

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI**

Scuola di dottorato di ricerca in: Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali
Indirizzo: Epatologia Clinica
Ciclo: XXIII

**APPLICAZIONE CLINICA E STUDIO DI
PROTEOMICA PLASMATICA IN PAZIENTI CON
INSUFFICIENZA EPATICA IN TRATTAMENTO
EXTRACORPOREO CON IL SISTEMA FPSA
(PROMETHEUS)**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Gatta
Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Angela D'Angelo

Dottorando: Dott. Giuseppe Scaparrotta

INDICE

Introduzione	pag.	1
Fisiopatologia del danno epatico cronico.....	pag.	3
Terapia sostitutiva epatica extracorporea.....	pag.	6
Scopo dello studio,pazienti e metodi	pag.	14
Risultati	pag.	19
Discussione e conclusioni	pag.	27
Bibliografia	pag.	31

RIASSUNTO

Il trapianto di fegato è diventato il trattamento standard per pazienti con insufficienza epatica terminale. Le differenti forme di danno epatico (acuto, subacuto, acuto su cronico, cronico) sono caratterizzate da alti tassi di mortalità.

Il corso naturale del danno epatico cronico è complicato spesso da episodi acuti di scompenso, potenzialmente reversibili, innescati da un evento improvviso quale un'infezione o un sanguinamento gastrointestinale, episodi che vengono definiti come danno epatico acuto su cronico.

La disponibilità ad effettuare i trapianti è limitata dalla scarsa disponibilità di organi con conseguente allungamento dei tempi d'attesa per i pazienti in lista di trapianto. Nel 2002 sono stati effettuati, in Europa occidentale, oltre 4000 trapianti di fegato e in lista d'attesa erano presenti più di 5000 pazienti.

Le terapie di supporto epatico extracorporeo hanno lo scopo di preparare il paziente al trapianto e prevedono due diversi approcci: uno di tipo biologico e uno di tipo non biologico.

Mentre quelli di tipo biologico utilizzano epatociti o l'organo intero (sia di origine animale che umana), quelli non biologici utilizzano tecniche dialitiche di filtrazione e adsorbimento.

Lo scopo del nostro studio è la valutazione dell'efficacia clinica del sistema Prometheus per la detossificazione epatica, il miglioramento degli indici di ritenzione azotata e miglioramento del MELD score.

Abbiamo trattato con il sistema Prometheus 7 pazienti con insufficienza epatica acuta, consecutivamente giunti alla nostra osservazione, per un totale di 18 trattamenti.

Outcome primario dei trattamenti con il sistema Prometheus consiste nel raggiungimento di valori sierici di bilirubina ottimali.

E' stata valutata la concentrazione plasmatica delle citochine nei pazienti trattati con il

sistema Bio-Plex Suspension Array System.

La nostra esperienza ha confermato che il sistema Prometheus, pur determinando il raggiungimento dell'outcome primario di ottenere una importante riduzione dei livelli sierici di bilirubina, non incide sulla mortalità dei pazienti epatopatici terminali ma va considerato come un importante strumento di preparazione al trapianto di fegato.

L'andamento delle concentrazioni plasmatiche delle citochine da noi dosate ha evidenziato che il prolungamento della terapia comporta la modulazione di un numero maggiore di citochine, in particolare la down-regolazione di quelle pro-infiammatorie, come IP10, IL-6, IL-8, PDGF bb e RANTES accompagnata da una diminuzione della apoptosi.

La ottimizzazione del sistema e gli ulteriori risultati ancora in fase di elaborazione potranno svilupparsi su due fronti:

- implementazione delle conoscenze sui meccanismi fisiopatologici che correlano il processo flogistico allo scompenso metabolico in corso di insufficienza epatica acuta da epatopatia cronica
- applicazione definitiva del Sistema Prometheus come bridge al trapianto epatico, a fronte del sempre più rilevante mismatch tra il pool dei donatori disponibili e il numero dei pazienti in lista in attesa di trapianto epatico.

ABSTRACT

Liver transplantation has become the standard treatment for patients with terminal liver failure. The different forms of liver injury (acute, subacute, acute on chronic, chronic) are characterized by high mortality rates.

The natural course of chronic liver injury is often complicated by acute episodes of potentially reversible decompensation, triggered by a sudden event such as infection or gastrointestinal bleeding. These episodes are defined as acute on chronic liver injury.

The willingness to carry out transplants is limited by the shortage of organs resulting in longer waiting times for patients on the transplant list. In 2002, in Western Europe, more than 4,000 liver transplants were made, and the waiting list were more than 5000 patients.

The extracorporeal liver support therapies have the aim of preparing the patient for transplantation and provide two different approaches: a biological one and non-organic one type.

While biological approaches use hepatocytes or a whole organ (both animal and human), non-biological ones use filtration dialytic techniques and sorption.

The aim of our study is to evaluate clinical efficacy of the Prometheus system liver for detoxification, improvement of the indices of nitrogen retention and improvement of the MELD score.

We have dealt, with the Prometheus system, 7 patients with acute liver failure, we studied consecutively, for a total of 18 treatments.

Primary outcome of treatment with the Prometheus system is to achieve optimal serum bilirubin levels.

Was estimated plasma concentration of cytokines in patients treated with the Bio-Plex Suspension Array System.

Our experience has confirmed that the Prometheus, while causing achieving the primary

outcome to get a significant reduction in serum bilirubin, it does not affect the mortality of patients with terminal liver disease but must be viewed as an important tool in preparation for liver transplantation.

The trend of plasma concentrations of cytokines measured by us showed that the prolongation of therapy involves the modulation of a greater number of cytokines, in particular the down-regulation of pro-inflammatory ones, such as IP10, IL-6, IL-8, PDGF bb and RANTES accompanied by a decrease in apoptosis.

The system optimization and further results, still being processed, could be developed on two fronts:

- Implementation of knowledge on the pathophysiological mechanisms that relate to the inflammatory process metabolic decompensation in the course of acute liver failure from chronic liver disease
- Final implementation of the Prometheus system as a bridge to liver transplantation in face of increasingly significant mismatch between the pool of available donors and the number of waiting list patients for liver transplantation.

INTRODUZIONE

Il trapianto di fegato è diventato il trattamento standard per pazienti con insufficienza epatica terminale.

Le differenti forme di danno epatico (acuto, subacuto, acuto su cronico, cronico) sono caratterizzate da alti tassi di mortalità. (1)

Le patologie epatiche sono in rapido aumento in tutto il mondo e l'Europa non sfugge a questa tendenza: infatti circa 10.000 pazienti muoiono ogni anno in Germania per malattie epatiche ed oltre 35.000 negli Stati Uniti. (2)

La possibilità di effettuare i trapianti è limitata dalla scarsa disponibilità di organi con conseguente allungamento dei tempi d'attesa per i pazienti in lista di trapianto.

Nel 2002 sono stati effettuati, in Europa Occidentale, oltre 4000 trapianti di fegato e in lista d'attesa erano presenti più di 5000 pazienti (2).

Per far fronte alla scarsa disponibilità di organi si è incrementato l'utilizzo di tecniche alternative al trapianto ortotopico di fegato come lo "split", o trapianto da consanguinei, che costituisce attualmente l'11% di tutte le procedure effettuate in Europa ma tuttavia un terzo dei pazienti muore ancora in attesa di trapianto. (3-5)

Un altro aspetto da considerare è che non tutti i pazienti che necessitano di trapianto di fegato possiedono i requisiti necessari per poter essere messi in lista d'attesa: infatti molti pazienti presenti nei reparti di terapia intensiva, a causa delle loro condizioni critiche o per l'abuso di alcool, vengono esclusi dalle liste di trapianto e ciò ha richiamato la necessità di sviluppare dei dispositivi di sostegno epatico che permettano di supportare temporaneamente il paziente fino ad un eventuale recupero della funzionalità epatica o per condurlo fino al trapianto. (6)

Il nostro progetto di ricerca è incentrato proprio su uno di questi sistemi di sostegno epatico artificiale di tipo non biologico (Prometheus, Fresenius Medical Care) al fine di valutare l'impatto dello stesso sull'andamento clinico e sulla mortalità di questi pazienti.

Il progetto di ricerca ha previsto come aspetto corollario lo studio di proteomica

plasmatica relativo alle variazioni della concentrazione plasmatica delle citochine, prima, durante e dopo i trattamenti con il sistema Prometheus; tale processo si è proposto di valutare se esiste un profilo citochinico comune nei pazienti, alla base dei meccanismi infiammatori che sovrintendono e/o complicano il quadro clinico dei pazienti cirrotici scompensati, e se e in che modo il sistema Prometheus li influenza.

FISIOPATOLOGIA DEL DANNO EPATICO CRONICO

Il corso naturale del danno epatico cronico è complicato spesso da episodi acuti di scompenso, potenzialmente reversibili, innescati da un evento improvviso quale un'infezione o un sanguinamento gastrointestinale, episodi che vengono definiti come danno epatico acuto su cronico (7-9).

Questo tipo di complicanza è spesso associata ad ulteriore aggravamento della disfunzione sistemica emodinamica connessa con l'ipertensione portale, detto anche stato iperdinamico.

La fisiopatologia di questo stato non è stata ancora completamente chiarita, sebbene vi siano evidenze che suggeriscono che l'accumulo di sostanze vasodilatatrici endogene, compreso l'ossido nitrico (NO), possono avere un ruolo importante (10).

La combinazione di vasodilatazione ed espansione del volume intravascolare è associata con un'anormale distribuzione del volume plasmatico che determina una condizione di ipervolemia nella regione splancnica e nel circolo periferico, con relativa ipovolemia specialmente nel compartimento toracico. Specifici sensori interpretano questa ipovolemia centrale come un'effettiva riduzione del volume circolante, e ciò comporta l'attivazione di sostanze vasocostrittrici endogene e dei sistemi di ritenzione di sodio e acqua (come il sistema renina-angiotensina-aldosterone e il sistema nervoso simpatico) e il conseguente rilascio non osmotico di arginina-vasopressina.

La persistente attivazione di questi sistemi, nel tempo, sembra aggravare l'aumento della resistenza intraepatica, che a sua volta gioca un ruolo centrale nell'aggravamento dell'ipertensione portale, con quest'ultima che promuove la vasocostrizione e aggrava l'ischemia in organi essenziali, portando all'insorgenza della sindrome epatorenale, ipertensione post-polmonare fino alla Multiple Organ Failure (MOF) (10).

L'accumulo di sostanze legate all'albumina, quali la bilirubina o gli acidi biliari, è l'induttore principale della Systemic Inflammatory Reaction Syndrome (SIRS),

caratterizzata dall'attivazione di citochine pro-infiammatorie e di fattori di crescita e dall'espressione di diverse molecole di adesione.

E' stato infatti ipotizzato che le citochine pro-infiammatorie siano mediatori di infiammazione epatica, apoptosi e necrosi delle cellule epatiche, colestasi e fibrosi (11): si ipotizza inoltre che la rimozione di queste citochine pro-infiammatorie possa avere un effetto benefico su questi pazienti (12).

La Systemic Inflammatory Reaction Syndrome (SIRS) è una risposta all'attività di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-1, TNF- α e interferoni generati da cellule specifiche, i macrofagi, durante l'infezione. Livelli più alti di TNF- α e IL-6 sono rintracciabili nel siero di pazienti con epatite e cirrosi fulminanti (18,19).

Diverse citochine sembrano coinvolte nella patogenesi e nel mantenimento della risposta immunitaria nell'insufficienza epatica acuta, particolarmente quando prodotte in eccesso. Un'alta concentrazione plasmatica di TNF- α , IL-1 β e IL-6 in pazienti con sepsi o shock settico, correla con l'alta gravità della patologia e con una prognosi infausta.

E' stato dimostrato che in pazienti con insufficienza epatica acuta, è presente un'elevata concentrazione di queste citochine circolanti e che esiste un difficile equilibrio tra la reazione infiammatoria e la risposta compensatoria anti-infiammatoria (18,19).

La transizione da una condizione stabile di cirrosi all'esplosione di uno scompenso acuto che porta al relativo danno epatico è basata su una risposta infiammatoria sistemica acuta, principalmente mediata da citochine.

La conseguente perdita di funzione metabolica epatica porta ad un accumulo di tossine nel plasma, generalmente accettato come il principale meccanismo fisiopatologico di danno epatico terminale e pertanto la rimozione di queste sostanze potrebbe produrre un recupero dallo scompenso epatico acuto (20).

L'ossido nitrico (NO), uno dei principali mediatori dello stato iperdinamico, è sintetizzato in cellule differenti da tre tipi diversi di isoforme dell'enzima NO sintasi (NOS), due costitutive e una inducibile; la forma inducibile (iNOS) produce NO nelle

cellule endoteliali e nelle cellule muscolari lisce così come negli epatociti e nei macrofagi in risposta a differenti stimoli, come il lipopolisaccaride batterico (LPS) e diverse citochine.

Un fenomeno comune nei pazienti cirrotici potrebbe indurre, attraverso l'aumentata produzione di citochine, la sintesi di NO nei vasi sanguigni periferici, favorendo così l'insorgere dello stato circolatorio iperdinamico (22-24).

Alcuni studi hanno dimostrato che diverse citochine, incluso il Tumor Necrosis Factor (TNF- α), l'Interleuchina 1 (IL-1) e l'Interleuchina 6 (IL-6), sono sistematicamente elevate in pazienti con insufficienza epatica cronica e che la generazione di NO è incrementata nei pazienti cirrotici (17,18,25).

Studi su modelli sperimentali di ipertensione portale e cirrosi hanno suggerito un ruolo sia per il TNF- α che per NO nello sviluppo dei cambiamenti che caratterizzano l'ipertensione portale negli animali (18, 19).

TERAPIA SOSTITUTIVA EPATICA EXTRACORPOREA

Le terapie di supporto epatico prevedono due diversi approcci: uno di tipo biologico e uno di tipo non biologico. Mentre quelli di tipo biologico utilizzano epatociti o l'organo intero (sia di origine animale che umana), quelli non biologici utilizzano tecniche dialitiche di filtrazione e adsorbimento (13).

I metaboliti associati al danno epatico si differenziano tra loro per peso molecolare e caratteristiche chimico-fisiche e gran parte delle tossine è legata all'albumina (bilirubina, bile, aminoacidi e acidi grassi).

Numerose sono le evidenze che suggeriscono un ruolo importante di queste tossine nell'insorgenza e nel mantenimento della MOF conseguente all'insufficienza epatica (13). Un'altra porzione di tossine è invece rappresentata da quelle idrosolubili di basso o medio peso molecolare derivanti o dal danno epatico (ammonio) o dal danno renale, efficacemente rimosse con l'emodialisi o l'emofiltrazione.

I metodi convenzionali non sono comunque efficaci nella rimozione delle tossine legate all'albumina (14). Sono proprio queste sostanze a rivestire un ruolo principale nella fisiopatologia delle complicanze del danno epatico quali l'encefalopatia epatica.

L'ipotesi dell'intossicazione da tossine endogene è considerata la spiegazione più accreditata per giustificare gli eventi che si verificano in corso di insufficienza epatica e che determinano un rischio per la vita. Tossici di varia natura, di diverso peso molecolare, liberi o veicolati dalle proteine, sono responsabili delle diverse manifestazioni cliniche che caratterizzano questa sindrome.

Le tossine accumulate danneggiano il fegato ed innescano un meccanismo vizioso per cui la malattia stessa si autoalimenta, si aggrava e si perpetua. L'aumentata concentrazione sierica di bilirubina, acidi biliari, ossido nitrico, ammonio, lattati, fenoli, aminoacidi aromatici, benzodiazepine endogene, correla con la gravità della epatopatia. L'aumentata concentrazione di citochine pro-infiammatorie ed endotossine, rilasciate dal

tessuto epatico necrotico, è stata correlata con un'alterata risposta del sistema infiammatorio, caratteristicamente associata a una prognosi infausta.

L'albumina è il principale trasportatore di proteine. Il concetto di dialisi con albumina è stato sviluppato proprio per rimuovere le sostanze legate all'albumina; è un nuovo metodo che combina l'efficacia di sorbenti per la rimozione di sostanze legate all'albumina, con la biocompatibilità delle moderne membrane di dialisi (13).

I sistemi di supporto artificiale non biologico, gravati da costi inferiori e caratterizzati da una gestione più semplice sotto il profilo logistico, risultano maggiormente sperimentati in termini di valutazione e applicazione clinica rispetto ai sistemi bio-artificiali.

Plasmaexchange (PE)

Il PE rappresenta il primo supporto extracorporeo che è stato proposto per il trattamento della insufficienza epatica (34).

La metodica si basa sulla scomposizione del sangue tramite centrifuga o appositi emofiltro. Il plasma prodotto viene eliminato e rimpiazzato, in ugual volume, con plasma fresco congelato (PFC), soluzione albuminata o altri fluidi di sostituzione. L'infusione di plasma permette di reintegrare sostanze utili o mancanti come l'albumina e fattori della coagulazione, e permette di rimpiazzare fattori attivi contro i mediatori dell'infiammazione. Rappresenta un buon sistema per il controllo delle intossicazioni in pazienti affetti da insufficienza epatica acuta (IEA), provvedendo alla rimozione di tossici liberi, principalmente quelli a peso molecolare elevato, sostanze legate alle proteine e immunocomplessi circolanti aiutando così a superare quella fase in cui l'impegno colestatico sembra dominare sul quadro più francamente necrotico.

Nella IEA conclamata, dove lo scambio plasmatico deve essere effettuato con infusione di plasma fresco congelato e praticato in maniera massiva e reiterata, si può incorrere nei limiti della metodica correlati all'infusione di citrato contenuto nelle sacche di PFC: cioè intossicazione da citrato, squilibri elettrolitici, alcalosi metabolica e riduzione dei

colloidi plasmatici. Il PE da solo non è sufficiente a fronteggiare il quadro clinico che si viene a delineare e pertanto è stato usato in associazione a terapie dialitiche continue (CRRT).

Una variante alla metodica è rappresentata dalla PAP (plasma-adsorbimento-perfusione): è una particolare forma di plasmaferesi che prevede l'utilizzo nel circuito di una colonna contenente stirene-divinilbenzene (Plasorba BR-350, Asahi). Tale metodica trova indicazione nei casi di insufficienza epatica cronica, cirrosi biliare primitiva, cirrosi scompensata ed iperbilirubinemia nel pre- e post-trapianto di fegato al solo scopo di adsorbire bilirubina (coniugata e non coniugata) ed acidi biliari mediante un meccanismo di interazione a scambio ionico (Figura 1).

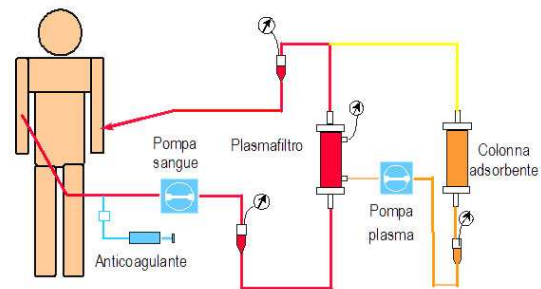


Figura 1: Plasma-adsorbimento-perfusione (PAP)

Continuous Renal Replacement Therapy (CRRT)

Le CRRT (Figura 2), in particolare l'emofiltrazione (CVVH) e/o l'emodiafiltrazione continua (CVVHDF), sfruttando la combinazione dei meccanismi di convezione e/o diffusione-convezione si sono dimostrate efficaci nel rimuovere dal circolo sostanze di peso molecolare piccolo e medio-alto. Un cut-off di membrana compreso tra 30-50

kilodaltons permette la rimozione di citochine, come la IL-6, la IL-8, la IL-18 e il TNF-alfa.

Un importante contributo alla rimozione delle citochine è dato dall'adsorbimento che la membrana stessa del filtro esercita su queste molecole. L'efficacia di rimozione è diversa secondo la natura della membrana utilizzata. Il polimetilmetacrilato sembra essere superiore rispetto agli altri materiali di comune impiego come il polisulfone e l'ethylvinil alcool.

Le citochine pro-infiammatorie e le endotossine rilasciate dal tessuto epatico necrotico causano alterazioni emodinamiche con riduzione delle resistenze vascolari periferiche, riduzione della contrattilità cardiaca, perdita della regolazione del tono vasale, ipotensione e conseguente riduzione di perfusione. Vari studi clinici hanno dimostrato l'efficacia della CVVHDF, in particolare, nell'eliminare i mediatori dell'infiammazione nei soggetti settici e nella MOF, sottolineando la validità di questo supporto per la prevenzione e il trattamento delle complicanze legate alla IEA (41).

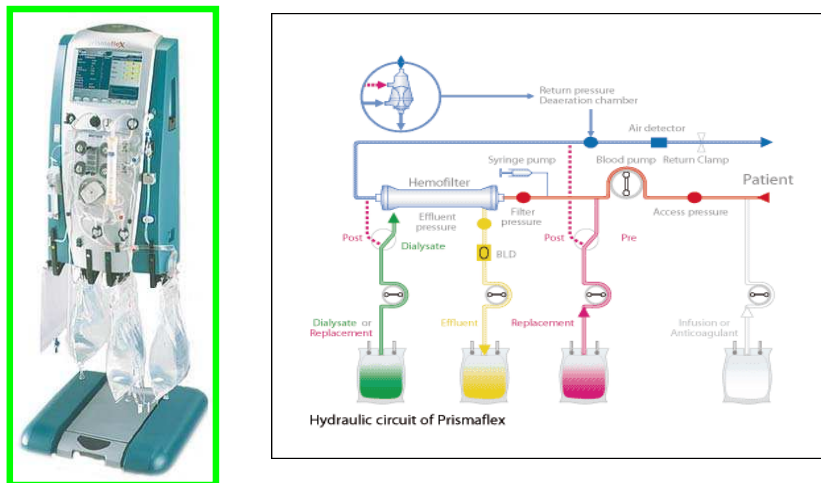


Figura 2: Continuous Renal Replacement Therapy (CRRT). CVVH/CVVHDF

Molecular Adsorbent Recycling System (MARS®)

Un importante progresso è stato conseguito, alla fine degli anni Novanta, con l'ingresso sul mercato di un nuovo supporto extracorporeo per l'insufficienza epatica, il MARS, prodotto Teraklin e distribuito dalla Gambro (Figura 3).

Si tratta di un sistema caratterizzato da un circuito ematico, in cui il sangue transita in un filtro costituito da una membrana con cut-off di 50.000 Dalton, affrontato a un circuito di dialisato in cui scorre una soluzione albuminata al 20%. Tramite l'effetto di attrazione che l'albumina esercita con i siti lipofili disponibili sulle sostanze legate all'albumina circolante nel letto ematico, il sistema consente una buona clearance delle molecole così veicolate nel sangue. Ovviamente anche le piccole molecole idrofiliche attraversano il filtro per diffusione. La membrana è impermeabile all'albumina, alle proteine identificabili come gli ormoni, i fattori della coagulazione e l'antitrombina III.

Il dialisato, ricircolando in un circuito secondario attrezzato con due colonne adsorbenti in carbone attivato e resine trattate adibite alla detossificazione dell'albumina, viene continuamente rigenerato per il successivo passaggio nel filtro. Il circuito del dialisato è a sua volta cimentato con un terzo circuito costituito da un sistema per bicarbonato-dialisi, idoneo per rimuovere i tossici idrosolubili, le eventuali tossine uremiche, correggere l'equilibrio idro-elettrolitico, correggere il pH (42).

I lavori riportati in letteratura sono ormai numerosi, alcuni concordi, altri meno, nel sottolineare l'efficacia di questa metodica. I dati riferiti sono per lo più suggestivi per un miglioramento della sopravvivenza accompagnata da significativo miglioramento dell'encefalopatia, del controllo emodinamico e della coagulazione, con decremento dei livelli sierici della bilirubina, dei tossici uremici e dell'ammonio (27,35).

Lo studio RELIEF (Recompensation of Exacerbated Liver Insufficiency with Hyperbilirubinaemia and/or Encefalopathy and/or Renal Failure), studio randomizzato controllato, ha dimostrato come in 189 pazienti con AoCLF (acute on chronic liver failure), di cui 95 trattati con terapia medica standard (SMT) e 95 con metodica MARS

(12 sessioni di 6/8 ore ciascuna nell'arco di 21 giorni), la sopravvivenza a 28 giorni (endpoint primario) era praticamente sovrapponibile (circa 40% dei pazienti) mentre si assisteva ad un miglioramento significativo dell'encefalopatia epatica (HE score da II-IV a 0-I, 56% MARS vs 39 SMT). (43)

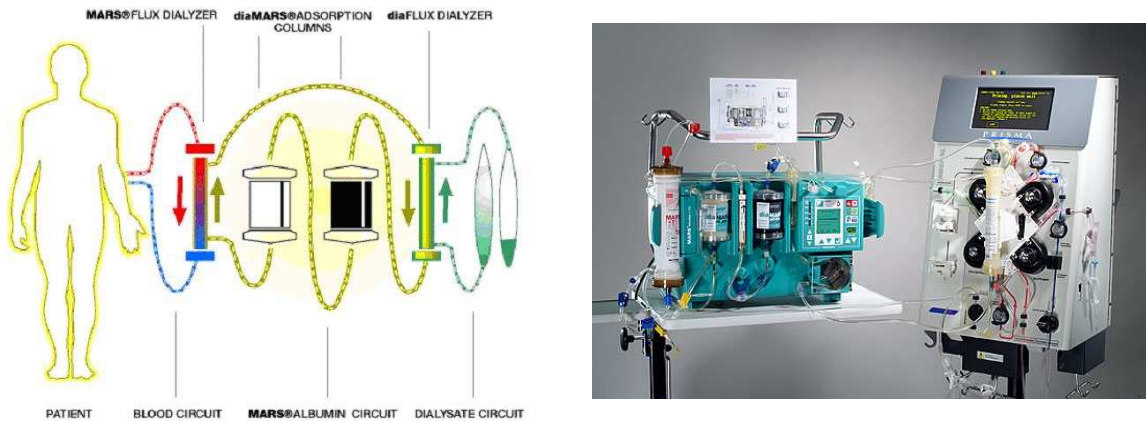


Figura 3: Molecular Adsorbent Recycling System (MARS®)

Il sistema Prometheus (Fresenius Medical Care AG): Fractionated Plasma Separation and Adsorption (FPSA)

Il sistema Prometheus (Figura 4), oggetto e strumento del nostro progetto di ricerca, è costituito da un circuito primario (plasmafiltro e dializzatore) ed uno secondario (filtri adsorbenti per la rimozione della bilirubina) e realizza una rimozione combinata di molecole tossiche legate all'albumina e di molecole tossiche idrosolubili mediante l'utilizzo di un sistema di adsorbimento e separazione frazionata del plasma (*Fractionated Plasma Separation and Adsorption FPSA*) che è stato sviluppato nel 1999 da Falkenhagen et al. (15).

Diversamente da MARS, la frazione composta dall'albumina passa attraverso una membrana di polisulfone (plasmafiltro AlbuFow; cut-off ~250 kDalton, Fresenius).

(27,29). Questa membrana permette il passaggio della frazione contenente l'albumina, delle sostanze ad essa legate e di tutte le componenti del plasma di peso < a 250 kilodalton, nel circuito secondario in cui il plasma viene purificato dalle tossine legate all'albumina mediante adsorbimento diretto su speciali supporti adsorbenti (Prometh 01 e Prometh 02).

Successivamente viene inoltre effettuata una dialisi convenzionale ad alto flusso (dializzatore FX50; Fresenius) allo scopo di rimuovere le sostanze idrosolubili.

Per integrare i due circuiti è utilizzato un monitor di emodialisi modificato; un catetere di dialisi standard a doppio lume viene connesso al circuito ematico extracorporeo (circuito primario); la membrana di AlbuFlow separa il circuito primario dal secondario che contiene il plasma filtrato.

Dal momento che i circuiti hanno un funzionamento indipendente dall'unità, l'operatore può decidere se effettuare una emodialisi convenzionale o se associarla alla detossificazione albuminica.

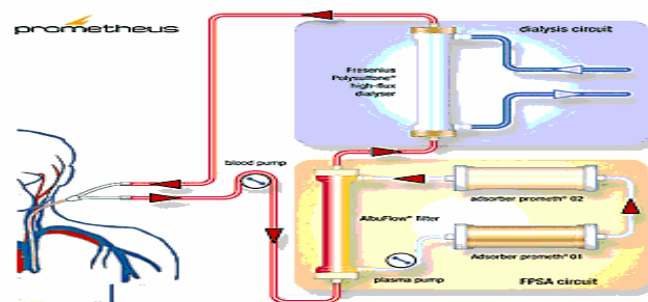


Figura 4: Il sistema Prometheus (Fresenius Medical Care AG)

Il fatto che questi strumenti di purificazione extracorporea del sangue abbiano capacità di rimuovere selettivamente determinate sostanze è fondamentale per valutare la loro specificità ed efficacia. (21)

Con il sistema Prometheus sia le sostanze legate all'albumina che quelle idrosolubili, che si accumulano in caso di danno epatico, vengono rimosse tutte mediante un singolo passaggio del sangue attraverso il circuito extracorporeo. (31,32,33)

Il più recente trial randomizzato e controllato condotto sull'efficacia clinica di tale sistema è lo studio HELIOS (44). In tale studio sono stati arruolati 179 pazienti con insufficienza epatica acuta su cronica (AoCLF) di cui 68 trattati con terapia medica standard (SMT) e 77 con FPSA (sessioni di 6/8 ore per un massimo di 8/11 trattamenti per paziente) con l'endpoint primario rappresentato dalla sopravvivenza dei pazienti a 28 giorni ed a 90 giorni, indipendentemente dal trapianto. I risultati di tale studio mostrano una sopravvivenza del 66% vs 63% a 28 gg e 47% vs 38% a 90 gg (FPSA vs SMT) che non è statisticamente significativa. Analizzando però il sottogruppo dei pazienti con sindrome epatorenale (HRS) tipo I o con Meld score > 30 si notava una maggior sopravvivenza statisticamente significativa nel gruppo di pazienti trattati con FPSA.

Pochi sono gli studi in letteratura che riportano gli effetti della terapia con Prometheus sul livello di citochine, come la IL-6, la IL-2 e il TNF- α e anche questi con risultati contraddittori (16,17,30). Non sono ancora stati condotti studi che descrivano un'ampia varietà di fattori infiammatori e la loro relazione con i parametri clinici e/o laboratoristici dei pazienti.

SCOPO DELLO STUDIO, PAZIENTI E METODI

Lo scopo del nostro studio è la valutazione dell'efficacia clinica del sistema Prometheus.

Tre gli obiettivi fondamentali:

- la detossificazione epatica attraverso la rimozione della bilirubina, in termini necessari ad ottenere una persistente correzione della iperbilirubinemia per almeno 4 giorni dalla fine del trattamento. La bilirubinemia costantemente al di sopra di 25 mg/dL si rende responsabile di diverse forme di tossicità cellulare con danni prevalentemente a carico del sistema mitocondriale e di una tossicità che si può manifestare a carico di diversi apparati. Il coinvolgimento neurologico è il più noto (deposizione della bilirubina a livello dei gangli della base) ma può svilupparsi anche deficit renale, vasodilatazione e ridotta funzione miocardica. Non esiste una terapia medica specifica;
- il miglioramento degli indici di ritenzione azotata nei pazienti con danno renale correlato o meno alla patologia epatica di base;
- miglioramento del MELD (Model for End-stage Liver Disease), modello matematico messo a punto da ricercatori della Mayo Clinic di Rochester (USA) con lo scopo di predire la sopravvivenza del paziente cirrotico sottoposto a shunt porto-sistemico. Il MELD ha il grande vantaggio di stratificare i pazienti secondo un scala continua progressiva di severità utilizzando tre parametri oggettivabili quali la bilirubinemia, la creatininemia e l'INR. Secondo tale sistema, viene riportata una mortalità a tre mesi superiore all'80% nei pazienti con score > 30 e vicina al 100% in quelli con score > 40 (45). L'originale formula del sistema MELD ha subito diverse modifiche. Per esempio, la versione modificata da *United Network for Organ Sharing* (UNOS) ha lo scopo di migliorare la distribuzione degli organi da trapiantare tenendo anche conto del fatto che i pazienti siano o meno sottoposti a dialisi.

Abbiamo trattato con tale sistema di supporto epatico extracorporeo 7 pazienti con insufficienza epatica acuta, consecutivamente giunti alla nostra osservazione, per un totale di 18 trattamenti.

Le indicazioni al trattamento sono state:

- un caso di cirrosi biliare primitiva
- sei casi di epatopatia acuta su cronica (di cui una HCV-relata e cinque su base esotossica)

Tutti i pazienti presentavano al momento dell'arruolamento una bilirubinemia > 25 mg/dL (con prevalenza della forma coniugata) da almeno 4 giorni, con o senza alterazione degli indici di ritenzione azotata.

Sono stati esclusi i pazienti che all'arruolamento presentavano grave deficit coagulativo, infezioni sistemiche con ripercussione emodinamica, sanguinamento in atto, sindrome epatorenale (HRS) tipo 1, iperbilirubinemia da prevalente componente emolitica. Criterio di esclusione è stato anche il riscontro ecografico di varici esofagee ad uno stadio superiore a F1 secondo la classificazione endoscopica adattata e modificata dal New Italian Endoscopic Club.

In tutti i pazienti ritenuti idonei al trattamento è stato posizionato un catetere venoso centrale a doppio lume tipo Quinton in vena giugulare sinistra o femorale sinistra.

Durante i trattamenti con il sistema Prometheus è stata utilizzata anticoagulazione sistemica con eparina attraverso un bolo iniziale di 1000 UI e successiva infusione continua con 5000 UI in 50 ml di Soluzione Fisiologica 0.9% a una velocità iniziale di 8 ml/h, pari a 800 UI/h di eparina infuse.

Si monitorava il tempo di coagulazione attivato (ACT) a cadenza oraria.

Parametri clinici, di laboratorio e strumentali valutati all'arruolamento:

- livelli ematici di emocromo, urea, creatinina, albumina, PT, INR, aPTT, ALT, AST, γ GT, bilirubina totale e frazionata, sodio, potassio, cloro prima e dopo trattamento (i valori dell'ammoniemia erano non dosabili a causa dell'iperbilirubinemia);

- osmolarità plasmatica prima del trattamento;
- diuresi del giorno precedente e del giorno successivo al trattamento;
- esame chimico-fisico delle urine, oltre a sodiuria, potassuria e osmolarità urinaria delle urine delle 24 ore prima del trattamento;
- precedente EGDS per la valutazione di presenza e stadio di varici esofagee;
- pressione arteriosa e frequenza cardiaca prima, dopo e durante il trattamento;
- temperatura corporea prima e dopo il trattamento
- elettrocardiogramma in derivazione II (comunque costante durante tutto il trattamento).

L'end-point primario dei trattamenti ha previsto il raggiungimento di valori sierici di bilirubina inferiori a 25 mg/dL dopo 4 trattamenti (laddove le condizioni cliniche lo permettevano) della durata minima di 4 ore ciascuno.

L'end-point secondario è stato il miglioramento della funzione renale, della diuresi e della stessa funzione epatica, fino a influire sulla predizione di sopravvivenza, calcolata valutando eventuali modifiche del "MELD score".

L'analisi statistica è stata condotta con il test t-Student e sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

La sospensione anticipata rispetto alla programmazione del trattamento con il sistema Prometheus, è stata prevista in caso di raggiungimento dell'outcome primario, trapianto di fegato, decesso del paziente o comparsa di eventi avversi.

Il progetto di ricerca ha previsto come aspetto corollario lo studio di proteomica plasmatica relativo alle variazioni della concentrazione plasmatica delle citochine, prima, durante e dopo i trattamenti con il sistema Prometheus; tale processo si è proposto di valutare se esiste un profilo citochinico comune nei pazienti, alla base dei meccanismi infiammatori che sovrintendono e/o complicano il quadro clinico dei pazienti cirrotici scompensati, e se e in che modo il sistema Prometheus li influenza.

La concentrazione plasmatica delle citochine è stata valutata tramite il sistema Bio-Plex Suspension Array, un nuovo sistema per analisi quantitative dirette in fluorescenza, concepito per effettuare analisi quantitative simultanee (36-40)

La tecnologia si basa su un set di microsferi (fino a 96) ognuna delle quali è univocamente e specificamente colorata e quindi discriminabile.

Su ogni microsfera possono essere fatte aderire diverse molecole biologiche (nel nostro caso anticorpi specifici per le diverse citochine) che vengono utilizzate per “catturare” nel campione le molecole di interesse. Per ognuna delle proteine del saggio si formano sulla superficie di ogni microsfera di un determinato colore dei complessi conosciuti come sandwich (anticorpo I-proteina di interesse-anticorpo II biotinilato); questi complessi, fatti reagire con la Streptavidina ficoeritrinata, permettono la quantificazione simultanea delle proteine contenute nel saggio.

Il saggio, una volta prodotte le microsferi specifiche, presenta vantaggi notevoli, anche rispetto ai classici array bidimensionali, basati sullo spotting di proteine o acidi nucleici su una superficie adeguata:

- L'array ha un volume microscopico che permette di analizzare decine di analiti in piccolissimi campioni biologici. Ad esempio, un array fatto da 15 diversi set costituiti da 500 microsferi ciascuno occupa un volume di circa 10 μ l, implicando che il campione da analizzare avrà un volume originario dell'ordine delle poche decine di μ l, dopo diluizione. Ciò è particolarmente significativo nell'analisi di campioni da pazienti (ad esempio saliva, estratti da biopsie, etc.).
- L'analisi della fluorescenza intrinseca della singola biglia di fatto rende la determinazione della fluorescenza intrinseca media in un singolo campione equivalente a centinaia di determinazioni effettuate mediante saggi alternativi, ad esempio Elisa. Questo conferisce una accuratezza elevata alla misura, che è estremamente quantitativa se comparata agli array bidimensionali - generalmente semiquantitativi - e in grado di evidenziare differenze minime in diverse campioni.

- L'alta capacità legante delle microsfele, accoppiata all'alta sensibilità del parametro di quantificazione (fluorescenza), garantisce un *vasto range dinamico* (ad esempio da 3 a 30000 pg/ml di antigene). Questo fa sì che raramente la diluizione del campione ignoto si accompagna a valori localizzati al di fuori della retta di taratura ed inoltre permette di quantificare in parallelo, nello stesso campione, analiti presenti in concentrazioni molto elevate e molto basse, pur effettuando una medesima diluizione.

Il dosaggio delle citochine è stato effettuato presso il Centro Ricerche Interdipartimentale Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università degli Studi di Padova, con la valutazione simultanea di 27 citochine attraverso prelievi venosi effettuati prima, durante e dopo ogni singolo trattamento. (PDGFbb / IL1b / IL1ra / IL2 / IL4 / IL5 / IL6 / IL7 / IL8 / IL9 / IL10 / IL12 / IL13 / IL15 / IL17 / EOTAXIN / FGF basic / G-CSF / GM-CSF / IFN γ / IP10 / MCP1 / MIP1a / MIP1b / RANTES / TNF α / VEGF).

RISULTATI

I trattamenti totali sui 7 pazienti sono stati 18.

In tre pazienti sono stati eseguiti i quattro trattamenti previsti in modo consecutivo, un paziente ne ha eseguiti tre e tre pazienti un solo trattamento. Ciascun trattamento ha avuto una durata minima di 4 ore ed al massimo una durata di 6 ore.

Dai dati ematochimici emerge che, con il trattamento Prometheus, si è raggiunto in 3 su 7 pazienti l'outcome primario di una bilirubinemia inferiore a 25 mg/dl.

In tutti i pazienti la riduzione della bilirubina è stata importante e statisticamente significativa ($p < 0.02$), variando da un minimo del 23% ad un massimo del 70%. (Fig. 5)

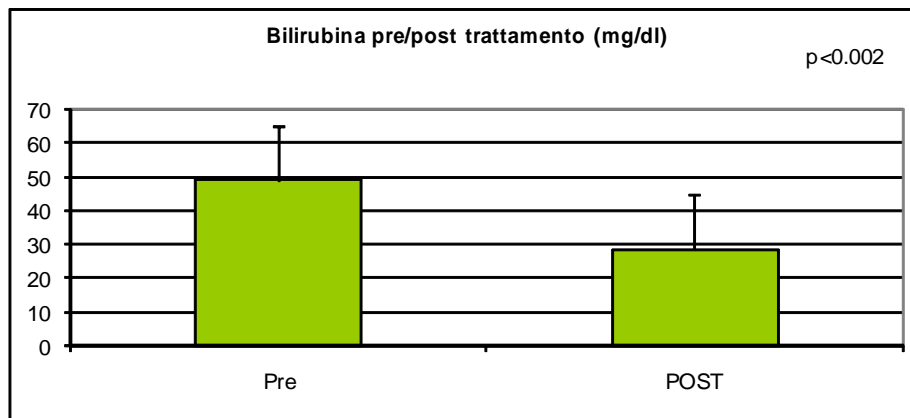


Figura 5

In tutti i pazienti si è inoltre registrato, al termine dei trattamenti, un decremento dei livelli sierici sia delle transaminasi AST(fig. 6a) e ALT(fig. 6b) che della γ GT(fig. 6c), anche se non statisticamente significativo (Figura 6)

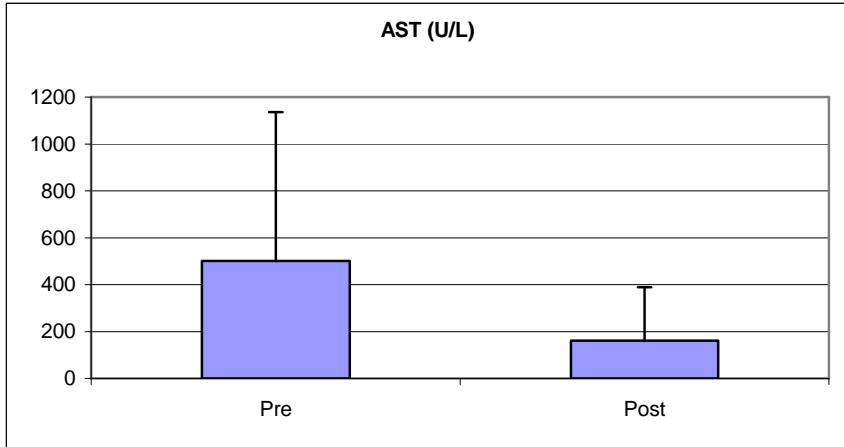


Figura 6a

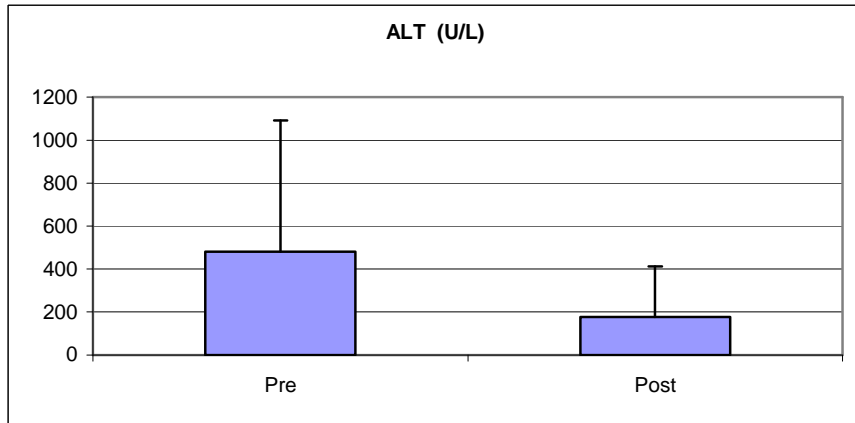


Figura 6b

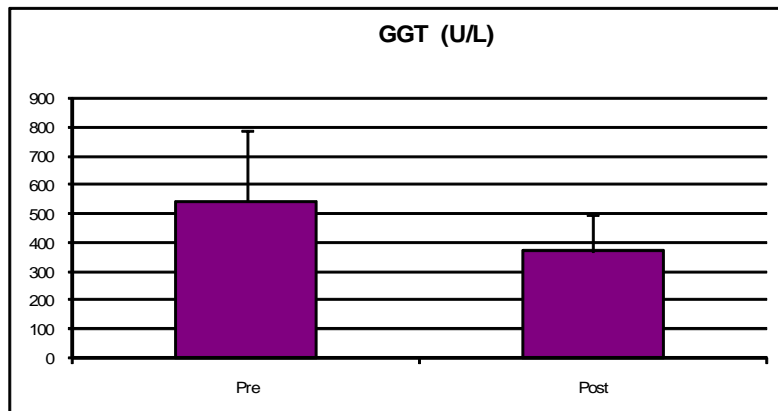


Figura 6c

Nei pazienti che presentavano al momento dell'arruolamento importante alterazione degli indici di ritenzione azotata, si è verificato un significativo miglioramento degli stessi sia per quanto riguarda l'urea ($p<0.005$) che per la creatininemia ($p<0.005$) (Figura 7)

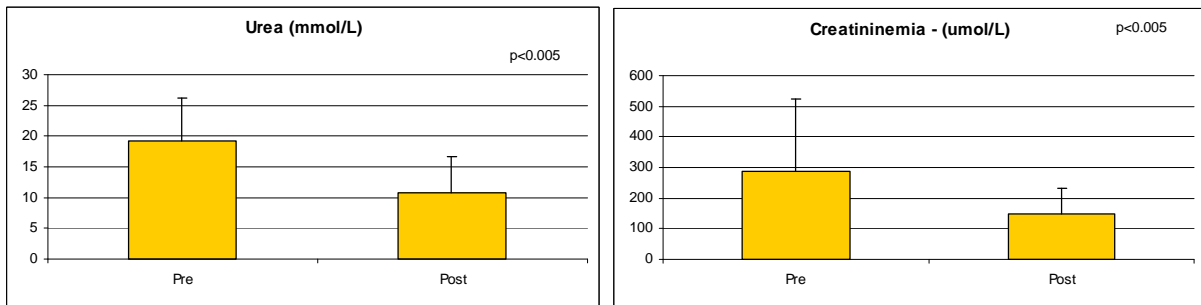


Figura 7

Il valore di INR è risultato aumentato in tutti i pazienti per l'effetto dell'indispensabile anticoagulazione con eparina, utilizzata per garantire il trattamento stesso e la sua efficacia, e considerando anche il deficit coagulativo di tali pazienti causato dalla patologia di base. (Figura 8)

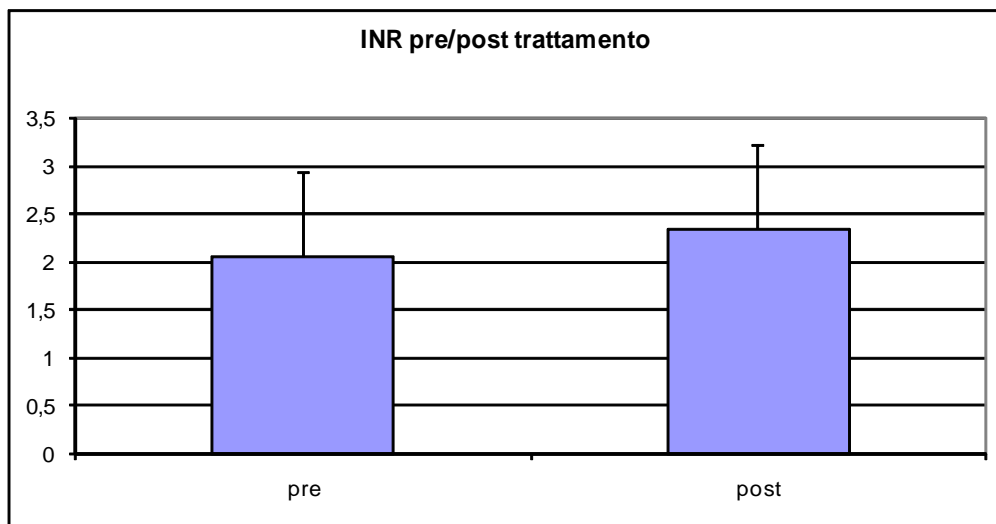


Figura 8

I pazienti presentavano tutti un importante quadro infiammatorio pre-trattamento come mostrano i dati della leucocitosi (x1000/mm³) e della PCR (mg/L): si nota una riduzione statisticamente significativa di entrambi i parametri nel post trattamento ($p < 0.02$ e $p < 0.006$ rispettivamente) (Figura 9)

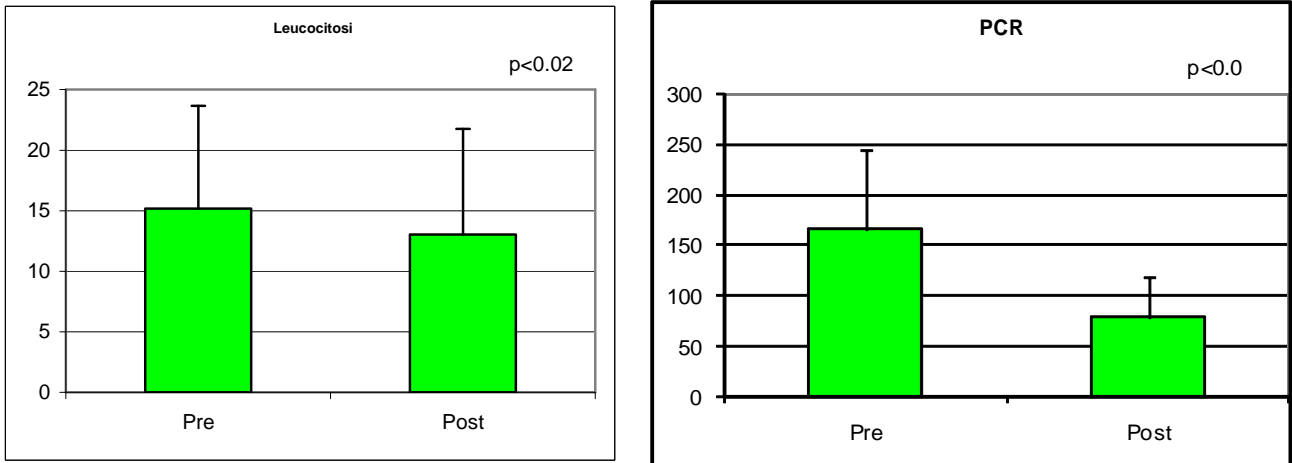


Figura 9

Per quanto riguarda i dati clinici, il mantenimento di accettabili livelli di pressione arteriosa si è realizzato solo mediante un supporto farmacologico costituito da ammine vasoattive (dopamina e noradrenalina). Con i trattamenti effettuati si è però registrato un miglioramento statisticamente significativo della pressione arteriosa media ($p < 0.035$) al termine degli stessi tanto da richiedere dosaggi sempre più bassi delle ammine vasoattive man mano che i trattamenti si susseguivano. (Figura 10)

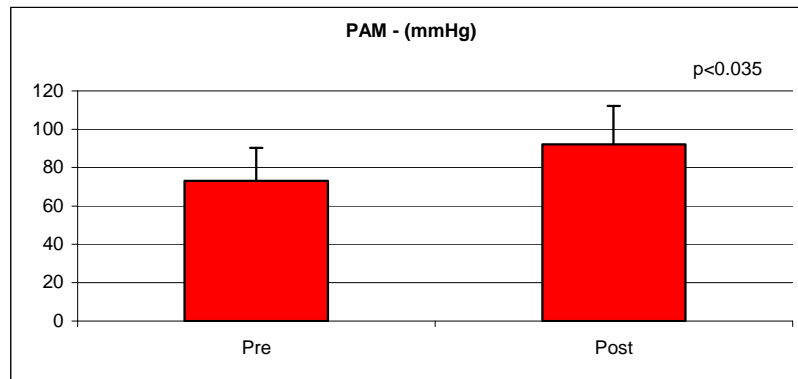


Figura 10

In 5 pazienti su 7 si è osservato, al termine dei trattamenti, un miglioramento del MELD score (Δ MELD medie pari a 6), ma solo in 4 di essi si è mantenuto al di sotto di 30.

Dei 7 pazienti trattati solo 1 è giunto al trapianto di fegato.

A trenta giorni dal termine dei trattamenti i 6 pazienti non trapiantati sono deceduti per complicanze legate alla Sepsis o a Multiple Organ Failure (MOF).

Tabella riassuntiva: valori ematochimici più significativi prima e dopo i trattamenti per ciascun paziente.

Variazione dei principali valori ematochimici nei pazienti prima e dopo i trattamenti									
P	Bilirubina tot. mg/dL			Creatinina mg/dL		INR		MELD	
	pre	post	calo %	Pre	Post	pre	post	pre	post
1	40,82	20,27	49,66	0,81	0,53	1,04	1,12	19	13
2	40,23	20,42	50,76	4,93	1,26	1,53	1,85	40	27
3	76,02	33,54	44,12	3,3	0,72	1,81	2,12	40	25
4	47,19	31,84	67,47	1,5	0,96	1,91	3,41	32	33
5	49,82	38,13	76,54	2,32	1,75	2,05	2,66	37	37
6	25,09	7,8	31,09	0,64	0,89	3,87	2,1	29	21
7	63,39	48,38	76,32	2,43	1,22	2,19	3,17	39	36

Nel corso dello studio sono stati analizzati con la tecnica BioPlex Array System simultaneamente i livelli sierici di 27 citochine in 5 su 7 pazienti trattati con uno o più trattamenti consecutivi. (Figure 11-12-13-14).

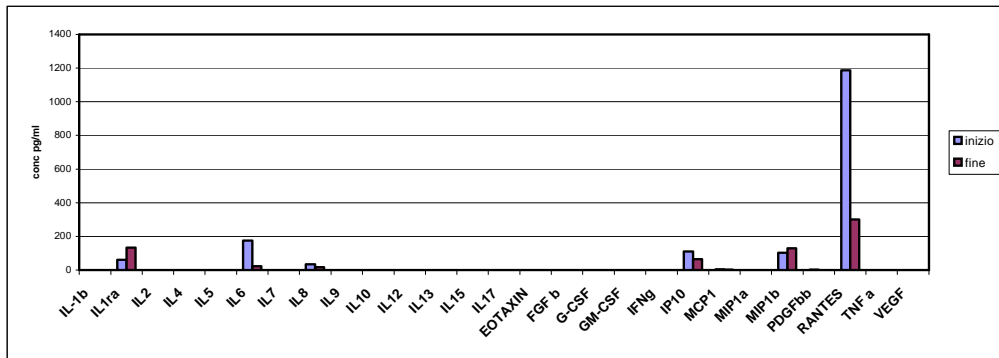


Fig.11 Profilo citochinico inizio-fine ciclo trattamento (Pz.1-2-3)

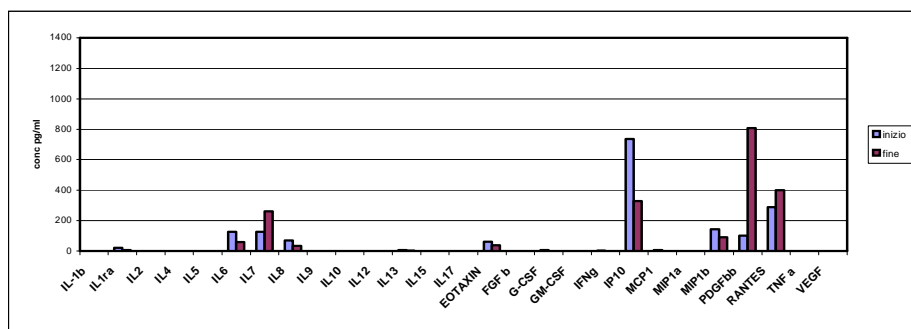


Fig.12 Profilo citochinico inizio-fine ciclo trattamento (Pz.4-5)

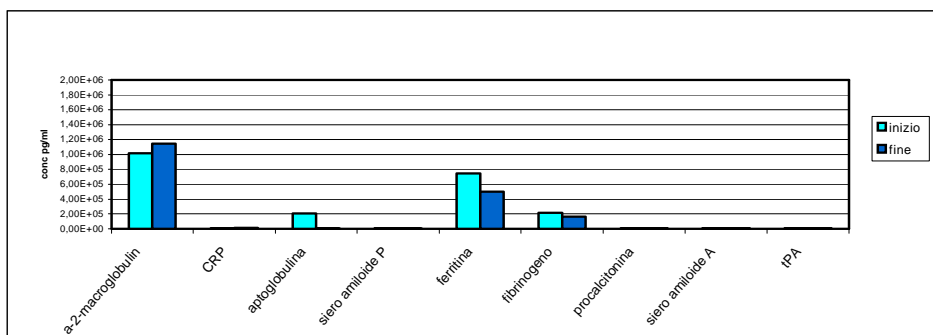


Fig.13 Profilo delle proteine di fase acuta inizio-fine ciclo trattamento (Pz.1-2-3)

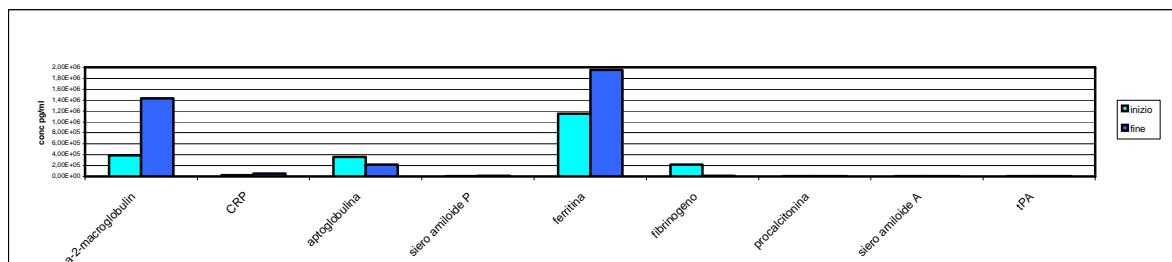


Fig.14 Profilo delle proteine di fase acuta inizio-fine ciclo trattamento (Pz.4-5)

La percentuale di apoptosi è stata saggiata misurando la concentrazione di AOPP (advanced oxidation protein products) in seguito all'incubazione dei sieri con monociti-macrofagi a 24, 48, 72h (Figure 15-16).

Da un punto di vista qualitativo i pazienti presentavano tutti uno stesso profilo citochinico identificando così 16 citochine quantificabili.

Il confronto tra un singolo trattamento o 4 trattamenti ha evidenziato che il prolungamento della terapia comporta la modulazione di un numero maggiore di citochine, in particolare la down-regolazione di quelle pro-infiammatorie, come IP10, IL-6, IL-8, PDGF bb e RANTES accompagnata da una diminuzione della apoptosi.

Questi ultimi due analiti risultano over-espressi alla fine del trattamento solo in uno dei pazienti trattati, in cui la percentuale di apoptosi aumenta gradualmente fino alla 72ma ora. Questo potrebbe far supporre un coinvolgimento di RANTES, come supportato da alcuni studi (35-40), nel processo apoptotico

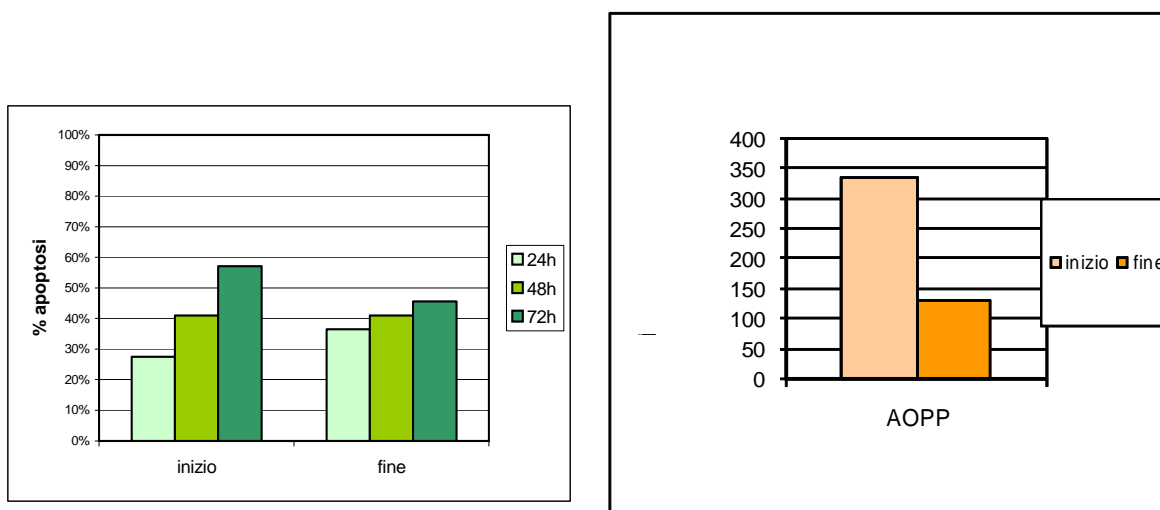


Figura 15

Percentuale apoptosi e indice stress ossidativo inizio-fine ciclo trattamento (Pz.1-2-3)

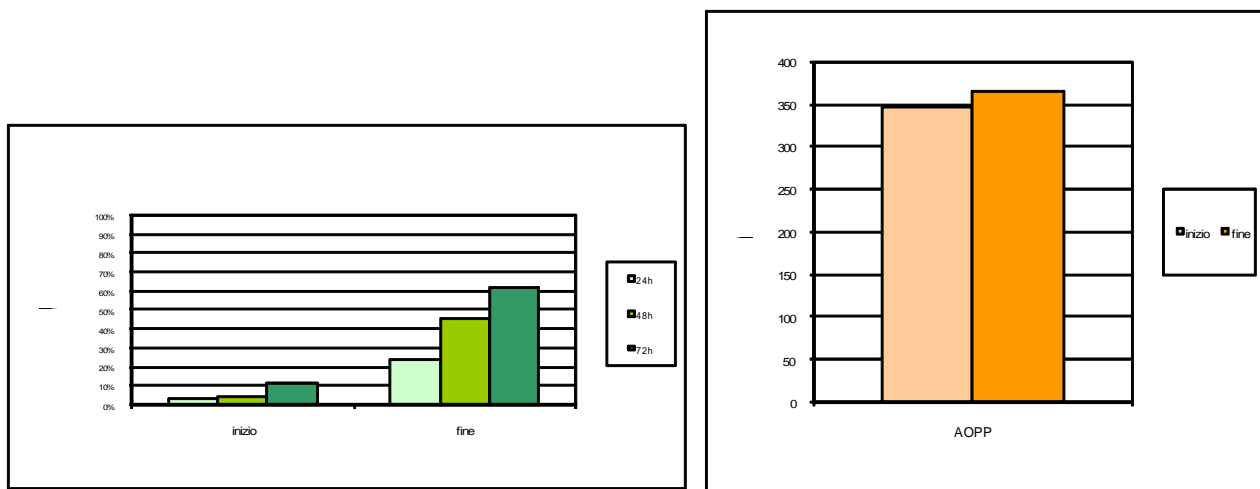


Figura 16

Percentuale apoptosi e indice stress ossidativo inizio-fine ciclo trattamento (Pz.4-5)

La sensibilità del metodo utilizzato ha permesso per la prima volta di tracciare il profilo citochinico di questi pazienti trattati con sistema Prometheus e di valutare in contemporanea la risposta molecolare e biologica del trattamento depurativo con il sistema stesso.

Per quanto riguarda lo studio di Trascrittomica Plasmatica la nuova tecnologia RT^2 Profiler PCR Arrays (*Superarray Biosciences Corporation*) ha permesso invece la valutazione del profilo di espressione genica dei pazienti prima, durante e dopo il trattamento (26). In particolare è stato analizzato il livello di espressione di 84 geni appartenenti al *pathway* NF-kB. I risultati preliminari suggeriscono che l'apoptosi cellulare possa giocare un ruolo chiave nella compromissione dei pazienti, data confermato dal fatto che in tutti i pazienti la maggior parte dei geni modulati appartengono al *pathway* apoptotico.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel nostro studio sono stati trattati con il sistema Prometheus sette pazienti con insufficienza epatica acuta, tutti con bilirubinemia totale maggiore a 25 mg/dL e 5 pazienti su 7 con indici di ritenzione azotata alterati.

I trattamenti con il sistema Prometheus hanno consentito di raggiungere l'outcome primario o di ottenere comunque un'importante riduzione dei livelli sierici di bilirubina totale (di entrambe le sue componenti, diretta e indiretta) nei pazienti arruolati.

Dalla elaborazione dei risultati risulta che per il raggiungimento dell'outcome primario sono efficaci 4 trattamenti consecutivi, senza interruzioni, della durata minima di 4 ore e massima di 6 ore (considerando la cinetica di saturazione del dializzatore), se la bilirubinemia totale di partenza non supera i 40 mg/dL.

Si è notato, inoltre, al termine di ciascun trattamento una diminuzione non statisticamente significativa dei livelli di transaminasi (AST e ALT) e γ GT a testimonianza comunque dell'impatto positivo del sistema sul profilo epatico. Riguardo invece gli indici di ritenzione azotata, trattandosi di un sistema che si combina con una dialisi ad alta efficienza, si è registrata una significativa riduzione sia dei livelli dell'urea che della creatinina, ed in due pazienti si è anche assistito ad una buona ripresa della diuresi.

Il miglioramento del profilo epatico e renale, ha permesso di ottenere in 5 pazienti su 7 un miglioramento del MELD score (Δ MELD medie pari a 6), anche se solo in 4 di essi si è mantenuto al di sotto di 30.

In tre pazienti sono stati eseguiti i quattro trattamenti previsti in modo consecutivo, un paziente ne ha eseguiti tre e tre pazienti un solo trattamento. Un paziente in lista di trapianto di fegato è stato sottoposto ad un solo trattamento depurativo ed il giorno successivo è stato trapiantato.

A trenta giorni dal termine dei trattamenti i 6 pazienti non trapiantati sono deceduti per

complicanze legate alla Sepsi o a Multiple Organ Failure (*MOF*). L'elevata mortalità non è tuttavia correlata alle complicanze del trattamento ma corrisponde a quella dei pazienti affetti da epatopatia terminale non giunti a trapianto.

In conclusione, i dati in nostro possesso ci inducono a sostenere che il sistema Prometheus non riesce a incidere prognosticamente sulla mortalità dei pazienti epatopatici in fase avanzata, ma può costituire tuttavia un importante sistema bridge al trapianto di fegato, in particolare nel raggiungimento dei singoli obiettivi finalizzati al miglioramento dei principali esami ematochimici e del MELD score.

In termini pratici ciò ha permesso di ottimizzare lo status clinico dei pazienti in attesa di terapia sostitutiva. Tale scopo è stato definitivamente raggiunto con il paziente poi trapiantato, che ha affrontato il trapianto d'organo in condizioni cliniche più favorevoli. I restanti pazienti, in mancanza di disponibilità di una donazione, hanno comunque beneficiato del trattamento in quanto esso ha permesso un miglioramento delle condizioni cliniche tale da consentire il trasferimento dall'unità di terapia intensiva all'unità di terapia semi-intensiva.

Tali risultati potrebbero presentare chiare ricadute positive sul servizio sanitario regionale, sia dal punto di vista di qualità di gestione clinica che per l'impatto economico.

La realizzazione del progetto ha incontrato difficoltà sia in ambito logistico sia clinico.

Nel primo caso sono state correlate alla complessità dell'apparato tecnico e ai diversi esperti coinvolti nel sistema; ciò ha richiesto una progressiva ottimizzazione dei processi di attivazione delle sedute (selezione del paziente, attivazione dei tecnici e degli esperti medici e paramedici). Tuttavia, dopo un'iniziale *learning curve*, abbiamo assistito ad una riduzione dei tempi di attivazione ed un miglioramento dei processi di feedback tra gli esperti coinvolti.

Tra i principali limiti tecnici nell'utilizzo del sistema Prometheus, vi è l'elevato volume extracorporeo, di molto superiore a quello della dialisi standard, che comporta due

rilevanti conseguenze negative: la necessità di instaurare una significativa anticoagulazione in pazienti già con uno stato coagulativo compromesso e l'inevitabile calo pressorio in pazienti già ipovolemici, situazione particolarmente critica fin dall'inizio del trattamento.

Riguardo all'anticoagulazione abbiamo scelto quella sistemica con eparina, e non quella regionale con citrato, per la quale la macchina è predisposta, per il fondato rischio di una grave alcalosi metabolica che il citrato può indurre, in particolare nei pazienti epatopatici non in grado di metabolizzarlo.

Il monitoraggio orario del tempo di coagulazione del paziente durante il trattamento ha consentito di adeguare il dosaggio dell'eparina infusa a seconda delle necessità: nonostante ciò, alla fine di ciascun trattamento, i valori del tempo di coagulazione risultavano comunque alterati, tali da rendere necessaria l'infusione di sacche di plasma fresco concentrato, infusione che non può essere eseguita prima del trattamento per il rischio di coagulazione del circuito.

Per garantire un'adeguato sostegno emodinamico, durante i trattamenti, è stata determinante la somministrazione di ammine vasoattive quali noradrenalina al dosaggio di 0.01 gamma/Kg/minuto e dopamina al dosaggio variabile tra 3 e 5 gamma/Kg/minuto in quei pazienti che presentavano all'arruolamento valori di pressione arteriosa media uguali o inferiori a 60-70 mmHg.

Questi provvedimenti terapeutici hanno consentito di attuare i 4 trattamenti previsti in modo continuativo e senza complicazioni in 3 pazienti su 7 e, grazie al raggiungimento di valori pressori adeguati, hanno verosimilmente contribuito al miglioramento significativo della diuresi in 2 su 3 (peraltro oligurici).

Per altri pazienti l'ipotensione arteriosa grave, refrattaria all'uso di ammine vasoattive verificatasi durante il primo trattamento e la comparsa di criteri di esclusione dal trattamento stesso, hanno determinato la loro esclusione dallo studio.

In conclusione, l'ottimizzazione del sistema e gli ulteriori risultati ancora in fase di

elaborazione potranno svilupparsi su due fronti:

- implementazione delle conoscenze sui meccanismi fisiopatologici che correlano il processo flogistico allo scompenso metabolico in corso di insufficienza epatica da epatopatia cronica
- applicazione definitiva del Sistema Prometheus come bridge al trapianto epatico, a fronte del sempre più rilevante mismatch tra il pool dei donatori disponibili e il numero dei pazienti in lista in attesa di trapianto epatico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rifai K, Bahr MJ. Acute liver failure. *Internist* 2003; 44: 585-598
- 2) Adam R et al. Evolution of liver transplantation in Europe: Report of the European Liver transplant registry. *Liver Transplantation* 2003; 9: 1231-1243.
- 3) Tsai M-H et al. Organ system failure scoring system can predict hospital mortality in critically ill cirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 251-257.
- 4) Wehler M et al. Short term prognosis in critically ill patients with cirrhosis assessed by prognostic scoring system. *Hepatology* 2001; 34: 255-261.
- 5) Kress JP et al. Outcomes of critically ill patients denied consideration for liver transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 418-442.
- 6) Secher A, Osorio J, Freise C, Osorio RW. Artificial liver support devices for fulminant liver failure. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 415-430.
- 7) Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002; 20: 252-261.
- 8) Sen S, Williams R, Jalan R. Emerging indications for albumin dialysis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 468-475.
- 9) Laleman W, Wilmer A, Evenepoel P, et al. Review article: non biological liver support in liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 351-363.
- 10) Laleman W, Wilmer A, Evenepoel P, et al. Effect of the molecular adsorbent recirculating system and Prometheus devices on systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure. *Critical Care* 2006; 10: R108.
- 11) Stadlbauer V, Krisper P, Aigner R, et al. Effect of extracorporeal liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure. *Critical Care* 2006; 10: R169.

- 12) Sen S, Davies NA, Mookerjee RP et al. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver Transpl* 2004; 10: 1109-1119.
- 13) Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A et al. Detoxifying capacity and kinetics of Prometheus- a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Blood Purif* 2005; 23: 349-358.
- 14) Bammens B, Evenepoel P, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Removal of the protein-bound solute p-cresol by convective transport: a randomized crossover study. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 278-285.
- 15) Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G et al. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs* 1999; 23: 81-86.
- 16) Rifai K, Ernst T, Kretschmer U et al. Removal selectivity of Prometheus: a new extracorporeal liver support device. *World J Gastroenterol* 2006; 12(6): 940-944.
- 17) Santoro A. et al. Prometheus system: a technological support in liver failure. *Transplant Proc.* 2006; 38(4): 1078-82.
- 18) Rolando N. et al. The Systemic Inflammatory Response Syndrome in Acute Liver Failure. *Hepatology* 2000; 32: N. 4.
- 19) Nagaki M. et al. High levels of serum Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- are associated with fatality in fulminant hepatitis. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182: 1103-08.
- 20) Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl: 64-74.
- 21) Rifai K. et al. Review article: clinical experience with Prometheus. *Ther Apher Dial.* 2006; 10(2): 132-37.
- 22) Genesca J. et al. Interleukin-6, Nitric Oxide, and the clinical and

- hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology* 1999; 1: 94.
- 23) Paisarn Vejchapipat et al. Elevated serum nitric oxide metabolites in biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 106–09.
 - 24) Blei A. T. Infection, inflammation and hepatic encephalopathy, synergism redefined. *Journal of Hepatology* 2004; 40: 327–30.
 - 25) Di Campli C. et al. The decrease in cytokine concentration during albumin dialysis correlates with the prognosis of patients with acute on chronic liver failure. *Transplantation Proceedings*, 2005; 37: 2551–53.
 - 26) Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R. Nuclear Factors-Kappa B plays a central role in tumor necrosis factor-mediated liver disease. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1409-1415.
 - 27) Strobl W et al. The fractionated plasma separation and adsorption system: in vitro evaluation and first clinical results. *ASAIO J* 1999; 45: 194.
 - 28) Kramer L et al. Clinical experience with artificial liver support in chronic liver failure with encephalopathy. *ASAIO J* 2000 , 46: 211
 - 29) Krisper P et al. MARS versus Prometheus: Comparison of reduction ratios (RR) as a measure of treatment dose in two different liver detoxification devices. *J Hepatol* 2004; 40: 69.
 - 30) Rifai K et al. Prometheus- a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol* 2003; 39:984-990.
 - 31) Strobl W et al. Das „Fractionated Plasma Separation and Adsorption System“ (FPSA), ein neues membran-adsorptionsgestütztes adjunktives extrakorporales Blutreinigungssystem für das Leberversagen; *Biomedizinische Technik*, 1998; Band 43, Ergänzungsband 1, 168-169..
 - 32) Falkenhagen D et al. Fractionated Plasma Separation and Adsorption system: A novel System for Blood Purification to Remove Albumin Bound Substances.

- Artificial Organs 1999; 23: 81-86.
- 33) Weber C et al. A novel detoxification device for the treatment of hepatic failure (HF). *ASAIO J* 2002; 48:181.
 - 34) Tabei K et al. Application of plasma perfusion in hepatic failure. *Biomaterial Artif. Cells* 1991;19 (1): 193-201
 - 35) Patel N. et al. Changes in brain size in hepatic encephalopathy: a coregistered MRI study. *Metabolic Brain Disease* 2004; 19: 431-45.
 - 36) Vignali D.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000; 21: 243-55.
 - 37) De Jager W. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10: 133-39.
 - 38) Szodoray P. et al. Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol.* 2004; 59: 592-99.
 - 39) Heijmans-Antonissen C. et al. Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm.* 2006; 1: 283-98.
 - 40) Zheng Z. et al. Sensitive and quantitative measurement of gene expression directly from a small amount of whole blood. *Clin Chem.* 2006; 52(7): 1294-1302.
 - 41) Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Continuous hemoifiltration/hemodiafiltration in critical care. *Ther Apher* 2002; 6(3): 193-8.
 - 42) Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Continuous hemoifiltration/hemodiafiltration in critical care. *Ther Apher* 2002; 6(3): 193-8.
 - 43) Banares el al. Extracorporeal liver support with MARS in patients with acute on chronic liver failure (AoCLF). The RELIEF trial, Oral presentation

International Liver Congress 2010

- 44) Rifai K. et al. Extracorporeal liver support with FPSA (Prometheus) in patients with acute on chronic liver failure (AoCLF). The Helios study. Oral presentation International Liver Congress 2010
- 45) Wong RF et Al. Midodrine, Octreotide, Albumin and TIPS in selected patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome. Hepatology 2004; 40:55-64

