

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Fisiologia Applicata e Fisiopatologia

Ciclo XXIV

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/06

TITOLO TESI

**STUDIO DELLE PROPRIETA' ONCOTICHE
E NON ONCOTICHE DELL'ALBUMINA
NEL PAZIENTE CON CIRROSI EPATICA E
ASCITE**

Presentata da: FEDERICA MIRICI CAPPA

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatori

Prof. Mauro Bernardi

Prof. Paolo Caraceni

Esame finale anno 2012

Indice

Capitolo Primo - Inquadramento del problema clinico.....	1
1. L'albumina	1
1.1. Introduzione	1
1.2. Caratteristiche generali dell'albumina	2
- Struttura	2
- Metabolismo	3
- Funzioni	4
2. La cirrosi epatica	17
2.1. Introduzione	17
2.2. Definizione	17
2.3. Epidemiologia	18
2.4. Eziologia	19
2.5. Storia naturale	19
3. L'albumina nella cirrosi epatica.....	21
3.1. Alterazioni del metabolismo dell'albumina	21
3.2. Presupposti fisiopatologici all'uso razionale	22
3.3 Effetti dell'espansione plasmatica sulla cirrosi.....	25
3.4 Recenti usi terapeutici dell'albumina e prospettive future...	26
Capitolo Secondo - Scopo dello studio.....	28
1. Studio Randomizzato	28
2. Studio di Coorte	30
Capitolo Terzo – Materiali e Metodi	
1. Studio Randomizzato	32
2. Studio di Coorte	37
Capitolo Quarto- Risultati	41

Risultati dello studio randomizzato.....	41
Risultati dello studio di Coorte.....	45
<i>Capitolo Quinto - Discussione</i>	48
Bibliografia	53
Appendice	61
Tabelle	61
Figure	64

Capitolo Primo

INQUADRAMENTO DEL PROBLEMA CLINICO

1. L'ALBUMINA

1.1 Introduzione

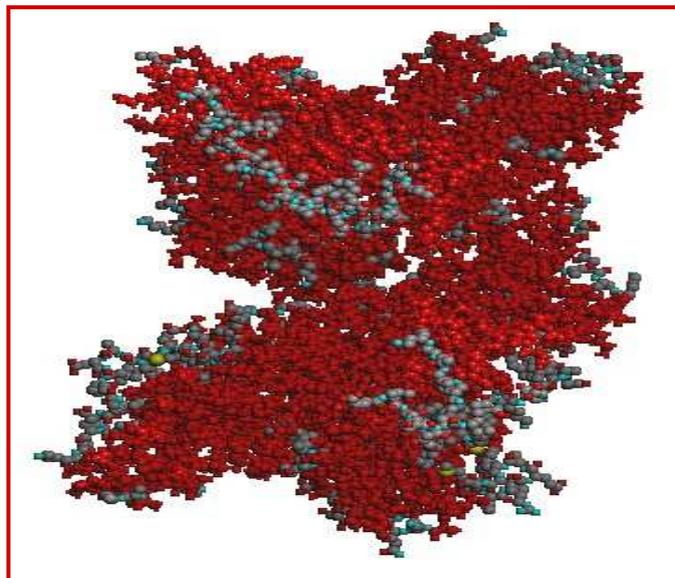
L'albumina è la proteina più abbondante del plasma, ove rappresenta circa il 50% del contenuto proteico (3,5-5 g/L) (1). Essa riveste una grande importanza sia per l'omeostasi fisiologica dell'organismo, sia per le possibili modalità d'impiego clinico, soprattutto nel paziente critico. In campo epatologico, il suo utilizzo a scopi terapeutici risale agli anni '50, quando si attribuiva all'ipoalbuminemia un ruolo preminente nella patogenesi della formazione di ascite attraverso l'alterazione dell'equilibrio tra le forze di Starling nel microcircolo intraepatico conseguente all'iponchia plasmatica (2). Dagli anni '90, a seguito di una maggiore attenzione al rapporto costo/beneficio dei trattamenti medici e grazie alla conoscenza sempre più approfondita dei meccanismi fisiopatologici delle complicanze della cirrosi epatica, si è assistito a una revisione critica dell'utilizzo clinico dell'albumina. Attualmente, se da una parte, è ormai riconosciuto all'albumina un ruolo fondamentale nel rimpiazzo volemico e nell'espansione del volume plasmatico, dall'altra un'attenzione sempre maggiore è rivolta alle proprietà non oncotiche di questa proteina che, in prospettiva, potrebbero allargare le indicazioni alla sua utilizzazione terapeutica (3).

1.2 Caratteristiche generali dell'albumina

- **Struttura**

L'albumina è un peptide di 585 aminoacidi, di dimensioni relativamente contenute (66 KDa) e presenta quattro caratteristiche strutturali di notevole importanza (4):

- 1) la cisteina in posizione 34 contiene un gruppo $-SH$ (tiolo), principale antiossidante extracellulare, in grado di legare anche il nitrossido (NO);
- 2) i domini I e II permettono il legame e il trasporto di numerose molecole, sia endogene sia esogene;
- 3) l'alto grado di ionizzazione consente un'elevata solubilità in acqua, mentre la predominanza di gruppi ionizzabili anionici (COO^-) è responsabile di una carica netta negativa;
- 4) i numerosi residui imidazolici dell'istidina rendono l'albumina un importante tampone dello spazio extravascolare per la capacità di cedere o legare H^+ in base ai valori di pH.



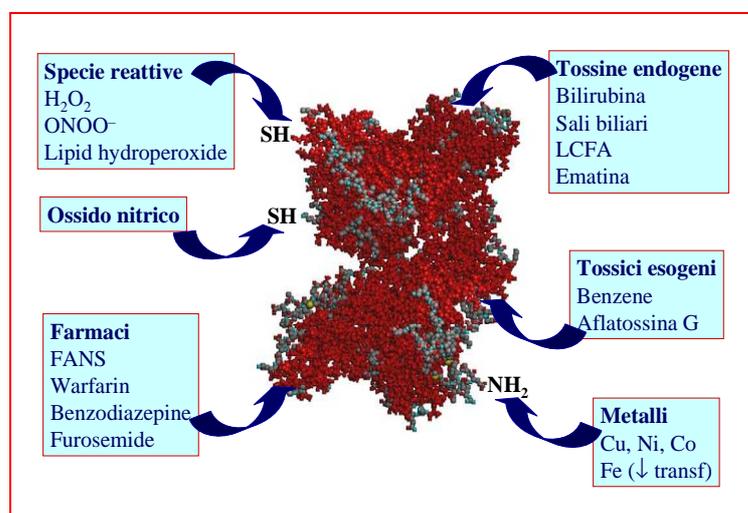
- **Metabolismo**

Il gene che codifica per l'albumina è presente sul cromosoma 4; la *sintesi* è interamente a carico degli epatociti, che la riversano direttamente nel torrente ematico, senza immagazzinarla. In condizioni fisiologiche, la produzione di albumina, pari a 9-12 g/die nell'adulto, impegna solo il 20-30% delle cellule epatiche. Il fegato ha, quindi, una grande riserva funzionale che consente di aumentare la sintesi di albumina di 3-4 volte in caso di necessità. La produzione di albumina è regolata principalmente dall'osmolarità e dalla pressione oncotica del liquido interstiziale dello spazio extravascolare epatico, ma viene anche influenzata da fattori ormonali (ad es. insulina, cortisolo e GH ne aumentano la sintesi) e citochine della fase acuta, come IL-6 e TNF- α , che ne deprimono la trascrizione. Il *catabolismo* è ubiquitario e si svolge a livello degli endoteli vascolari, ad un tasso giornaliero che eguaglia la sintesi epatica ed è influenzato dalle concentrazioni plasmatiche del peptide natriuretico atriale. La concentrazione plasmatica di albumina è di circa 4 g/dl e la sua massa intravascolare è pari a circa 120 g; la concentrazione della proteina nel liquido interstiziale è inferiore (circa 1,4 g/dl) e la sua massa extravascolare è di circa 160 g. Ne consegue che il turnover giornaliero dell'albumina in condizioni normali non supera il 5% della sua massa totale. L'*emivita circolatoria* è pari a 16-18 ore, poiché ogni ora il 4-5% di albumina lascia il compartimento intravascolare (tasso di trasporto transcapillare- TTT_{ab}), per poi ritornarvi tramite il sistema linfatico. L'*emivita complessiva* è prolungata (14-20 giorni).

- **Funzioni**

La funzione principale e meglio studiata dell'albumina è la sua proprietà oncotica, fondamentale per la *stabilizzazione dei volumi intravascolari*. (5) Infatti, per effetto della sua elevata concentrazione e del suo peso molecolare, l'albumina è responsabile di circa il 70% della pressione oncotica del plasma. Questa funzione è dovuta per 2/3 ad un effetto osmotico diretto e per 1/3 all'*effetto di Gibbs-Donnan* (la carica netta fissa negativa conferisce la capacità di trattenere molecole cariche positivamente nel comparto intravascolare). L'albumina possiede anche una serie di proprietà non oncotiche, alcune delle quali stanno suscitando particolare interesse nel campo della ricerca, anche per le possibili implicazioni terapeutiche:

1) *Legame e trasporto di numerose molecole endogene ed esogene*: tali funzioni sono imputabili principalmente ai siti I e II, localizzati in differenti domini della molecola e dotati di affinità di legame differenziali, ma non esclusivi. Le molecole che si legano all'albumina possono tra loro competere nel legame ad un singolo sito oppure possono alterare l'affinità di siti remoti tramite variazioni configurazionali della struttura terziaria della molecola.



Il sito I tende a legare composti eterociclici relativamente grandi o acidi dicarbossilici, mentre il sito II è più piccolo e meno flessibile, presentando proprietà di legame maggiormente stereo-specifiche. La cisteina-34 lega farmaci come il cisplatino, la D-penicillamina e l’N-acetil-cisteina e ioni metallici come Au, Ag e Hg. La porzione N-terminale lega ioni metallici, come Cu, Ni e Co. Inoltre, l’albumina interagisce con il nitrossido (NO), sia endogeno che esogeno, con formazione di S-nitroso HSA addotti. Tale interazione riveste notevole importanza nella regolazione del tono vascolare, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni di sepsi o di aumentata produzione di NO (come si verifica nella cirrosi epatica). Tra le sostanze più fortemente legate vi sono alcuni anioni organici idrofobici, come acidi grassi a catena lunga, bilirubina ed ematina. La bilirubina viene legata a livello dei siti di degradazione dell’emoglobina e trasportata al fegato, dove avviene la coniugazione e la successiva escrezione. Tra le sostanze tossiche esogene neutralizzate dall’albumina vi sono benzene, aflatossina G e il cancerogeno epatico N-sulfoxi-2-acetaminofluorene. Particolare importanza riveste il trasporto di numerosi farmaci come: warfarin, salicilati, furosemide, alcune penicilline (sito I), benzodiazepine, altri FANS come ibuprofene e ketoprofene (sito II), in quanto tale proprietà rende l’albumina in grado di influenzare la farmacocinetica e la farmacodinamica di numerosi farmaci, modulandone gli effetti farmacologici e la tossicità. Ad esempio, il volume di distribuzione di farmaci legati all’albumina può aumentare in stati di ipoalbuminemia, con conseguente riduzione dell’efficacia farmacologica. Infine, l’albumina lega in modo covalente e irreversibile D-glucosio e D-galattosio. La glicosilazione dell’albumina ha effetti sulla sua carica e sembra influenzare la

permeabilità capillare e avere un ruolo importante nella patogenesi delle alterazioni aterosclerotiche nel paziente diabetico.

2) *Azione scavenger dei radicali liberi:* l'albumina è presente normalmente nel plasma in un equilibrio tra forma ossidata e forma ridotta, con predominanza dello stato ridotto, il quale è caratterizzato dalla presenza di un singolo gruppo tiolico (SH sulla cys 34). Tale struttura rende l'albumina la principale fonte extracellulare di gruppi sulfidrilici ridotti (tioli), in grado di interagire e neutralizzare numerose specie reattive potenzialmente dannose. In particolare, grande importanza riveste la capacità dell'albumina di neutralizzare specie reattive dell'ossigeno e del nitrossido, come il perossido di idrogeno e i perossinitriti. Un incremento dei livelli di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e del nitrossido (RNS) rappresenta un fattore implicato nel mantenimento e nella progressione degli stati critici come la sepsi. In queste circostanze, l'albumina sembra mostrare un effetto protettivo, derivante dalla rigenerazione del pool di tioli extracellulari. E' stato infatti osservato sperimentalmente che la somministrazione intravenosa di albumina a pazienti con sepsi si associa ad un incremento dei livelli di tioli nel plasma, incremento che persiste anche dopo che i livelli di albumina plasmatici decadono per effetto del passaggio nell'interstizio. Tale osservazione, che suggerisce l'esistenza di uno scambio di gruppi tiolici tra albumina e molecole contenenti gruppi tiolici ossidati, ha aperto nuovi scenari circa l'utilizzo terapeutico dell'albumina nel paziente critico. In condizioni critiche come la *sepsi*, caratterizzate da un elevato stress ossidativo, conseguente all'esaltata produzione di specie altamente reattive dell'ossigeno e dell'ossido

nitrico, benefici potrebbero derivare dal ripristino del pool di tioli plasmatici, ad azione antiossidante, promosso dalla somministrazione di albumina (6).

L'albumina conferisce protezione dalla perossidazione lipidica, conseguente all'azione di ROS inorganici generati dal sistema enzimatico xantina ossidasi/ipoxantina. Una dimostrazione indiretta del ruolo protettivo nei confronti del danno di membrana da specie altamente reattive dell'ossigeno, scaturisce dall'osservazione indiretta che l'ipoalbuminemia persistente si associa alla perossidazione delle membrane degli eritrociti in pazienti sottoposti ad emodialisi cronica. Infine, studi in vitro suggeriscono un ruolo protettivo nei confronti del danno ossidativo prodotto dall'azione del tetracloruro di carbonio e delle tossine uremiche.

Oltre ad un'azione diretta, che scaturisce dall'avidità di legame con queste specie altamente reattive, la produzione di radicali liberi può essere limitata dall'albumina in modo indiretto, attraverso il legame con ioni metallici di transizione potenzialmente pro-ossidanti, come rame e ferro. In virtù dell'elevata affinità del sito di legame per il rame libero (Cu^{2+}), uno ione in grado di accelerare notevolmente la formazione di radicali liberi, l'albumina limita il danno ossidativo mediato da questo ione metallico nei confronti di altre molecole. Il ferro presenta, invece, un'affinità di legame di molto inferiore. In modo simile, l'albumina può contenere il danno causato dall'accidentale contaminazione biologica di altri ioni metallici, come vanadio, cobalto e nickel. Paradossalmente e comunemente ad altri agenti anti-ossidanti, l'albumina può esercitare *proprietà pro-ossidanti*, attraverso la capacità di provocare la transizione di ioni metallici, come rame e ferro, da stati meno reattivi (Cu^{3+} e Fe^{3+}) a stati più reattivi (Cu^{2+} e

Fe²⁺). Recenti studi, inoltre, suggeriscono che la somministrazione intra-venosa di albumina in condizioni caratterizzate da un'elevata mobilizzazione o da un sovraccarico di ferro sia sconsigliabile.

Nel campo dell'epatologia, vari studi sono stati condotti allo scopo di comprendere la patogenesi del danno che interessa il parenchima epatico, conseguentemente alla ri-perfusione successiva ad un periodo di anossia. Tali studi sembrano suggerire un ruolo preminente dei radicali liberi dell'ossigeno nel danno epatico post-anossico. La ri-perfusione del parenchima epatico, dopo un periodo di anossia di 2-3 ore, si associa, infatti, ad un'aumentata produzione di specie altamente reattive dell'ossigeno da parte di leucociti neutrofili, cellule del Kupffer e cellule endoteliali. La dimostrazione indiretta di tale attività pro-ossidante risiede nel rilievo di un'aumentata chemiluminiscenza. I radicali liberi dell'ossigeno prodotti a questo livello sono responsabili di un danno epatico di entità proporzionale alla formazione di tali specie reattive, come è dimostrato da un aumentato rilascio di LDH e da un aumentato uptake di trypan blu. In questa condizione, l'albumina sembra possedere un ruolo protettivo, derivante dall'azione "scavenger" dei radicali liberi, con preservazione del parenchima epatico dal danno da ri-perfusione (7)

3) *Preservazione dell'integrità capillare:* l'albumina concorre al mantenimento della normale permeabilità capillare a macromolecole e soluti per effetto del legame con la matrice interstiziale e lo spazio sub-endoteliale. Tale funzione, seppur ampiamente riconosciuta, si basa su meccanismi ancora poco chiari. Essa potrebbe derivare dall'elevata carica negativa, con conseguente repulsione elettrostatica di molecole cariche negativamente o da un'azione

meccanica, conseguente all'effetto "occupante spazio". Effetti indiretti sul microcircolo potrebbero essere mediati dal legame con l'acido arachidonico, molecola che incrementa la permeabilità capillare. Inoltre, è stato dimostrato che l'"albumina polinitrossilata" (PNA) è un potente inibitore dell'adesione di neutrofili umani a cellule endoteliali umane colturali (8). Anche se l'influenza di altri liquidi rimpiazzo sulle variazioni di permeabilità del microcircolo non è ancora ben conosciuta, studi sulla permeabilità del letto capillare nell'endotossiemia, sembrano suggerire un ruolo favorevole del rimpiazzo volumico, indipendentemente dalle variazioni della pressione oncotica.

4) *Azione antitrombotica e anticoagulante:* l'azione antitrombotica dell'albumina sembra essere riconducibile alla combinazione tra i gruppi sulfidrilici dell'albumina e l'ossido nitrico, con formazione di gruppi stabili S-nitroso-tiolic, che possiedono un'emivita maggiore rispetto all'NO. Tali addotti, che impediscono la rapida inattivazione dell'NO, esibiscono proprietà vasodilatatorie ed anti-aggreganti, con un meccanismo dipendente dal GMP ciclico. Studi condotti in vitro (9), suggeriscono che tali addotti siano in grado di esercitare funzioni sovrapponibili a quelle esercitate dal fattore di rilassamento derivante dall'endotelio (EDRF): 1. vasodilatazione significativa delle coronarie; 2. incremento del flusso coronario meno pronunciato ma significativo; 3. una vasodilatazione sistemica venosa ed arteriosa; 4. inibizione dose-dipendente delle piastrine. Inoltre, la lunga emivita dei gruppi nitroso-tiolic è responsabile di una maggiore durata d'azione rispetto ad altri vasodilatatori di derivazione dell'NO, come il nitroprussiato di sodio, la nitroglicerina e l'S-nitroso-cisteina.

L'effetto anticoagulante sembra esser dovuto ad un'azione simil-eparinica.

5) *Regolazione dell'equilibrio acido-base:* per la presenza dei 16 residui imidazolici dell'istidina, l'albumina rappresenta il principale tampone extravascolare, proprietà fondamentale per minimizzare effetti potenzialmente dannosi della riduzione del pH in tutte le condizioni in cui deficit energetici cellulari possono determinare un quadro di acidosi lattica (sepsi, insufficienza cardiaca, etc.).

6) *Influenza sui meccanismi dell'infiammazione:* interviene nell'attivazione dei PMN neutrofili e nell'inibizione reversibile di citochine (TNF) e componenti del complemento (C5). E' stato infatti dimostrato che l'albumina umana è in grado di sopprimere il "burst ossidativo" dei neutrofili in risposta all'esposizione a citochine implicate nella patogenesi di condizioni cliniche critiche (TNF) e a componenti del complemento (C5A). (10)

7) *Influenza sui processi di traduzione intracellulare:* tale azione si esplica grazie alla regolazione, permessa dalla modulazione dello stato ossido-riduttivo, dell'attività di molecole implicate nella traduzione dei segnali intracellulari, quali, ad esempio, il fattore nucleare NFkB (11).

L'albumina somministrata al paziente critico incrementa i livelli di tioli nel plasma, anche dopo la sua rimozione dal circolo, avviando la cascata di reazioni ossido-riduttive che influenza i processi di segnalazione intracellulare.

Quindi, l'albumina non è un semplice espansore plasmatico, ma possiede altre proprietà, indipendenti dal suo potere oncotico, la più importante delle quali è la capacità di legare e trasportare molecole insolubili in acqua, come metalli e farmaci; ciò influenza la farmacocinetica, la farmacodinamica e, quindi, l'efficacia dei farmaci, compresi gli antibiotici, oltre a rappresentare un

importante meccanismo di detossificazione di sostanze sia endogene che esogene (3).

Recentemente, Jalan e collaboratori (12) hanno documentato, in un gruppo relativamente piccolo di pazienti con cirrosi epatica, che, in maniera proporzionale al grado di insufficienza epatica, le capacità dell'albumina di legare, trasportare e detossificare appaiono compromesse. Inoltre, i marcatori di ossidazione dell'albumina risultano significativamente aumentati, maggiormente nei pazienti con insufficienza epatica acuta-su-cronica, precipitata, nella maggioranza dei casi, da infezione batterica. Infine, a conferma dell'importanza delle proprietà non oncotiche dell'albumina, queste alterazioni sembrano essere indicatori prognostici di sopravvivenza.

Le proprietà non oncotiche dell'albumina possono essere modificate anche da alterazioni post trascrizionali che tale proteina subisce mentre si trova in circolo. Tali alterazioni sono in grado di alterare la struttura e le funzioni dell'albumina, e sono allo stato attuale di grande interesse scientifico in quanto possono fungere da vero e proprio marker dell'ambiente in cui si trova l'albumina. Tra queste la più studiata è l'albumina modificata dall'ischemia ("*ischaemia-modified albumin*"-*IMA*). Difatti, alterazioni dell'albumina a scapito della regione N-terminale ne diminuiscono le sue capacità antiossidanti, giacché, come detto, l'N-terminale presenta normalmente dei siti di legame per una serie di cationi metallici (tra cui il rame, nichel, calcio, magnesio, zinco, cadmio, mercurio, alluminio, manganese e cobalto), attività che contribuisce al suo potere antiossidante, impedendo a questi ioni di fungere da catalizzatori di reazioni ossidative (13).

Sebbene il meccanismo di questa modifica non sia del tutto compreso, la perdita del legame con il cobalto durante la sindrome coronarica acuta o il danno da I/R può avere rilevanza clinica, essendo già alla base dell' Albumin Cobalt Binding (ACB) test per la valutazione del danno da ischemia miocardica (14). E' probabile che i radicali liberi e altre specie reattive siano coinvolti nelle modifiche alla struttura N-terminale dell'albumina la quale a causa di tali alterazioni perde la sua capacità di legame con il Co^{2+} , portando alla formazione della "ischaemia-modified albumin".

Basandosi sull'osservazione dell'affinità del N-terminale dell'albumina umana per lo ione Co^{2+} che è ridotto in pazienti che presentano un'ischemia del miocardio, il legame del cobalto all'albumina (ACB, Albumin Cobalt Binding) è stato recentemente proposto come test diagnostico rapido per discriminare la sindrome coronarica acuta (ACS, Acute Coronary Syndromes) conclamata, dai pazienti senza ischemia coronarica (15).

In una molecola di albumina umana, la regione N-terminale, composta dalla sequenza NH_2 -Asp-Ala-His-Lys-, si è dimostrata essere un sito di legame forte per gli ioni dei metalli di transizione, come per esempio il cobalto, il rame e il nichel (16).

La modifica del legame sembra avvenire nei minuti seguenti all'evento ischemico, ma i precisi meccanismi che portano alla formazione dell'albumina modificata a causa di un'ischemia (IMA, Ischemia Modified Albumin) non sono ancora ben spiegati. Si è ipotizzato che ciò sia dovuto all'azione dei radicali liberi, all'ipossia, all'acidosi e/o alla distruzione della pompa sodio-potassio (17). Lo studio condotto da Christenson e al., nel 2001 ha dimostrato difatti, che l'analisi

dell'ACB offre un'alta sensibilità e una capacità di predire i risultati negativi o positivi del campione con 6-24 ore di anticipo rispetto alla troponina.

Recentemente la Food and Drug Administration (FDA) nel 2003 ha autorizzato l'introduzione, nei laboratori, del test ACB nelle analisi di routine; esiste infatti in commercio almeno un kit in automatico per il test ACB della ditta Ischemia Technologies (Denver, USA). Il dosaggio della concentrazione di IMA, effettuabile utilizzando il kit commerciale ACB-test, è stato recentemente approvato quale marcatore sierico di ischemia cardiaca dalla FDA negli Stati Uniti. Inoltre, un elevato livello circolante di IMA è stato proposto quale indicatore prognostico di mortalità in pazienti con infarto miocardio ed insufficienza renale (18,19, 20).

Come già accennato, l'albumina è conosciuta essere la maggiore fonte extracellulare gruppi sulfidrilici ridotti, i quali sono dei potenti spazzini di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. L'albumina contiene un totale di 35 residui di cisteina. Trentaquattro di questi sono coinvolti in legami disolfuro intramolecolari, mentre solo la cysteine³⁴ (Cys³⁴) rimane libera (21).

Nel plasma, esistono diverse coppie sulfidrilico/disolfuro compresa la Cys³⁴ dell'albumina. A seconda del suo stato redox, ci sono tre principali specie di albumina: la mercaptalbumina (HMA) con un gruppo tiolico libero sulla cisteina-34, la nonmercaptalbumin-1 (HNA1) con la cisteina vincolata da un legame disolfuro con l'omocisteina o il glutatione, e la nonmercaptalbumin-2 (HNA2) con la cisteina-34 ossidata ad acido sulfinico o solfonico [22]. L'HMA e HNA1 sono in uno scambio dinamico con piccoli composti contenenti tiolo e disolfuri nel sangue [23]. Lo stato di acido sulfenico è stato descritto come un reattivo

intermedio nella formazione della HNA1 [23]. L'albumina contenente acidi sulfinici e acidi solfonici è considerata come irreversibilmente ossidato.

Negli adulti sani, circa 70 -80% del Cys34 dell' albumina contiene un gruppo sulfidrilico libero (HMA), il 20-25% della Cys34 forma un disolfuro con piccoli composti come un'altra cisteina, l'omocisteina e il glutathione (HNA1) e una piccola frazione (2-4%) della Cys34 è altamente ossidato nella forma di acido sulfinico o solfonico (HNA2) (24). Un'altra possibile modifica ossidativa della Cys34 è la nitrosilazione con l'ossido nitrico (NO). Quantità nanomolari di nitroso-albumina sono stati riportati in vivo (24).

Lo stress ossidativo è ritenuto svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'insufficienza epatica acuta-su-cronica (ACLF) (25). Sogami et al. hanno descritto una diminuita quantità relativa di HMA in pazienti con epatopatia di diversa origine rispetto ai controlli sani (26). Ciò è stato confermato da Watanabe et al., il quale ha anche riportato una correlazione positiva tra l'aumento dell'albumina ossidata e la gravità della malattia epatica (27).

Il potenziale redox extracellulare dato dalla coppia redox cisteina/cistina è stato segnalato mantenersi costante e molto importante per la regolazione del funzioni intracellulari (28). Difatti la concentrazione plasmatica di albumina (fino a 700 μM) è di gran lunga superiore alla concentrazione nel plasma sia di cisteina (30-50 μM) sia di glutathione ridotto (Basso range micromolare) (29,30). Tuttavia rimane poco chiaro se il potenziale redox della Cys34 e dei suoi disolfuri può essere regolato o è solo una conseguenza dell'invecchiamento proteico, o se serve come una sorta di serbatoio redox che è in grado di regolare il potenziale redox di piccolo composti sulfidrilici meno concentrati presenti nel plasma.

L'albumina, come principale proteina plasmatica, dovrebbe essere un obiettivo delle modifiche indotte durante lo stress ossidativo. Difatti di recente, è stato segnalato che l'esposizione in vitro dell'albumina a radicali dell'ossigeno porta ad un aumento del contenuto di disolfuri nell'albumina (31). In diverse malattie croniche, come diabete, insufficienza renale, cardiopatia ischemica e cancro, ma anche nella cataratta senile (32), nella chirurgia invasiva (33), e durante l'esercizio fisico intenso (34) e l'invecchiamento (35) la forma ossidata (HNA-1 e -2) dell'albumina può aumentare notevolmente, alterando le attività biologiche della proteina.

L'albumina è quindi a tutti gli effetti un antiossidante circolante, essendo la maggiore fonte extracellulare di gruppi sulfidrilici ridotti, potenti depuratori di ROS (6). La sua forma ossidata, infatti, presenta un'elevata suscettibilità alla digestione con tripsina, un'eliminazione più rapida dalla circolazione rispetto alla forma non ossidata, ed una ridotta capacità di legare altre sostanze, compresa la bilirubina (36). Conseguentemente, sostanze endogene ed esogene, normalmente legate all'albumina, non sono più trasportate al sito fisiologico di utilizzo, ma possono interagire liberamente ed in maniera potenzialmente dannosa con altre molecole.

E' uso comune considerare l'albumina come una componente omogenea rispetto ad altre proteine del siero. Tuttavia, i recenti progressi della chimica delle proteine (Proteomica) e della biologia molecolare hanno dimostrato, come accennato sopra, che l'albumina presenta una sua microeterogeneità, difatti esistono diverse forme dell'albumina con caratteristiche modifiche post-trascrizionali ben caratterizzate, come la forma ossidata (non-mercaptoalbumina-1 e -2) e la forma

ridotta (mercaptoalbumina), oltre che quella glicata (glicalbumina).

Oggigiorno, il significato biologico e le implicazioni cliniche di queste specie molecolari dell'albumina rimangono ancora poco chiare. Inoltre i dati disponibili su ruolo e significato clinico delle proprietà non-oncotiche dell'albumina in corso di cirrosi sono ancora limitati, anche se è stato evidenziato che i pazienti con epatopatia cronica mostrano livelli più bassi di albumina ridotta ed elevati livelli della sua forma ossidata (37).

Nell'attuale scenario clinico, i medici sono interessati solo a considerare se il livello di albumina sierica è alto o basso. In futuro, in pazienti affetti da varie malattie che mostrano un'evoluzione quantitativa dei livelli di albumina, l'analisi qualitativa e quantitativa delle diverse forme di albumina, potrebbe chiarire la cinetica di queste specie molecolari e le loro varie funzioni sia per analisi fisiopatologiche sia diagnostiche, e per la gestione della patologia.

2. LA CIRROSI EPATICA

2.1 Introduzione

Il termine cirrosi fu coniato nel 1819 da René Théophile Hyacinthe Laënnec che riprendendo gli studi di Morgagni e, volgarizzando i termini greci *Skirròs* e *Kirrhòs*, denominò quest'aspetto dell'organo "cirrosi".

In realtà, già nel 1761 Giovanni Battista Morgagni nel suo trattato *De sedibus, et causis morborum per anatomen indagatis* (Libro III, Delle malattie del ventre, Lettera XXXVIII, Dell'Idropisia ascite, della Timpanite, dell'Idropisia del peritoneo e di altre idropisie dette saccate) descriveva per la prima volta la cirrosi epatica come una particolare degenerazione del fegato umano. In alcuni esami anatomici, egli aveva riscontrato un fegato più piccolo e più duro del normale, di colorito giallastro anziché rosso scuro e con una superficie irregolare, formata da noduli più o meno grossi, separati da lamine biancastre.

2.2 Definizione

Ai primi degli anni 80, la cirrosi fu definita come un processo diffuso, caratterizzato dalla fibrosi e dalla conversione della normale architettura epatica in noduli strutturalmente anomali (38). Tale definizione, comunque, non include un'importante alterazione della vascolarizzazione epatica in corso di cirrosi, rappresentata dalla formazione di "shunts" vascolari intraepatici tra vasi epatici afferenti (vena porta e arteria epatica) ed efferenti (vena epatica) (39,40).

Istologicamente, la cirrosi è quindi caratterizzata da setti fibrosi vascolarizzati che uniscono i tratti portalì con altri tratti portalì e/o con le vene centrolobulari,

portando alla formazione di isole di epatociti circondate da setti fibrosi e prive di vena centrolobulare (41).

Le principali conseguenze cliniche della cirrosi sono rappresentate dalla compromissione della funzione epatocitaria, da un aumento delle resistenze intraepatiche, con conseguente ipertensione portale, e dal possibile sviluppo del carcinoma epatocellulare (HCC).

Le anomalie della circolazione sistemica in corso di cirrosi (vasodilatazione splancnica, vasocostrizione e un'ipoperfusione renale, ritenzione di acqua e sodio, aumento della portata cardiaca) sono legate alle alterazioni vascolari epatiche e alla conseguente ipertensione portale. La cirrosi e le distorsioni vascolari ad essa associate, sono tradizionalmente considerate come fenomeni irreversibili, ma recentemente diversi studi suggeriscono la possibilità della loro regressione in particolari circostanze [40,42].

2.3 Epidemiologia

La prevalenza esatta della cirrosi nel mondo non è nota. La prevalenza di cirrosi è stata stimata pari a 0,15% negli Stati Uniti, ed insieme alle epatiti croniche rappresenta la nona causa di morte negli Stati Uniti essendo responsabile di 35.000 decessi ogni anno (43). Simili percentuali, si ritrovano in Europa, mentre risultano ancor più elevate nella maggior parte dei paesi asiatici ed africani, dove l'epatite cronica da virus B e C è molto diffusa.

Ad oggi in Italia, la cirrosi e l'insufficienza epatica cronica sono patologie abbondantemente diffuse, tanto che ogni anno, sono 26.000 i nuovi casi registrati e circa 15.000 sono i decessi ad esse dovuti. La cirrosi rappresenta, infatti, la

seconda causa di morte nella fascia di popolazione italiana compresa tra i 45 ed i 50 anni di età, con una lieve predominanza nei maschi (44)

2.4 Eziologia

I più comuni agenti eziologici della cirrosi sono l'abuso di alcool, l'epatite cronica C e B, l'obesità con concomitante non alcoholic steatohepatitis (NASH), la cirrosi biliare primaria o secondaria, altre malattie autoimmuni, malattie metaboliche, quali quelle da accumulo di ferro e di rame. L'epatopatia alcolica ed l'epatite C sono le cause più comuni nel mondo occidentale, mentre l'epatite B prevale in molte parti dell'Asia e dell'Africa sub-sahariana.

Allo sviluppo della cirrosi spesso contribuiscono più fattori eziologici. Diversi studi epidemiologici hanno permesso di identificare, ad esempio, come fattori di rischio nell'epatite cronica C (45-47), il regolare (moderato) consumo di alcool, un'età superiore a 50 anni, e il genere maschile; mentre fattori di rischio nella NASH sono l'obesità protratta nel tempo, l'insulino-resistenza / diabete di tipo 2, l'ipertensione e l'iperlipidemia (tutte caratteristiche della sindrome metabolica) (48,49).

2.5 Storia naturale

La cirrosi epatica è una malattia ad andamento lento che per molti anni si mantiene in un buon compenso funzionale. Infatti, la storia naturale della cirrosi è generalmente caratterizzata da una prolungata fase asintomatica della malattia, a cui segue la fase di malattia conclamata con le conseguenti complicanze.

La sopravvivenza mediana dal momento della diagnosi di cirrosi compensata è 10-12 anni (50,51) Nel corso di questo periodo, i pazienti devono essere monitorati sullo eventuale sviluppo di complicanze (formazione di ascite, sanguinamento da rottura di varici esofagee, peritonite batterica spontanea, sindrome epato-renale, epatocarcinoma) e di insufficienza epatica.

L'insorgenza di complicanze legate alla cirrosi si verifica nel contesto di un peggioramento dell'ipertensione portale e dell'insufficienza epatica, e definisce il passaggio da uno stato compensato a quello di cirrosi scompensata. La progressione a malattia scompensata è stata stimata in circa il 60% dei pazienti cirrotici a 10 anni dalla diagnosi (51). Queste complicanze hanno un impatto negativo sia sulla qualità della vita sia sulla prognosi del paziente cirrotico (52)

3. L'ALBUMINA NELLA CIRROSI EPATICA

3.1 Alterazioni del metabolismo dell'albumina

Nella maggior parte dei pazienti con cirrosi epatica è presente un'*ipoalbuminemia*, che riconosce, come causa principale, una ridotta sintesi da parte degli epatociti. (53). Per tale ragione, l'albuminemia costituisce un indice di funzionalità epatica universalmente accettato e la riduzione della sua concentrazione plasmatica assume un significato prognostico negativo (53).

Tuttavia, è necessario ricordare che la concentrazione plasmatica di albumina è influenzata, in modo non trascurabile, da altri fattori. Infatti, la ritenzione renale di sodio che si verifica in questi pazienti (54) determina un'espansione del volume plasmatico dell'ordine di circa il 20-25% rispetto al soggetto normale (55); ne consegue che l'ipoalbuminemia è attribuibile ad un meccanismo di emodiluizione per 1/4 - 1/5 della sua entità. Oltre a ciò, diversi studi hanno dimostrato che il TTTalb è aumentato nei pazienti affetti da cirrosi, raggiungendo mediamente valori superiori al 10% della massa albuminica intravascolare (56,57). L'impatto negativo di questa alterazione è attenuato dall'incremento proporzionale del tasso di trasporto dell'albumina dal compartimento peritoneale a quello intravascolare. Tuttavia, questa condizione di equilibrio non viene raggiunta nei pazienti con ascite refrattaria, nei quali l'ipoalbuminemia può essere attribuita anche ad un esaltato TTTalb, specie verso il compartimento peritoneale (57). Inoltre, nei pazienti con cirrosi ad eziologia alcolica, infine, sembra esservi un effetto inibente diretto dell'alcol sulla secrezione dell'albumina, che amplifica gli effetti della

riduzione della sintesi, legata per buona parte ad un deficiente introito nutrizionale di aminoacidi precursori, quali arginina, leucina, isoleucina e valina.

3.2 Presupposti fisiopatologici all'uso razionale dell'albumina

Inizialmente, si era attribuito un ruolo centrale nella genesi del versamento ascitico all'ipoalbuminemia in quanto tale alterazione contribuiva allo squilibrio tra le forze di Starling a livello dei sinusoidi epatici (58). In effetti, una pressione oncotica plasmatica inferiore a 20 mmHg (valori normali compresi tra 25 e 35 mmHg) aumenta notevolmente la probabilità della comparsa di ascite se concomita ipertensione portale (59). Sul piano clinico, valori di albuminemia inferiori a 3 g/dl si associano invariabilmente alla presenza di ascite, che è invece assente con valori superiori a 4 g/dl (60). I risultati di queste ricerche hanno rappresentato il razionale per l'utilizzazione clinica dell'albumina al fine della correzione dell'iponchia plasmatica. Tuttavia, è necessario considerare che il flusso netto di fluidi dal compartimento vascolare a quello interstiziale è regolato non tanto dalla concentrazione intravascolare di albumina, quanto dal suo gradiente transcapillare. Sotto questo profilo, non si è riscontrata una stretta correlazione fra pressione oncotica differenziale plasma/ascite e tasso di formazione del versamento peritoneale. Quindi, l'associazione tra iponchia plasmatica e formazione di ascite non implica necessariamente un ruolo patogenetico diretto dell'ipoalbuminemia, il cui grado potrebbe semplicemente riflettere diversi stadi evolutivi della cirrosi. Negli ultimi due decenni, la migliore comprensione dei meccanismi responsabili della formazione di ascite ha implicato una rivalutazione dell'uso terapeutico dell'albumina. Infatti, *l'ipotesi della*

vasodilatazione arteriosa periferica ha identificato nelle alterazioni dell'emodinamica sistemica e distrettuale la base fisiopatologica dello scompenso ascitico e di altre gravi complicanze della cirrosi (61).

I pazienti con cirrosi in fase avanzata presentano una sindrome circolatoria iperdinamica, caratterizzata dalla caduta delle resistenze vascolari periferiche ed incremento compensatorio della gittata cardiaca, che si esprime sul piano clinico mediante ipotensione arteriosa, tachicardia e celerità dei polsi arteriosi.(62,63) Il *primum movens* della sindrome circolatoria iperdinamica è rappresentato da una vasodilatazione arteriosa, prevalentemente localizzata a carico del distretto vascolare splancnico, di entità tale da inficiare la volemia efficace. Si viene così a creare una condizione di squilibrio tra i principali determinanti dell'integrità della circolazione arteriosa: il sistema vascolare, il volume ematico e la gittata cardiaca. In questa situazione, la difesa del volume extra-cellulare è affidata all'incremento compensatorio della gittata cardiaca che si realizza attraverso l'incremento della frequenza cardiaca e l'espansione del volume ematico totale secondario a ritenzione renale di sodio ed acqua. Nella fase pre-ascitica della malattia, questi meccanismi di compenso risultano efficaci: una volta assicurata l'integrità della circolazione arteriosa, la ritenzione renale di sodio si arresta. Il superamento di tale capacità di compenso coincide con il completo manifestarsi delle alterazioni emodinamiche della sindrome circolatoria iperdinamica prima descritte e con il persistere della sodioritenzione renale. In queste circostanze, si manifestano il versamento ascitico e le altre importanti complicanze della cirrosi riconducibili alle alterazioni emodinamiche, quali la disfunzione circolatoria post-paracentesi

(DCPP) e la sindrome epatorenale (SER) spontanea o scatenata da episodi infettivi quali la peritonite batterica spontanea (PBS) (63,64,65)

La DCPP consiste in una riduzione della volemia efficace, documentata dall'incremento dell'attività reninica plasmatica (PRA), che si verifica a seguito di paracentesi di grande volume. Essa non è reversibile spontaneamente e si associa ad ipotensione arteriosa, compromissione della perfusione renale e ridotta sopravvivenza. Si è a lungo ritenuto che questa complicanza fosse la conseguenza ad una contrazione del volume plasmatico secondaria a rapida riformazione di ascite. Quest'ipotesi non è stata confermata perché si è dimostrato che la paracentesi non induce una riduzione del volume plasmatico né un aumento del trasporto transcapillare di albumina. L'aggravamento dell'ipovolemia efficace consegue, piuttosto, ad un'ulteriore compromissione dello stato emodinamico, attraverso l'accentuazione della vasodilatazione arteriosa (64).

La SER rappresenta l'evoluzione finale delle alterazioni emodinamiche della cirrosi con esaltazione della vasodilatazione arteriosa e contrazione del volume circolante efficace (66). La conseguente esaltata attivazione a fini compensatori dei sistemi vasocostrittori endogeni realizza, infine, una vasocostrizione renale, responsabile del quadro di insufficienza renale. Nei casi di SER insorta durante PBS, il marcato rilascio di citochine pro-infiammatorie (come il TNF- α) e lo sviluppo di una sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) si ripercuotono su un quadro emodinamico già compromesso, causando un' ulteriore riduzione del volume circolante efficace, alla quale contribuiscono le alterazioni della funzionalità cardiaca conseguenti alla cardiomiopatia cirrotica (67)

Alla luce di queste acquisizioni, l'albumina viene oggi utilizzata non in base al tasso di albuminemia, ma per fronteggiare situazioni cliniche caratterizzate da una compromissione grave del volume circolante efficace. Il suo impiego clinico è, quindi, volto ad ottenere un'efficace espansione volumetrica in situazioni acute in cui è necessario preservare il volume circolante efficace e la portata cardiaca (68-70).

3.3 Effetti dell'espansione plasmatica nella cirrosi epatica.

Come si è visto sopra, i pazienti con cirrosi sono caratterizzati da un'espansione del volume ematico totale che risulta, almeno in parte, emodinamicamente inefficace. Oltre alla concomitante vasodilatazione arteriosa, tale inefficacia emodinamica è legata alla sua alterata distribuzione; in particolare, la frazione splancica del volume ematico è significativamente aumentata. Ne consegue che gli effetti dell'espansione plasmatica sono inferiori all'attesa per due ragioni. Da un lato, l'aumento della frazione splancica, particolarmente evidente dei pazienti con spiccata ipertensione portale, fanno sì che l'espansione acuta del volume plasmatico influenzi in misura modesta la volemia centrale e la perfusione renale. Dall'altro, nei pazienti con cirrosi in stadio avanzato, l'esaltazione del fenomeno di shear-stress a livello dei vasi di resistenza vanifica in parte gli effetti dell'espansione volumetrica sulla volemia arteriosa (62) Infatti, le manovre in grado di promuovere un rapido e sostanziale incremento della gittata cardiaca, sono seguite da un'esagerata riduzione delle resistenze vascolari periferiche. Ne consegue che la pressione arteriosa media tende a declinare e gli effetti renali di queste manovre sono scarsi od assenti. Paradigmaticamente, la sindrome

epatorenale, conseguenza estrema delle alterazioni emodinamiche descritte, non è influenzata, per definizione, dall'espansione acuta del volume plasmatico indotta dall'infusione di cristalloidi (71).

Anche se gli studi in questo campo sono pochi, vi è evidenza che l'infusione di albumina, grazie al grande potere oncotico ed all'emivita più prolungata, sia emodinamicamente più efficiente rispetto a cristalloidi e colloidi (72). Inoltre, i vantaggi della sua utilizzazione sono legati ad un minor numero di effetti indesiderati. Infatti, i cristalloidi possono aggravare la ritenzione idrosalina ed indurre acidosi metabolica, mentre i colloidi provocano alterazioni della coagulazione. Infine, l'albumina dotata delle già descritte proprietà non-oncotiche, potrebbe essere dotata di un ulteriore "vantaggio farmacologico" rispetto agli altri espansori plasmatici (70,73).

Nella tabella I, sono schematizzate le principali indicazioni terapeutiche per il corretto uso dell'albumina.

3.4 Recenti utilizzazioni terapeutiche dell'albumina e prospettive future

Come abbiamo ricordato, è verosimile che gli effetti farmacologici dell'albumina non siano legati solamente alla funzione di espansore plasmatico, ma anche al corteo di proprietà non oncotiche che essa possiede, come la capacità di legame e trasporto, l'attività antiossidante, l'azione sulla permeabilità capillare, l'influenza sui meccanismi dell'infiammazione, dell'emostasi e sui processi di traduzione intracellulare e, infine, la capacità tampone sul turnover del nitrossido. Le

funzioni non oncotiche dell'albumina potrebbero rivestire, in particolare, un ruolo terapeutico importante in condizioni cliniche critiche, quali la sepsi.

Queste proprietà sono state sfruttate nelle più recenti applicazioni alla pratica clinica dell'albumina. Un esempio è rappresentato dallo sviluppo di sistemi di emodepurazione extracorporea, quali il “Molecular Adsorbent Recirculating System” (MARS) ed il Prometheus (74,75). Tali sistemi sono basati sull'associazione di una membrana dialitica tradizionale con un secondo circuito dialitico in cui scorre albumina umana al 20% nel caso del MARS o con un secondo filtro contenente albumina nel caso del Prometheus. In entrambe le metodiche, l'obiettivo è di depurare il sangue da sostanze, legate all'albumina od idrosolubili, con azione tossica, come bilirubina, acidi biliari ed ammonio, o vasoattiva, come il nitrossido ed alcune citochine, che si vengono ad accumulare in corso di insufficienza epatica. Oltre alle conseguenze positive derivanti dalla rimozione di molecole tossiche, i primi studi condotti su questi sistemi fanno intravedere importanti e favorevoli ripercussioni sull'emodinamica sistemica attraverso la depurazione di sostanze implicate nella genesi della sindrome circolatoria iperdinamica, come il nitrossido e citochine quali TNF- α e IL-6.

Tali sistemi, disponibili attualmente solo in centri epatologici specializzati e centri trapianto, hanno un potenziale ruolo terapeutico nelle seguenti condizioni cliniche: 1. insufficienza epatica acuta fulminante; 2. insufficienza epatica acuta su epatopatia cronica; 3. disfunzione primaria del fegato trapiantato (“primary graft nonfunction”); 4. insufficienza epatica post-resezione; 5. prurito intrattabile.

Capitolo Secondo

SCOPO DELLO STUDIO

Mentre le varie applicazioni terapeutiche oncologiche dell'albumina sono state ampiamente studiate, ancora poco si sa circa il ruolo della somministrazione di tale molecola nel prevenire o rallentare l'insorgenza dell'ascite refrattaria e il ruolo fisiopatologico che le modificazioni post trascrizionali possono giocare nello sviluppo delle complicazioni della cirrosi epatica.

A questo proposito abbiamo creato uno studio diviso in due sottostudi differenti, ma complementari per il loro patrimonio informativo:

1) 1. STUDIO RANDOMIZZATO PROSPETTICO, MULTICENTRICO

che prevede l'impiego dell'albumina umana a lungo termine per il trattamento dello scompenso ascitico nei pazienti con cirrosi epatica.

Si tratta di uno studio che coinvolge 42 Centri italiani, finanziato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e promosso da tre Società Scientifiche (Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF); Società Italiana di Gastroenterologia (SIGE); Associazione Italiana Gastroenterologi Ospedalieri (AIGO).

Obiettivo di questo studio è stabilire se il trattamento a lungo termine con albumina umana nella cirrosi scompensata è in grado di migliorare la sopravvivenza dei pazienti e comportare una riduzione dell'incidenza di ascite refrattaria e delle altre complicanze legate allo scompenso ascitico (effetti avversi

indotti dalla terapia diuretica, peritonite batterica spontanea, sindrome epatorenale).

Come già detto, infatti, l'ascite complica frequentemente la cirrosi e ha un significato prognostico sfavorevole. Il suo trattamento si basa su dieta iposodica e diuretici, approccio che spesso induce una risposta in tempi prolungati e complicanze (insufficienza renale, iponatremia, ipo- od iperkaliemia, encefalopatia epatica). Circa il 10-20% dei pazienti con ascite diventa ogni anno refrattario al trattamento medico per mancata risposta diuretica o per comparsa di effetti collaterali. L'ascite refrattaria si associa ad un aumento del rischio di gravi complicanze (sindrome epatorenale, peritonite batterica spontanea) e della probabilità di morte. Inoltre, l'ascite refrattaria necessita paracentesi evacuative ripetute, con deterioramento della qualità di vita e frequenti ospedalizzazioni. Oltre l'80% degli specialisti italiani ritiene che l'uso di albumina sia efficace nel trattamento dell'ascite (76).

Come già indicato, la nota 15 dell'AIFA ne prevede l'impiego, sia in specifici contesti nei quali studi controllati ne hanno dimostrato l'utilità (disfunzione circolatoria post-paracentesi; insufficienza renale indotta da peritonite batterica spontanea), sia in caso di "grave ritenzione idrosalina non responsiva a un trattamento diuretico appropriato, specie se associata ad ipoalbuminemia e in particolare a segni clinici di ipovolemia". Tuttavia, il suo impiego in quest'ultimo ambito e, più in generale, nel trattamento dell'ascite è dibattuto. Nell'unico studio controllato (77) condotto in casi di ascite non refrattaria, l'uso di albumina ha migliorato la risposta ai diuretici durante il ricovero e, dopo la dimissione, ridotto la ricorrenza di ascite e le ri-ospedalizzazioni. Il rapporto costo-efficacia, tuttavia,

è stato vantaggioso solo durante il ricovero e non si è ridotta l'incidenza di complicanze o la mortalità. La formazione di ascite è legata a sodioritenzione renale indotta da ipovolemia efficace, a sua volta secondaria a vasodilatazione arteriosa, tale da compromettere la perfusione renale ed attivare sistemi che riducono l'escrezione renale di sodio. Il razionale dell'uso di albumina nella terapia dell'ascite è, quindi, volto non tanto a correggere l'ipoalbuminemia, ma a promuovere come detto nel capitolo primo, un'espansione plasmatica più efficiente rispetto a colloidali e cristalloidi.

Questo studio si propone di verificare se la somministrazione di albumina aumenta la risposta dell'ascite alla terapia standard. In tal caso, le conoscenze così acquisite contribuirebbero a precisare le indicazioni prescrittive dell'albumina, consentendo sia una più appropriata utilizzazione di questo emoderivato nei pazienti con ascite, sia la razionalizzazione dell'impiego delle risorse. Infatti, l'aumento di costo indotto dall'impiego di albumina sarebbe ampiamente compensato dalla riduzione del numero e durata delle ospedalizzazioni, della frequenza delle paracentesi evacuative e, probabilmente, dell'incidenza di sindrome epatorenale e peritonite batterica spontanea.

2) Studio di coorte sulle proprietà non oncotiche dell'albumina, in particolare sull'associazione tra IMA e cirrosi e sulle modificazioni post trascrizionali dell'albumina in corso di cirrosi epatica e delle sue complicanze.

Si tratta di uno studio monocentrico, volto all'analisi di una popolazione di pazienti cirrotici afferenti nel nostro centro.

Gli obiettivi dello studio, sono:

- verificare se le modificazioni post trascrizionali dell'albumina sono associate alle complicanze della cirrosi. Specificatamente, sarà effettuata un'analisi proteomica (78) ed il dosaggio del contenuto plasmatico di Albumina Modificata dall'Ischemia (79).L'analisi proteomica sarà utilizzata anche per verificare se esistono particolari parametri che poi possano essere monitorati nello studio al punto 1.
- mettere a punto la metodica, che poi potrà essere utilizzata per dosare l'IMA anche nei pazienti arruolati nello studio prospettico, randomizzato descritto al punto 1..

Capitolo Terzo

MATERIALI E METODI

1. STUDIO RANDOMIZZATO PROSPETTICO, MULTICENTRICO

Disegno dello studio

La popolazione oggetto dello studio è rappresentata da pazienti con cirrosi epatica e ascite non complicata in terapia diuretica stabile, con almeno 25 mg di furosemoide e 200 mg di antialdosteronico.

Lo studio prevede una popolazione di studio di 440 pazienti in totale (220 per braccio), assegnata a due tipi di trattamento:

- 1) trattamento standard, rappresentato da terapia diuretica standard e dieta iposodica (Na < 90 mmoli, NaCl 5.2 g/die);
- 2) trattamento standard associato alla somministrazione prolungata di albumina umana (alla dose di 40 gr x 2/sett per le prime due settimane, poi 40 gr/sett per tutta la durata dello studio).

L'assegnazione ai due tipi di trattamento è operata mediante randomizzazione centralizzata e stratificata in base a:

- Paracentesi evacuativa effettuate nell'ultimo mese (si; no)
- Iponatremia, quale marcatore affidabile di funzionalità renale (< 135 mmol/L; \geq 135 mmol/L)

Dopo la randomizzazione e l'assegnazione ad uno dei due tipi di trattamento, i pazienti sono sottoposti a controlli clinico-laboratoristici che non si discostano da quanto avviene nella comune pratica clinica, con cadenza mensile.

Lo studio prevede un arruolamento di tipo competitivo fra Centri.

La durata dello studio è 18 mesi dal momento della randomizzazione, mentre la durata del periodo di arruolamento è prevista in 18 mesi.

Criteri di inclusione ed Esclusione

I criteri di inclusione dello studio sono:

- Diagnosi di cirrosi epatica istologica e/o in base ai dati clinici, laboratoristici, ecografici ed endoscopici e ascite non complicata secondo i criteri I.A.C (70).
- Trattamento in corso con diuretici ad un dosaggio pari a 200 mg/die di antialdosteronico ed a 25mg/die di furosemide, stabile per almeno 4 giorni prima dell'arruolamento e che non induce risposta alla terapia (definita secondo i criteri della Ascites International Club come riduzione del peso corporeo \geq 800 grammi nei 4 giorni precedenti l'arruolamento).
- Trattamento in corso con diuretici ad un dosaggio >200 mg/die di antialdosteronico e >25 mg/die di furosemide, indipendentemente dalla risposta alla terapia.
- Esecuzione di EGDS negli ultimi 12 mesi, ecografia addome negli ultimi 30 giorni ed esami di laboratorio, previsti dal protocollo, negli ultimi 7 giorni

I criteri di esclusione sono:

- Età anagrafica inferiore a 18 anni
- Assenza di consenso informato scritto
- Incapacità a fornire consenso informato scritto
- Diagnosi già posta di ascite refrattaria (criteri IAC) (70)
- Necessità di 2 o più paracentesi nell'ultimo mese
- Creatininemia > 1.5 mg/dl
- Sindrome epatorenale tipo 1 negli ultimi 15 gg
- Nefropatia organica (criteri IAC)
- Sanguinamento gastrointestinale negli ultimi 15 gg
- Eradicazione endoscopica in corso in paziente che ha presentato in passato un sanguinamento da varici esofago-gastriche
- Infezione batterica o fungina, compresa la peritonite batterica spontanea (PBS), insorte negli ultimi 7 giorni

- Encefalopatia epatica di grado III-IV
- Sindrome di Budd-Chiari
- TIPS o shunt porto-sistemico chirurgico
- Neoplasia maligna, compreso HCC, attiva nota o sospetta
- Precedente trapianto di fegato
- Abuso etilico attivo (consumo alcolico negli ultimi 3 mesi)
- Paziente affetto da epatite HBV relata che ha iniziato terapia antivirale negli ultimi 6 mesi
- Insufficienza cardiaca
- Insufficienza respiratoria (pO₂ < 60 mmHg in aria ambiente)
- Uso di farmaci sperimentali nei 2 mesi precedenti lo studio
- Il paziente è arruolato in un altro studio clinico interventistico sulla terapia dell'ascite
- Il paziente ha ricevuto albumina per il trattamento dell'ascite negli ultimi 30 giorni
- Ipersensibilità sospetta o certa all'albumina umana
- Gravidanza e allattamento
- Donne potenzialmente fertili, sono escluse a meno che non incontrino uno dei seguenti criteri:
 - Post menopausa per 6 o più mesi e nel caso di post menopausa inferiore a 2 anni, test di gravidanza negativo
 - Sterilizzazione chirurgica da più di 1 mese e test di gravidanza negativo
 - Dispositivi intrauterini in combinazione a un metodo di barriera secondario (es: diaframma, preservativo o spermicida) e test di gravidanza negativo.

Obiettivi dello studio e criteri di interruzione

L'obiettivo primario è stabilire se il trattamento a lungo termine con albumina umana associato al trattamento tradizionale è in grado di migliorare la sopravvivenza dei pazienti. Altri obiettivi sono rappresentati da:

- 1) riduzione dell'incidenza di ascite refrattaria;

- 2) riduzione della necessità di shunt porto-cavale intraepatico transgiugulare (TIPS) in pazienti affetti da cirrosi ed ascite refrattaria (80);
- 3) riduzione dell'incidenza di complicazioni correlate alla malattia e/o all'uso di diuretici;
- 4) miglioramento della qualità della vita;
- 5) miglioramento del profilo costo-beneficio del trattamento della cirrosi ascitica.

I criteri di interruzione dello studio sono rappresentati da :

- Trapianto ortotopico di fegato
- TIPS (shunt intra-epatico porto-sistemico)
- Necessità di 3 o più paracentesi negli ultimi 30 giorni
- Rifiuto del paziente a proseguire nello studio
- Giudizio medico

I pazienti che svilupperanno nel corso dello studio, ascite refrattaria secondo i criteri stabiliti dall'International Ascites Club, che rappresenta uno degli end-point secondari, continueranno ad essere seguiti e trattati secondo quanto previsto dal gruppo terapeutico di appartenenza fino al completamento del periodo di osservazione o al realizzarsi dell'indicazione a TIPS, rappresentata dalla necessità di effettuare almeno 3 paracentesi in 30 giorni. L'esecuzione di trapianto di fegato comporta la cessazione del periodo di osservazione.

Analisi statistica

Calcolo della numerosità del campione (drop-out rate: 0.04 per intervallo di tempo) Ipotesi: mortalità (da ogni causa) pari al 35% nel gruppo di pazienti sottoposti a trattamento standard e pari al 20% nel gruppo di pazienti che riceveranno anche albumina umana. Per stabilire che la differenza di mortalità fra

i due gruppi è statisticamente significativa con una probabilità del 95%, dovranno essere arruolati 210 pazienti per braccio (potere 90%).

Analisi ad interim: sarà effettuata quando il 50 % del totale dei pazienti previsti raggiungerà la fine dello studio.

Valutazione degli end-points primari: sarà effettuata secondo la modalità di intenzione di trattamento. Livello di significatività: 0.05.

Mortalità: sarà valutata in termini sia di differenza di eventi che si verificano nel corso dei 18 mesi di osservazione sia di analisi del tempo di sopravvivenza.

Incidenza di ascite refrattaria: sarà valutata in termini sia di differenza del numero di nuovi casi che si verificano nel corso dei 18 mesi di osservazione sia di analisi del tempo di comparsa.

Differenze fra ed all'interno dei gruppi: confronto mediante test di Fisher o χ^2 per le variabili qualitative: test di Student o ANOVA per le variabili continue. Distribuzione delle variabili valutata con test di Kolmogorov-Smirnov.

Tempo di comparsa di ascite refrattaria e tempo di sopravvivenza: valutazione con metodo di Kaplan-Meier, confrontando le differenze con test log rank a due code.

Fattori di rischio associati alla durata della sopravvivenza ed al tempo di comparsa di ascite refrattaria valutati con regressione di Cox con procedura step-down (tipo backward).

2. STUDIO DI COORTE SULLE PROPRIETÀ NON ONCOTICHE DELL'ALBUMINA

Disegno dello studio

La popolazione oggetto dello studio è rappresentata da pazienti cirrotici con e senza ascite, valutati nella nostra Unità Operativa, nel periodo compreso tra Gennaio e Dicembre 2011.

I soggetti valutati sia in regime ambulatoriale che in regime di ricovero, presentavano, una grande variabilità in termini di stadio della malattia e presenza di complicanze, il che ci ha permesso di avere a disposizione una coorte di individui rappresentativa di tutte le fasi della storia naturale della cirrosi epatica.

Criteri di inclusione ed Esclusione

I criteri di inclusione dello studio sono:

- Diagnosi di cirrosi epatica di qualsiasi eziologia confermata a livello istologico o tramite una combinazione di criteri clinici, biochimici (bassa conta piastrinica, bassi livelli di albumina sierica, elevati valori di bilirubina sierica e/o un aumento dell'INR), ecografici (fegato nodulare) ed endoscopici (presenza di varici esofagee).

I criteri di esclusione sono:

- Età anagrafica inferiore a 18 anni
- Ricovero per eseguire procedura programmata (ad esempio, trattamento per epatocarcinoma, legatura di varici esofagee, ecc.)
- Presenza di epatocarcinoma che non rispetta le caratteristiche richieste dai criteri di Milano (81)

- Pregresso trapianto di fegato
- Trattamento immunosoppressivo in atto.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti all'inclusione sono descritte nella Tabella 2.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo primario è stato valutare le modificazioni post trascrizionali dell'albumina sulla base di due metodiche:

- 1) documentare le modifiche all'estremo N-terminale dell'albumina proveniente dal plasma dei pazienti cirrotici arruolati nel protocollo con diversi stadi di malattia valutando l'albumina modificata dall'ischemia con all'ABC test (Albumin Cobalt Binding) con la metodica descritta da Baghavan et al (79),
- 2) dosaggio dell'IMA-R, rappresentato dal rapporto esistente fra IMA e concentrazione di albumina sierica
- 3) indagare gli spettri di massa dell'albumina e delle modifiche post-trascrizionali che essa può subire, attraverso delle analisi di proteomica in HPLC e al MALDI-TOF.

Metodi

Entro 24 ore dal ricovero sono stati prelevati 20 cc di sangue venoso periferico per le analisi descritte successivamente. I dati clinici ed i principali parametri di laboratorio sono stati inseriti in un database elettronico.

Cinquanta individui sani, comparabili per età e sesso ai pazienti cirrosi, hanno costituito il gruppo di controllo.

Metodo dell'ACB test per la valutazione dell'IMA

In Letteratura si trovano due metodiche per il test ACB: quella descritta da Christenson et al. (2001) e quella descritta da Baghavan et al. (2003). In questo studio, i campioni di plasma sono stati analizzati utilizzando la metodica descritta da Baghavan et al. Il motivo che ci ha spinto a voler sperimentare il test manuale per questo studio è dato dall'alto costo del kit commerciale della ditta Ischemia Technologies (Denver, USA) (3850 euro per 100 test) e dalla sua ridotta stabilità nel tempo (2 settimane).

Nella metodica descritta da Baghavan (79), in breve il campione non viene pretrattato e inizialmente a 200 µl di plasma (in Eparina oppure Siero) si aggiungono 50 µl di cloruro di cobalto (CoCl₂; 1g/L), si miscela e si incuba per 10 minuti. In seguito si aggiungono 50 µl di ditiotreitolo (DTT; 1,5 g/L) e si incuba per 2 minuti; dopodichè si aggiunge 1 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) e si attendono almeno 5 minuti prima di effettuare la lettura. Infine si misura l'assorbanza allo spettrofotometro (Agilent, Regno Unito) a 470 nm. Il bianco viene preparato seguendo la stessa procedura escludendo però il DTT. L'IMA è stata calcolata dalla differenza tra i campioni misurati con e senza DTT. La concentrazione plasmatica di albumina rappresenta uno dei parametri laboratoristici richiesti alla visita di inclusione ma anche monitorato mensilmente. Inoltre è stato calcolato il rapporto tra IMA ed albuminemia (IMAR), in considerazione del fatto che in corso di cirrosi epatica la concentrazione di albumina nel plasma si riduce. Tale indice è stato già utilizzato, come già spiegato nel capitolo precedente, da Jalan et al. in un recente lavoro che correlava in maniera proporzionale l'IMAR al grado d'insufficienza epatica.

Analisi Proteomiche all'HPLC accoppiato all'ESI-qTOF

Il plasma dei volontari sani e dei pazienti cirrotici sono stati analizzati mediante nano cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) (Waters, Milford, MA) accoppiata all'analizzatore quadrupole time-of-flight mass spectrometry con sorgente nano-electrospray ionization (ESI-qTOF MS, Micromass, UK).

Gli spettri di massa riguardanti i picchi sono stati accumulati per minimizzare il rapporto segnale/rumore e, dopo sottrazione del "background" e "smoothing", sono stati sottoposti a "deconvoluzione" per ottenere la massa reale della proteina a partire dai relativi segnali attribuibili agli ioni multi carica, utilizzando MaxEnt 1 (Micromass, UK).

Gli spettri sono stati quindi confrontati qualitativamente utilizzando il valore di massa nominale e l'altezza del picco nello spettro deconvoluto come stima dell'abbondanza relativa delle specie presenti.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando test di comparazione delle medie (student t Test) dopo aver verificato la distribuzione normale dei dati. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$

Le correlazioni sono state studiate con il test di Pearson

Capitolo Quarto

RISULTATI

1. STUDIO RANDOMIZZATO PROSPETTICO, MULTICENTRICO

Questo studio, che è uno studio sperimentale di fase IV e di cui il nostro Centro è Centro Promotore, è stato caratterizzato da una lunga fase perliminare, in cui il lavoro principale è stato quello di coordinare, svolgere e portare a conclusione le pratiche autorizzative e amministrative che ne hanno caratterizzato la fase di inizio, volte a far approvare ai Centri partecipanti il protocollo di studio stesso. L'interazione con i Comitati Etici non è sempre stata facile e il tempo necessario a far approvare il protocollo di studio ai Centri è stato in media di due mesi. Inoltre, anche l'aspetto legato alla fornitura del farmaco albumina e alla modalità di distribuzione fra i Centri, ha richiesto molto tempo ed un'attenta valutazione dei costi. Il Promotore, dopo un lungo lavoro, è riuscito ad ottenere per la fornitura del farmaco oggetto di studio e per il solo trattamento dei pazienti arruolati nel braccio albumina e per le indicazioni al di fuori della nota 15, il supporto delle Aziende Produttrici Esterne del pool albumina. Questo è stato un importante traguardo che ha permesso, secondo noi, la reale fattibilità dello studio.

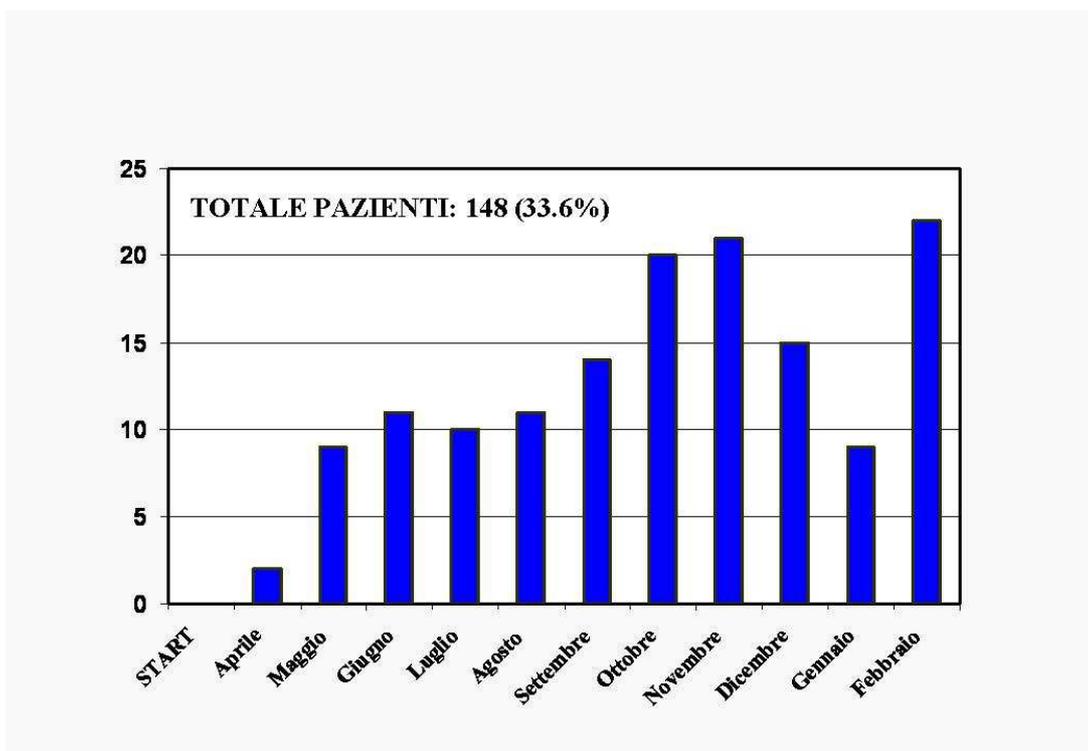
Tale lavoro, che si è svolto nei primi due anni di dottorato se da un lato ha permesso la realizzazione e fattibilità del protocollo, dall'altro ha causato inevitabili ritardi nell'inizio dell'arruolamento.

Inoltre, essendo un protocollo di ricerca realizzato ormai due anni fa, negli ultimi mesi abbiamo apportato, come Centro Promotore dello studio, alcune modifiche

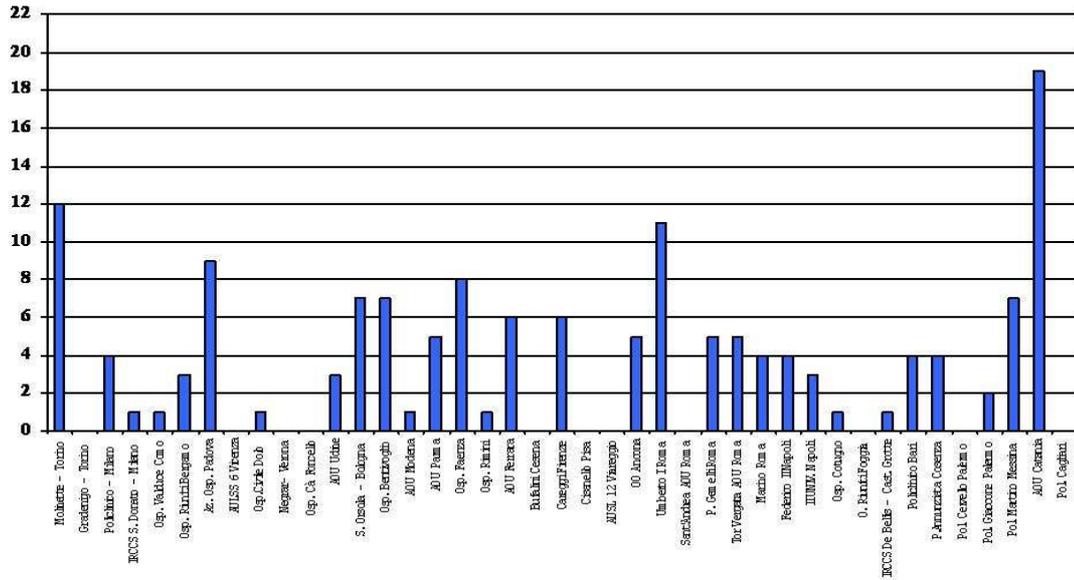
al protocollo necessarie, prima di tutto, ad adeguare il protocollo ai dati emergenti in letteratura dai grandi trials sull'utilizzo del satavaptan per la terapia dei pazienti con cirrosi ed ascite (82), che non erano ovviamente disponibili al momento della stesura del protocollo, ma anche per permettere la conclusione del protocollo entro i tempi previsti dal contratto con AIFA.

Le visite di inizio studio e, quindi, l'attivazione dei Centri rendendoli in grado di arruolare pazienti, si è resa possibile solo a Marzo del 2011. Il primo paziente è stato arruolato ad aprile 2011.

L'andamento dell'arruolamento è stato lento nei primi mesi, per poi mantenersi stabile per i successivi mesi alla media di 15 paziente al mese.



Allo stato attuale, sono stati attivati 41 Centri e 30 sono i centri che hanno arruolato almeno un paziente.



Al momento, sono stati arruolati 148 pazienti, di questi pazienti, 76 sono stati randomizzati nel braccio standard e 72 nel braccio in terapia con albumina.

Sono tutti pazienti che rispettano i criteri di inclusione e che presentano caratteristiche differenti, diverso grado di insufficienza epatica e diverse tipologia di complicanze e gravità di malattia. Questo aspetto ci permette di dire che saremo in grado di poter analizzare una popolazione molto eterogenea di soggetti cirrotici in grado di rappresentare la storia naturale della malattia in tutti i suoi molteplici aspetti. Allo stato attuale non è ampio il numero di pazienti che ha eseguito almeno 6 mesi di visite (circa il 10%) e nessuno a concluso l'anno di arruolamento, per cui i risultati che possiamo fornire non sono assolutamente definitivi, ma possiamo dire che sono incoraggianti.

Non è possibile al momento avere alcuna indicazione sulla sopravvivenza o viceversa mortalità dei due bracci di trattamento, in quanto il tempo medio di follow up, per le ragioni sopra dette, è ridotto a pochi mesi.

I primi dati preliminari, sono rappresentati nello schema sottostante

	DECESSO	DROP OUT	3 paracentesi/ mese TIPS	OLT	RITIRO CI	DECISIONE MEDICA
BRACCIO ALBUMINA	5	3	1	2	0	2
BRACCIO STANDARD	3	0	8	2	1	1

Da questa tabella, si può vedere come emerge in modo più chiaro rispetto agli altri dati, che la popolazione di soggetti randomizzati al braccio standard ha una maggiore tendenza a raggiungere uno degli end point secondari, rappresentato dalla necessità di eseguire tre o più paracentesi/mese.

In questo studio, è prevista un'analisi ad interim, che verrà effettuata solo quando il 50 % del totale dei pazienti previsti raggiungerà la fine dello studio, e speriamo di confermare il trend in miglioramento dei pazienti osservato fino ad ora, nel gruppo in trattamento con l'albumina.

2. STUDIO DI COORTE SULLE PROPRIETÀ NON ONCOTICHE

DELL'ALBUMINA

Sono stati arruolati 118 pazienti con cirrosi epatica, mentre 50 sono gli individui sani che hanno rappresentato il gruppo di controllo e sono stati comparati per età e sesso ai pazienti cirrotici.

2.1 Valutazione modificazioni post trascrizionali mediante analisi proteomica

Il plasma dei pazienti è stato analizzato attraverso delle tecniche di proteomica per cercare di mettere in evidenza altre possibili modificazioni post-trascrizionali dell'albumina associata alla cirrosi o nel corso di infezione batterica.

Dalle analisi proteomiche condotte all'HPLC accoppiato all'ESI-qTOF e dagli spettri ottenuti, è stato possibile osservare che nei pazienti cirrotici esiste un marcato aumento del picco che corrisponde al blocco della cisteina 34 (Cys-34) se paragonato a quello ottenuto nei volontari controlli sani, con conseguente riduzione del potere anti-ossidante attribuibile a tale sito.

Inoltre è stato possibile osservare delle forme di albumina complessate con dei composti che ne aumentano il peso molecolare (glicosilazione, nitrosilazione e forme miste), oltre che la probabile perdita di alcuni amminoacidi (gli ultimi 2-3 AA) dalla porzione N-terminale nelle albumine provenienti dai pazienti cirrotici, giacché sono presenti negli spettri alcune forme troncate di albumina attribuibili a tale modifica, infine sono probabilmente presenti delle forme troncate alla porzione C-terminale (perdita probabilmente di Leucina).

I primi dati emersi dall'analisi degli spettri dell'albumina di pazienti infetti sembra indicare una elevata alterazione a livello della Cys-34.

Dall'analisi dei dati disponibili emergono chiaramente 3 pattern ,visualizzati nella figura 3

1 i soggetti sani

2 i pazienti cirrotici che presentano un picco corrispondente all'albumina ossidata

3 pazienti cirrotici con peritonite batterica spontanea che presentano un picco di albumina con estremo N terminale troncato

2.2 Valutazione delle concentrazioni circolanti dell'IMA

I livelli di IMA nella nostra popolazione di controlli sani risultano confrontabili con quelli descritti in letteratura (nel braccio di controllo in cui erano arruolati controlli sani). Inoltre, l'ACB test eseguito manualmente presenta, sia intra-seduta che inter-seduta, un coefficiente di variazione o deviazione standard relativa (CV) sotto i limiti del 15%, indicando una buona precisione della misura eseguita.

Bisogna però segnalare che si sono riscontrati dei problemi di misurazione nei pazienti che presentavano un valore di bilirubina superiore a 20 mg/dl, che interferisce con la lettura spettrofotometrica dell'ACB test, causando un'elevata lettura pre- con conseguente lettura-post fuori scala. A causa di tale problematica, sono stati esclusi 6 pazienti che presentavano un valore di bilirubina superiori a 20 mg/dl.

I livelli circolanti di IMA risultano significativamente più alti nei pazienti con cirrosi epatica (CH) se confrontati con quelli dei controlli sani (CT), ($0,502 \pm 0,099$ vs $0,396 \pm 0,112$; $p = 0,0001$). (Figura 1A). Anche il rapporto IMAR è

risultato significativamente maggiore nei pazienti con cirrosi epatica (CH) rispetto ai controlli sani (CT) ($0,166 \pm 0,058$ vs $0,088 \pm 0,025$; $p = 0,0001$) (Figure 1B).

I livelli di IMA non correlano con lo score o le classi di Child-Pugh nè con lo score di MELD, mentre è stata riscontrata una correlazione positiva tra IMAR e Child-Pugh score ($p=0,02$). Le concentrazioni plasmatiche di IMA sono risultate significativamente superiori nei pazienti cirrotici che all'inclusione presentavano un'infezione batterica in atto ($n=25$) rispetto ai pazienti non infetti ($0,650 \pm 0,089$ vs $0,448 \pm 0,098$; $p = 0,005$) (Figura 2A). Dati simili si sono avuti anche considerando il rapporto IMAR ($0,286 \pm 0,056$ Vs $0,160 \pm 0,057$; $p = 0,05$) (Figura 2B).

Non sono state, invece, evidenziate differenze significative sulla base della presenza o meno delle principali complicanze cliniche della cirrosi (ittero, ascite, encefalopatia epatica, insufficienza renale) (come riportato in tabella 3).

Infine, l'eziologia della cirrosi non si associa a differenze significative per quanto riguarda i livelli di IMA e il rapporto IMAR.

Capitolo Quinto

DISCUSSIONE

In base alle sue note proprietà oncotiche, l'albumina umana è usata principalmente in ambito clinico per ricostituire il volume circolante in pazienti critici e in quelli con cirrosi epatica avanzata. Tuttavia, l'albumina è più di un semplice espansore plasmatico, in quanto è provvista di molte altre proprietà biologiche, non oncotiche, quali, ad esempio, la capacità di legare e trasportare molecole insolubili in acqua, come metalli e farmaci, il suo potere antiossidante e di detossificazione di sostanze sia endogene che esogene.

Il nostro studio, è stato progettato da un lato per dimostrare che il trattamento in cronico e a lungo termine con albumina umana nei pazienti con cirrosi ed ascite è in grado di ridurre l'incidenza di ascite refrattaria, delle complicanze legate all'uso cronico dei diuretici e i tempi e la ricorrenza delle ospedalizzazioni, dall'altro per determinare se le alterazioni delle proprietà non oncotiche dell'albumina, possono rappresentare degli indicatori di un aumentato rischio di complicanze cliniche e di una prognosi sfavorevole di questi pazienti.

Al momento per quanto riguarda lo studio randomizzato, non è possibile trarre delle conclusioni per i motivi già spiegati, ma il dato più forte che emerge dai primi risultati, è che i pazienti del braccio standard presentano una tendenza maggiore a uscire dallo studio per il raggiungimento di uno degli end point secondari (tre paracentesi/mese), rispetto ai pazienti in trattamento con albumina, anche se bisogna sottolineare che l'arruolamento ed la durata del follow up non

sono tali da permettere di avere dati statisticamente significativi, ma tale risultato è in linea con gli attesi.

Per quanto riguarda lo studio randomizzato, si possono tuttavia fare alcune osservazioni riguardo alle difficoltà incontrate per allestire uno studio così ampio. Nella fase preliminare, dello studio, le interazioni con i Comitati Etici non sono sempre state facili ed in parte questo ha contribuito al ritardo ad ottenere le approvazioni e le delibere autorizzative. Inoltre, anche l'aspetto legato alla fornitura del farmaco albumina e alla modalità di distribuzione fra i Centri, ha richiesto molto tempo ed un'attenta valutazione dei costi. Alle iniziali difficoltà riscontrate al momento della valutazione da parte delle Amministrazioni delle varie Aziende/Enti partecipanti allo studio, ovute agli eventuali costi aggiuntivi legati al farmaco albumina, che secondo le normative degli studi no profit, dovevano essere sostenuti dal SSN, il Promotore ha interagito prima con AIFA e poi con le Aziende produttrici del farmaco albumina per supportare lo studio. Dopo un lungo lavoro, siamo riusciti ad ottenere per la quota di farmaco oggetto di studio e per il solo trattamento dei pazienti arruolati nel braccio albumina e per le indicazioni al di fuori della nota 15, il supporto delle Aziende Produttrici Esterne del pool albumina. Questo è stato un importante traguardo che ha permesso, secondo noi, la reale fattibilità dello studio.

Per quanto riguarda lo studio di coorte, invece, i dati significativi che emergono dall'analisi proteomica sono rappresentati dalle modifiche della porzione N-terminale dell'albumina e dalla presenza di una elevata alterazione a livello della Cys-34 nei pazienti con cirrosi. Mediante l'ACB test, abbiamo dimostrato, inoltre, che nei pazienti con cirrosi sono significativamente più elevati i livelli circolanti

di IMA e anche il rapporto IMAR è risultato significativamente maggiore nei cirrotici, rispetto ai controlli sani.

Inoltre, tali alterazioni, sono risultate essere correlate alle infezioni batteriche. Infatti, questi pazienti presentano una più elevata concentrazione di IMA rispetto a quelli non infetti. In particolare, i soggetti con peritonite batterica spontanea sembrano presentare alterazioni dell'estremo N terminale.

Al momento noi non abbiamo dati per verificare se tali alterazioni siano direttamente coinvolte nella genesi delle complicanze o siano semplici epifenomeni, però possiamo escludere che siano semplicemente dei marcatori di maggior gravità della malattia di base.

Possiamo supporre che pazienti più gravi abbiano un maggior rischio di sviluppare complicanze, ed in particolare, complicanze legate alle infezioni batteriche, ma l'IMA non correla né con il child né con il meld risultando quindi un marcatore di infezione. E' possibile dimostrare che in corso di infezione nel paziente con cirrosi epatica, la riduzione delle capacità antiossidanti e di detossificazione dell'albumina umana può aumentare gli effetti della risposta infiammatoria alle infezioni batteriche e contribuire alla prognosi infausta dei pazienti.

Ricordiamo che le infezioni batteriche sono fra le complicanze più frequenti nei pazienti con cirrosi in stadio avanzato, in quanto sono direttamente responsabili della morte nel 30-50% dei pazienti ospedalizzati.

Peraltro, questi dati sono confrontabili a quelli ottenuti in un modello animale, su ratto, di cirrosi epatica indotta da CCl₄ per via inalatoria, in cui i livelli circolanti di IMA risultano essere più alti se confrontati con quelli dei ratti sani e questo

aumento significativo si mantiene anche dopo somministrazione di LPS nei ratti cirrotici.

Al momento però i numeri ed il disegno dello studio di coorte, non permettono di valutare l'importanza clinica di questo parametro e pertanto, anche per tale motivo, sono necessarie ulteriori conferme che possono venire dall'analisi dei dati che potremmo ottenere alla conclusione dello studio randomizzato, multicentrico in corso.

Infine, l'analisi proteomica ci ha fornito dei risultati incoraggianti, il che ci permetterà di individuare con precisione e quantificare le modifiche responsabili della alterazione post-trascrizionale dell'albumina. Questo, inoltre, ci consentirà di aggiungere potenza prognostica ai classici fattori di rischio clinici. L'altro aspetto innovativo è rappresentato dalla capacità di aver messo a punto un test riproducibile e relativamente economico per quantificare i livelli circolanti di ischemia-modificati albumina (IMA) i livelli, nei pazienti con cirrosi epatica avanzata per il confronto con i classici fattori di rischio clinici e biologici, con efficacia diagnostica paragonabile a quello in commercio attualmente.

Pensiamo che la possibilità di eseguire questa ricerca che coinvolge un ampio numero di pazienti rappresenti un'occasione unica, in quanto si tratta di uno studio prospettico, con un campione di soggetti arruolati di grandi dimensioni e piuttosto eterogeneo in termini di funzionalità epatica e di complicanze legate alla malattia.

In conclusione anche se sono necessarie ulteriori evidenze sperimentali legate soprattutto alla conclusione dello studio randomizzato, si può pensare che la somministrazione in cronico di albumina e lo studio delle alterazioni post

trascrizionali siano elementi chiave per disegnare le terapie del futuro del paziente cirrotico.

BIBLIOGRAFIA

1. Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15: 207-11.
2. Evans TW. Albumina as a drug biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (Suppl 5): 6-11.
3. Quinlan GJ, Marrin GS, Evans TW. Albumin:biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 2005 ; 41 : 1211-19.
4. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology* 1998; 8: 385-401.
5. Evans TW. Review Article: albumin is a drug biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 6-11.
6. Quinlan GJ, Margaron MP, et al. Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clin Sci* 1998; 95: 459-465.
7. Caraceni P, Gasbarrini A et al. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation: scavenging effect of albumin. *Am Phys Society* 1994.
8. Zhang S, Li H, Ma L, et al. Polynitroxyl-albumin (PNA) plus tempol attenuate lung capillary leak elicited by prolonged intestinal ischemia and reperfusion. *Free Radical Biol Med* 2000; 29: 42-50.
9. Keaney JF et al, NO forms an adduct with Serum Albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1582-9

10. Nathan C, Xie QW et al. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43. *J Cell Biol* 1993; 122: 243-56.
11. Cantin AM, Paquette B et al. Albumin mediated regulation of cellular glutathione and nuclear Kappa B activation. *Am J Resp Crit Care Med* 2000 162: 1539-46.
12. Jalan R et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* 2009; 50: 555-64.
13. Sokolowska M, Wszelaka R, et al. Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin. *J Inorg Biochem* 2009; 103:1005-13.
14. Liyan C, Jie Z, et al. Assay of ischemia modified albumin and C reactive protein for early diagnosis of acute coronary syndromes. *J Clin Lab Anal* 2008; 22: 45-49
15. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med.* 2000 Nov;19(4):311-5.
16. Bar-Or et al. An Analog of the Human Albumin N-Terminus (Asp-Ala-His-Lys) Prevents Formation of Copper-Induced Reactive Oxygen Species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001: 284, 856–862
17. Christenson H. R. et al. Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for Assessment of Acute Coronary Syndrome Patients: A Multicenter Study. *Clinical Chemistry* 2001, 47:3 464-470.
18. Lin S, Yokoyama H, Rac VE, Brooks SC. Novel biomarkers in diagnosing cardiac ischemia in the emergency department: A systematic review. *Resuscitation.* 2011 Dec 23.
19. Peters TJ. Ligand binding by albumin. In: all about albumin. *Biochemistry, Genetics and medical applications.* San Diego Academic Press 1996:76-132

20. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:177-84.
21. Peng L, Turesky RJ. Mass spectrometric characterization of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine N-oxidized metabolites bound at Cys34 of human serum albumin. *Chem Res Toxicol*. 2011;24:2004-17.
22. Sogami M, Nagoka S, Era S, et al. Resolution of human mercapt- e non mercaptalbumin by high performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res* 1984:96-103.
23. Hughes WL, Dintzis HM. Crystallization of the mercury dimmers of human and bovine mercaptalbumin. *J Biol Chem* 1964; 39: 845-49.
24. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., Onda, E., and Yoh, M. Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract .*Pathophysiology* 2000; 6, 237–243.
25. Grisham MB; Jourd'heil D, Wink DA. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism implications in DNA damage and mutagenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Supl 1: 3-9.
26. Sogami M, Era S et al. High performance liquid chromatographic studies on non mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. *J Chromatogr*. 1985; 332: 19-27.
27. A. Watanabe, S. Matsuzaki, H. Moriwaki, K. Suzuki, S. Nishiguchi . Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhotics. *Nutrition*, 2004; 20:351–357
28. Jones GD, Martin JI et al. Ligand redox effects in the synthesis, electronic structure and reactivity. *J Am Chem Soc* 2006; 28: 13175-83.
29. Jones, D. P., Mody, V. C., Carlson, J. L., Lynn, M. J., and Sternberg, P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med* . 2002. 33, 1290–1300.

30. Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 481-509.
31. Ogasawara Y, Mukai Y et al. Determination of plasma thiol bound to albumin using affinity chromatography and high performance liquid chromatography with fluorescence detection: ratio of cysteinyl albumin is a possible biomarker of oxidative stress. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Science* 2007; 845: 157-63.
32. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., Onda, E., and Yoh, M. Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract. *Pathophysiology* 2000;6, 237–243.
33. Hayakawa A, Kuwata K, Era S et al. Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 698: 27-33.
34. Imai H, Hayashi T, Negawa T, et al. Strenuous exercise induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol* 2002; 52: 135-40.
35. Era et al., Era, S., Kuwata, K., Imai, H., Nakamura, K., Hayashi, T., and Sogami, M.. Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1247, 12–16.
36. Oetl, K., Stadlbauer, V., Petter, , et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1782, 469–473.
37. E. Meucci, A. Mordente, G.E. Martorana Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 4692–4699
38. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen H, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *Bull World Health Organ* 1977; 55:521–540.
39. Millward-Sadler GH, Hahn EG, Wright R. Cirrhosis: an appraisal. In: Wright R, Millward-Sadler GH, Alberti KGMM, Karran S, editors. *Liver and biliary disease*, 2nd ed. London: Baillière Tindall WB Saunders; 1985; p. 821–860.

40. Desmet VJ, Sciote R, Van Eyken P. Differential diagnosis and prognosis of cirrhosis: role of liver biopsy. *Acta Gastroenterol Belg* 1990; 53:198–208.
41. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371(9615):838-51.
42. Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1599–607.
43. Digestive diseases in the United States: Epidemiology and Impact. NIDDK; Bethesda, MD: 1994. NIH Publication No. 94-1447
44. Commissione Epidemiologia dell'Associazione Italiana per lo studio del fegato (AISF): Epidemiologia delle epatopatie croniche in Italia in Documenti elaborati dalle commissioni scientifiche AISF, Raccolta 1996-2001.
45. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349:825–32.
46. Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, et al. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999; 44:874–80.
47. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, et al. The Dionysos Study Group. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. *Gut* 1997; 41:845–50.
48. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 (3 Suppl 1):S5–10.
49. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1):S99–S112.
50. Gines P, Quintero E, Arroyo V. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987; 7:122–8.
51. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro L, et al. Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1986; 31:468–75.

52. National Center for Health Statistics. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; Hyattsville, MD: 2005; Series 13
53. Salerno F, Borroni G, Moser P, et al. Survival and prognostic factors of cirrhotic patients with ascites: a study of 134 outpatients. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 514-9.
54. Bernardi M, Trevisani F, Colantoni A, et al. Pathophysiology of ascites and hepatorenal syndrome. In: Holstege A, Hahn EG, Schölmerich J, Ed. *Portal Hypertension*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1995, 193-208.
55. Lieberman FL, Reynolds TB. Plasma volume in cirrhosis of the liver: its relation to portal hypertension, ascites, and renal failure. *J Clin Invest* 1967; 46: 1297-308.
56. Henriksen JH, Siemssen O, Krintel JJ, et al. Dynamics of albumin in plasma and ascitic fluid in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 53-60.
57. Salò J, Ginès A, Ginès P, et al. Effect of therapeutic paracentesis on plasma volume and transvascular escape rate of albumin in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 645-653.
58. Henriksen JH, Stage GJ, Schlichtink P, et al. Intraperitoneal pressure: ascitic fluid and splanchnic vascular pressures, and their role in prevention and formation of ascites. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40: 493-502.
59. Witte CL, Witte MH, Dumont AE. Lymph imbalance in the genesis and perpetuation of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* 78: 1059-68.
60. Wood LJ, Colman J, Dudley FJ. The relationship between portal pressure and plasma albumin in the development of cirrhotic ascites. *J Gastroenterol Hepatol* 1987; 2: 525-31.
61. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, et al. Peripheral vasodilatation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis.

62. Martin PY, Gines P, Schrier RW. Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med* 1998 20; 339: 533-41.
63. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994; 20: 1359-63.
64. Ruiz-del-Arbol L, Monescillo A, et al. Paracentesis-induced circulatory dysfunction: mechanism and effect on hepatic hemodynamics in cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 579-86.
65. Fernandez J, Monteagudo J, Bargallo X, et al. A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2005; 42: 627-34.
66. Ortega R, Gines P, Cardenas A, et al. Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: results of prospective, nonrandomized study. *Hepatology* 2002; 36: 941-8.
67. Møller S, Henriksen JH. Cardiovascular complications of cirrhosis. *Gut*. 2008 Feb;57(2):268-78.
68. Ginés A, Fernandez-Esparrach G, Monescillo A, et al. Randomised trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1002-10.
69. Brinch K, Møller S, Bendtsen F, et al. Plasma volume expansion by albumin in cirrhosis. Relation to blood volume distribution, arterial compliance and severity of disease. *J Hepatol* 2003; 39: 24-31.
70. Moore KP, Wong F, Ginés P, Bernardi M, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003; 38: 258-66.
71. Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 1996; 23: 164-76.
72. Ginés A, Fernandez-Esparrach G, Monescillo A, et al. Randomised trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1002-10.

73. Sola-Vera J, Minana J, Ricart E, et al. Randomized trial comparing albumin and saline in the prevention of paracentesis-induced circulatory dysfunction in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology* 2003; 37: 1147-53.
74. Mitzner SR. Extracorporeal liver support-albumin dialysis with the Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS). *Ann Hepatol*. 2011;10 Suppl 1:S21-8.
75. Oettl K, Stadlbauer V, Krisper P, Stauber RE. Effect of extracorporeal liver support by molecular adsorbents recirculating system and Prometheus on redox state of albumin in acute-on-chronic liver failure. *Ther Apher Dial*. 2009;13:431-6.
76. Gentilini P, Bernardi M, Bolondi L, et al. The rationale use of albumin in patients with cirrhosis and ascites. A Delphi study for the attainment of a consensus on prescribing standards. *Dig Liv Dis* 2004; 36: 539-46.
77. Gentilini P, Casini-Raggi V, Di Fiore G, et al. Albumin improves the response to diuretics in patients with cirrhosis and ascites: results of a randomized, controlled trial. *J Hepatol* 1999; 30: 639-45.
78. Foley SF, Sun Y, Zheng TS, Wen D. Picomole-level mapping of protein disulfides by mass spectrometry following partial reduction and alkylation. *Anal Biochem*. 2008;377:95-104.
79. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, Honda SA, Rios CN, Sugiyama CE, Ha CE. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem*. 2003;49(4):581-5.
80. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Eng J Med* 2004; 350: 1646-54.
81. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, Mariani L. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl*. 2011;17:57.
82. Wong F. Management of ascites in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jan;27:11-20

Appendice

TABELLE

Tabella 1. Indicazioni terapeutiche al corretto uso dell'albumina nella cirrosi

L'espansione della volemia efficace rappresenta, quindi, la più importante indicazione attuale all'impiego clinico nel paziente con cirrosi:

- 1) *Prevenzione della disfunzione circolatoria post-paracentesi*: in uno studio clinico controllato, l'albumina, impiegata alla dose di 8 g/L di ascite evacuata, si è dimostrata più efficace di espansori plasmatici artificiali, come destrano 70 e poligelina, nel prevenire la DCP, qualora con la paracentesi venga rimosso un volume di liquido ascitico > 5 L.
- 2) *Trattamento della sindrome epatorenale*: la SER viene distinta in due tipi: il *tipo 1*, rapidamente progressivo, con sopravvivenza mediana di 1.7 settimane, ed il *tipo 2*, caratterizzato da una compromissione lentamente ingravescente della funzione renale associata ad ascite refrattaria, con una sopravvivenza media di 6-12 mesi. Identificando nell'ipovolemia efficace il fattore patogenetico fondamentale di questa complicanza, diversi protocolli di trattamento della SER prevedono l'impiego di vasocostrittori (ornipressina, terlipressina, midodrina + octreotide, noradrenalina) associati alla somministrazione di albumina umana in quantità diverse secondo il protocollo proposto e variabili da 20 a 60 g/die, in modo da mantenere la pressione venosa centrale attorno a 10 mmHg (Tabella 1). In tutti gli studi, si è ottenuto un prolungamento della sopravvivenza e, in alcuni casi, una risoluzione della sindrome. Questo tipo di approccio terapeutico è di fondamentale importanza come provvedimento "ponte" in pazienti inseriti in lista d'attesa per trapianto di fegato.
- 3) *Prevenzione dell'insufficienza renale funzionale in corso di PBS*: la SER si sviluppa nel 30-35% dei casi di PBS e, in questo contesto, comporta un'elevata mortalità ospedaliera. La somministrazione di albumina umana (1,5 g/Kg di peso corporeo alla diagnosi di PBS e 1 g/Kg in 3° giornata), oltre alla terapia antibiotica, a fronte di un numero paragonabile di risoluzioni dell'episodio infettivo, ha ridotto significativamente l'incidenza di insufficienza renale (dal 33 al 10% dei casi), la mortalità intra-ospedaliera (dal 29 al 10%) e quella a tre mesi (dal 41 al 22%). Studi recenti hanno dimostrato che, in questo contesto, l'infusione dell'albumina umana, ma non quella di amido idrossietilico, porta ad un miglioramento della volemia efficace, testimoniato da un incremento della pressione arteriosa e della pressione atriale destra. Tale risultato non è tanto legato ad un incremento della gittata cardiaca, quanto ad una netta elevazione delle resistenze vascolari periferiche, rilievo che suggerisce un possibile effetto sulla funzione endoteliale.

Tabella 2. Caratteristiche demografiche, eziologia della cirrosi epatica e parametri clinici dei soggetti arruolati nello studio

	Controlli Sani (n=50)	Pazienti Cirrotici (n=110)
Età (Anni)	57 ± 9	59 ± 12
Sesso (M/F)	29/21	68/42
Eziologia (Virale/Alcool/Altro)	-	60/23/27
MELD score	-	16,6 ± 7,32 (15 mediana)
Child-Pugh class (A/B/C)	-	22/64/24
Birilubina tot. sierica (0,2-1,0 mg/dl)	-	4,147 ± 5,09262
Creatinina sierica (0,5-1,2 mg/dl)	-	1,1430 ± 0,65392
INR (<1,1)	-	1,5086 ± 0,40790
Ittero all'inclusione (Si/No)	-	7/103
Encefalopatia all'inclusione (Si/No)	-	39/71
Ascite all'inclusione (Si/No)	-	53/57
Infezione al prelievo (Si/No)	-	25/87
Infezione all'inclusione (Si/No)	-	23/87
Beta bloccanti all'inclusione (Si/No)	-	48/62
Profilassi Antibiotica all'inclusione (Si/No)	-	18/92
Diuretici all'inclusione (Si/No)	-	78/32
HSA all'inclusione (Si/No)	-	23/87

Tabella 3. Associazione IMA e IMAR con le complicanze maggiori della cirrosi nella popolazione di studio

	IMA		IMAR	
	Pearson Correlation	Sig. (2-tailed)	Pearson Correlation	Sig. (2-tailed)
MELD score	-0.002	0.982	0.003	0.972
Child-Pugh	0.179	0.063	0.300**	0.02

	IMA		Sig. (2-tailed)	IMAR		Sig. (2-tailed)
Sanguinamento GI	0.544 (N=6)	0.499 (N=104)	N.S.	0.190 (N=6)	0.164 (N=104)	N.S.
Ascite	0.505 (N=54)	0.499 (N=56)	N.S.	0.168 (N=54)	0.164 (N=56)	N.S.
Ittero	0.491 (N=7)	0.507 (N=103)	N.S.	0.157 (N=7)	0.168 (N=103)	N.S.
Encefaloptia epatica	0.490 (N=38)	0.508 (N=72)	N.S.	0.163 (N=38)	0.167 (N=72)	N.S.
Insufficienza renale	0,536 (N=11)	0.504 (N=99)	N.S.	0.168 (N=11)	0.165 (N=99)	N.S.

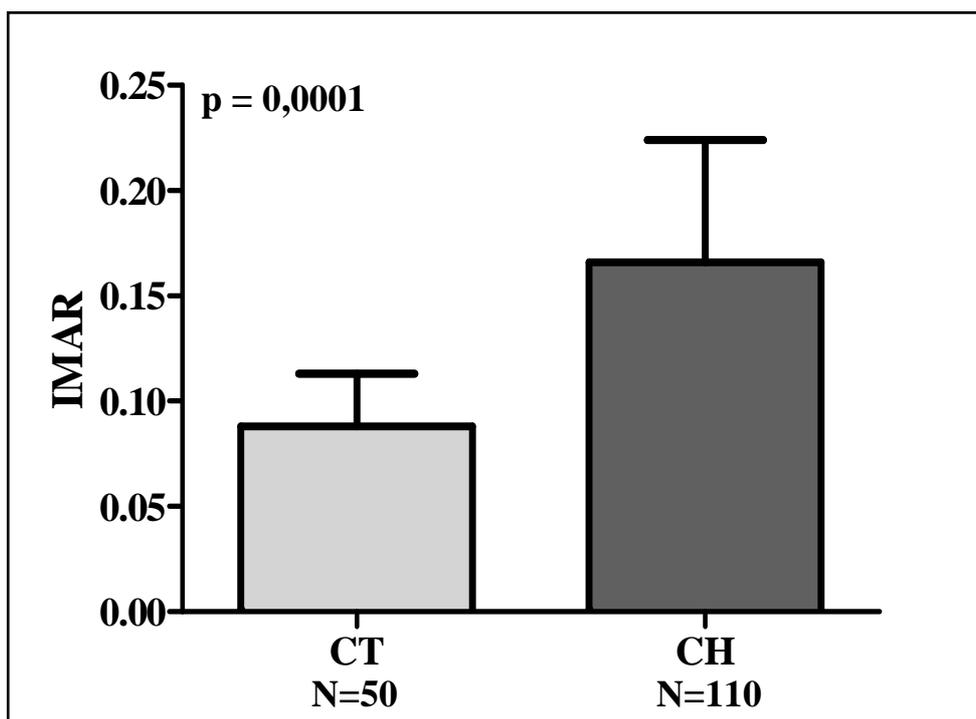
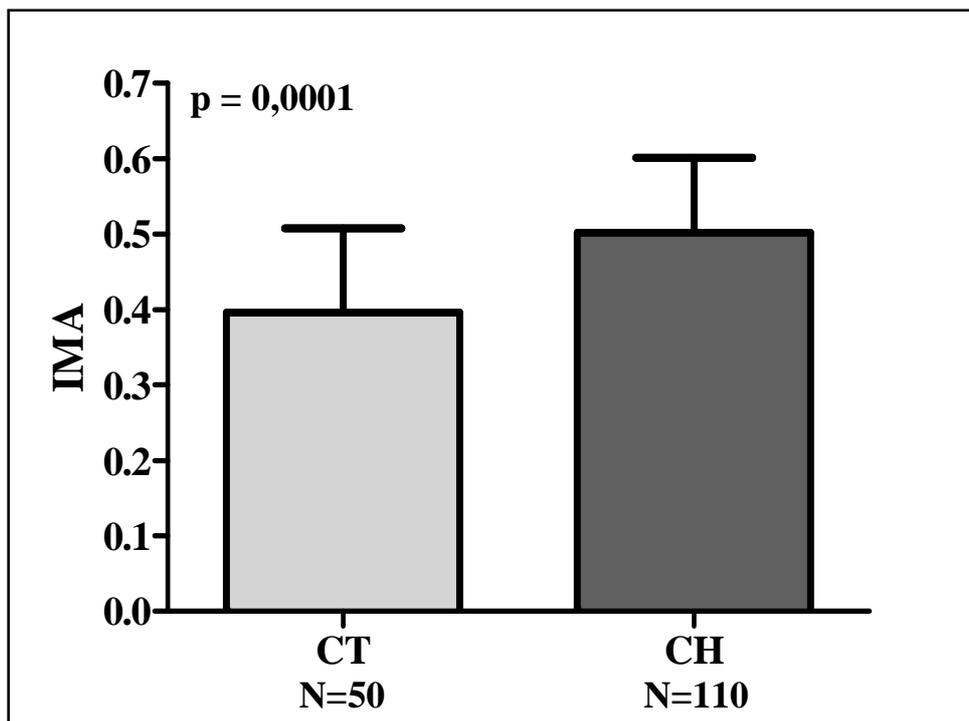


Figura 1. I grafici mostrano, i valori di Ischemia Modified Albumin (IMA), ottenuti con l'Albumin Cobalt Binding (ACB) test (pannello A) e i valori del rapporto IMA/concentrazione plasmatica di albumina (IMAR) (pannello B), in plasma proveniente da volontari sani (CT) e da pazienti cirrotici (CH). I dati sono espressi come media \pm Dev. St.

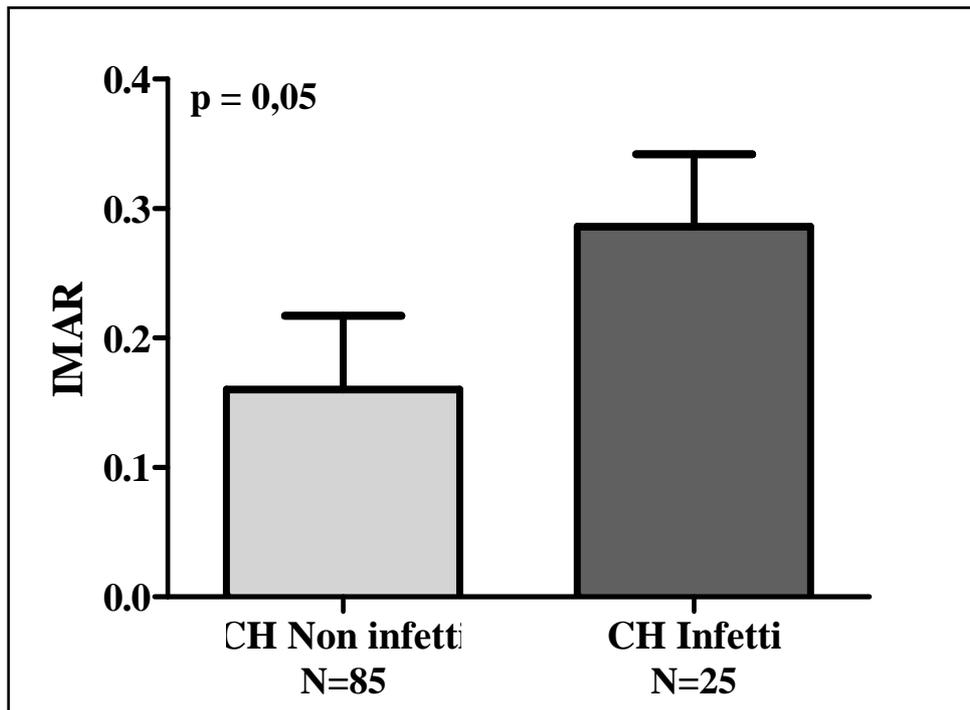
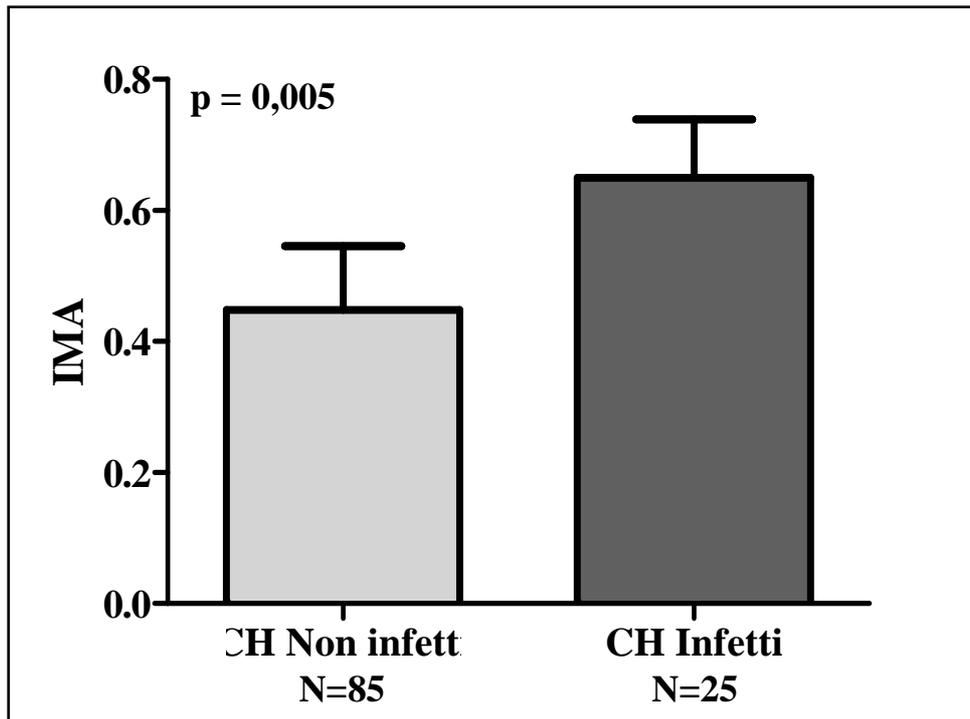


Figura 2. I grafici mostrano, i valori di Ischemia Modified Albumin (IMA), ottenuti con l'Albumin Cobalt Binding (ACB) test (pannello A) e i valori del rapporto IMA/concentrazione plasmatica di albumina (IMAR) (pannello B), in plasma proveniente da pazienti cirrotici non infetti (CH non infetti) e da pazienti cirrotici con un'infezione batterica in atto (CH Infetti). I dati sono espressi come media \pm Dev. St.

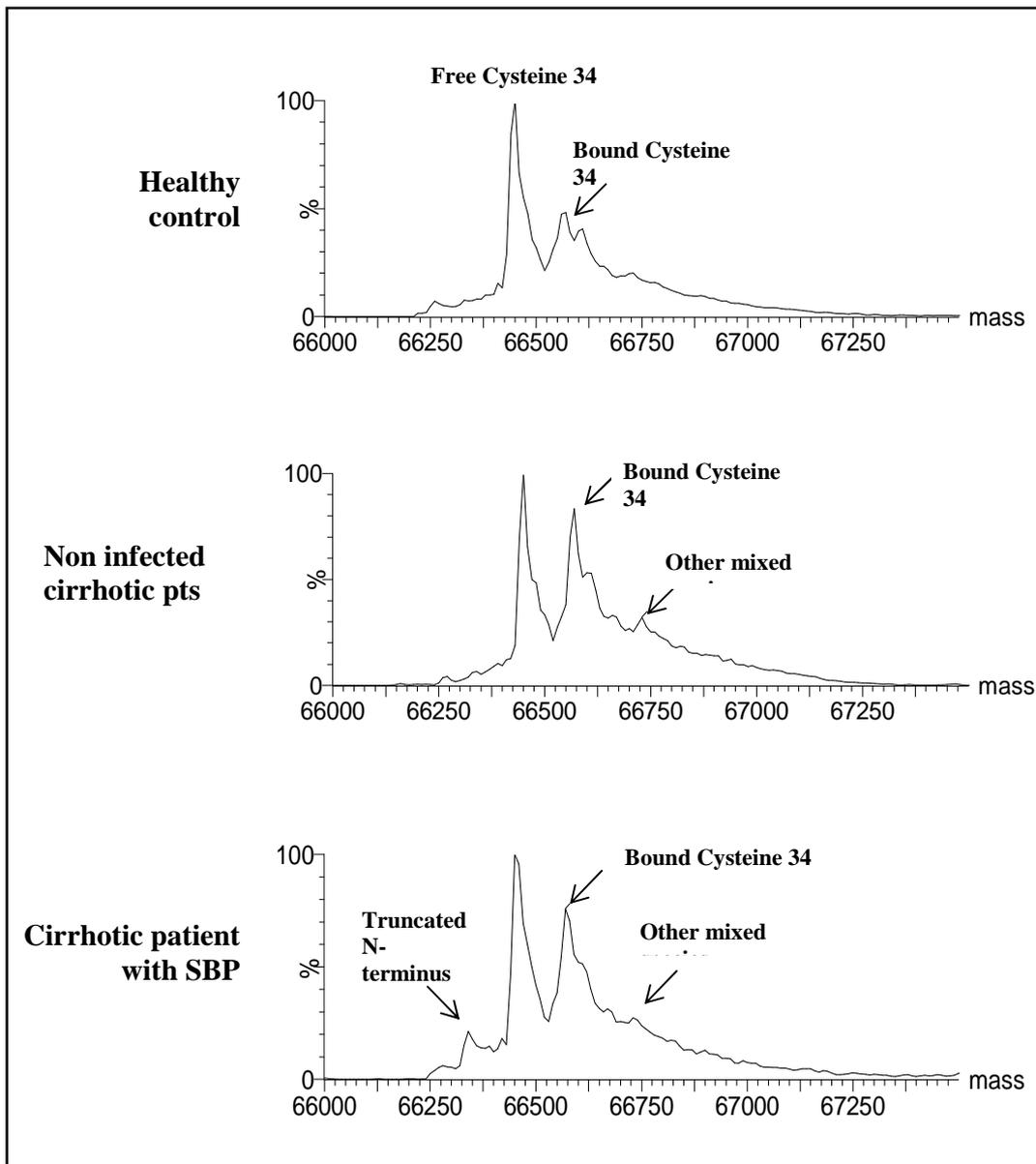


Figura 3. Il grafico mostra gli spettri dell'albumina in soggetti sani, i soggetti sani, in pazienti cirrotici che presentano un picco corrispondente all'albumina ossidata, in pazienti cirrotici con peritonite batterica spontanea che presentano un picco di albumina con estremo N terminale troncato.