservano inoltre acidosi metabolica ed ipoglicemia (6, 7).

Alla autopsia, il fegato appare pallido e l'esame microscopico evidenzia estesi danni del parenchima con ciorressi, alterate qualità di colorazione nucleare e citoplasmatica e necrosi coagulativa focale epatocitaria, con frequenti corpi eosinofili. Nettamente ridotto è il contenuto epatocitario di glicogeno in tutto il lobulo, la cui architettura appare tuttavia intatta e senza incremento di fibrosi. Negli animali giunti a morte non si osserva infiltrazione flogistica, la quale è invece assai estesa e caratteristica nel fegato degli animali che sopravvivono, con maggiori segni di citolisi, accumulo di detriti cellulari nelle cellule di Kupffer e lieve steatosi. Tanto negli animali deceduti che in quelli sopravvissuti, solitamente non vi è evidenza di lesioni ad altri organi e l'incremento modesto di creatininemia negli animali che decedono, può essere espressione della disidratazione propria degli stadi preterminali, piuttosto che di un danno renale clinicamente rilevante. Infine, va sottolineato che negli animali che sviluppano encefalopatia è dimostrabile un franco edema cerebrale (6, 7).

Altre sostanze. Altri composti epatotossici largamente impiegati in passato per indurre una IEF sono il CCl₄ e la Dimetilnitrosamina (DMNA). Tuttavia, la mancan-

za di alcuni dei requisiti di base per la realizzazione del modello sperimentale, in particolare la non sufficiente selettività d'organo per il fegato, la necessità di somministrare dosi elevate ed i significativi rischi legati alla loro manipolazione, fanno unanimemente ritenere questi due composti meno adatti rispetto alla D-Galattosamina.

Modelli chirurgici

Epatectomia totale. Questo modello mira alla creazione di un animale anepatico. Sono solitamente usati maiali di peso corporeo compreso fra 20 e 25 Kg. Dopo anestesia con Penthotal sodico alla dose di 2-3 mg/Kg, essa viene mantenuta con una miscela di O₂ e protossido di azoto somministrata per via endotracheale in circuito chiuso. Dopo il posizionamento di un catetere venoso giugulare e di uno arterioso carotideo, si esegue la laparotomia mediana e vengono isolate l'arteria epatica, la vena porta e la vena cava sovra- e sotto-epatica. Si confeziona quindi una anastomosi porto-cava latero-laterale che, mediante legatura della stessa vena porta a valle dell'ultima confluyente, viene trasformata in uno shunt di tipo termino-laterale. A questo punto si sezionano tutti i legamenti epatici, si legano e sezionano l'arteria epatica e la via biliare principale e si rimuove il fegato in toto. Il circolo portale viene decompresso con la tecnica descritta da Lempinen (8) o con un by-pass venovenoso cavo-porto-giugulare (Fig. 1) proposto da Filipponi e Coll. (9). Infine, il tratto intraepatico della vena cava inferiore viene ricostituito con una protesi vascolare in Goretex o Teflon, mentre durante l'esecuzione dell'anastomosi tra innesto protesico e la parte superiore della vena cava si procede a temporaneo clamping per circa 10 minuti della vena porta. Al termine dell'intervento, l'animale viene riposto in gabbia singola

riscaldata, proseguendo l'infusione di soluzione glucosata al 5% e.v., mentre grazie alla presenza dei cateteri intragiugulare ed intracarotideo si può effettuare un agevole controllo dei parametri vitali e di quelli metabolici. La mortalità del modello è pari al 100%, con una sopravvivenza media intorno alle 19 ore ed un range compreso tra 11 e 27 ore (10-12).

Valori analoghi di sopravvivenza sono stati osservati nel cane, con una sopravvivenza media di 22 ore ed un range che va da 17 a 27 ore (13). Con il passare del tempo diventano sempre più manifesti sia una instabilità emodinamica sia i segni EEG di danno cerebrale grave, il cui passaggio all'irreversibilità corrisponde ad un netto incremento finale della ammoniemia. L'evento terminale, cioè l'arresto cardio-respiratorio, viene preceduto da tachipnea e diffuse alterazioni elettrofisiologiche. In questo modello si sviluppa un caratteristico edema cerebrale, ma di entità minore rispetto a quello che si osserva nei modelli sperimentali in cui il fegato viene lasciato in situ in toto od in parte. La concentrazione plasmatica di ammoniaca risulta aumentata già dopo un'ora dalla fine dell'intervento, raggiungendo il valore medio di $150 \pm 13 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, valore che continua a crescere progressivamente. Negli animali vivi a 24 ore dall'intervento, l'ammoniemia è di $245 \pm 55 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, cioè più che triplicata dall'inizio dell'esperimento. Dopo 9 ore, si osservano anche alterazioni tipiche della coagulazione, rappresentate da un valore del tempo di protrombina di $13,5 \pm 0,4 \text{ sec}$, dalla riduzione del fibrinogeno da $231 \pm 14 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ a $173 \pm 19 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ e del Fattore VII da $41,5 \pm 6,80$ a $22,33 \pm 10,37\%$ (10-13).

Nel ratto, l'epatectomia totale può essere eseguita in tre stadi, secondo quanto proposto da Bismuth e Coll. (14). Il primo intervento prevede la legatura della vena cava inferiore al di sopra delle vene renali, e ciò per assicurare lo sviluppo di adeguati circoli collaterali cavo-cavali; dopo tre settimane, si reinterviene e si esegue una anastomosi porto-cava termino-laterale; solo successivamente, due giorni più tardi, si esegue la epatectomia totale, previa devascularizzazione completa del fegato e legatura e sezione della vena cava sottodiaframmatica. Più recentemente, è stata messa a punto una tecnica di epatectomia totale in singolo stadio nel ratto, che prevede la resezione completa della vena cava infraepatica e della vena porta e quindi l'utilizzazione di un innesto vascolare venoso omologo, precedentemente prelevato e preparato, con anastomosi microvascolari cavo-cavali e porto-cavale (15). Tale metodica può permettere una sopravvivenza a 12, 18 e 24 ore del 90%, 70% e 45%, rispettivamente, con una sopravvivenza media di 20 ± 5 ore. La tecnica di epatectomia totale nel ratto proposta da Rozga e Coll., si avvale di due stadi (16); nel primo intervento si determina una atrofia dei lobi posteriori attaccati alla vena cava infra-epatica, creata con la legatura selettiva delle branche portalì posteriori; due settimane più tardi, l'arteria epatica viene legata, si procede con la classica epatectomia secondo Higgins & Anderson

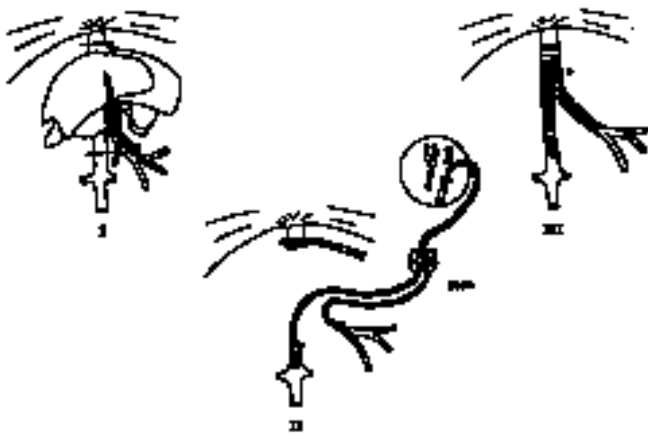


Fig. 1: Fasi dell'intervento di epatectomia totale nel maiale, con resezione porto-cavale en-bloc (I). Previo by-pass venovenoso cavo-porto-giugulare (CPJB) in circolazione extra-corporea (II), la ricostruzione vascolare (III) viene effettuata con l'uso di una protesi biforcata (P). Modificata da Filipponi e Coll. (9).

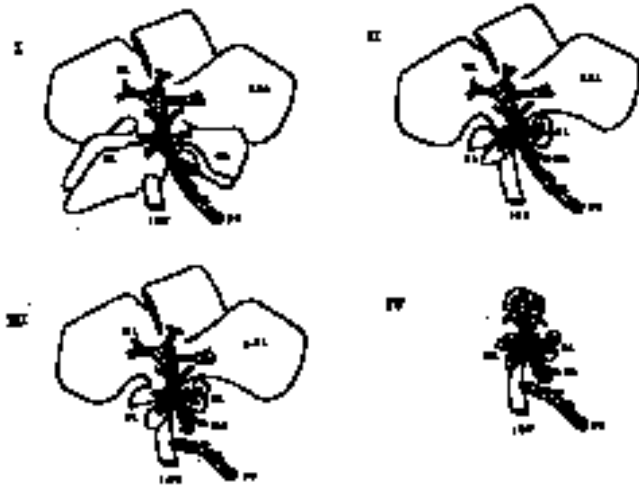


Fig. 2: Illustrazione schematica dell'intervento di epatectomia totale in due stadi nel ratto. In I) sono indicati il peduncolo vascolare portale (PV), arterioso (HA), i lobi epatici (RL: lobo destro; OL: lobi omentali; LAL: lobo anteriore sinistro; ML: lobo mediano) e la vena cava inferiore (ICV). Il *primo stadio* dell'intervento prevede la legatura selettiva dei peduncoli portalici posteriori, con risparmio dei rami arteriosi, tale da indurre l'atrofia dei lobi epatici posteriori (RL ed OL), evidenziata in II). Nel *secondo stadio* dell'intervento è prevista la creazione di uno shunt porto-cava termino-laterale tra la vena porta (PV) e la vena cava inferiore (ICV), schematizzata in III), che viene associata alla resezione dei lobi epatici anteriori (ML ed LAL) ed alla legatura dei rami dell'arteria epatica tributari dei lobi posteriori, come rappresentato in IV). Modificata da Rozga e Coll. (16).

(17) e si associa una anastomosi porto-cava termino-laterale (Fig. 2). Questa tecnica presenta il vantaggio di aggiungere al modello puramente resettivo una piccola quantità di tessuto epatico residuo in preda a necrosi ischemica, che a detta degli stessi Autori riproduce più strettamente la condizione clinica di IEF (16).

Epatectomia sub-totale. Nel ratto, il fegato è macroscopicamente costituito da diversi lobi, ognuno ben individuato e con un proprio peduncolo bilio-vascolare che ne consente la rimozione indipendentemente dagli altri. Si riconoscono infatti un lobo destro, un lobo mediano, un lobo sinistro ed un lobo caudato. Di questi, il lobo destro ed il lobo caudato sono bipartiti: nel primo si riconosce una porzione superiore ed una inferiore, mentre il secondo è composto da una parte anteriore ed una posteriore. Anche nel ratto la distribuzione segmentaria dei rami portalici rappresenta la base anatomica della suddivisione in segmenti e questa particolareggiata suddivisione permette di eseguire resezioni parenchimali quantificabili in maniera sufficientemente precisa. Nel corso di studi sperimentali, a partire da quello classico di Higgins & Anderson (17), è stato possibile stabilire che il volume del lobo sinistro costituisce il 30% del totale, il mediano il 40%, la porzione superiore del destro il 15%, mentre quella inferiore il 5%, così come ciascuna delle due parti del lobo caudato.

Per l'esecuzione di una epatectomia dell'85% e del 90%

nel ratto, dopo induzione di anestesia inalatoria con vapori di etere ed attraverso una laparotomia mediana, si procede alla classica epatectomia descritta da Higgins ed Anderson, che prevede la rimozione dei lobi mediano e sinistro (17). In questo modo, il 67% circa del parenchima epatico viene rimosso senza conseguenza alcuna sulla sopravvivenza degli animali. La successiva asportazione della porzione superiore del lobo destro e di quella anteriore del lobo caudato, che in entrambe i casi e per ragioni tecniche non può mai essere totale, fa sì che residui una porzione di fegato di circa il 15% del totale, che si riduce al 10% quando si provvede ad asportare anche la parte posteriore del lobo caudato o la inferiore del destro. Per la precisione, la percentuale di parenchima epatico asportato con il primo intervento è pari all'84,6 $\pm$ 1,3%, mentre con il secondo è pari all'87,9 $\pm$ 2,4%. Dopo l'intervento, agli animali viene lasciato libero accesso ad acqua e cibo, senza alcun altro supporto metabolico. Dopo una epatectomia dell'85% il tasso di sopravvivenza a 24 ore è del 48%, che si riduce al 18% a 48 ore. Gli animali che giungono vivi alla terza giornata post-operatoria sopravvivono indefinitamente. Diversamente, dopo una epatectomia del 90%, solo il 37% degli animali è vivo a distanza di 24 ore, mentre nessun animale oltrepassa la soglia delle 48 ore, con una mortalità globale del 100%.

Da un punto di vista biochimico, a partire dalla 2ª ora dopo l'intervento, si osserva un rapido incremento sia di SGOT sia di SGPT che raggiungono il valore massimo di 4000 UI/L e di 1500 UI/L dopo 24 ore. Contemporaneamente si osserva un aumento della bilirubinemia fino a 1,5 mg/100 ml a 24 ore. Al decesso, indipendentemente dal tipo di resezione operata, si osservano distensione delle vene splancniche e presenza di liquido ascitico. Il fegato residuo è macroscopicamente steatosico, con una irregolare distribuzione di fenomeni congestizi soprattutto nelle regioni centrolobulari. È presente anche steatosi microvascolare e si apprezzano aree di necrosi centrolobulare disomogeneamente distribuite nel parenchima, ma sono evidenti anche aree di rigenerazione con la presenza di numerose mitosi (18-20).

Devascolarizzazione epatica in due stadi. Questa tecnica è stata proposta in conigli adulti di circa 3 Kg di peso. Dopo anestesia generale, viene eseguita una anastomosi porto-cava latero-laterale calibrata a 5 mm di diametro ed attorno al legamento epatoduodenale viene passato un laccio che viene guidato attraverso un piccolo tubo introduttore, attraverso la parete addominale, fino al sottocute. Nell'immediato postoperatorio vengono somministrati, sottocute, 50 ml di soluzione glucosata al 10% e successivamente agli animali è permesso di accedere liberamente al cibo ed all'acqua. Il secondo giorno dopo l'intervento, viene indotto il danno ischemico acuto al fegato, stringendo la legatura attorno al legamento epatoduodenale, previa somministrazione per via endovenosa di 50 mg di amoxicillina. Successivamente gli animali

vengono stabulati in gabbia metabolica ed al fine di prevenire l'ipoglicemia, viene infusa soluzione glucosata al 10%. Dopo un intervallo di circa 10 ore si osservano i primi sintomi propri della encefalopatia, con perdita completa di attività spontanea, alterata postura, assenza dei riflessi di raddrizzamento, marcata ipotonia ed assenza di risposta agli stimoli dolorosi. In poco più del 30% dei casi si osserva opistotono. Già 4 ore dopo l'induzione dell'ischemia epatica si osserva un netto incremento della ammoniemia fino a $299 \pm 36 \mu\text{Mol/L}$, che al momento in cui l'encefalopatia è manifesta, raggiunge valori di $679 \pm 89 \mu\text{Mol/L}$ (18). Il danno epatico indotto con l'ischemia totale è documentato da elevati livelli di bilirubinemia ed enzimi epatici, mentre si registrano acidosi lattica ed ipotermia, con una mortalità del 100%. Al riscontro autoptico si apprezza massiva ischemia del parenchima epatico ed edema cerebrale. L'aumento del contenuto di acqua è particolarmente significativo a livello dell'ippocampo e del cervelletto, con un incremento del 1,57% nel primo e dell'1,03% nel secondo (21). Recentemente, Rozga e Coll. hanno utilizzato la metodica di danno ischemico epatico in due stadi, al fine di indurre una IEF sperimentale nel cane, riportando un grave scompenso metabolico in tutti gli animali già dopo 5 ore dall'intervento, con glicemia di $22,5 \pm 4,31 \text{ mg/100 ml}$, ammoniemia di $163 \pm 8 \mu\text{g/L}$, lattacidemia di $11,3 \pm 1,4 \text{ mMol/L}$, pH ematico arterioso di $7,02 \pm 0,05$, LDH di $456 \pm 122 \text{ mUI/ml}$ e SGOT di $527 \pm 162 \text{ mUI/ml}$ (22).

Epatectomia sub-totale ed ischemia arteriosa. In ratti albini adulti di peso corporeo di circa 300 g, si procede ad epatectomia dell'85%, come sopra descritto. L'ischemia epatica del fegato residuo viene indotta mediante clampaggio selettivo dell'arteria celiaca e dell'arteria mesenterica superiore, protratta per 30 minuti. Al termine del periodo di ischemia si rimuove il clampaggio, si verifica la pulsilità di entrambe i vasi arteriosi, si sutura la laparotomia e si ripongono gli animali in gabbie separate. La mortalità osservata è del 100% entro 4 giorni, con il 40% dei decessi osservabili entro le prime 24 ore dall'intervento. Da un punto di vista biochimico ed anatomopatologico, il quadro è sovrapponibile a quello indotto dalla resezione epatica massiva (4, 20).

Epatectomia parziale (70%-75%) e shunt porto-cavale. In ratti albini adulti di circa 300 g di peso corporeo, dopo anestesia inalatoria da vapori di etere, si esegue la classica epatectomia parziale secondo Higgins ed Anderson con asportazione dei lobi mediano e sinistro (17). In stretta successione, si esegue quindi una anastomosi porto-cavale termino-laterale, che prevede l'isolamento della vena cava inferiore infra-epatica, l'isolamento della vena porta con legatura e sezione della vena gastroduodenale, il clampaggio tangenziale della vena cava nel tratto isolato, la legatura all'ilo epatico della vena porta ed il suo clampaggio all'origine. L'anastomosi viene confezionata in

non più di 15 minuti allo scopo di evitare un danno intestinale da congestione venosa del territorio splancnico. Al termine viene risuturata la laparotomia e gli animali vengono riposti in gabbie singole ed in ambiente controllato.

La mortalità osservata, riportata in letteratura dopo epatectomia parziale e shunt porto-cavale varia grandemente dal 30 al 90% e questa disparità di risultato ha indotto ad aumentare la percentuale di resezione epatica associata allo shunt porto-cavale fino al 75%, ottenibile mediante la rimozione anche del lobo caudato. In questo modo si è ottenuta costantemente una mortalità globale dell'84,6%, con una mortalità a 24 ore del 70%, mentre i rimanenti decessi si verificano tra la 48^a e la 96^a ora. Gli animali giungono al decesso dopo un periodo di tempo in cui si dimostrano sonnolenti ed inattivi, con un ridotto livello di vigilanza ed ipertonia muscolare. Parallelamente, lo studio dei parametri biochimici dimostra un aumento dei valori plasmatici di SGOT fino ad un massimo di $1194,4 \pm 565,7 \text{ UI/L}$ a 24 ore. Allo stesso intervallo di tempo raggiunge il picco anche la SGPT con $844 \pm 229,8 \text{ UI/L}$, mentre il fibrinogeno è ridotto a $141 \pm 59 \text{ mg/100 ml}$. A 48 ore infine, il tempo di protrombina sale a $32 \pm 20,8 \text{ sec}$. All'indagine istologica si apprezza diffusa necrosi epatocitaria (18, 23).

Modelli misti farmacologici e chirurgici

Fenobarbital, ischemia arteriosa e tetracoloro di carbonio. In maiali di peso corporeo compreso tra 15 e 20 Kg, viene somministrato fenobarbital per via orale alla dose di 8 mg/Kg, nel corso dei 3 giorni che precedono l'intervento chirurgico. Successivamente, ad animale anestetizzato ed intubato per via orotracheale, l'ischemia arteriosa temporanea del fegato viene ottenuta isolando l'arteria epatica all'ilo e legando e sezionando tutti i legamenti del fegato, comprese le sue connessioni vascolari transdiaframmatiche. L'arteria epatica viene infine occlusa circondandola con un laccio di polietilene posto oltre l'origine del ramo arterioso gastrico di destra. Suture l'addome, l'animale viene risvegliato e si attendono 2 ore al termine delle quali, sotto una leggera anestesia da protossido di azoto, la laparotomia viene riaperta rapidamente. Si rimuove il laccio attorno all'arteria epatica e se ne verifica la pulsilità, mentre viene somministrato CCl_4 alla dose di 0,5 mg/Kg, direttamente nello stomaco. L'addome viene quindi suturato e cateteri da 8 Fr vengono posti in arteria e vena femorale per misurare la pressione arteriosa, per prelevare campioni di sangue e per l'infusione di liquidi allo scopo di mantenere la diuresi. Al termine della procedura, gli animali vengono stabulati in gabbie individuali e riscaldate a 37° C. Tra la 15^a e la 52^a ora dopo l'intervento e la somministrazione del CCl_4 per via intragastrica, gli animali vengono al decesso, con una sopravvivenza media di 32 ore. Il decesso viene in genere preceduto da una fase di coma

epatico di lunghezza variabile tra 6 e 36 ore con gli animali privi di conoscenza e che rispondono solo leggermente agli stimoli dolorosi. Tuttavia, non viene mai raggiunto il coma di grado IV, e la morte viene preceduta il più delle volte da spasmi muscolari e convulsioni. All'esame autoptico, il fegato si presenta pallido e rigonfio. L'indagine istologica mostra la tipica severa necrosi centrolobulare da CCl_4 , che viene preceduta da vacuolizzazione citoplasmatica, circa 1 ora dopo la somministrazione della sostanza epatolitica, da redistribuzione nel citoplasma dei granuli del reticolo ergastoplasmatico, dopo circa 1 ora e mezza, da rigonfiamento mitocondriale dopo 2 ore, infine da vacuolizzazione del reticolo endoplasmico, deplezione di glicogeno ed accumulo di lipidi, dopo 3 ore. Da un punto di vista biochimico si osserva un innalzamento della bilirubinemia con un valore medio di 1,43 mg/100 ml ed un valore massimo di 3,95 mg/100 ml. Il valore medio di SGOT è di 3150 UI/L, con un range compreso tra 620 e 5000 UI/L, mentre l'ammoniemia è di 420 $\mu\text{Mol/L}$ (range 127-1177), e l'indice di Protrombina si riduce al 45%, con un range compreso tra 18 e 77. In maniera caratteristica, nel liquido cefalorachidiano (LCR) sale la concentrazione di alcuni aminoacidi come la Glutamina, la Glicina e la Treonina, l'Alanina, la Fenilalanina e l'Ornitina, mentre sia a livello plasmatico che nel LCR si abbassa marcatamente il rapporto tra aminoacidi ramificati ed aminoacidi aromatici (1, 6, 24).

Discussione

I modelli sperimentali di IEF sopra riportati sono solo alcuni tra i numerosissimi studiati e messi a punto nella vasta letteratura sull'argomento. Tuttavia, quelli da noi scelti risultano di più frequente impiego e per questo sono meglio conosciuti e caratterizzati, in quanto essi si avvicinano maggiormente al cosiddetto modello ideale (2). Ad esempio, l'impiego della D-galattosamina ha permesso lo sviluppo di un valido modello sperimentale, da una parte in virtù del 94% di mortalità globale e dall'altra per la sua potenziale reversibilità che, a causa della selettività del danno epatico indotto, consente il supporto temporaneo della funzione epatica ed il recupero funzionale del fegato intossicato attraverso la sua rigenerazione (6). Infatti, come già ricordato, l'intervallo di tempo che separa il momento dell'induzione del danno epatico dall'evento letale, per quanto significativamente variabile, individua una finestra terapeutica sufficiente per mettere in opera tutti i possibili trattamenti e prima ancora per poter verificare, sia clinicamente che da un punto di vista biochimico, l'instaurarsi della IEA (6). Tuttavia il potenziale rischio per coloro che impiegano la D-Galattosamina non può mai essere escluso completamente ed inoltre la sua limitazione d'uso può derivare anche dall'alto costo delle quantità di farmaco da impiegare negli animali di grosse dimensioni (2).

Il coniglio è l'animale di uso più frequente nei modelli sperimentali di IEF e ciò costituisce un altro fattore limitante, soprattutto nel momento della estrapolazione di dati da rapportare all'uomo. Per esempio, la volemia del coniglio, pur consentendo una sufficiente monitoraggio temporale dei vari parametri biochimici in studio (6), potrebbe rivelarsi non idonea per l'impiego di metodiche di trattamento extracorporeo, quali quelle che vengono attualmente studiate come strumento terapeutico temporaneo, in attesa della sostituzione dell'organo irrimediabilmente leso.

Nel tentativo di riprodurre forme di IEF che nelle premesse eziologiche avessero addentellati con la realtà clinica, la chirurgia sperimentale con le varie procedure che vanno dall'animale reso anepatico fino ai diversi tipi di devascularizzazione e di combinazione fra resezione e danno ischemico, ha sviluppato modelli che, come quelli puramente farmacologici, hanno pur sempre dei limiti. Ad esempio, l'animale anepatico ha una indiscutibile riproducibilità, ma nella mancanza di reversibilità dimostra il suo limite ed elemento negativo (2). Infatti, è evidente che nello stato di anepatia l'unica forma di trattamento possibile è costituito dal trapianto di fegato ed inoltre, la condizione anatomica creata è tale che non vi sono cellule epatiche morte perfuse dal torrente circolatorio. Questa condizione, che difficilmente trova riscontro anche in casi di insufficienza epatica post-chirurgica, sembra essere rilevante in quanto è forse dal parenchima epatico necrotico che si ritiene vengano dismesse sostanze che concorrono all'insorgenza dell'edema cerebrale con le caratteristiche proprie degli stadi terminali dell'IEF (19). Inoltre, nell'animale anepatico l'edema cerebrale è di minore entità forse anche in relazione allo stato di ipotermia che si sviluppa in questa situazione (19) ed esso è accompagnato da alterazioni ematochimiche tardive e con una sindrome neurologica che, almeno nei maiali, non sempre raggiunge i gradi più avanzati del coma (2).

L'utilità del modello sperimentale di animale anepatico è stato recentemente rivalutata in seguito ad osservazioni cliniche miranti a ridurre le conseguenze della cosiddetta "toxic liver syndrome". Alcuni ricercatori hanno infatti suggerito l'esecuzione di una epatectomia totale nel momento in cui sia posta la diagnosi di IEF irreversibile e non si abbia la disponibilità immediata di un fegato da trapiantare (25, 26). Il vantaggio teorico derivante dalla rimozione totale del fegato è quello della rimozione di una sorgente endogena di composti tossici, con l'implicita necessità di fornire al malato tutti i supporti terapeutici per prevenire il coma epatico di IV grado (13, 26).

Diverso è il caso dei modelli che basano l'induzione di IEF su vari tipi di resezione chirurgica del parenchima epatico, in quanto essi hanno dimostrato il loro maggior limite nella scarsa riproducibilità. Anche dopo resezione del 90% del fegato, la mortalità osservabile è strettamente dipendente dal tipo di supporto metabolico posto-

peratorio fornito. In questo senso l'ipoglicemia sembra un elemento limitante significativo in quanto la semplice somministrazione di soluzione glucosata può giungere fino ad azzerare la mortalità (27), contro una percentuale di decessi che raggiunge l'82% qualora non venga fornito nessun tipo di supporto metabolico o nutrizionale (20). Oltre a questa ampia variabilità di risultato, un ulteriore limite del modello resettivo deriva dal fatto che nella pratica clinica il ricorso a terapie infusionali di supporto, volte a contrastare gli effetti negativi metabolici più banali, è obbligatorio per il sostegno della funzione epatica. Una ulteriore critica è quella secondo la quale alla mortalità degli animali contribuirebbe in modo significativo la stasi venosa del distretto splancnico secondaria alla drastica riduzione del letto portale, con ripercussioni negative sul circolo venoso intestinale, prima fra tutte la possibilità di infarti venosi (28). Tuttavia, la validità intrinseca di questo modello di insufficienza epatica è quella di contribuire a determinare il valore soglia di resecabilità del parenchima epatico, in tutti i casi di chirurgia demolitiva del fegato.

L'associazione di una demolizione parenchimale ad un danno epatico ischemico, quale quella che si ritrova nei modelli di epatectomia parziale sommata ad una anastomosi porto-cava o ad un clampaggio delle arterie mesenterica e celiaca, ha come scopo non solo quello di superare i limiti dei modelli puramente resettivi ma anche quelli propri dei modelli basati sul solo danno ischemico. Infatti, anche nei modelli puramente ischemici, come già osservato per i modelli resettivi, non vi è omogeneità di risultati in termini di riproducibilità (2, 29, 30). Questi limiti vengono superati anche dalla devascolarizzazione in due stadi in quanto la presenza di uno shunt porto-cavale latero-laterale e la successiva ischemia arteriosa temporanea fanno sì che si sviluppi una necrosi massiva di epatociti non esclusi dalla circolazione, sufficiente a fare insorgere una sindrome da IEF con una riproducibilità ottimale e potenzialmente reversibile anche in animali differenti (21, 28). Queste caratteristiche hanno fatto definire la devascolarizzazione in due stadi un modello soddisfacente di tipo puramente chirurgico (2). Il ricorso all'impiego di modelli misti chirurgico-farmacologici è espressione del tentativo di superare i limiti derivanti dall'impiego del solo tossico o del solo intervento (2). Ma anche nel modello misto, come osservato per i modelli farmacologici puri, è reale il rischio che al decesso dell'animale utilizzato non siano estranei eventuali effetti tossici su altri organi, specialmente polmoni e reni, derivanti dall'impiego del CCl_4 (2). Risulta dunque assai difficile riproporre in un solo modello tutte le caratteristiche di cui idealmente dovrebbe disporre uno strumento di studio esaustivo nel campo della IEF. Infine, per quanto alle diverse metodiche di induzione di IEF possa essere riconosciuta una certa selettività d'organo, le ripercussioni che a cascata si avviano nel resto dell'organismo hanno probabilmente differente valenza biologica nei diversi animali impiegati. In questo senso la biodi-

versità uomo-animale costituisce una ulteriore difficoltà nella attualizzazione dei risultati del lavoro sperimentale. Tuttavia la molteplicità delle cause in grado di portare il fegato ad uno stato di insufficienza funzionale non compatibile con la sopravvivenza, quale appunto verificabile nella pratica clinica, sostiene la necessità di avere strumenti altrettanto diversificati per comprendere ogni possibile meccanismo epatolesivo e giungere a disporre del trattamento correlato. In questo senso la molteplicità dei modelli sperimentali, pur con tutti i limiti ricordati, è uno dei contributi fondamentali offerti dalla ricerca.

Bibliografia

- 1) Hickman R., Alp M.H.: *A predictable pathophysiological model of porcine hepatic failure*. Eur Surg Res, 18:283-292, 1986.
- 2) Terblanche J., Hickman R.: *Animal models of fulminant hepatic failure*. Dig Dis Scie, 36:770-774, 1991.
- 3) Gorini P., Koshikawa H., Falk R.E.: *The stimulating effect of a cytosol extract from regenerating liver on isolated hepatocytes and the positive role of insulin*. It J Surg Sci, 18:201-205, 1988.
- 4) Gorini P.: *Effect of Hepatic Stimulator Substance (HSS) in acute liver failure*. Medicina, 9:191-192, 1989.
- 5) Mullen K.D., Birgisson S., Gacad R.C., Conjeevaram M.: *Animal models of hepatic encephalopathy and hyperammonemia*. In *Hepatic Encephalopathy, Hyperammonemia and Ammonia Toxicity*, Felipe V., Grisolia S. eds., Plenum Press, New York, p. 1-10, 1994.
- 6) Blitzer B.L., Waggoner J.G., Jones A.E., Gralnick H.R. et al.: *A model of fulminant hepatic failure in the rabbit*. Gastroenterology, 74(4):664-671, 1978.
- 7) Traber P.G., Ganger D.R., Blei A.T.: *Brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatitis*. Gastroenterology, 91:1347-1356, 1986.
- 8) Lempinen M., Sayer T., Eiseman B.: *A new technique for preparing totally hepatectomized pigs*. Surgery, 73:463-467, 1973.
- 9) Filippini F., Boggi U., Meacci L., Burchielli S. et al.: *A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices*. Surgery, 125:448-455, 1999.
- 10) Hickman R., Bracher M., Tyler M., Lotz Z., Fourie J.: *Effect of total hepatectomy on coagulation and glucose omeostasis in the pig*. Dig Dis Sci, 37:328-334, 1992.
- 11) James M.F.M., Hickman R., Janicki P., Mets B. et al.: *Early effects of total hepatectomy on haemodynamic state and organ uptake of catecholamines in pigs*. Br J Anaest, 76:713-720, 1996.
- 12) McGrath M., Rozga J., Morsiani E., Demetriou A.A.: *Development and evaluation of a novel anhepatic large animal experimental model*. Surg Forum, 46:419-420, 1995.
- 13) Drapanas T., McMenamy R.H., Adler W.J., Vang J.O.: *Intermediary metabolism following hepatectomy in dogs*. Ann Surg, 162:621-633, 1965.
- 14) Bismuth H., Franco D.: *Technique et résultats de l'hépatectomie totale chez le rat*. Bordeaux Mèd, 10:1823-1826, 1977.

- 15) Azoulay D., Astarcioglu I.A., Lemoine A., Majno P., Bismuth H.: *A new technique of one-stage total hepatectomy in the rat*. Surgery, 121:219-222, 1997.
- 16) Rozga J., Jeppsson B., Bengmark S., Demetriou A.A.: *A simple two-stage technique of total hepatectomy in the rat*. J Surg Res, 52:46-49, 1992.
- 17) Higgins G.M., Anderson R.H.: *Experimental pathology of the liver*. Arch, Pathol, 12:186-195, 1931.
- 18) Minato M., Houssin D., Morin J., Szekely A.M., Bismuth H.: *Surgically induced acute hepatic failure in the rat*. Eur Surg Res, 14:185-191, 1982.
- 19) Olafsson S., Gottstein J., Blei A.T.: *Brain edema and intracranial hypertension in rats after total hepatectomy*. Gastroenterology, 108:1097-1103, 1995.
- 20) Panis Y., Mc Mullan D.M., Edmond J.C.: *Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection*. Surgery, 121:142-149, 1997.
- 21) De Knecht R.J., Groeneweg M., Shalm S.W., Hekking-Weijma I.: *Encephalopathy from acute liver failure and from acute hyperammonemia in the rabbit. A clinical and biochemical study*. Liver, 14:25-31, 1994.
- 22) 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 a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells*. Hepatology, 17:258-265, 1993.
- 23) Cuervas-Mons V., Golitsin A., Cienfuegos J.A., Maganto P., Eroles G., Castillo-Olivares J.L.: *Hepatectomia del 70% y anastomosis porto-cava termino-lateral como modelo experimental de insuficiencia hepatica fulminante*. Rev Esp Enf Ap Digest, 64:389-394, 1983.
- 24) Magee P.N., Path H.C.: *Toxic liver necrosis*. Lab Invest, 15:111-131, 1966.
- 25) Ringe B., Pichlmayr R., Ziegler H., Grosse H., Kuse E., Oldhafer K., Bornscheur A., Gubernatis G.: *Management of severe hepatic trauma by two-stage total hepatectomy and subsequent liver transplantation*. Surgery, 109:792-805, 1991.
- 26) Rozga J., Podesta L., Hoffman A., Morsiani E., Sher L., Woolf G.M., Makowka L., Demetriou A.A.: *Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure*. Lancet, 342:898-899, 1993.
- 27) Gaub J., Iverson J.: *90% partial hepatectomy in rats: a model of reversible liver insufficiency*. Hepatology, 4:492-494, 1984.
- 28) De Groot G.H., Reuvers C.B., Schalm S.W., Boks A.L. et al.: *A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig*. J Surg Res, 42:92-100, 1987.
- 29) Makowka L., Rotstein L.E., Falk R., Falk J.A. et al.: *Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngenic, allogenic and xenogenic hepatocyte transplantations*. Surgery, 88:224-253, 1980.
- 30) Stridbeck H., Lorelius L.E.: *Liver necrosis after hepatic dearterialization in pigs*. Cardiovasc Intervent Radiol, 8:50-53, 1985.

Autore corrispondente:

Dott. Paolo GORINI
Viale IV Novembre, 25
44100 FERRARA
Fax: 0532.894041