

ΙΑΤΡΙΚΗ.— Ήπαρ ή ήπατοκύτταρα; Λειτουργική και Μορφολογική εκτίμηση δύο συστημάτων εξωσωματικής υποστήριξης της ήπατικής λειτουργίας, υπό Γ. Κωστοπαναγιώτου, Α. Παπαλόη, Ν. Ἀρκαδόπουλου, Β. Σμυρνιώτη, Ι. Παπαδημητρίου, Κ. Τούντα, διὰ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Κωνσταντίνου Τούντα*.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἡ ταχέως ἐξελισσόμενη (κεραυνοβόλος) ήπατική ἀνεπάρκεια (ΚΗΑ) παραμένει μετὰ τῶν δυσχερέστερα ἀντιμετωπιζόμενων ἱατρικῶν προβλημάτων σήμε-
ρα καὶ ἀφορᾷ στὴν ταχεῖα καταστροφή τοῦ ήπατικοῦ παρεγχύματος.

Εἶναι γνωστὸ ὅτι τὸ ήπαρ ἀποτελεῖ ἓνα ἀπὸ τὰ πλέον ζωτικὰ ὄργανα γιὰ τὴ διατήρηση τῆς ὁμοιοστασίας τοῦ ὀργανισμοῦ καὶ σοβαρὴ διαταραχὴ τῆς λειτουργίας του προκαλεῖ ἐπίσης σοβαρὴ διαταραχὴ καὶ τῆς λειτουργίας τῶν ἄλλων ὀργανικῶν συστημάτων (ἀναπνευστικοῦ, πεπτικοῦ, κεντρικοῦ νευρικοῦ, αἱμοποιητικοῦ, νεφρικοῦ, καρδιαγγειακοῦ, ἀνοσιακοῦ), μὲ ἀποτέλεσμα τὴν ἐμφάνιση συνδρόμου ὀξείας ἀναπνευστικῆς δυσχέρειας, νεφρικῆς ἀνεπάρκειας, αἱμορραγικῶν ἐπιπλοκῶν, ἐγκεφαλοπάθειας, λοιμώξεων, καρδιαγγειακῶν ἐπιπλοκῶν.

Ἡ συντηρητικὴ ἀντιμετώπιση τῆς ΚΗΑ εἶναι σχετικῶς ἀναποτελεσματικὴ γιὰ μεγάλο ἀριθμὸ ἀσθενῶν. Τοιοῦτοτρόπως, παρὰ τὶς προόδους στὸν τομέα τῆς ἐν-
τατικῆς υποστήριξης τῶν βαρέως πασχόντων ἀσθενῶν, ἡ θνητότητα κυμαίνεται με-
ταξὺ 65 ἕως 95% καὶ 90 ἕως 95% γιὰ ἀσθενεῖς μὲ 40 στάδιο ἐγκεφαλοπάθειας. Ἡ μόνη θεραπευτικὴ λύση παραμένει ἡ ἐπείγουσα μεταμόσχευση τοῦ ήπατος, ἡ ὁποία καὶ μειώνει τὴ θνητότητα σὲ 20-40%. Ὅμως, ὁ περιορισμένος ἀριθμὸς ήπατικῶν μοσχευμάτων καὶ ἡ δυσχέρεια τῆς ἔγκαιρης ἀνεύρεσης τοῦ καταλλήλου μοσχεύμα-
τος, καθιστοῦν τὴν θεραπεία ἐξαιρετικῶς δύσκολη. Τὸ 90% τῶν ἀσθενῶν μὲ ΚΗΑ ἀναπτύσσουν μὴ ἀναστρέψιμη νευρολογικὴ βλάβη, ἀνεπάρκεια ἄλλου ὀργάνου ἐκτὸς τοῦ ήπατος ἢ σηπτικὴ κατάσταση, ἐνῶ ἀναμένουν τὴν πραγματοποιοίηση τῆς ήπατι-
κῆς μεταμόσχευσης.

Ὁ συνδυασμὸς τῆς βαρύτητας τῆς νόσου καὶ τῆς δυσχέρειας ἀνεύρεσης μοσχευ-
μάτων ἐπέβαλαν τὴν ἀνάγκη ἀνάπτυξης συστημάτων προσωρινῆς υποστήριξης τῆς
ήπατικῆς λειτουργίας ὡς «γέφυρας» γιὰ τὴ μεταμόσχευση.

* G. KOSTOPANAGIOTOU, A. PAPALOIS, N. ARKADOPOULOS, B. SMYRNIOTIS, J. PAPADIMITRIOU, C. TOUNTAS, **Liver or hepatocytes? Functional and morphological evaluation of two extracorporeal liver support systems.**

Ἡ ἔρευνα πρὸς αὐτὸ τὸ σκοπὸ ἄρχισε τὴ δεκαετία τοῦ 1950 μὲ τὴν ἐφαρμογὴ αἰμοδιύλησης, αἱμοπροσρόφησης, πλασμαφαίρεσης καὶ διαφόρων ἄλλων τεχνικῶν μὲ πτωχὰ ἀποτελέσματα. Ἡ βελτίωση τῶν σύγχρονων τεχνικῶν ἀπομόνωσης τῶν ἥπατοκυττάρων καὶ μεταμόσχευσής τους, ἡ χρησιμοποίησή τους σὲ ἐξωσωματικὰ κυκλώματα, ἀποτελεῖ τὴ μελλοντικὴ ἀποτελεσματικὴ μέθοδο ὑποστήριξης τῆς ἥπατικῆς λειτουργίας.

Ἡ σημαντικὴ ἔνδεια πτωματικῶν δοτῶν καὶ οἱ ὅλο αὐξανόμενες ἀνάγκες στὴν Ἑλλάδα ὀδήγησαν τὴν ἐρευνητικὴ μας ομάδα στὴν ἀνάπτυξη κυκλώματος ἐξωσωματικῆς ὑποστήριξης τῆς ἥπατικῆς λειτουργίας, ποὺ νὰ μπορεῖ νὰ ἐφαρμοστεῖ σὲ περιπτώσεις:

1. Κεραυνοβόλου ἥπατικῆς ἀνεπάρκειας (ιογενοῦς ἢ τοξικῆς) μέχρις ἀνανήψεως τοῦ φυσικοῦ ἥπατος ἢ ἀνευρέσεως καταλλήλου μοσχεύματος.
2. Πρωτοπαθοῦς μὴ λειτουργίας τοῦ ἥπατικοῦ μοσχεύματος, στὶς περιπτώσεις ποὺ ἔχει πραγματοποιηθεῖ μεταμόσχευση καὶ τὸ μόσχευμα δὲν λειτουργεῖ φυσιολογικά, μέχρι τὴν ἀνεύρεση νέου μοσχεύματος (ἐπαναμεταμόσχευση).
3. Ἐκτεταμένης ἥπατεκτομῆς, μέχρις ἀνανήψεως τοῦ ἐναπομείναντος ἥπατικοῦ ἱστοῦ.
4. Ἐπὶ χρονίας ἥπατικῆς ἀνεπάρκειας, ἐπιπλεγμένης ἀπὸ λοίμωξη ἢ ἐπεισόδιο ἐγκεφαλοπάθειας, μέχρις ἀποτελεσματικῆς ἀντιμετώπισεως τῆς ἐπιπλοκῆς.

Σκοπὸς τοῦ παρόντος ἐρευνητικοῦ πειραματικοῦ πρωτοκόλλου εἶναι ἡ ἔπειτα ἀπὸ ἀνάπτυξη ὅζειας ἥπατικῆς ἀνεπάρκειας ἐφαρμογὴ ἐξωσωματικῆς ὑποστήριξης τῆς ἥπατικῆς λειτουργίας μὲ δύο διαφορετικὲς μεθόδους: 1) μὲ χρῆση ὀλικοῦ ἥπατος καὶ 2) ἀπομονωμένων ἥπατοκυττάρων, ἡ λειτουργικὴ καὶ μορφολογικὴ μελέτη καὶ ἀξιολόγηση τῶν δύο αὐτῶν συστημάτων.

Ὁμάδα Ἐφαρμογῆς Κυκλώματος Ἐξωσωματικῆς Ὑποστήριξης τῆς Ἡπατικῆς Λειτουργίας (Κ.Ε.Υ.Η.Λ.) μὲ χρῆση Ὀλοκλήρου τοῦ ἥπατος.

Ὑλικὸ καὶ Μέθοδος

Πειραματόζωα (ἀναισθησία καὶ παρακολούθηση πειραματοζώων): Δέκα χοῖροι μέσου σωματικοῦ βάρους 25-35 kg ἀπαιτήθηκαν γιὰ τὴ μελέτη, ἡ ὁποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα μὲ τὶς διεθνεῖς δεοντολογικὲς ἀρχές ποὺ διέπουν τὴν πειραματικὴ ἔρευνα. Μετὰ ἀπὸ 24ωρη στέρηση τροφῆς, χορηγήθηκαν ἐνδομυϊκῶς 10 mg/kg κεταμίνης καὶ 0,5 mg/kg διαζεπάμης. Τὸ παραπάνω προαναισθητικὸ σχῆμα ἐπέτρεψε τὴν

μετά παρέλευση είκοσαλέπτου τοποθέτηση φλεβοκαθετήρα 22 G σὲ φλέβα τοῦ ὠτός. Φάρμακο εἰσαγωγῆς στὴν ἀναισθησία ἦταν ἡ νατριούχος θειοπεντάλη σὲ δόση 5 mg/kg ἢ ὁποία συνεχίστηκε καὶ ἔπειτα ἀπὸ διασωλήνωση τῆς τραχείας σὲ δόση 1 mg/kg/h γιὰ διατήρηση. Ἀναλγησία ἐξασφαλίστηκε μὲ φαντανύλη 5 γ/kg/h καὶ μυοχάλαση μὲ πανκουρόνιο σὲ δόση 0,1 mg/kg ἀρχικὰ καὶ στὴ συνέχεια σὲ 0,3 mg/kg/h. Ὁ ἀρτισμὸς γινόταν σὲ μεῖγμα ὀξυγόνου-ἀέρα ($\text{FiO}_2 = 60\%$) καὶ τὴν προσθήκη ἰσοφλουρανίου σὲ πυκνότητες 0,8 - 1,5%. Ὁ ἀναπνεόμενος ὄγκος ἦταν 15 ml/kg καὶ ἡ ἀναπνευστικὴ συχνότητα περίπου 20/min ὥστε νὰ διατηρεῖται τὸ τελεοεκπνευστικὸ CO_2 σὲ ἐπίπεδα περίπου 30 mmHg. Στὴν οὐροδόχο κύστη τοποθετήθηκε οὐροκαθετήρας, ἐνῶ φλεβοκαθετήρας εὐρέος ἀλλοῦ (6 Fr) τοποθετήθηκε στὴ δεξιὰ μηριαία φλέβα γιὰ χορήγηση ὑγρῶν καὶ φαρμάκων. Στὴν ἀριστερὴ καρωτίδα ἀρτηρία τοποθετήθηκε ἀρτηριακὸς καθετήρας μέσω τοῦ ὁποίου ἔγινε ἡ εἰσαγωγή τοῦ ἐνδοαρτηριακοῦ σένσορα συνεχοῦς καταγραφῆς ἀερίων αἵματος. Τὸν καθετηριασμὸ τῆς ἀριστερῆς ἔσω σφαγίτιδας φλέβας ἀκολούθησε ἡ εἰσαγωγή καθετήρα τύπου Swan-Ganz γιὰ μέτρηση πιέσεων καρδιακῆς πλήρωσης (δεξιῶν κόλπου, πνευμονικῆς ἀρτηρίας/τριχοειδῶν) καὶ καρδιακῆς παροχῆς μὲ τὴ μέθοδο τῆς θερμοραϊώσεως. Τοποθετήθηκε θερμόμετρο ὀρθοῦ, παλμικὸ ὀξύμετρο, ἐνῶ γινόταν συνεχῆς ἀπεικόνιση ἡλεκτροκαρδιογραφήματος καὶ καρδιακῆς συχνότητος. Στρώμα θερμάνσεως διατηροῦσε τὴ θερμοκρασία τοῦ πειραματοζώου σὲ ἀποδεκτὰ πλαίσια καθ' ὅλη τὴ διάρκεια τοῦ πειράματος, ἐνῶ συνεχῆς ἀπεικόνιση τοῦ κορσεμοῦ τοῦ μεικτοῦ φλεβικοῦ αἵματος (S v O_2) ἐξασφαλίστηκε μὲ τὴ μέθοδο τῆς ὀξύμετρίας.

Χειρουργικὴ τεχνικὴ: Μετὰ τὴν ἐγκατάσταση ὅλων τῶν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε διάνοιξη τοῦ κοιλιακοῦ τοιχώματος μὲ ἐπιμήκη τομὴ καὶ στὴ συνέχεια ἐκτροπὴ τῆς προσαγωγῶν αἱμάτωσης τοῦ ἥπατος (τελικοπλάγια πυλαιοκοιλικὴ ἀναστόμωση καὶ ἀπολίνωση τῆς ἥπατικῆς ἀρτηρίας). Ἐντὸς ὥρου περίπου ἀπὸ τῆς ἀπαγγειώσεως τοῦ ἥπατος τὰ βιοχημικὰ καὶ αἱματολογικὰ στοιχεῖα τῆς ὀξείας ἥπατικῆς ἀνεπάρκειας ἦταν πλέον ἔκδηλα (AST, INR), ἐνῶ μετὰ τὴν παρέλευση ὥρου τὰ πειραματόζωα κατανεμήθηκαν τυχαῖα σὲ δύο ὁμάδες.

Ὅμαδες καὶ σύνδεση κυκλώματος: ὁμάδα I ($n = 5$): μὲ συνέχιση τῆς αἱμοδυναμικῆς καὶ μεταβολικῆς παρακολούθησης καὶ ἐνδοφλέβια χορήγηση διαλύματος γλυκόζης μὲ σκοπὸ τὴ διατήρηση τοῦ σακχάρου τοῦ αἵματος $> 70 \text{ mg/dl}$. Ἡ ὁμάδα II ($n = 5$): ὅπως καὶ στὴν ὁμάδα I καὶ ἐπιπλέον ἐφαρμογὴ τῆς ἐξωσωματικῆς υποστήριξης τῆς ἥπατικῆς λειτουργίας (E.Y.H.A.) ὡς ἑξῆς: ἀπομονωμένο ἥπατικὸ

μόσχευμα (τὸ ὁποῖο ἔχει ληφθεῖ με̐ ἐνιαία χειρουργικὴ τεχνικὴ ἀπὸ δότῃ χοῖρο μέσου βάρους σώματος 20-25 kg) τοποθετεῖται σὲ εἰδικὸ κυτίο με̐ ἐλεγχόμενες συνθῆκες θερμοκρασίας καὶ ὑγρασίας καὶ κάνουλες στὴν πυλαία φλέβα, τὴν ὑπερηπατικὴ κάτω κοίλῃ καὶ τὸ χοληδόχο πόρο. Ἀκολουθῶς συνδέεται ἡ δεξιὰ καρωτίδα τοῦ λήπτη με̐ τὴν πυλαία φλέβα τοῦ μοσχεύματος τροφοδοτώντας το με̐ αἷμα τὸ ὁποῖο ἀπάγεται ἀπὸ τὴν ὑπερηπατικὴ κάτω κοίλῃ φλέβα τοῦ μοσχεύματος, καταλήγει σὲ δεξαμενὴ καρδιοτομῆς ὅπου θερμαίνεται καὶ ἡπαρινίζεται καὶ στὴ συνέχεια μέσω φυγόκεντρης ἀντλίας καταλήγει στὴ δεξιὰ ἔσω σφαγίτιδα φλέβα τοῦ χοίρου. Σὲ περίπτωση πα-ράκαμψης τοῦ πειραματοζώου, ἡ ὀξυγόνωση τοῦ μοσχεύματος διατηροῦνταν με̐ ὀξυ-γονωτὴ μεμβράνης. Ὁ ὀλικὸς ἔξωσωματικὸς ὄγκος τοῦ κυκλώματος ἦταν 600 ml, ἡ θερμοκρασία 38°C, ἡ πίεση τῆς πυλαίας διατηρήθηκε στὰ 16 (12-20) mmHg, ἐνῶ ἡ ροὴ ἦταν 0,5 - 0,7 ml/g ἡπατικοῦ ἱστοῦ/min. Σὲ τακτὰ χρονικὰ διαστήματα με-τροῦνταν τὰ ἐπίπεδα ALB, ALT, AST, γ-GT, PT, ACT, παράγοντες I, V, VIII, σάκχαρο, γαλακτικό, ἡλεκτρολύτες, ἀπόδοση καὶ κατανάλωση ὀξυγόνου. Μετὰ 6ωρο E.Y.H.A λαμβανόταν βιοψία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ἀπὸ τὴ μελέτη τῶν αἰμοδυναμικῶν παραμέτρων προέκυψε στατιστικῶς ση-μαντικὴ πτώση τοῦ κορεσμοῦ τοῦ μεικτοῦ φλεβικοῦ αἵματος ($S \bar{v} O_2$) μετὰ τὴ σύν-δεση τῶν πειραματοζώων με̐ τὸ κύκλωμα ἔξωσωματικῆς ὑποστήριξης τῆς ἡπατικῆς λειτουργίας, πτώση πού, δεδομένης τῆς μὴ μεταβολῆς τῶν οὐσιωδῶν παραμέτρων πού ἐπηρεάζουν τὸ $S \bar{v} O_2$, δηλαδὴ καρδιακὴ παροχή, αἰμοσφαιρίνης καὶ κορεσμοῦ τοῦ ἀρτηριακοῦ αἵματος σὲ ὀξυγόνο, ἀποδίδεται σὲ αὐξηση τῆς κατανάλωσης O_2 , γεγονὸς πού ἐπιβεβαιώθηκε καὶ ἀπὸ τοὺς ὑπολογισμοὺς μας. Ἡ αὐξηση αὐτὴ τῆς κατανάλωσης ὀξυγόνου καταδεικνύει λειτουργικὴ ἱκανότητα τοῦ ἀπομονωμένου μο-σχεύματος, τουλάχιστον ὅσον ἀφορᾷ τὴν παράμετρο ἀπόληψης ὀξυγόνου, πράγμα πού εἶχε ἐπιβεβαιωθεῖ καὶ σὲ παλαιότερη ἐργασία μας πού ἀφοροῦσε τὴ λειτουργικὴ καὶ μορφολογικὴ μελέτη ἀπομονωμένου ἡπατικοῦ μοσχεύματος. Ἀντίθετα ἡ πτώση τῆς μέσης ἀρτηριακῆς πίεσης με̐ συνοδὸ αὐξηση τῆς μέσης πνευμονικῆς πίεσης καὶ πίεση ἐνσφῆνωσης τῶν πνευμονικῶν τριχοειδῶν μετὰ τὴ σύνδεση τοῦ πειραματοζώου με̐ τὸ κύκλωμα E.Y.H.A. ὑποδηλώνει ἐπιβάρυνση τῆς καρδιακῆς τους λειτουργίας πιθανῶς λόγω κυκλοφορουσῶν τοξινῶν ἀπὸ τὸν ἱσχαιμικὸ ἡπατικὸ ἱστὸ ἢ τὸ μεγάλο ὄγκο τοῦ κυκλώματος (Πίνακας I).

Ἡ μελέτη τῶν βιοχημικῶν καὶ αἱματολογικῶν μεταβλητῶν κατέδειξε ἐπιβά-

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι
ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

x ± SD	MAP (mmHg)	PAP (mmHg)	PCWP (mmHg)	CO (lit.min ⁻¹)
A. ΟΛΙΚΟ ΗΠΑΡ				
Έναρξη ΕΥΗΛ ↓	106,5 ± 27,00	22,83 ± 3,25	13,00 ± 3,16	5,22 ± 1,07
Τέλος ΕΥΗΛ	66,0 ± 26,05*	43,33 ± 7,77*	18,33 ± 3,51*	2,04 ± 0,62*
B. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ				
Έναρξη ΕΥΗΛ ↓	108,0 ± 30,0	23,50 ± 2,55	12,0 ± 3,20	5,50 ± 2,50
Τέλος ΕΥΗΛ	120,5 ± 25,5*†	25,70 ± 3,50†	14,0 ± 2,51†	3,92 ± 1,07†

Στατιστική ανάλυση: one way ANOVA analysis (*p < 0,05: σύγκριση μεταξύ τιμών έναρξης - τέλους ΕΥΗΛ στην ίδια ομάδα. †p < 0,05: σύγκριση μεταξύ τιμών τέλους Β προς Α ομάδα).

MAP = μέση αρτηριακή πίεση, PAP = πίεση πνευμονικής αρτηρίας, PCWP = πίεση ένσφηνωσης πνευμονικών τριχοειδών, CO = καρδιακή παροχή.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

x ± SD	ALB (g.lit ⁻¹)	AST(SGOT) (IU.lit ⁻¹)	ALT(SGPT) (IU.lit ⁻¹)	NH ₃ (μmol.lit ⁻¹)
A. ΟΛΙΚΟ ΗΠΑΡ				
Έναρξη ΕΥΗΛ ↓	1,16 ± 0,25	1452 ± 310,71	68,22 ± 17,11	310,29 ± 84,5
Τέλος ΕΥΗΛ	0,81 ± 0,18	3041 ± 638,50*	121,5 ± 39,01*	400,00 ± 20,0
B. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ				
Έναρξη ΕΥΗΛ ↓	2,05 ± 0,25	1568,00 ± 144,29	64,25 ± 2,48	308,0 ± 50,5
Τέλος ΕΥΗΛ	3,5 ± 0,89*†	1342,25 ± 73,27*†	73,25 ± 9,54†	250,5 ± 28,3*†

Στατιστική ανάλυση: one way ANOVA analysis (*p < 0,05: σύγκριση μεταξύ τιμών έναρξης-τέλους ΕΥΗΛ στην ίδια ομάδα. †p < 0,05: σύγκριση μεταξύ τιμών τέλους Β προς Α ομάδα).

ρυνση της ήπατικής λειτουργίας και έπηρεασμό της πηκτικότητας, ή όποια ήταν ήδη εκδηλη μετά την παρέλευση δώρου από την έναρξη της ήπατικής ανεπάρκειας και δεν ανεστράφη μετά τρίωρη εφαρμογή του κυκλώματος Ε.Υ.Η.Α. (πιθανώς οί τοξίνες που παράγονται από τον ισχαιμικό ήπατικό ιστό είναι και σ' αυτήν την περίπτωση υπεύθυνες) (Πίνακας ΙΙ). Η παθολογοανατομική εξέταση δειγμάτων (χρώσεις Ήωσίνης - Αίματοξυλίνης και PAS) που ελήφθησαν σε διαφορετικούς χρόνους από την έναρξη λειτουργίας του κυκλώματος, έδειξε, κεντρολογιακή ήπατική νέκρωση με κατεύθυνση από την περιφέρεια του ήπατος προς τó κέντρο, αναλόγως του χρόνου λειτουργίας του κυκλώματος. Αντίθετα οί βιοψίες ήπατος που έγιναν πριν από τή σύνδεση του μοσχεύματος με τó κύκλωμα και μετά τή λήψη του από τó δότη, έπιβεβαίωσαν τήν άρχική μορφολογική του άκεραιότητα.

Όμάδα Έφαρμογής Βιοτεχνητού Ήπατος (Χρήση Ήπατοκυττάρων)

Υλικό και Μέθοδος

α) Πειραματόζωα: 12 χοίροι βάρους 25-35 kg.

β) Όμάδες πειραματικού πρωτοκόλλου:

i) Όμάδα I ($n = 4$): Όμάδα έλέγχου, δηλαδή ανάπτυξη ήπατικής ανεπάρκειας χωρίς περαιτέρω θεραπεία.

ii) Όμάδα δοτών ήπατοκυττάρων ($n = 4$).

iii) Όμάδα II ($n = 4$): Όμάδα έφαρμογής του κυκλώματος έξωσωματικής υποστήριξης (μεμβράνη/φίλτρο βιοτεχνητού ήπατος) μετά τήν ανάπτυξη ήπατικής ανεπάρκειας (8 h). Δύο φίλτρα φορτώθηκαν με Π.Α. Ηκ και δύο με Κρ Ηκ. Επίσης σε κάθε μιá από τίς υποκατηγορίες αυτές δοκιμάστηκαν μικρές και μεγάλες ποσότητες Ηκ ($\cong 10^9$ Π.Α. και Κρ Ηκ καθώς και $\cong 5 \times 10^9$ Π.Α. και Κρ Ηκ).

γ) Πειραματική ανάπτυξη ήπατικής ανεπάρκειας: Τά πειραματόζωα υποβλήθηκαν υπό γενική αναισθησία σε λαπαροτομία και στή συνέχεια έκτελέστηκε πυλαιοκοιλιακή αναστόμωση και απολινώθηκε ή ήπατική άρτηρία. Χορηγήθηκε διάλυμα γλυκόζης για τή διατήρηση του σακχάρου του αίματος > 70 mg/dl.

Π.Α.: Προσφάτως άπομονωθέντα ήπατοκύτταρα.

Κρ.: Κρυσυντηρημένα ήπατοκύτταρα.

δ) Λήψη ήπατικοῦ μοσχεύματος: Οἱ δότες ἥπατος ὑποβλήθηκαν σὲ λαπαροτομή ὑπὸ ἄσηπτες συνθήκες καὶ γενικὴ ἐνδοτραχειακὴ ἀναισθησία (εἰσαγωγή μὲ πεντοβαρβιτόλη, συντήρηση μὲ ἀλλοθάνιο - ὀξυγόνο). Ἐπειτα ἀπὸ τὴ μέση τομή, ἀκολουθοῦσε παρασκευὴ τῶν ἀγγείων τοῦ ἥπατος, ἡπαρίνιση τοῦ πειραματοζώου (15.000 U) καὶ τοποθέτηση ἑνὸς καθετήρα ἐκπλύσεως 14 Fr στὸ περιφερικὸ τμήμα τῆς ἀορτῆς καὶ ἑνὸς 18 Fr στὴν πυλαία φλέβα. Ἀκολουθοῦσε ἀπολίνωση τῆς ὑφίπατικῆς κάτω κοίλης πᾶνω ἀπὸ τὶς νεφρικὲς φλέβες, ἀποκλεισμός τῆς ἀορτῆς ὑποδιαφραγματικὰ καὶ ἐκπλυση in situ τοῦ ἥπατος μὲ 10 lt κρύου (4°C) διαλύματος U.W. (University of Wisconsin). Μετὰ τὴν πλήρη ἐκπλυση τοῦ ἥπατος ἀκολουθοῦσε ἡπατεκτομὴ διατηρώντας τοὺς καθετήρες ἐκπλύσεως στὴ θέση τους καὶ εὐθανασία τοῦ πειραματοζώου μὲ ὑψηλὴ δόση ἀναισθητικοῦ. Ἀκολουθοῦσε συντήρηση σὲ 4°C μὲ διάλυμα U.W. γιὰ 1 h περίπου.

ε) Ἀπομόνωση τῶν ἡπατοκυττάρων: Τὸ ἥπαρ ἐκπλύοταν καὶ μετὰ τὴ συντήρησή του μὲ διάλυμα U.W. Στὴ συνέχεια τοποθετοῦνταν ὁ καθετήρας ἐκπλύσεως στὸν ἀριστερὸ κλάδο τῆς πυλαίας φλέβας καὶ γινόταν ἐκτομὴ τοῦ ἔσω καὶ ἔξω ἀριστεροῦ λοβοῦ ποὺ χρησιμοποιοῦνταν τελικὰ γιὰ τὴν ἀπομόνωση τῶν Ηκ.

Τὰ ἐπόμενα στάδια τῆς ἀπομόνωσης τῶν Ηκ ἀποτελοῦν ἐκτεταμένη τροποποίηση τῆς τεχνικῆς Seglen [5], ποὺ ἔχει πλέον δοκιμαστεῖ κατ' ἐπανάληψιν στὸ Ἐργαστήριό μας. Μέσω τοῦ καθετήρα τῆς πυλαίας φλέβας ἐγχέοταν κρύο (4°C) διάλυμα τοῦ ἐνζύμου τῆς κολλαγενάσης (τύπου V, Sigma C-9263) σὲ συγκέντρωση 1,3 mg/ml. Συνολικὰ ἐγχέονταν 500-600 ml κολλαγενάσης μὲ ρυθμὸ 80-100 ml/min. Μετὰ τὴν ἐγχυση ὁ ἡπατικὸς λοβὸς τοποθετοῦνταν σὲ ἀποστειρωμένο δοχεῖο 1 lit ποὺ περιεῖχε διάλυμα P.B.S. (Phosphate Buffered Saline, Sigma, 1000-3) μὲ pH = 7,4. Τὸ P.B.S. ἀποτελοῦσε καὶ τὸ διαλύτη τῆς κολλαγενάσης. Ἀκολουθοῦσε ἐπώαση τοῦ ἡπατικοῦ λοβοῦ σὲ ὑδατόλουτρο, γιὰ 40 min, ἀπὸ τὴ στιγμή ποὺ ἡ θερμοκρασία ἐντὸς τοῦ δοχείου μετροῦνταν σταθερὰ στοὺς 37°C. Μετὰ τὴν ἐπώαση καὶ τὴ δράση τῆς κολλαγενάσης τὸ παρέγχυμα τοῦ ἥπατος δὲν διατηροῦσε πλέον τὴν ἀρχικὴ του κατασκευή, ἀλλὰ εἶχε τὴ μορφή ἑνὸς ἰδιαίτερα εὐθραυστοῦ ἱστοῦ. Ἀμέσως ἀφαιροῦνταν τὸ ὑπερκείμενο διάλυμα κολλαγενάσης καὶ ὁ ἱστὸς ἐπαναδιαλύοταν σὲ κρύο διάλυμα P.B.S. ὥστε νὰ σταματήσει ἡ δράση τοῦ ἐνζύμου. Ὁ ἱστὸς συντηροῦνταν σὲ κρύες συνθήκες καὶ μικρὰ τμήματά του διαδοχικὰ διηθοῦνταν μέσω ἀποστειρωμένου μεταλλικοῦ φίλτρου μεγέθους πόρων 400 μm. Στὸ φίλτρο συγκρατοῦνταν τὸ δίκτυο τῶν πυλαίων κλάδων, λεμφαδένες, ράμματα καὶ θραύσματα τοῦ ἡπατικοῦ λοβοῦ ποὺ δὲν διασπάστηκαν ἀπὸ τὴ δράση τοῦ ἐνζύμου. Τὸ διήθημα (ἀθροίσματα κυττάρων) ἐπαναδιαλύοταν σὲ κρύο (4°C) διάλυμα Hank's (Sigma H - 4661) ποὺ περιεῖχε καὶ 5% ἐμβρυικὸ ὀρὸ νεογέννητου μοσχαριοῦ (Newborn Calf Serum, NB.C.S.,

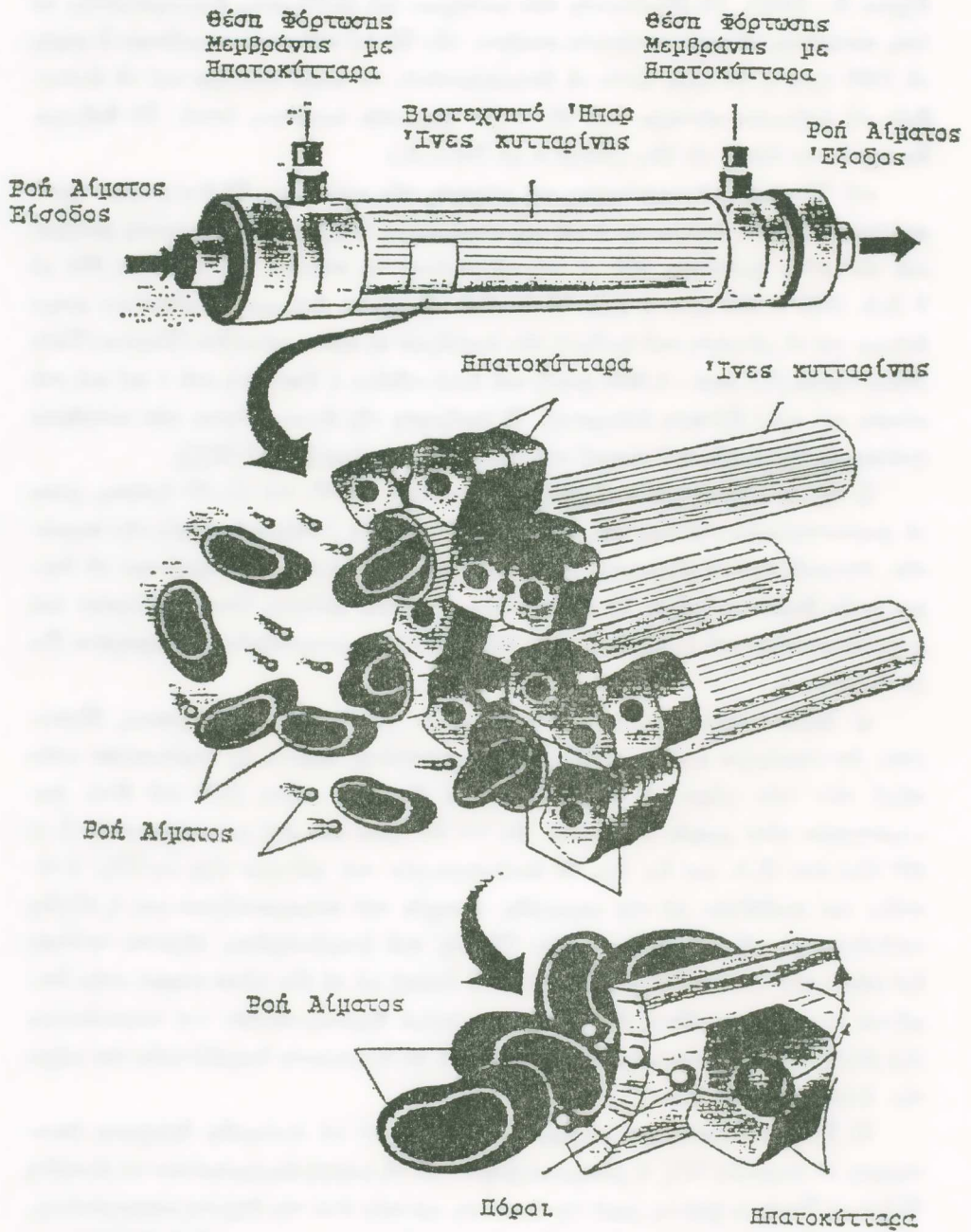
Sigma N - 4637). Τα άθροίσματα των κυττάρων του διηθήματος διαμοιράζονταν σε ίσες ποσότητες σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 ml και φυγοκεντρούνταν 2 φορές σε 1000 rpm \times 10 min, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και να εκπλυθούν τα υπόλοιπα κύτταρα από την τυχόν παρουσία λιπώδους ιστού. Το διάλυμα διατηρούνταν πάντα το ίδιο (Hank's με NB.C.S.).

στ) Έκτίμηση βιωσιμότητας και μέτρηση των κυττάρων: Σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml διαλύονταν 5 ml του ιστού (λήψη δείγματος από όμογενές μείγμα) και απ' αυτά ποσότητα 100 μ l επαναδιαλύονταν σε σωλήνα του 1 ml με 900 μ l P.B.S. (100 + 900 μ l = 1 ml). Από αυτό το τελικό διάλυμα, λαμβανόταν μικρό δείγμα για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε ειδικό πλακίδιο (Thoma/Tiefe /Fein Optik/0,1 mm - 1/400 mm²) και ακολουθοῦσε ή άναγωγή στο 1 ml και στο σύνολο του προς εξέταση δείγματος. Η έκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων γινόταν με δοκιμασία του κυανού του τρυπανίου (trypan blue 0,02%).

ζ) Κρυοσυντήρηση Ηκ: Διατηρήθηκαν στους -20°C για 15-20 ημέρες, μέσα σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 ml (10-15 ml Ηκ / σωλήνα), χωρίς την παρουσία όποιουδήποτε διαλύματος. Κατά το χρόνο χρήσης τους, διατηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να αποτελέσουν όμογενές μείγμα, επαναδιαλύονταν και φυγοκεντρούνταν στα 1100 rpm \times 15 min για να απομακρυνθούν τα νεκρωμένα Ηκ (υπερκείμενο).

η) Έξωσωματικό φίλτρο ήπατοκυττάρων: Το φίλτρο αυτό (Zymax, Microgon) αποτελούμενο από κυλινδρικές ίνες κυτταρίνης (εικόνα 1) φορτωνόταν στον περίξ των ίνων χώρο με τα απομονωμένα Ηκ του χοίρου (110 ml Ηκ). Δοκιμάστηκαν τόσο μικρές ποσότητες Ηκ (= 10⁹ Ηκ) όσο και μεγαλύτερες (= 5 \times 10⁹ Ηκ) από Π.Α. και Κρ Ηκ. Η συνδεσμολογία του φίλτρου είχε ως εξής: ή είσοδός του συνδεόταν με την καρωτίδα αρτηρία του πειραματοζώου και ή έξοδος συνδεόταν με τη σφαγίτιδα φλέβα. Η ροή του ήπαρινισμένου αίματος γινόταν διά μέσου των ίνων και το αίμα έρχόταν σε έπαφή με τα Ηκ μέσω πόρων στην επιφάνεια των ίνων μεγέθους 0,2 μ . Στο κύκλωμα δημιουργούνταν και παρακάμψεις (by pass), ώστε να παρακάμπτεται το φίλτρο σε περίπτωση θρομβώσεως του μέχρι την αντικατάστασή του.

θ) Παθολογοανατομικά εύρήματα: Ελήφθησαν τα ακόλουθα δείγματα (συντήρηση σε φορμόλη 10% ή μονιμοποιήθηκαν με τη μορφή επιχρισμάτων σε αλκοόλη 95%): α) Τεμάχια ήπατος μετά την έκπλυση και πριν από την έγχυση κολλαγενάσης, β) Π.Α. Ηκ, γ) Κρ Ηκ, δ) Π.Α. Ηκ (3h και 6h λειτουργίας του Κ.Ε.Υ.Η.Α.) και ε) Κρ Ηκ (3h και 6h λειτουργίας του Κ.Ε.Υ.Η.Α.). Έγινε χρώση αίματοξυλίνης - ήωσίνης (Α.Η.).



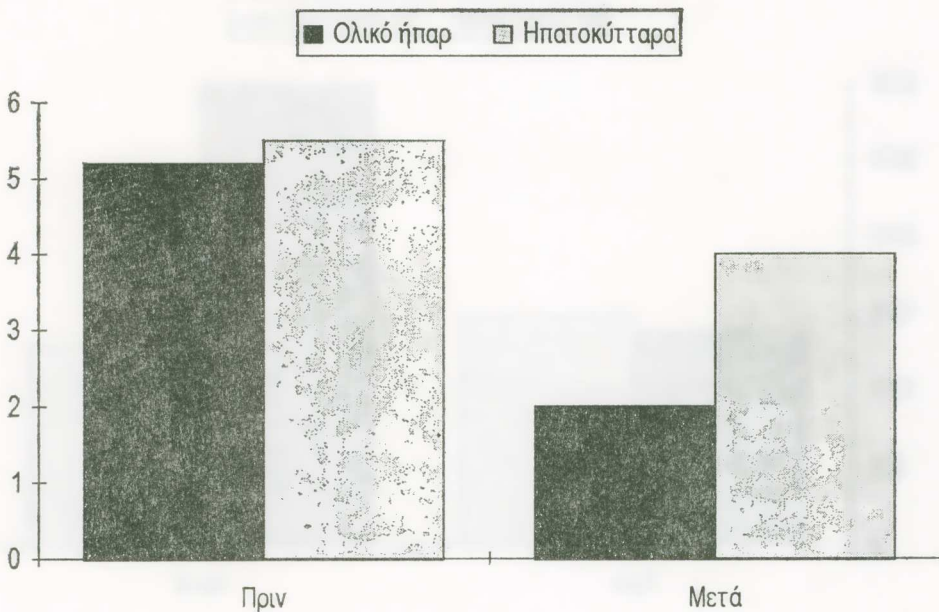
Εικόνα 1. Δομή βιοαντιδραστήρα (μεμβράνης φίλτρου) ήπατοκυττάρων και τρόπος έπαφής ήπατοκυττάρων με αίμα άσθενους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στο σχεδιασμό του πειραματικού πρωτοκόλλου, τόσο τα Π.Α. Ηκ όσο και τα Κρ εξετάστηκαν παθολογοανατομικώς πριν από τη χρήση τους στη μεμβράνη βιοτεχνητού ήπατος. Αποδείχτηκε με τη δοκιμασία του κυανοϋ του τρυπανίου όσο και με χρώση αίματοξυλίνης-ήωσίνης ότι για τα Κρ Ηκ υπάρχουν άπω-

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Καρδιακή παροχή (lit/min)

 $p < 0,05$ 

Διάγραμμα 1. Μεταβολές της καρδιακής παροχής πριν και μετά την εξωσωματική υποστήριξη της ηπατικής λειτουργίας με όλικό ήπαρ και ήπατοκύτταρα.

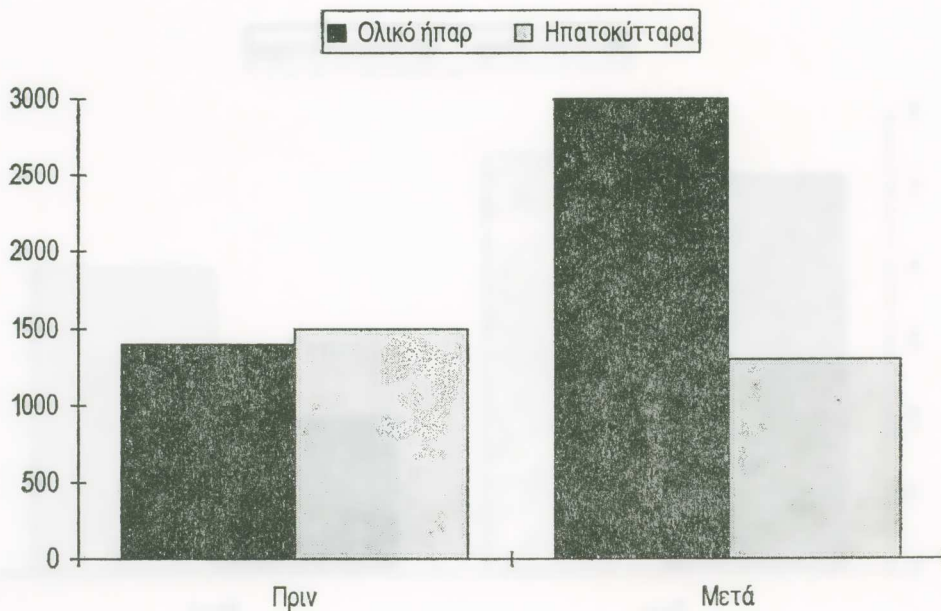
λειες της τάξης του 20-30% (νεκρά κύτταρα). Όμως, με κατάλληλη φυγοκέντρωση των κυττάρων αυτών, τα νεκρά κύτταρα απομακρύνονται, με αποτέλεσμα τα Ηκ που τελικά χρησιμοποιούνται στο βιοτεχνητό ήπαρ (Β.Η.) να είναι εξίσου ζωτικά με τα Π.Α. (> 90%). Επίσης πριν από τη χρήση τους στο φίλτρο Β.Η., τόσο τα Κρ όσο και τα Π.Α. Ηκ, διατηρούν τη μορφολογική τους ακεραιότητα. Χαρακτηριστικό επίσης

των Π.Α. Ηκ είναι ή εμφάνισή τους ως μονήρων κυττάρων ή σέ πολύ μικρά άθροίσματα κυττάρων. Άντιθέτως τά Κρ Ηκ, λόγω τής συντήρησής τους σέ χαμηλή θερμοκρασία, εμφανίζονται στά επιχρίσματα ως άθροίσματα σαφώς περισσοτέρων κυττάρων άπ' ό,τι τά Π.Α. Οί βιοχημικές καί αίμοδυναμικές μετρήσεις στήν ομάδα έλέγχου, 8 h μετά τή χειρουργική επέμβαση για τήν ανάπτυξη ήπατικής ανεπάρκειας,

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

SGOT (IU/lit)

$p < 0,05$



Διάγραμμα 2. Μεταβολές τής SGOT πριν καί μετά τήν έξωσωματική ύποστήριξη τής ήπατικής λειτουργίας μέ όλικό ήπαρ καί ήπατοκύτταρα.

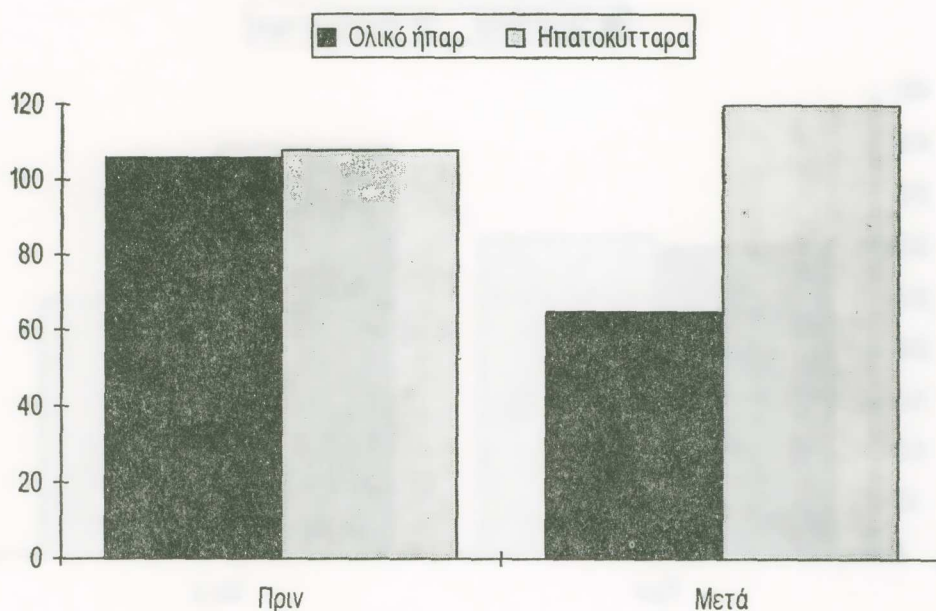
εμφάνισαν τīs τιμές που άναφέρονται στους πίνακες I καί II καί στά διαγράμματα 1, 2, 3, 4. Άντιθέτως, μετά τήν έφαρμογή του Κ.Ε.Υ.Η.Α., μέ χρήση βιοτεχνητού ήπατος, οί δείκτες αύτοι βελτιώθηκαν, ήταν όμως σαφής ή ανάγκη για τήν πάροδο ένός χρονικού διαστήματος μεγαλύτερου των 6 h από τήν ώρα έφαρμογής του Β.Η., χρόνο στόν όποίο τó κύκλωμα σταθεροποιεΐται κατά κύριο λόγο αίμοδυναμι-

κώς. Στους χρόνους των 3 και των 6 h μετά την εφαρμογή του Β.Η. εξετάστηκαν παθολογοανατομικώς τὰ Ηκ. Διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των Ηκ σχετίζεται με τὴ βελτίωση τῆς γενικῆς κατάστασης τοῦ πειραματοζώου. Ἀντιθέτως τὰ παθολογοανατομικὰ εὐρήματα ἔδειξαν ὅτι εἶναι ἀνεξάρτητα τοῦ ἀριθμοῦ των Ηκ. Διαπιστώθηκε δηλαδή ὅτι ἀνεξαρτήτως τοῦ ἂν τὸ Β.Η. φέρει μεγάλο (5×10^9) ἢ μικρό

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Μέση ἀρτηριακὴ πίεση (mmHg)

$p < 0,85$



Διάγραμμα 3. Μεταβολὲς τῆς μέσης ἀρτηριακῆς πίεσης πρὶν καὶ μετὰ τὴν ἐξωσωματικὴ ὑποστήριξη τῆς ἡπατικῆς λειτουργίας με ὅλοιο ἥπαρ καὶ ἀπομονωμένα ἡπατοκύτταρα.

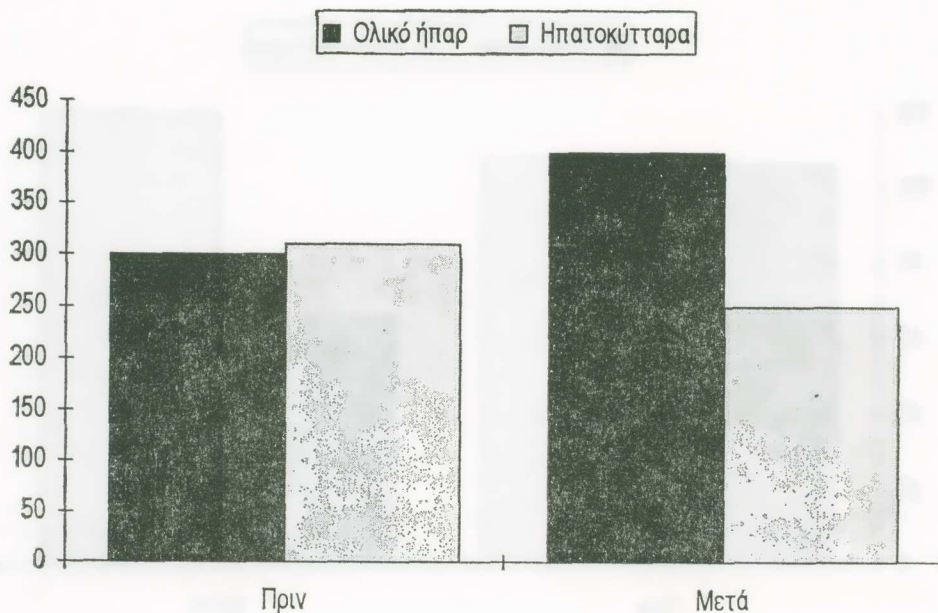
ἀριθμὸ Ηκ (10^9), κατὰ τὴν ἐξέταση τῶν ἐπιχρισμάτων παρουσιάζονται παρόμοια ἀποτελέσματα. Παρατηρήθηκαν μεταβολὲς στὴ μορφολογία τῶν κυττάρων καθὼς καὶ ἀσάφεια τῆς κυτταρικῆς μεμβράνης, ἀναλόγως ὅμως τοῦ χρόνου λειτουργίας τοῦ Κ.Ε.Υ.Η.Λ. Οἱ μεταβολὲς αὐτὲς ἀποδίδονται κυρίως στὴν ἐπαφὴ τῶν κυττάρων με τὶς ἴνες κυτταρίνης καθὼς καὶ στὴ νέα λειτουργικὴ τους διάταξη (ὁμοιόμορφη

κατανομή γύρω από τις ίνες) που ενώ ασφαλώς τὰ φέρνει σὲ ἐπαφή μὲ τὸ αἷμα, ὡστόσο ἡ διάταξη αὐτὴ δὲν «μιμεῖται» τὴ φυσικὴ τους ἱστολογικὴ διάταξη. Στὶς 3 καὶ στὶς 6 h μετὰ τὴ λειτουργία τοῦ Β.Η., τὰ Π.Α. Ηκ ἐμφανίζονται καὶ πάλι ὡς μονήρη κύτταρα ἢ σὲ μικρὰ ἀθροίσματα. Ἀντιθέτως τὰ Κρ Ηκ ἐξακολουθοῦν νὰ συγκροτοῦν μεγάλα ἀθροίσματα κυττάρων.

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ἀμμωνία (μmol/lit)

$p < 0,05$



Διάγραμμα 4. Μεταβολὲς τῆς ἀμμωνίας αἵματος πρὶν καὶ μετὰ τὴν ἐξωσωματικὴ ὑποστήριξη τῆς ἡπατικῆς λειτουργίας μὲ ὀλικὸ ἥπαρ καὶ ἡπατοκύτταρα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τὰ τελευταῖα χρόνια ἡ βιοτεχνολογία πρόσφερε ἀρκετὰ συστήματα μὲ ιδιότητες χρήσιμες γιὰ κλινικὴ ἐφαρμογὴ [1, 6]. Ἀπὸ τὴν τεχνογνωσία αὐτὴ προέρχονται καὶ οἱ συσκευὲς ποὺ χρησιμοποιοῦνται γιὰ τὴν ἐξωσωματικὴ ὑποστήριξη τῆς ἡπα-

τικής λειτουργίας σέ ήπατικές ανεπάρκειες. Τὰ συστήματα αὐτὰ παρουσιάζουν ὀρι-
σμένα χαρακτηριστικά πού ἀποτελοῦν ταυτόχρονα καί πλεονεκτήματά τους:

1. Ὑποστηρίζουν ἐπαρκῶς τὴν ἥπατική λειτουργία μέχρι τὴν ἀνεύρεση καταλ-
λήλου μοσχεύματος.

2. Προσφέρουν τὴ δυνατότητα χρήσης ἥπατοκυττάρων ἀπὸ ἄλλα θηλαστικά
(χοῖρος).

3. Προσφέρουν τὴ δυνατότητα τὸ ἥπαρ ἑνὸς δότη ἥπατοκυττάρων νὰ ἐπαρκεῖ
γιά 2 ἢ καί γιά 3 λήπτες, καθὼς καί δυνατότητα συντήρησης τῶν κυττάρων.

4. Τὰ κύτταρα, ὅταν αὐτὸ κρίνεται ἀπαραίτητο, ἀνανεώνονται ταυτοχρόνως μὲ
τὴ μεμβράνη τοῦ B.H., μέσω παρακαμπτηρίων γραμμῶν.

5. Παρέχουν τὴ δυνατότητα ἀπομόνωσης τῶν ἥπατοκυττάρων ἀπὸ τὸ ἀνοσο-
λογικὸ σύστημα τοῦ λήπτη (immunoisolation).

6. Οἱ μεμβράνες ἀλλάζουν τὴ μορφολογία τῶν κυττάρων, ἀλλὰ δὲν προκαλοῦν
βλάβες στὰ κύτταρα.

7. Προσφέρουν τὴ δυνατότητα διορθωτικῶν χειρισμῶν σέ ἐπιμέρους τμήματα
τοῦ κυκλώματος, ἀν αὐτὸ κριθεῖ ἀναγκαῖο.

8. Ὑποστηρίζονται πολὺ καλύτερα οἱ περιπτώσεις ἐκείνων τῶν ἀσθενῶν πού
μπορεῖ ἡ ἥπατική ἀνεπάρκεια νὰ ὑποχωρήσει μετὰ ἀπὸ ἀναγέννηση τοῦ πάσχοντος
ἥπατος. Στὰ παραπάνω συστήματα γίνεται χρῆση ἀπομονωμένων ἥπατοκυττάρων
τὰ ὁποῖα λαμβάνονται ἀπὸ δότες χοίρους μὲ διαφορετικούς τρόπους ἀπομόνωσης.
Ἀπὸ ἀντίστοιχη ἐμπειρία τοῦ Ἐργαστηρίου μας ἔχουμε ἀναπτύξει μιὰ δοκιμασιμέ-
νη καί ἐλεγμένη μέθοδο ἀπομόνωσης [7, 8]. Στὴ διεθνή βιβλιογραφία ἐμφανίζονται
δύο μεγάλα κέντρα μὲ πειραματική καί κλινική ἐμπειρία στὴ χρῆση τῶν συστημάτων
αὐτῶν. Τὸ πρῶτο εἶναι τὸ Cedars - Sinai Medical Center, στὸ Los Angeles τῶν
Η.Π.Α. [1] καί τὸ δεύτερο στὸ Πανεπιστήμιο τῆς Minnesota καί πάλι στίς Η.Π.Α.
[9]. Ἀπὸ τὴν κλινική ἐμπειρία τῶν κέντρων αὐτῶν ἔχουν καταγραφεῖ μὲ λεπτομέ-
ρειες, πρὸς τὸ παρόν, τὰ ἀποτελέσματα μόνο τοῦ πρώτου (ὡς παλαιότερο κέντρο).
Στὰ 9 πρῶτα περιστατικά, οἱ 7 ἀσθενεῖς ἐπέζησαν σὲ B.H. (2 ἢ καί 3 συνεδρίες σὲ
διαφορετικούς χρόνους) ἕως ὅτου μεταμοσχεύθηκαν, ἓνας πέθανε καί ἓνας θεραπεύ-
τηκε ἀπὸ τὴ χρῆση B.H. ἀλλὰ χρειάστηκε μεταμόσχευση 6 μῆνες ἀργότερα. Ἀπὸ
τὴ μικρὴ αὐτὴ προκαταρκτικὴ ἐμπειρία, εἶναι φανερό, ὅχι μόνο ἡ σημασία τῆς χρή-
σης B.H. μέχρι τὴν ἀνεύρεση καταλλήλου μοσχεύματος, ἀλλὰ καί ἡ πραγματικὴ συμ-
βολή του στὴν ὑποστήριξη τῆς ἥπατικής λειτουργίας. Παράλληλα ὅμως γίνεται ἐπι-
τακτικὴ καί ἡ ἀνάγκη γιά περαιτέρω πειραματικὴ ἔρευνα στὸν τομέα αὐτὸ πού μὲ τὴ
σειρά τῆς παραπέμπει στὴ δημιουργία ἀντίστοιχων ἀπλῶν πειραματικῶν διατάξεων.
Πρὸς τὴν κατεύθυνση αὐτὴ κινήθηκε καί τὸ ἐρευνητικὸ ἐνδιαφέρον τοῦ Ἐργαστηρίου

μας, πού με έδαφος τήν έμπειρία από τις πειραματικές μεταμοσχεύσεις ήπατος, αλλά και τήν ανάπτυξη Κ.Ε.Υ.Η.Α. [2, 3, 4] με τή χρήση όλοκλήρου του ήπατικού μοσχεύματος, προχώρησε στο σχεδιασμό τής πειραματικής διάταξης πού περιγράφτηκε στην παρούσα έργασία.

Γιά τò σκέλος τής έργασίας πού άφορᾷ στην τεχνική ανάπτυξης τής ήπατικής ανεπάρκειας, προτιμήθηκε τελικῶς ή χειρουργική μέθοδος έναντι τής χημικῆς πού χρησιμοποιεῖται με έπιτυχία σέ έπίμυες (νιτροδοαμίνης, D-γαλακτοζαμίνης κ.ᾶ.), γιά τò λόγο ὅτι ὁ χῶρος ὡς πειραματόζωο δέν άνέχτηκε τή χρήση τῶν οὐσιῶν αὐτῶν. Γιά τò καθ' έαυτò σκέλος τής έργασίας, πού άφορᾷ στην έφαρμογή Κ.Ε.Υ.Η.Α. με χρήση άπομονωμένων Ηκ και βιοσυμβατῆς μεμβράνης γιά τήν έγκατάστασή τους, συνοπτικά παρατηρήσαμε τὰ άκόλουθα:

1. Σημαντικότερο ρόλο στην καλή λειτουργία του κυκλώματος διαδραματίζει προφανῶς ή ποιότητα τῶν άπομονωμένων Ηκ (βιωσιμότητα, μορφολογική άκεραιότητα). 'Η ποιότητα αὐτή πηγάζει ὄχι μόνο από τήν τεχνική άπομόνωσης αλλά πιό πρίν, κατά τήν τεχνική λήψης του μοσχεύματος.

2. Όπως διαπιστώσαμε και στα προηγούμενα πειράματα, ὅπου χρησιμοποιήθηκε ὀλόκληρο τò ήπατικό μόσχευμα σέ Κ.Ε.Υ.Η.Α., απαιτεῖται και πάλι ένας χρόνος αἰμοδυναμικῆς σταθεροποίησης του κυκλώματος. Στο χρόνο αὐτò ὀφείλονται μέρος τῶν παθολογοανατομικῶν μας εύρημάτων και γιά τò λόγο αὐτò στη μελέτη μας έπικεντρωθήκαμε σέ πρώτη φάση στίς 3 και στίς 6 h λειτουργίας του Β.Η.

3. 'Υπάρχει άσφαλής τρόπος νά παρακολουθοῦνται παθολογοανατομικῶς τὰ Ηκ κατά τή διάρκεια λειτουργίας του συστήματος, με κατάλληλη τεχνική λήψης δειγμάτων από τις θέσεις φόρτωσης τῶν κυττάρων.

4. Σέ περίπτωση πού διαπιστωθεῖ σοβαρή βλάβη τῶν κυττάρων, τò Β.Η. άντι-καθίσταται μέσω παρακαμπτηρίων γραμμῶν.

5. 'Η περιγραφείσα διάταξη ύποστήριξε τò πειραματόζωο, αλλά απαιτεῖται περαιτέρω πειραματική διερεύνηση πολλῶν παραμέτρων πού άφοροῦν στη λειτουργία του κυκλώματος αὐτοῦ (άριθμός κυττάρων, αἰμοδυναμική παρακολούθηση του πειραματοζώου κ.ᾶ.).

6. 'Η έξωσωματική συντήρηση Ηκ, ὅπως αὐτò άλλωστε φαίνεται και από τή διεθνή βιβλιογραφία [9], ὀδηγεῖ σέ μεταβολές τής μορφολογίας τους, πού εἶναι προφανές ὅτι πρέπει νά μελετηθοῦν και νά προσδιοριστοῦν.

'Η πειραματική διάταξη πού χρησιμοποιήθηκε προσφέρει τή δυνατότητα τής επέκτασης του χρόνου λειτουργίας του Κ.Ε.Υ.Η.Α., ή δέ άπλότητά της διευκολύνει τήν επαναληψιμότητα τῶν πειραμάτων και κατ' επέκταση τήν έρευνητική μας δραστηριότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Demetriou A. A., Editor. Support of the acutely failing liver. Cedars - Sinai Medical Center, Los Angeles. Medical Intelligence Unit. R. G. Landes Company, Austin 1994.
2. Kostopanagiotou G., Arkadopoulos N., Kontopoulou V., et al., Morphology and function of an isolated liver graft in an extracorporeal liver support circuit. (8th European Congress of Intensive Care Medicine 18-22/10/96). Intensive Care Medicine, 1995, 21 (1): 188.
3. Kostopanagiotou G., Arkadopoulos N., Theodoraki K., et al., Development of a novel extracorporeal liver support system (liver graft). Haemodynamic study in healthy animals. (8th European Congress of Intensive Care Medicine, 18-22/10/95). Intensive Care Medicine, 1995, 21 (1): 227.
4. Kostopanagiotou G., Arkadopoulos N., Theodoraki K., Athanassiou L., Papalois A., Prahalias A., Smyrniotis B., Papadimitriou J., Evaluation of an extracorporeal liver support system (liver graft) in an experimental model of acute liver failure (9th European Congress of Intensive Care Medicine, 24-28/9/96). Intensive Care Medicine, 1996, 22 (3): S313.
5. Seglen P. O., Preparation of isolated liver cells methods. Cell Biology, 1976, 13: 29-83
6. Rozga J., Holzman M., Man-Soo R., et al., Development of a hybrid bioartificial liver. Annals of Surgery, 1993, 217 (5): 502-11.
7. Arkadopoulos N., Papalois A., Karvouni E., Papalois B., Pataras Th., Golematis B., Papadimitriou J., Isolation of hepatocytes from a human amyloid liver. Transplantation Proceedings, 1994, 26 (6): 3385-3386.
8. Papalois A., Arkadopoulos N., Kostopanagiotou G., Theodoraki K., Peveretos P., Golematis B., Papadimitriou J., Experimental xenotransplantation of fresh isolated and cryopreserved pig hepatocytes. Biochemical and morphological study. Transplantation Proceedings, accepted for publication (1997).
9. Lazar A., Peshwa M., Wu F., Chi C., Cerra F., Hu W., Formation of porcine hepatocytes spheroids for use in a bioartificial liver. Cell Transplantation, 1995, 4 (3): 259-268.

SUMMARY

**Liver or hepatocytes? Functional and morphological evaluation
of two extracorporeal liver support systems**

The increased incidence of fulminant —viral and toxic— hepatic failure (FHF) and the severe shortage of cadaveric liver donors have stressed the need for the development of liver support systems, which will be used as tem-

porary metabolic support of FHF patients until the host liver regenerates or a suitable graft is provided.

The aim of the present study was to compare functionally and pathologically two extracorporeal liver support systems: One with the use of a whole liver graft and an another one with the use of isolated hepatocytes (bioartificial liver). Experimental development of FHF was established by liver devascularisation (surgical technique) in the swines. For hepatocyte isolation a modification of the Seglen technique was used. The isolated hepatocytes ($1-5 \times 10^9$) were placed into the bioreactor, which was incorporated in the extracorporeal circuit. The study of biochemical and haematological variables showed deterioration of hepatic function in the whole liver graft group. The morphology of the liver graft showed necrosis of the parenchyma according to the time. The application of the bioartificial liver improved hepatic function and offered the advantage of substitution of the bioreactor when it was necessary for further extension of the time of metabolic support.