



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali
INDIRIZZO: EPATOLOGIA E CHIRURGIA EPATOBILIARE E TRAPIANTOLOGICA
CICLO XVII

TITOLO TESI

RESEZIONE EPATICA MAGGIORE CON MODULAZIONE DEL FLUSSO PORTALE NEL
RATTO: STUDIO EMODINAMICO E RUOLO DELLA SERPINA B3 SUL DANNO
CELLULARE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Gatta

Supervisore : Ch.mo Prof. Umberto Cillo

Dr. Enrico Gringeri

Dottorando : Dott. Domenico Bassi

INDICE

RIASSUNTO

INTRODUZIONE

La rigenerazione epatica

- ▲ *Induzione della proliferazione*
- ▲ *Rigenerazione epatica nel fegato con patologia cronica*
- ▲ *L'apoptosi nell'epatocita*
- ▲ *Serpina B3*

Emodinamica nel fegato sano

- ▲ *Arteria epatica*
- ▲ *Vena porta*
- ▲ *Controllo del flusso epatico*
- ▲ *Resistenze vascolari intraepatiche*
- ▲ *Regolazione del flusso sanguigno attraverso il buffer dell'arteria epatica*
- ▲ *Il ruolo dell'Adenosina*
- ▲ *Chirurgia resettiva e suo impatto sull'emodinamica del fegato*

Insufficienza epatica post epatectomia e Small for Size Syndrome

- ▲ *Insufficienza epatica post epatectomia*
- ▲ *Small for Size*
- ▲ *Prevenzione dell'insufficienza epatica post epatectomia e della Small for Size Syndrome*
 - *Embolizzazione portale*
 - *Two-Stage hepatectomy*
 - *Legatura portale e In situ splitting (ALPPS)*
 - *Preservazione dell'outflow venoso epatico*
 - *Splenectomia*
 - *Shunt porto-cavale*

Anatomia chirurgica del fegato di ratto

SCOPO DELLO STUDIO

MATERIALI E METODI

- ♣ Animali
- ♣ Anestesia
- ♣ Intervento chirurgico
- ♣ Ecografia intra-operatoria
- ♣ Valutazione dell'espressione della Serpina B3
- ♣ Valutazione morfologica

ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

RISULTATI

- ♣ Esami bioumorali
- ♣ Flussimetria-Doppler
- ♣ Espressione di Serpina B3
- ♣ Analisi morfologica ed apoptosi

DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

Presupposti studio: L'aumento del flusso sanguigno per grammo di fegato immediatamente dopo resezione epatica comporta un aumento dello shear stress intraepatico che sembra essere coinvolto nello stimolo e regolazione della rigenerazione. Un iperafflusso portale tuttavia sembra determinare un serio danno epatico a causa dell'elevato shear stress intraparenchimale. Questo fenomeno è stato studiato prevalentemente nel trapianto di fegato parziale da donatore vivente o cadavere e nei soggetti sottoposti a resezioni epatiche estreme. Ne risulta una sindrome definita come Small for Size che ha molte similitudini con l'insufficienza epatica post epatectomia e che si associa a grave morbilità e mortalità.

Tra i meccanismi di rigenerazione e protezione cellulare post resezione epatica, la Serpina B3 (inibitore delle serin-proteasi con azione anti- apoptotica) potrebbe avere un ruolo nel controllo dell'apoptosi.

Per prevenire il danno da elevato shear stress si è focalizzata l'attenzione sulla modulazione del flusso portale attraverso il confezionamento di shunt porto-cavali, l'embolizzazione dell'arteria splenica, la splenectomia.

Scopo dello studio : è l'analisi delle variazioni emodinamiche all'ecodoppler del circolo portale e arterioso epatico in corso di resezione epatica maggiore nel ratto e in corso di resezione epatica associata a splenectomia e il loro impatto sul danno parenchimale. Lo studio ha inoltre lo scopo di valutare la correlazione tra espressione della Serpina B3 e il danno cellulare post resettivo in gruppi diversi di animali.

Materiali e metodi: 23 ratti Wistar maschi sono stati suddivisi in 4 gruppi: il Gruppo A (5 animali) è stato sottoposto a resezione epatica del 30%, il Gruppo B (8) a resezione 60%, il Gruppo C (7) a resezione 60% associata a splenectomia e il Gruppo D (3) ha costituito il gruppo di controllo ed è stato sottoposto a laparotomia, ma non a resezione epatica (*sham operated*). Immediatamente prima dell'intervento chirurgico (T0) e a due ore (T1) si sono eseguiti prelievi ematici su ciascun ratto (dosaggio di AST, ALT, LDH, Acido lattico e Ammonio). Campionamenti di tessuto epatico sono stati eseguiti al termine della resezione e a 2 ore dalla fine dell'intervento chirurgico. Sempre a T0 e T1 è stato effettuato un eco-color doppler epato-splenico. Sui prelievi bioptici dei vari gruppi oltre ad analisi istopatologiche standard, è stata eseguita l'estrazione e la quantificazione dell'RNA della Serpina B3. Sugli stessi prelievi bioptici si è eseguito il test TUNEL per la quantificazione dell'indice apoptotico.

Risultati: L'indagine doppler ha mostrato un flusso portale per grammo di fegato maggiore nel gruppo B rispetto agli altri 3 gruppi. Solamente nel gruppo B le resistenze arteriose epatiche hanno avuto un aumento significativo e le resistenze dell'arteria splenica apparivano aumentate. Nel gruppo C c'è stata una tendenza del flusso portale a diminuire dopo resezione epatica + splenectomia ed anche le resistenze arteriose epatiche tendevano a ridursi in questo stesso gruppo. L'espressione di Serpina B3 nel gruppo B è aumentata maggiormente rispetto agli altri gruppi. L'indagine TUNEL ha mostrato un maggior grado di apoptosi nel gruppo C rispetto al gruppo B e al controllo.

Conclusioni: Il danno epatico post-resettivo è presente già 2 ore dopo l'epatectomia ed è probabilmente dovuto alle alterazioni emodinamiche che questa provoca.

Il ruolo della Serpina B3 non è ancora chiarito nella protezione del danno dopo resezione epatica maggiore; quello che abbiamo assistito nel nostro studio è che ad una maggior espressione di Serpina B3 si associa una minore apoptosi.

ABSTRACT

Background: The increased blood flow per gram of liver immediately after liver resection results in an increase intrahepatic shear stress that seems to be involved in the stimulation and regulation of regeneration. A portal hyperflow however causes a serious liver damage due to high intraparenchymal shear stress. This phenomenon has been studied mainly in living donor liver transplantation or cadaveric split liver and in extreme liver resections. The result is a syndrome defined Small for Size which has many similarities with liver failure after hepatectomy and it is associated with severe morbidity and mortality. Among the mechanisms of cell protection and regeneration after liver resection, the Serpin B3 (serine protease inhibitor with anti-apoptotic action) could have a role in the control of apoptosis. The portal flow modulation through the use of port-caval shunt, embolization of the splenic artery, splenectomy has been proposed to prevent the damage due to a high shear stress.

Aim of the study: The aim of the study is the analysis of hemodynamic changes assessed by ultrasound of the portal and hepatic artery circulation in rats after major liver resection and liver resection associated with splenectomy and their impact on the parenchymal damage. The study also aims to assess the relationship between the Serpin B3 expression and cell damage after resection in different groups of animals.

Material and Methods: 23 male Wistar rats were divided into 4 groups: Group A (5 animals) underwent a 30% liver resection, Group B (8) 60% resection, the Group C (7) 60% resection associated with splenectomy and Group D (3) constituted the control group and underwent a simple laparotomy (sham operated). Immediately before surgery (T0) and after two hours (T1) blood samples were drawn from each rat (dosage of AST, ALT, LDH, lactic acid and ammonium). Samples of liver tissue were collected after the resection and 2 hours after surgery. An hepato-splenic echo-color Doppler was done at T0 and T1 in all the rats. On bioptic samples of the various groups, in addition to standard histopathological analysis, the extraction and quantification of RNA Serpin B3 was performed. On the same biopsies the apoptotic index quantification was tested with TUNEL.

Results: The eco-Doppler study showed a portal flow per gram of liver in group B greater than the other 3 groups. Only in group B the hepatic arterial resistance had increased significantly; also the resistance of the splenic artery appeared increased. In group C, there was a tendency to reduction in portal flow and also the hepatic arterial

resistance tended to decrease in this same group. The expression of Serpin B3 in group B increased more than the other groups. The TUNEL test showed a greater degree of apoptosis in group C than in group B and in the control.

Conclusions: The post-resection liver damage is already present 2 hours after hepatectomy and it is probably due to the hemodynamic changes that this causes.

The role of Serpina B3 has not been yet clarified in the protection of the damage after major liver resection; what we have seen in our study is that to a greater expression of Serpin B3 is associated a lower apoptosis.

INTRODUZIONE

La rigenerazione epatica

A differenza di altri organi solidi, il fegato umano possiede un'abilità unica cioè di rigenerare dopo insulti tossici, infiammazione cronica, e resezioni chirurgiche. Il termine rigenerazione si riferisce al processo iperplastico a cui vanno incontro le cellule a seguito di appropriati stimoli. All'interno del fegato danneggiato le cellule iniziano a replicare incrementando il numero totale delle cellule residue e portando all'effetto comunemente definito come ipertrofico (1). Questo processo, in parte non ancora chiaro, è regolato in maniera molto precisa e coinvolge molti tipi di cellule, segnali extraepatici, *pathway* molecolari complessi e interazioni cellulari. Si genera un delicatissimo equilibrio tra i meccanismi che portano alla rigenerazione cellulare con conseguente ripristino della massa epatica persa a seguito di un insulto e le normali funzioni metaboliche dell'organo necessarie per la sopravvivenza dell'intero organismo umano. L'incapacità di mantenere questo equilibrio porta ad una ridotta funzionalità epatica fino all'insufficienza d'organo.

La chirurgia epatica in particolare quella delle resezioni maggiori e delle resezioni a scopo di trapianto può essere praticata proprio per il fatto che il fegato è in grado di rigenerare ed di riacquistare la propria massa funzionale entro 2 settimane circa. Oggi giorno l'estensione delle resezioni e la conseguente possibilità di curare tumori una volta considerati non resecabili vengono spinte all'estremo attraverso l'uso di strategie volte ad aumentare il volume del fegato residuo dopo resezione (2). Alcuni gruppi di pazienti non possono tuttavia tollerare resezione epatiche di una certa estensione per incapacità del parenchima epatico di rigenerare appropriatamente. Questo succede in particolare in soggetti come quelli con cirrosi o fibrosi epatica, pazienti con sindrome metabolica, obesità grave con steatosi associata, NASH, pazienti anziani con ridotta capacità rigenerativa (3,4). La rigenerazione epatica è cruciale anche in ambito trapiantologico. Nel trapianto da donatore cadavere, la perdita di epatociti è significativa a seguito del danno da ischemia riperfusione o a seguito di danni cellulari che si possono essere verificati nel donatore. Questi fenomeni sono maggiormente evidenti nei fegati marginali oggi giorno sempre più utilizzati per la scarsità di risorse. I fenomeni di rigenerazione sono inoltre essenziali quando vengono impiegati fegati parziali da donatore vivente o donatore cadavere.

La rigenerazione dopo resezione epatica è realizzata dalla proliferazione delle cellule mature già esistenti nel parenchima (Figura 1). Queste includono epatociti, cellule epiteliali biliari ed endoteliali fenestrate, cellule di Kupffer e cellule di Ito. Sono gli stessi epatociti che provvedono a generare gli stimoli replicativi delle altre cellule e il grado di proliferazione cellulare è proporzionale a grado di danno che l'organo ha subito.

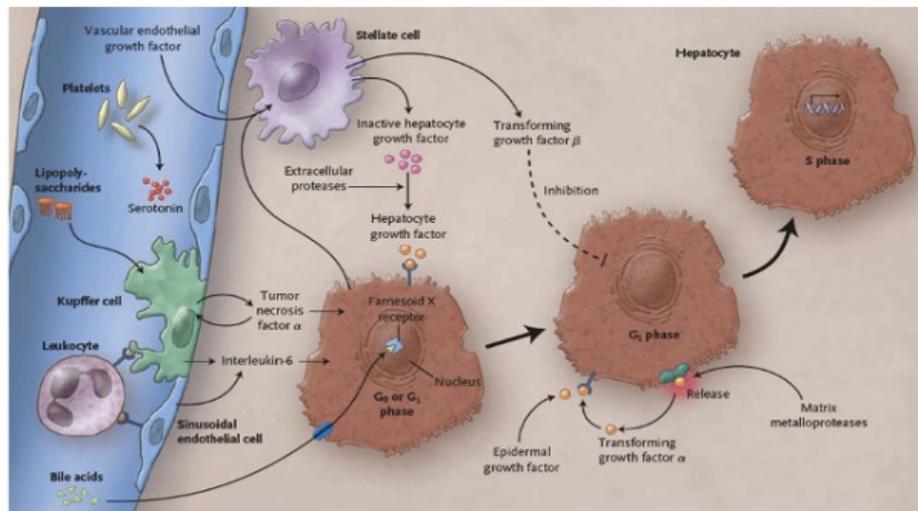


Figura 1: Interazioni cellulare nella rigenerazione epatica

Immediatamente a seguito della resezione epatica, la sintesi di DNA negli epatociti inizia ad aumentare passando dalla fase G₀ alla fase G₁, alla successiva fase S (di sintesi del DNA) fino alla fase M di mitosi. L'induzione della sintesi nelle cellule non parenchimali inizia solitamente dopo 48h per le cellule di Kupffer e le cellule dell'epitelio biliare e dopo 96h per le cellule endoteliali (5, 6). Il primo picco di sintesi del DNA avviene nelle prime 40 ore dalla resezione nei roditori e tra i 7 e 10 giorni nell'uomo. Nei piccoli animali dopo 7-10 giorni dalla resezione la massa epatica ritorna ad essere come prima dell'intervento chirurgico. Nell'uomo la rigenerazione è evidente già prima di 2 settimane e si completa in circa 3 mesi. In studi eseguiti su donatori viventi di fegato si è tuttavia riscontrata un non completo recupero del volume epatico a 3 mesi dalla donazione (7, 8). Dopo un'epatectomia del 70% gli epatociti richiedono un numero di cicli proliferativi pari a 1,66 per ripristinare il numero di epatociti iniziale. (9).

A differenza di altri tessuti che hanno la capacità di rigenerare come il midollo osseo o la pelle, la rigenerazione del fegato dopo chirurgia dipende non da un piccolo numero di cellule progenitrici ma dalle cellule normalmente residenti nel parenchima. Solo in

alcune situazioni particolari come in caso di necrosi epatica massiva si ha la partecipazione di cellule dette ovali che rappresentano cellule progenitrici epatiche e di derivazione da cellule epiteliali biliari (10). Anche cellule esogene sembrano poter partecipare nei fenomeni di rigenerazione epatica a seguito di danno epatico acuto da tetracloruro di carbonio come cellule staminali mesenchimali dal cordone ombelicale, tessuto adiposo, midollo osseo (11).

Induzione della proliferazione

Già dopo minuti dalla resezione negli epatociti residui si attivano dei geni che includono protooncogeni che normalmente giocano un ruolo importante nella normale progressione del ciclo cellulare come JUN, FOS, MYC, KRAS (12), fattori trascrizionali come NfκB (*nuclear factor*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*), AP-1 (*activating protein*). Uno stimolo umorale (Figura 2) importante per questi geni e in particolare per i differenti fattori trascrizionali durante la rigenerazione sono l'interleuchina 6 (IL-6) e il *tumor necrosis factor Alfa* (TNF-Alfa). Queste citochine, che vengono rilasciate dalle cellule di Kupffer a seguito di specifici stimoli porto-sistemici come il lipopolisaccaride, sono coinvolte nella risposta cellulare al danno e sono definite *Priming Factors*. Nei topi deficienti di IL-6 e senza i recettori per il TNF-Alfa, la rigenerazione epatica è ritardata anche se non completamente abolita (13, 14). Sono poi necessari degli altri fattori detti *Growth Factors* (TGF Alfa – *transforming growth factor*, HB EGF – *heparin binding epidermal growth factor*) rilasciati dalle cellule stellate che permettono la progressione degli epatociti verso il ciclo cellulare.

Nella progressione della cellule nelle varie fasi che portano alla mitosi tra i numerosi fattori umorali pro rigenerativi coinvolti dopo resezione epatica è da annoverare l'adenosina trifosfato (ATP) extracellulare, l'insulina, l'EGF, la noradrenalina.

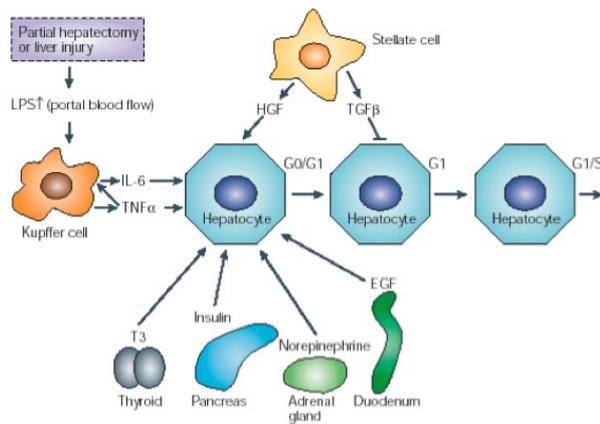


Figura 2: stimoli rigenerativi indotti dall'epatectomia parziale o dal danno epatico

La sintesi del *transforming growth factor Beta* (TGF Beta - avente un effetto inibente sulla proliferazione epatocitaria) viene bloccata nelle fasi precoci della proliferazione degli epatociti, ma può essere successivamente ripristinata, segnando il termine della rigenerazione (15).

Il *pathway* citochinico inoltre (nello specifico la produzione di IL-6), inibisce anche l'apoptosi nel fegato. In risposta al rilascio di citochine da parte delle cellule di Kupffer, gli epatociti liberano ossido nitrico (attivazione di iNOS), il quale può agire sopprimendo l'inibizione dell'espressione delle cicline D1 e D2, indotte dall'HGF (16). In modelli murini knockout per il gene iNOS, dopo l'epatectomia l'animale andava incontro a insufficienza epatica caratterizzata da marcata apoptosi degli epatociti (17).

Numerosi sono i *pathway* intracellulari noti nella rigenerazione epatica molti dei quali studiati con le tecniche di *cDNA array*. Un esempio importante è lo studio con *cDNA array* del ruolo dell'IL-6 nella rigenerazione in topi con deficit di IL-6 dopo epatectomia. In questi animali si è riscontrata una riduzione del 36% nell'espressione genica rispetto a topi *wild type*. In particolare si è notato un ritardo nell'attivazione di geni come il recettore u-PA e la *Serpina1* (18). IL-6 attiva il JAK/STAT3 e MAPK *pathway* e questo comporta la conseguente attivazione di geni richiesti nelle normali funzioni metaboliche epatiche, di riparazione e protezione contro gli insulti (19). STAT3 è cruciale nella progressione dalla fase cellulare G1 a S e per l'attivazione del gene MYC anch'esso coinvolto nella progressione del ciclo cellulare. Altri *pathway* intracellulari coinvolgono i recettori delle tirosin chinasi p38 MAPK, pERKs.

La progressione attraverso il ciclo cellulare è inoltre regolata da cicline e da chinasi cicline-dipendenti (CDKs).

Rigenerazione epatica nel fegato con patologia cronica

La rigenerazione epatica può essere seriamente compromessa da condizione intrinseche al fegato come la steatoepatite, la cirrosi, la fibrosi. La steatosi epatica influisce in maniera negativa sulla rigenerazione cellulare infatti l'accumulo di lipidi è stato associato ad un danno mitocondriale degli epatociti da radicali liberi. Il fegato steatosico nel ratto mostra una mitosi ritardata e un' aumentata mortalità dopo epatectomia dovuta ad alterazione nel segnale di TNF Alfa e IL-6 (20). Nella pratica clinica la steatosi maggiore del 30% è collegata a maggiore mortalità e rischio di complicanze post chirurgiche. (21). Nell'ambito dei trapianti di fegato, una steatosi severa (maggiore del 60%) del fegato donato comporta una maggiore percentuale di *primary non function*, ipertransaminasemia e perdita del *graft* legata ad un'incapacità dell'organo trapiantato di attivare i meccanismi di riparazione e rigenerazione tissutale.

La rigenerazione è maggiormente inibita nei fegati cirrotici. L'accumulo nella matrice extracellulare di collagene crea una barriera fisica che ostacola la rigenerazione degli epatociti e non permette la diffusione agli epatociti di nutrienti e fattori epatotrofici. Kuramitsu et al hanno dimostrato sui topi profonde differenze nella rigenerazione del fegato nell'animale sano e in quello con fibrosi indotta da tetracloruro di carbonio, in particolare hanno visto che nel fegato fibrotico si ha: 1) una ridotta replicazione delle cellule parenchimali con un tasso 8 volte più basso di epatociti positivi per marcatori specifici di proliferazione; 2) un'aumentata morte cellulare nelle fasi avanzate di rigenerazione (dopo 5 giorni) con maggior presenza di apoptosi e aumento dei livelli di ALT; 3) un incremento della popolazione di cellule progenitrici ovali; 4) una grave risposta fibrogenica dimostrata da una *up regulation* di geni profibrotici ed eccessiva deposizione di collagene (22).

L'apoptosi nell'epatocita

Non è chiaro se l'apoptosi giochi un ruolo significativo nella perdita epatocitaria in seguito ad epatectomia parziale. Lee e collaboratori (23) hanno descritto un aumento di tre volte nel numero di cellule apoptotiche dopo 1 ora da un'epatectomia del 70% nel ratto, mentre Sakamoto e colleghi (24) hanno osservato un'ondata apoptotica tra le 60 e le 96 ore successive ad epatectomia del 70% nel topo. D'altro canto Helling et al (25) non hanno riscontrato un significativo aumento dell'attività apoptotica dopo resezione epatica nel ratto. Il termine "apoptosi" fu introdotto da Kerr per descrivere una forma di

morte epatocitaria che si verifica nel danno ischemico del fegato (26). L'apoptosi si caratterizza per le profonde alterazioni morfologiche a carico della cellula interessata:

- Contrazione cellulare;
- Perdita di connessioni con le cellule circostanti;
- *Blebbing* delle membrane;
- Condensazione della cromatina (27, 28).

Il DNA nucleare delle cellule apoptotiche è spesso frammentato in unità oligonucleotidiche ("*laddering*"). Una caratteristica dell'apoptosi che va sottolineata è la mancanza di risposta infiammatoria locale, dovuta alla preservazione dell'integrità dei frammenti sub-cellulari, che evita la liberazione del contenuto potenzialmente tossico della cellula.

Attualmente il metodo più affidabile per identificare l'apoptosi rimane l'analisi morfologica al microscopio ottico (29, 31). La necrosi e l'apoptosi possono verificarsi contemporaneamente e livelli elevati di apoptosi possono esitare in una necrosi secondaria.

L'apoptosi può seguire due vie differenti (figura 3):

- Via estrinseca: il segnale apoptotico origina dai recettori di membrana *TNF receptor1* (TNFR1) e dai recettori Fas/Apo. Il legame con TNFa o Fas-ligando è in grado di attivare la cascata delle caspasi, la quale si conclude con la morte cellulare. Sebbene gli epatociti siano ricchi di questi recettori superficiali, la loro attivazione solitamente si traduce nell'inizio della rigenerazione, anziché nell'avvio dei *pathways* apoptotici (32, 33).
- Via intrinseca: la cascata delle caspasi può attivarsi a partire dallo stress ossidativo, che si esplica a livello mitocondriale; la formazione di specie reattive dell'ossigeno è in grado di promuovere l'apoptosi attraverso la creazione di canali anionici voltaggio-dipendenti, nella membrana mitocondriale esterna (34), attraverso cui viene liberato il citocromo C, che induce l'intera cascata della caspasi (35). Lo stress ossidativo, inoltre, è in grado di perturbare l'omeostasi del calcio e l'ingresso nel citoplasma di tale catione bivalente, proveniente dall'esterno della cellula o dal reticolo endoplasmatico. Questo fenomeno interrompe il metabolismo mitocondriale ed altera la trascrizione genica, provocando l'apoptosi (36, 37).

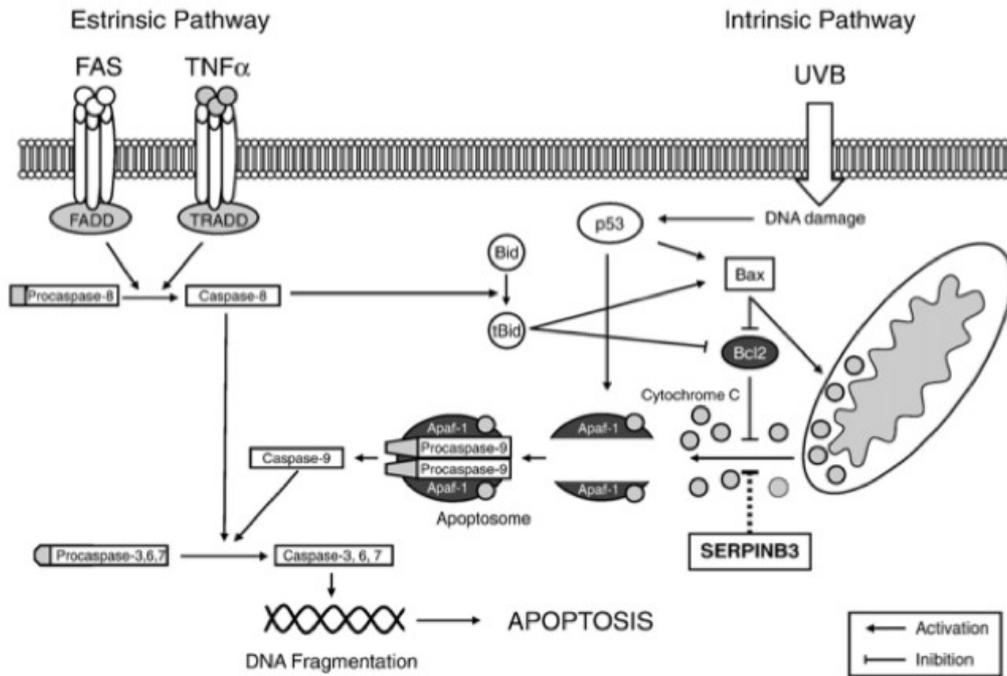


Figura 3: Principali vie di induzione dell'apoptosi e ruolo della serpina B3

Serpina B3

Le serpine sono una famiglia di inibitori delle serin- o cistein- proteasi coinvolte in molteplici funzioni biologiche e nel controllo dell'omeostasi cellulare (38). Esse hanno caratteristiche strutturali comuni uniche, hanno localizzazione intra ed extracellulare e inibiscono specifiche proteasi (39,40). Le serpine agiscono come inibitori delle serin-proteasi, anche se alcune di esse hanno la capacità di inibire altre proteasi come la Serpina B3 (conosciuta come *Squamous Cell Carcinoma Antigen 1* or SCCA1) che esercita la sua azione inibente su cistein-proteasi (41). Le azioni differenti delle varie Serpine o la loro specificità nel target dipende principalmente dalle differenze presenti nel *loop* del sito di contatto che è coinvolto nell'interazione iniziale con le proteasi, il loro riconoscimento, il taglio, con la conseguente inibizione dell'enzima (42, 43).

La serpina B3 è stata originariamente isolata dalle cellule del carcinoma squamoso dell'utero e della cervice (44) e il sequenziamento genomico ha rivelato che essa appartiene alla famiglia degli inibitori delle ov-albumin serin proteasi (ov-serpine) (45). Il ruolo di questa serpina non è stato definito in maniera completa. Essa è fisiologicamente espressa nell'epitelio squamoso, nelle cellule endoteliali delle vene, nella parete delle arterie e nelle cellule mononucleari del sangue periferico (46, 47). E'

inoltre sovraespressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale (48, 49). Il fegato normale non contiene quantità di serpina rilevabile, mentre lo è nelle cellule carcinomatose epatiche e le lesioni preneoplastiche. Nel siero di soggetti affetti da questo tipo di patologie sono stati trovati livelli significativi di tali proteine come immunocomplessi legati a IgM (50, 51). Diversi dati indicano che la serpina B3 stimola una protezione cellulare dalla morte per apoptosi causata da diversi stimoli. Il bersaglio molecolare della serpina sembra esser a monte della caspasi-3 (52). Si ritiene che la Serpina B3 inibisca solo parte della cascata indotta dal segnale apoptotico, di conseguenza può essere considerata come uno dei numerosi fattori cellulari coinvolti nella regolazione dell'apoptosi, in particolare è stato dimostrato che la Serpina B3 impedisce la morte cellulare indotta da TNF α contrastando il rilascio del citocromo c dai mitocondri (53). La Serpina B3 induce una proliferazione cellulare e una deregolamentazione dei processi di adesione spingendo la cellula verso una transizione epitelio-mesenchimale con potenziale invasività (54). E' stato inoltre riportato che la serpina induce l'espressione di TGF- β (55) e promuove la fibrogenesi in modelli sperimentali (56). Sulla base di tali osservazioni, la Serpina B3 potrebbe giocare un ruolo nello sviluppo del cancro. Nell'epatocarcinoma infatti, dove la serpinaB3 è stata trovata iper espressa, è stata riscontrata un'inibizione significativa della morte per apoptosi (57). In topi transgenici in grado di esprimere la Serpina B3 nel fegato e nelle cellule infiammatorie si è osservata una maggiore longevità rispetto a topi *wild type*. Si è osservato in particolare che nei topi transgenici sono presenti ridotti livelli di IL-6 che si possono correlare con una minor morte cellulare per apoptosi (58).

È stato inoltre dimostrato che, quando i cheratinociti vengono esposti alla luce ultravioletta, SCCA1 trasloca nel nucleo e si lega alla forma fosforilata di JNK1 (*Jun-NH2-terminal kinase1*), sopprimendola ed inibendo così l'apoptosi indotta dai raggi UV. Quest'ultima azione anti-apoptotica sembra essere indipendente dall'attività di inibizione delle proteasi (60).

Uno studio del 2010 condotto da Villano et al. (61) utilizza un modello di rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale al fine di studiare i normali segnali di crescita epatocitari: due gruppi, uno di topi *wild-type* e uno di transgenici per SCCA1 umano (Serpina B3), furono sottoposti ad un'epatectomia di 1/3. Dopo 7 giorni dalla resezione epatica, né nel gruppo *wild-type* né in quello transgenico c'era stata amplificazione dell'omologo murino di SCCA1, rispetto al livello basale. Il gruppo di animali transgenici però, mostrava una riduzione dell'attività apoptotica (livelli più bassi di caspasi3 attivata) ed un aumento della proliferazione epatocitaria (maggior numero di

mitosi ed espressione di Ki67), ascrivibili all'espressione di SCCA1-umano.

Emodinamica nel fegato sano

Il fegato riceve normalmente un quarto dell'*output* cardiaco nonostante costituisca solo il 2,5% del peso corporeo totale. Il 75-80% del sangue che gli arriva parzialmente deossigenato è drenato dallo stomaco, intestino, milza, pancreas tramite la vena porta. Il resto del sangue è invece ben ossigenato e veicolato dall'arteria epatica (Tabella 1). Il sangue arterioso e venoso si mescolano nei sinusoidi e da qui è drenato al cuore attraverso il sistema venoso epatico. Il volume ematico epatico costituisce circa 10-15% del volume ematico totale di cui il 60% è contenuto nei sinusoidi.

Arteria epatica	Vena porta
Alta pressione – alta resistenza	Bassa pressione – bassa resistenza
Pressione=pressione aortica	Pressione=6-10mmHg
Sat O ₂ =95%	Al digiuno Sat O ₂ =85%, si riduce dopo ingestione di cibo

Tabella 1: arteria epatica e vena porta a confronto

Arteria epatica

L'arteria epatica normalmente fornisce il 25% del flusso epatico totale dell'organo quantificabile in 30ml/min per 100g di tessuto epatico; attraverso essa viene veicolato il 30-50% dell'ossigeno totale.

La riduzione della pressione nel sistema arterioso a favore di quella nel sistema portale si realizza con variazioni delle resistenze nelle arteriole nel plesso peribiliare e attraverso la chiusura intermittente delle arteriole che proteggono la circolazione portale dalla pressione arteriosa. Nel caso di occlusione dell'arteria epatica o di una delle sue principali diramazioni, si creano dei circoli collaterali garantiti attraverso numerose piccole arterie come le arterie freniche inferiori, le arterie gastroduodenali.

Vena porta

La vena porta riceve il sangue venoso dall'intero distretto vascolare splanchnico epatico; questo sistema a bassa pressione e bassa resistenza senza valvole è regolato dal

grado di contrazione delle arteriole mesenteriche e splancniche in associazione con le resistenze vascolari intraepatiche. La vena porta normalmente trasporta al fegato circa il 75% del flusso totale epatico o 90ml/min per 100g di fegato; la pressione portale normale è di 5-8 mmHg. Il sangue portale è postcapillare e parzialmente deossigenato, ma fornisce, vista la sua portata elevata, il 50-70% dell'ossigeno richiesto dal fegato.

Controllo del flusso epatico

Il flusso sanguigno epatico è controllato da meccanismi fisiologici che sono indipendenti dall'innervazione estrinseca o agenti vasoattivi circolanti. L'inter-relazione tra i circuiti di afflusso arterioso e portale sembra il principale meccanismo di controllo del flusso. Il flusso sanguigno portale trova una resistenza minima nelle venule portali e nei sinusoidi epatici e viene controllato al di fuori del fegato attraverso modifiche di tono delle arterie di resistenza all'interno dei vasi splancnici. In caso di riduzione della pressione portale si determina un collasso parziale del letto vascolare portale e ciò indica che non è presente o comunque poco rilevante un sistema di autoregolazione del flusso (62).

Resistenze vascolari intraepatiche

Le resistenze vascolari intraepatiche sembrano localizzarsi a livello delle venule portali presinusoidali o a livello dei sinusoidi. I meccanismi che controllano tali resistenze non sono chiari tuttavia si ipotizza la presenza di strutture simil sfintere all'entrata ed uscita dei sinusoidi che mantengono il gradiente pressorio porto-venoso (63). È stato osservato una contrazione sinusoidale in risposta all'Endotelina 1 (ET1) nonostante l'assenza di muscolatura liscia (64). Questa contrattilità è attribuibile alle cellule epatiche stellate anche dette di Ito. ET1 è in grado di causare una contrazione reversibile e graduata delle cellule stellate in colture di tissutali e determina la riduzione del lume dei sinusoidi nel fegato perfuso (65–66). Le cellule stellate contengono infatti filamenti simil desmina e actina che conferiscono alla cellula capacità contrattili (67–68).

Tra i vari meccanismi che sembrano essere in grado di modulare le resistenze portali nei sinusoidi epatici bisogna ricordare anche l'ossido nitrico (NO) di derivazione endoteliale (69).

Regolazione del flusso sanguigno attraverso il buffer dell'arteria epatica

Oltre alla regolazione intrinseca dell'arteria epatica tramite la classica autoregolazione arteriosa, esiste una seconda forma di regolazione intrinseca, chiamata risposta *buffer* dell'arteria epatica (HABR). Questa denominazione fu coniata da Lautt nel 1981 (70).

Alcuni studi dimostrarono che il flusso dell'arteria epatica non viene influenzato dall'attività metabolica epatica, come invece accade in altri organi (71); da questi studi si poté desumere che l'unico parametro che sembrava correlare con le modifiche del flusso arterioso erano i cambiamenti del flusso portale (72). Esperimenti sulla misurazione del flusso arterioso epatico fetale hanno dimostrato che questo tipo di regolazione è già presente nella vita prenatale (73).

L'HABR rappresenta la capacità dell'arteria epatica di produrre delle variazioni di flusso compensatorie in risposta a modifiche del flusso portale: se questo si riduce l'arteria epatica si dilata, mentre essa si vaso costringe se il flusso portale aumenta (74). Questo fenomeno si manifesta normalmente in condizioni fisiologiche, dove l'arteria epatica è in grado di compensare il 25- 60% della riduzione del flusso portale (75-76).

Il ruolo fisiologico di questa risposta è quello di minimizzare l'influenza delle variazioni del flusso venoso portale sulla *clearance* e sul metabolismo del fegato, e di mantenere un adeguato apporto di ossigeno ai tessuti (72). Poiché la vena porta non può controllare il suo flusso ematico, che è semplicemente la somma dei flussi provenienti dagli organi splanchnici extraepatici, non c'è reciprocità dell'HABR, cioè alterazioni della perfusione arteriosa epatica non inducono cambiamenti compensatori nel flusso portale (70).

Il ruolo dell'Adenosina

Alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato che la risposta di *buffer* dell'arteria epatica è regolata dall'adenosina (76-77). L'ipotesi corrente è che l'HABR può essere spiegato dal concetto di *washout* dell'adenosina (76). Quest'ipotesi si fonda sul presupposto che l'adenosina è rilasciata in proporzioni costanti, indipendentemente dall'apporto o dalla domanda di ossigeno, all'interno dello spazio di Mall, il quale circonda i vasi intraepatici arteriosi e portalici: questi subiscono numerose suddivisioni all'interno del parenchima del fegato e queste ramificazioni sono circondate dallo spazio di Mall, che appare delimitato da uno strato di epatociti (Figura 4)(78).

L'adenosina è dotata di una potente azione vasodilatatrice sull'arteria epatica e la sua concentrazione è regolata dal *washout*, che avviene ad opera del flusso ematico dei vasi

che attraversano lo spazio di Mall: se il flusso portale si riduce, meno adenosina viene rimossa dallo spazio di Mall e l'aumento della sua concentrazione provoca la dilatazione dell'arteria epatica, con il conseguente aumento del flusso arterioso.

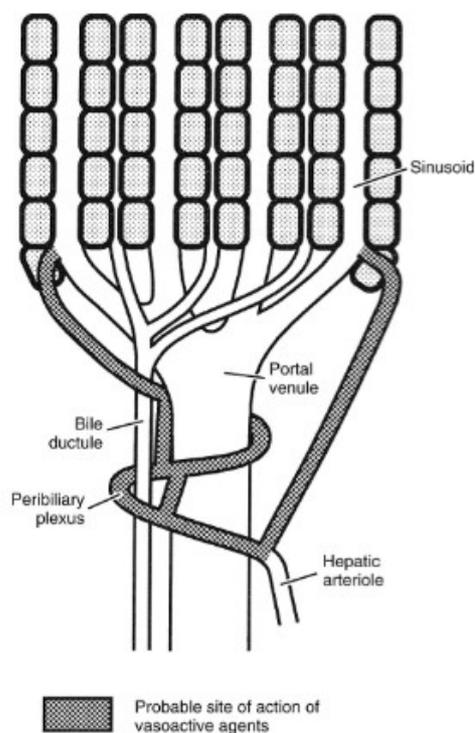


Figura 4: Rappresentazione schematica del letto microvascolare del fegato, che dimostra l'associazione anatomica tra le arteriole epatiche, le venule portalì, e i duttoli biliari. E' indicato il sito probabile di azione degli agenti vasoattivi

Chirurgia resettiva e suo impatto sull'emodinamica del fegato

Le resezioni epatiche maggiori si associato ad un significativo e persistente incremento della pressione portale (79). Resezioni epatiche limitate senza sezione di vasi epatici maggiori normalmente non producono variazioni nel flusso sanguigno al fegato, questo perché ciò che contribuisce in maniera maggiore al flusso totale, la vena porta, è influenzato meno dagli eventi che si verificano all'interno del fegato piuttosto che dai meccanismi di controllo nei vasi arteriosi di resistenza del letto splancnico preepatico. Nelle decurtazioni importanti di parenchima, il fegato ,non essendo in grado di controllare in maniera diretta il flusso portale, risulta essere iper perfuso dalla vena

porta. Visto che lo stesso flusso totale è ridistribuito ad un massa ridotta di fegato, si può predire un corrispondente incremento nelle perfusione tissutale (ml/min per unità di peso del tessuto) nel parenchima residuo. Questo fenomeno è noto da studi sperimentali sui ratti negli anni settanta (80); dopo epatectomia del 60-70% si era osservato infatti un immediato aumento della perfusione tissutale dato prevalentemente da flusso portale. Nell'uomo studi analoghi hanno dimostrato un'immediato aumento della perfusione epatica del 120% dopo resezione nel fegato residuo (81). Studi sperimentali hanno messo in evidenza l'importanza nella regolazione della rigenerazione epatica dello shear stress intraepatico a seguito dell'incremento del flusso portale. Già nel 1944 (82) si era ipotizzato che la rigenerazione del parenchima epatico fosse in relazione con il flusso sanguigno e in particolare che l'iperplasia rigenerativa del fegato dopo resezione fosse legata al flusso portale e che un suo controllo mediante derivazione portale fosse in grado di prevenire il processo. Tale concetto non è confermato dagli esperimenti nei ratti di resezione epatica associati a trasposizione portocavale in cui la rigenerazione avviene nonostante non ci sia un apporto diretto di sangue portale al fegato né il normale aumento del flusso sanguigno che usualmente avviene post resezione.

Come già descritto, a seguito di un'epatectomia, la riduzione delle dimensioni del fegato e, di conseguenza, della capacità vascolare, risulta nell'aumento della pressione portale (83); questo a sua volta provoca l'incremento dello shear-stress a livello dei sinusoidi epatici, il quale costituisce un importante fattore stimolante la rigenerazione epatica (84). Tuttavia quando la massa epatica è eccessivamente ridotta, l'incapacità del fegato di controllare il flusso venoso portale ha come conseguenza l'iperperfusione portale: nell'uomo, un'epatectomia del 60% risulta in un raddoppiamento del flusso portale nel rimanente 40% del tessuto epatico (85). Tuttavia pressioni troppo elevate possono provocare il collasso del microcircolo e il danneggiamento gli epatociti; tali cambiamenti si riscontrano frequentemente con epatectomie superiori al 90% (86).

Smyrniotis et al (87) hanno inoltre dimostrato che l'HABR può provocare ipoperfusione arteriosa del fegato di taglia ridotta, come conseguenza dell'iperperfusione portale. In un modello porcino di *small for size syndrome*, l'esame istologico dei grafts ha confermato il verificarsi del vasospasmo arterioso e le sue conseguenze: colestasi, necrosi centrolobulare ed ischemia del polo biliare (88).

Insufficienza epatica post epatectomia e Small for Size Syndrome

Insufficienza epatica post epatectomia

L'insufficienza epatica post resettiva è una delle complicanze più serie in chirurgia epatobiliare. Non esiste una definizione o terminologia standardizzata per definire la tale sindrome. Nel 2010 Rahbari e altri membri del Internation Study Group of Liver Surgery (ISGLS) hanno definito l'insufficienza epatica post epatectomia come un “un deterioramento acquisito post operatorio della capacità del fegato di mantenere la sua sintesi, le sue funzioni di detossificazione ed escretorie e che è caratterizzata da un incremento dell'INR e concomitante iperbilirubinemia dopo la quinta giornata post operatoria” (89). La ISGLS ha inoltre conferito 3 gradi differenti di gravità alla sindrome dalla A alla C (Tabella 2).

Grado	
A	Insufficienza epatica post epatectomia che risulta in alterazione dei parametri laboratoristici ma senza cambiamenti nel management clinico del paziente
B	Insufficienza epatica post epatectomia che risulta in una variazione del regolare decorso clinico ma il cui management non richiede trattamento invasivo
C	Insufficienza epatica post epatectomia che risulta in una variazione del regolare decorso clinico il cui management richiede trattamenti invasivi

Tabella 2: Gradi di gravità nella sindrome da insufficienza epatica post epatectomia

Esistono altre definizioni per l'insufficienza epatica post epatectomia. Jarnagin et al. (90)

caratterizzano l'insufficienza epatica postoperatoria come “iperbilirubinemia prolungata non correlata ad ostruzione o leak biliare, ascite clinicamente evidente, coagulopatia prolungata che richiede FFP e/o encefalopatia porto-sistemica”. Il cosiddetto “Criterio 50-50” prevede il controllo in 5^ giornata post-operatoria dei valori di PT e Bilirubina Totale, dove il valore di PT inferiore al 50% e quello di Bilirubina superiore a 50 µmol/L sono associati ad un rischio elevato di sviluppare un'insufficienza epatica irreversibile (91).

L'incidenza di tale sindrome varia in letteratura dal 1,2% al 32%, nella recente letteratura si aggira attorno al 8% (92). Questa grande eterogeneità nei risultati rispecchia la differenze di popolazioni considerate e le procedure eseguite.

Per tentare di ridurre l'incidenza dell'insufficienza epatica post epatectomia è importante identificare i fattori di rischio ad essa associati (Tabella 3). Se ne posso identificare 3 gruppi

- rischi legati al paziente – per cui diventa importante selezionare in maniera appropriata i pazienti;
- rischi legati alla procedura chirurgica – per cui il miglioramento delle tecniche chirurgiche ed anestesologiche posso migliorare *l'outcome*;
- rischi legati al management post operatorio – evitare l'uso di ventilazione assistita, vasopressori, farmaci epatotossici per ridurre l'incidenza di insufficienza epatica

Fattori di rischio	
Legati al paziente	<ul style="list-style-type: none"> -Patologia epatica preesistente (cirrosi, steatosi, fibrosi, colangite) - Trattamento chemioterapico preoperatorio - Sesso maschile - Età > 65 anni - Malnutrizione - Comorbilità
Legati alla procedura chirurgica	<ul style="list-style-type: none"> - Volume epatico post epatectomia ridotto - Perdite ematiche eccessive (>1000ml) - Tempi operatori lunghi
Miscellanea	<ul style="list-style-type: none"> - Congestione parenchimale epatica

	<ul style="list-style-type: none"> - Danno da ischemia riperfusione - Infezioni
--	---

Tabelle 3: Fattori rischio nell'insufficienza epatica post epatectomia

Small for Size

Si parla di *Small for Size Syndrome* (SFSS) in ambito trapiantologico quando il volume del *graft* è troppo piccolo per soddisfare le richieste metaboliche del ricevente. Il paziente va incontro ad un corteo di segni e sintomi che si caratterizza per una prolungata colestasi funzionale, ascite intrattabile, ritardata normalizzazione del tempo di protrombina ed encefalopatia. Altri fattori oltre al un volume epatico non adeguato sono responsabili di tale sindrome.

Secondo Kiuchi et al (93) per *Small for Size graft* (SFSG) si intende un rapporto tra il peso del *graft* e del ricevente $< 0,8\%$ (GRWR). L'uso di un SFSG si associa alla comparsa dei sintomi sopra descritti che sfociano in complicanze settiche ed elevata mortalità. Sugawara et al (94) definiscono a rischio quei soggetti con rapporto volume del *graft*/ volume epatico standard $< 40\%$.

Dahm et al (95). hanno proposto una distinzione della SFSS in due entità:

-- "*small for size dysfunction*" (SFSD), definita da due di queste condizioni per tre giorni consecutivi nel corso della prima settimana post-trapianto di fegato (GRWR $< 0,8\%$), previa esclusione di altre possibili cause:

-Bilirubinemia $> 100 \mu\text{mol/L}$, -INR > 2 , -Encefalopatia di grado 3-4

-- "*small for size non-function*" (SFSNF), definita dalla necessità di re-trapianto o morte del paziente per insufficienza epatica durante la prima settimana successiva a trapianto di fegato (GRWR $< 0,8\%$) e una volta escluse altre possibili cause.

Molteplici sono i fattori di rischio che influenzano la SFSS (Tabella 4) (96).

Qualità del Graft	
Danno da ischemia	Questo quadro risulta aggravato dalla presenza di steatosi nel <i>graft</i> e si associa frequentemente a complicanze settiche ed elevata mortalità.
Steatosi	Fegati steatosici sono più sensibili al

	danno da ischemia-riperfusion e alla preservazione ipotermica.
Età del Donatore	Funzione e rigenerazione di <i>graft</i> da donatori anziani sono peggiori rispetto a donatori più giovani
Congestione	La congestione tissutale causata da interruzione dello scarico venoso può portare ad ascite e disfunzione del <i>graft</i>
Fattori legati al ricevente	
Status preoperatorio del ricevente	Elevato MELD (>20) ed età avanzata (>50) del ricevente si associano ad una rallentata ripresa di funzionalità del <i>graft</i> e richiedono un <i>graft</i> più grande e giovane
Pressione e flusso portale	Dopo trapianto da donatore vivente una pressione portale <15mmHg si associa ad un <i>outcome</i> migliore rispetto a soggetti con pressione dopo trapianto >15mmHg

Tabelle 4: fattori di rischio che influenzano la SFSS

Prevenzione dell'insufficienza epatica post epatectomia e della Small for Size Syndrome

Embolizzazione portale

C'è una relazione tra il volume di fegato residuo (o *future remnant liver - FRL*) post resezione e la funzione epatica postoperatoria. Questo è il concetto su cui si fonda l'embolizzazione portale (PVE) descritta da Makuuchi nel 1984 e che rappresenta il *benchmark* per la prevenzione dell'insufficienza epatica post epatectomia (97). Questa procedura permetta un'ipertrofia del futuro fegato residuo del 30-40% in 4-6 settimane in più dell'80% dei pazienti. L'efficacia della legatura chirurgica della vena porta di destra è considerata da molti equivalente all'embolizzazione (98). Queste tecniche

possono essere impiegate anche nei pazienti con preesistenti patologie epatiche con riduzione del rischio di insufficienza post resettiva e di morbilità. In questi soggetti l'embolizzazione è un test terapeutico per valutare l'effettiva capacità del parenchima di ipertrofizzare; un'ipertrofia inferiore al 5% dovrebbe controindicare l'intervento chirurgico (99). La spiegazione per una mancata ipertrofia è da imputare alla presenza di shunt porto-sistemici e all'esistenza di un flusso portale stagnante o epatofugo prima dell'embolizzazione della porta. L'obiettivo dell'embolizzazione portale, indipendentemente dalla crescita volumetrica parenchimale, è di trasferire la funzione dell'organo a quella parte di fegato che residuerà dopo la resezione (100). Per un maggiore effetto ipertrofizzante, l'embolizzazione portale può seguire una chemioembolizzazione arteriosa nel caso di epatorcarinomi. Con questa combinazione oltre al maggior incremento volumetrico del *future remnant liver*, si riduce ulteriormente il rischio di insufficienza post resezione (4% vs 12%) (101).

Two-Stage hepatectomy

Questa strategia terapeutica consiste nella completa resezione di lesioni epatiche in due successivi interventi in casi di tumori epatici bilobari dove un'operazione unica sarebbe ad alto rischio di mortalità (102). Nella maggior parte dei casi il primo tempo consiste in resezione/i epatiche associate o meno ad ablazioni parenchimali in un lobo con l'aggiunta della legatura o embolizzazione portale controlaterale. Quest'ultima comporterà un'atrofia del future fegato da resecare e un'ipertrofia del lobo opposto. Il secondo tempo consiste quindi di un'epatectomia maggiore con rischi di insufficienza epatica ridotti.

Legatura portale e In situ splitting (ALPPS)

Lo scopo di questo tipo di approccio è accorciare i tempi tra l'embolizzazione portale e la resezione, questo per evitare la progressione neoplastica che può raggiungere il 30%. Schnitzbauer et al (103) hanno per primi proposto questa tecnica che consiste in approccio in due tempi. Durante il primo step vengono eseguite una legatura portale destra e la transezione del parenchima senza resezione. Durante il secondo step si esegue una trisegmentectomia destra. Con tale tecnica hanno dimostrato un incremento volumetrico del segmento 2 e 3 del 74% in 9 giorni, superiore ai metodi tradizionali. Questi risultati trovano la loro spiegazione nella disconnessione tra i due lobo che non

consente la vascolarizzazione del lobo epatico in cui è stata fatta l'embolizzazione.

Preservazione dell'outflow venoso epatico

Il drenaggio venoso al cuore è essenziale per ottimizzare l'apporto ematico al fegato, per ridurre il sanguinamento e l'ischemia nel fegato residuo dopo resezione. Ogni alterazione nell'*outflow* venoso deve essere diagnosticata e corretta dopo aver riposizionato l'organo in ipocondrio destro, soprattutto nell'epatectomia destra dove i peduncoli vascolari epatici possono torcersi. In caso di congestione macroscopica (tensioni sulla capsula o colorazione blu del parenchima), un ecodoppler dovrebbe essere fatto per un corretto studio delle alterazioni vascolari dell'*outflow* e il riconoscimento di una conseguente inversione del flusso portale. In questo caso il rischio di insufficienza epatica post epatectomia aumenta a causa della caduta del flusso portale nelle aree congeste con conseguente riduzione della rigenerazione portale (104-105).

Splenectomia

La milza contribuisce al 25-30% del flusso portale nei soggetti sani e può arrivare al 50% nei casi di importante ipertensione portale. La modulazione del flusso portale viene impiegata in ambito di chirurgia trapiantologica per prevenire o curare la *Small for Size Syndrome* (106). Questa sindrome può manifestarsi anche dopo epatectomie estese. Sugawara et al (107) hanno dimostrato un miglioramento della funzionalità epatica in casi di splenectomia pre o intraoperatoria anche se la morbilità post splenectomia non è da trascurare. Arakawa et al (108) hanno dimostrato i benefici della splenectomia dopo resezione epatica del 90% in ratti, con miglioramento della sopravvivenza, riduzione nel danno epatocitario, e della steatosi microvescicolare a 48h. La splenectomia, anche quando eseguita molti giorni prima della resezione, riduce il danno da ischemia-riperfusionem aumentando la proteina Eme Ossigenasi 1 con effetti anti ossidanti, riducendo il flusso e pressione portale, aumentando il flusso arterioso (risposta buffer dell'arteria) permettendo una miglior ossigenazione dei tessuti (109).

Glanemann et al. (110) ha sperimentalmente dimostrato che la diversione del flusso portale è in grado di migliorare l'*outcome* nel modello animale sottoposto a resezione del 90% del parenchima epatico: nei ratti sottoposti a resezione con associata splenectomia il livello di transaminasi nel periodo post-operatorio risultava inferiore di almeno tre volte rispetto agli animali che subivano solamente la resezione epatica:

questo può essere giustificato dal fatto che il flusso portale aumenta di meno negli animali splenectomizzati, rispetto ai ratti che non avevano subito splenectomia, e questo è stato osservato già a 15 minuti dall'intervento.

Inoltre è stato osservato che la splenectomia associata a resezione epatica estrema, nel modello animale, era in grado di riequilibrare il meccanismo dell'HABR: i ratti splenectomizzati infatti presentavano flussi arteriosi epatici maggiori rispetto a quelli resecati senza splenectomia (111).

Questi esperimenti hanno contribuito alla comprensione delle cause di insufficienza epatica post-resettiva e *Small for Size Syndrome* post-trapianto. Nello studio di Eipel et al. (111) è stato dimostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza a favore degli animali splenectomizzati ed epatectomizzati, rispetto agli animali con la sola resezione epatica del 90%. Si era inizialmente ipotizzato che l'effetto benefico della splenectomia dipendesse dalla riduzione dell'iperafflusso portale che ne deriva, con conseguente riduzione dello *shear stress* a carico dei sinusoidi; tuttavia non si osservò una riduzione marcata del flusso epatico totale (portale+arterioso) in questo gruppo di animali, quindi l'ipotesi della riduzione dello *shear stress* risulta poco convincente. Ciò che invece la splenectomia aveva provocato era il raddoppio della pO₂ tissutale epatica prima dell'esecuzione dell'epatectomia, confermando la teoria dell'HABR. Inoltre negli animali splenectomizzati, si assisteva paradossalmente ad un aumento ulteriore del flusso arterioso in corso di epatectomia estesa, con l'aumento delle pO₂ tissutali e la riduzione dell'ipossia. L'aumento del flusso arterioso verificatosi è stato quindi in grado di rispondere alle richieste di ossigeno e ha migliorato la rigenerazione dell'organo e la sopravvivenza degli animali.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Di Domenico et al (112), il quale ha dimostrato che nel ratto sottoposto a resezione dell'80% previa splenectomia il tasso di estrazione di ossigeno da parte del parenchima residuo aumentava rispetto agli animali non splenectomizzati che subivano la resezione ed inoltre il consumo di glutazione era minore nel gruppo di animali splenectomizzati.

Sullo stesso principio si basa la legatura dell'arteria splenica e la sua embolizzazione, usate più frequentemente in ambito trapiantologico.

Shunt porto-cavale

Lo *shunt* porto-cavale era stato inizialmente proposto per il management delle complicanze dell'ipertensione portale ma potrebbe essere utile anche nella prevenzione

dell'insufficienza epatica post epatectomia. Wang et al (113) hanno dimostrato risultati incoraggianti in un modello di *shunt* porto-cavale latero-laterale nel maiale con un miglioramento della sopravvivenza (57% vs 0%) e riduzione dell'ipertensione portale e flusso epatico. Attraverso lo shunt e le ripercussioni sull'emodinamica portale si riduce il danno dell'endoteliale sinusoidale.

Gli *shunt* porto-sistemici (porto-cavali, meso-cavali e spleno-renali) permettono dunque la modulazione dell'afflusso sanguigno portale dopo trapianto di fegato segmentario o resezione epatica maggiore, al fine di superare il problema dell'iperperfusionazione dell'organo (114), ma possono causare un'inversione del flusso portale. La presenza dello shunt fa sì che una quota importante del flusso ematico destinato al fegato sia deviata nel circolo sistemico diminuendo così la pressione sinusoidale, nella vena porta e nei circoli collaterali. La competizione per il flusso portale fra l'organo e lo *shunt* può talvolta rendersi responsabile di un'insufficienza d'organo secondaria all'ipoperfusione (115). Lo shunt porto-cavale inoltre si associa spesso ad un aumento dell'encefalopatia epatica. Se l'encefalopatia persiste ed è mal controllata dalla terapia medica, si lo *shunt* potrà essere chiuso a rigenerazione epatica ultimata.

Anatomia chirurgica del fegato di ratto

Il fegato del ratto è diviso in 4 lobi principali (Figura 5):

- Lobo caudato (CL), che comprende:

- ▲ Processo caudato (CP)
- ▲ Lobo caudato posteriore (PC)
- ▲ Lobo caudato anteriore (AC)

- Lobo destro (RLL), formato da:

- ▲ Lobo superiore destro (SRL)
- ▲ Lobo inferiore destro (IRL)

- Lobo medio (ML), che è composto da due parti:

- ▲ Lobo medio-destro (RML)
- ▲ Lobo medio-sinistro (LML)

- Lobo laterale sinistro (LLL)

In figura si può vedere la disposizione dei vari lobi con le relative percentuali. La tecnica classica per la resezione epatica nel ratto consiste nella legatura *en-bloc* alla base del lobo da asportare. Sebbene questa tecnica sia la più utilizzata, comporta un elevato rischio di lesioni, poiché la legatura può compromettere gli elementi del peduncolo dei lobi adiacenti. L'impiego del ratto come modello sperimentale per la ricerca nell'ambito della chirurgia del fegato ha come limiti la taglia ridotta dell'animale e il fatto che le conoscenze anatomiche sui roditori sono scarse. Esiste inoltre una notevole variabilità interindividuale nella vascolarizzazione e nel sistema biliare. La correlazione tra l'anatomia del fegato del ratto e quella del fegato umano non è ad oggi compresa appieno [132].

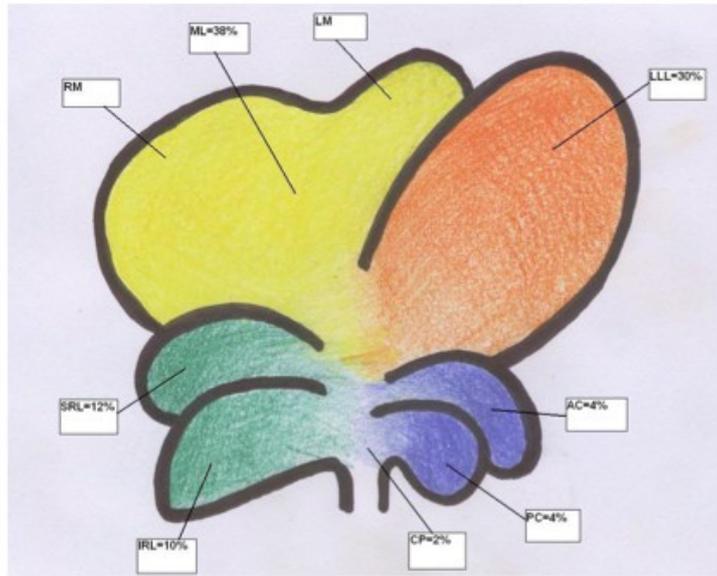


Figura 5: rappresentazione schematica del fegato di ratto con la sua divisione in lobi

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è l'analisi delle variazioni emodinamiche all'ecodoppler del circolo portale e arterioso epatico in corso di resezione epatica maggiore nel ratto e in corso di resezione epatica associata a splenectomia e il loro impatto sul danno parenchimale. Lo studio ha inoltre lo scopo di valutare la correlazione tra espressione della Serpina B3 (inibitore delle serin-proteasi con azione anti-apoptica) e danno cellulare post resettivo in gruppi diversi di animali.

MATERIALI E METODI

Animali

Ad oggi sono stati impiegati 23 ratti Wistar maschi, allevati e stabulati secondo le medesime condizioni. Gli animali avevano un peso medio di 300 grammi (range 210-390g). I ratti, prima di ogni procedura, sono stati mantenuti per almeno 7 giorni in un ambiente a temperatura e luminosità controllate ed avevano libero accesso a cibo ed acqua. Le procedure chirurgiche sono state effettuate in linea con le attuali leggi che regolano la sperimentazione animale con parere favorevole del CEASA (Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale): Progetto n° 11/2012, Protocollo 11280, parere favorevole espresso in data 18/01/2012.

I ratti sono stati suddivisi in 4 gruppi:

- Gruppo A: Resezione epatica del 30%: 5 ratti
- Gruppo B: Resezione epatica > 60%: 8 ratti
- Gruppo C: Resezione epatica > 60% preceduta da splenectomia: 7 animali
- Gruppo D: gruppo di controllo *sham operated* (laparotomia e manipolazione chirurgica dell'ilo epatico): 3 animali

Anestesia

In ciascun animale l'anestesia è stata indotta con sevoflurano per via inalatoria, somministrato a 4ml/min nella fase di induzione e ridotto a 1,5 ml/min durante la fase di mantenimento. L'anestetico è stato miscelato con ossigeno a 0,5L/min durante l'intera procedura. Si è fatto uso di dispositivo "Fluovac" (Harvard Instruments), dedicato per l'anestesia di piccoli animali. Ogni ratto è stato sottoposto a prelievi ematici (T0) dalla coda, (uno dei quali è stato impiegato per il dosaggio di AST, ALT, LDH, ammonio e lattati, l'altro è stato centrifugato e stoccato a -80°), depilazione e disinfezione della cute.

Intervento chirurgico

Dopo anestesia dell'animale è stata eseguita una laparotomia mediana xifo-pubica (Figura 6 A) e la cute è stata fissata tramite punti di trazione per rendere ottimale l'esposizione del campo operatorio. Prima di procedere alla resezione epatica il ratto così

preparato è stato sottoposto ad un'eco-color-doppler (T0) dei vasi epatici e splenici. Successivamente si è proceduto all'intervento chirurgico descritto di seguito.

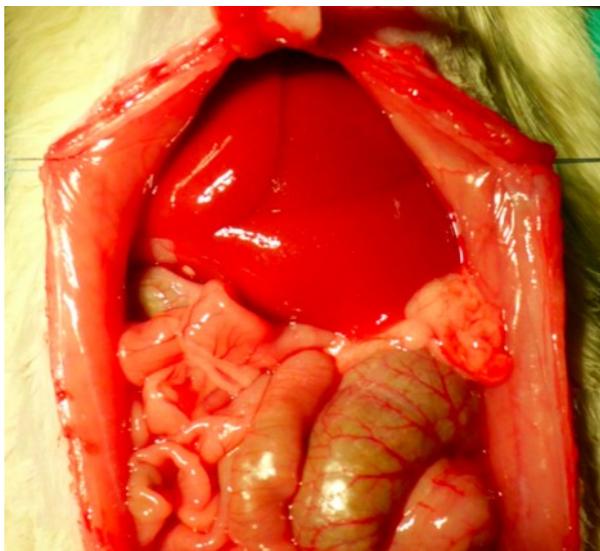
Gruppo A - resezione epatica del 30%: intesa come resezione del lobo epatico laterale sinistro; questo è stato mobilizzato e isolato mediante sezione dei legamenti falciforme ed epatogastrico, mantenendo indenne l'ilo vascolare e biliare. Dopo legatura del lobo mediante filo 5/0, a livello del suo peduncolo vascolare e biliare, si è potuto assistere alla demarcazione del tessuto situato a valle della legatura (Figura 6 B); il lobo è stato pertanto resecato. Il fegato resecato è stato pesato e sottoposto a tre prelievi biotipici (T0), uno di essi è stato conservato in formaldeide al 10%, gli altri 2 venivano posti in provette Eppendorf RNAasi-free e stoccate a -80° previa crioconservazione in azoto liquido.

Gruppo B - resezione epatica > 60%: la resezione dei lobi: laterale sinistro, caudato e destro. È stata attuata la procedura precedentemente descritta a carico del lobo laterale sinistro, in seguito il lobo caudato, composto a sua volta dal caudato anteriore e posteriore e dal processo caudato, è stato isolato dallo stomaco, tramite sezione dei suoi legamenti; inoltre il caudato posteriore, localizzato in sede retrogastrica veniva anteriorizzato ed insieme alle restanti parti che costituiscono il lobo caudato, veniva legato a livello del peduncolo vascolo-biliare e resecato; infine i lobi superiore destro ed inferiore destro sono stati esposti tramite eviscerazione della matassa intestinale, legati singolarmente alla loro base e resecati a loro volta. In questo modo rimaneva in sede esclusivamente il lobo medio, il cui volume si attesta intorno al 35-38% del fegato in toto. Il peso del parenchima epatico resecato ed i prelievi biotipici a carico di quest'ultimo sono stati eseguiti e conservati analogamente al gruppo precedente.

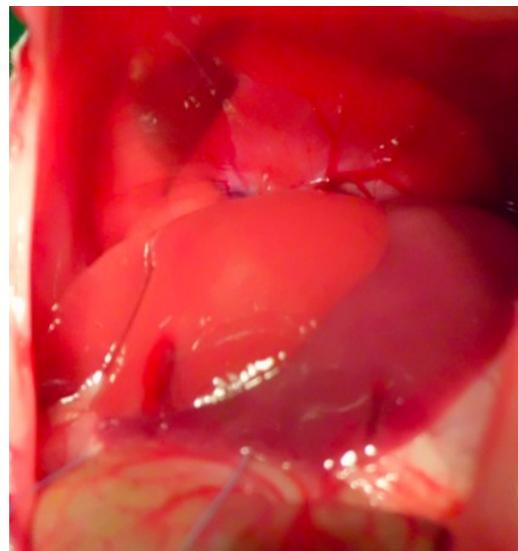
Gruppo C - splenectomia e resezione epatica > 60%: la splenectomia ha preceduto la resezione epatica ed è stata attuata tramite identificazione dei vasi splenici visibili a livello dei due poli della milza; tali vasi sono stati poi sezionati, tra legature. Si è proceduto pertanto a resezione di oltre il 60% del parenchima epatico, come già descritto in precedenza. Il peso del parenchima epatico resecato ed i prelievi biotipici a carico di quest'ultimo sono stati eseguiti e conservati analogamente al gruppo precedente.

Gruppo D - sham operated: gli animali facenti parte di questo gruppo sono stati semplicemente sottoposti a manipolazione chirurgica dell'ilo epatico, in assenza di

resezione epatica o di splenectomia. La procedura chirurgica, anche in assenza della resezione epatica, ha avuto la stessa durata dei gruppi A, B e C e gli animali sono stati, pertanto, esposti al medesimo stress anestesiológico.



A



B

Figura 6: A: Aspetto del fegato di ratto dopo laparotomia mediana. B: demarcazione del lobo laterale sinistro, conseguente alla sua legatura. Il lobo è pronto per essere resecato

Al termine della procedura chirurgica descritta, la chiusura dell'addome veniva garantita mediante sintesi diretta della parete per strati previo lavaggio della cavità addominale e somministrazione di soluzione fisiologica intra-peritoneale. Il ratto è stato riposto in un box opportunamente riscaldato per un tempo di 2 ore ad addome chiuso e senza mai sospendere la somministrazione di anestetico.

Trascorso il tempo di osservazione si procedeva a relaparotomia in tutti e 4 i gruppi, seguita da eco-color doppler (T1) dei vasi epatici e splenici e da prelievi ematici (T1) dalla coda dell'animale o, qualora non attuabili, direttamente dalla vena cava inferiore. L'animale è stato quindi sottoposto ad epatectomia in blocco del fegato residuo, il quale veniva a sua volta pesato e sottoposto a 3 biopsie (T1), che sono state stoccate come le precedenti 3 (T0). Per ciascun ratto sottoposto a resezione epatica il peso del fegato umido residuo è stato sommato al peso del fegato umido resecato, ottenendo così una stima del peso del fegato intero. L'animale, al termine di tali procedure, veniva sacrificato mediante l'utilizzo di CO₂.

Ecografia intra-operatoria

Dopo l'esecuzione di laparotomia mediana è stato eseguito uno studio intra operatorio mediante eco-Doppler epatosplenico, utilizzando un ecografo Vevo2100 (Visualsonics) con sonda ecografica MS-550D (Figura 7), utilizzando un fascio ultrasonoro di frequenza pari a 32 Mhz (Doppler pulsato, PRF= 3kHz). Durante l'esecuzione dell'esame ecografico ciascun ratto è stato fissato in decubito supino su un'apposita piastra riscaldata a 40°C per mantenere una temperatura corporea in media pari nel pre-operatorio a 32,3°C (range 30,5-33,4) e nel post-operatorio a 33,55°C (range 31,0-36,2), e che ha permesso il monitoraggio di frequenza cardiaca (FC pre-operatoria media: 278bpm, range 223-404; post- operatoria media: 317,5bpm, range: 252-432) e frequenza respiratoria (FR pre- operatoria media: 40,4 e range 23-91; post-operatoria media: 41,05 e range: 33- 62); registrando contemporaneamente un tracciato elettrocardiografico di ciascun animale. Per ottenere una buona interfaccia tra sonda e organi da esaminare, la cavità peritoneale di ciascun ratto è stata riempita con una quantità di soluzione fisiologica sterile tale da permettere una buona immersione della sonda ecografica senza compressione dei parenchimi e delle strutture da esaminare.

Con la sonda posizionata a livello del lobo epatico mediano (lobo risparmiato nelle resezioni maggiori) posizionando la sonda trasversalmente è stato misurato il calibro della vena porta a livello ilare subito a monte dell'emergenza del primo ramo portale. In tale scansione è stato misurato anche il calibro della vena cava inferiore. L'arteria epatica è stata valutata a livello ilare mediante una scansione ottenuta ruotando la sonda ecografica di circa 45° dalla scansione trasversale iniziale, da questa sezione posizionando l'animale in lieve Trendelemburg è stato possibile ottenere anche la misurazione della velocità portale. Infine sono state valutate le resistenze spleniche ottenute subito all'interno dell'ilo splenico, allineando la sonda con il diametro longitudinale della milza.



Figura 7: Eco-doppler epato-splenico intra-operatorio

Parametri rilevati

I parametri quantitativi che sono stati rilevati in ciascun animale sono i seguenti:

Vena porta:

- ▲ Diametro (mm) V elocità media (mm/s)
- ▲ Flusso portale: calcolato secondo la formula velocità portale media \times Area di sezione della vena porta (mm³/s)

Arteria epatica

- ▲ PI: indice di pulsatilità arteriosa del ramo arterioso epatico destro, calcolato secondo la formula: $V_{\max} - V_{\min} / V_{\text{media}}$;
- ▲ RI: indice di resistenza arteriosa: $V_{\max} - V_{\min} / V_{\max}$

Arteria splenica

- ▲ PI: indice di pulsatilità arteriosa dell'arteria splenica;
- ▲ RI: indice di resistenza arteriosa.

Valutazione dell'espressione di Serpina B3 in fegato di ratto

L'espressione di Serpinb3 nel fegato di ratto dopo epatectomia è stata valutata attraverso la metodica di Real-time PCR (saggio SYBR green) in tutti gruppi di animali: i risultati di quest'ultimo campione esaminato sono stati considerati come "controllo negativo". Inoltre è stato eseguito il dosaggio su un campione di esofago di ratto, il quale è servito da "controllo positivo".

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da campioni di tessuto, congelato in azoto liquido e successivamente conservato a -80°C , utilizzando RNAeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e seguendo le istruzioni del protocollo di estrazione. 30 mg di tessuto epatico sono stati sospesi in 600 μl di una soluzione di lisi contenente β -mercaptoetanololo e quindi il tessuto è stato completamente distrutto mediante omogenizzazione per 60 secondi (MagNA Lyser, Roche). La sospensione, così ottenuta, è stata incubata con proteinasi K per 10 minuti a 55°C e, dopo centrifugazione e successivi lavaggi con una soluzione di etanolo 70%, il supernatante è stato trasferito in apposite colonnine capaci di legare solo l'RNA estratto. Dopo centrifugazione, il filtrato è stato eliminato e la colonnina eluita con 30 μl di H_2O sterile. L'RNA totale così ottenuto è stato conservato a -80°C e ne è stata valutata la concentrazione ($\text{ng}/\mu\text{l}$) mediante lettura del valore di assorbanza ottenuto tramite spettrofotometro (Nano drop 2000 C) alle λ di 260 nm (quantità RNA totale), di 280 e di 230 nm (il rapporto tra i valori di assorbanza 260/280 e 260/230 indicano il grado di qualità dell'RNA).

Retrotrascrizione dell'RNA totale

Nella fase di retrotrascrizione l'enzima trascrittasi inversa sintetizzava una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA template. Per ogni campione di tessuto, 2 μg di RNA, vengono retrotrascritti in cDNA utilizzando il Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Milano, Italia) e il gradiente di temperatura è consistito in una prima fase a 25°C per 5 minuti, una seconda a 42°C per 30 minuti che attiva la trascrittasi inversa ed una terza a 85°C per 5 minuti al fine di chiudere la reazione.

Real-time PCR (saggio SYBR green)

L'amplificazione mediante Real-time PCR (saggio SYBR Green) è stata eseguita mediante l'apparecchio Light Cycler Apparatus (Roche, Monza, Italy), utilizzando capillari in vetro nei quali il campione è stato miscelato con una mix fornita dal FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit (Roche, Monza, Italy) e contenente una molecola fluorescente (SYBR-Green). Questa molecola fluorescente ha la particolarità di intercalarsi nel doppio filamento di DNA e di emettere fluorescenza solamente quando si

lega al doppio filamento del prodotto di amplificazione della sequenza oligonucleotidica del gene di interesse. Di conseguenza l'aumento del segnale di fluorescenza sarà proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione ottenuto dalla reazione di PCR che corrisponde al valore del ciclo di amplificazione definito Ciclo Soglia o Threshold Cycle (Ct). Infatti, nella reazione di PCR Real-Time, monitorata in tempo reale per 45 cicli, il valore di Ct, utilizzato per quantificare il prodotto della reazione di PCR, corrisponde al ciclo dove l'aumento di fluorescenza risulta essere significativamente maggiore a quello del livello basale (background) misurato nei primi cicli di amplificazione. I primer specifici sono stati disegnati a partire dalla sequenza di Serpinb3-mRNA di ratto pubblicata su GenBank (Accession number NM_001008887.1), producendo le seguenti sequenze: senso: 5'-ATGGTCGATGCTTCAATCC-3'; antisenso: 5'-TGTGGTCCTTGGTGCAGATA-3'. Il prodotto di amplificazione generato consisteva in un frammento di 174 paia di basi. Come gene housekeeping è stato scelto HPRT (Ipoxantina fosforibosil transferasi) ed i primer sono stati disegnati a partire dalla sequenza su GenBank (Accession number NM_012583.2), generando le sequenze oligonucleotidiche: senso: 5'-GGTCCATTCCCTATGACTGTAGATTTT-3'; antisenso: 5'-CAATCAAGACGTTCTTTCCAGTT-3'. Il prodotto di amplificazione generato consisteva in un frammento di 209 paia di basi. Il profilo termico della reazione prevede dopo una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, 45 cicli di amplificazione con le seguenti condizioni: denaturazione a 95°C per 10 secondi, annealing a 60°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 10 secondi. L'amplificazione dei prodotti di trascrizione specifici era confermata dai profili della curva di melting alla fine del processo di amplificazione, le caratteristiche della curva permettono di verificare l'eventuale presenza di dimeri dei primer o la presenza di prodotti aspecifici nella reazione di PCR. La quantificazione dell'espressione del nostro gene di interesse (Serpinb3) è di tipo relativo in quanto viene normalizzata per il gene housekeeping (HPRT) e viene calcolata applicando la formula matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$; dove $-\Delta\Delta Ct = [(Ct (\text{gene di interesse di un campione}) - Ct (\text{HPRT di un campione})) - [(Ct (\text{gene di interesse di un normalizzatore}) - (Ct (\text{HPRT di un normalizzatore}))]$. Per normalizzatore viene definito un campione il cui valore di espressione corrisponde a 1. HPRT è stato scelto come gene housekeeping per la quantificazione relativa in quanto la sua espressione permane stabile nelle nostre condizioni sperimentali.

Valutazione morfologica

Per valutare le alterazioni e l'entità del danno riportato dagli epatociti in seguito alla resezione epatica, le biopsie epatiche T0 e T1 conservate in formaldeide, sono state analizzate istologicamente (Gruppo B, C e D). Per valutare la presenza di apoptosi è stata applicata la metodica TUNEL su alcuni casi di epatectomia >60%-gruppo B (2) e con splenectomia associata-gruppo C (2). Inoltre un prelievo bioptico T1 del gruppo D è stato analizzato in maniera analoga e preso come campione di riferimento.

Analisi istologica

Nello studio istologico le biopsie, fissate in una soluzione al 10% di formalina neutra tamponata, sono state progressivamente disidratate nella serie scalare degli alcoli e incluse in paraffina. Sezioni di circa 4-5µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina e su queste si è andati a valutare la congestione, l'infiammazione, l'edema e la necrosi; abbiamo valutato inoltre la carica glicogenica su sezioni con colorazione PAS. I dati sono stati espressi secondo uno score semi-quantitativo che va da 0 a 3.

TUNEL (Terminal deoxy-nucleotidil-transferase-mediated deoxyUridine triphosphate Nick-End Labelling)

Il TUNEL è una metodica che consente di valutare "in situ" la frammentazione del DNA tipica del processo apoptotico. Sezioni di tessuto incluso in paraffine (4- 5µm) sono state pretrattate con proteinasi K (20µg/mL; *Boehringer Mannheim*) per 10 minuti a temperatura ambiente, allo scopo di rompere i legami crociati formati tra le proteine e il fissativo aldeidico utilizzato. Le sezioni sono state poi incubate in una camera umida a 37°C per 60 min con Deossinucleotidil Transferasi Terminale (TdT) (0,3 U/ul) e digossigenina-11- dUTP (*Boehringer Mannheim*) in una soluzione tampone (Buffer TdT: 30 mM Trizma Base, pH:7,2, 140 mM Sodio Cacodilato, 1 mM Cloruro di Cobalto). Prima della colorazione con diaminobenzidina, le sezioni sono state incubate con un anticorpo anti-digossigenina coniugato con la perossidasi (*Boehringer Mannheim*), diluito in un tampone contenente Fosfato (diluizione 1:50). Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua bidistillata e reagenti privi di ogni contaminazione di DNAsi, per evitare risultati falsi-positivi. Come controllo positivo, sezioni di ciascuna biopsia sono state incubate per 10 min con 0,7 mg/dL di DNAsi I (*Boehringer*

Mannheim) e trattati come descritto nel protocollo precedente. Il TdT è stato omesso nei controlli negativi. Il TUNEL è stato ripetuto almeno tre volte per ciascun caso al fine di confermare i dati ottenuti. La valutazione TUNEL è stata eseguita senza conoscere il gruppo di appartenenza degli animali. La presenza e l'entità dell'apoptosi sono state valutate con metodo quantitativo, come percentuale di cellule apoptotiche presenti in 4 campi microscopici, contenenti circa 300 cellule.

ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

È stato eseguito un confronto tra tutti i gruppi dei valori basali e post-intervento degli esami ematochimici e dei parametri Doppler; in un secondo tempo all'interno di ciascun gruppo sono stati confrontati i dati pre e post intervento. Vista la numerosità campionaria e l'assenza di distribuzione gaussiana, i dati raccolti sono stati studiati con il Mann-Whitney test, per il confronto tra due gruppi e il test di Kruskal-Wallis seguito dal Dunn post test per il confronto tra più gruppi. Sono stati considerati significativi valori di p inferiori a 0.05.

Anche i risultati basali e finali del dosaggio dell'RNA di Serpina B3, sono stati confrontati utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney per l'analisi delle mediane. Il livello di significatività dei dati è stato fissato per un valore di $p < 0.05$. Tutte le analisi sono state svolte con il software GraphPad InStat (San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Esami Biomorali

Abbiamo eseguito il dosaggio delle transaminasi (AST,ALT), LDH, ammonio e acido lattico.

AST-ALT: nel gruppo B esiste un aumento significativo dei valori plasmatici mediani postoperatori rispetto a quelli preoperatori di AST ($P= 0,001$) e ALT ($P=0,0078$), cosa che non abbiamo riscontrato nei gruppi A, C e D se si fa eccezione delle ALT nel gruppo C (Fig. 8). Dall'analisi statistica dei valori relativi a coppie di gruppi si è riscontrata una differenza significativa tra i valori di AST nel gruppo B rispetto al gruppo D e lo stesso si è osservato per le ALT. Nel caso di queste ultime esiste anche una differenza significativa tra i gruppi C e D (Fig. 9-10).

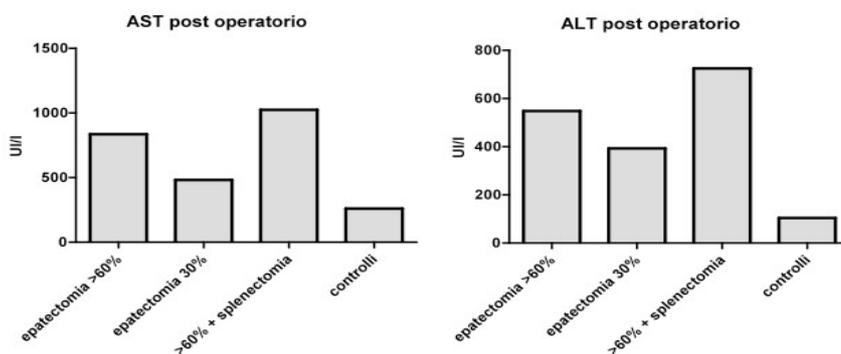


Figura 8: AST e ALT a 2 ore dalla procedura chirurgica

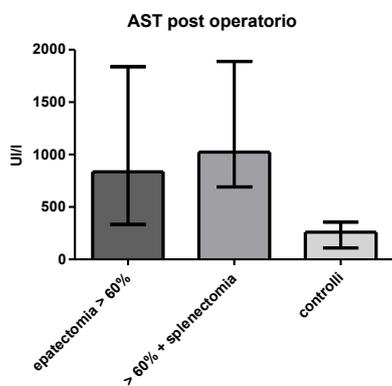


Figura 9: Confronto AST a 2h gruppo B e C; $p=0,0166$

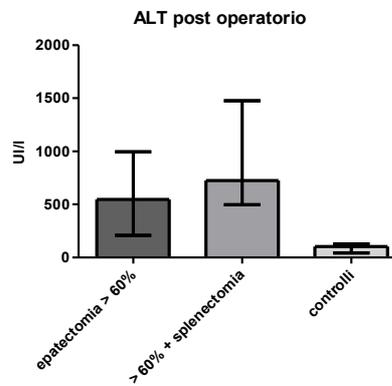


Figura 10: Confronto ALT a 2h gruppo B e C; $p=0,0074$

LDH: questo parametro ha un andamento diverso rispetto alle transaminasi, esso infatti

ha mostrato solo un aumento significativo ($p=0,0156$) tra il pre ed il post-operatorio nel gruppo C dove esso è risultato essere il più elevato.

Acido lattico e ammonio: I valori che abbiamo riscontrato in questi due parametri non hanno mostrato differenze significative ne' dal confronto tra il pre-operatorio ed il post-operatorio in ciascun gruppo, ne' dal confronto tra i valori post-operatori nei diversi gruppi. Si segnala tuttavia che i dati relativi ad acido lattico ed ammonio risultano poco attendibili a causa dell'additivo utilizzato al momento del prelievo.

Flussimetria-Doppler

Velocità portale: le variazioni riscontrate nella velocità portale tra il pre ed il post operatorio all'interno di ciascun gruppo non presentano differenze significative. Il confronto delle velocità mediane del sangue portale post intervento chirurgico nei gruppi A, B, C e D mostra come nei controlli la mediana della velocità portale postoperatoria sia complessivamente maggiore rispetto ai gruppi con resezione del 30%, >60% e >60% con splenectomia (Fig. 11). Le differenze sottolineate non raggiungono la significatività statistica ne' quando si considerano coppie di gruppi, ne' ad una valutazione complessiva.

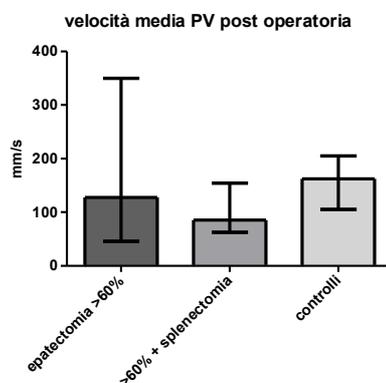


Figura 11: Confronti nei vari gruppi tra velocità media PV dopo resezioni a 2h ($p=NS$)

Diametro portale (Fig. 12): i valori mediani del diametro portale non hanno mostrato variazioni significative tra il pre ed il post-operatorio all'interno di nessun gruppo e dal confronto tra i diametri portali mediani dei diversi gruppi nel periodo post-operatorio non sono emerse differenze significative. Si è assistito ad una lieve diminuzione del diametro portale nei ratti sottoposti a resezione epatica >60% associata a splenectomia, confrontando il pre ed il post-operatorio, ma la significatività di tale fenomeno non è

stata valutabile a causa dell'insufficiente numerosità del campione.

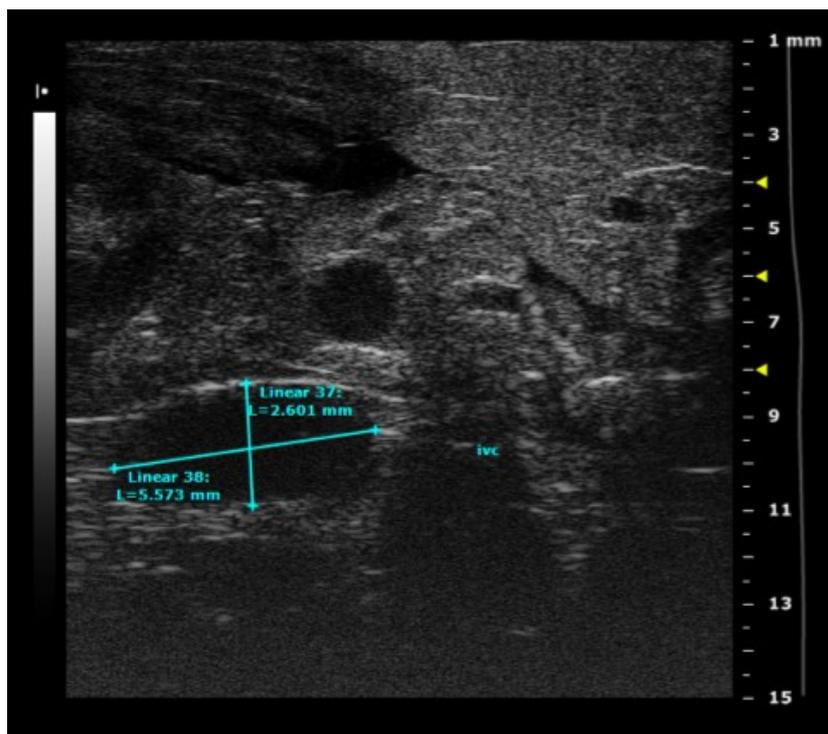


Figura 12: esempio di misurazione del diametro portale

Flusso portale: abbiamo deciso di valutare il flusso della vena porta sia in termini assoluti, sia in relazione alla quantità di parenchima epatico presente al momento della misurazione. Il flusso portale standardizzato per il peso del fegato è stato ottenuto dividendo il flusso rilevato in ciascun animale per il peso del fegato: nel pre-operatorio si è considerato il fegato intero, nel post-operatorio il fegato residuo.

Flusso assoluto (Fig. 13): è risultato un aumento del flusso portale assoluto mediano con significatività $p=0,05$ nei ratti appartenenti al gruppo B, mentre nessun incremento significativo è stato rilevato nei flussi assoluti misurati negli altri gruppi. Negli animali sottoposti a splenectomia il flusso portale ha mostrato una riduzione nel post-operatorio rispetto al pre-operatorio, in linea con il fatto che l'apporto splenico al flusso portale è stato rimosso. I flussi portali presenti nel post-operatorio nei vari gruppi sono stati messi a confronto: il valore mediano del flusso nel gruppo B è risultato essere il maggiore, seguito, nell'ordine, da quello nel gruppo D, A e C.

I valori mediani del flusso portale per unità di parenchima epatico (Fig. 14) non hanno mostrato variazioni di entità significativa tra il pre ed il post-operatorio in nessuno dei gruppi considerati, ma dal confronto fra gruppi nel periodo post-operatorio è risultato un flusso maggiore/grammo di parenchima nel gruppo B, seguito nell'ordine dal gruppo C,

D e A.

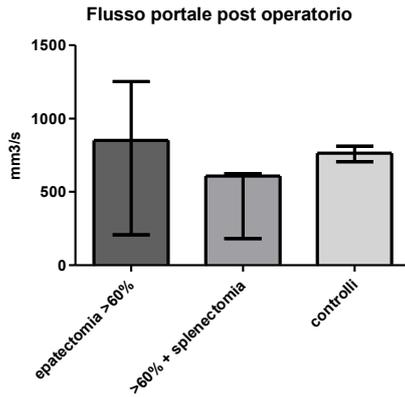


Figura 13: flusso portale assoluto a 2h; p=NS

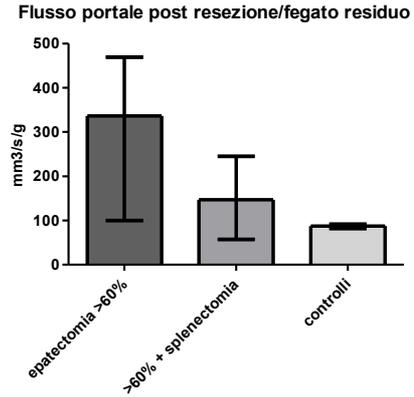


Figura 14: flusso portale a 2h per unità di peso di fegato residuo; p=NS

Resistenze arteriose epatiche (Fig. 15): per le valutazioni emodinamiche eseguite sull'arteria epatica (HA), si è scelto di considerare l'indice di pulsatilità (PI) e di resistenza (RI). Significativo è l'aumento dell'PI e RI dopo resezione epatica del 60%. Nei ratti sottoposti a resezione epatica del 60% associata a splenectomia si invece una riduzione della PI e RI. Tale variazione non raggiunge significatività statistica.

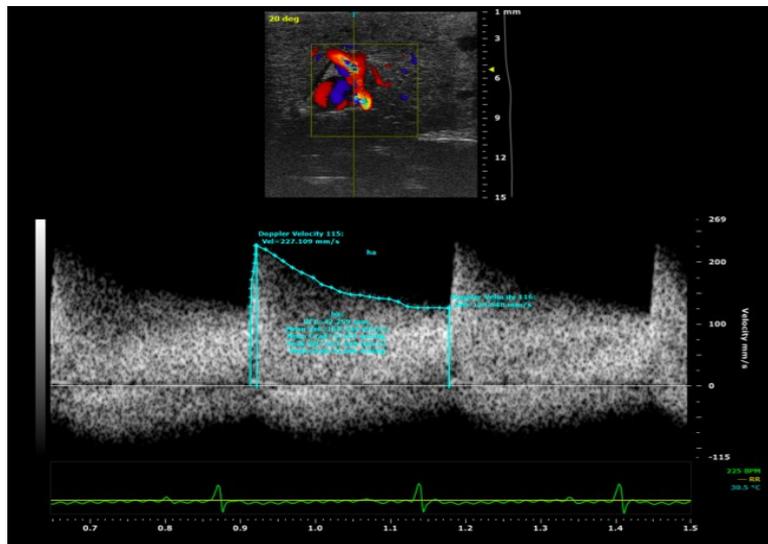


Figura 15: Misurazione di PI e RI dell'arteria epatica

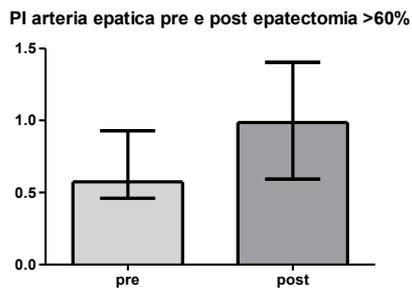


Figura 16: HA IP prima e dopo epatectomia 60%; p=0,0156

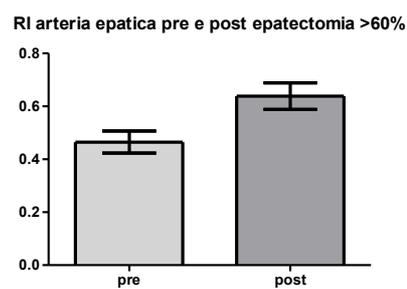


Figura 17: HA IR prima e dopo epatectomia 60%; p=0,0156

PI arteria epatica pre e post epatectomia >60% +splenectomia

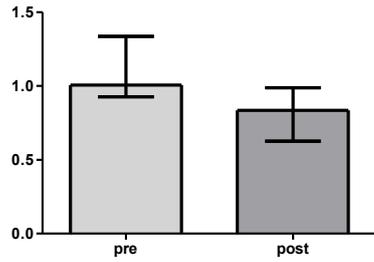


Figura 17: HA IP prima e dopo epatectomia 60%+ splenectomia

RI arteria epatica pre e post epatectomia >60% +splenectomia

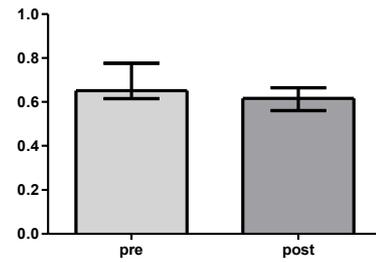


Figura 18: HA IR prima e dopo epatectomia 60%+ splenectomia

Resistenze arteriose spleniche: questi parametri possono riflettere il grado di ipertensione portale e dai risultati da noi ottenuti si può evincere che solo nel gruppo B c'è stato un aumento di PI ed RI dell'arteria splenica, tale differenza raggiunge significatività statistica. Il confronto tra i valori mediани ottenuti nei vari gruppi nel periodo post-operatorio non ha evidenziato differenze significative correlate all'estensione della resezione epatica (Fig. 19-20).

PI arteria splenica pre e post epatectomia > 60%

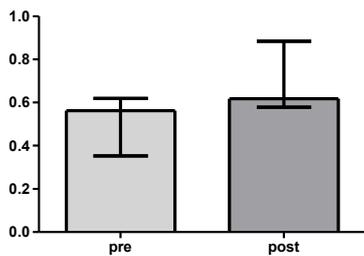


Figura 19: SA IP prima e dopo resezione epatica del 60%; p= 0,0313

RI arteria splenica pre e post epatectomia >60%

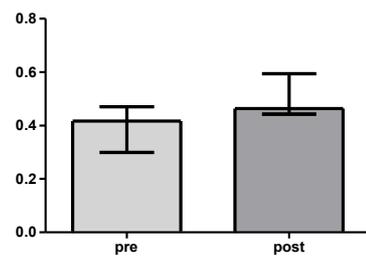


Figura 20: SA IR prima e dopo resezione epatica del 60%; p=0,0355

Espressione di Serpina B3

Nei gruppi A, B e C si è voluto considerare la differenza di espressione basale e finale (T0 e T1) di serpina. Quello che si è riscontrato è un aumento dell'espressione mediana di Serpina nel gruppo B (p=0,03), mentre negli altri due gruppi l'aumento non è stato significativo (Fig. 21).

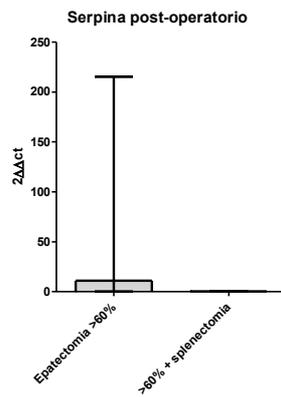


Figura 21: Espressione di Serpinb3-mRNA, valutata mediante Real-time PCR, in fegato di ratto sottoposto a epatectomia 60% vs epatectomia 60% + splenectomia. $P=0,03$ – Mediana: Epatectomia > 60% = 10.78 SD = 93,28568
Mediana>60% + splenectomia =0 SD = 0,792501

Analisi morfologica ed apoptosi

Al fine di valutare il danno parenchimale epatico abbiamo eseguito l'analisi istopatologica dei campioni di fegato prelevati al momento dell'intervento chirurgico (T0) e dopo 2h (T1). I due gruppi che abbiamo analizzato sono il B ed il C ed i parametri considerati sono:

- Congestione vascolare
- Infiammazione
- Edema
- Necrosi
- Carica glicogenica

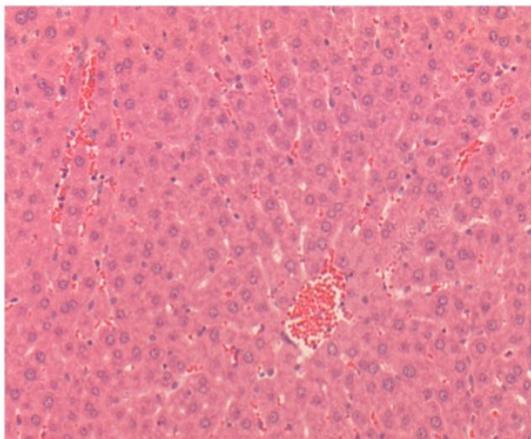


Figura 22: resezione epatica >60%: Lieve edema score 1 (10%) discreta congestione: score 2 (40%). EE : Ingrandimento originale 20X

Inoltre si è eseguita la metodica TUNEL su due prelievi a T0 e due a T1 per ciascun

gruppo, al fine di valutare l'indice apoptotico. Nel gruppo B, dal punto di vista istologico si è riscontrata una diminuzione della carica glicogenica nei campioni prelevati 2 ore dopo l'intervento, rispetto ai valori iniziali (Fig. 22); sempre in questo gruppo, inoltre, un individuo ha mostrato un lieve incremento della congestione tissutale.

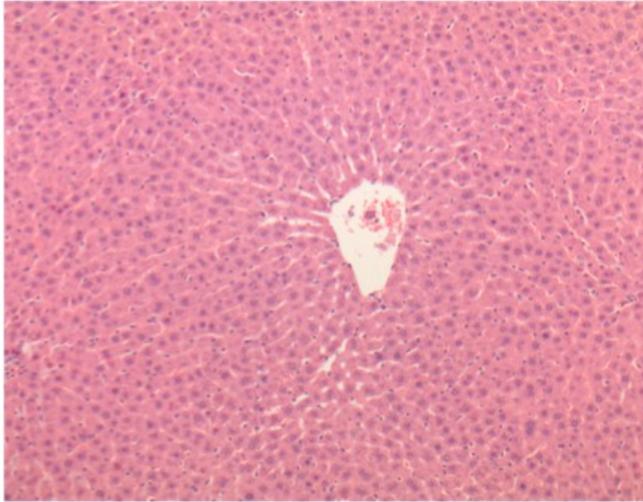
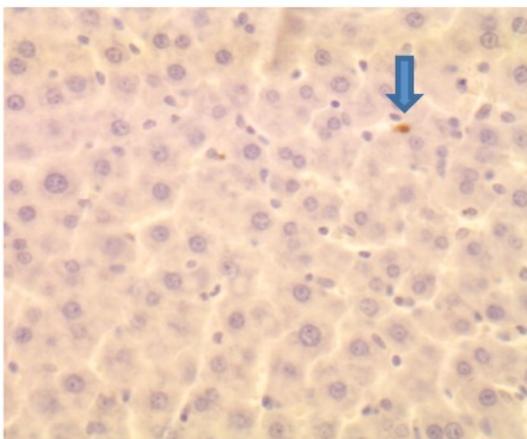


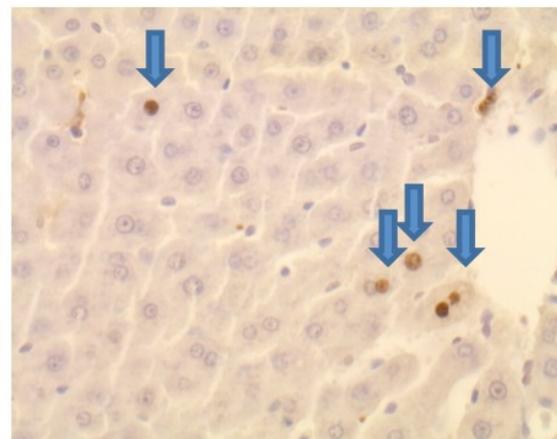
Figura 23: resezione epatica >60%+ splenectomia: Lieve edema: score 1 (10%) Lieve congestione: score 1 (30%). EE : Ingrandimento originale 20X

Nel gruppo C, analogamente a quanto riportato relativamente al gruppo B, sembra esserci una complessiva riduzione della carica glicogenica da T0 a T1 (Fig. 23).

I dati relativi all'indice apoptotico (IA), sebbene la loro numerosità sia piuttosto esigua, sembrerebbero indicare un aumento dell'IA tra T0 e T1 nel gruppo C, fenomeno che avviene in misura minore nel gruppo B (Fig. 24A-B). I valori dell'IA a 2 ore dall'intervento chirurgico sono inoltre maggiori nel gruppo C rispetto al B.



A



B

Figura 24: **A:** resezione epatica >60%:TUNEL:1% Ingrandimento Originale 60X. **B:** resezione epatica >60%+ splenectomia: TUNEL: 5% Ingrandimento Originale 60X

DISCUSSIONE

Il fegato ha una capacità unica che consiste nel riuscire a regolare la propria massa dopo resezione chirurgica o dopo perdita di parte delle cellule causata da sostanze chimiche o virus. L'aumento del flusso sanguigno per grammo di fegato immediatamente dopo resezione comporta un aumento dello *shear stress* intraepatico che sembra essere coinvolto nello stimolo e regolazione della rigenerazione. Un iperafflusso portale tuttavia sembra determinare un serio danno epatico a causa dell'elevato *shear stress* intraparenchimale. Si associa modulazione delle resistenze dell'arteria che all'iperafflusso portale risponde con un aumento delle resistenze (si parla di risposta *buffer* dell'arteria) con conseguente ipossiemia. Questo fenomeno è stato studiato prevalentemente nel trapianto di fegato parziale da donatore vivente o cadavere e nei soggetti sottoposti a resezioni epatiche estreme. Ne risulta una sindrome definita come *Small for Size* che si associa a grave morbilità e mortalità. Per prevenire questo tipo di sindrome si è focalizzata l'attenzione sulla modulazione del flusso portale attraverso il confezionamento di shunt porto-cavali, l'embolizzazione dell'arteria splenica, la splenectomia.

Come già dimostrato in altri studi (111), e confermato nel nostro, la simultanea splenectomia e ed epatectomia nel ratto produce una riduzione del flusso portale. Tale riduzione è una conseguenza del mancato apporto sanguigno portale dalla milza che ne è responsabile fino al 52% (117). In tali soggetti si assiste ad una concomitante riduzione delle resistenze arteriose, come ci si aspetterebbe nella risposta *buffer* dell'arteria, aumento del flusso arterioso e aumento dell'ossigenazione tissutale. Nel nostro studio confrontando i gruppi sottoposti a resezione epatica al 60% e simultanea resezione e splenectomia abbiamo dimostrato un aumento significativo di PI e RI nel primo dei due gruppi mentre una riduzione di PI e RI nel secondo gruppo seppure senza raggiungere una significatività statistica. Valutando i parametri bioumorali l'evidenza che AST e ALT siano aumentate significativamente nel gruppo di ratti sottoposti a resezione epatica > 60% (gruppo B), ma che i loro valori appaiano elevati anche nel gruppo di animali sottoposti a resezione epatica 60% + splenectomia (gruppo C) contrasta con l'ipotesi che la splenectomia sia protettiva nei confronti del tessuto epatico residuo. Tuttavia, anche in uno studio analogo di Di Domenico et al. (112) i valori di transaminasi nei ratti sottoposti a resezione epatica e splenectomia appaiano comparabili con i valori ritrovati nei ratti sottoposti soltanto a resezione.

Nei preparati istopatologici a 2 ore dall'intervento chirurgico non abbiamo potuto

riscontrare significativa necrosi ma solo un edema più marcato nei fegati sottoposti a resezione al 60% rispetto a quelli con simultanea splenectomia. L'edema è ascrivibile all'iperafflusso portale nei primi mentre l'assenza della necrosi potrebbe essere legato al fatto che nel nostro modello abbiamo praticato una resezione del 60% che normalmente è ben tollerata dal ratto e in cui i fenomeni necrotici non si estrinsecano .

Lo scopo del nostro studio , oltre al valutare l'impatto delle modificazioni emodinamiche sui flussi epatici e sul possibile danno parenchimale, ha valutato l'espressione della Serpina B3 nelle cellule epatiche dei differenti gruppi di animali. Questa proteina con la sua capacità di inibire le serin- proteasi ha un effetto antiapoptotico ed è iperespressa in alcuni tipi di cancro come l'epatocarcinoma e in condizioni fisiologiche non espressa nel fegato. Sebbene da uno studio precedente su resezioni epatiche del 30% nel topo non sia stata riscontrata alcuna iperespressione di Serpina B3 nel fegato residuo (61), ci siamo riproposti di eseguire questa valutazione nell'ambito di resezioni epatiche maggiori (60%) nel ratto, nell'ipotesi che questa proteina potesse essere iperespressa in situazioni di maggior decurtamento parenchimale. Nel gruppo B si assiste appunto ad un'iperespressione di Serpina B3 come conseguenza dello stimolo dovuto all'iperafflusso portale. L'espressione di tale proteina non è presente invece nel gruppo sottoposto a simultanea resezione e splenectomia forse proprio per il fatto che in tali animali si previene l'iperafflusso portale. L'effetto antiapoptotico della Serpina B3 viene confermato dal Tunel che dimostra una maggiore apoptosi nel gruppo sottoposto a resezione del 60% e concomitante splenectomia rispetto a quello sottoposto alla sola resezione del 60%. La spiegazione a questo comportamento dell'espressione della Serpina B3 e di una meno evidente apoptosi nel gruppo sottoposto alla sola resezione epatica del 60% potrebbe essere che l'iperafflusso portale conseguente all'epatectomia determina un'attivazione dei meccanismi di rigenerazione e di protezione dalla morte cellulare più marcato di quanto succeda nel gruppo con simultanea splenectomia. In questi ratti tale manovra, comportando una riduzione della flusso portale, ha effetto protettivo sul danno parenchimale non stimolando i meccanismi di protezione cellulare dalla morte programmata. Di conseguenza i fenomeni apoptotici sono più evidenti.

Questo studio presenta una serie di limitazioni che dovranno essere affrontate e risolte in futuro.

- La numerosità pesa molto sulla significatività dei risultati non sempre evidente nonostante quanto descritto in letteratura.
- Le analisi eseguite sull'emodinamica e sui preparati patologici come pure l'espressione della Serpina B3 sono state effettuate a 2h dalla resezione. Da studi di Lee et al del

1999 (116) l'apoptosi nel fegato di ratto sottoposto a resezione del 70% ha un picco nella prima ora per poi ridursi significativamente nelle ore successive. Il nostro studio, potrebbe non aver fotografato gli effetti del flusso sulla morte cellulare programmata nei diversi gruppi nel momento più idoneo. Inoltre i meccanismi di attivazione della rigenerazione e di protezione della cellula, anche a livello mitocondriale, sono più evidenti nella prima ora dopo l'epatectomia (118). Nello studio di Di Domenico i preparati istologici vengono analizzati dopo 6 ore con evidenza di apoptosi nel gruppo sottoposti a resezione epatica, cosa che non si nota nel gruppo dei ratti sottoposti a simultanea resezione e splenectomia.

Il passo successivo sarà quello di ampliare lo studio valutando l'espressione di IL-6 e TNF Alfa nei vari gruppi di ratti e correlando questi risultati con quelli della Serpina B3 e con l'apoptosi e la proliferazione cellulare attraverso l'uso di anticorpi anti Ki67/MIB1.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Lory J, et al.: The pathology of the atrophy/hypertrophy complex (AHC) of the liver: a light microscopic and immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 9 (3):541-554 1994
- 2- Clavien PA, et al.: Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 356 (15):1545-1559 2007
- 3- Belghiti J, et al.: Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg.* 191 (1):38-46 2000
- 4- McCormack L, et al.: Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg.* 245 (6):923-930 2007
- 5- Grisham JW: Cellular proliferation in the liver. *Recent Results Cancer Res.* 17:28-43 1969
- 6- Widmann JJ, Fahimi HD: Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver: a light and electron microscopic cytochemical study. *Am J Pathol.* 80 (3):349-366 1975
- 7- Pomfret EA, et al.: Liver regeneration and surgical outcome in donors of right-lobe liver grafts. *Transplantation.* 76 (1):5-10 2003
- 8- Ibrahim S, et al.: Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg.* 29 (12):1658-1666 2005
- 9- Stocker E, Heine WD: Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol.* 144 (4):400-408 1971
- 10- Fausto N, Campbell JS: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 120 (1):117-130 2003

- 11- Yan Y, et al.: Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int.* 29 (3):356-365 2009
- 12- Taub R: Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5 (10):836-847 2004
- 13- Streetz KL, et al.: Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut.* 47 (2):309-312 2000
- 14- Fujita J, et al.: Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery.* 129 (1):48-54 2001
- 15- Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo J, Koniaris LG: Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration. *Hepatology.* 2003; 38: 326–34
- 16- García-Trevijano ER, et al.: NO sensitises rat hepatocytes to proliferation by modifying S-adenosylmethionine levels. *Gastroenterology* 2002; 122: 1355–1363
- 17- Rai RM, et al.: Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13829–13834
- 18- Li W, et al.: STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem.* 277 (32):28411-28417 2002
- 19- Taub R: Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest.* 112 (7):978-980 2003
- 20- Selzner M, et al.: Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology.* 32 (6):1280-1288 2000
- 21- Kooby DA, et al.: Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg.* 7 (8):1034-1044 2003
- 22- Kuramitsu K, et al.: Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am J Pathol.* 2013 Jul;183(1):182-94.

- 23- Lee FYJ, et al.: Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1999; 29:677-687
- 24- Sakamoto T, et al.: Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 29: 403-411
- 25- Helling TS, et al.: Partial hepatectomy with or without endotoxin does not promote apoptosis in the rat liver. *J Surg Res* 2004; 116: 1-10
- 26- Kerr JF: Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20
- 27- Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130
- 28- Rosser BG, Gores GJ: Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-275
- 29- Patel T, Gores GJ: Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1741
- 30- Cotter TG, al-Rubeai M: Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 150-155
- 31- Galle PR: Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 1997; 27: 405-412
- 32- Bruccoleri A, et al.: Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 1997; 25: 133-141
- 33- Desbarats J, Newell MK: Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nature Med* 2000; 6: 920-923
- 34- Madesh M, Hajnoczky G: VDAC-dependent permeabilization of the outer

mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 2001; 155: 1003-1015

35- Slee EA, et al.: Ordering the cytochrome C-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9- dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144: 281-292

36- Ermak G, Davies KJ: Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 2002; 38: 713-721

37- Helling TS, Liver failure following partial hepatectomy, *HPB*, 2006; 8: 165-174

38- Silverman, G. A. *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions and a revised nomenclature. *J Biol Chem* **276**, 33293–33296 (2001).

39- Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **102**, 4751–4804 (2002)

40- Silverman, G. A. *et al.* Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci* **61**, 301–325 (2004).

41- Schick, C. *et al.* Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258–5266 (1998).

42- Masumoto, K. *et al.* Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1. *J Biol Chem* **278**, 45296–45304 (2003).

43- Sakata, Y. *et al.* The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p1. *J Biol Chem* **279**, 5081–5087 (2004).

44- Kato, H. & Torigoe, T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical

squamous cell carcinoma. *Cancer* **40**, 1621–1628 (1977).

45- Suminami, Y. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 51–58 (1991).

46- Turato, C. *et al.* Over-expression of SERPINB3 in hepatoblastoma: A possible insight into the genesis of this tumour? *Eur J Cancer* **48**, 1219–1226 (2012).

47- Chechlinska, M. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 expression in cultured normal peripheral blood mononuclear cells and in vulvar squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* **31**, 559–567 (2010).

48- Takeshima, N. *et al.* Expression of mRNA of SCC antigen in squamous cells. *Tumour Biol* **13**, 338–342 (1992).

49- Cataltepe, S. *et al.* Co-expression of squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 in normal adult tissues and squamous cell carcinomas. *J Histochem Cytochem* **48**, 113–122 (2000).

50- Beneduce, L. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* **103**, 2558–2565 (2005).

51- Pontisso, P. *et al.* Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **119**, 735–740 (2006).

52- Murakami, A. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* **84**, 851–858 (2001).

53- Hashimoto, K. *et al.* Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF- α -induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Tumor Biol* **26**, 165–172 (2005).

54- Quarta, S. *et al.* SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* **221**, 343–356 (2010).

- 55- Calabrese, F. *et al.* Overexpression of squamous cell carcinoma antigen in idiopathic pulmonary fibrosis: clinico-pathological correlations. *Thorax* **63**, 795–802 (2008).
- 56- Lunardi, F. *et al.* Overexpression of Serpinb3 promotes epithelial proliferation and lung fibrosis in mice. *Lab Invest* **9**, 945–954 (2011).
- 57- Kountouras, J., Zavos, C. & Chatzopoulos, D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* **50**, 242–249 (2003).
- 58- Villano G, *et al.*: SERPINB3 is associated with longer survival in transgenic mice. *Sci Rep.* 2013 Oct 28;3:3056.
- 59- Hashimoto K, *et al.*: Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF-alpha-induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Tumour Biol* 2005; 26: 165–172
- 60- Katagiri C, *et al.*: Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2 terminal kinase. *J Cell Biol* 2006; 172: 983-990
- 61- Villano G, *et al.*: Role of squamous cell carcinoma antigen-1 on liver cells after partial hepatectomy in transgenic mice. *Int J Mol Med* 2010; 25: 137-143
- 62- Condon RE, *et al.*: Hepatic arterial and portal venous pressure–flow relationships in isolated, perfused liver. *Am J Phys.* 202:1090-1094 1962
- 63- Knisley MH, *et al.*: Hepatic sphincters: brief summary of present-day knowledge. *Science.* 125:1023-1026 1957
- 64- Bauer M, *et al.*: ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol.* 267:G143-G149 1994
- 65- Pinzani M, *et al.*: Fat-storing cells as liver-specific pericytes: spatial dynamics of

- agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest.* 90:642-646 1992
- 66- Zhang JX, *et al.*: Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 266:G624-G632 1994
- 67- Greenwel P, *et al.*: Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers: differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest.* 65:644-653 1991
- 68- Martinez-Hernandez A, Amenta PS: The hepatic extracellular matrix: I. Components and distribution in normal liver. *Virchow Arch A Pathol Anat Histopathol.* 423:1-11 1993
- 69- Bauer C, *et al.*: Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J Hepatol.* 27:1089-1095 1997
- 70- Lauth WW: Role and control of the hepatic artery. In: Lauth WW, editor. *Hepatic circulation in health and disease.* New York: Raven Press, 1981: 203- 226
- 71- Lauth WW, Greenway CV: Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology* 1987; 7: 952-963
- 72- Lauth WW: The hepatic artery: subservient to hepatic metabolism or guardian of normal hepatic clearance rates of humoral substances. *Gen Pharmacol* 1977; 8: 73-8
- 73- Ebbing C, *et al.*: Hepatic artery hemodynamics suggest operation of a buffer response in the human fetus. *Reprod Sci.* 15:166-178 2008
- 74- Lauth WW, *et al.*: Quantitation of the hepatic arterial buffer response to graded changes in portal blood flow. *Gastroenterology* 1990; 98: 1024-1028
- 75- Lauth WW: Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc* 1983; 42: 1662-1666
- 76- Lauth WW, Legare DJ, d'Almeida MS: Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* 1985; 248: H331- H338

77- Lauth WW, Legare DJ. The use of 8-phenyltheophylline as a competitive antagonist of adenosine and an inhibitor of the intrinsic regulatory mechanism of the hepatic artery. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 717-722

78- Lauth WW: Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepato-renal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatology Research* 2007; 37: 891–903

79- Morsiani E, *et al.*: Increased sinusoidal wall permeability and liver fatty change after two-thirds hepatectomy: an ultrastructural study in the rat. *Hepatology*. 21:539-544 1995

80- Rice GC, *et al.*: Liver tissue blood flow measured by ⁸⁵Kr clearance in the anaesthetized rat before and after partial hepatectomy. *Br J Exp Pathol*. 58:243-250 1977

81- Mathie RT, Blumgart LH: Hepatic tissue perfusion studies during partial hepatectomy in man. *Surg Gastroenterol*. 1:297-302 1982

82- Mann FC: The William Henry Welch Lectures. II. Restoration and pathologic reactions of the liver. *J Mt Sinai Hosp*. 11:65-74 1944

83- Kin Y, Nimura Y, *et al.*: Doppler analysis of hepatic blood flow predicts liver dysfunction after major hepatectomy. *World J Surg* 1994; 18: 143–149

84- Niiya T, *et al.*: Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999; 6: 275–80

85- Troisi R, *et al.*: Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1397-1404

86- Fukauchi T, *et al.*: Effects of portal-systemic shunt following 90% partial

hepatectomy in rats. *J Surg Res.* 2000; 89: 126–31

87- Smyrniotis V, *et al.*: Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int* 2002; 15: 355-360

88- Kelly DM, *et al.*: Adenosine restores the hepatic artery buffer response and improves survival in a porcine model of small-for-size syndrome. *Liver Transpl* 2009; 15: 1448- 1457

89- Rahbari NN, *et al.*: Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 2011;149:713–724.

90- Jarnagin WR, *et al.*: Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236: 397–407

91- Balzan S, *et al.*: The "50-50 criteria" on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. *Ann Surg* 2005; 242: 824-828; discussion 828-829

92- Paugam-Burtz C, *et al.*: Prospective validation of the 'fifty-fifty' criteria as an early and accurate predictor of death after liver resection in intensive care unit patients. *Ann Surg* 2009;249:124–128

93- Kiuchi T, *et al.*: Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999; 67: 321 - 327.

94- Sugawara Y, *et al.*: Small-for-size grafts in living-related liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2001;192:510-513.

95- Dahm F, *et al.*: Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005; 5 2605-2610

96- Yagi S, Uemoto S. Small-for-size syndrome in living donor liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012 Dec 15;11(6):570-6.

- 97- Hemming AW, *et al.*: Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg.* 2003;237 (5):686–91; discussion 691–3
- 98- Capussotti L, *et al.*: Portal vein ligation as an efficient method of increasing the future liver remnant volume in the surgical treatment of colorectal metastases. *Arch Surg.* 2008;143(10):978–82; discussion 982.
- 99- Ribero D, *et al.*: Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg.* 2007;94(11):1386–1394.
- 100- Yoo H, *et al.*: sequential transcatheter arterial chemoembolization and portal vein embolization versus portal vein embolization only before major hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010;18 (5):1251–1257.
- 101- Ogata S, *et al.*: Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 2006;93(9):1091–1098.
- 102- Adam R, *et al.*: Two- stage hepatectomy: a planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg.* 2000;232(6):777–785.
- 103- Schnitzbauer AA, *et al.*: Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended righthepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg.* 2012;255 (3):405–414.
- 104- Scatton O, *et al.*: Impact of localized congestion related to venous deprivation after hepatectomy. *Surgery.* 2008;143(4):483–489.
- 105- Akamatsu N, *et al.*: Effects of middle hepatic vein reconstruction on right liver graft regeneration. *Transplantation.* 2003;76(5):832–837.
- 106- Yoshizumi T, *et al.*: The beneficial role of simultaneous splenectomy in living donor liver transplantation in patients with small-for-size graft. *Transpl Int.* 2008;21(9):833–

842.

107- Sugawara Y, *et al.* Splenectomy in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism. *J Am Coll Surg.* 2000;190(4):446–450

108- Arakawa Y, *et al.*: Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. *Hepatol Res.* 2009;39(4):391–397.

109- Ren Y-S, *et al.*: Beneficial effects of splenectomy on liver regeneration in a rat model of massive hepatectomy. *HBPD Int.* 2012;11(1):60–65.

110- Glanemann M, *et al.*: Hyper-perfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res.* 2005; 37: 335-341

111- Eipel C, *et al.*: Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int* 2010; 23: 998–1007

112- Di Domenico S, *et al.*: Early effects of portal flow modulation after extended liver resection in rat. *Digestive and Liver Disease* 2011; 43: 814–822

113- Wang H, *et al.*: Effect of portocaval shunt on residual extreme small liver after extended hepatectomy in porcine. *World J Surg.* 2006;30(11):2014–2022.

114- Adam R, Diamond T, Bismuth H. Partial portacaval shunt: renaissance of an old concept. *Surgery.* 1992 Jun; 111(6): 610-616

115-Takada Y, *et al.*: End-to-side portocaval shunting for a small-for-size graft in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10: 807-810

116- Lee FYJ, *et al.*: Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1999; 29:677-687

117- Troisi R, *et al.*: Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-donor liver transplantation? *Ann Surg* 2003; 237: 429.

118- Michalopoulos GK. Liver regeneration.*J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):286-300.
Review.