

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI di Trieste e UNIVERSITÀ CAMPUS BIO-MEDICO di Roma
Istituto Centro Ricerche - Dipartimento Scienze della Vita – Trieste
Dipartimento di Medicina Clinica – Roma

XXIII Ciclo del CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

in

PATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

TITOLO TESI DI DOTTORATO

Studio sperimentale sugli effetti della prostaciclina nell'epatite cronica

Settore scientifico-disciplinare: Med/04

DOTTORANDO
Dr. Enrico Maria Zardi

RESPONSABILE DEL DOTTORATO DI RICERCA
Prof. Pietro Dri - Università di Trieste

RELATORE
Prof. Aldo Dobrina - Università di Trieste

SUPERVISORE/TUTORE
Prof. Aldo Dobrina - Università di Trieste

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

ABSTRACT	5
SOMMARIO	9
1. CENNI DI ANATOMIA EPATICA NORMALE	13
2. FIBROSI EPATICA	23
• <u>Fisiopatologia delle cellule stellate epatiche</u>	23
• <u>Altre popolazioni di miofibroblasti coinvolti nella fibrosi</u>	28
<i>a.Fibroblasti portali</i>	28
<i>b.Miofibroblasti derivati dal midollo osseo</i>	28
<i>c.Fibroblasti</i>	28
<i>d.Epatociti e colangiociti</i>	29
3. PATOLOGIE	31
• <u>Steatosi e NASH</u>	31
• <u>Epatite cronica</u>	34
• <u>Cirrosi</u>	35
4. FISIOPATOLOGIA DELL'EMODINAMICA PORTALE: L'IPERTENSIONE PORTALE	36
5. PREMESSA ALLA RICERCA	43
• <u>Studi sperimentali su</u>	44
<i>a. Endotelina</i>	44
<i>b. Prostaciclina</i>	44
<i>c.PPAR-γ</i>	45
• <u>Sintesi della ricerca di base</u>	46
• <u>Caratteristiche dell'iloprost (analogo della prostaciclina)</u>	47
• <u>Basi razionali della ricerca</u>	48

6. SCOPO DELLA RICERCA	49
7. STUDIO CLINICO - MATERIALI E METODI	52
• <u>Protocollo sperimentale su pazienti con epatite cronica C</u>	52
• <u>Base di partenza per la sperimentazione stessa</u>	52
• <u>Descrizione degli obiettivi e della finalità della sperimentazione</u>	52
a. <i>Obiettivi immediati (dopo il I ciclo di trattamento con iloprost)</i>	52
b. <i>Esiti primari (al termine del I ciclo di trattamento di 3 giorni con iloprost)</i>	53
• <u>Schema dello studio</u>	53
• <u>Raccolta e gestione dati</u>	54
• <u>Trattamento dei pazienti con iloprost</u>	57
• <u>Valutazione dell'efficacia</u>	57
• <u>Valutazione della sicurezza</u>	57
• <u>Selezione e ritiro dei soggetti</u>	58
a. <i>Criteri di inclusione</i>	58
b. <i>Criteri di esclusione</i>	58
• <u>Effetti collaterali</u>	58
• <u>Criteri per la raccolta dati e modalità di raccolta</u>	59
• <u>Esame sierico delle citochine</u>	59
• <u>Valutazione della viremia (HCV-RNA)</u>	62
• <u>Valutazione del flusso portale</u>	62
• <u>Descrizione dei metodi statistici impiegati</u>	63
8. STUDIO SU RATTI - MATERIALI E METODI	65
• <u>Estrazione RNA da fegato</u>	66
a. <i>RT-PCR (PCR retrotrascrizionale)</i>	67
b. <i>Real Time PCR</i>	68
• <u>Western Blot</u>	70

• <u>Inclusione di organi in paraffina</u>	72
• <u>Colorazioni istologiche</u>	73
• <u>Criostato</u>	74
• <u>Tecniche di immunoistochimica e di immunofluorescenza</u>	74
• <u>Scopo delle analisi istologiche ed immunoistochimiche</u>	75
9. RISULTATI	76
• <u>Risultati studio clinico</u>	76
<i>a. IL-2</i>	76
<i>b. IL-4</i>	76
<i>c. IL-5</i>	77
<i>d. IL-10</i>	78
<i>e. TNF-α</i>	78
<i>f. IFN-γ</i>	78
<i>g. TGF-β</i>	79
<i>h. Transaminasi</i>	80
<i>i. HCV-RNA</i>	80
• <u>Risultati studio sperimentale su ratti</u>	81
<i>a. Transaminasi</i>	81
<i>b. Real Time PCR</i>	82
<i>c. Colorazioni istologiche</i>	85
<i>d. Tecnica di immunofluorescenza</i>	86
<i>e. Tecnica di immunoistochimica</i>	87
<i>f. Western Blot</i>	88
10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	90
11. BIBLIOGRAFIA	94
12. RINGRAZIAMENTI	100

ABSTRACT

Previous studies have shown that hepatic fibrosis is caused by altered responses in all of the mechanisms that control regeneration and repair.

Some stimulating events (e.g., viral, oxidoreductive, endotoxinic and alcoholic) occur repeatedly, are continuous, are responsible for this uncontrolled regeneration and able to perpetuate and cause these processes to become irreversible. This occurs by the activation and then the transformation of hepatic stellate cells, the primary cells regulating the production and synthesis of the cell matrix, receptors and various cytokines and molecules.

Activation and transformation are thus the events that lead hepatic stellate cells to progressive and irreversible phenotypic dedifferentiation. They acquire the abilities of fibroblasts and thus a high fibrogenic activity that can progressively overthrow normal liver structure and produce cirrhosis.

Furthermore, hepatic stellate cells that are transformed into hepatic myofibroblastic cells lose their ability to dynamically regulate the homeostasis of the portal microcirculation due to their impairment or failure to synthesise vasodilating molecules (such as prostacyclin), which benefits other molecules with vasoconstrictive properties (such as endothelin).

Therefore, an increase in the portal microcirculation pressure causes portal hypertension and a series of haemodynamic complications, such as ascites, collateral circulation, and oesophageal varices.

Major steps forward have been made toward the understanding of the mechanisms underlying liver fibrosis. However, much still needs be done to identify drugs with hepatic antifibrotic properties that are able to stop the evolution of fibrosis and thus cirrhosis.

Our scientific research arises from two of our published studies concerning the haemodynamic effects of an increase in portal flow caused by a prostacyclin analogue vasodilator (iloprost) administered to patients suffering from disabling lower-limb arteriopathy with chronic HCV-positive hepatitis (Zardi et al, *Ultrasound Med Biol* 2003; Zardi et al, *J Interferon Cytokine Res.* 2004).

Subsequently, in another published study of ours, we showed that iloprost also increases portal flow in subjects with systemic sclerosis (Zardi et al., *In Vivo* 2006), a feature that was then internationally patented as a new application (patent no. PCT/IT02/00554).

Improved hepatic perfusion prompted us to continue the research and test the other features of the drug on human and animal models of chronic hepatopathy.

Preliminary to this experimental research, we also performed an in-depth study of the liver's regenerative and reparative mechanisms that are pathogenetically responsible for altered hepatic fibrosis (Zardi et al, *Expert Opin Biol Ther.* 2007; Zardi et al, *Curr Med Chem.* 2008; Zardi et al, *J Am Coll Cardiol.* 2010).

This research was divided into two sections:

- Observation of patients with HCV-positive chronic hepatitis that were treated with iloprost;
- Observation of rats with steatosis and chronic hepatitis induced by carbon tetrachloride and treated with iloprost.

For the first section of this research, after obtaining consent from the Bioethics Committee of the Campus Bio-Medico University of Rome, five patients (who were admitted into the Department of Clinical Medicine at our university with HCV-positive chronic hepatitis and adhered to the study protocol) were treated with placebo for two days and with iloprost for another three days.

After treatment with iloprost, the following results were obtained: a trend toward an increase in hepatic portal perfusion and trends toward decreases in transaminase and cytokines IL-4, TNF- α , IFN- γ and TGF- β without worsening of HCV-RNA levels.

These data suggest that iloprost acts as an anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic and anti-TNF agent and has beneficial effects on the livers of subjects with chronic hepatitis by decreasing their cytonecrosis indices.

The second section of this research was performed at the Department of Life Sciences, University of Trieste, after receiving specific authorisation from the Health Ministry to experimentally induce chronic hepatitis in rats. Twenty-four Wistar rats, divided into three groups, were administered carbon tetrachloride to induce steatosis and eventually chronic hepatitis. Within each group, some were treated with placebo and others with iloprost. After 4, 8 and 12 weeks, some rats in each population were sacrificed, their blood samples were collected in EDTA, and their livers were explanted.

RNA was extracted and studied by RT-PCR and real-time PCR on some liver sections. Histological, immunohistochemical and molecular tests were also performed to evaluate the expression of receptors, molecules and proteins.

In the population of iloprost-treated rats, transaminases, collagen production, and the expression of endothelin and α -smooth muscle actin receptors were all reduced compared to the placebo-treated rat population.

The data from the clinical and animal studies are consistent and suggest that this vasodilator drug has both good tolerability and beneficial effects on the liver.

In fact, iloprost has been shown to be an anti-inflammatory that can regulate the cytokine network and antifibrotic capacity of the liver in both human and animal

models of chronic hepatitis. Some attenuation of histological damage has also been observed in iloprost-treated rats compared to placebo-treated rats.

Obviously, all of these data need further confirmation by studies on a broader population, but combined with the data obtained in our previous studies (improved portal perfusion after treatment with iloprost), these data suggest that iloprost has many pharmacological properties that are beneficial to the liver.

Patients suffering from chronic hepatitis may benefit from a combined treatment with well-established therapies and this vasodilator drug.

SOMMARIO

Precedenti studi hanno mostrato come la fibrosi epatica è la conseguenza di una risposta alterata da parte dei meccanismi deputati al controllo dei processi rigenerativi e riparativi.

Responsabili di questa incontrollata attività riparativa sono alcuni eventi stimolatori ripetuti e continuativi (virali, ossido-riduttivi, endotossinici, alcolici) in grado di perpetuare e rendere irreversibile questi processi determinando attivazione prima e trasformazione poi, delle principali cellule che regolano produzione e sintesi di matrice extracellulare e di numerose citochine: le cellule stellate epatiche.

Attivazione e trasformazione rappresentano, gli eventi che conducono le cellule stellate epatiche ad una progressiva ed irreversibile de-differenziazione fenotipica; esse acquisiscono potenzialità di tipo fibroblastico e quindi elevata attività fibrogenetica in grado di sovvertire progressivamente la normale impalcatura epatica e provocare lo sviluppo di cirrosi. Inoltre, le cellule stellate trasformate in cellule miofibroblastiche epatiche perdono la capacità di regolare dinamicamente l'omeostasi del microcircolo portale a causa della diminuzione o mancata sintesi di molecole vasodilatatorie come la prostaciclina a vantaggio di altre con proprietà vasoconstrictorie come l'endotelina.

L'esito è un incremento della pressione del microcircolo portale che causa conseguentemente ipertensione portale e determina una serie di complicanze emodinamiche quali la formazione di ascite, di circoli collaterali, di varici esofagee.

Notevoli passi avanti si sono compiuti nella comprensione dei meccanismi che sottendono il processo fibrotico epatico, mentre ancora rimane da fare per trovare farmaci con caratteristiche antifibrotiche epatiche, in grado di arrestare l'evoluzione della fibrosi e quindi della cirrosi.

Lo spunto per questa ricerca scientifica nasce da due nostri studi, precedentemente pubblicati, sugli effetti emodinamici epatici di incremento del flusso portale, di un vasodilatatore analogo della prostaciclina (iloprost), in pazienti sottoposti a questo trattamento a causa di una invalidante arteriopatia obliterante degli arti inferiori e con epatite cronica HCV positiva (Zardi et al, *Ultrasound Med Biol* 2003; Zardi et al, *J Interferon Cytokine Res.* 2004). Successivamente, in un altro studio pubblicato, dimostravamo che l' iloprost era capace di incrementare il flusso epatico in soggetti con sclerosi sistemica (Zardi et al, *In Vivo* 2006). Questa caratteristica di incremento del flusso portale è poi stata brevettata sotto forma di nuova applicazione d'uso in brevetto internazionale (brevetto n.° PCT/IT02/00554). Il miglioramento della perfusione epatica, ci ha indotto a proseguire la ricerca per verificare altre proprietà di questo farmaco sul modello umano e animale di epatopatia cronica. Preliminarmente alle indagini sperimentali oggetto di questa ricerca, abbiamo anche portato avanti un approfondimento culturale sui meccanismi rigenerativi e riparativi a livello del fegato nella cui alterazione si riconosce la responsabilità patogenetica della fibrosi epatica (Zardi et al, *Expert Opin Biol Ther.* 2007; Zardi et al, *Curr Med Chem.* 2008; Zardi et al, *J Am Coll Cardiol.* 2010).

La ricerca è stata pertanto suddivisa in due filoni:

- primo filone: osservazione di pazienti con epatite cronica HCV positiva trattati per pochi giorni, compatibilmente con la proponibilità al paziente di questa sperimentazione, con iloprost;
- secondo filone: ratti sottoposti a induzione di steatosi ed epatopatia cronica con tetracloruro di carbonio contemporaneamente trattati con iloprost.

Per quanto riguarda il primo filone di ricerca, dopo aver ottenuto il consenso del comitato bio-etico dell'Università Campus Bio-Medico di Roma, 5 pazienti con

epatite cronica HCV positiva, che avevano aderito al protocollo di studio, sono stati trattati per tre giorni con placebo e per altri tre giorni con iloprost in regime di ricovero ospedaliero presso il dipartimento di Medicina Clinica dell'Università Campus Bio-Medico. Dopo trattamento con iloprost si è apprezzata una tendenza ad un incremento della perfusione epatica portale, una tendenza ad un decremento dei valori delle transaminasi e dei valori delle seguenti citochine (IL-4, TNF- α , IFN- γ e TGF- β) senza peggioramento dei livelli sierici di HCV-RNA.

Tali dati suggeriscono che l'ilocprost, agendo con caratteristiche anti-infiammatorie, anti-ossidanti, anti-TNF ed anti-fibrotiche possa avere effetti benefici sul fegato di soggetti con epatite cronica inducendo un decremento degli indici di citonecrosi.

Per quanto riguarda il secondo filone di ricerca, esso è stato avviato presso il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste, dopo aver ottenuto, in regime di deroga dal Ministero della Salute, un'autorizzazione specifica per indurre in via sperimentale l'epatite cronica su ratti. Sono stati utilizzati 24 ratti della specie Wistar, presso lo stabulario dell'Università di Trieste e suddivisi in tre gruppi. Tutti i ratti di ogni gruppo ricevevano la somministrazione di tetracloruro di carbonio per indurre in essi steatosi prima ed epatite cronica, poi. Per ogni gruppo una parte di ratti veniva trattata con placebo, mentre l'altra con iloprost. Al termine di 4, 8 e 12 settimane ratti di entrambe le popolazioni di ogni gruppo, venivano sacrificati, veniva prelevato il sangue in EDTA e veniva espantato il fegato. Su alcune sezioni di esso venivano eseguite estrazioni di RNA studiate con RTqPCR; venivano inoltre eseguite analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari per la valutazione dell'espressione di alcuni recettori, di molecole e proteine. Le informazioni ottenute ci hanno permesso, complessivamente, di apprezzare nella popolazione di ratti trattata con iloprost, una diminuzione delle transaminasi, della

produzione di collagene, della espressione del recettore dell'endotelina e dell' α -smooth muscle actin rispetto alla popolazione di ratti trattata con placebo.

I dati dello studio clinico e di quello su animali sono coerenti tra loro ed in maniera univoca consentono di affermare una buona tollerabilità ed effetti benefici sul fegato di questo farmaco vasodilatatore. L'iloprost, ha mostrato, infatti, di possedere sia nel modello animale che umano di epatopatia cronica, proprietà anti-infiammatorie, di regolazione del network citochinico, ed antifibrotiche epatiche; infine si è notata nel modello animale un'attenuazione del grado di danno istologico nei ratti trattati con ilprost, rispetto a quelli trattati con placebo. Questi nuovi riscontri necessitano di conferma in casistiche più ampie ma unitamente a quelli ottenuti in nostri precedenti studi (che hanno mostrato un miglioramento della perfusione portale dopo trattamento con ilprost), suggeriscono che questo vasodilatatore ha numerose proprietà farmacologiche benefiche per il fegato. Pazienti con epatopatia cronica potrebbero maggiormente beneficiare di un trattamento combinato che preveda l'impiego di terapie consolidate e di questo vasodilatatore.

1. CENNI DI ANATOMIA EPATICA NORMALE

Il fegato umano, organo a secrezione esocrina ed endocrina di circa 1,5-2Kg di peso, è posto sotto il diaframma ed occupa l'ipocondrio destro, l'epigastrio ed una piccola parte dell'ipocondrio sinistro.

La sua faccia viscerale è leggermente concava e presenta tre solchi disposti a formare una H: un solco trasverso e due solchi sagittali, destro e sinistro. Nel solco trasverso, che corrisponde all'ilo dell'organo, vi si trovano arteria epatica, vena porta e dotti epatici, insieme con i vasi linfatici ed i nervi: essi costituiscono, così, il peduncolo epatico.

La sua faccia diaframmatica, convessa e a superficie liscia, è dotata di un solco sagittale che la divide in due aree o lobi principali: il lobo destro ed il lobo sinistro (quest'ultimo presenta dimensioni fino a sei volte minori del destro) (Figura 1). Al lobo sinistro appartengono il II segmento (a localizzazione postero-superiore) ed il III segmento (a localizzazione antero-inferiore), mentre, al lobo destro, il V e VI segmento (a localizzazione antero-inferiore) ed il VII e VIII segmento (a localizzazione postero-superiore).

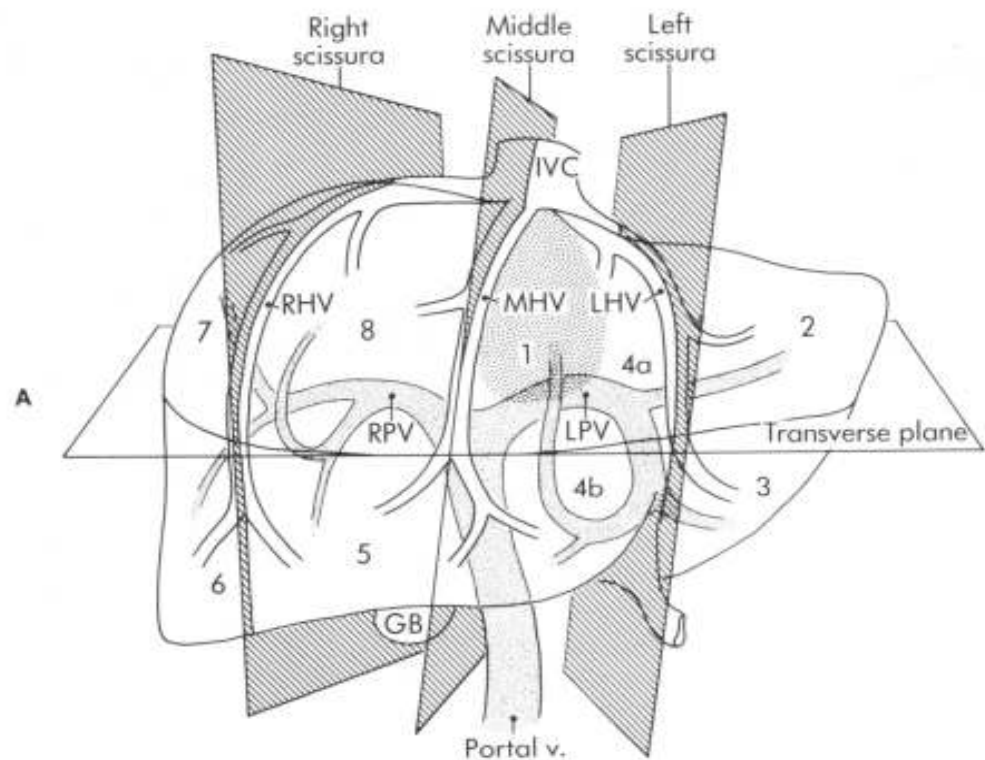


Figura 1. Segmentazione epatica. Tratto da "Corso di Ecografia interattivo (Dr. Claudio Pasquali)".

Il fegato comprende inoltre due lobi secondari, di dimensioni minori rispetto a quelli principali: il lobo caudato (che corrisponde al I segmento ed è localizzato posteriormente al lobo sinistro, da cui è diviso per mezzo del legamento venoso) ed il lobo quadrato [che corrisponde al IV segmento ed è interposto tra lobo destro (da cui è separato per mezzo della vena sovraepatica media e della colecisti) e sinistro (da cui è diviso per mezzo del legamento rotondo e del ramo portale sinistro)] (Figura 2).

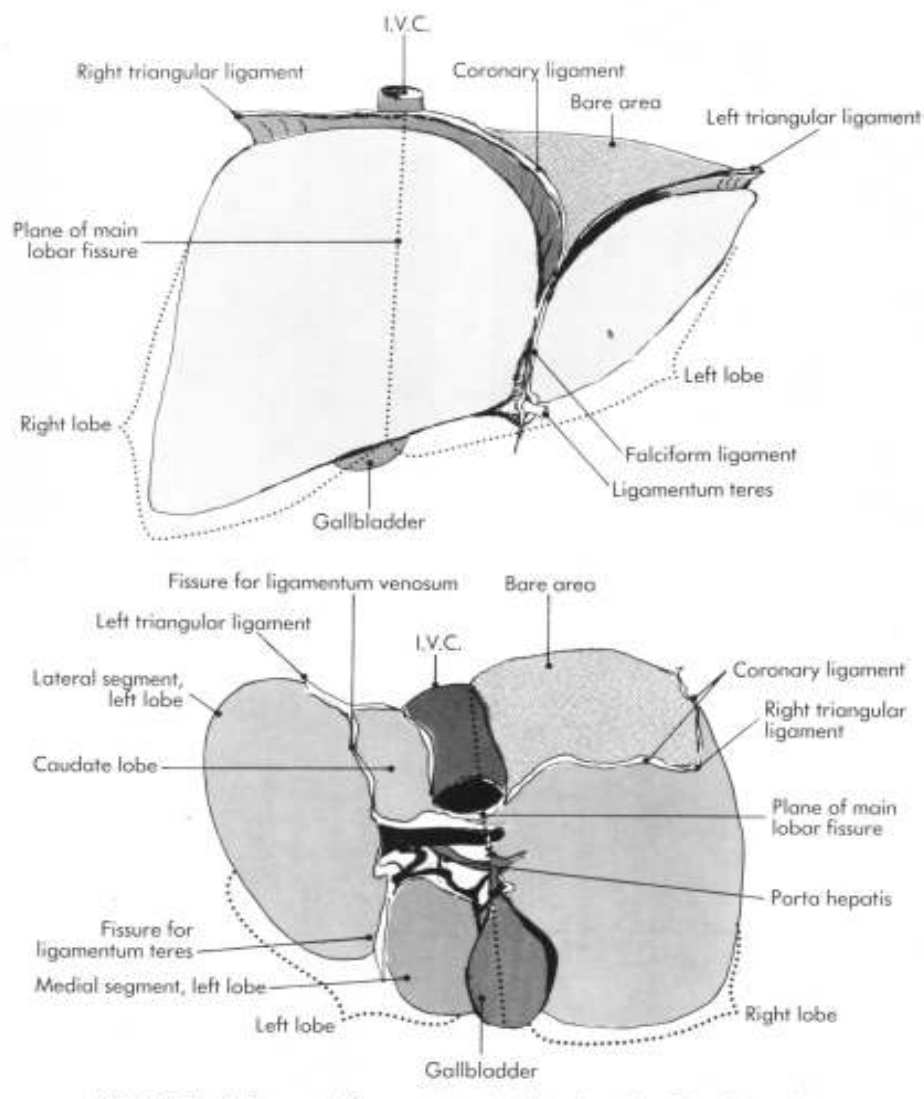


Figura 2. Proiezione anteriore e posteriore del fegato. Tratto da "Corso di Ecografia interattivo (Dr. Claudio Pasquali)".

Il fegato ha una duplice perfusione così suddivisa:

- per il 75 % dalla vena porta (diametro normale 8-12mm) che riceve il sangue proveniente da intestino e milza (la vena porta nasce infatti dall'unione di vene mesenterica superiore, inferiore e splenica) (Figura 3); in essa circola sangue di tipo venoso, e cioè poco ossigenato ma con la peculiarità di essere ricco di sostanze nutritive introdotte con l'alimentazione

- il restante 25 % deriva dall'arteria epatica che fornisce sangue ossigenato proveniente dalla circolazione sistemica.

Questo doppio apporto ematico confluisce e si meschia a livello dei sinusoidi epatici fuoriuscendo, poi, dal fegato, in direzione del cuore destro, per mezzo del sistema delle vene sovraepatiche tributarie della vena cava inferiore.

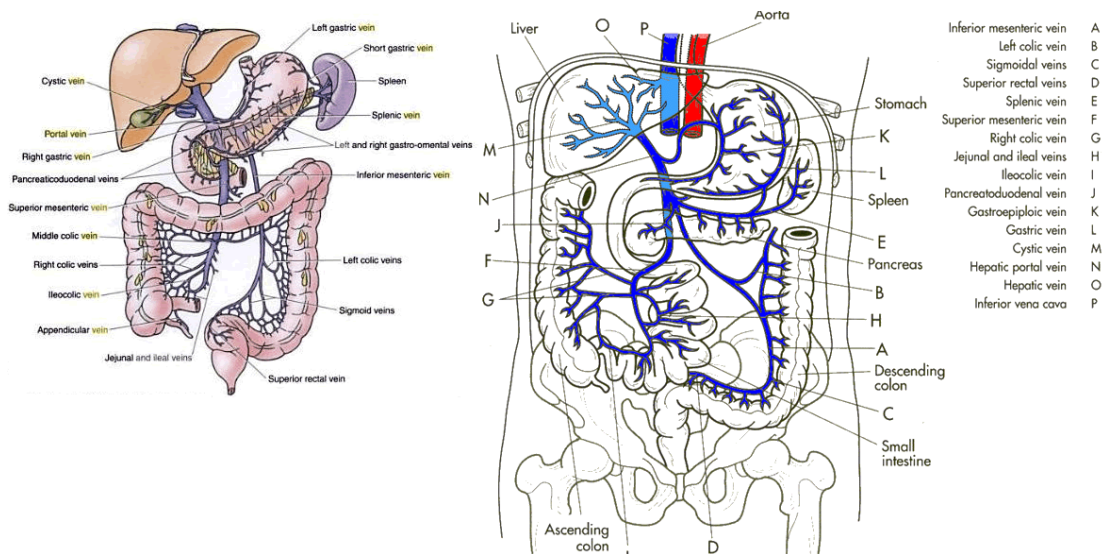


Figura 3. Schema della vascolarizzazione epatica. Tratto da "anatomytopics.files.wordpress.com/2009/01/portal-vein-system.jpg".

Il fegato, eccetto l'area nuda triangolare sulla sua faccia superiore, presenta duplice rivestimento:

- peritoneo viscerale, costituito dal mesotelio, un unico strato di cellule superficiali e da tessuto extraperitoneale sottostante;
- tessuto connettivo lasso che forma la capsula del Glisson, che ricopre anche il fascio neurovascolare a livello dell'ilo.

Dalla capsula del Glisson si dipartono setti e trabecole connettivali che, penetrando nel parenchima epatico, realizzano miriadi di spazi portali. Ogni spazio portale è caratterizzato dalla presenza di un ramo portale, un ramo dell'arteria epatica e di un

dotto biliare (che rappresentano la cosiddetta triade portale) a cui debbono aggiungersi anche dotti linfatici e ramificazioni nervose.

Il parenchima epatico è prevalentemente costituito da strutture laminari tridimensionali composte da epatociti (cellule che misurano in sezione 20-25 μm e svolgono la quasi totalità delle funzioni metaboliche) disposti in un singolo strato cellulare.

Uno spazio intercellulare separa gli epatociti dai sinusoidi venosi: lo spazio di Disse, che misura 0,2-0,5 μm e si può, talvolta, estendere anche tra epatociti adiacenti. Lo spazio di Disse è costituito da strette intercapedini intercellulari, i recessi perisinusoidali, che creano un intricato sistema di superfici pericapillari ed intercellulari attraverso cui defluisce il filtrato plasmatico; perciò, lo spazio di Disse favorisce, in condizioni fisiologiche, gli scambi tra epatociti e sangue, scambio facilitato anche grazie all'estesa superficie di assorbimento assicurata dai microvilli e dalle ampie fenestrature presenti nei sinusoidi venosi. Ad agevolare ulteriormente gli scambi, contribuisce la corretta distribuzione di fibre collagene di tipo I, III e IV, i microvilli di origine epatocitaria e le terminazioni nervose; lo spazio di Disse, da alcuni considerato virtuale, in condizioni patologiche può dilatarsi e sovvertirsi ritardando così gli scambi.

Tra gli epatociti sono, inoltre, presenti sottili canalicoli a costituire tutt'intorno una fitta micro-rete biliare. Questi canalicoli biliari drenano in dotti di calibro maggiore, i canali di Hering, che a loro volta confluiscono nei dotti biliari della triade portale. Quest'ultimi drenano poi nei dotti di terz'ordine che si gettano in quelli di second'ordine e questi in quelli di prim'ordine. I dotti di prim'ordine destro e sinistro drenano, per i rispettivi lobi destro e sinistro, nel dotto epatico comune che

a seguito della confluenza con il dotto cistico, proveniente dalla colecisti, assume il nome di coledoco.

Le lamine di epatociti non si limitano ad espandersi a raggiera a partire da una vena centrolobulare (vena tributaria delle vene epatiche), ma si dispongono tridimensionalmente in strutture ramificate e difficilmente rappresentabili. L'unità funzionale epatica più piccola che le lamine di epatociti vanno a formare è l'acino epatico. Un acino epatico è una sezione a forma ovalare di parenchima epatico, il cui asse maggiore congiunge due vene centrolobulari ed il minore, un lato dell'esagonale lobulo epatico. Ciascun acino è, inoltre, funzionalmente suddivisibile in tre zone:

- la zona 1, definita periportale, è quella più vicina alla ramificazione della vena porta e dei rami terminali dei vasi afferenti; il suo asse maggiore congiunge le due ramificazioni portali mentre quello minore si incunea lievemente nel parenchima epatico lobulare;
- la zona 2, intermedia, è un'area triangolare che comprende esclusivamente il parenchima del lobulo nella sua porzione media;
- la zona 3, centrolobulare, è limitrofa alla vena centrolobulare.

L'acino assume così una forma ovalare o romboidale.

L'interconnessione di più acini dà luogo, quindi, a quell'unità anatomica più complessa che è il lobulo epatico (50.000-100.000 unità per ogni fegato) (Figura 4) dotato di forma pseudo-esagonale (tende ad essere più regolare in altri animali che non nell'uomo), il cui scheletro è formato per l'appunto da multipli acini a loro volta costituiti da lamine di epatociti separate per mezzo dello spazio di Disse da sinusoidi venosi di origine portale.

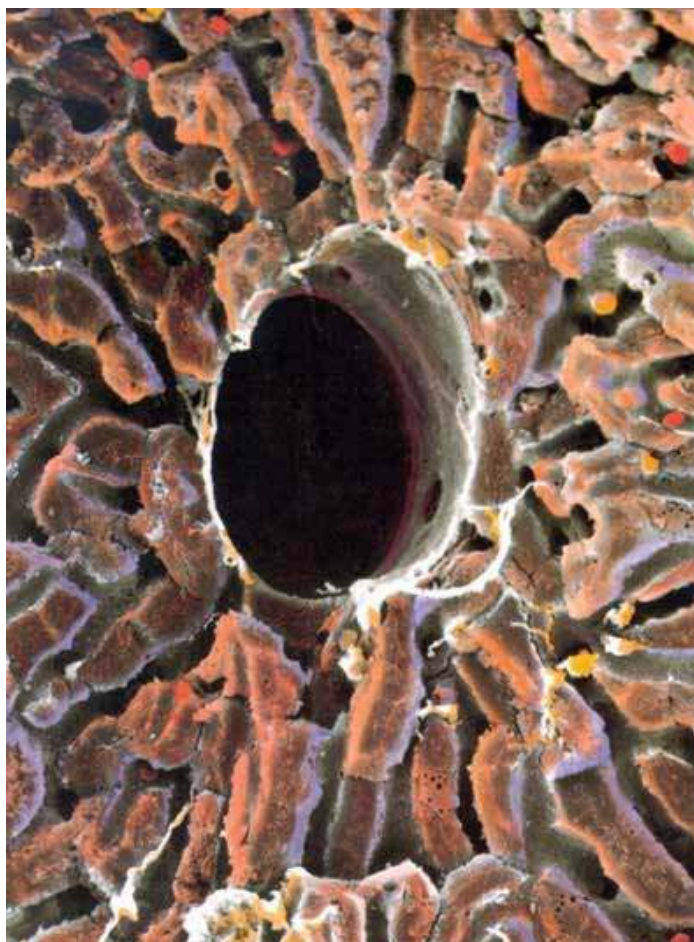


Figura 4. Immagine di porzione di lobulo epatico. Tratto da "Viaggio nel corpo umano; Autori: Piero Angela – Piero Motta, Edizioni Rizzoli. Libro coperto da copyright".

Ciascun lobulo è a sua volta delimitato da sottili setti connettivali, e ad ogni suo “angolo” si schiude una triade portale costituita da una ramo portale, un ramo dell’arteria epatica ed un dotto biliare. La triade portale o spazio portale è il vero centro nodale di smistamento, l’area funzionale di vero interesse del fegato ove le concentrazioni ematiche di ossigeno, di fattori nutritizi e di ormoni sono maggiori; le concentrazioni rilevate a questo livello calano poi vistosamente man mano che, attraverso i sinusoidi, si giunge verso la vena centrolobulare. I sinusoidi venosi provengono, infatti, dai rami portali che decorrono nello spazio portale e sono

disposti lungo le lamine di epatociti, separandole tra loro. I sinusoidi venosi raccolgono anche il sangue ricco di ossigeno che perviene dalle ramificazioni arteriose dell'arteria epatica realizzandosi, così, in essi, una piena commistione di sangue venoso ed arterioso.

Come già detto è qui nei sinusoidi che avvengono i processi di scambio nutritizio e d'ossigeno con gli epatociti attraverso il transito, nello spazio di Disse, del trasudato. Parte di esso viene raccolto dagli epatociti per essere metabolizzato e poi re-immesso, attraverso il polo vascolare, nel circolo ematico, parte raggiunge il sistema biliare, parte viene drenato dai vasi linfatici. Questi scambi sono favoriti da una bassa pressione nel microcircolo sinusoidale epatico grazie alla insolitamente alta resistenza precapillare rispetto a quella postcapillare che determina una bassa pressione di perfusione dei sinusoidi. La resistenza precapillare è data da una zona ad alta resistenza presinusoidale, localizzata nelle radici delle venule portali terminali.

I sinusoidi hanno decorso molto tortuoso e si anastomizzano tra loro, formando reti interlobulari. Hanno lume ampio e parete sottile; le cellule che rivestono i sinusoidi sono formate da 4 distinte popolazioni cellulari ognuna con un suo ruolo specifico atto a consentire i processi di scambio con gli epatociti attraverso lo spazio di Disse: queste sono le cellule endoteliali, le cellule del Kupffer, le cellule stellate (o di Ito) e le cellule foveolari.

1. Le cellule endoteliali sono cellule piatte prive di membrana basale e contengono rari mitocondri; sulla loro superficie presentano pori del diametro di 0.1-0.2 μm , spesso disposti in gruppi e fenestrature che raggiungono un diametro anche superiore ad 1 μm . I pori permettono lo scambio di sostanze nutritive e di molecole con i vicini epatociti, attraverso lo spazio di Disse. Le cellule endoteliali

hanno inoltre funzione fagocitaria, sintetizzano proteine che influenzano la composizione della matrice extracellulare ed hanno un ruolo nel metabolismo delle lipoproteine.

2. Le cellule fusiformi del Kupffer rivestono i sinusoidi e svolgono il ruolo che è proprio del sistema reticolo-endoteliale; derivano da precursori del midollo osseo e si comportano come macrofagi tissutali. Tra le funzioni rilevanti che assolvono vi sono: la fagocitosi di molecole, di endotossine, di sostanze tossiche e la modulazione della risposta immunitaria.

3. Le cellule stellate, scoperte nel 1876 da Carl von Kupffer, costituiscono circa 1/3 della popolazione cellulare non parenchimale del fegato e rappresentano circa il 5-8% dell'intera popolazione cellulare epatica. Esse si localizzano a livello dello spazio di Disse, a stretto contatto degli epatociti e delle cellule endoteliali che delimitano il sinusoidale epatico. Dal punto di vista morfologico presentano lunghe estroflessioni citoplasmatiche che conferiscono loro la tipica forma a stella e dalla presenza di numerosi granuli lipidici di vitamina A del diametro di 1-2 μm (le cellule stellate contengono infatti circa il 90% dei retinoidi totali corporei). I prolungamenti citoplasmatici di tipo ameboide possono essere o in contatto con le cellule endoteliali o posti nello spazio sottoendoteliale o localizzati lungo le ampie fenestrazioni endoteliali.

Le cellule stellate sono dotate di nucleo grande e chiaro, sintetizzano diverse proteine della matrice extracellulare e possiedono numerose funzioni:

- hanno funzione modulatrice della perfusione sinusoidale regolando dinamicamente lo stato di costrizione e vasodilatazione dei sinusoidi in risposta a mediatori vasocostrittori e vasodilatatori;

- contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del fegato producendo fattori di crescita, collagene di tipo IV ed in minor misura I e III;
- partecipano al turnover della matrice extracellulare epatica mediante la secrezione di metalloproteinasi e loro inibitori;
- hanno fenotipo simil-pericitario (cellule associate all'endotelio che hanno carattere staminale in quanto hanno la funzione di rigenerare aree epatiche che hanno subito lesioni od interventi chirurgici grazie alla secrezione di fattori di crescita specifici, possono sostituire gli epatociti danneggiati e mediante la secrezione di collagene ed altre proteine strutturali, formare tessuto cicatriziale a partire dalla zona 3 di ciascun acino) e possono divenire precursori dei fibroblasti;
- sono in grado di produrre ossido nitrico (NO), citochine e sostanze chemotattiche potendo quindi attirare linfociti durante l'infiammazione.

In fase quiescente esse esprimono il PPAR- γ che è il fondamentale fattore in grado di regolare la trascrizione in senso adipogenico ed anabolico; esso è considerato anche capace di effetti anti-fibrotici (inibisce l'espressione trascrizionale del collagene di tipo I). Le cellule stellate quiescenti sono in grado di produrre prostaciclina che agisce attraverso il recettore PPAR con meccanismo autocrino. Esse esprimono inoltre i recettori dell'endotelina, quello ET-A che detiene effetti profibrotici e vasocostrittori e quello ET-B che ha funzioni opposte, i recettori dell'adiponectina (Adipo R1 ed Adipo R2) e la forma breve del recettore della leptina. Le cellule stellate in fase quiescente esprimono inoltre il recettore IP per i prostanoidi.

E' inoltre ampiamente dimostrato il loro ruolo nell'ipertensione portale avvalorato da studi sulla stimolazione di queste cellule con sostanze vasocostrittrici quali

trombossano, prostaglandina ed endotelina-1 che suscita una loro risposta contrattile

L'incrementata risposta contrattile avviene quando esse divengono attive e acquisiscono un fenotipo simile a quello dei miofibroblasti; questo è un processo a decorso graduale che inizia con la perdita dei granuli di vitamina A e con una loro aumentata espressione di miofilamenti quali l' α -actina del muscolo liscio. Le cellule stellate attivate perdono, inoltre, la loro caratteristica forma a stella, acquistano capacità proliferative e contrattili e presentano un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso che sta ad indicare un aumento della sintesi proteica (collagene di tipo I, III, fibronectina e TIMP).

4. Le cellule foveolari, ovvero i linfociti tissutali, hanno funzioni di cellule natural killer.

Tutti i sinusoidi venosi confluiscono nelle vene centrolobulari che si uniscono in vene di calibro maggiore, le interlobulari (poste tra i lobuli epatici), le quali a loro volta drenano nelle vene epatiche e queste nella vena cava inferiore.

2. FIBROSI EPATICA

Fisiopatologia delle cellule stellate epatiche

Le cellule stellate hanno origine mesenchimale e detengono una funzione simil-pericitaria. Esse contengono una citocheratina chiamata desmina caratteristica delle cellule muscolari lisce e, come la maggior parte dei periciti, immagazzinano esteri della vitamina A. Il danno cellulare si esprime con uno stato di attivazione delle cellule stellate che ne provoca la de-differenziazione; ciò si esprime in rapidi cambiamenti nella loro funzione, quali:

- la riduzione delle riserve dei retinoidi,

- la mancata regolazione dei recettori per i fattori di crescita e per le citochine come il PDGF ed il TGF- β ,
- la produzione di mediatori infiammatori,
- l'inibizione della degradazione della matrice,
- l'aumentata sintesi del recettore endotelinico (procostrittore) ET-A e la diminuita sintesi di quello ET-B (pro dilatatore),
- l'espressione di microfilamenti contrattili di actina.

Le cellule stellate attivate sono caratterizzate anche per l'incrementata produzione di collagene di tipo I e III nello spazio perisinusoidale di Disse.

In condizioni fisiologiche, infatti, la matrice nello spazio di Disse è a bassa densità ed è formata, principalmente, dal collagene di tipo I, III e IV. Quest'ultimo è definito "collagene a maglie aperte" e forma una struttura non fibrillare che consente agli epatociti di ricevere agevolmente soluti e metaboliti in arrivo attraverso il microcircolo sinusoidale. Il collagene di tipo I e III, invece, forma fasci di fibre di largo diametro che hanno la proprietà di rinforzare l'architettura dello spazio perisinusoidale. Pertanto le cellule stellate attivate favoriscono una modificazione della morfologia strutturale dello spazio di Disse e ciò prevalentemente nelle zone perisinusoidali. Infatti la matrice extracellulare a bassa densità ed a "maglie aperte" viene sostituita da una matrice ricca di collagene fibrillare; ciò causa un mancato scambio di soluti con il sistema sinusoidale e un'alterata funzionalità degli epatociti e delle cellule non parenchimali.

La matrice extracellulare non è una struttura statica ma è sottoposta ad un continuo rinnovamento; la sintesi di nuovi componenti è infatti associata alla contemporanea, lenta degradazione delle proteine che la compongono. Questa degradazione è

catalizzata dalle metalloproteinasi [(MMP) famiglia di endopeptidasi calcio-zinco-dipendenti costituita da diversi elementi ognuna con una specificità di substrato] prodotte dalle cellule stellate. A sua volta l'attività enzimatica delle MMP è controllata da un'altra famiglia di enzimi, gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP); pertanto il corretto rapporto tra queste due classi enzimatiche assicura l'appropriata omeostasi della degradazione proteica che avviene nella matrice extracellulare. L'attivazione delle cellule stellate epatiche altera questo equilibrio e la sintesi e degradazione della matrice extracellulare non è più regolata.

Più precisamente si è osservato che si modificano i bersagli contro cui le MMP agiscono; ad esempio durante l'attivazione delle cellule stellate c'è una transitoria sovraregolazione di MMP-13 che incrementa la degradazione della collagenasi-3. Allo stesso tempo è stata notata l'incrementata sintesi di TIMP-1 e TIMP-2 la cui azione deprime fortemente (20 volte) l'attività di MMP-2 ed MMP-9.

Un ruolo importante nell'attivazione delle cellule stellate epatiche è dato dalla secrezione di citochine.

Le citochine sono molecole proteiche, generalmente di peso molecolare compreso fra 10 e 50 kD, secrete da vari tipi di cellule in risposta ad uno stimolo; esse svolgono molte funzioni ed in particolare quelle sulla risposta immunitaria naturale ed acquisita. I maggiori produttori di citochine sono le cellule del sistema immunitario (in misura prevalente monociti, linfociti T, natural killer e cellule di Kupffer) ma oltre a queste anche le cellule non immunitarie quali quelle endoteliali ed i fibroblasti. Le citochine agiscono con meccanismo *autocrino* (effetto sulla cellula produttrice), *paracrino* (effetto sulle cellule vicine) ed *endocrino* (a distanza) attraverso recettori specifici dotati di elevata o elevatissima affinità di

legame (10^{-10} - 10^{-12} M); le citochine detengono caratteristiche pleiotropiche; la loro produzione, limitata nel tempo, è finemente regolata.

In base all'azione ed ai siti cellulari su cui agiscono, le citochine sono state suddivise in tre grandi famiglie:

1. Quelle ad azione emopoietica (che non sono coinvolte nel fegato)
2. Quelle ad azione pro-infiammatoria
3. Quelle ad azione immunoregolatoria

Tra le citochine pro-infiammatorie riconosciamo la IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β , IFNs di tipo I (α , β , ω od IFN non immuni), IL-12, IL-15, IL-18.

Tra le citochine immunoregatorie troviamo la IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ , TGF- β .

Le principali citochine prodotte dalle cellule di Kupffer sono TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, e TGF- β . Esse, con modalità diverse, sono capaci di stimolare la produzione di collagene da parte delle cellule stellate.

Il perpetuarsi di tutte queste alterazioni conduce le cellule stellate attivate ad acquisire un fenotipo morfologico differente e a trasformarsi quindi in miofibroblasti. Tappa fondamentale per questo processo di trasformazione è rappresentato dalla fosforilazione di alcuni fattori di trascrizione come FoXO ed alla sovra-espressione di alcune chinasi come ILK. In particolare la fosforilazione di FoXO comporta la sua traslocazione dal nucleo al cytosol venendosi quindi a ridurre il sistema di controllo che regola proliferazione e trans-differenziazione delle cellule stellate, mentre la sovra-espressione di ILK agisce sul citoscheletro modificando la conformazione delle cellule stellate e predisponendole all'adesione, alla motilità ed alla trasformazione. La fosforilazione di complessi sistemi di chinasi IKB porta alla degradazione di proteine inibitrici IKB che consentono il

passaggio del fattore di trascrizione NF- κ B al nucleo favorendo così l'espressione genica di loci come quello per la sintesi di IL-6 ed ICAM-1. Parimenti queste cellule trasformate incrementano la sintesi di leptina che possiede a sua volta la capacità di attivare il fattore di trascrizione NF- κ B oltre che di favorire la crescita cellulare e di inibire l'apoptosi.

Da molti, la trasformazione delle cellule stellate in miofibroblasti è ritenuta condizione difficilmente reversibile. I miofibroblasti non sono più capaci di regolare l'omeostasi sinusoidale ed è particolarmente esaltata l'attività di sintesi fibrotica e quella vasocostrittrice con spiccato incremento della sintesi di endotelina e riduzione di ossido nitrico e prostaciclina.

La steatosi, l'epatite cronica e la cirrosi rappresentano le tappe cliniche della progressiva infiammazione che comporta l'attivazione e poi la trasformazione delle cellule stellate epatiche in mio fibroblasti che concorrono in misura rilevante nel favorire il deposito di collagene nello spazio di Disse (Figura 5).

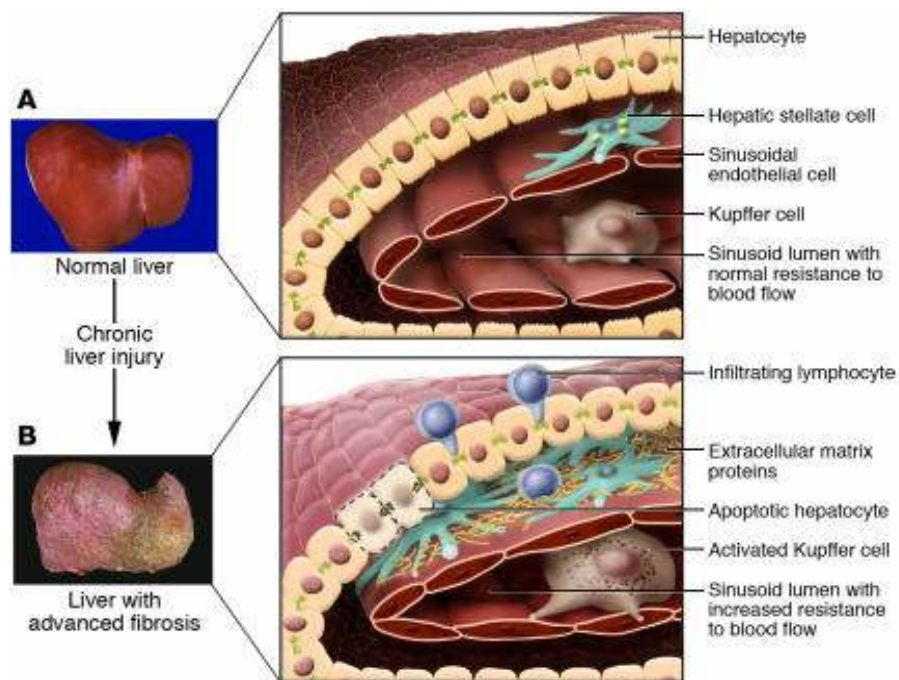


Figura 5. Modificazioni strutturali epatiche incorso di cirrosi. Tratto da "J Clin Invest 2005".

Altre popolazioni di miofibroblasti coinvolti nella fibrosi

Recentemente è stato anche dimostrato come altre popolazioni differenti dalle cellule stellate epatiche e con capacità migratoria anche da altri siti, possano contribuire alla fibrosi epatica, anche se si ritiene che il ruolo principale nel favorire lo sviluppo di fibrosi rimanga appannaggio delle cellule stellate epatiche.

a. Fibroblasti portalì

Il tessuto connettivo portale del fegato sano contiene fibroblasti quiescenti (o portalì) che, nelle fasi iniziali del danno, vengono indotti a proliferare formando strutture “a cipolla” attorno alle strutture biliari.

Negli stadi precoci della fibrosi da patologia col estatica queste cellule acquisiscono un fenotipo miofibroblastico attivo e sono coinvolti nella deposizione di matrice extracellulare nelle zone portalì; solo in seguito vengono attivate le cellule stellate.

b. Miofibroblasti derivati dal midollo osseo

Da diversi studi è emerso il contributo del midollo osseo quale sorgente di cellule immature capaci di differenziarsi a seconda degli organi in cui sono destinate; è noto infatti come a livello epatico queste cellule di derivazione midollare possano differenziarsi in epatociti, cellule sinusoidali, colangiociti, cellule di Kupffer, cellule stellate e mio fibroblasti. Si è infine dimostrato che il 30% delle cellule stellate epatiche originano dal midollo osseo e possano acquisire un fenotipo miofibroblastico in condizioni di danno epatico.

c. Fibrociti

I fibrociti rappresentano una sottopopolazione di leucociti circolanti con una potente attività immunostimolante. I fibrociti sono coinvolti nel processo di

fibrogenesi epatica e possono differenziarsi in miofibroblasti producendo collagene in risposta al TGF- β .

Uno studio basato sul modello di fibrosi indotta nel topo a seguito della legatura del dotto biliare ha provato che il 5-10 % delle cellule in grado di produrre collagene di tipo I è rappresentata da fibrociti che originano dal midollo osseo.

d Epatociti e colangiociti

Gli epatociti sono le cellule funzionali del fegato e si dispongono in lamine a costituire gli acini che a loro volta formano i lobuli. Il noto meccanismo fisiologico che si ha durante lo sviluppo embrionale, noto come transizione epitelio-mesenchimale (ovvero la capacità di migrazione delle cellule epiteliali, che di per sé non dovrebbe avvenire, in quanto cellule altamente polarizzate e connesse tra loro da giunzioni cellulari) ha luogo a seguito della perdita delle giunzioni cellulari e le fa acquisire fenotipo mesenchimale; l'induttore principe di questo meccanismo è il TGF- β . Anche gli epatociti possono essere soggetti a questo fenomeno e possono modificare il loro fenotipo in fibroblasti grazie all'azione induttrice del TGF- β . Questo processo non riguarda tutti gli epatociti ma solo quelli che acquistano resistenza verso la morte per apoptosi stimolata da questa citochina.

I colangiociti sono le cellule endoteliali che tappezzano i dotti biliari e anch'essi possono essere coinvolti nel processo di EMT nella fibrogenesi epatica.

I colangiociti costituiscono non più del 4-5 % della massa epatica; tuttavia questa popolazione cellulare contribuisce per almeno il 10-30 % del flusso biliare. Inoltre i colangiociti sono il target delle malattie colestatiche croniche (definite anche colangiopatie o sindromi da vanificazione dei dotti biliari), tra cui la Cirrosi Biliare Primitiva e la Colangite Sclerosante Primitiva, le quali sono tra le prime cause di trapianto di fegato.

Le patologie sopracitate derivano da un'alterazione della funzione principale di queste cellule e cioè quella di modificare la bile attraverso una serie di reazioni. Questa alterazione fa restringere i dotti biliari ostacolando il flusso, la bile quindi verrà immagazzinata nel fegato danneggiandolo.

3. PATOLOGIE

Un'alterazione della funzionalità epatica può portare a diverse patologie dall'esito reversibile o irreversibile. Le cause principali di tale alterazione sono: abuso di alcool, disfunzioni a livello biliare, obesità, patologie parassitarie, infezioni virali e molte altre.

Steatosi e NASH

In un soggetto sano, la percentuale di grasso nel fegato rappresenta il 20 %, di cui una quota non superiore al 5 % è rappresentata da acidi grassi liberi, mentre il resto da lipidi di membrana. Quando si parla di steatosi epatica si intende che la percentuale di acidi grassi liberi, i trigliceridi, è superiore al 5 %. Questa condizione è facilmente rilevabile con una semplice ecografia che in questi casi documenta un incremento dell'ecogenicità parenchimale.

Le cause di steatosi possono essere molteplici:

- Alcooliche
- nutrizionali: obesità
- metaboliche: diabete mellito, dislipidemie, glicogenesi, galattosemia, intolleranza al fruttosio
- farmacologiche: glucocorticoidi, estrogeni sintetici
- virali.

La steatosi semplice è una condizione non-infiammatoria e facilmente reversibile se si ha cura di eliminare o contrastare i fattori che l'hanno prodotta.

Tuttavia anche la steatosi epatica può evolvere verso la NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) che è una sorta di epatopatia cronica non virale, non-alcolica e non-tossica, caratterizzata dalla contemporanea presenza di steatosi, infiammazione e fibrosi; la NASH può esitare in cirrosi. Nel favorire l'evoluzione

in NASH giocano un ruolo importante gli acidi grassi che saturano la β -ossidazione mitocondriale con un repentino switch verso la β -ossidazione perossisomiale e la generazione di radicali liberi tossici.

La fibrosi, elemento saliente della NASH, è invece dovuta all'incremento di citochine come il CTGF, prodotto dalle cellule stellate attivate in seguito a stimolo iper-glicemico ed iper-insulinemico od alla sovrabbondante presenza di leptina, in grado di agire con meccanismo autocrino sulle cellule stellate, inducendole a promuovere la fibrosi.

Clinicamente sia la steatosi epatica che la NASH non mostrano sintomatologia specifica sebbene, talora, i pazienti possano lamentare senso di pesantezza e dolenzia sotto l'arcata costale destra ed altri sintomi aspecifici. Nella maggior parte dei casi la diagnosi di steatosi o di NASH è casuale ed il sospetto nasce dall'osservazione di incrementi nei valori sierici delle transaminasi. Le transaminasi, enzimi predisposti a catalizzare la reazione di trasferimento del gruppo amminico α da un amminoacido a un α -chetoacido sono le spie essenziali nell'indicare la presenza di queste patologie. Sono due le transaminasi più importanti:

- ALT: alanina amminotransferasi
- AST: aspartato aminotransferasi

Anche l'enzima GGT (gamma-glutamyl transferasi), pur non essendo un indicatore di sofferenza epatica, può avere incrementi sierici in corso di steatosi.

La diagnosi istologica è lo strumento più efficace per distinguere queste patologie.

Tra i metodi non invasivi capaci di predire gli stadi precoci di NASH vi sono:

- la combinazione contemporanea di elevati livelli sierici di adiponectina, insulino-resistenza e presenza di collagene di tipo IV

- il rilievo ecografico contemporaneo di attenuazione epatica del fascio acustico in sede posteriore, presenza di zone a diversa infiltrazione lipidica nel fegato e un incremento del volume splenico.

Non esistono terapie specifiche per queste due patologie.

Contro la steatosi è opinione consolidata quella di eliminare la causa principale della malattia stessa, ovvero l'abuso di alcool, l'alimentazione eccessiva e non equilibrata, la sedentarietà ed in caso di malattia diabetica procedere alla correzione della glicemia.

Il trattamento chirurgico, procedura non comune, per la riduzione dell'obesità, riduce il punteggio istologico della NASH; la suggestiva spiegazione di ciò è una riduzione della quantità di citochine circolanti e della conseguente infiammazione.

Tra le diverse opzioni terapeutiche non chirurgiche ricordiamo:

- i tiazolidinedioni (agenti farmacologici che si legano al *PPAR-γ* favorendo l'accumulo di acidi grassi in sede sottocutanea piuttosto che epatica e omentale) riducono i valori di insulino-resistenza ed incrementano quelli di adiponectina
- la metformina, riducendo la produzione di glucosio epatico e aumentando la distribuzione muscolare consente una riduzione dell'insulino-resistenza
- la vitamina E che neutralizza i radicali liberi e previene la perossidazione lipidica grazie alla sua capacità di donare idrogeno dal suo gruppo idrossilico
- gli inibitori del recettore dell'angiotensina che limitano l'azione di questo fattore, riducono la fibrosi epatica e l'attivazione delle cellule stellate epatiche.

Epatite cronica

La fibrosi epatica rappresenta la risposta ad un danno epatico cronico indotto da una varietà di stimoli lesivi a carattere continuativo nel decorso del tempo, come si verifica nell'epatopatia alcolica, nelle epatiti virali, nella malattia colestatica e nell'emocromatosi. La fibrosi epatica è quella condizione patologica in cui vi è un eccesso di tessuto cicatriziale. In seguito a danno epatico di tipo acuto i meccanismi di rigenerazione tessutale consentono una completa guarigione della lesione con la degradazione del materiale fibrotico depositato. Invece, in seguito ad insulti ripetuti e cronici i meccanismi fibrogenici di riparazione tessutale risultano persistentemente attivati producendo e depositando elevate quantità di matrice extracellulare. Il processo di fibrogenesi viene quindi a prevalere sulla corretta rigenerazione parenchimale, sbilanciando il rapporto parenchima/stroma in favore di quest'ultimo e sfociando nella disorganizzazione epatica e nell'instaurarsi, in percentuali ridotte di casi, della cirrosi (Figura 6).

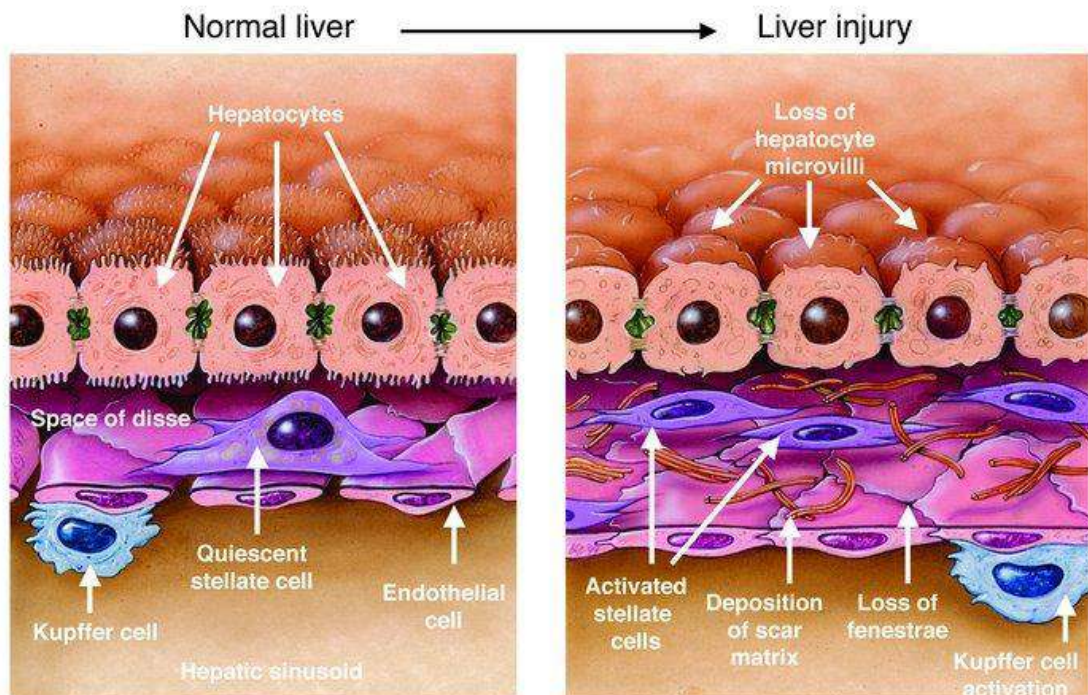


Figura 6. Modificazioni della matrice extracellulare ed alterazioni cellulari in corso di fibrosi epatica. Tratto da J Biol Chem 2000.

Cirrosi

La cirrosi epatica rappresenta l'ultimo stadio delle patologie epatiche croniche ed è considerata una condizione raramente reversibile; essa è caratterizzata da un elevato stato di fibrosi che provoca una grave alterazione di tutta la vascolarizzazione epatica. Questa situazione compromette seriamente gli scambi nutritivi con le cellule epatiche. Gli scambi nutritivi si complicano a causa di modificazioni ambientali-strutturali nello spazio di Disse; la diversa composizione e la maggiore quantità di collagene presente in questo spazio rallenta infatti il transito di molecole tra sinusoidi e lamine epatiche. La formazione di micro-shunt intraepatici e di macro-shunt con le vene centrali da parte di rami venosi portali e di rami dell'arteria epatica, non essendo altro che un bypass del fegato, contribuisce inoltre a peggiorare il quadro. Macroscopicamente la normale morfologia lobulare subisce una grossolana alterazione dovuta alla formazione di pseudolobuli.

Dal punto di vista eziopatogenetico e clinico, la cirrosi si suddivide in alcolica, criptogenica, biliare, cardiaca, metabolica, virale e da farmaci.

In particolare:

- nella cirrosi alcolica la causa principale è l'assunzione cronica di alcool
- nella cirrosi criptogenica la causa della manifestazione della patologia non è determinabile; attualmente si ritiene che molte di queste siano in realtà esito di NASH
- la cirrosi biliare è il risultato di una prolungata ostruzione delle vie biliari intraepatiche od extraepatiche. In questo caso la cirrosi non è la causa ma l'effetto della colangite sclerosante (i vasi si riducono di diametro comportando un accumulo di bile all'interno del fegato danneggiandolo)

- la cirrosi cardiaca è causata da un cronico grave scompenso cardiaco congestizio: la stasi circolatoria a livello epatico può portare a necrosi e fibrosi
- la cirrosi metabolica può essere dovuta a diverse patologie come l'emocromatosi (malattia da sovraccarico di ferro nei tessuti) o il morbo di Wilson (patologia autosomica recessiva metabolica collegata ad un accumulo di rame nei tessuti dovuta ad una alterata escrezione dello stesso da parte del fegato)
- la cirrosi virale può essere conseguenza di infezioni epatiche croniche da virus dell'epatite B e C
- la cirrosi da farmaci può avere origine dall'uso prolungato e continuativo di farmaci in grado di provocare epatite, quali isoniazide, metildopa.

L'evoluzione della malattia conduce ad una diminuzione del circolo sanguigno che transita nel fegato causato dall'incremento delle resistenze vascolari a livello del microcircolo portale condizione nota come "ipertensione portale".

4. FISIOPATOLOGIA DELL'EMODINAMICA PORTALE:

L'IPERTENSIONE PORTALE

In corso di cirrosi avanzata, il fegato appare macroscopicamente ridotto di volume, deformato e occupato da noduli epatocitari separati da larghe e dense bande di tessuto fibrotico. Questi cosiddetti noduli di rigenerazione hanno dimensioni variabili e sono composti da grandi quantità di tessuto connettivo che separano isole disorganizzate di parenchima in rigenerazione. Microscopicamente il tessuto connettivo è costituito da collagene e proteine fibrillari, localizzati prevalentemente nello spazio di Disse, posto a ridosso dei sinusoidi; esso produce chiari effetti compressivi e disorganizzazione strutturale che si ripercuote sulla microvascolarizzazione acinare e dei lobuli epatici. Ne esita incremento delle

resistenze e conseguente ipertensione del microcircolo. L'incremento delle resistenze e la conseguente ipossia del microcircolo portale inducono l'attivazione di numerosi meccanismi atti a stimolare il rimodellamento dell'architettura vascolare, la capillarizzazione dei sinusoidi, l'apertura di neo-shunt porto-epatici, la neovascolarizzazione intraepatica.

All'aumento delle resistenze concorrono altri due fondamentali fattori: l'alterazione della dinamica contrattile nel microcircolo sinusoidale e l'incremento della flussimetria splancnica (sindrome iperdinamica).

La perfusione dei sinusoidi è infatti regolata in maniera dinamica da un efficiente sistema contrattile il cui controllo è gestito da alcune cellule che rispondono in modo graduale a differenti mediatori. Queste cellule capaci di contrattilità sono localizzate sia a livello sinusoidale che postsinusoidale. Esse sono rappresentate dalle cellule muscolari lisce della parete vascolare, presenti ad esempio nei rami terminali della vena porta, nonché dalle cellule stellate, localizzate nello spazio perisinusoidale di Disse e dotate di estensioni citoplasmatiche che circondano i sinusoidi. L'azione vasocontrattile delle cellule stellate nei sinusoidi epatici, influenzata da mediatori molecolari vasoattivi, determina incremento e diminuzione della pressione locale e, di conseguenza, regola quella dell'intero albero portale. Tutto questo sistema serve a mantenere nel microcircolo portale una pressione di perfusione normale e cioè un gradiente di pressione porto-epatico non superiore a 6 mmHg.

Le cellule stellate, fisiologicamente presenti nei sinusoidi del microcircolo portale dei soggetti normali, subiscono, in corso di epatopatia cronica, un processo di attivazione prima e di modificazione fenotipica, poi, provocata dallo stimolo continuativo di numerosi mediatori citochinici e divenendo, così, miofibroblasti.

Queste citochine sono prodotte in parte da epatociti danneggiati, in parte da cellule del Kupffer, in parte dall'arrivo di linfociti T e cellule natural killer che hanno risposto a stimoli di natura virale, endotossinici, alcolici o a modificazione dei meccanismi ossido-riduttivi; il protrarsi della produzione citochinica induce, poi, le cellule stellate attivate a produrre mediatori profibrotici come il TGF- β ed il CTGF che favoriscono la trasformazione di esse in miofibroblasti. I miofibroblasti, in grado di sintetizzare più matrice extracellulare, più metalloproteinasi (che agiscono sul collagene favorendo la produzione di collagene tipo I) e più recettori ET-A [che agevolano la potente azione del vasocostrittore endotelina-1 (ET-1)] favoriscono lo sviluppo di cirrosi.

Oltre all'ET-1, altri mediatori contribuiscono alla contrazione delle cellule muscolari vascolari e delle cellule stellate: la norepinefrina, l'angiotensina II e la vasopressina. In condizioni normali, l'ossido nitrico e la prostaciclina hanno il merito di controbilanciare gli effetti dei mediatori vasocostrittori; tutto il sistema di vasocostrittori e vasodilatatori è parimenti utile per mantenere la giusta pressione di perfusione nel microcircolo portale. Nella cirrosi epatica sperimentale è stata, invece, osservata un'aumentata quantità di vasocostrittori ed una diminuita sintesi di vasodilatatori. Anche nei soggetti con cirrosi epatica si è apprezzato l'incremento sierico di sostanze ad azione vasocostrittrice e parallelamente la diminuzione di quelle ad azione vasodilatatrice come l'ossido nitrico e la prostaciclina. Questo provoca aumento delle resistenze vascolari intraepatiche e concorre ad incrementare la pressione del microcircolo portale favorendo quindi lo sviluppo di ipertensione portale.

L'altro fattore che contribuisce ad aggravare l'ipertensione portale in condizione di cirrosi è il significativo incremento del flusso ematico portale (portal inflow),

causato dalla vasodilatazione arteriolare splancnica e dall'incremento della frequenza e della gittata cardiaca. Questa alterazione è presente soprattutto negli stadi più avanzati di cirrosi epatica e sembra generata da differenti meccanismi di tipo neurogenico, umorale e locale. Gli studi condotti fino ad oggi conferiscono il ruolo di vasodilatatori splancnici ai sali biliari ed al glucagone, la cui concentrazione plasmatica aumenta per ridotta clearance epatica e incrementata secrezione pancreatica.

Pertanto, in corso di cirrosi, la compressione e la distorsione dei vasi, causate dall'alterata composizione strutturale dello spazio di Disse e l'incrementata contrattilità delle cellule stellate epatiche, dovuta al rilascio di sostanze vasoattive, provoca l'aumento della resistenza nei sinusoidi e nelle venule portali.

Nella vena porta la pressione fisiologica è stimata in 7-12 mmHg, mentre nelle vene sovraepatiche in 2-6 mmHg. Questo determina un minimo gradiente pressorio tra vena porta e vene sovraepatiche che consente la normale progressione della colonna ematica dal distretto portale a quello cavale inferiore; quando questa pressione supera i 14 mmHg o quando il gradiente è superiore a 6 mmHg si ha ipertensione portale. Quando poi il gradiente pressorio porto-epatico raggiunge i 10-12 mmHg, si ha l'apertura di anastomosi vascolari naturali che permettono così di ridurre la pressione portale.

In base all'equazione di Ohm [$\Delta P = Q \times R$] dove ΔP = gradiente di pressione portale, Q = flusso ematico nell'intero sistema venoso portale, R = resistenza vascolare dell'intero sistema venoso portale], l'ipertensione portale è dovuta a:

I) un aumento delle resistenze al deflusso del sangue nel circolo portale in presenza o meno di un afflusso normale

II) un aumentato afflusso di sangue nel circolo portale in presenza di resistenze invariate.

L'incremento delle resistenze può avere origine:

1. in sede presinusoidale (extraepatica od intraepatica)
2. in sede postsinusoidale (intraepatica od extraepatica) (Tabella 1).

Tabella 1. Distribuzione dell'eziologia dell'ipertensione portale in base alla sede dell'aumento delle resistenze.

SEDE DELL'AUMENTO DELLA RESISTENZA AL FLUSSO EMATICO	EZIOLOGIA
Presinusoidale extraepatica	Ipertensione portale idiopatica Trombosi della vena splenica e della vena porta Compressione estrinseca della vena porta
Presinusoidale intraepatica	Ipertensione portale idiopatica Cirrosi biliare primitiva e secondaria Fibrosi epatica congenita Schistosomiasi Disordini mieloproliferativi Sarcoidosi Graft versus host disease
Postsinusoidale intraepatica	Cirrosi epatica
Postsinusoidale extraepatica	Stenosi od ostruzione delle vene sovraepatiche Stenosi od occlusione della vena cava inferiore Insufficienza cardiaca destra Pericardite costrittiva

La cirrosi da causa virale determina ipertensione di tipo postsinusoidale intraepatica da ostacolato transito del sangue a livello dei sinusoidi epatici quale diretta conseguenza del sovvertimento dell'architettura epatica e della vasocostrizione del microcircolo sinusoidale.

La risposta dell'organismo all'incremento della pressione nel microcircolo portale, peraltro già sottoposto alla neoformazione di micro-shunt intraepatici, è, come già detto, l'apertura di macro-shunt posto-sistemici; questi non sono altro che rami di comunicazione (anastomosi vascolari naturali) tra il circolo portale e quello vascolare sistemico. Essi hanno lo scopo di diminuire la pressione portale favorendo il ritorno del sangue al cuore bypassando il fegato. I principali shunt porto-sistemici sono rappresentati dalle vene dell'esofago (varici esofagee), dalle vene della parete addominale (*caput medusae*) o dal circolo venoso emorroidario (Figura 7).

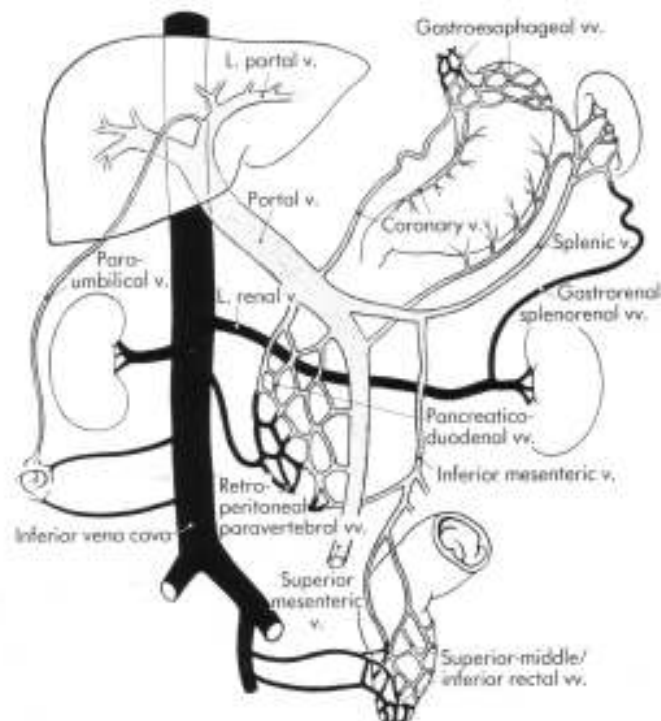


Figura 7. Shunt vascolari porto-sistemici in corso di ipertensione portale. Tratto da Corso di Ecografia interattivo (Dr Claudio Pasquali).

Se da una parte gli shunt porto-sistemici riducono la pressione portale dall'altra conducono a serie conseguenze quali la possibilità di sanguinamento da varici esofagee, l'entrata in circolo di sostanze tossiche normalmente inattivate nel fegato che possono esercitare azione tossica a livello cerebrale dando luogo alla comparsa di encefalopatia epatica. Clinicamente grazie all'ecografia ed al color Doppler si può attentamente monitorare l'evoluzione della cirrosi e la comparsa di shunt porto-sistemici (Tabella 2).

Tabella 2. Segni di ipertensione portale da cirrosi epatica post-virale all'ecografia ed al color Doppler.

ECOGRAFIA	COLOR DOPPLER
- Ipertrofia del lobo caudato	- Shunt splenorenale prossimale
- Profili epatici irregolari e/o bozzuti, marcata disomogeneità ecostrutturale	- Velocità rallentata nella vena porta e nei rami portali
- Assottigliamento delle vene sovraepatiche	- Inversione di flusso nel ramo portale principale e/o nei rami portali dx e sx
- Dilatazione di vena porta, splenica, mesenterica superiore, arteria epatica e arteria splenica	- Inversione di flusso nella vena coronaria stomacica
- Ridotta od assente modificazione del calibro della vena porta e della vena splenica con gli atti del respiro	- Riabitazione e flusso epatofugo nella vena paraombelicale
- Presenza di circoli collaterali	- Flusso piatto ed uniforme nelle vene sovraepatiche
- Splenomegalia	- Shunt porto-epatico
- Ascite	

5. PREMESSA ALLA RICERCA

Nel soggetto sano l'omeostasi del circolo portale è mantenuta prevalentemente da un corretto bilancio tra mediatori vasocostrittori e vasodilatatori, entrambi deputati a correggere in alto ed in basso i valori di pressione intra-epatica, ed in parte anche dalla portata portale che è strettamente correlata alla resistenza vascolare nel microcircolo portale. Tra i mediatori vasodilatatori che hanno un ruolo importante nella dinamica vascolare del microcircolo portale vi è la prostaciclina.

La patogenesi dell'ipertensione portale dipende quindi dalla relazione tra flusso ematico venoso portale e resistenza intra-epatica al flusso. Il sovvertimento morfologico e la fibrosi epatica, sostenute dall'increzione di citochine proinfiammatorie (TNF, TGF, PDGF, etc), sono indubbiamente i principali responsabili dell'incremento della resistenza intra-epatica dovuto al deposito di collagene nello spazio di Disse da parte delle cellule stellate attivate; pur tuttavia, ad elevare la pressione intraepatica giocano un ruolo anche alcuni fattori vasocostrittori che stimolano l'attività delle cellule stellate nei sinusoidi del microcircolo portale. Le cellule stellate epatiche sono infatti deputate a modulare la resistenza vascolare intraepatica attraverso un meccanismo di contrazione e rilassamento che dipende dal tipo di segnale che esse ricevono da sostanze vasocostrittrici o vasorilassanti. Notevole peso, sullo sviluppo e mantenimento dell'ipertensione portale, hanno quindi la modificazione fenotipica delle cellule stellate in miofibroblasti e l'incremento delle sostanze vasocostrittrici (endotelina, angiotensina, etc) che prevalgono pertanto su quelle vasodilatatrici (ossido nitrico e prostaciclina).

Studi sperimentali su

a. Endotelina

Il maggior responsabile della contrattilità delle cellule stellate è l'*endotelina*. Questa proteina è un potente vasocostrittore; se ne riconoscono nell'organismo prevalentemente tre isoforme: ET-1 , ET-2 e ET-3.

L'endotelina matura è formata da 21 amminoacidi ed è prodotta dalle cellule endoteliali ed il suo effetto è allo stesso tempo *paracrino* e *autocrino*.

Due sono le tipologie recettoriali in grado di rispondere a questa molecola: l'ET-A e l'ET-B; entrambi vengono attivati tramite le proteine GTP.

L'ET-A è presente sulle cellule muscolari dei vasi e lega ET-1 con un'affinità 100 volte maggiore a ET-3. La risposta primaria del legame ET-1 con il recettore ET-A è la vasocostrizione.

Il recettore ET-B è invece ampiamente distribuito e lega ET-1, ET-2 e ET-3 con la stessa affinità. Differentemente dal recettore ET-A, quello ET-B fornisce risposte diverse a in base alla sua ubicazione; ad esempio nelle cellule endoteliali la risposta del legame *endotelina-recettore* ET-B provoca il rilascio di *ossido nitrico* con conseguente vasodilatazione.

E' noto che in condizioni fisiologiche le cellule stellate hanno entrambi i tipi di recettori (ET-A ed ET-B) sulla membrana. Al contrario nelle malattie croniche di fegato a condizione evoluta si ha un'incrementata estrazione di mRNA di endotelina del recettore ET-1 ed un'aumentata circolazione di ET-1/ET-3.

b. Prostaciclina

E' una sostanza ad azione vasodilatante a breve emivita, presente nell'organismo umano; deriva dai prostanoidi, metaboliti dell'acido arachidonico (un acido grasso poli-insaturo che forma la componente fosfolipidica delle membrane cellulari),

attraverso l'azione della ciclossigenasi. E' un ormone ad azione locale capace di agire attraverso due sistemi recettoriali, di membrana e nucleare (recettore I e PPAR). Oltre alla sua proprietà vasodilatante è nota la sua capacità di inibitore dell'aggregazione piastrinica.

L'iloprost, un analogo della prostaciclina, utilizzato in commercio nel trapianto epatico perché riduce il danno da ischemia/riperfusion è l'attore farmacologico di questo studio sperimentale. In situazioni di danno da ischemia/riperfusion esso contrasta l'elevata produzione di ROS (*Reactive Oxygen Species*) quali l'anione superossido, i radicali ossidrilici ed il perossido di idrogeno, supplendo ad una patologica diminuzione di ossido nitrico sintetasi. La prostaciclina è la più importante sostanza prodotta dalle cellule endoteliali in grado di compiere una serie di azioni quali: inibire la coagulazione, l'attivazione dei leucociti, la chemiotassi e la produzione di anione superossido. Le proprietà analoghe dell'iloprost ne hanno permesso l'utilizzo come potente vasodilatatore che attenua la modificazione di permeabilità microvascolare indotta da stimoli nocivi. Si è dimostrato che, in seguito a terapia con ilprost, diminuisce la concentrazione di lipidi e di proteine ossidanti e incrementa i livelli di GSH (glutathione: potente antiossidante).

c. PPAR- γ

I PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) sono recettori nucleari che hanno la funzione di trascrivere fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni e svolgono un ruolo importante nella differenziazione cellulare, nell'accrescimento e nel metabolismo. Sono state identificate finora 3 isoforme dei PPAR (α , β/δ e γ) tutte simili dal punto di vista strutturale e funzionale.

È stato dimostrato che l'attività di PPAR- γ diminuisce nelle HSC attivate sia umane che di ratto, in coltura ed in vivo, suggerendo quindi, per esso, la possibile funzione

d'inibitore dell'attivazione delle HSC. Poiché sono disponibili molti ligandi del PPAR- γ che ne promuovono l'attività trascrizionale, esso viene considerato un possibile target terapeutico.

Sintesi della ricerca di base

La fisiopatologia dell'ipertensione portale riconosce questi tre meccanismi:

1. Le cellule stellate epatiche inducono vasocostrizione del microcircolo portale in risposta all'increzione di endotelina, vasopressina ed angiotensina II.
2. il meccanismo della contrazione delle cellule stellate epatiche avviene attraverso l'apertura di canali del calcio e/o la mobilizzazione del calcio.
3. la fibrosi epatica è sostenuta dalla modificazione fenotipica delle cellule di Ito che si trasformano in miofibroblasti in risposta a citochine proinfiammatorie (TNF, TGF- β , PDGF).

E' inoltre noto che

- ❖ le cellule stellate attivate posseggono canali del calcio tipo L la cui apertura ne permette la contrazione
- ❖ le cellule stellate epatiche sono in grado di mantenere nel tempo la resistenza sinusoidale che provoca ipertensione portale
- ❖ una stabile attivazione delle cellule stellate epatiche consente e favorisce la progressione della fibrosi
- ❖ le cellule stellate epatiche attivate possono trasformarsi in miofibroblasti e questo rappresenta un perpetuarsi dell'azione profibrotica che può rendere irreversibile questo processo di fibrosi.

Caratteristiche dell'iloprost (analogo della prostaciclina)

L'iloprost, analogo di sintesi dell'epoprostenolo, la prostaciclina sintetica PGI₂, possiede diverse proprietà che contribuiscono alla sua azione vaso dilatante ed emoreologica:

- è un inibitore dell'aggregazione piastrinica
- è un potente vasodilatatore arterioso
- ha attività fibrinolitica nei pazienti con patologia vascolare periferica
- limita la migrazione neutrofila nei tessuti lesionati
- ha azione citoprotettiva (i meccanismi proposti per spiegare la citoprotezione includono la prevenzione del rilascio di catecolamine da parte dei nervi simpatici, la preservazione della funzione mitocondriale e dell'attività superossido-dismutasi nonché la stabilizzazione della membrana citoplasmatica).

Rispetto alla prostaciclina, l'iloprost possiede, tuttavia, maggiore stabilità metabolica e soprattutto chimica.

L'iloprost è stato ad oggi utilizzato con efficacia nel trattamento dell'ipertensione polmonare primitiva, del fenomeno di Raynaud secondario a sclerodermia, dell'ischemia arteriosa cronica grave degli arti inferiori, in pazienti a rischio di amputazione e quando non è indicato un intervento chirurgico o di angioplastica, ed infine, nel trattamento della tromboangiite obliterante (Morbo di Burger) in stadio avanzato con ischemia critica degli arti, quando non è indicato un intervento di rivascularizzazione. E' inoltre stato accertato anche un effetto vasodilatatore dell'iloprost sulla circolazione renale nei pazienti con Sclerosi Sistemica.

La somministrazione del farmaco avviene, generalmente, per infusione venosa [esistono anche: una modalità di somministrazione per aerosol (che si consiglia nei soggetti con ipertensione polmonare) ed una per via orale con dosaggi compresi tra

50 e 100 mg giornalieri, la cui limitazione consiste nella breve emivita del farmaco]. Lo schema di trattamento endovenoso consente ampi range di dosaggio: la somministrazione endovenosa continua viene consigliata per un periodo compreso tra le 5 e 16 ore al giorno, per 3-6 giorni in dosaggi farmacologici compresi tra 0,5 e 2 ng/kg/min; il trattamento può essere ripetuto ad intervalli di 1-2 mesi con le stesse modalità.

La somministrazione di iloprost non presenta rischi per la salute essendo ampiamente utilizzato per diverse patologie vascolari arteriose. L'iloprost è un analogo di sintesi della prostaciclina sintetica (sostanza, quest'ultima, che normalmente le cellule stellate epatiche umane sintetizzano e che ha azione vasodilatatrice a livello del microcircolo portale,) contribuendo a regolare, insieme all'ossido nitrico, l'emodinamica epatica.

Basi razionali della ricerca

Sulla base della fisiologia e fisiopatologia del microcircolo portale, delle caratteristiche farmacologiche dell'iloprost e delle ricerche già effettuate esistono basi razionali per

- verificare l'effetto dell'iloprost in soggetti con epatopatia cronica virale
- testare in modelli sperimentali animali di cirrosi la sua azione antifibrotica.

Infatti:

1. l'iloprost è un analogo stabile della prostaciclina sintetica PGI₂
2. la prostaciclina sintetica è sintetizzata sulla base della nota prostaciclina umana
3. la prostaciclina umana è sintetizzata a livello delle cellule vascolari (stellate)

epatiche del microcircolo epatico per regolare l'omeostasi locale

4. l'iloprost, analogo della prostaciclina dimostra effetti anti-endotelina (l'endotelina è un potente vasocostrittore a livello del microcircolo epatico)
5. l'iloprost agisce sul cAMP (il cAMP è in grado di inibire l'apertura dei canali del calcio che si ha durante la contrazione delle cellule stellate del microcircolo portale);
6. l'iloprost ha un'azione anti-TNF ed anti-TGF (il TNF ed il TGF sono mediatori dell'infiammazione epatica e profibrotici);
7. l'iloprost ha un effetto citoprotettivo epatico;
8. l'iloprost incrementa nei soggetti con arteriopatìa senza malattia epatica la velocità di flusso portale e la portata della vena porta dimostrandosi capace di regolare l'omeostasi del microcircolo portale;
9. l'iloprost ha mostrato di incrementare la velocità di flusso e la portata portale in pazienti con epatopatia cronica virale dimostrandosi capace di regolare l'omeostasi del microcircolo portale.

6. SCOPO DELLA RICERCA

Come discusso nelle sezioni precedenti, il danno epatico cronico e la cirrosi sono dovute a stimoli di diverso genere che inducono infiammazione, attivazione delle cellule stellate epatiche e, qualora vi sia una perpetuazione dei meccanismi infiammatori, a trasformazione di esse in miofibroblasti, cellule che favoriscono potentemente il realizzarsi di fibrosi e cirrosi.

In particolare l'attivazione è il risultato di interazioni con diverse popolazioni cellulari facenti parte del fegato o sopraggiunte nel fegato a causa dell'elevato stato di infiammazione in atto. I mediatori pro-infiammatori più importanti sono le specie

reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte dalle cellule del Kupffer mentre la citochina pro-fibrogenetica più rilevante è il TGF- β . Tra le citochine e i fattori di crescita fondamentali nell'attivazione vi sono: il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), l'endotelina-1 (ET-1), diversi fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-I), il fattore di necrosi tumorale TNF- α e l'adipochina leptina. L'attivazione è data dalla cooperazione di tre fasi finemente regolate tra loro. Nella fase pre-infiammatoria (o initiation) avvengono rapidi cambiamenti nell'espressione genica e nel fenotipo che rendono le cellule stellate responsive alle citochine. Gli epatociti danneggiati rilasciano sostanze che, avendo azione paracrina, le fanno proliferare per cercare di riparare il danno nel parenchima. La trasformazione delle cellule stellate avviene durante la fase post-infiammatoria (perpetuazione) quando fattori di crescita ed altri mediatori agiscono in maniera autocrina sulle cellule stellate già attivate oppure in modo paracrino su cellule ancora in stato quiescente (Figura 8).

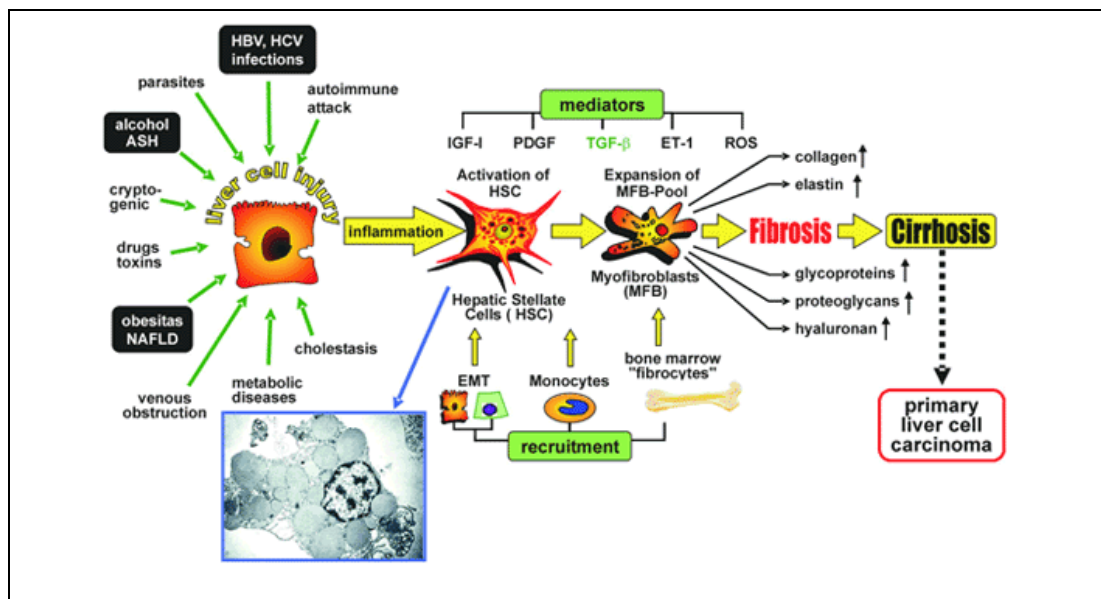


Figura 8. Meccanismi di fibrosi e cirrosi: attivazione e trasformazione delle cellule stellate epatiche. Tratto da www.Medscape.com; Comparative Hepatology 1999-2007 Biomed Central.

Quando si giunge alla cirrosi si ha una progressiva alterazione della vascolarizzazione da cause meccaniche e dinamiche vasocostrittorie.

Partendo dalle proprietà vasodilatatrici della prostaciclina, che ha la funzione di mantenere l'omeostasi del microcircolo epatico, scopo di questa ricerca è stato quello di valutare l'effetto della somministrazione di iloprost (analogo stabile della prostaciclina) sia in soggetti con epatite cronica virale da virus dell'epatite C sia in una popolazione di ratti sottoposta a trattamento chimico continuativo con CCl₄ (tetracloruro di carbonio), per indurne l'epatite cronica.

7. STUDIO CLINICO - MATERIALI E METODI

Protocollo sperimentale su pazienti con epatite cronica C

Per questo studio prospettico controllato sono stati arruolati cinque pazienti (quattro maschi, una femmina, età media $59,2 \pm 2$ anni) affetti da epatite cronica HCV positiva, già sottoposti presso il nostro Dipartimento di Medicina Clinica a biopsia epatica ecoguidata e con indice di Knodell il cui range era compreso tra un minimo di 6 ed un massimo di 8 (ovvero un'inflammazione di grado lieve). Nessuno dei 5 pazienti arruolati aveva svolto in precedenza terapia antivirale contro l'epatite C.

Tutta la sperimentazione clinica è stata condotta in ambito di ricovero ospedaliero ed ogni paziente ha avuto assicurata la piena assistenza che si offre a qualsiasi paziente ricoverato presso il Dipartimento di Medicina Clinica. La sperimentazione ha avuto l'approvazione del Comitato Bioetico dell'Università Campus Bio-Medico.

Base di partenza per la sperimentazione stessa

Sia le determinazioni sieriche delle citochine, degli indici di citonecrosi epatica e lo studio del volume di flusso portale epatico costituiscono la base di questo studio clinico il cui scopo è quello di valutare l'azione dell'iloprost.

Descrizione degli obiettivi e della finalità della sperimentazione

a. Obiettivi immediati (dopo il I ciclo di trattamento con iloprost)

Con questo studio si vuole verificare se

- l'iloprost detiene un effetto epatoprotettivo e di diminuzione della infiammazione epatica
- l'iloprost determina un incremento del flusso epatico

b. Esiti primari (al termine del I ciclo di trattamento di 3 giorni con iloprost)

- ❖ decremento di alcuni dei fattori profibrogenici epatici (TNF- α , TGF- β).

Schema dello studio

Lo studio si è svolto secondo il seguente schema:

tempo 0: ogni paziente a digiuno è stato sottoposto ad esami ematici epatici ed emocromo (svolti dal laboratorio centrale del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico) ed un campione di sangue è stato raccolto per essere conservato in frigorifero a -20°C (su cui sono state poi eseguite le analisi delle seguenti citochine (TNF- α , TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ) con tecnica citofluorimetrica e con sistema ELISA (dal laboratorio di immunologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico). Dopo il prelievo ematico ogni paziente è stato sottoposto a trattamento placebo con soluzione fisiologica 250cc ad una velocità di infusione di 30ml/h per una durata massima di 8 ore per due giorni;

tempo 2 controllo: dopo due giorni di somministrazione di soluzione fisiologica, ovvero all'inizio del terzo giorno, ogni paziente è stato sottoposto ad esami ematici epatici ed emocromo ed un campione di sangue è stato raccolto per essere conservato in frigorifero a -20°C. Successivamente al prelievo ematico è stata iniziata in ogni paziente la somministrazione di iloprost in 250cc di fisiologica ad una velocità di infusione regolata tra 10 e 30ml/h di velocità massima [dosaggio personalizzato sulla base dell'insorgenza di effetti collaterali (insorgenza di cefalea e rossore al viso)] per una durata massima di 8 ore al giorno, per 3 giorni consecutivi;

tempo 3 iloprost: al termine dei 3 giorni di infusione con iloprost, ovvero all'inizio del sesto giorno, ogni paziente è stato nuovamente sottoposto ad esami ematici epatici ed emocromo ed un ultimo campione di sangue è stato raccolto per essere conservato in frigorifero a -20°C.

Tutti i dati relativi alle analisi sulla funzione epatica sono stati conservati in un formato raccolta dati (modello unico per ogni paziente) come qui sotto riportato:

Raccolta e gestione dati

Data:	Paziente:	Data di nascita:	
	Prelievi		
All'ingresso Tempo 0	<i>Valori</i>		<i>Valori</i>
	Volume di flusso portale (l/min)		
	GOT		
	GPT		
	ALP		NOTE:
	GGT		
	Bilirubina tot		
	Bilirubina dir		
	IL-2		
	IL-4		
IL-5			

	IL-10		
	IFN- γ		
	TNF- α		
	TGF- β		
	HCV-RNA		
Terapia con soluzione fisiologica 250cc per 8ore al giorno per 2 giorni			
Tempo 2 controllo		Valori	Valori
	Volume di flusso portale (l/min)		
	GOT		
	GPT		
	ALP		NOTE:
	GGT		
	Bilirubina tot		
	Bilirubina dir		
	IL-2		
	IL-4		
	IL-5		
	IL-10		
	IFN- γ		
	TNF- α		
	TGF- β		

	HCV-RNA		
Terapia con ILOPROST 1.5 ng/Kg/min per 8 ore al giorno per 3 giorni			
Tempo 3 iloprost		Valori	Valori
	Volume di flusso portale (l/min)		
	GOT		
	GPT		
	ALP		NOTE:
	GGT		
	Bilirubina tot		
	Bilirubina dir		
	IL-2		
	IL-4		
	IL-5		
	IL-10		
	IFN- γ		
	TNF- α		
	TGF- β		
	HCV-RNA		

Trattamento dei pazienti con iloprost

L'ilocprost è stato somministrato utilizzando la confezione in commercio che prende il nome di Endoprost. Una fiala di Endoprost per somministrazione endovenosa contiene 0.067 mg di iloprost trometazolo pari a 0.50 mg di iloprost. Dopo aver calcolato il dosaggio (2 ng/Kg/min) l'ilocprost è stato diluito in 250 cc di soluzione fisiologica e la velocità di infusione è stata regolata a 30 ml/h per 8 ore al giorno. La durata del trattamento è stata di 3 giorni.

Valutazione dell'efficacia

La valutazione dell'efficacia del trattamento è stata legata alla diminuzione dei valori sierici dei vasocostrittori e delle citochine proinfiammatorie, sull'incremento di quelle antifibrotiche, sul miglioramento degli indici di citonecrosi epatica.

Valutazione della sicurezza

Ogni paziente arruolato allo studio ha sottoscritto il consenso informato di sperimentazione ed è stato sottoposto ad una visita clinica completa, ad esami emato-clinici generali e ad ECG appena prima di dare avvio all'inizio del trattamento sperimentale.

Il paziente in quanto degente è stato costantemente seguito, durante il protocollo di sperimentazione, dai medici del Reparto di Medicina Clinica che erano informati sulla necessità di interrompere la somministrazione del farmaco nell'eventualità di insorgenza di effetti collaterali (in tal caso il paziente sarebbe stato assistito anche al di fuori del ricovero ordinario per le esigenze del caso). Ogni giorno i pazienti sono inoltre stati sottoposti a domande sulla condizione clinica e visitati accuratamente per accertare modificazioni della condizione clinica.

Selezione e ritiro dei soggetti

a. Criteri di inclusione

Pazienti afferenti al dipartimento di Medicina Clinica con positività anticorpale per HCV da oltre 6 mesi, movimento enzimatico epatico (incremento GOT e GPT), ed epatite cronica istologicamente comprovata.

b. Criteri di esclusione

- Pazienti con cirrosi epatica di qualsiasi natura
- emorragia digestiva del tratto digestivo superiore od inferiore nei 12 mesi precedenti
- piastrinopenia
- epatocarcinoma
- alcolismo attivo
- epatite autoimmune
- deficit di α 1-anti-tripsina
- malattia di Wilson
- colangite sclerosante primitiva
- qualsiasi patologia neoplastica concomitante
- ipertensione arteriosa in trattamento con anti-ipertensivi
- scompenso cardiaco congestizio
- disturbi del ritmo cardiaco trattati con con β -bloccanti o calcio-antagonisti
- stato di gravidanza

Effetti collaterali

Non sono stati osservati effetti collaterali di rilievo all'infusione endovenosa eccetto la comparsa di lieve arrossamento in viso e cefalea in un paziente; tale

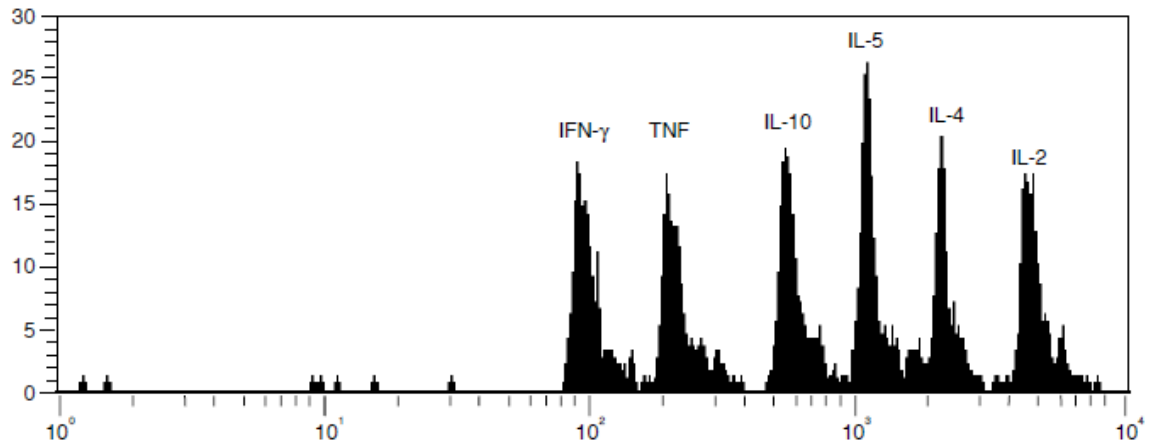
effetto è repentinamente regredito con la riduzione della velocità di infusione della terapia e pertanto non è stato necessario interrompere il trattamento.

Criteri per la raccolta dati e modalità di raccolta

I dati riguardanti i fattori vasocostrittori e profibrogenici sono stati testati su siero, raccolto e conservato secondo le normali procedure standard di congelamento, al termine dell'intero esperimento.

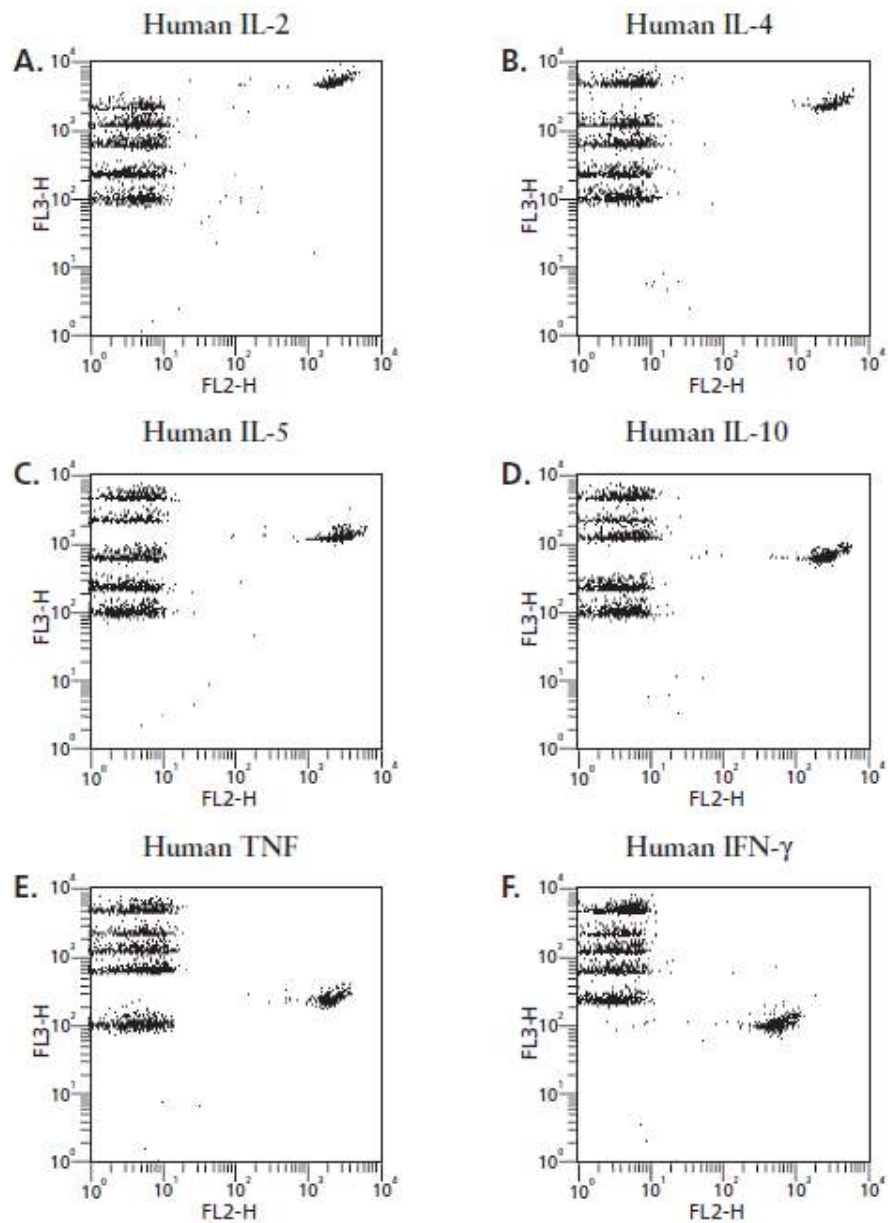
Esame sierico delle citochine

Le citochine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α ed IFN- γ sono state dosate con metodica citofluorimetrica utilizzando kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit. Tale metodica si basa sulle capacità della citofluorimetria di discriminare differenti particelle sulla base di dimensione e colore. Il CBA impiega una serie di particelle (biglie) con un'intensità di fluorescenza discreta, in modo da poter individuare multipli analiti solubili nello stesso test. In particolare, nel CBA, ogni biglia possiede una superficie di cattura per una specifica proteina, in analogia con i pozzetti delle piastre ELISA. Nel kit VCA utilizzato, 6 popolazioni di biglie con distinte intensità di fluorescenza sono state coniugate ciascuna con anticorpi leganti una specifica citochina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ). Le popolazioni di biglie si distribuiscono distintamente nel canale rosso di un citofluorimetro a flusso.



Le biglie fornite nel kit sono state mixate con anticorpi di detezione coniugati con PE e successivamente incubate con gli standard con il campione biologico contenete le citochine da dosare, formando un complesso a sandwich, in analogia con le metodiche ELISA. La misurazione dell'intensità di fluorescenza nel canale PE per ogni popolazione di biglie esprime la concentrazione della relativa citochina nel campione biologico.

I pannelli successivi mostrano i risultati ottenuti dal kit per ogni citochina:



Le sensibilità del test per citochina sono: 2.6 pg/ml per IL-2 e IL-4, 2.4 pg/ml per IL-5, 2.8 pg/ml per IL-10 e TNF- α e 7.1 pg/ml per IFN- γ .

I livelli di TGF- β sono stati dosati mediante kit commerciale ELISA (R&D Systems Inc, Mineapolis, USA). La sensibilità del test è di 4.61 pg/mL.

Valutazione della viremia (HCV-RNA)

Per la valutazione quantitativa dell'HCV-RNA è stata usata una tecnica real time RT-PCR (*artus* HCV RG RT-PCR Kit).

Questo sistema si basa sull'amplificazione e sul rilevamento simultaneo di una specifica regione del genoma dell'HCV.

Ogni kit è in grado di fornire quattro quantizzazioni standard dell'HCV utilizzando quantità di campione di 0,2 ml per ogni paziente eluiti a 0,06 ml. La sensibilità della metodica è valutata in 34,0 UI/ml. 1 UI/ml corrisponde a 1.21 copie/ml di HCV RNA.

Valutazione del flusso portale

I pazienti sono stati esaminati con ecografia color Doppler della vena porta utilizzando una sonda ecografica con frequenza Doppler compresa tra 1.8 e 3.5 MHz. Ogni paziente è stato studiato in posizione supina al mattino e a digiuno nei tre tempi previsti dallo studio [a tempo 0 (all'ingresso), a tempo 2 controllo (dopo due giorni di terapia con soluzione fisiologica) ed a tempo 3 iloprost (dopo tre giorni di terapia con iloprost)]. L'esame color Doppler della vena porta è stato svolto, in questi tre tempi, sempre alla stessa maniera, con approccio sottoxifoideo obliquo destro; il ramo portale principale è stato visualizzato in decorso obliquo e la misura della velocità (cm/s) è stata effettuata nel punto in cui esso incrocia l'arteria epatica, ponendo con attenzione il cursore del Doppler pulsato al centro del vaso e parallelo al suo decorso e facendo attenzione che l'angolo di insonazione fosse compreso tra 30 e 60°. Nella sede vasale ove si effettuava la misura della velocità di flusso, si eseguiva, contemporaneamente, anche quella del diametro del calibro. Ottenute queste informazioni la misurazione del volume di flusso portale (ml/min)

era automaticamente eseguita dal software della macchina ecografica, che utilizzava la seguente formula $[(r^2 \times 3.14) \times \text{velocità media del flusso portale}]$ (Figura 9).

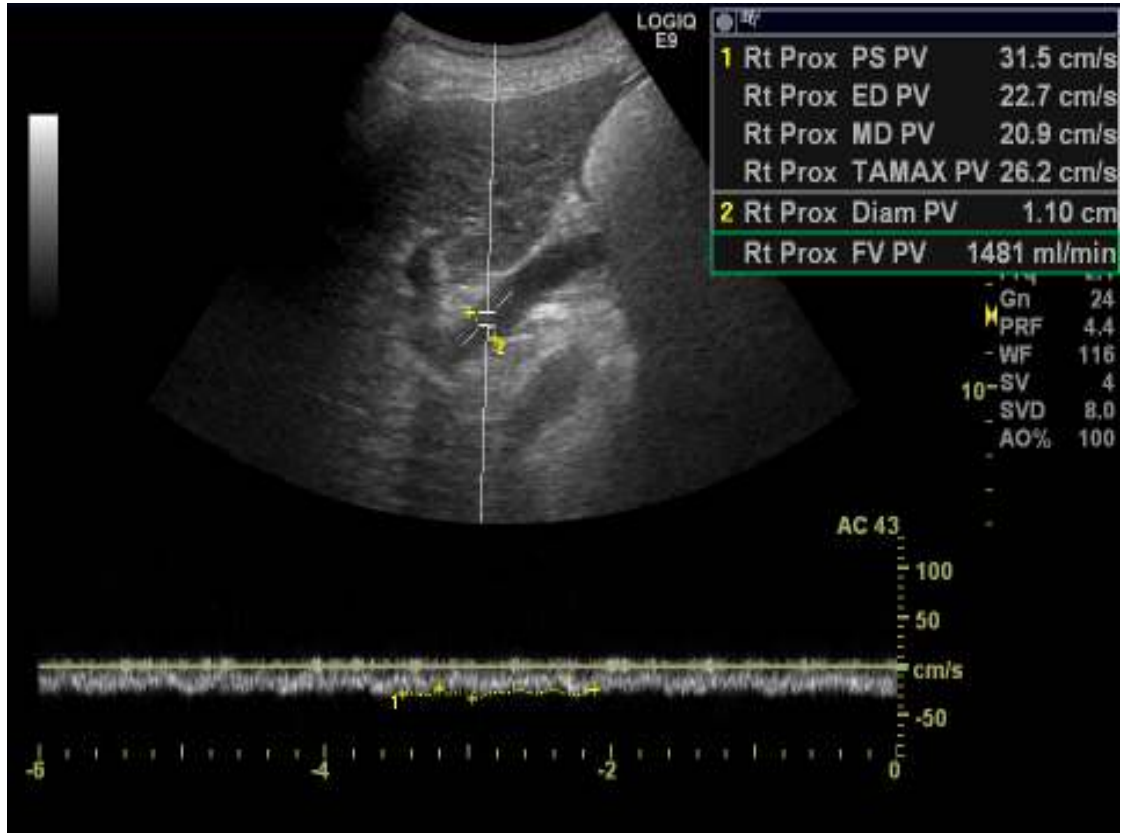


Figura 9. Scansione ecografica longitudinale della vena porta. E' visibile il calliper del Doppler posto al centro del vaso e parallelo al decorso del vaso. Nel riquadro in alto a destra si nota il valore del volume di flusso automaticamente determinato dalla macchina.

Descrizione dei metodi statistici impiegati

I risultati del volume di flusso e degli enzimi epatici sono stati espressi come media \pm DS. Tali risultati sono stati sottoposti a Test di D'Agostino per valutarne la distribuzione secondo curva normale gaussiana. La differenza media tra i valori T0, T2 e T3 sono stati analizzati con il test t di Student. Il software utilizzato per l'elaborazione statistica è SPSS 10.0. Si è considerata significativa una p a due code < 0.05 .

Le mediane dei livelli di citochine sono state confrontate nei tre gruppi mediante test non parametrico Mann-Whitney. In particolare in gruppo di terapia a 3 giorni con Iloprost è stato paragonato con il gruppo a tempo 0 e con il gruppo placebo a 3 giorni. Livelli di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

8. STUDIO SU RATTI - MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati 24 ratti della specie Wistar (Figura 10) di sesso maschile e di 12 settimane, mantenuti nello stabulario dell'università di Trieste. Sono stati suddivisi in tre gruppi e per tutta la durata dell'esperimento si è somministrato loro il tetracloruro di carbonio (CCl₄) attraverso una iniezione intraperitoneale per due volte a settimana. È stato usato il CCl₄ per via della sua tossicità iniettandolo sotto forma di complesso costituito da una soluzione di CCl₄ (1 ml/Kg) e olio di semi in un rapporto di 30/70.

Per ogni gruppo di ratti una parte di essi è stata trattata con placebo, mentre l'altra con iloprost, in entrambi i casi, somministrati attraverso la dieta alimentare. Sia il placebo che l'iloprost, essendo in polvere, sono stati aggiunti, al mangime, ad una concentrazione di 1mg/kg per ratto.

Infine è stato usato un ratto sano non trattato né con placebo né con iloprost, come ulteriore controllo.



Figura 10. Modello animale utilizzato per lo studio sperimentale. Tratto da www.iar.or.jp/shodobutsu/wi_rat/index.html.

Gli animali sono stati sacrificati con CO₂ dopo trattamento durato:

- 4 settimane (in base alla letteratura di riferimento in questo step si prevedeva una condizione di steatosi)
- 8 settimane (in base alla letteratura di riferimento in questo step si prevedeva un'ulteriore evoluzione ed aggravamento del processo steatosico verso l'epatite cronica)
- 12 settimane (in base alla letteratura di riferimento in questo step si prevedeva un quadro istopatologico di cirrosi micro nodulare).

Dopo il sacrificio è stato prelevato il sangue in EDTA per monitorare i livelli plasmatici delle transaminasi e sono stati espianati cuore e fegato che in parte sono stati congelati a -80°C ed in parte conservati in formalina a 4°C. Le parti conservate in formalina sono state incluse in paraffina per la successiva colorazione mentre le parti congelate sono state utilizzate per successivi studi molecolari.

Una parte di campioni invece è stata congelata in azoto liquido e conservata a -80°C; questi campioni sono poi stati sezionati al criostato per successive analisi immunohistochimiche.

Estrazione RNA da fegato

L'RNA è stato estratto utilizzando il kit Mini RNeasy Lipid Tissue.

Il tessuto è stato lisato e, seguendo il protocollo, si sono ottenuti 50 µl RNA da circa 100 mg di tessuto. L'RNA ottenuto, facilmente degradabile e instabile, è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

a. RT-PCR (PCR retrotrascrizionale)

L'RT-PCR permette di amplificare sequenze bersaglio a partire da molecole di RNA (Figura 11).

Questa tecnica presenta due fasi:

- una retrotrascrizione in cui l'RNA viene retrotrascritto in cDNA a singolo filamento ad opera di una trascrittasi inversa
- un'amplificazione attraverso PCR del cDNA

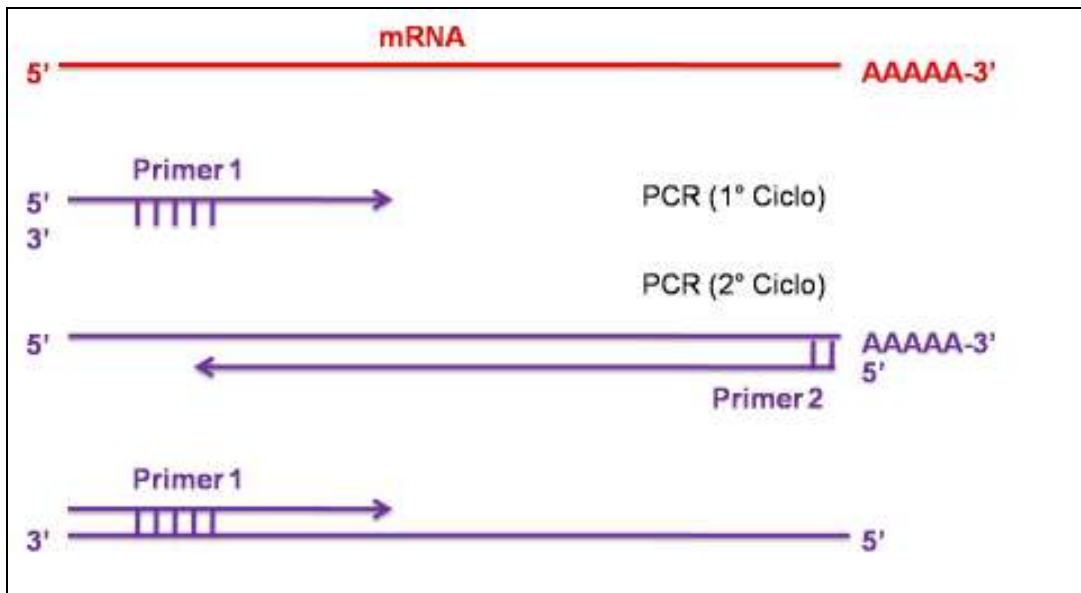


Figura 11. Schema di funzionamento di RT-PCR. Tratto da www.digilander.libero.it

Per funzionare, la RT-PCR ha bisogno di:

- buffer in cui sono contenuti oligo-(dT)primer
- RT
- H₂O
- RNA

Il protocollo di retrotrascrizione prevede tre fasi: una fase di 5 minuti a 25°C, una fase di allungamento a 42°C per 30 minuti ed una fase a 85°C per 5 minuti.

b. Real Time PCR

È una tecnica che si basa sullo stesso principio della PCR e cioè quello di amplificare la sequenza bersaglio ma la differenza che la distingue dalle altre è che permette di ottenere simultaneamente la rilevazione dell'amplificato e permette di quantificare il DNA iniziale. Questo grazie al fatto che è una tecnica che unisce un termociclatore, che permette l'amplificazione, e un fluorimetro che permette di vedere la fluorescenza (Figura 12).



Figura 12. Rotor gene 6000 (Corbett). Tratto da www.sci.muni.cz/botany/systemgr/index.php?show=molekular&res=1600

La fluorescenza è data dall'aggiunta, nel campione da amplificare, di una sostanza che ha la capacità di intercalarsi tra le eliche di DNA, il SyBR Green.

La PCR è divisa in tre fasi che si ripetono per un numero definito di cicli:

fase di denaturazione ad alte temperature, fase di annealing (appaiamento dei primer alla catena) e fase di allungamento.

La tecnica si basa sul principio che maggiore è il numero di molecole stampo presenti all'inizio della reazione, minore sarà il numero di cicli necessari per raggiungere un valore minimo (soglia) di ammontare del prodotto.

L'analisi viene fatta quindi esprimendo il numero di cicli richiesti per raggiungere il valore soglia Ct (cycle threshold) e cioè quando tutti i campioni sono amplificati con la stessa efficienza e questa curva di amplificazione è inversamente proporzionale alla quantità di DNA di partenza.

In questo studio è stata valutata l'espressione di 4 geni: recettore A dell'endotelina, collagene I, α -smooth muscle actin e PPAR- γ (Tabella 3).

Tabella 3. Primers di ratti utilizzati

H	Primers Fw Primers Rv	T° annealing
ET-A receptor	Fw : 5'-GAAGTCGTCCGTGGGCATCA-3' Rv : 5'-CTGTGCTCCTCGCCCTTGTA-3'	65°
Collagene I	Fw : 5'-CAAGATGGCATCCCTGGACAG-3' Rv : 5'-AGCTGCACCGACAGCACCATC-3'	66°
α -smooth muscle actin	Fw : 5'-GATCACCATCGGGAATGAACGC-3' Rv : 5'-CTTAGAAGCATTGCGGTGGAC-3'	65°
PPAR- γ	Fw : 5'-TAGGTGTGATCTTAACTGTCG-3' Rv : 5'-GCATGGTGTAGATGATCTCA-3'	60°

Il protocollo seguito per la Real Time PCR è il seguente:

- una prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti
- una fase di amplificazione ripetuta per 35 cicli. Ogni ciclo prevede 1 minuto di denaturazione del cDNA a 94°C, 1 minuto di appaiamento alla temperatura specifica dei primers ed una fase di allungamento per 1 minuto

Western blot

Il western blot è una tecnica biochimica che permette di valutare quanto e dove è espressa una proteina.

L'analisi si svolge in elettroforesi su gel di acrilamide al 12 % in condizioni denaturanti che consente la separazione delle varie proteine in funzione della loro massa.

Esso è costituito da due gel:

- Stacking gel (o gel di impaccamento) è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza. È formato da acrilamide, APS 10% (persolfato d'ammonio), TEMED (tetrametiletilendiammina), SDS (sodio dodecilsolfato) e TRIS-HCl (idrossimetil-amminometano) a pH 6.8
- Running gel (o gel di separazione) è la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine dei vari campioni sulla base del loro peso molecolare. È composto dagli stessi ingredienti dello stacking gel, ma in quantità diverse. In particolare il pH della soluzione TRIS-HCl SDS è più basico (8.8) e la concentrazione di acrilamide varia a seconda della porosità desiderata: concentrazioni maggiori portano a pori di dimensioni minori, dunque capaci di separare le proteine con una risoluzione maggiore .

A fine corsa si trasferisce su una membrana di nitrocellulosa e poi la si lascia a saturare in PBS/BSA 2%(Phosphate Buffer Saline e Albumin from Bovine Serum) con TWEEN-20 0.1%.

Dopo saturazione la membrana è pronta per la reazione con gli anticorpi primario e secondario e quest'ultimo deve essere coniugato ad una perossidasi che servirà, alla fine, per impressionare su una lastra fotografica la posizione della proteina di interesse.

L'anticorpo primario utilizzato è stato ETAR goat-IgG (Santa Cruz Biotechnology INC) che ha la capacità di riconoscere tutti e due i tipi di recettore dell'endotelina (A e B) in quanto presentano peso molecolare diverso.

Sfruttando questa differenza è stata effettuata la corsa su gel di acrilamide al 12% per poi essere trasferita su membrana di nitrocellulosa.

La concentrazione di anticorpo primario utilizzata è di 1:200, di quello secondario, invece, 1:5000.

Dopo aver lasciato la membrana con l'anticorpo primario per un'ora, è stato utilizzato l'anticorpo secondario anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology INC). La coniugazione dell'anticorpo secondario con la perossidasi è servita per il successivo trattamento della membrana con la soluzione ECL che fornisce il substrato per HRP, formando così un complesso luminescente che ha la capacità di impressionare una lastra autoradiografica.

Inclusione di organi in paraffina

Dopo l'espianto l'organo è stato immerso in formalina, un fissativo che immobilizza i costituenti cellulari e tissutali in uno stato il più vicino possibile alla vita bloccandone le attività vitali.

Una volta che la formalina è entrata nel tessuto (1-2 giorni) il campione è stato lavato, togliendo l'eccesso di fissativo e poi, prima di essere incluso in paraffina (sostanza idrofoba), è stato disidratato. Quest'ultimo processo prevede un passaggio graduale di disidratazione (si incomincia con alcool 80 %, passando al 90 ed al 95 % fino ad arrivare all'etanolo assoluto).

Poichè la paraffina è poco solubile in alcool, mentre lo è nello xilolo, quest'ultimo è stato usato nel passaggio finale; infine si è proceduto all'inclusione in paraffina in specifiche cassette istologiche (Figura 13).

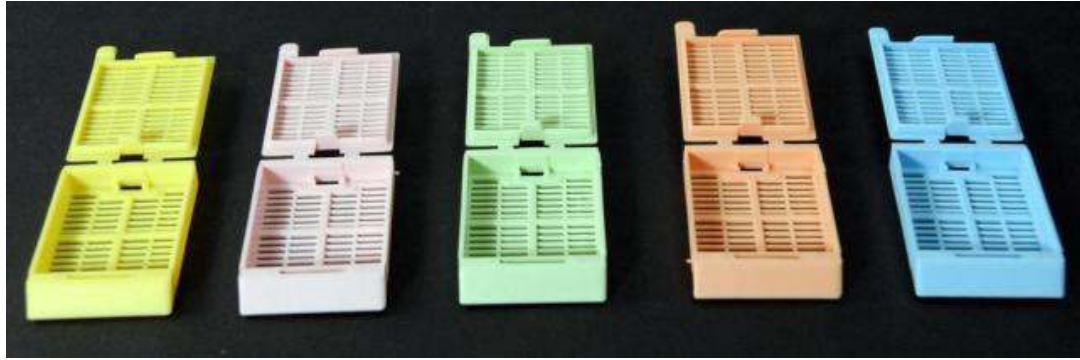


Figura 13. Cassette istologiche. Tratto da www.biosigma.it

Il tessuto è poi stato sezionato utilizzando un particolare apparecchio, il microtomo, che ha permesso di tagliare sottilissime fettine dello spessore compreso tra 2-10 μ m che sono state colorate e osservate al microscopio.

Colorazioni istologiche

I coloranti (sostanze chimiche che si legano a componenti cellulari aumentandone il contrasto) utilizzati sono stati:

- la colorazione tricromica che permette la visualizzazione del tessuto connettivo.
- i coloranti impiegati in sequenza sono fucsina, formolo acetico e picro indigo-carminio

Prima di procedere alla colorazione le sezioni istologiche hanno subito il processo di sparaffinatura in soluzione acquosa. Questo processo ha permesso di re-idratare le sezioni istologiche seguendo un processo inverso a quello di disidratazione, ovvero utilizzando una scala discendente di alcoli iniziando dal solvente della paraffina, lo xilolo.

Criostato

Il criostato è un tipo di microtomo che permette di tagliare organi congelati a - 80°C mantenendo la temperatura dell'apparecchio a - 20°C.

Le sezioni tagliate vengono poste su vetrini porta-oggetto e mantenute a - 80°C fino al loro utilizzo per colorazioni con tecniche immunoistochimiche e di immunofluorescenza.

Tecniche di immunoistochimica e di immunofluorescenza

Queste tecniche sfruttano la capacità degli anticorpi di legarsi all'antigene specifico (la maggior parte delle molecole biologiche sono antigeni).

Per l'analisi immunoistochimica ci sono due possibilità:

- l'analisi diretta in cui l'anticorpo utilizzato è già coniugato all'enzima perossidasi
- l'analisi indiretta. Quest'ultima prevede l'utilizzo di due anticorpi: il primario che si lega all'antigene interessato e il secondario, che si lega al primario.

Sono stati utilizzati due metodi:

1. a fluorescenza in cui l'anticorpo secondario è coniugato ad un fluorocromo (FITC)
2. con tecnica di immunoistochimica dove l'anticorpo secondario è coniugato all'enzima perossidasi e in seguito, dopo il trattamento con un particolare cromogeno, si colorerà il complesso proteina-anticorpo-cromogeno.

Scopo delle analisi istologiche ed immunoistochimiche

Le analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari sono finalizzate a cercare e quantificare quanto segue:

1. la presenza di molecole e proteine espresse prevalentemente da cellule stellate in fase quiescente attraverso
 - l'espressione del recettore dell'endotelina (ET-B)
 - l'espressione di PPAR- γ
2. la presenza di molecole e proteine espresse prevalentemente da mio fibroblasti attraverso
 - l'espressione del recettore dell'endotelina (ET-A)
 - l'espressione di collagene tipo I
 - l'espressione dei filamenti sottili di actina
 - l'espressione di endotelina-1

9. RISULTATI

Risultati studio clinico

I risultati sono espressi come [tempo 0 (T0: basale prima di ogni trattamento); Tempo 2 controllo (T2: dopo due giorni di trattamento con soluzione fisiologica) Tempo 3 iloprost (T3 iloprost: dopo tre giorni di trattamento con iloprost)].

a. IL-2

I livelli sierici mediani di IL-2 sono rispettivamente 2900 pg/ml (3500-1100), 2700 pg/ml (3750-850), 2900 pg/ml (3450-600) a T0, a T2, a T3. I livelli mediani non differiscono significativamente (Figura 14).

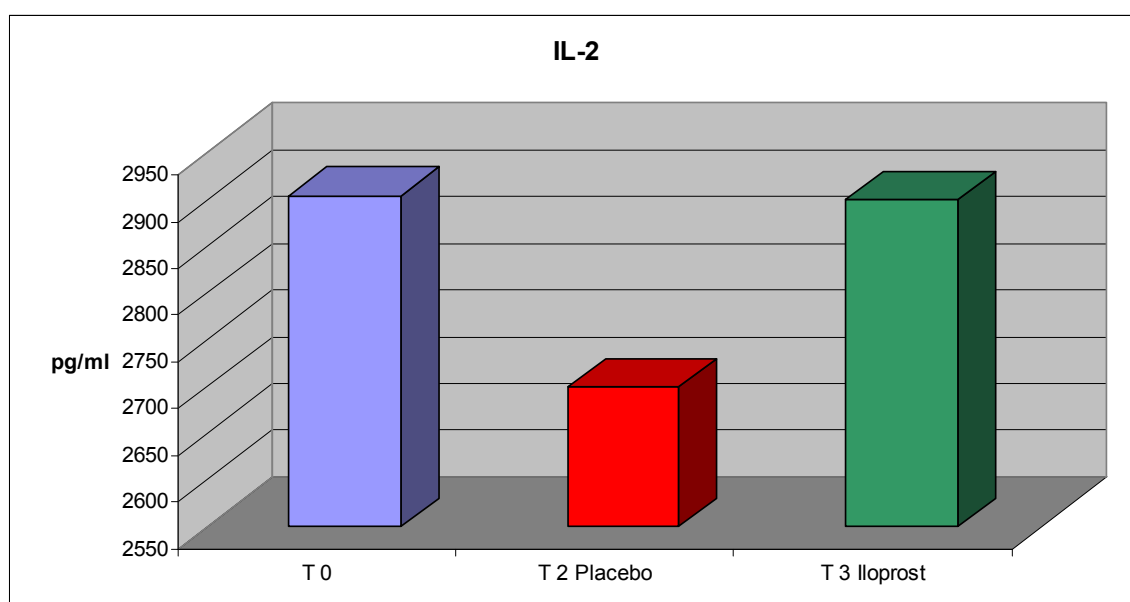


Figura 14. Livelli mediani di IL-2 (pg/ml).

b. IL-4

Abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli mediani di IL-4 nei sieri a T3, rispetto a T2 e T0. Tali livelli sono rispettivamente 227.5 pg/ml (400-155), 215 pg/ml (740-150), 200 pg/ml (1000-145) a T0, a T2 ed a T3, tuttavia le differenze non sono statisticamente significative. (Figura 15).

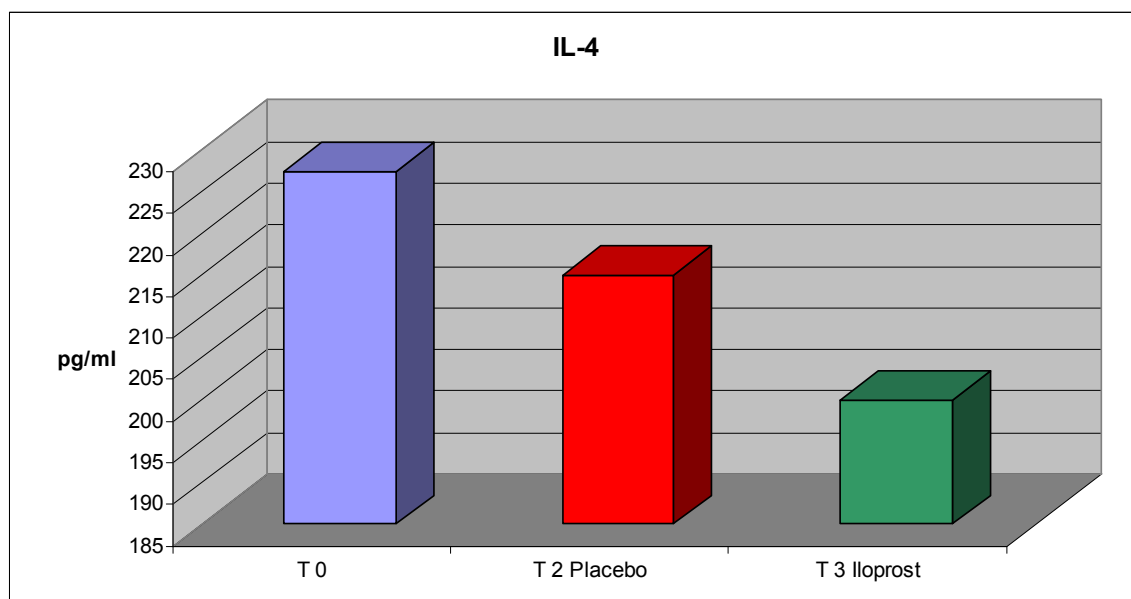


Figura 15. Livelli mediani di IL-4 (pg/ml).

c. IL-5

Non abbiamo riscontrato differenze significative nei livelli mediani di IL-5 nei sieri a T0, a T2, a T3. I livelli mediani di IL-5 sono rispettivamente 950 pg/ml (1200-300), 900 pg/ml (1250-290), 990 pg/ml (1100-270) a T0, a T2 ed a T3 (Figura 16).

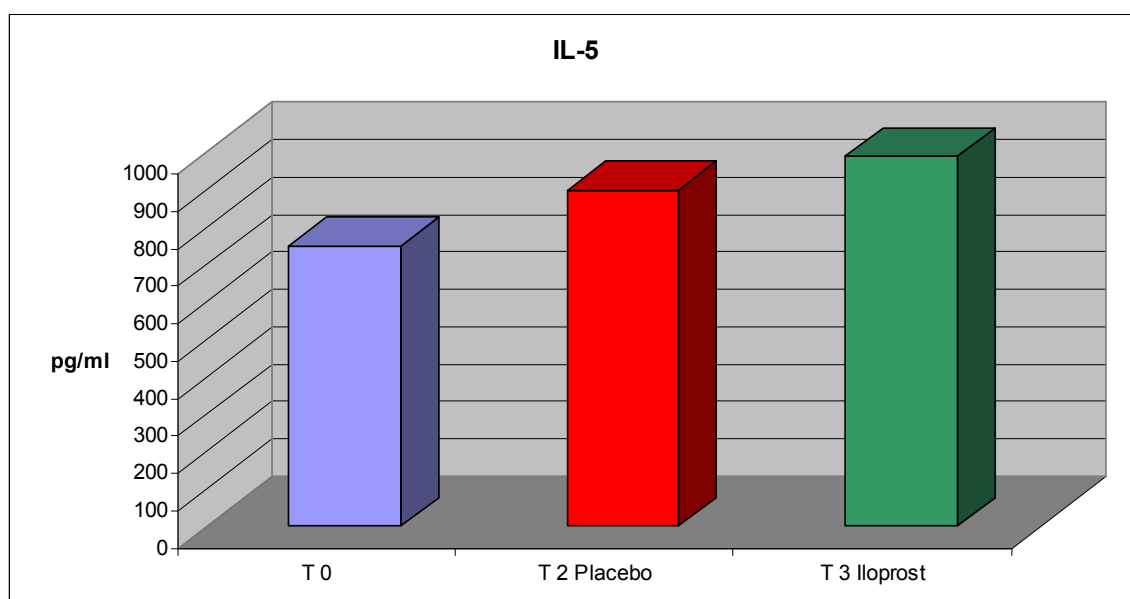


Figura 16. Livelli mediani di IL-5 (pg/ml).

d. IL-10

Di questa citochina non vengono riportati i dosaggi poichè un problema tecnico non ha consentito la visualizzazione della curva standard.

e. TNF- α

Abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli mediani di TNF- α nei sieri a T3, 1650 pg/ml (4000-950), rispetto a T0 1800 pg/ml (4159-900) e a T2, 1750 pg/ml (4250-1200), tuttavia i livelli non differiscono in maniera significativa (Figura 17).

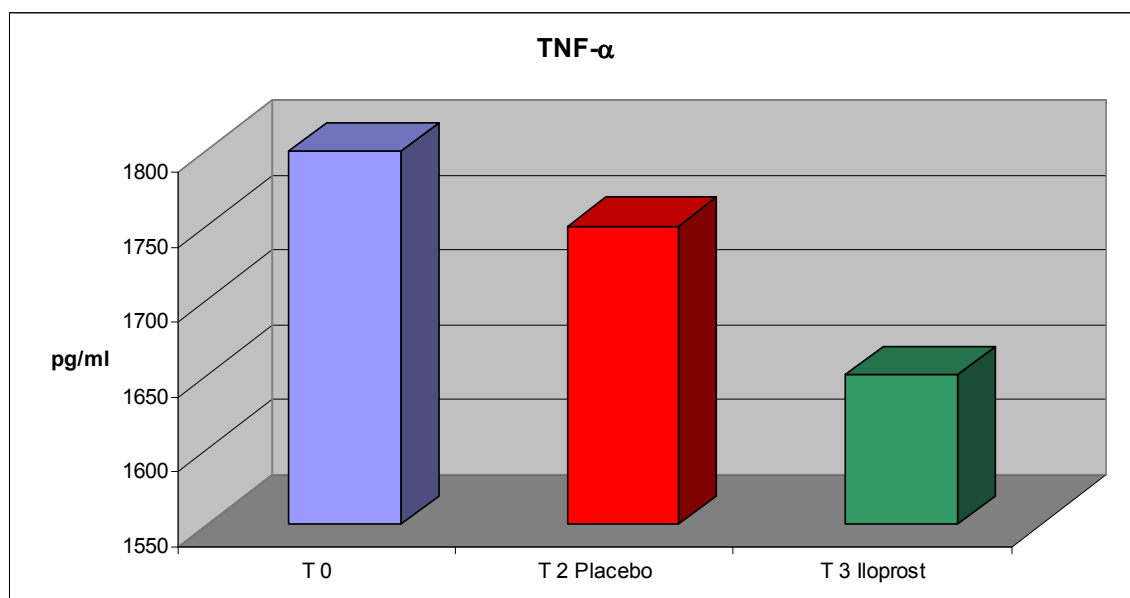


Figura 17. Livelli mediani di TNF- α (pg/ml).

f. IFN- γ

Abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli mediani di IFN- γ nei sieri a T3, 2250 pg/ml (3050-950), rispetto a T0, 2300 pg/ml (3000-1050) e a T2, 2350 pg/ml (2350-1000), tuttavia i livelli non differiscono in maniera significativa (Figura 18).

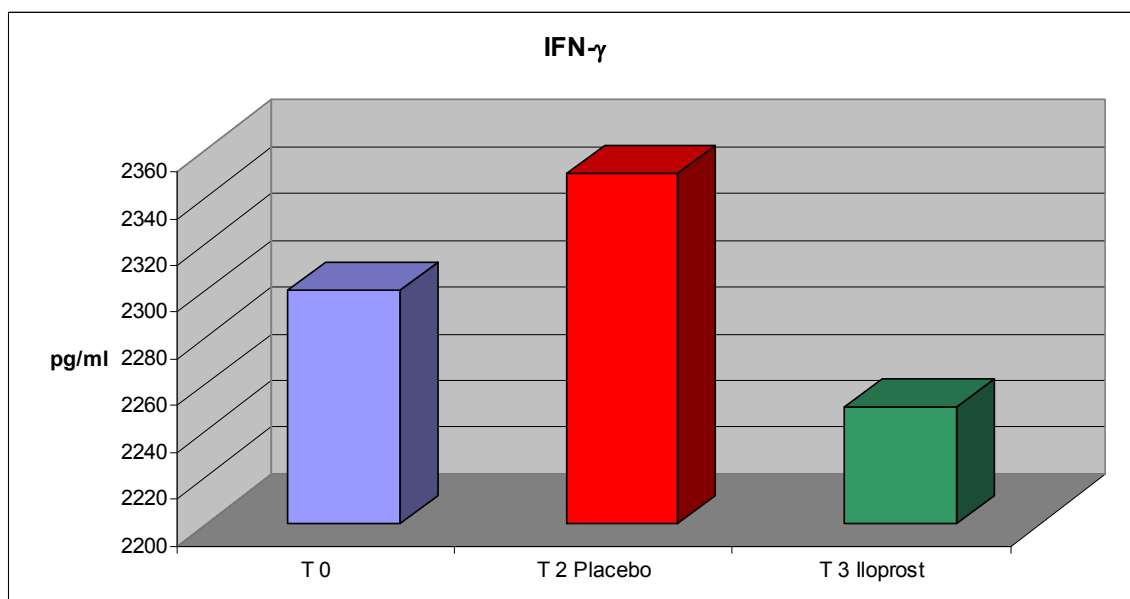


Figura 18. Livelli mediani di IFN- γ (pg/ml).

g. TGF- β

Abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli mediani di TGF- β nei sieri a T3 290 pg/ml (900-20), rispetto a T0, 370 pg/ml (1100-50) e a T2, 320 pg/ml (1050-20), tuttavia i livelli non differiscono in maniera significativa (Figura 19).

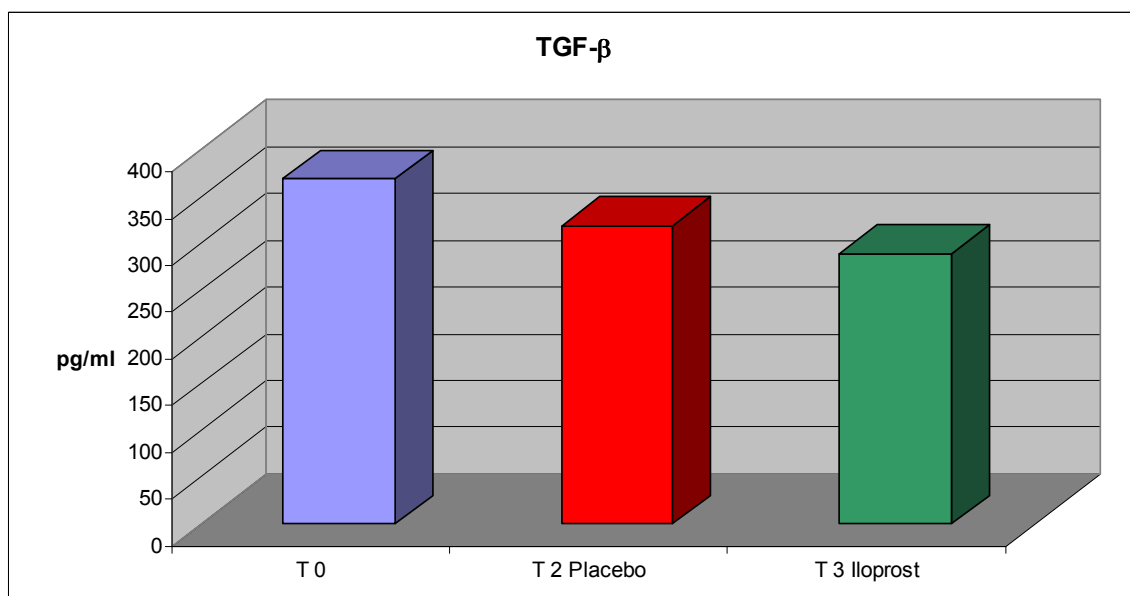


Figura 19. Livelli mediani di TGF- β (pg/ml).

h. Transaminasi

Per quanto riguarda i valori di transaminasi si è osservata una tendenza ad una diminuzione dei valori di transaminasi al tempo T3 ilprost rispetto al valore T0 e T2 controllo senza tuttavia poter raggiungere una significatività statistica a causa dell'esiguità numerica dei pazienti e della variabilità dei valori numerici delle transaminasi tra i diversi pazienti (Tabella 4).

Tabella 4. Valore medio \pm DS delle singole transaminasi

<u>Transaminasi</u>	<u>T0 basale</u>	<u>T2 controllo</u>	<u>T3 ilprost</u>
GOT (UI/L)	91,6\pm69,2	90,8\pm73,6	81,4\pm57,1
GPT (UI/L)	99,2\pm71,1	99,6\pm84,8	95,4\pm91,8

i. HCV-RNA

Nei tre pazienti in cui è stata dosata la viremia si apprezza una diminuzione di valori in due pazienti a T3 ed un incremento in un paziente a T3 rispetto agli altri tempi di valutazione (Tabella 5). Le variazioni non sono significative dal punto di vista statistico.

Tabella 5. Valori di HCV-RNA in tre pazienti nei rispettivi tre tempi (T0 prima di somministrare placebo, T2 dopo placebo, T3 dopo ilprost.

<u>Pazienti</u>	<u>T0</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>
1	198000,0 UI/ml	289000,0 UI/ml	185000,0 UI/ml
2	1480000,0 UI/ml	1000000,0 UI/ml	396000,0 UI/ml
3	497000,0 UI/ml	754000,0 UI/ml	762000,0 UI/ml

Risultati studio sperimentale su ratti

a. Transaminasi

Dal sangue prelevato viene raccolto il plasma e i campioni sono stati analizzati.

L'analisi delle transaminasi sono molto importanti perché funzionano da indicatori di sofferenza epatica. Le transaminasi nei ratti sono più concentrate rispetto all'uomo, il valore di ALT in un ratto non trattato è di 33 U/l mentre AST è di 115.7 U/l.

I valori ottenuti dalle analisi del sangue mostrano un forte aumento delle concentrazione degli enzimi epatici nei ratti non trattati con ilprost rispetto a quelli trattati e questo potrebbe indicare una reale attività di protezione del tessuto epatico da parte del farmaco (Figura 20).

I risultati inoltre sono stati messi a confronto con i valori trovati in un ratto non trattato.

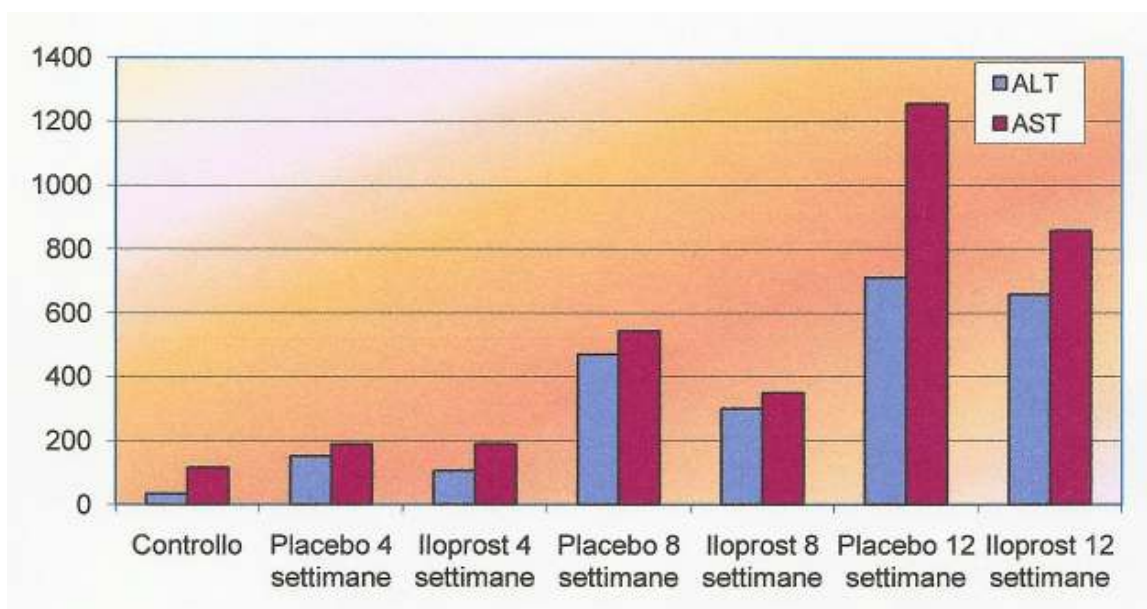


Figura 20. Andamento degli enzimi transaminasi

b. Real Time PCR

Grazie a questa analisi si è voluto dimostrare l'andamento reale delle concentrazione dei geni indicatori di sofferenza epatica a livello dei tre gruppi d'esperimento.

Sono stati analizzati i geni α -smooth muscle actin, recettore A endotelinico e il collagene di tipo I per le cellule stellate epatiche attivate.

Come marker di cellule stellate epatiche nello stato quiescente è stato analizzato il PPAR- γ .

La tecnica prevede l'utilizzo di un intercalante (SyBR Green) fluorescente e questo permette di vedere in tempo reale l'amplificazione della sequenza bersaglio.

I risultati ottenuti sono stati normalizzati con i trascritti di β -actina.

I valori relativi ai ratti trattati (i4, i8, i12) sono stati messi a confronto con i ratti non trattati dello stesso gruppo. La figura 21 rappresenta l'andamento della concentrazione del recettore A endotelinico.

Si può notare come la concentrazione del recettore dell'endotelina diminuisca con il passare delle settimane di trattamento del farmaco.

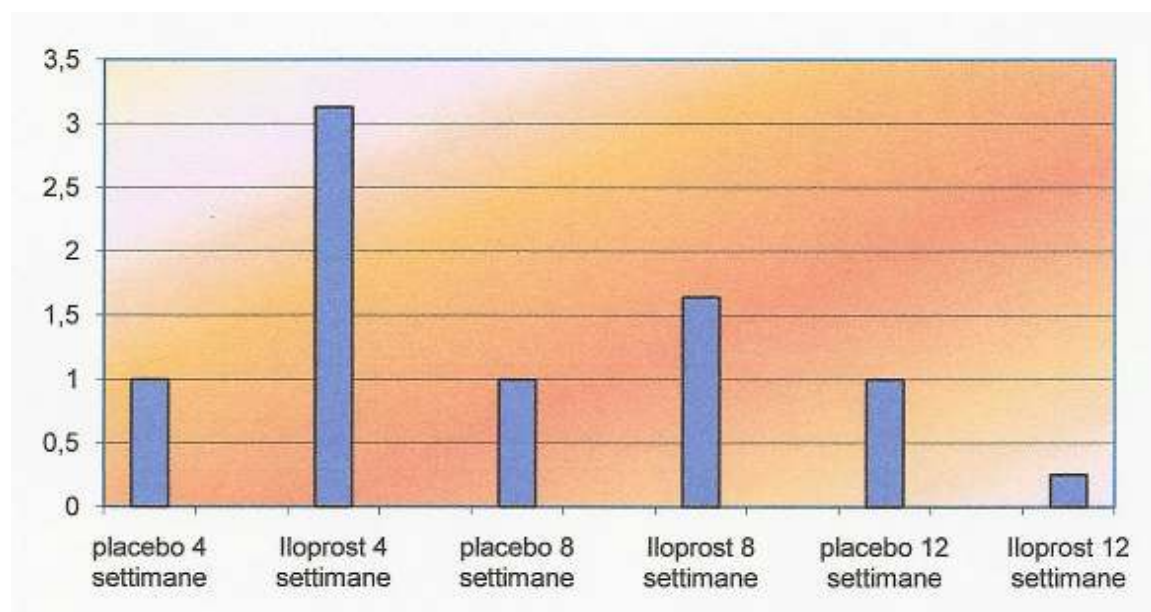


Figura 21. Andamento del recettore endotelinico A tramite analisi Real Time PCR

Il grafico in figura 22 mostra l'andamento del collagene di tipo 1.

Da questi dati si vede come già a livello dei ratti trattati con iloprost e sacrificati alla 4a e 12ma settimana il farmaco sembra aver avuto effetto in quanto vi è una diminuzione dell'espressione del collagene.

A livello dell'8a settimana invece si nota un netto aumento.

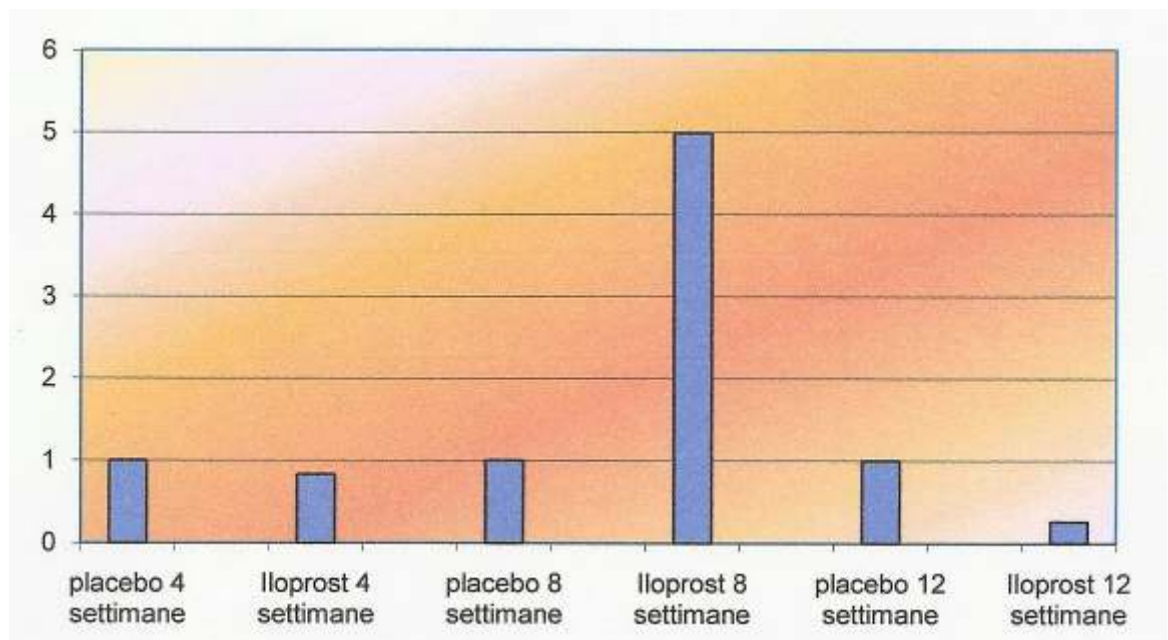


Figura 22. Analisi del collagene tipo I grazie a Real Time PCR

Il grafico di α -smooth muscle actin (Figura 23) mostra come la concentrazione di questo marcatore di attivazione delle HSC diminuisca con il passare delle settimane di trattamento anche se i valori rimangono tendenzialmente alti.

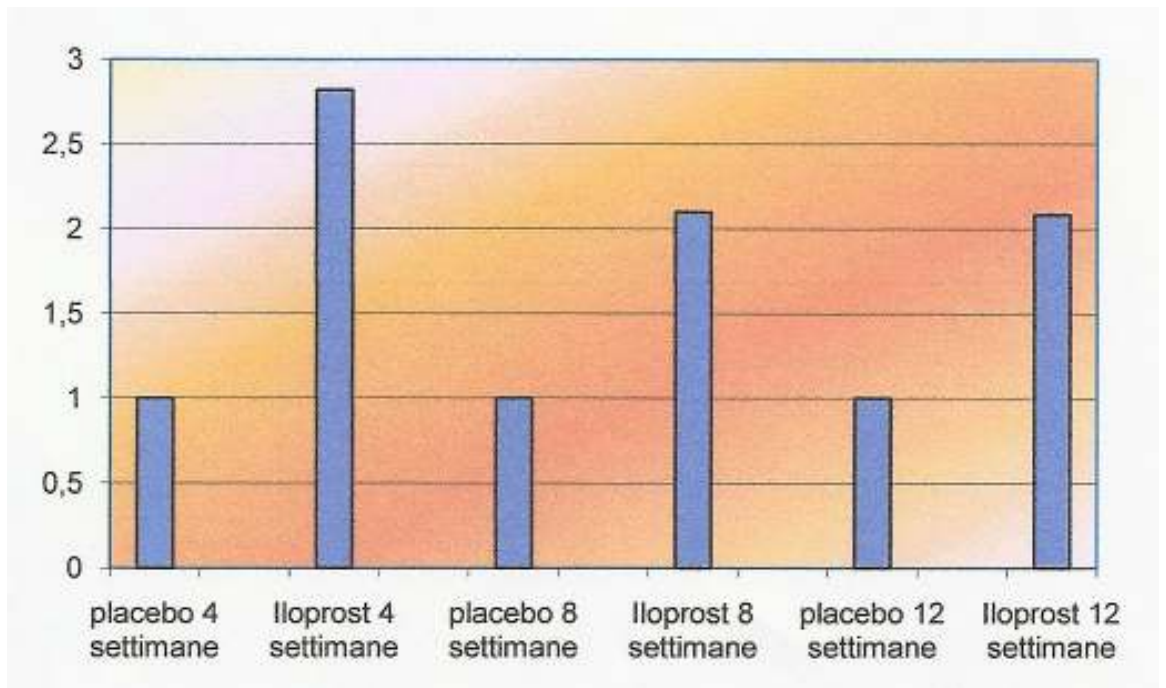


Figura 23. Analisi del marker α -smooth muscle actin tramite Real Time PCR

Il grafico in figura 24 è relativo al PPAR- γ . Essendo un marker delle cellule stellate in stato quiescente si pensava di dover trovare un valore costante o un po' basso mentre si nota che diminuisce drasticamente con il passare delle settimane.

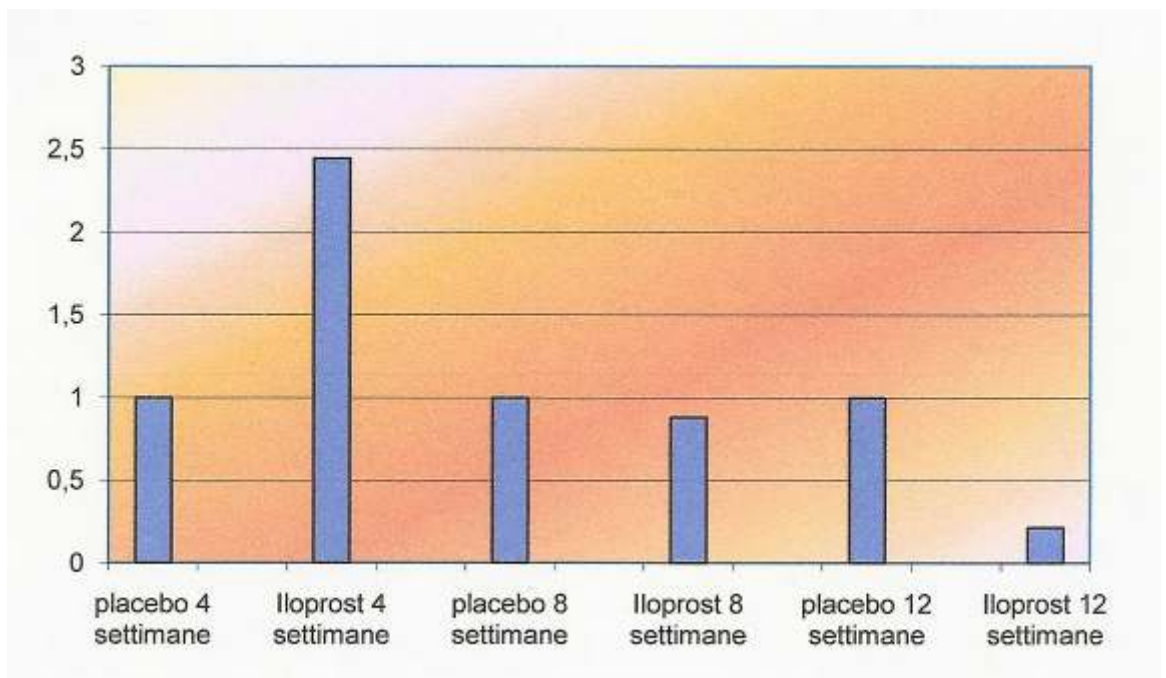


Figura 24. Analisi del gene PPAR- γ tramite Real Time PCR

c. Colorazioni istologiche

La colorazione usata è stata la colorazione tricromica.

Con questo tipo di colorazione si possono differenziare nuclei, vasi e collagene con rispettive colorazioni viola, verde chiaro-giallognolo e azzurro verde.

La figura 25 mostra tessuto epatico sano ed è stato utilizzato come controllo. Si può notare come la struttura sia molto compatta, le cellule siano ben definite come anche i sinusoidi. La colorazione verde è riferita a globuli rossi rimasti intrappolati all'interno del vaso.

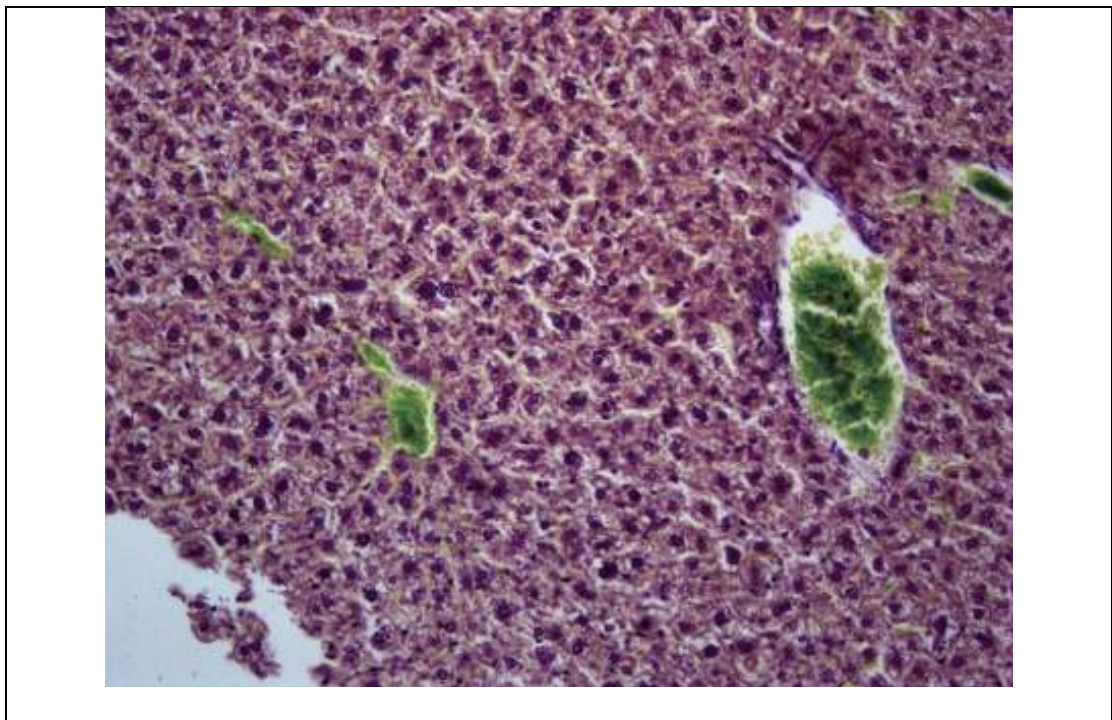


Figura 25. Fegato di ratto sano usato come controllo

Nella figura 26 si nota che sia a livello del gruppo placebo sia a livello del gruppo iloprost c'è una sofferenza epatica. A livello del gruppo placebo la colorazione verde acqua è riferibile a collagene che fisiologicamente è presente come rivestimento dell'endotelio vasale.

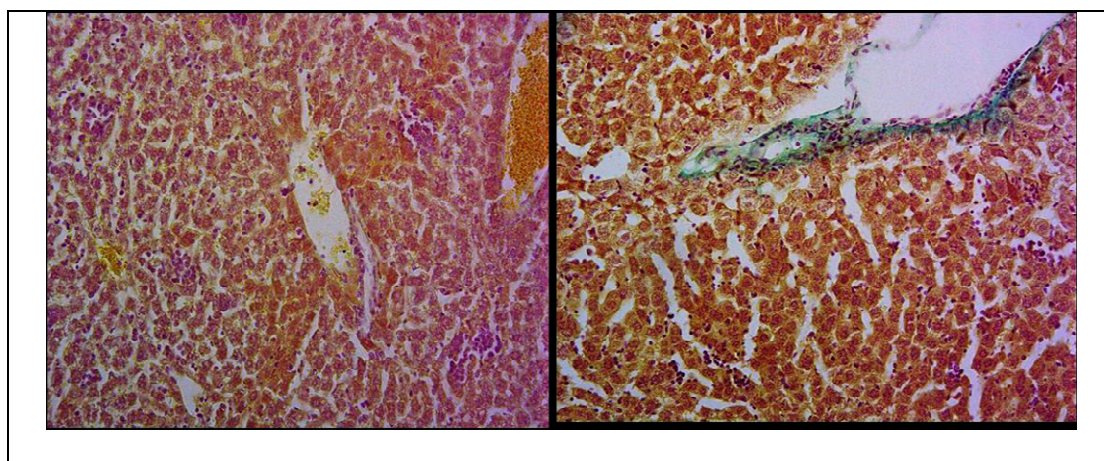


Figura 26. A sinistra fegato di ratto del gruppo iloprost di 8 settimane confrontato con fegato di ratto del gruppo Placebo di 8 settimane

In questa sezione è stata trovata un'alta percentuale di collagene a livello della maggior parte dei vasi e questo può essere indice di elevata produzione di collagene quindi di attivazione del processo di transizione della matrice extracellulare.

d. Tecnica di immunofluorescenza

La ricerca dell'endotelina-1 può essere eseguita anche tramite colorazioni a fluorescenza. La tecnica consiste nell'utilizzare due anticorpi che si riconoscono formando un complesso. L'anticorpo secondario è coniugato ad un fluorocromo che assorbe ad una determinata lunghezza d'onda e emette la fluorescenza a una lunghezza d'onda maggiore.

In questo caso è stato utilizzato il fluorocromo FITC che assorbe a 488 nm ed emette a 519 nm a luce verde.

La figura 27 fa riferimento a un vaso e si nota la differenza tra il gruppo placebo e il gruppo iloprost in cui si apprezza la maggior positività intorno al vaso del gruppo placebo. Il colore verde brillante è endotelina.

La flebile fluorescenza periferica è invece da considerarsi un'autofluorescenza aspecifica del tessuto.

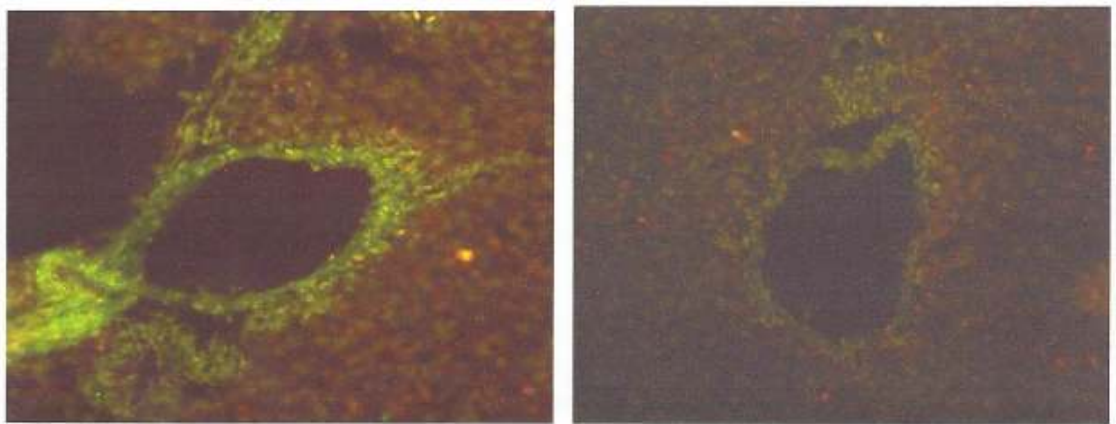


Figura 27. A sinistra fegato di ratto appartenente al gruppo placebo di 8 settimane, a destra fegato del gruppo Iloprost di 8 settimane

e. Tecnica di immunistoichimica

Questo tipo di colorazione sfrutta anch'essa il complesso che si forma tra anticorpo primario e secondario con la differenza che quest'ultimo non è coniugato ad un fluorocromo ma ad un enzima. L'enzima utilizzato è una perossidasi che, legandosi al substrato che ha legato a se un cromogeno (in questo caso viene utilizzato il cromogeno DAB), dà la caratteristica colorazione marrone a livello del complesso.

Dalla figura 28 si può notare una positività con caratteristica colorazione marrone a livello del complesso collagene-anticorpo-cromogeno.

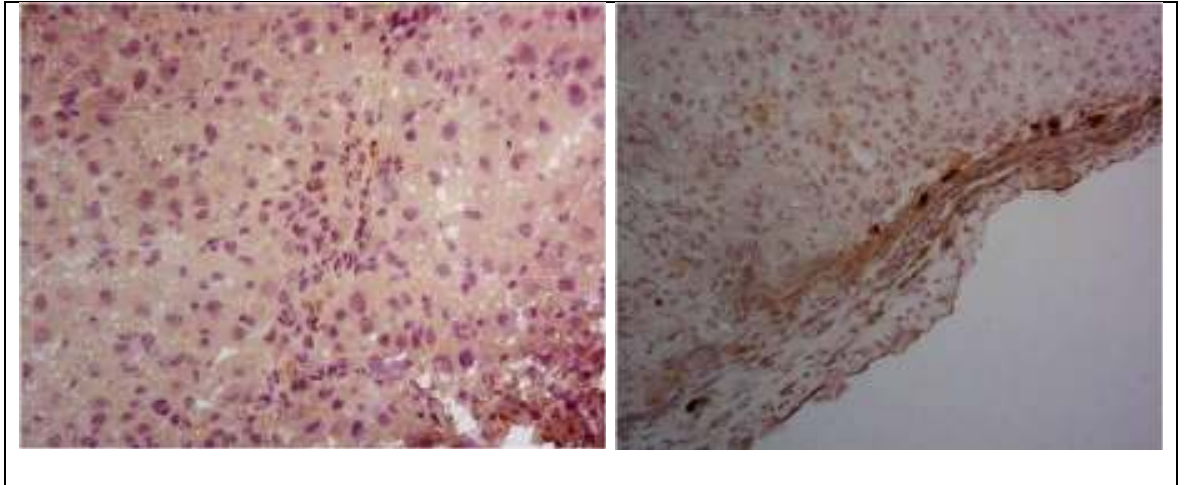


Figura 28. A sinistra fegato di ratto del gruppo iloprost a 8 settimane visualizzato con ingrandimento 40x, a destra il corrispettivo placebo con ingrandimento 20x

Per facilitare la visione i vetrini dopo trattamento sono stati colorati con il colorante ematossilina per distinguere i nuclei (viola) dai citoplasmici (rosa pallido).

Il fegato a destra mostra un'elevata positività all'endotelina-1 rispetto al fegato a sinistra trattato con l'iloprost.

f. Western Blot

Con la tecnica del Western Blot si è andati a valutare l'espressione del recettore endotelinico A e B.

La figura 29 mostra la presenza dei recettori endotelinici A e B nel fegato dei ratti.

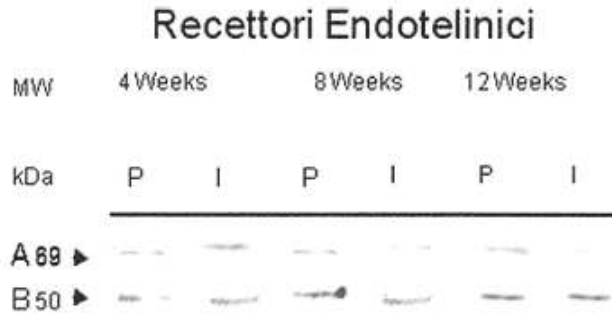


Figura 29. Western Blot di recettori endotelinici

Si nota, in accordo con i risultati ottenuti con la Real Time PCR, la presenza di una forte concentrazione di recettore A per l'endotelina-1 nei ratti trattati con iloprost a 4 settimane ed una elevata diminuzione di questo nei ratti trattati con iloprost a 12 settimane.

Il recettore B invece, essendo fisiologicamente presente in tutte le cellule, lo si trova in tutti i gruppi di animali.

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il processo di fibrogenesi epatica può definirsi come un alterato e perdurante meccanismo di riparazione che si innesca in seguito ad un danno epatico ed esita in un'eccessiva produzione e accumulo di collagene nella matrice extracellulare.

Il fenomeno più rilevante di tale processo è la trasformazione delle cellule stellate epatiche da uno stato quiescente ad uno attivo; le cellule stellate epatiche e, secondo alcuni, anche altre cellule di derivazione dal midollo osseo, cambiano morfologia ed acquisiscono un fenotipo simil-miofibroblastico che le rende capaci di produrre più matrice extracellulare. I miofibroblasti depositano, infatti, eccessive quantità di collagene di tipo I e III nello spazio di Disse; questo processo è favorito anche da una modificazione del rapporto tra MMP e TIMP. L'incrementata sintesi di ET-1, favorisce la vasocostrizione automantenendo in evidente stato di contrazione le neocellule miofibroblastiche e aggrava, quindi, la condizione di ipertensione del microcircolo portale.

Dai lavori pubblicati in letteratura emerge una mole di studi concentrati sulla ricerca di strumenti farmacologici in grado di contrastare la fibrosi epatica.

Da questi studi consegue che la reversibilità della fibrosi epatica in modelli animali è stata studiata in diversi modi:

- cercando di contrastare gli stimoli che determinano il danno cronico, ovvero, cercando di ostacolare il processo infiammatorio che porta all'attivazione delle cellule stellate ed alla loro trasformazione in miofibroblasti e quindi all'incrementato deposito di matrice extracellulare
- cercando di ridurre attraverso un incremento dell'apoptosi la quantità di cellule stellate che si attivano e si trasformano in miofibroblasti

- cercando di rimodulare il bilancio MMP-TIMP in maniera da favorire una corretta degradazione della matrice extracellulare.

Scopo di questa ricerca è stato quello di verificare se l'analogo della prostaciclina (iloprost) era in grado di contrastare gli stimoli che favoriscono lo sviluppo di epatite cronica.

A tal fine si è deciso di procedere secondo due filoni di ricerca, ovvero sperimentando il farmaco in soggetti umani ed animali.

Nel primo filone di ricerca sono stati arruolati 5 soggetti affetti da epatite cronica HCV positiva, documentata istologicamente che sono stati trattati con placebo per due giorni e con iloprost per tre giorni.

Al termine dei tre giorni di trattamento con iloprost, si è notata

- un incremento statisticamente significativo della perfusione portale epatica
- una tendenza alla diminuzione dei valori sierici di alcune citochine senza apprezzabili modificazioni a carico delle altre
- una tendenza al decremento del valore medio di entrambe le principali transaminasi senza peggioramento dei valori della viremia

Il miglioramento della perfusione portale è senza dubbio un effetto interessante dal momento che è noto come nei soggetti con epatopatia cronica in evoluzione cirrotica il flusso portale subisca un decremento.

La tendenza al decremento di alcune citochine sieriche come IL-4, TNF- α , IFN- γ e TGF- β è pure confortante dal momento che esse solitamente incrementano i loro valori sierici in corso di infezione virale cronica e partecipano con un ruolo preminente alla stimolazione ed all'attivazione delle cellule stellate epatiche ed all'arruolamento di altre cellule del sistema immunitario; le cellule stellate epatiche,

poi, potendosi trasformare in miofibroblasti, a loro volta divengono attori principali della induzione della fibrosi epatica e conseguentemente dell'ipertensione portale.

Il secondo filone di ricerca ha voluto verificare gli effetti dell'iloprost in ratti sottoposti ad induzione di danno epatico cronico mediante somministrazione di CCl₄.

Per tale motivo sono stati utilizzati 24 ratti Wistar di sesso maschile. A tutti, attraverso un'iniezione intraperitoneale per due volte alla settimana di una soluzione di CCl₄ e olio di semi, è stato indotto un processo di cirrotizzazione e durante tutta la durata dell'esperimento una parte di ratti è stata alimentata con placebo, mentre l'altra parte è stata trattata con ilprost.

A settimane stabilite sono stati sacrificati e sono stati prelevati sangue e organi a cui sono seguite analisi molecolari, istologiche ed immunoistochimiche.

In questo studio sono state monitorate l'espressione e la quantificazione di alcuni geni: quello del recettore endotelinico A, dell' α -smooth muscle actin e del collagene di tipo I che, in caso di fibrosi aumentano o vengono espressi.

Per determinare la concentrazione del recettore endotelinico A sono state effettuate analisi sia a livello dell'espressione genica che molecolare. Le due tecniche utilizzate (Real Time PCR e Western Blot) hanno fornito risultati equivalenti sui ratti trattati con ilprost e sacrificati alla 12ma settimana. In essi si è riscontrata una diminuzione dell'RNA specifico per il recettore A ed anche una diminuzione dell'espressione di endotelina. Ad ulteriore supporto le tecniche immunoistochimiche e di immunofluorescenza su campioni bioptici hanno dimostrato un decremento dell'endotelina.

Le altre analisi con Real Time PCR riguardanti l'espressione di α -smooth muscle actin hanno dimostrato come la concentrazione di questo marcatore di attivazione

delle cellule stellate epatiche diminuisca con il trascorrere del tempo di trattamento con ilprost, nonostante i valori rimangano elevati.

Una delle caratteristiche principali del processo fibrotico è il cambiamento della composizione della matrice extracellulare con un'aumentata concentrazione di collagene tipo I.

L'analisi del collagene tipo I con la Real Time PCR dimostra una tendenza alla diminuzione dell'espressione di collagene nei ratti trattati con ilprost, a 12 settimane, rispetto a quelli trattati con placebo.

A supporto dei dati esposti in precedenza, anche il dosaggio medio delle transaminasi indica una migliore condizione epatocellulare dei ratti trattati con ilprost rispetto a quelli trattati con placebo.

In conclusione si può dire che questi risultati preliminari ottenuti nello studio umano ed in quello su ratti sono concordi nel dimostrare che l'ilprost potrebbe avere effetti benefici sul fegato in corso di epatopatia.

11. BIBLIOGRAFIA

- Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 2004; 40:255-260.
- Bass NM, Somberg KA. Portal Hypertension and gastrointestinal bleeding. *Gastrointestinal and Liver Disease* (Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds), 1998, 6th edition vol 2, p 1285-1290.
- Bosch J and García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32 (suppl 1): 141-156.
- Burgenson RE. New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:551-577.
- Cappelli R, Bicchi M, Arrigucci S, Boschi S, Guerrini M, Forconi S. Critical ischemia in elderly patients. Evaluation of the effect of two different methods of Iloprost therapy on the efficacy, tolerance, modification of quality of life and self-sufficiency. *Minerva Cardioangiol* 1999; 47:81-88.
- Ceru S, Pancera P, Sansone S, Sfondrini G, Codella O, De Sandre G, Lechi A, Lunardi C. Effects of five-day versus one-day infusion of iloprost on the peripheral microcirculation in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15:381-385.
- Crepaldi Gaetano, Baritussio Aldo. *Trattato di medicina interna*, 2002, "Volume 3.
- Curgunlu A, Vural P, Canbaz M, Erten N, Karan MA, Tascioglu C. Plasma nitrate/nitrite and endothelin-1 in patients with liver cirrhosis. *J Clin Lab Anal* 2005; 19:177-181.

- Del Castillo G, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Bertran E, Fernandez M, Sanchez A, Fabregat I. Autocrine production of TGF- β confers resistance to apoptosis after an epithelial-mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2006; 312:2860-2871.
- Gedik E, Girgin S, Obay BD, Ozturk H, Ozturk H, Buyukbayram H. Iloprost, a prostacyclin (PGI₂) analogue, reduces liver injury in hepatic ischemia–reperfusion in rats. *Acta Chirurgica Brasileira* 2009; 24:226-232.
- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88:125–172.
- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 2010; 7:425–436.
- Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int* 1996; 54:S39-45.
- Jorres A, Dinter H, Topley N, Gahl GM, Frei U, Scholz P. Inhibition of tumour necrosis factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: cellular mechanisms. *Rheumatol Int* 2002; 22:45-51.
- Harada N, Okajima K, Kushimoto S, Isobe H, Tanaka K. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood* 1999; 93:157-164.
- Hoepfer MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M, Fabel H. Long-term treatment of

primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 2000; 342:1866-70.

- Iredale JP, Ramachandran P. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2009; 8:283-291.
- Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. *Eur J Biochem* 1993; 213:815-823.
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatology* 2006; 45:429-438.
- Leslie P. Gartner - James L. Hiatt. *Istologia*. Edizione: III / 2008.
- Liu H, Xiong Z, Sperelakis N. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1411-1421.
- Machherndl S, Kneussl M, Baumgartner H, Schneider B, Petkov V, Schenk P, Lang IM. Long-term treatment of pulmonary hypertension with aerosolized iloprost. *S. Eur Respir J* 2001; 17:8-13.
- Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR- γ in humans. *Mol Genet Metab* 2004; 83:93-102.
- Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferators-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275:35715-35722.
- Ohara N, Futagawa S, Watanabe S, Fukasawa M, Takamori S. Clinical investigation of endothelin-1 and nitric oxide in patients with portal hypertension

focusing on plasma levels and immunohistological staining of liver tissues. *Hepatol Res* 2001;21:40-54.

- Oide H, Tateyama M, Wang XE, Hirose M, Itatsu T, Watanabe S, Ochi R, Sato N. Activated stellate (Ito) cells possess voltage-activated calcium current. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1418:158-64.
- Picardi A, Zardi EM. Teodori, malattie del fegato. *Trattato Italiano di Medicina Interna (Società Editrice Universo)*, 2001 VI Edizione, vol 2, p 1412-1416.
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397-416.
- Purdy KE, Arendshorst WJ: Iloprost inhibits inositol-1,4,5-triphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:19-28.
- Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Annals of Hepatology* 2009; 8: 283-291.
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension *Gut* 2002; 50:571-581.
- Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DE, Burt AD. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45:977-981.
- Rockey DC “The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25:2-5.
- Rockey DC_ Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21:337-349.

- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371: 838–851.
- Scorza R, Rivolta R, Mascagni B, Berruti V, Bazzi S, Castagnone D, Quarto di palo F. Effect of Iloprost infusion on the resistance index of renal vessels of patients with Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 1944-1948.
- Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, Martin GR, Black CM, Abraham D. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 2001; 108:241-250.
- Thimigan MS, Yee HF jr. Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol* 1999; 277:G137-G143.
- Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat *Lab Invest* 1996; 74: 265-278.
- Villeneuve JP, Dagenais M, Huet PM, Roy A, Lapointe R, Marleau D. The hepatic microcirculation in the isolated perfused human liver. *Hepatology* 1996; 23:24-31.
- Zardi EM, Picardi A, Ambrosino G, Serio A, Costantino S, Dobrina A. Hemodynamic effects of a prostacyclin analogue (iloprost) on portal flow volume and velocity and visceral arteries circulation in patients with lower limb arteriopathy. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29:209-213.
- Zardi EM, Picardi A, Fazio VM, Ambrosino G, Dobrina A, Zullo M, Zennaro D, Afeltra A Improved hepatic perfusion after iloprost infusion in patients with HCV chronic infection: a pilot study with possible therapeutic implications. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24:297-300.

- Zardi EM, Picardi A, Ambrosino G, Fazio VM, Dobrina A, Frego M, Afeltra A, Lumachi F. Iloprost enhances portal flow velocity and volume in patients with systemic sclerosis. *In Vivo* 2006; 20:377-380.
- Zardi EM, Dobrina A, Amoroso A, Afeltra A. Prostacyclin in liver disease: a potential therapeutic option. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7:785-790.
- Zardi EM, Dobrina A, Ambrosino G, Margiotta D, Polistina F, Afeltra A. New therapeutic approaches to liver fibrosis: a practicable route? *Curr Med Chem* 2008; 15:1628-1644.
- Zardi EM, Abbate A, Zardi DM, Dobrina A, Margiotta D, Van Tassell BW, Afeltra A, Sanyal AJ. Cirrhotic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:539-549.
- Zardi EM, De Sio I, Ghittoni G, Sadun B, Palmentieri B, Roselli P, Persico M, Caturelli E. Which Clinical and Sonographic Parameters May Be Useful to Discriminate NASH from Steatosis? *J Clin Gastroenterol* 2011; 45:59-63.

12. RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento profondamente sentito al Prof. Aldo Dobrina, per la costante disponibilità mostratami in tanti anni di proficua collaborazione scientifica, per avermi incoraggiato a intraprendere questa esperienza di dottorato estremamente utile, per l'essenziale aiuto fornitomi nell'impostare questa ricerca e per avermi messo in condizione di svolgerla presso il suo Dipartimento, per i suoi consigli scientifici ed umani, sempre molto apprezzati ed, infine, per la sua stimata amicizia.

La mia riconoscenza va anche a tutti coloro che al mio fianco si sono impegnati nelle rispettive sedi universitarie di Roma e Trieste, in reparto, nello stabulario ed in laboratorio per la riuscita di questa ricerca, consentendomi di completare la tesi.

Infine, un pensiero grato a mio padre, fine ricercatore, esempio di metodicità, applicazione, coerenza e professionalità, stimolo costante per i miei studi ed approfondimenti scientifici ed un grazie affettuoso alla mia famiglia da cui ho sempre copiosamente tratto ispirazione ideale e sostegno concreto.