

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche Progetto n°3: Fisiologia Applicata e Fisiopatologia

Ciclo XXV

Settore concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore scientifico-disciplinare: MED/09

TITOLO TESI

**IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI NELLA
CIRROSI EPATICA COMPLICATA DA INFEZIONE
BATTERICA: STUDIO NELL’UOMO ED IN UN
MODELLO SPERIMENTALE ANIMALE**

Presentata da: DOTT. MAURIZIO BALDASSARRE

Coordinatore Dottorato

Prof. Mauro Bernardi

Relatore

Prof. Mauro Bernardi

Correlatore

Prof. Paolo Caraceni

Esame finale anno 2013

Indice

CAPITOLO PRIMO - INQUADRAMENTO DEL PROBLEMA CLINICO.....	1
1. IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI	1
1.1. ANANDAMIDE	3
1.2. 2-ARACHIDONOILGLICEROLO	5
1.3. N-PALMITOILETANOLAMIDE E N-OLEOILETANOLAMIDE	6
1.4. RECETTORI PER GLI ENDOCANNABINOIDI.....	7
2. IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI E IL FEGATO.....	9
2.1. ENDOCANNABINOIDI ED IPERTENSIONE PORTALE.....	11
2.2. ENDOCANNABINOIDI E SINDROME CIRCOLATORIA IPERDINAMICA	14
2.3. ENDOCANNABINOIDI E SCOMPENSO ASCITICO	16
2.4. ENDOCANNABINOIDI ED ENCEFALOPATIA EPATICA	18
2.5. ENDOCANNABINOIDI E INFEZIONI BATTERICHE	19
CAPITOLO SECONDO - SCOPO DELLO STUDIO	22
1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	22
2. PROTOCOLLO CLINICO.....	23
CAPITOLO TERZO - MATERIALI.....	24
1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	24
1.1. ANIMALI DA ESPERIMENTO	24
1.2. INDUZIONE DELLA CIRROSI EPATICA	25
1.3. TEST DA SOVRACCARICO SALINO	26

1.4. DISEGNO DELLO STUDIO	28
2. PROTOCOLLO CLINICO.....	31
2.1 DISEGNO DELLO STUDIO.....	31
CAPITOLO QUARTO - METODI	33
1. PRELIEVO DEI CAMPIONI.....	33
1.2. PROTOCOLLO SPERIMENTALE.....	33
1.2. PROTOCOLLO CLINICO	34
1.3. PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI EMATICI	34
2. ANALISI BIOMOLECOLARI.....	34
2.1. ESTRAZIONE DELL'RNA	34
2.2. RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA.....	38
2.3. REAL-TIME PCR	39
3. DOSAGGIO DEGLI ENDOCANNABINOIDI CIRCOLANTI	41
3.1. ESTRAZIONE DELLA FASE LIPIDICA	41
3.2. FASE ANALITICA	42
4. ANALISI STATISTICA	42
CAPITOLO QUINTO - RISULTATI	44
1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	44
1.1 IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI VIENE ATTIVATO DALL'ESPOSIZIONE AD LPS IN CORSO DI CIRROSI EPATICA.....	44
1.2. LA SOMMINISTRAZIONE DI RIMONABANT AUMENTA LA SOPRAVVIVENZA A 24 ORE DI RATTI CIRROTTICI TRATTATI CON UNA DOSE LETALE DI LPS.	45
1.3. LA SOMMINISTRAZIONE DI LPS MODULA L'ESPRESSIONE GENICA EPATICA DEGLI ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO DEI NAE.	45
1.4. LA SOMMINISTRAZIONE DI UNA SINGOLA DOSE DI RIMONABANT MODULA L'ESPRESSIONE GENICA EPATICA DI CITOCHINE PRO-Infiammatorie e molecole vasoattive.	46
2. PROTOCOLLO CLINICO.....	47
2.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE	47

2.2. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI DEMOGRAFICI ED ANTROPOMETRICI NEI VOLONTARI NON CIRROTICI	47
2.3. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI DEMOGRAFICI ED ANTROPOMETRICI NEI PAZIENTI CIRROTICI	48
2.4. CONFRONTO TRA LE CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DI EC DEI VOLONTARI NON CIRROTICI E PAZIENTI CIRROTICI.	48
2.5. TRASFORMAZIONE DELLE VARIABILI OGGETTO DELLO STUDIO.....	49
2.6. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E GRADO DELLA MALATTIA.....	49
2.7. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI EMODINAMICI.	50
2.8. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PRESENZA DELLE PRINCIPALI COMPLICANZE DELLA CIRROSI.	50
2.9. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E SOPRAVVIVENZA AD UN ANNO.....	52
CAPITOLO SESTO - DISCUSSIONE	54
1. LO STUDIO NEL MODELLO ANIMALE	54
2. LO STUDIO CLINICO.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	68
APPENDICE I - FIGURE	83
APPENDICE II - TABELLE	91

Capitolo Primo

INQUADRAMENTO DEL PROBLEMA CLINICO

1. IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI

Le proprietà antiemetiche, analgesiche e stimolanti l'appetito della Cannabis Sativa erano già note numerosi secoli fa alla medicina Orientale. Nella società occidentale tuttavia la marijuana è stata conosciuta principalmente per la sua capacità di alterare la percezione sensoriale e causare euforia. Il principale componente psicoattivo della Cannabis Sativa è il Delta-9-Tetraidrocannabinolo (THC), isolato nel 1967 da Mechoulam R. e colleghi [1]. Successivamente nel 1988 fu identificata nel cervello di ratto la prima molecola recettoriale in grado di interagire con i cannabinoidi [2] e successivamente, nel 1991, fu definitivamente clonato il recettore CB1 degli endocannabinoidi nel cervello umano [3], aprendo, di fatto, la strada allo studio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti analgesici dei cannabinoidi e all'individuazione di ligandi endogeni. A distanza di un anno fu, infatti, individuata la prima molecola endogena in grado di interagire con il recettore per i cannabinoidi, l'Arachidonoiletanolamide, successivamente chiamato Anandamide (AEA) [4]. Tali scoperte furono seguite in rapida successione dall'individuazione a livello periferico

di un secondo recettore per gli endocannabinoidi [5], il CB2, e di una nuova molecola endogena, il 2-arachidonoiletanolamide (2-AG), capace di legare ed attivare i recettori per i cannabinoidi [6]. Parallelamente alla caratterizzazione delle molecole recettoriali e non, appartenenti al sistema degli endocannabinoidi (EC), la comunità scientifica negli stessi anni si occupava anche dell'individuazione di composti sintetici, con potenzialità terapeutiche, in grado di modulare il sistema stesso. Nel 1994 fu, infatti, sintetizzato il primo antagonista selettivo del recettore CB1, l'SR141716, inizialmente usato nello studio delle implicazioni fisiologiche del recettore CB1, e successivamente, a seguito della scoperta delle sue proprietà anoressizzanti, commercializzato con il nome di Rimonabant, per il trattamento dell'obesità [7].

Più recente è la scoperta di molecole con azione simile a quella degli endocannabinoidi, non definiti tuttavia endocannabinoidi in quanto incapaci di interagire con i recettori CB1 e CB2. Tali molecole, l'N-palmitoil-etanolamina (PEA) e l'N-oleil-etanolamina (OEA), condividono con l'AEA gli stessi meccanismi di sintesi e degradazione tuttavia non interagiscono con i recettori CB ma con altre molecole recettoriali, nello specifico il Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α e, nel caso dell'OEA, il TRPV1 [8-10].

1.1. ANANDAMIDE

L'Anandamide (AEA) fa parte della classe di molecole definite N-acetiletanolamidi (NAE) ed è stato il primo endocannabinoide a essere isolato [4]. Come il 2-AG, anche l'AEA è un derivato dell'Acido Arachidonico e funge da agonista per il recettore CB1 mentre mostra una ridotta affinità per il recettore CB2.

Essendo una molecola altamente lipofila l'AEA non può essere immagazzinata in vescicole, di conseguenza il controllo della sua azione viene effettuato mediante una fine regolazione dei processi di sintesi, rilascio e degradazione [11]. Stimoli quali una depolarizzazione della membrana, un'attivazione recettoriale o un aumento degli ioni Ca^{2+} danno inizio alle reazioni enzimatiche che portano al rilascio di AEA. Nello specifico l'enzima N-acetil-transferasi, un enzima Ca^{2+} e cAMP dipendente, catalizza la formazione di N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina (NAPE) a partire dalla fosfatidil-ethanolamina e da un fosfolipide contenente il gruppo acile dell'acido arachidonico. Il NAPE viene successivamente clivato in una reazione catalizzata da una specifica fosfolipasi D (NAPE-PLD), una β -idrossilasi appartenente alla famiglia delle zinco-metallo idrolasi, con rilascio di AEA ed acido fosfatidico [12]. Una volta rilasciata nel citosol, specifici trasportatori di membrana (Endocannabinoids Membrane Transporter – EMT) mediano sia il rilascio che il re-uptake di AEA dal comparto extracellulare [13]. La degradazione dell'AEA avviene nel comparto intracellulare per opera dell'enzima microsomiale Fatty Acid Amide Hydrolase

(FAAH), il quale agisce a livello delle membrane intracellulare e rilascia acido arachidonico ed etanolamina.

L'AEA è in grado di attivare il signaling attraverso i recettori CB1 e CB2, mostrando tuttavia una maggiore affinità per il recettore CB1. L'AEA può inoltre attivare il Transient Receptor Potential Vanilloid type-1 (TRPV1), legando il suo dominio intracellulare, mentre più controversa l'interazione con il GPR55, un recettore orfano accoppiato ad una proteina g [13] (Figura 1).

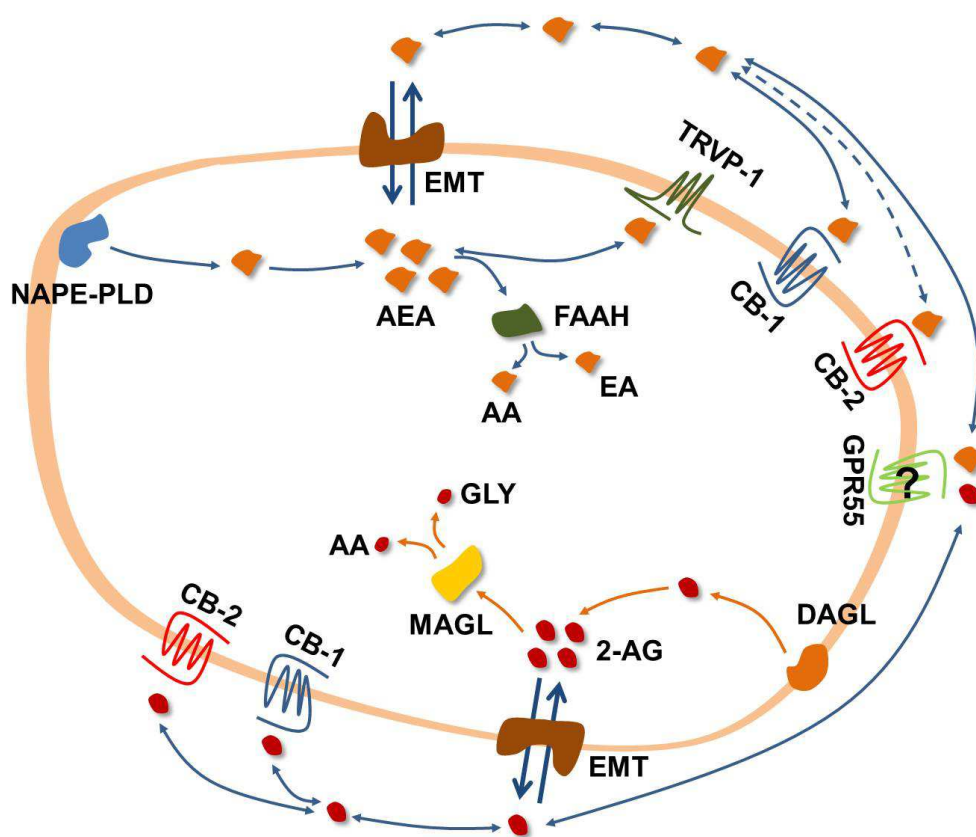


Figura 1. Rappresentazione schematica del metabolismo dei due principali endocannabinoidi AEA e 2-AG, e loro target recettoriali

1.2. 2-ARACHIDONOILGLICEROLO

Il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) è l'esponente più importante e maggiormente studiato della famiglia dei Monoacil-gliceroli (MAG). La sintesi di 2-AG avviene a partire da precursori fosfolipidici di membrana ad opera dell'enzima Diacilglicerolo lipasi (DAGL) in una reazione enzimatica ed enantioselettiva. Il fosfatidil-inositolo, abbondante nelle membrane, è idrolizzato per opera di una fosfolipasi C con formazione di diacilglicerolo (DAG), quest'ultimo è convertito in 2-AG dall'enzima specifico DAGL. I diacilgliceroli, precursori biosintetici del 2-AG, possono inoltre derivare sia dall'idrolisi del fosfatidilinositolo ad opera di una fosfolipasi C, che dall'idrolisi di acido fosfatidico catalizzata da una specifica fosfoidrolasi [14]. Come l'AEA, anche il 2-AG viene veicolato attraverso la membrana plasmatica da specifici trasportatori (EMT), pertanto, una volta attivato il recettore, esso viene ri-captato dalla cellula ed inattivato ad opera dell'enzima Monoacilglicerolo Lipasi (MAGL) con rilascio di Acido Arachidonico e glicerolo [13].

I target recettoriali del 2-AG sono rappresentati dal CB1 e CB2, a differenza dell'AEA esso presenta un'uguale affinità per i due recettori. Come l'AEA anche il 2-AG è in grado di interagire con altre molecole recettoriali quali il GPR55 [13], la cui attivazione scatena una risposta antiinfiammatoria e vasomotoria [14] (Figura 1).

1.3. N-PALMITOILETANOLAMIDE E N-OLEOILETANOLAMIDE

Di più recente scoperta sono molecole endogene simili agli endocannabinoidi ma incapaci di interagire con i canonici recettori CB1 e CB2, esse sono l'N-palmitoiletanolamide (PEA) e l'N-oleoiletanolamide (OEA), sono più abbondanti nei tessuti rispetto a all'AEA e scatenano la loro risposta biologica interagendo con recettori non-CB1 e non-CB2 [15]. Tali molecole, come l'AEA, fanno parte della famiglia delle N-acetiletanolamidi (NAE), condividono, infatti, con l'AEA la via biosintetica, derivano da precursori molto simili al NAPE, l'N-acil-fosfatidiletanolamina, inoltre come l'AEA sono anch'essi degradati dal FAAH.

Tra gli effetti sperimentalmente dimostrati dell'OEA ricordiamo la capacità di ridurre l'introito alimentare, ridurre il peso corporeo e modulare il metabolismo lipidico e degli zuccheri. Tali azioni derivano dall'interazione con molecole recettoriali quali il TRVP-1 ed il PPAR- α [16], non è ancora del tutto stata dimostrata la capacità di attivare il GPR55 [17].

Il PEA sembra svolgere un'azione antiinfiammatoria attraverso meccanismi molecolari che coinvolgono l'interazione con i recettori PPAR- α , con effetto tipicamente analgesico ed antiinfiammatorio, e GPR55 [18], o, attraverso un'inibizione dell'espressione del FAAH, potenziando l'azione dell'AEA a livello dei recettori CB1 e TRVP1 [19-20].

1.4. RECETTORI PER GLI ENDOCANNABINOIDI

Come accennato in precedenza i primi due recettori per gli endocannabinoidi ad essere stati caratterizzati sono il CB1 ed il CB2. Entrambi i recettori possiedono sette domini trans membrana, con 3 loop intracellulari, un dominio carbossiterminale rivolto al versante intracellulare che interagisce con una proteina G un dominio aminoterminale extracellulare. Entrambi i recettori, una volta attivati, interagiscono con una proteina G che inibisce l'Adenilato ciclasi, riducendo i livelli intracellulari di AMPc, modulano i canali ionici e ed i pathway chinasi.

I recettori CB1 sono espressi a livello del sistema nervoso sia centrale che periferico, sono tuttavia presenti anche nei tessuti periferici di altri apparati quali il sistema endocrino, gastro-enterico, cardio-circolatorio, riproduttivo ed immunitario [21-23].

I recettori CB2 sono classicamente definiti periferici poiché principalmente localizzati a livello del sistema immunitario, in particolare nelle tonsille, nella zona marginale della milza, e nelle cellule immunocompetenti [24-25]. Recentemente è stata tuttavia dimostrata la presenza di tale recettore a livello di specifiche aree del sistema nervoso centrale quali il bulbo olfattorio, le regioni corticali, i nuclei talamici ed ipotalamici, ed il cervelletto [26-27].

Il TRVP-1 fa parte della famiglia dei recettori non-CB, e viene attivato dall'AEA. Esso è un canale con sei domini trans membrana e le porzioni C-terminale ed N-terminale entrambe rivolte al versante intracellulare. Il TRVP-1 a seguito di uno stimolo fisico

(temperatura, luce, pressione) o chimico (composti acidi, alcalini, xenobiotici, lipidi endogeni) media il passaggio di diversi cationi sia monovalenti che polivalenti tra cui gli ioni Ca^{2+} [28]. L'AEA lega il TRVP-1 al versante intracellulare, condividendo quindi il sito di legame per la capsaicina, primo ligando per il TRVP-1 identificato. Studi funzionali hanno evidenziato che il TRVP-1 è coinvolto nei meccanismi della nocicezione mediando la percezione del dolore sia termico che infiammatorio, è coinvolto nei processi di regolazione della temperatura corporea, regola il food intake, il movimento e partecipa alla regolazione del tono vascolare [29]. Il TRVP-1 è maggiormente espresso a livello del sistema nervoso, sia centrale che periferico, è presente tuttavia anche in tessuti non neurali quali i tessuti della vescica, epidermide, fegato, vasi sanguigni e cellule del sistema immunitario.

Un altro target recettoriale per gli endocannabinoidi è rappresentato dal GPR55, un recettore orfano accoppiato a una proteina G, facente parte della sottofamiglia dei recettori purinergici. Il GPR55 è coinvolto nella regolazione dell'espressione di alcune citochine anti-infiammatorie, quali IL4, IL10, IFN γ [30], e dei processi anti-nocicettivi [31], esso, come il CB1, è espresso a livello del sistema nervoso centrale anche se i livelli di espressione sono nettamente inferiori rispetto al CB1 [32].

Infine, un'altra classe di recettori attivati dagli endocannabinoidi è quella dei Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Essi appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari e legano diverse classi di composti tra cui acidi grassi, eicosanoidi e diversi xenobiotici [33]. Come il CB2 i recettori PPARs sono

debolmente espressi a livello centrale e più rappresentati a livello degli organi periferici quali fegato, cuore, rene, tessuto adiposo bruno e muscolo scheletrico e sono coinvolti nella regolazione dei processi infiammatori [34].

2. IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI E IL FEGATO

Il ruolo del sistema degli endocannabinoidi nella fisiologia del fegato non è ancora del tutto chiaro. In condizioni fisiologiche essi sono prodotti sia dagli epatociti che dalle cellule non parenchimali quali le cellule di Kupffer e le cellule endoteliali. Il recettore CB1 è debolmente espresso nel fegato sano, mentre il recettore CB2 è espresso nella fase embrionale, quando il fegato assume funzioni ematopoietiche, ed è completamente assente nel fegato adulto [35-36].

Contrariamente a quanto accade nel fegato sano, nelle epatopatie croniche ad eziologia alcolica, virale e metabolica, il sistema degli EC risulta notevolmente up-regolato, si assiste infatti ad un marcato aumento nella produzione di EC e dell'espressione di entrambi i recettori CB [37]. Nonostante gli studi clinici nell'uomo siano pochi e condotti su casistiche ristrette, ciò che emerge dalla letteratura è un marcato aumento dei livelli di AEA, ma non di 2-AG, nel plasma periferico e nella vena epatica di pazienti affetti da cirrosi epatica. Parallelamente anche i livelli di OEA e PEA risultano elevati rispetto ai controlli sani anche se il significato biologico di tale dato non è ancora stato chiarito [38] (Figura 2). Tali studi confermano inoltre

l'implicazione del sistema degli endocannabinoidi nelle fisiopatologia delle epatopatie croniche in quanto evidenziano una diretta correlazione tra concentrazioni plasmatiche di EC e parametri biochimici indicatori di funzionalità epatica quali INR e bilirubina [38]

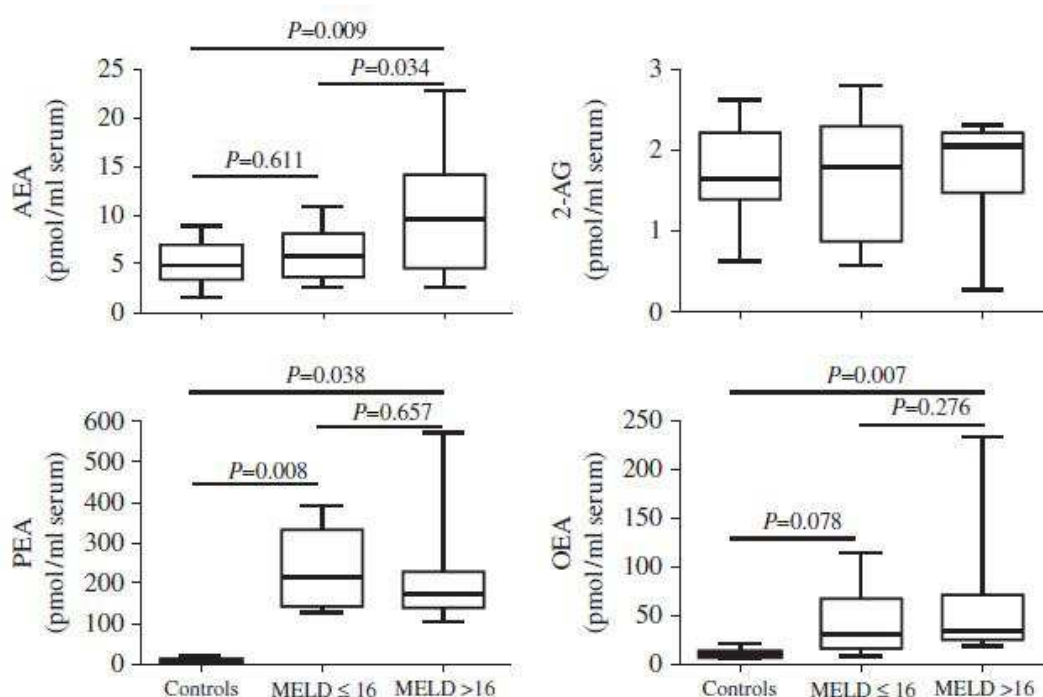


FIGURA 2. Concentrazioni plasmatiche di AEA, 2-AG, PEA ed OEA in controlli sani, pazienti cirrotici con MELD≤16 o MELD>16. Immagine tratta dalla referenza 38.

Ad oggi tutte le informazioni disponibili circa il sistema EC e patologie epatiche derivano da studi sperimentali su animali da laboratorio, mentre sono molto limitati gli studi sull'uomo. Gli animali da esperimento hanno permesso di individuare stretti

link tra sistema degli EC e le principali complicanze della cirrosi epatica, candidando tale sistema come potenziale target terapeutico innovativo.

2.1. ENDOCANNABINOIDI ED IPERTENSIONE PORTALE

Una delle tappe nella storia naturale della cirrosi epatica è rappresentata dallo sviluppo di alterazioni emodinamiche quali l'ipertensione portale e la sindrome circolatoria iperdinamica, che espongono il paziente ad un aumentato rischio di complicanze quali il sanguinamento delle varici gastroesofagee, l'ascite, l'encefalopatia e la sindrome epato-renale.

L'aumento della pressione portale in corso di cirrosi epatica è dovuto essenzialmente a due fattori: da un lato il danno parenchimale epatico ed il conseguente processo fibrogenetico contribuiscono ad un repentino aumento delle resistenze intraepatiche al flusso, dall'altro si verifica a livello locale uno sbilancio delle molecole ad azione vasomotora con una netta prevalenza delle molecole vasocostrittrici [39].

2.1.1. ENDOCANNABINOIDI E FIBROSI EPATICA

Il processo fibrogenetico a livello epatico interviene in risposta a stimoli lesivi da parte di virus epatotropi, abuso di alcool, accumulo di metalli pesanti, alterazioni

metaboliche. Il processo inizia con l'attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC), o cellule di Ito. Tali cellule sono normalmente presenti nel fegato sano e risiedono nello spazio di Disse, deputate alla produzione "controllata" di elementi strutturali che sorreggono la normale architettura dell'organo. In seguito allo stimolo lesivo la produzione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie e fattori mitogeni determina l'attivazione di tali cellule che acquisiscono un fenotipo simil-miofibroblastico ed esprimono marcatori specifici di attivazione quali l'isoforma alfa dell'actina del muscolo liscio (α SMA). Le HSCs attivate iniziano così la produzione incontrollata di matrice extracellulare che in definitiva porta ad una marcata distorsione del parenchima epatico [40]. La prima evidenza del coinvolgimento del sistema degli EC in tale processo deriva dall'osservazione di una più marcata e veloce fibrogenesi in pazienti consumatori abituali di Marijuana affetti da epatite C [41]. In aggiunta è stato sperimentalmente dimostrato che la modulazione genetica o farmacologica dei recettori CB è in grado di interferire con il processo fibrogenico.

Il blocco del signaling attraverso il CB1 in animali in topi geneticamente modificati o trattati con il Rimonabant si associa ad una ridotta quantità di tessuto fibrotico, una ridotta espressione di citochine pro-fibrogeniche, quali il Trasforming Growth Factor β (TGF- β), ed una ridotta proliferazione ed aumentata apoptosi delle HSCs [42,43].

Al contrario topi knockout per il recettore CB2 sottoposti a trattamento con l'epatotossico tetracloruro di carbonio (CCl_4) mostrano un'aumentata deposizione di matrice extracellulare se comparati ai topi wild-type, suggerendo quindi che tale

recettore moduli negativamente il processo fibrogenico [44,45]. Dati sperimentali suggeriscono inoltre che la modulazione del sistema degli EC sia una strategia terapeutica efficace nel ridurre il grado di fibrosi anche negli stadi più avanzati della cirrosi epatica. In tali studi l'attivazione del recettore CB2 mediante l'agonista JWH-133, così come il blocco del CB1 mediante la somministrazione di Rimonabant sono, infatti, associate ad una marcata riduzione del tessuto fibrotico ed un miglioramento dell'architettura epatica [43,46,47].

Riassumendo, i dati sperimentali ad oggi disponibili indicano chiaramente un effetto opposto dei recettori CB1 e CB2 nei confronti del processo fibrogenico. Mentre l'attivazione del CB1 sembra favorire i processi infiammatori, l'attivazione e la proliferazione delle cellule stellate, l'attivazione del recettore CB2 è associata ad una riduzione della fibrosi.

2.1.2. ENDOCANNABINOIDI E RESISTENZE VASCOLARI INTRAEPATICHE

Il sistema degli EC risulta essere coinvolto anche nella modulazione delle resistenze vascolari intraepatiche, contribuendo allo sviluppo di ipertensione portale. Dati sperimentali indicano che l'AEA provoca un aumento dose dipendente della produzione di eicosanoidi in un modello di fegato isolato e perfuso. Gli aumentati livelli di eicosanoidi si associano ad un aumento dello stimolo vasocostrittivo che risulta essere più pronunciato nel fegato cirrotico rispetto al fegato sano [48]. La

somministrazione dell'antagonista AM251 in ratti con cirrosi biliare si associa inoltre ad una marcata riduzione dell'espressione genica di molecole vasocostrittrici con conseguente riduzione delle resistenze intraepatiche [49].

2.2. ENDOCANNABINOIDI E SINDROME CIRCOLATORIA IPERDINAMICA

A seguito del progressivo deterioramento della funzionalità epatica e dell'emodinamica sistemica negli stadi più avanzati della malattia si realizza il quadro della sindrome circolatoria iperdinamica, caratterizzata sul piano clinico da ipotensione arteriosa, ampia pressione differenziale, vasodilatazione periferica, tachicardia, aumento della gittata cardiaca a riposo, estremità calde e subcianotiche [50]. Essa si associa alla comparsa di alcune delle principali complicanze della cirrosi, quali lo scompenso ascitico, la sindrome epatorenale, la sindrome epatopolmonare e l'aumentata suscettibilità allo shock ed è, inoltre, implicata nello sviluppo e nel mantenimento dell'ipertensione portale e, verosimilmente, contribuisce alla genesi dell'encefalopatia epatica [51]. Le alterazioni emodinamiche che contribuiscono allo sviluppo di tale sindrome sono un'iniziale vasodilatazione del distretto splancnico che determina una diminuzione della volemia efficace e successiva attivazione compensatoria di sistemi neuroormonali quali il sistema renina-angiotensina-aldosterone ed il sistema nervoso simpatico [52]. I meccanismi molecolari alla base dell'iniziale vasodilatazione del distretto splancnico non sono ancora del tutto chiari,

è tuttavia possibile ipotizzare uno sbilancio di sostanze ad azione vasocostrittrice e sostanze vasodilatatrici quali l'ossido nitrico (NO) e gli stessi endocannabinoidi [53].

La prova sperimentale del coinvolgimento del sistema degli EC in tale fenomeno deriva dall'osservazione che l'inibizione farmacologica del recettore CB1 in ratti cirrotici si associa a una riduzione dell'ipotensione arteriosa e un aumento delle resistenze vascolari con conseguente riduzione del flusso mesenterico e della pressione portale [46,54]. In aggiunta è stato dimostrato che monociti isolati da ratti cirrotici e re-infusi in ratti sani determinano uno stato di ipotensione, lo stesso effetto non si manifesta con monociti isolati da ratti sani [55]. Alla base dell'effetto ipotensivo dei monociti isolati dai ratti cirrotici è stata ipotizzata un'aumentata produzione di AEA. Il lipopolisaccaride (LPS) batterico rappresenta, infatti, un potente stimolo alla produzione di EC, in particolare di AEA, da parte di monociti e piastrine [56,57]. In corso di cirrosi tali cellule sono costantemente stimolate a causa dell'endotossinemia secondaria al fenomeno della traslocazione batterica intestinale e pertanto concorrono a determinare lo stato ipotensivo rilasciando AEA che attiva i recettori CB1 localizzati a livello degli endoteli vascolari e delle terminazioni nervose perivascolari [53,58]. Parallelamente al CB1 anche il TRVP1 sembra concorrere a determinare l'ipotensione. Dati sperimentali indicano, infatti, che in un modello di arteria mesenterica isolata da ratto cirrotico, la somministrazione di Rimonabant e Capsazepina, una molecola che blocca il TRVP1, previene l'effetto ipotensivo dell'AEA [58].

2.3. ENDOCANNABINOIDI E SCOMPENSO ASCITICO

L'ascite è una delle maggiori complicanze della cirrosi epatica. Essa è il risultato delle alterazioni emodinamiche e della funzionalità epatica che intervengono negli stadi avanzati della malattia e si associa ad un netto peggioramento della prognosi dei pazienti sia in termini di sopravvivenza che di qualità della vita. Alla base della sua comparsa c'è lo stato di ipovolemia effettiva causato dalla vasodilatazione splancnica, la conseguente attivazione dell'asse renina angiotensina aldosterone, il rilascio di catecolamine e vasopressina che nell'insieme promuovono la ritenzione renale di sodio e acqua. L'espansione volumetrica che ne deriva associata all'ipertensione portale determina l'accumulo di liquido nella cavità peritoneale [59].

Dati sperimentali indicano che la modulazione farmacologica del sistema degli EC rappresenta un'efficace opzione terapeutica per prevenire lo scompenso ascitico. È stato, infatti, dimostrato che due settimane di trattamento con Rimonabant, in ratti con cirrosi epatica allo stadio pre-ascitico, sono in grado di prevenire lo scompenso in circa il 90% dei casi. In aggiunta al sacrificio di questi animali è stato osservato che i ratti trattati presentavano un ridotto volume di ascite se comparati con i non trattati. Alla base di tale effetto vi era un netto miglioramento del bilancio del sodio, con un aumento della sodio escrezione, ed un miglioramento dell'emodinamica sistemica, nello specifico un aumento delle resistenze vascolari ed un aumento della

pressione arteriosa media che nel complesso hanno favorito la perfusione renale [46] (Figura 3).

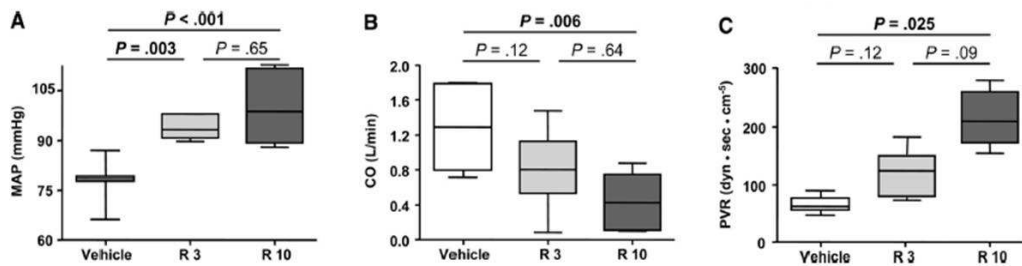


FIGURA 3. Effetto dell'antagonismo farmacologico del recettore CB1 mediante la somministrazione di Rimonabant (SR141716A) in ratti cirrotici. Immagine tratta dalla referenza 46.

Tali dati sperimentali confermano quindi il coinvolgimento del sistema degli EC nella fisiopatologia delle alterazioni emodinamiche e dello scompenso ascitico che si manifestano in corso di cirrosi epatica, e rappresentano il razionale per uno studio più approfondito degli effetti della modulazione farmacologica del sistema degli EC al fine di mettere a punto un nuovo protocollo terapeutico da applicare in clinica.

2.4. ENDOCANNABINOIDI ED ENCEFALOPATIA EPATICA

Un'altra frequente complicanza della cirrosi epatica è l'encefalopatia, tipica degli stadi più avanzati della malattia. La sintomatologia può variare dal calo del livello di attenzione, allo stato confusionale fino al coma [60]. Per lungo tempo la neurotossicità dell'ammonio è stata considerata la causa primaria dell'encefalopatia, oggi è stato dimostrato che alla sua insorgenza concorrono altri tipi di alterazioni che interessano principalmente i sistemi di neurotrasmissione GABAergici, monoamminergici, opioidergici e lo stesso sistema degli endocannabinoidi [61,62]. L'evidenza diretta del coinvolgimento del sistema degli EC nella fisiopatologia dell'encefalopatia deriva dall'osservazione degli aumentati livelli di 2-AG e dei recettori CB1 e CB2 a livello del sistema nervoso centrale di topi con insufficienza epatica acuta indotta mediante la somministrazione di tioacetamide [61]. Inoltre l'inibizione del signaling del CB1, così come l'attivazione del recettore CB2, mediante l'agonista HU-308, sono efficaci nel migliorare le funzioni cognitive e gli score neurologici in topi con encefalopatia secondaria ed insufficienza epatica acuta [61]. Il CB1 ed il CB2 non sono tuttavia i soli recettori coinvolti, studi su animali knock-out hanno infatti messo in evidenza un ulteriore meccanismo neuroprotettivo legato all'azione del recettore TRVP1 [63]. Un'ulteriore evidenza di ciò deriva dall'evidenza che la somministrazione di Cannabidiolo (CBD), un costituente non-psicoattivo della Marijuana incapace di interagire con i recettori CB1 e CB2, è associata ad un miglioramento degli score neurologici in topi con cirrosi biliare encefalopatici. In

questo lavoro è stata pertanto ipotizzata l'interazione del CBD con il recettore purinergico A2A, i cui livelli di espressione si riducono a seguito della legatura del dotto biliare e sono invece riportati ai normali livelli dalla somministrazione di CBD [64]. Riassumendo quindi, sia il blocco del CB1 che l'attivazione del CB2, ma anche l'attivazione di altre strutture recettoriali legate al sistema degli endocannabinoidi quali il TRVP1 ed il A2A, sembrano rappresentare dei potenziali target terapeutici per la gestione clinica dell'encefalopatia epatica.

2.5. ENDOCANNABINOIDI E INFEZIONI BATTERICHE

Le infezioni batteriche costituiscono una frequente e grave complicanza nei pazienti con cirrosi epatica in fase avanzata [65]. Esse rappresentano il motivo del ricovero in circa il 10% dei pazienti cirrotici ospedalizzati, mentre fino al 40% dei pazienti ricoverati per un'altra complicanza presenta un'infezione sottostante. Inoltre, circa un terzo dei pazienti sviluppa un'infezione nosocomiale, incidenza notevolmente superiore rispetto al 5-7% che si osserva negli ospedalizzati per altra causa [66,67]. Ancora più rilevante è l'impatto sulla prognosi: la mortalità ospedaliera dei pazienti cirrotici con infezione batterica si avvicina al 15%, oltre il doppio rispetto a quella dei pazienti non infetti [66]; inoltre, i pazienti cirrotici che sviluppano shock settico hanno una mortalità superiore al 70%, largamente più elevata rispetto a quella dei non-cirrotici [68,69]. Ciò non sorprende se si tiene conto che l'infezione batterica,

nel paziente con cirrosi, spesso determina, accanto al peggioramento della funzionalità epatica, una serie di complicanze extra-epatiche, quali insufficienza renale e circolatoria, disfunzione cardiaca, coagulopatia, encefalopatia ed insufficienza surrenalica relativa, sino all'insufficienza multiorgano (MOF) [70].

Dal punto di vista patogenetico, l'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche è legata ad alterazioni della flora enterica e della barriera mucosa intestinale, che favoriscono il fenomeno della translocazione batterica, alla compromissione dei meccanismi di difesa dell'ospite [65] ed in alcuni casi ad una predisposizione genetica. Una volta instaurata, l'infezione è in grado di innescare un'abnorme risposta infiammatoria, che favorisce lo sviluppo di disfunzione cardiocircolatoria, sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) e MOF [65]. Tali eventi sono mediati dalla produzione ed attivazione di una lunga serie di sostanze, tra le quali ricordiamo citochine pro- ed anti-infiammatorie, specie reattive dell'ossigeno (ROS), ossido nitrico (NO) ed endocannabinoidi [71], le cui azioni ed interazioni sono ben lontane dall'essere pienamente comprese [65,68].

L'importante ruolo svolto dal sistema degli EC nelle alterazioni emodinamiche in corso di cirrosi epatica complicata da infezione batterica è stato in parte elucidato da studi sperimentali. È stato dimostrato, infatti, che l'LPS inibisce l'azione dell'enzima FAAH, responsabile della degradazione di AEA, nei linfociti umani facendo di fatto aumentare la concentrazione di Anandamide [56]. Parallelamente Varga e colleghi hanno dimostrato che piastrine e macrofagi stimolati con LPS

aumentano la produzione rispettivamente di 2-AG ed AEA i quali fungono da mediatori paracrini dell'ipotensione associata all'LPS attivando i recettori CB1 espressi a livello vascolare [72]. Gli elevati livelli di endocannabinoidi in corso di cirrosi epatica potrebbero quindi essere legati alla costante stimolazione da parte dell'endotossinemia, secondaria alla traslocazione batterica intestinale, fenomeno comune ai pazienti in stadio avanzato. Tale ipotesi è stata confermata da uno studio sperimentale nel quale si dimostrava che la somministrazione di ciprofloxacina a ratti con cirrosi epatica si associava ad una riduzione dell'endotossinemia, una riduzione dei livelli circolanti di AEA e 2-AG e ad un miglioramento del microcircolo epatico e della pressione portale. Tali effetti erano accompagnati da una ridotta espressione del recettore CB1 ed una up-regolazione del CB2 a livello epatico [73].

Tutte le precedenti osservazioni sperimentali suggeriscono quindi che l'endotossinemia rappresenta un potente stimolo per la produzione di endocannabinoidi, i quali una volta rilasciati mediano il rilassamento vascolare interagendo principalmente con il recettore CB1 determinando un peggioramento del già precario assetto emodinamico del paziente cirrotico.

Capitolo Secondo

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è stato quello di investigare il ruolo del sistema degli endocannabinoidi nella fisiopatologia delle maggiori complicanze della cirrosi epatica con particolare riguardo alle infezioni batteriche. Appare, infatti, evidente che migliorare la conoscenza dei meccanismi che favoriscono le infezioni batteriche e che contribuiscono allo sviluppo delle gravi alterazioni ad esse correlate costituisce un importante obiettivo di ricerca finalizzato a sviluppare nuovi approcci terapeutici in grado di aumentare la sopravvivenza dei pazienti cirrotici.

Nello studio sono stati utilizzati due diversi protocolli, un protocollo clinico ed uno sperimentale.

1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Scopo del protocollo sperimentale è stato quello di verificare in un modello altamente standardizzato di cirrosi epatica, ottenibile nel ratto mediante somministrazione di CCl₄ per via inalatoria, gli effetti della somministrazione di LPS sull'attivazione del sistema dei cannabinoidi endogeni. Inoltre si è voluto verificare l'efficacia del trattamento con un antagonista del recettore CB1, il Rimonabant, nel migliorare la sopravvivenza in ratti cirrotici

trattati con LPS ed i cambiamenti nei livelli di espressione di enzimi implicati nella sintesi di EC, di citochine pro-infiammatorie e sostanze vasoattive, indotti da tale trattamento.

2. PROTOCOLLO CLINICO

Il protocollo clinico ha avuto lo scopo di verificare in un'ampia popolazione di pazienti affetti da cirrosi epatica l'effettivo innalzamento dei livelli circolanti dei principali endocannabinoidi rispetto ad una popolazione di individui non cirrotici comparabili per sesso ed età.

Successivamente è stata valutata la presenza di eventuali correlazioni tra i livelli circolanti di EC, parametri biochimici ed emodinamici e specifiche complicanze della malattia.

Capitolo Terzo

MATERIALI

1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

1.1. ANIMALI DA ESPERIMENTO

Nello studio sono stati utilizzati ratti maschi della razza Wistar Hann (Charles River Laboratories, Calco, LC, Italia), del peso iniziale di 175-200 grammi. Gli animali sono stati stabulati in gabbie autoventilate a temperatura (22-24°C) e umidità (40-70%) controllate con cicli di luce e buio di uguale intervallo (12 ore) presso il Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA) nel Policlinico S. Orsola-Malpighi. Durante il periodo di esecuzione dello studio, gli animali hanno avuto libero accesso a una dieta in pellet standard (Laboratori Dottori Piccioni, Gessate, MI, Italia) contenente 2.5 g di Sodio ogni Kg di dieta (133 mmol Na⁺/Kg).

Tutte le operazioni sono state eseguite nel rispetto delle linee guida della direttiva CEE 86/609 sull'uso degli animali sperimentali (recepito in Italia con D.L. gs 116/92), tutti i protocolli sono stati approvati dal Comitato Etico Veterinario dell' Università di Bologna.

1.2. INDUZIONE DELLA CIRROSI EPATICA

Per l'induzione della cirrosi negli animali da esperimento è stato seguito il protocollo descritto da Jimenez et al. [74]. Tale protocollo permette di riprodurre fedelmente tutte le fasi della storia naturale della malattia ed è basato sulla somministrazione per via inalatoria di tetracloruro di carbonio (CCl_4). La tossicità del CCl_4 , a livello epatico, si realizza attraverso la sua attivazione a radicale triclorometilico ($\bullet\text{CCl}_3$) per l'azione di un'isoforma del citocromo P-450 (CYP) [75]. Il danno cellulare è conseguenza della reazione tra $\bullet\text{CCl}_3$ e acidi grassi polinsaturi che, innescando una cascata perossidativa, porta alla disintegrazione delle membrane cellulari [76]. Al fine di potenziare l'epatotossicità del tetracloruro durante il periodo di induzione gli animali sono stati trattati con fenobarbitale (0.3 g/L), un induttore del sistema dei citocromi epatici, mediante l'aggiunta di quest'ultimo nell'acqua da bere.

Il trattamento con CCl_4 è stato iniziato dopo una settimana di somministrazione di fenobarbitale.

Durante l'esposizione al tossico, i ratti sono stati collocati in una gabbia a tenuta stagna (larghezza: 40 cm; altezza: 30 cm; lunghezza: 60 cm), fornita di coperchio trasparente per consentire un costante monitoraggio. Quest'ultimo è reso necessario dalla correlazione esistente tra i tempi d'esposizione (che

aumentano progressivamente) ed il rischio di arresto respiratorio. Per ridurre al minimo i rischi per l'operatore, i trattamenti sono stati eseguiti sotto cappa a flusso laminare, in modo da prevenire la dispersione ambientale del tossico, e consentirne la rapida rimozione dei fine seduta.

Ai ratti posti all'interno della gabbia stagna è stata somministrata una miscela ricavata facendo gorgogliare aria a flusso costante (1 L/min) in una beuta di vetro contenente CCl₄. L'esposizione a questa miscela gassosa prevede due sedute settimanali (lunedì e venerdì), composta ognuna da due fasi la cui durata viene aumentata progressivamente ogni tre sedute. Nella prima fase, i ratti sono esposti al flusso gassoso di CCl₄; nella seconda, i ratti rimangono nella gabbia ormai satura di CCl₄, in assenza di flusso. Inizialmente, i tempi di esposizione sono pari a 30 secondi + 30 secondi, con aumenti progressivi fino ad un massimo di 5 minuti + 5 minuti.

1.3. TEST DA SOVRACCARICO SALINO

Tale test è stato utilizzato per identificare la fase pre-ascitica della malattia.

Per la sua esecuzione, i ratti sono stati posti, a partire dalla decima settimana di induzione della cirrosi epatica, in gabbia metabolica (Tecniplast, model

1700, Buggiate, VA, Italia), in modo da consentire l'esatta misurazione della diuresi e della quota di acqua assunta. Dopo un primo periodo di ambientamento, della durata di 12 ore, con accesso solo ad acqua minerale a basso contenuto di sodio (1.8 mg/L), ai ratti è stato somministrato tramite gavaggio un carico di sodio pari a 0.5 g/Kg NaCl in una soluzione acquosa 4 molare. Dopo il carico, i ratti hanno avuto libero accesso solo ad acqua demineralizzata per le successive otto ore. Al termine di questo periodo, sono state raccolte le urine ed è stato misurato il contenuto di sodio.

La sodiuria è stata misurata mediante uno spettrometro a fiamma, presso il settore Biochimica del Laboratorio Centralizzato del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi. L'escrezione di sodio è stata valutata come percentuale del carico escreto (F Na) nelle otto ore dopo il test ricorrendo alla seguente formula:

$$F Na = \left[\frac{Nai - Nau}{Nai} \right] * 100$$

dove Nai rappresenta la quota di sodio somministrata e Nau la quota di sodio escreta con le urine [77].

1.4. DISEGNO DELLO STUDIO

1.4.1. VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DEL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI LPS IN RATTI CIRROTICI.

Al termine del periodo di induzione della cirrosi i ratti sono stati sottoposti settimanalmente ad un test da sovraccarico salino (SOT) al fine di individuare la fase pre-ascitica della malattia. Una volta risultati positivi al SOT per 2 settimane successive 20 ratti cirrotici sono stati randomizzati in due gruppi sperimentali e sono stati trattati per via intraperitoneale con una dose di LPS pari a 5 mg/kg. I ratti sono stati quindi sacrificati dopo 2 (CH_{LPS2}; n=5) e 6 (CH_{LPS6}; n=5) ore dal trattamento. Al sacrificio è stato effettuato un prelievo ematico dalla vena cava per la raccolta del plasma usato successivamente per il dosaggio degli endocannabinoidi. Cinque ratti cirrotici aggiuntivi, non trattati con LPS (CH), sono stati sacrificati al tempo 0 per ottenere i valori basali (Figura 4).

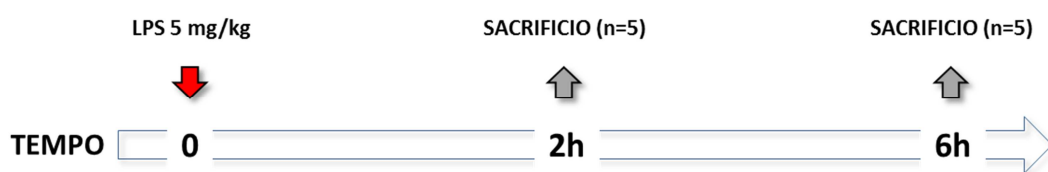


FIGURA 4. Time Line del protocollo finalizzato alla valutazione dell'attivazione del sistema degli endocannabinoidi a seguito della somministrazione di LPS in ratti cirrotici.

1.4.2. VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DALL'ANTAGONISMO FARMACOLOGICO DEL RECETTORE

CB1 SULLA SOPRAVVIVENZA IN RATTI CIRROTTICI TRATTATI CON UNA DOSE LETALE DI LPS

Al termine del periodo d'induzione della cirrosi, e dopo due SOT positivi, 20 ratti sono stati randomizzati in due gruppi sperimentali. Ad entrambi i gruppi è stata somministrata una dose letale di LPS pari a 10mg/kg, 15 minuti dopo il trattamento tramite gavage con placebo (CH_{LPS.PL}; n=10) o con Rimonabant (SR141716A) alla dose di 10mg/kg (CH_{LPS.SR}; n=10). I ratti sono stati quindi riposti in gabbia con libero accesso a cibo ed acqua e sono stati monitorati ad intervalli regolari di un ora nelle prime 6 ore e successivamente ogni 6 ore fino al raggiungimento delle 24 ore.

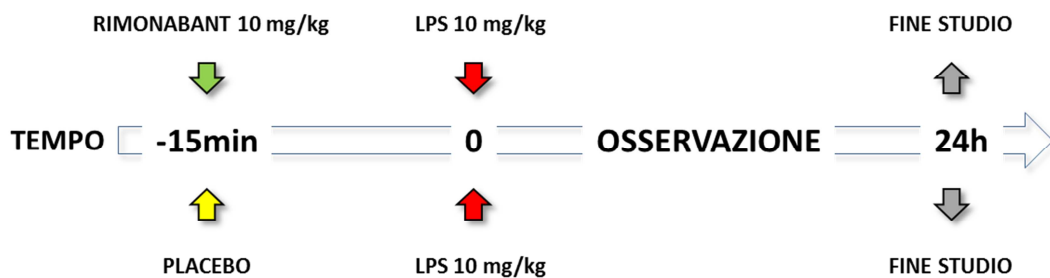


FIGURA 6. Time Line del protocollo finalizzato alla valutazione dell'impatto dall'antagonismo farmacologico del recettore cb1 sulla sopravvivenza in ratti cirrotici trattati con una dose letale di LPS.

1.4.3. VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DALL'ANTAGONISMO FARMACOLOGICO DEL RECETTORE CB1 SULLE ALTERAZIONI CAUSATE DALLA SOMMINISTRAZIONE DI UNA DOSE SUB-LETALE DI LPS IN CORSO DI CIRROSI.

Al termine del periodo d'induzione della cirrosi, e dopo due SOT positivi, 20 ratti sono stati randomizzati in due gruppi sperimentali. Ad entrambi i gruppi è stata somministrata una dose sub-letale di LPS pari a 5mg/kg, 15 minuti dopo il trattamento tramite gavage con placebo (PL) o con Rimonabant (SR141716A) alla dose di 10mg/kg (SR). I ratti sono quindi stati riposti in gabbia con libero accesso a cibo ed acqua, sono stati monitorati, e successivamente sacrificati ad intervalli di 6 (n=5) e 24 ore (n=5) per la raccolta di campioni di tessuto epatico da utilizzare nelle successive analisi biomolecolari. In aggiunta, 5 ratti cirrotici non sottoposti a trattamento con LPS sono stati utilizzati per ottenere i valori basali (Basal).

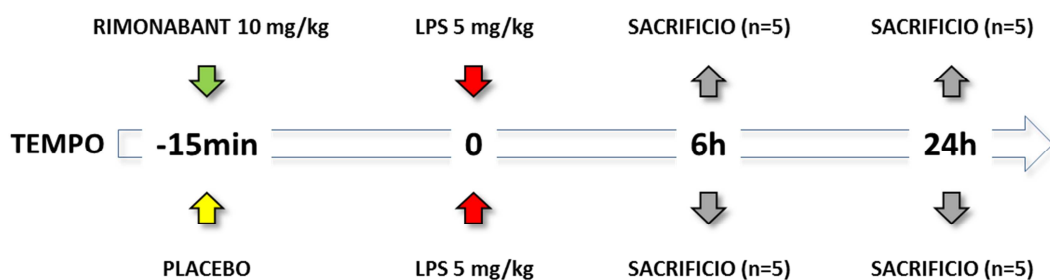


FIGURA 7. Time Line del protocollo finalizzato alla valutazione dell'impatto dall'antagonismo farmacologico del recettore cb1 sulle alterazioni causate dalla somministrazione di una dose sub-letale di LPS in corso di cirrosi.

2. PROTOCOLLO CLINICO

2.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Nel periodo di tempo compreso tra febbraio 2010 e febbraio 2012 sono stati arruolati consecutivamente 159 pazienti affetti da cirrosi epatica (CH) recatisi presso le strutture ambulatoriali ed ospedaliere ad indirizzo epatologico del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi. Parallelamente, come popolazione di riferimento, sono stati arruolati 108 volontari non cirrotici, paragonabili per sesso e età ai pazienti cirrotici.

Al momento dell'inclusione è stato chiesto sia ai pazienti che ai volontari non cirrotici di sottoporsi ad un prelievo di sangue venoso, sono inoltre stati registrati in un database elettronico i dati clinici e laboratoristici. Infine i pazienti sono stati monitorati fino ad un anno dalla data dell'arruolamento.

Bilirubina, albumina, funzionalità epatica, parametri della coagulazione, emocromo, e proteina C-reattiva sono stati eseguiti come esami di routine dal Laboratorio Centralizzato del Policlinico S.Orsola-Malpighi.

Il grado dell'insufficienza epatica è stato valutato mediante gli score MELD e Child-Pugh.

2.1.1 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE DEI VOLONTARI NON CIRROTICI

Criteria d'inclusione Assenza di malattie epatiche e renali, età compresa tra i 18 e 75 anni, ottenimento del consenso informato.

Criteria di esclusione obesità, dislipidemie, infezione in atto, neoplasie maligne.

2.1.2 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE DEI PAZIENTI CIRROTICI

Criteria di inclusione Pazienti con cirrosi epatica (appartenenti alle classi A, B e C di Child-Pugh), con o senza infezione batterica comunitaria o nosocomiale, valutati presso le strutture clinico-assistenziali ad indirizzo epatologico del policlinico S-Orsola-Malpighi, previo ottenimento di consenso informato.

Criteria di esclusione Età inferiore ai 18 anni; dislipidemie; obesità; Ricovero per eseguire procedure programmate (trattamento per HCC, legatura di varici esofagee); Epatocarcinoma che superava i criteri di Milano; Precedente OLT; Trattamento con immunosoppressivi in atto.

Capitolo Quarto

METODI

1. PRELIEVO DEI CAMPIONI

1.2. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Negli animali è stata indotta anestesia generale mediante la somministrazione per via intraperitoneale di Zoletil® alla dose di 0,5 ml/Kg di peso. La specialità Zoletil è costituita dalla combinazione di un agente dissociativo, la Tiletamina cloridrato (affine alla Chetamina cloridrato) ed una benzodiazepina, il Zolazepam cloridrato, nel rapporto 1/1. Ad anestesia generale indotta, sono stati prelevati circa 8 ml di sangue dalla vena cava, successivamente è stato asportato il fegato dal quale sono stati prelevati dei campioni di tessuto immediatamente congelati e stoccati a -80°C per le successive analisi biomolecolari. In seguito si è proceduto al sacrificio dell'animale e alla processazione dei campioni raccolti.

1.2. PROTOCOLLO CLINICO

Il campione ematico è stato raccolto al momento dell'inclusione del paziente mediante prelievo venoso periferico.

1.3. PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI EMATICI

In entrambi i protocolli, ai fini dell'analisi biomolecolare il sangue venoso periferico è stato raccolto in modo asettico in tubi apirogeni contenenti l'anticoagulante EDTA (BD Vacutainer, BD, Plymouth, UK). Per la raccolta del plasma, i campioni sono stati conservati a bassa temperatura ed, entro le due ore successive al prelievo, sono stati centrifugati a 3000 rpm a 4°C per 10 minuti. Quindi il surnatante è stato aliquotato e stoccato a -80°C, fino al suo successivo utilizzo.

2. ANALISI BIOMOLECOLARI

2.1. ESTRAZIONE DELL'RNA

Il protocollo utilizzato per l'estrazione è basato sul reagente Trizol, una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato che mantiene integro l'RNA, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari.

50-100 mg di tessuto ancora congelato sono stati messi in un tubo sterile da 1,5 ml (RNA-si free) contenente 800µl di Trizol (Invitrogen Reagent). Dopo di che il campione è stato frantumato utilizzando un pestello per alcuni secondi finché il frammento di tessuto non fosse completamente disgregato. Si è proceduto quindi con le varie fasi dell'estrazione.

2.1.1 FASE DI SEPARAZIONE

I campioni sono stati centrifugati a 12000 giri/min a 4°C per 10 minuti e successivamente si è trasferito il surnatante in un nuovo tubo. L'omogenato è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Quindi sono stati aggiunti ad ogni campione 200µl di cloroformio per ogni ml di Trizol utilizzato inizialmente e i campioni sono stati vortexati per 15 secondi, incubati per 2-3 minuti a temperatura ambiente ed infine centrifugati a 12000 giri/min a 4°C per 15 minuti. Durante la centrifuga, nel tubo, avviene la separazione del campione in tre diverse fasi: una di colore rosso contenente cloroformio sul fondo del tubo, un'interfase incolore, e una fase acquosa contenente l'RNA. DNA e proteine sono confinate nella fase incolore e nella fase organica.

2.1.2. PRECIPITAZIONE DELL'RNA

La fase acquosa contenente l'RNA è stata trasferita in un nuovo tubo nel quale sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo per ogni ml di Trizol utilizzato inizialmente. I campioni sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi centrifugati a 12000 giri/min a 4°C per 10 minuti. Durante la centrifuga l'RNA contenuto nel campione precipita formando un pellet di colore bianco sul fondo del tubo. Al termine della centrifuga il surnatante è stato rimosso.

2.1.3. LAVAGGIO E SOLUBILIZZAZIONE

Per il lavaggio dell'RNA è stato aggiunto ad ogni tubo 1ml di etanolo 75% per ogni ml di Trizol utilizzato inizialmente, quindi i campioni sono stati vortexati e centrifugati a 7500 giri/min a 4°C per 5 minuti. Terminata la centrifuga è stato rimosso il sovrnatante ed il pellet è stato lasciato ad asciugare fino alla completa eliminazione di ogni traccia di etanolo. Infine l'RNA ottenuto è stato risospeso in 50-100µl di acqua trattata con diethylpirocarbonato allo 0.1% (DEPC).

2.1.4. CONCENTRAZIONE, QUALITÀ E PUREZZA DELL'RNA ESTRATTO

Dopo l'estrazione è stata valutata la qualità, la purezza e la concentrazione dell'RNA mediante uno spettrofotometro (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific). Il NanoDrop è

uno Spettrofotometro UV-Visibile che sfrutta la tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando sono collocati tra due superfici vicine. Questo permette che una goccia di campione, posizionata sull'apposita piastra di lettura, crei una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, che può essere analizzata in modo semplice e veloce. È stato quindi utilizzato 1 μ l di ogni campione per valutare i seguenti parametri:

- Concentrazione dell'RNA (ng/ μ l)
- Rapporto tra assorbanze 260/280 per valutare la qualità dell'RNA estratto. Più questo dato si avvicina a 2.00 e più l'RNA estratto è di buona qualità.
- Rapporto tra assorbanze 230/260, un dato aggiuntivo, che valuta la purezza del campione in esame, poiché indica la presenza di contaminanti o di residui fenolici nel l'RNA estratto. Il valore ottenuto deve essere compreso tra 1,8-2,2.

Per confermare i risultati ottenuti con il Nanodrop, l'RNA ottenuto da ciascun campione è stato analizzato mediante una corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1%. Facendo correre l'RNA sul gel si dovrebbero ottenere due bande, corrispondenti alle subunità 18s e 24s dell'RNA. La subunità 5s è difficilmente visualizzabile a causa delle sue piccole dimensioni.

Al termine della procedura i campioni sono stati stoccati a -80°C fino al loro utilizzo.

2.2. RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA

In tale procedura $1\ \mu\text{g}$ di RNA è stato utilizzato come stampo per la sintesi di un singolo filamento di cDNA. In un tubo sterile è stata preparata una soluzione contenente $1\ \mu\text{l}$ Oligo(dT)₂₀ ($50\ \mu\text{M}$), miscela contenente molecole in grado di legare la terminazione poli(A) dell'mRNA, $5\ \mu\text{g}$ di RNA, $1\ \mu\text{l}$ di dNTP Mix $10\ \text{mM}$, miscela a pH neutro contenente dATP, dGTP, dCTP e dTTP, infine la soluzione è stata portata ad un volume finale di $13\ \mu\text{l}$ mediante l'aggiunta di acqua distillata sterile. I campioni sono quindi stati incubati a 65°C per 5 minuti per permettere la denaturazione dell'RNA e successivamente riposti in ghiaccio. A ciascun tubo sono stati aggiunti $4\ \mu\text{l}$ di 5X First-Strand Buffer, $1\ \mu\text{l}$ di DTT $0.1\ \text{M}$, $1\ \mu\text{l}$ di RNaseOUT™ ed $1\ \mu\text{l}$ di SuperScript™ III RT. I campioni sono quindi stati incubati a 50°C per 45 minuti per permettere la reazione di trascrizione inversa e successivamente a 70°C per 15 minuti al fine di inattivare l'enzima trascrittasi inversa e bloccare la reazione. I campioni di cDNA ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

2.3. REAL-TIME PCR

Sull'RNA totale estratto e retrotrascritto in cDNA è stata eseguita la quantificazione dell'mRNA utilizzando il sistema iCycler (BioRad), un unico strumento risultante dalla combinazione di un termociclatore, di un rilevatore a fluorescenza laser e di software applicativi specifici. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando come sistema rilevatore il SYBR® Green I dye, un intercalante che presenta una minima fluorescenza nella miscela iniziale ed emette fluorescenza a 520 nm solo quando è legato a dsDNA. L'intensità di fluorescenza dipende quindi dalla quantità iniziale di campione. L'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione di PCR viene analizzata da un software (SDS, Sequence Detection System software), che costruisce una curva d'amplificazione. Le misurazioni dal 3° al 15° ciclo vengono considerate rumore di fondo (livello di base) e su questi viene calcolata la deviazione standard. I valori di ciclo soglia vengono calcolati determinando il punto in cui la fluorescenza supera di 10 volte la deviazione standard del livello di base. Per determinare la concentrazione iniziale di campione, il software calcola il ciclo soglia di ogni campione e inserisce questo valore in una curva standard creata con concentrazioni note di uno standard. Il SYBR® Green è tuttavia un intercalante estremamente aspecifico in quanto si lega a qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento generato dalla Taq polimerasi. Al termine di ogni reazione di PCR quantitativa quindi è stata effettuata l'analisi delle curve di melting, al fine di escludere la presenza di dimeri di primers o amplificati aspecifici.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl in una miscela costituita da 12,5 µl di 2x iQSybr Green Supermix (BioRad), 1µl (0,2 µM) primers senso ed antisenso, 2 µl di cDNA ed acqua MilliQ. La fase di denaturazione a 95°C per 10 minuti è seguita, da 50 cicli di denaturazione per 15 secondi e di appaiamento alla temperatura richiesta dai primers per 30 secondi. Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Tutti le coppie di Primers sono state disegnate usando BioRad Beacon Designer 2.0 software e sintetizzate da Tema Ricerche (San Lazzaro), le sequenze dei primers utilizzati sono riportati in Tabella 1.

I trascritti di mRNA specifici per ciascun gene sono stati sottoposti a quantificazione rapportandoli alle curve standard generate dall'amplificazione di diluizioni seriali in base 10 dei pool di cDNA ottenuti dagli stessi campioni analizzati. In ogni esperimento l'efficienza di PCR, rapportata alla curva standard, era costante e compresa tra i valori di 90% e 110% ed il coefficiente di correlazione si aggirava su valori vicini a 0.99.

La quantificazione dei cambiamenti d'espressione genica è stata calcolata paragonando i vari valori ottenuti con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tra i ratti cirrotici (trattati e non) ed i ratti sani di controllo. L'espressione di ciascun gene studiato è stata normalizzata utilizzando l'espressione dei geni house-keeping β -actina e $\beta 2$ -microglobulina come controlli endogeni.

GENE	Forward	Reverse
β-actina (150pb)	TTGGCAACGAGCGGTTCC	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG
β2-Microglobulina (117pb)	GCCGTCGTGCTTGCCATTC	CTGAGGTGGGTGGAAGTGAAGAC
NAPE-PLD (100 bp)	GGATGCTGTAAGGATTACATTGAC	CGGCGGCTCTAAGTAATGCTC
FAAH (117 bp)	AACAGTATGCGTCCTCGGTCAG	GGTCAGCAGCACATCCAAGTTC
i-NOS (128 bp)	GGAAGAGACGCACAGGCAGAG	CAGCAGGCACACGCAATGATG
e-NOS (150 bp)	TCCCCTGCCTCCGCTACC	CTTCACACGCTTCGCCATCAC
IL-6 (109pb)	CTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG	TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCC
TNF (89.2 bp)	CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG	GGGCTACGGGCTTGCACTC

Tabella 1. Sequenze oligonucleotidiche dei primers forward e dimensioni attese (in paia di basi, bp) dell'amplificato.

3. DOSAGGIO DEGLI ENDOCANNABINOIDI CIRCOLANTI

3.1. ESTRAZIONE DELLA FASE LIPIDICA

Al momento della seduta una aliquota di ciascun campione è stata scongelata e 0.5 ml sono stati trasferiti in un tubo pyrex. Cento microlitri di EtOH contenente una miscela di standard interni alla concentrazione di 30 pmol/ml sono stati aggiunti a ciascun campione. Dopo aver vortexato per 2 min, a ciascun campione sono stati aggiunti 2 ml di toluene. Dopo aver vortexato per 10 min, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 2000 g a 4°C. Quindi i campioni sono stati immersi per 5min in un bagno di acetone gelido. La fase superiore è stata prelevata e trasferita in un tubo pyrex e quindi evaporata sotto flusso di azoto. I campioni sono stati infine ricostituiti in 100 µl di MeOH e posti in auto campionatore termostato a 4°C.

3.2. FASE ANALITICA

Settanta microlitri di campione sono stati iniettati in colonna preparativa (POROS[®], Applied Biosystems), il campione è quindi stato lavato per 1min con una fase al 28% di MeOH, quindi retro flussato verso la colonna analitica Discovery HS C18 7.5 cm x 4.6 mm, 3 µm (Supelco). Gli endocannabinoidi vengono separati in 21min in condizioni isocratiche all'87% di fase organica, costituita da H₂O 0.2%, acido acetico 0.1% in MeOH. Gli endocannabinoidi vengono infine ionizzati in sorgente APCI e analizzati in modalità MRM. La quantificazione è stata effettuata mediante interpolazione del rapporto analita/IS su una curva di calibrazione.

4. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante il software SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

L'analisi della varianza è stata utilizzata per variabili continue con distribuzione normale sono, mentre il confronto tra i gruppi è stato eseguito applicando il test post hoc di Bonferroni. L'analisi multivariata è stata eseguita usando il modello della regressione logistica con metodo di selezione backward al fine di individuare le variabili indipendentemente associate alla specifica complicanza. L'analisi della sopravvivenza è stata eseguita sulle variabili categorizzate con il metodo Kaplan-Meier, mentre la regressione di COX è stata usata per individuare i predittori di

sopravvivenza globale. I dati sono stati riportati come media più o meno la deviazione standard, un valore di deviazione standard inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Capitolo Quinto

RISULTATI

1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

1.1 IL SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI VIENE ATTIVATO DALL'ESPOSIZIONE AD LPS IN CORSO DI CIRROSI EPATICA.

La somministrazione di una dose di LPS pari a 5 mg/kg in ratti cirrotici nella fase pre-ascitica è associata ad una marcata attivazione del sistema degli endocannabinoidi come dimostrato dal significativo aumento dei livelli circolanti sia dei NAE che del 2-AG. In particolare i Livelli di AEA ed OEA hanno mostrato un trend lineare all'aumento essendo significativamente aumentati, rispetto ai controlli basali, sia dopo due ($p < 0,01$), che dopo sei ore ($p < 0,001$) dalla somministrazione di LPS (Figura 8, pannelli A e D). I livelli di 2-AG e PEA invece sono risultati significativamente aumentati, rispetto ai controllo basali, solo dopo 6 ($p < 0,001$) dalla somministrazione di LPS (Figura 8, pannelli B e C).

1.2. LA SOMMINISTRAZIONE DI RIMONABANT AUMENTA LA SOPRAVVIVENZA A 24 ORE DI RATTI CIRROTICI TRATTATI CON UNA DOSE LETALE DI LPS.

L'analisi eseguita con il metodo Kaplan-Meier ha evidenziato una significativa differenza nella sopravvivenza a 24 ore tra i ratti trattati con placebo ed i ratti trattati con SR141716A ($p < 0,0001$). La somministrazione di una dose letale di LPS pari a 10 mg/Kg ha prodotto, nel gruppo dei ratti cirrotici trattati con il veicolo, una mortalità del 100%, rilevata nel corso delle 6 ore successive all'induzione dell'endotossinemia; sorprendentemente, nel gruppo dei ratti cirrotici trattati con l'antagonista selettivo del recettore CB1, SR 141716A, durante le prime 6 ore successive all'endotossinemia, è stata riscontrata una sopravvivenza del 100%, mentre, nel corso delle successive 24 ore, il tasso di sopravvivenza si è ridotto al 50% (Figura 9).

1.3. LA SOMMINISTRAZIONE DI LPS MODULA L'ESPRESSIONE GENICA EPATICA DEGLI ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO DEI NAE.

L'analisi dell'espressione genica epatica eseguita mediante Real Time PCR ha permesso di evidenziare un aumento significativo nei livelli di espressione dell'enzima responsabile della sintesi dei NAE (AEA, PEA ed OEA), il NAPE-PLD, in tutti i ratti cirrotici trattati con LPS ed LPS e Rimonabant rispetto ai controlli basali ($p < 0,05$), al contrario i livelli di espressione dell'enzima responsabile della loro degradazione, il FAAH, sono risultati comparabili in tutti i gruppi sperimentali. (Figura 10). Tali risultati ci consentono di concludere che, in corso di

cirrosi, i livelli tissutali di AEA, PEA ed OEA potrebbero risultare aumentati in modo significativo a seguito della sovrapposizione di una complicanza infettiva.

1.4. LA SOMMINISTRAZIONE DI UNA SINGOLA DOSE DI RIMONABANT MODULA L'ESPRESSIONE GENICA EPATICA DI CITOCINE PRO-INFIAMMATORIE E MOLECOLE VASOATTIVE.

L'espressione genica epatica delle citochine pro-infiammatorie Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) e dell'Interleukina-6 (IL-6), responsabili dell'instaurarsi e del perpetuarsi del danno epatico, è risultata significativamente up-regolata nei ratti cirrotici trattati con LPS se comparati con i ratti cirrotici non trattati. Al contrario la somministrazione di Rimonabant è risultata essere associata ad una significativa riduzione dell'espressione genica epatica delle stesse sia dopo 6 che dopo 24 ore dal trattamento ($p < 0,05$)(Figura 11). L'analisi dell'espressione genica delle isoforme inducibile ed endoteliale della Ossido Nitrico Sintetasi (iNOS ed eNOS), ha mostrato un aumento dei livelli di espressione della sola isoforma inducibile nei ratti cirrotici trattati con LPS rispetto ai ratti non trattati. La somministrazione di Rimonabant è associata ad una down-regolazione della stessa rispetto al gruppo placebo sia dopo 6 che dopo 24 ore dal trattamento ($p < 0,05$) (Figura 12, pannello A). Non sono state evidenziate variazioni significative nei livelli di espressione di eNOS tra tutti i gruppi sperimentali (Figura 12, pannello B).

2. PROTOCOLLO CLINICO

2.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

I parametri demografici, antropometrici e clinico-laboratoristici dei pazienti cirrotici e dei volontari non cirrotici sono riportati in Tabella 2.

2.2. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI DEMOGRAFICI ED ANTROPOMETRICI NEI VOLONTARI NON CIRROTICI

Le concentrazioni plasmatiche dei quattro principali endocannabinoidi nei maschi e nelle femmine non cirrotici sono riportate in Tabella 3. In entrambi i gruppi i valori rientrano negli intervalli di riferimento riportati in letteratura per i soggetti definiti sani [78]. È stata evidenziata inoltre una differenza legata al sesso nelle concentrazioni dei soli endocannabinoidi AEA, PEA ed OEA appartenenti alla famiglia delle N-acil-etanolamidi (NAE), mentre nessuna differenza è stata riscontrata per il 2-AG membro della famiglia dei monoacil-gliceroli (MAG). Considerando l'intera popolazione dei controlli i livelli circolanti di tutti i NAE correlano positivamente tra di loro ma non con i livelli di 2-AG (Tabella 4). Infine è stata evidenziata una correlazione positiva con l'età per i soli AEA, PEA ed OEA (Tabella 5).

2.3. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI DEMOGRAFICI ED ANTROPOMETRICI NEI PAZIENTI CIRROTICI

Le concentrazioni plasmatiche dei quattro principali endocannabinoidi nei maschi e nelle femmine affetti da cirrosi epatica sono riportate in Tabella 6. In entrambi i gruppi le concentrazioni plasmatiche di EC sono ampiamente al di sopra degli intervalli di riferimento riportati in letteratura per i soggetti definiti sani [78], solo l'AEA nei maschi risulta essere leggermente al di sotto del limite superiore dell'intervallo di riferimento riportato per questo gruppo. Come per il gruppo dei volontari non cirrotici anche in questo caso è stata evidenziata una differenza legata al sesso nelle concentrazioni di entrambe le famiglie di EC, i NAE ed i MAG. Considerando l'intera popolazione i livelli circolanti di tutti i NAE correlano positivamente tra di loro e una correlazione positiva è stata inoltre riscontrata tra i livelli di AEA e 2-AG (Tabella 7). Infine è stata evidenziata una correlazione positiva con l'età per i soli AEA, e 2-AG (Tabella 8).

2.4. CONFRONTO TRA LE CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DI EC DEI VOLONTARI NON CIRROTICI E PAZIENTI CIRROTICI.

Il confronto tra pazienti cirrotici e volontari non cirrotici ha permesso di evidenziare una differenza statisticamente significativa nella concentrazione dei quattro EC considerati sia nei maschi (Tabella 9) che nelle femmine (Tabella 10) confermando

quindi l'attivazione dell'intero sistema ed il coinvolgimento sia dei NAE che dei MAG nella fisiopatologia della cirrosi epatica.

2.5. TRASFORMAZIONE DELLE VARIABILI OGGETTO DELLO STUDIO.

Per eliminare il fattore confondente rappresentato dal sesso, si è proceduto alla trasformazione delle variabili AEA, 2-AG, PEA ed OEA. Nello specifico ciascun valore è stato rapportato alla media della rispettiva popolazione dei maschi o delle femmine. In questo modo sono state ottenute delle nuove variabili continue indipendenti dal sesso che hanno consentito la prosecuzione dell'analisi sull'intera casistica senza la necessità di discriminare tra maschi e femmine (Tabella 11).

2.6. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E GRADO DELLA MALATTIA.

L'analisi bivariata condotta sulle variabili trasformate ha evidenziato una forte correlazione tra i livelli di PEA ed OEA e lo stadio della malattia valutato sia con il MELD che con il Child-Pugh score. Non sono invece state evidenziate correlazioni con i due più conosciuti endocannabinoidi AEA e 2-AG (Tabella 11).

2.7. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PARAMETRI EMODINAMICI.

Come indicato in Tabella 1 i parametri emodinamici della popolazione oggetto dello studio sono compatibili con il quadro della sindrome circolatoria iperdinamica, le cui caratteristiche sono una riduzione della pressione arteriosa media (MAP) ed un aumento della frequenza cardiaca (FC). L'analisi bivariata ha evidenziato una significativa correlazione negativa dei soli livelli di OEA con la MAP, tale dato è compatibile con gli effetti ipotensivi esercitati da tale molecola. È stata inoltre evidenziata una correlazione positiva tra tutti gli endocannabinoidi circolanti e la frequenza cardiaca, indice di un effetto inotropo positivo esercitato da tali molecole (Tabella 13).

2.8. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E PRESENZA DELLE PRINCIPALI COMPLICANZE DELLA CIRROSI.

2.8.1. ASCITE

L'analisi univariata ha evidenziato l'associazione dei soli livelli di OEA e la presenza di ascite ($p=0,043$). Non sono state invece evidenziate associazioni significative con le concentrazioni plasmatiche degli altri endocannabinoidi (Tabella 14).

2.8.2. ENCEFALOPATIA DI GRADO III E IV

L'analisi univariata ha evidenziato un significativo aumento dei livelli di due dei NAE, PEA ed OEA, nei pazienti con encefalopatia epatica di grado III e IV, non sono state invece osservate differenze statisticamente significative nei livelli di AEA e 2-AG (Tabella 15)

2.8.3. ITTERO

I livelli di PEA ed OEA sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con ittero rispetto ai pazienti non itterici. Nessuna differenza è invece stata rilevata per il livelli di AEA e 2-AG (Tabella 16).

2.8.4. INSUFFICIENZA RENALE

L'analisi univariata mediante il T di Student ha evidenziato una forte associazione dei soli livelli di OEA ($p=0,007$) con l'insufficienza renale definita come livello plasmatico di creatinina superiore a 1,5 mg/dl. Nessuna differenza è stata osservata nei livelli degli altri endocannabinoidi (Tabella 17). Come atteso, inoltre, la presenza di insufficienza renale è risultata associata ad un significativo aumento dei parametri biochimici che compongono il MELD (Tabella 17). Per confermare il risultato dell'analisi univariata, le variabili risultate associate all'insufficienza renale sono state testate in un modello di analisi multivariata. L'INR, la sodiemia, la bilirubinemia e la concentrazione plasmatica di OEA normalizzata sono state pertanto testate in un modello di regressione logistica binaria con backward selection. I risultati della regressione multivariata per i predittori di insufficienza renale sono mostrati in Tabella 18. Sia l'INR che la bilirubina sono stati rimossi dal modello della backward selection, al contrario sia il livelli di plasmatici di sodio che di OEA sono rimasti predittori indipendenti di insufficienza renale.

2.8.5. INFEZIONI BATTERICHE

La suddivisione dei pazienti in base alla presenza o meno di infezione batterica ha permesso di evidenziare un aumento significativo dei soli livelli di OEA nei pazienti infetti ($p=0,025$). Non sono state riscontrate differenze significative nelle concentrazioni degli altri endocannabinoidi inclusi nell'analisi (Tabella 19).

2.9. CORRELAZIONE TRA EC PLASMATICI E SOPRAVVIVENZA AD UN ANNO

L'analisi della sopravvivenza è stata effettuata con il metodo di Kaplan-Meier. Le variabili in precedenza trasformate sono state dicotomizzate in base alla mediana della rispettiva distribuzione. Per il PEA è stato individuato un valore soglia della variabile trasformata pari a 0,959, corrispondente a 36,16 pmol/ml per le femmine e 23,68 pmol/ml per i maschi, oltre il quale la mortalità entro un anno dall'arruolamento aumenta significativamente ($p=0,022$; Figura 13). Per l'OEA è stato individuato un valore soglia della variabile trasformata pari a 0,930, corrispondente a 13,06 pmol/ml per le femmine e 9,46 pmol/ml per i maschi oltre il quale la mortalità entro un anno dall'arruolamento aumenta significativamente ($p=0,016$; Figura 14). Non sono state trovate associazioni significative con i livelli di AEA e 2-AG.

La predittività di PEA ed OEA nei confronti della sopravvivenza globale è stata comparata a quella del Model for End Stage Liver Disease mediante il modello di COX stratificato per età con il metodo della backward selection. Tale analisi ha individuato l'OEA come variabile prognostica indipendente di sopravvivenza globale (Tabella 20).

Capitolo Sesto

DISCUSSIONE

Il presente studio ha avuto lo scopo di elucidare il ruolo del sistema degli endocannabinoidi nella fisiopatologia della cirrosi epatica e delle sue maggiori complicanze mediante l'impiego di due diversi protocolli, uno sperimentale ed uno clinico. Tale scelta è stata fatta in virtù di precedenti studi che hanno evidenziato la difficoltà di studiare direttamente nell'uomo la partecipazione del sistema degli EC agli eventi fisiopatologici alla base delle epatopatie croniche. Le informazioni circa i meccanismi molecolari alla base di tale coinvolgimento, derivanti dal modello animale, sono state successivamente verificate in ambito clinico al fine stabilire il loro reale valore prognostico.

1. LO STUDIO NEL MODELLO ANIMALE

Nel protocollo sperimentale la cirrosi epatica è stata indotta nei ratti mediante la somministrazione per via inalatoria dell'epatotossico CCl₄, la scelta di tale modello è stata dettata dal fatto che esso è in grado di riprodurre fedelmente la storia naturale

della malattia, dallo stadio iniziale della fibrosi fino agli stadi più avanzati caratterizzati dalla comparsa di complicanze quali lo scompenso ascitico [46]. Inoltre, i tempi d'induzione e di progressione della malattia in tale modello risultano essere compatibili con la necessità di testare l'efficacia terapeutica di approcci farmacologici innovativi.

Allo stato attuale le informazioni che abbiamo sul ruolo dei cannabinoidi endogeni nella fisiopatologia della cirrosi epatica e delle sue complicanze derivano prevalentemente da studi su modelli animali, nei quali è stato dimostrato che tale sistema svolge un importante ruolo nel processo fibrogenico [43], nella genesi delle alterazioni emodinamiche che intervengono in corso di cirrosi epatica e nello sviluppo dello scompenso ascitico [46].

Le infezioni batteriche e le alterazioni renali costituiscono altre due frequenti complicanze della cirrosi epatica. Alla base dell'insorgenza di tali complicanze, che spesso si associano ad una prognosi infausta, c'è il particolare assetto emodinamico, il diffuso stato infiammatorio e la suscettibilità individuale che caratterizzano il paziente cirrotico. Benché plausibile ipotizzare un coinvolgimento del sistema degli EC nel determinare la prognosi di tali complicanze in letteratura sono ancora poche le evidenze sperimentali al riguardo.

Lo studio in un modello sperimentale di cirrosi, delle alterazioni renali che caratterizzano gli stadi avanzati della malattia, risulta essere, tuttavia, difficoltoso.

Grazie ai modelli animali ad oggi disponibili in letteratura, è stato possibile indagare i meccanismi della sodio ritenzione che intervengono nelle fasi più avanzate delle epatopatie croniche [46, 77], tuttavia, l'assenza di un validato modello di sindrome epatorenale, rende molto difficoltoso lo studio di tale complicanza.

Il nostro interesse sperimentale si è pertanto focalizzato sullo studio dell'attivazione del sistema dei cannabinoidi endogeni in corso di infezione batterica. A tal riguardo abbiamo dimostrato che il sistema è iper-attivato dalle infezioni batteriche in corso di cirrosi epatica, e che tale attivazione assume un significato prognostico profondamente negativo, associandosi ad una mortalità del 100% entro le 6 ore dall'episodio infettivo. D'altra parte l'inibizione farmacologica del recettore CB1, ottenuta mediante una singola somministrazione di Rimonabant, è risultata essere efficace nell'abbassare il tasso di mortalità nei ratti trattati. Alla base di tale effetto protettivo vi è una modulazione sia del pathway infiammatorio che della produzione e rilascio di sostanze vasoattive.

La somministrazione di LPS (10mg/Kg) per via intraperitoneale ai ratti cirrotici ha determinato un significativo aumento sia dei NAE che dei MAG. In particolare sia i livelli di AEA che di OEA sono risultati significativamente aumentati, nei ratti trattati rispetto ai controlli basali, già dopo due ore dalla somministrazione, mentre per il 2-AG ed il PEA un innalzamento significativo si è registrato dopo sei ore dalla stessa. I meccanismi alla base di tale aumento possono essere diversi. È stato infatti dimostrato che l'esposizione all'LPS rappresenta un potente stimolo per la sintesi di

2-AG da parte delle piastrine, e di AEA da parte dei macrofagi, questi agendo in maniera paracrina ed attivando il recettore CB1 a livello vascolare contribuirebbero all'effetto ipotensivo esercitato dall'LPS [71]. Parallelamente è stato dimostrato che l'LPS inibisce l'espressione genica dell'enzima FAAH, responsabile della degradazione dei NAE, nei linfociti umani [56], suggerendo che oltre ad un'aumentata sintesi anche una ridotta degradazione contribuisce all'innalzamento dei livelli di EC circolanti. Un altro fattore che contribuisce a tale fenomeno è l'aumento della sintesi dei NAE a livello epatico. I nostri risultati circa l'analisi dell'espressione genica degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei NAE hanno evidenziato un significativo aumento dei livelli di espressione del NAPE-PLD nel fegato dei ratti cirrotici trattati con LPS rispetto ad i ratti non trattati. Al contrario l'espressione del FAAH non differisce significativamente nei tre gruppi, suggerendo che a livello epatico l'esposizione all'LPS si associa ad una produzione netta di EC.

Tali risultati sono in parte in disaccordo con dati in precedenza riportati in letteratura. Nello studio condotto da Lin e coll., infatti, la somministrazione di LPS in ratti cirrotici non si associava ad un aumento dei livelli epatici di AEA e 2-AG, al contrario un significativo aumento degli stessi era registrato nei ratti pretrattati con Ciprofloxacina. Alla luce di tali risultati gli autori concludevano che l'endotossinemia, risultante dal fenomeno della traslocazione batterica intestinale, che caratterizza gli stadi più avanzati della cirrosi, determina la massima attivazione del sistema degli endocannabinoidi a livello epatico, il quale, essendo già ad un livello di plateau, non

è più in grado di rispondere allo stimolo da parte di LPS esogeno. Tale osservazione era supportata dal fatto che i ratti pretrattati con Ciprofloxacina, allo scopo di abbattere i livelli di endotossine, rispondevano alla somministrazione di LPS aumentando il contenuto epatico di EC [72]. Tale studio si differenzia dal nostro principalmente per il metodo di induzione della cirrosi. Lin e coll. hanno infatti utilizzato un modello basato sulla legatura del dotto biliare (BDL). Tale modello, tuttavia, pur essendo rapido ed altamente riproducibile presenta alcuni svantaggi: è una metodica altamente invasiva, in quanto richiede l'esecuzione di una laparotomia; la rapida progressione della malattia non consente la precisa individuazione dello stadio al quale il trattamento viene iniziato [79]. Alla luce di ciò non si può escludere che tali animali, a causa della traslocazione batterica intestinale o a causa della procedura chirurgica, presentassero al momento della randomizzazione più elevati livelli di endotossine circolanti rispetto ai ratti usati nel nostro studio.

Alla luce dei nostri risultati, e di altri riportati in letteratura [80], appare evidente quindi che le tossine batteriche rappresentano potenti attivatori del sistema degli endocannabinoidi, e che questi ultimi potrebbero rappresentare importanti mediatori nelle alterazioni emodinamiche indotte dall'endotossinemia. Infatti, è stato dimostrato che i livelli di endotossine circolanti correlano inversamente con la pressione arteriosa media [81], tale effetto sembra essere mediato dall'aumento, LPS-indotto, della sintesi di sostanze ad azione vasodilatatrice con conseguente

disequilibrio di composti vasoattivi che si traduce in uno stimolo vasodilatatorio netto. Le alterazioni emodinamiche associate all'esposizione all'LPS spiegano in parte l'elevata mortalità osservata nei ratti cirrotici trattati con solo LPS alla dose di 10mg/kg. In tali animali, infatti, il repentino aumento dell'endotossinemia potrebbe aver contribuito a deteriorare ulteriormente il già precario assetto emodinamico associato alla cirrosi. Parallelamente l'osservazione che in ratti cirrotici, il pre-trattamento con Rimonabant riduce significativamente la mortalità a seguito della somministrazione della stessa dose di LPS, conferma pienamente l'ipotesi secondo la quale il sistema degli endocannabinoidi, ed in particolare il recettore CB1, svolge un ruolo chiave nelle alterazioni emodinamiche LPS-mediate.

Parallelamente all'azione sull'emodinamica sistemica l'LPS, ed in generale le infezioni batteriche, possono indurre una riacutizzazione del danno epatico cronico in corso di cirrosi a causa dell'attivazione dei sistemi infiammatori ed immunitari, contribuendo, in definitiva, all'insorgenza di insufficienza epatica [82]. A tal riguardo, in un successivo set di esperimenti abbiamo dimostrato che in ratti cirrotici la somministrazione di Rimonabant prima del trattamento con LPS alla dose di 5 mg/kg è in grado di ridurre l'espressione genica epatica sia di citochine pro-infiammatorie, quali IL-6 e TNF- α , che dell'isoforma inducibile dell'ossido nitrico sintasi, rispetto ai ratti trattati con solo LPS. Tali risultati suggeriscono quindi che oltre all'effetto diretto sull'emodinamica sistemica esercitato mediante il blocco dei recettori CB1 a livello vascolare, anche la modulazione del pathway infiammatorio e l'inibizione del

rilascio di sostanze vaso attive contribuiscono all'effetto protettivo del Rimonabant nei confronti della sepsi in corso di cirrosi.

2. LO STUDIO CLINICO

Mentre la letteratura ci dimostra come l'attivazione del sistema degli EC in corso di cirrosi sia un evento importante, in grado di giustificare in parte la progressione della malattia e la comparsa di alcune importanti complicanze, i dati ottenuti dagli studi clinici sono molto più contrastanti.

Il nostro gruppo ha in passato dimostrato come sia molto più difficile nell'uomo lo studio dell'attivazione del sistema degli EC ed il suo impatto sulla prognosi. Tale difficoltà deriva principalmente da:

- 1) estrema eterogeneità da un punto di vista antropologico, antropometrico e sociologico che caratterizza i pazienti affetti da cirrosi epatica. Al contrario gli studi sperimentali sono condotti su animali dello stesso sesso, della stessa età, spesso singenici e che vengono stabulati in modo tale da ridurre al minimo l'influenza di fattori ambientali;
- 2) impossibilità di testare l'effetto terapeutico di nuove molecole o di modulare selettivamente l'azione di enzimi o molecole recettoriali, al riguardo ricordiamo che l'unico inibitore selettivo del recettore CB1, il Rimonabant,

autorizzato per l'uso in clinica, è stato ritirato in quanto associato ad importanti effetti collaterali neuro-psichiatrici quali depressione e suicidio;

- 3) terapie farmacologiche alle quali i pazienti sono sottoposti, che possono mimetizzare gli effetti dell'attivazione dei cannabinoidi endogeni sul piano emodinamico, esempi al riguardo sono i farmaci beta bloccanti assunti per la prevenzione del sanguinamento e le profilassi antibiotiche.

Per valutare quindi la reale entità dell'attivazione del sistema degli EC in corso di cirrosi, riducendo al minimo l'influenza di questi fattori confondenti si è reso necessario allestire un ampio studio osservazionale. A differenza dei trials condotti in precedenza [38,83], il presente studio ha previsto l'arruolamento di 156 pazienti affetti da cirrosi epatica, rappresentativa di tutte le fasi della storia naturale della malattia e delle maggiori complicanze ad essa correlate. Parallelamente è stata arruolata una popolazione di 108 volontari non affetti da cirrosi epatica comparabile per sesso ed età alla popolazione oggetto dello studio.

L'ampia casistica raccolta ha permesso, pertanto, di dimostrare l'esistenza di differenze nei livelli circolanti di EC sesso specifiche, l'associazione tra sistema degli EC ed alcune delle maggiori complicanze della cirrosi, quali ascite, ittero, insufficienza renale ed infezioni batteriche, e di attribuire all'attivazione di tale sistema un valore prognostico negativo data la forte associazione con la sopravvivenza ad un anno dei pazienti arruolati.

Il primo dato emerso dall'analisi eseguita sulla popolazione di pazienti cirrotici e su quella dei soggetti di controllo è l'influenza del sesso sulle concentrazioni plasmatiche di endocannabinoidi. In entrambe le popolazioni i livelli dei NAE, ossia AEA, PEA ed OEA, sono risultati significativamente maggiori nelle femmine rispetto ai maschi, mentre solo nella popolazione di soggetti cirrotici il 2-AG è risultato significativamente aumentato nelle femmine. Dati riguardanti l'influenza del sesso sulle concentrazioni plasmatiche di endocannabinoidi sono già stati riportati in letteratura. In particolare Blüher e coll. hanno riportato che, in una popolazione di soggetti normopeso, le donne erano caratterizzate da livelli circolanti di AEA significativamente più alti rispetto ai maschi [84], un altro recente studio ha invece messo in evidenza che i livelli circolanti di 2-AG sono significativamente più alti nei maschi rispetto alle femmine [78]. Occorre precisare tuttavia che entrambi gli studi citati sono stati condotti su popolazioni con età media nettamente inferiore rispetto a quella delle due popolazioni oggetto del nostro studio, pertanto i differenti livelli di EC nei maschi e nelle femmine potrebbero essere il risultato della stretta correlazione tra concentrazioni di EC ed età evidenziata sia dal nostro sia da altri lavori pubblicati in letteratura [78].

Meno corposi sono invece i dati pubblicati relativi alle concentrazioni plasmatiche di PEA ed OEA. Entrambe le molecole fanno parte della stessa famiglia di composti dell'AEA, le N-acetiletanolamidi (NAE), e con l'AEA condividono sia la via di sintesi sia la via degradativa [15]. Alla luce di tale osservazione non sorprende pertanto la

stretta correlazione tra questi tre composti evidenziata nelle nostre ed in altre casistiche [78].

Data la forte associazione tra EC e sesso il confronto tra i loro livelli plasmatici nei soggetti cirrotici e nei non cirrotici è stato eseguito distintamente sulla popolazione dei maschi e delle femmine. In entrambe le popolazioni tutti e quattro gli EC oggetto dell'analisi sono risultati significativamente aumentati nei soggetti cirrotici, suggerendo un ruolo patogenetico del sistema degli EC nella cirrosi epatica. Tali dati confermano quanto riportato in precedenza in letteratura circa le concentrazioni dei NAE [38, 83], ed in aggiunta evidenziano, su una casistica più ampia, che anche i livelli di 2-AG, facente parte della famiglia dei MAG, risultano aumentati in corso di cirrosi.

Sia l'AEA che il 2-AG sono in grado di interagire con il recettore CB1 [11], la cui attivazione a livello del distretto vascolare periferico, in corso di cirrosi, è responsabile, almeno in parte, dell'azione ipotensiva degli EC [46,54]. I dati sia clinici che sperimentali ad oggi disponibili, tuttavia, supportano un ruolo patogenetico dell'AEA nelle alterazioni cardio vascolari tipiche della cirrosi epatica, mentre sono scarsi i dati riguardanti il 2-AG, che sembra essere maggiormente implicato nei processi di fibrogenesi ed infiammazione [85].

Nella nostra casistica tutti gli EC esaminati correlano positivamente con la frequenza cardiaca, a conferma dell'effetto inotropo positivo esercitato dagli

endocannabinoidi. In linea con quanto riportato in precedenza [38] non è stata evidenziata nessuna correlazione tra i livelli di AEA e la pressione arteriosa media, tuttavia una forte correlazione negativa è stata individuata tra quest'ultima ed i livelli circolanti di OEA. Anche se i dati sperimentali ad oggi disponibili individuano l'AEA come principale responsabile dell'ipotensione arteriosa, attraverso l'interazione del recettore CB1, anche l'OEA potrebbe contribuire a tale fenomeno.

Il CB1, infatti, non è il solo recettore coinvolto nella regolazione del tono vascolare, dati sperimentali suggeriscono il coinvolgimento di un'altra molecola recettoriale, il TRVP1, un canale ionico facente parte della classe dei recettori non-CB. A differenza del CB1 il TRVP1 può essere attivato anche dalle altre molecole della famiglia dei NAE, ossia il PEA e l'OEA, che quindi potrebbero contribuire allo sviluppo di ipotensione, e successivamente della sindrome circolatoria iperdinamica, attivando altre vie indipendenti dal signaling del CB1.

A supporto di tale ipotesi i livelli di PEA ed OEA, ma non quelli di AEA e 2-AG, sono risultati significativamente correlati alla gravità della malattia valutata con gli score Child-Pugh e MELD. Alla luce di tali risultati e di quelli inerenti le correlazioni con i parametri emodinamici, mentre all'OEA potrebbe essere ascritto un reale ruolo patogenetico nell'insorgenza delle alterazioni emodinamiche e nello sviluppo delle complicanze ad esse relate, l'aumento dei livelli di PEA potrebbe rappresentare invece una risposta adattativa dell'organismo nel tentativo di contrastare il diffuso processo infiammatorio tipico delle epatopatie croniche. Il PEA, infatti, esercita

tipicamente un'azione anti infiammatoria interagendo con i recettori PPAR- α , tale azione è già stata dimostrata in altre patologie [86], mentre evidenze indirette derivano da studi sperimentali che hanno dimostrato l'effetto protettivo dell'attivazione dei PPAR- α nelle epatopatie [87-89].

Ulteriori prove del coinvolgimento dell'OEA nella patogenesi delle maggiori complicanze della cirrosi epatica derivano dall'analisi univariata eseguita suddividendo la casistica in base alla presenza o meno di queste ultime. I livelli di PEA ed OEA sono risultati correlati significativamente alla presenza di encefalopatia di grado III e IV ed alla presenza di ittero. I soli livelli di OEA invece sono risultati significativamente correlati con la presenza di ascite e di insufficienza renale. In quest'ultimo caso, data la forte associazione evidenziata, è stata eseguita una regressione logistica multivariata con il metodo della backward selection. In tale analisi è stato comparato il potere predittivo dell'OEA nei confronti dell'insufficienza renale, con quella di parametri biochimici relati alla specifica complicanza ed al grado dell'insufficienza epatica. L'esito dell'analisi ha individuato l'OEA e la sodiemia come predittori indipendenti d'insufficienza renale.

L'associazione tra elevati livelli di OEA e deterioramento della funzione renale non è del tutto inattesa. I nostri risultati supportano, infatti, il coinvolgimento dell'OEA nella patogenesi delle alterazioni vascolari che negli stadi più avanzati della malattia possono contribuire all'insorgenza di insufficienza renale. Sia la perfusione renale sia la filtrazione glomerulare dipendono, infatti, da fattori sistemici e locali, tra cui la

gittata cardiaca, la pressione arteriosa media, il tono basale della tonaca muscolare delle arteriole renali ed i meccanismi vaso-regolatori locali [90]. Negli stadi più avanzati della cirrosi la vasodilatazione periferica determina una riduzione della volemia efficace e l'attivazione di sistemi compensatori neuro ormonali che inducono la ritenzione renale di sodio ed acqua. Il perpetuarsi di tale fenomeno conduce ad una progressiva riduzione della perfusione dell'organo ed all'insorgenza di insufficienza renale [52].

Infine l'analisi della sopravvivenza eseguita con il metodo di Kaplan-Meier ha messo in evidenza un'associazione tra quest'ultima ed i livelli di PEA ed OEA suggerendo che le loro concentrazioni plasmatiche possono assumere un significato prognostico in corso di cirrosi, tale ipotesi è stata successivamente confermata per il solo OEA. È stato, infatti, testato il valore predittivo delle tre variabili risultate associate alla sopravvivenza nella nostra casistica, ossia OEA, PEA e MELD. L'analisi eseguita utilizzando il modello di COX stratificato in base all'età ha individuato l'OEA come variabile prognostica indipendente di sopravvivenza globale.

In conclusione i risultati del presente studio confermano e rafforzano le evidenze sperimentali presenti in letteratura circa il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi nella patogenesi della cirrosi epatica e delle sue complicanze.

I dati ottenuti nel protocollo sperimentale costituiscono il razionale per uno studio più approfondito degli eventi molecolari che stanno alla base dell'effetto protettivo

dell'antagonismo del recettore CB1 nei confronti delle infezioni batteriche. La nuova classe di composti antagonizzanti il CB1 con azione limitata al solo comparto periferico potrebbe in tal senso rappresentare una nuova strategia terapeutica per i pazienti affetti da cirrosi epatica complicata da infezione batterica.

Lo studio clinico conferma invece il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi nella fisiopatologia delle principali complicanze della cirrosi come in precedenza dimostrato da studi sperimentali nel ratto. Tali dati hanno inoltre evidenziato la presenza di fattori antropologici in grado di modulare il sistema degli endocannabinoidi, rendendo più difficile, nell'uomo, la comprensione degli effetti a breve termine di tali composti ed il significato clinico del loro aumento in corso di cirrosi epatica. Parallelamente la forte associazione tra l'OEA e l'insufficienza renale, ed il suo potere predittivo nei confronti della sopravvivenza globale costituiscono un forte razionale per uno studio approfondito e la comprensione dei meccanismi d'azione di tale molecola nelle epatopatie croniche.

BIBLIOGRAFIA

1. Mechoulam R, Gaoni Y. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.* Mar 1967;12:1109-11.
2. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988 Nov;34(5):605-13.
3. Gérard, C. M.; Mollereau; Vassart; Parmentier (1991). "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis". *The Biochemical journal* 279 (1): 129–134.
4. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* Dec 18 1992;258(5090):1946-9.
5. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365(6441):61–5.

6. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, et al.. "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (October 1995)215 (1): 89–97.
7. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 1994 Aug 22;350(2-3):240-4.
8. Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 224–38.
9. Lo Verme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci* 2005; 77: 1685–98.
10. Re G, Barbero R, Miolo A, Di Marzo V. Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Vet J* 2007; 173: 21–30.
11. Piomelli D 2003 The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873–884
12. Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(3):134-40.

13. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.* 2004 Mar;141(5):765-74.
14. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 27(1):1-4,2006.
15. Alexander SP & Kendall DA. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *British Journal of Pharmacology* 2007; 152: 602–623.
16. Fu J, Gaetani S, Oveisi F et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 2003; 425: 90–93.
17. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM et al. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metabolism* 2006; 3: 167–175.
18. LoVerme J, La Rana G, Russo R et al. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sciences* 2005; 77: 1685–1698.
19. Di Marzo V, Melck D, Orlando P et al. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochemical Journal* 2001; 358:249–255.

20. Costa B, Comelli F, Bettoni I et al. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and antihyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain* 2008; 139(3): 541–550.
21. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995;232:54-61.
22. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006;27:73-100.
23. Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: Evidence for new players. *AAPS J* 2006;8:298-306.
24. Daaka Y, Klein TW, Friedman H. Expression of cannabinoid receptor mRNA in murine and human leukocytes. *Adv Exp Med Biol.* 373:91- 96,1995.
25. Schatz AR, Lee M, Condie RB, et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142(2):278-87,1997.

26. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 2006 Feb 3;1071(1):10-23. Epub 2006 Feb 9.
27. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Aug;1074:514-36.
28. Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G Thermo TRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* (2007) 42:427–438
29. Szallasi A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 110-121.
30. Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* (2008) 139:225–236
31. Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2699–2704

32. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092–1101
33. Willson T, Brown P, Sternbach D, Henke B. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000; 43(4):527-550.
34. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001; 169(3):453-459.
35. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-6.
36. Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 1998;82:1131-49.
37. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. *Endocannabinoids and their receptors in the liver. Am J Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:9-12.
38. Caraceni P, Viola A, Piscitelli F, Giannone F, Berzigotti A, Cescon M, et al. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver Int* 2010;30:816-25.

39. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:68-92.
40. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic Fibrosis: molecular mechanism and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:605-28.
41. Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, et al. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;42:63-71.
42. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-6.
43. Giannone FA, Baldassarre M, Domenicali M, Zaccherini G, Trevisani F, Bernardi M, et al. Reversal of liver fibrosis by the antagonism of endocannabinoid CB1 receptor in a rat model of CCl(4)-induced advanced cirrhosis. *Lab Invest* 2012;92:384-95.
44. Julien B, Grenard P, Texeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742-55.

45. Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, et al. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology* 2010;52:1046-59
46. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Pertosa AM, Principe A, Zambruni A, et al. Cannabinoid type 1 receptor antagonism delays ascites formation in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:341-9.
47. Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morals-Ruiz M, Alvarez CE, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:475-83.
48. Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Wang YW, et al. Roles of anandamide in the hepatic microcirculation in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;290:328-34.
49. Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Wang YW, et al. Effect of chronic CB1 receptor antagonism on livers of rats with biliary cirrhosis. *Clin Sci* 2007;112:533-42.
50. Murray F. J., Dawson A. M., Sherlock S. "Circulatory changes in chronic liver disease" *Am J Med* 1958; 24: 358-67
51. Jiménez W., Martínez-Pardo A., Arroyo V., Bruix J., Rimola A., Gaya J., Rivera F., et al. "Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention

- and ascites formation in rats with experimental cirrhosis" *Hepatology* 1985; 5: 245-50.
52. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:1151-7.
53. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43 2 Suppl 1:121-31.
54. Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001;7:827-32.
55. Ros J, Claria J, To-Figueras J, Planaguma A, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, et al. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:85-93.
56. Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, et al. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:321-8.

57. Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, et al. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 2003;278:45034-9.
58. Domenicali M, Ros J, Fernández-Varo G, Cejudo-Martín P, Crespo M, Morales-Ruiz M, et al. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut* 2005;54:522-7.
59. Bernardi M, Colantoni A, Caraceni P, Sica G, Trevisani F. Natural course and physiopathology of ascites in the cirrhotic patient. *Ann Ital Med Int* 1996;11 Suppl 2:30-38.
60. Magen I, Avraham Y, Berry E, Mechoulam R. Endocannabinoids in liver disease and hepatic encephalopathy. *Curr Pharm Des* 2008;14:2362-9.
61. Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev O, Silberman I, et al. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 2006;21:237-45.
62. Dagon Y, Avraham Y, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM. Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 2007;21:2431-41.

63. Avraham Y, Zolotarev O, Grigoriadis NC, Poutahidis T, Magen I, Vorobiev L, et al. Cannabinoids and capsaicin improve liver function following thioacetamide-induced acute injury in mice. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3047-3056.
64. Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. *J Hepatol* 2009;51:528-534.
65. Wong F et al. International Ascites Club. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005; 54: 718-25
66. Borzio M et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 41-8
67. Fernández J et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35: 140-8
68. Tandon P et al. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 26-42
69. Gustot T et al. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology* 2009; 50: 2022-33
70. Sen S et al. The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure. *Liver* 2002; 22: 5-13

71. Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002 Mar;1(1):53-63.
72. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet and macrophages derived endogenous cannabinoid are involved in endotoxine induced hypotension. *Faseb J* 1998;12:1035-44.
73. Lin HC, Yang YY, Tsai TH, Huang CM, Huang YT, Lee Fy, et al. The relationship between endotoxemia and hepatic endocannabinoids in cirrhotic rats with portal hypertension. *J of Hepatol* 2011;54:1145-53.
74. Domenicali M, Giannone FA, Baldassarre M, Di Pompo G, Bernardi M, Caraceni P. Protective effect of a cannabinoid CB1-receptor antagonist in a rat model of cirrhosis complicated by sepsis. *Hepatology* 2009; 50 Suppl 4:335-6.
75. Jiménez, W., Clària, J., Arroyo, V. and Rodés, J. "Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease" *J Gastroenterol Hepatol* (7:1), 1992, pp. 90—97
76. Williams, A. T. and Burk, R. F. "Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury.," *Semin Liver Dis* (10:4), 1990, pp. 279--284.
77. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., DuBose, C. M. and Janzen, E. G. "Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism.

Observation of lipid radicals in vivo and in vitro," J Biol Chem (259:4), 1984, pp. 2135--2143.

78. Domenicali M., Caraceni P., Principe A., Pertosa A.M., Ros J., Chieco P., Trevisani F., et al. "A novel sodium overload test predicting ascites decompensation in rats with CCl₄-induced cirrhosis" J Hepatology 2005; 43: 92-7.
79. Fanelli F, Di Lallo VD, Belluomo I, De lasio R, Baccini M, Casadio E, et al. Estimation of reference intervals of five endocannabinoids and endocannabinoid related compounds in human plasma by two dimensional-LC/MS/MS. J Lipid Res. 2012 Mar;53(3):481-93.
80. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. J Hepatol. 2009 Dec;51(6):991-9.
81. Maccarrone M., Bari M., Battista N., Finazzi-Agrò A. "Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation" Curr Drug Targ Inflamm Allergy 2002; 1: 53-63.
82. Wiest R, Cadelina G, Milstein S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann R.J. "Bacterial traslocation up-regolates GTP-Cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats" Hepatology 2003; 38: 1508-1515.

83. Han D.W. "Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure"
World J Gastroenterol 2002; 8: 961-965.
84. Fernández-Rodríguez CM, Romero J, Petros TJ, Bradshaw H, Gasalla JM, Gutiérrez ML, et al. Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. Liver Int. 2004 Oct;24(5):477-83.
85. Blüher M, Engeli S, Klötting N, Berndt J, Fasshauer M, Bátkai S, et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. Diabetes. 2006 Nov;55(11):3053-60.
86. Tam J, Liu J, Mukhopadhyay B, Cinar R, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoids in liver disease. Hepatology. 2011 Jan;53(1):346-55. doi: 10.1002/hep.24077. Review.
87. Paterniti I, Impellizzeri D, Crupi R, Morabito R, Campolo M, Esposito E, Cuzzocrea S. Molecular evidence for the involvement of PPAR- δ and PPAR- γ in anti-inflammatory and neuroprotective activities of palmitoylethanolamide after spinal cord trauma. J Neuroinflammation. 2013 Feb 1;10:20. doi: 10.1186/1742-2094-10-20.

88. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1286–96.
89. Toyama T, Nakamura H, Harano Y, et al. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 697–704.
90. Alwayn IP, Andersson C, Lee S, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases increases PPAR-alpha and IL-6 and prevents dietary-induced hepatic steatosis and injury in a murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1011–9.
91. Ginès P, Schrier RW. Renal Failure in Cirrhosis. *N Engl J Med* 2009; 361:1279-1290

Appendice I

FIGURE

FIGURA 8. Concentrazioni plasmatiche di AEA (Pannello A), 2-AG (Pannello B), PEA (Pannello C) ed OEA (Pannello D) in ratti cirrotici non trattati e dopo 2 e 6 ore dalla somministrazione per via intraperitoneale di una dose di LPS pari a 5 mg/kg.

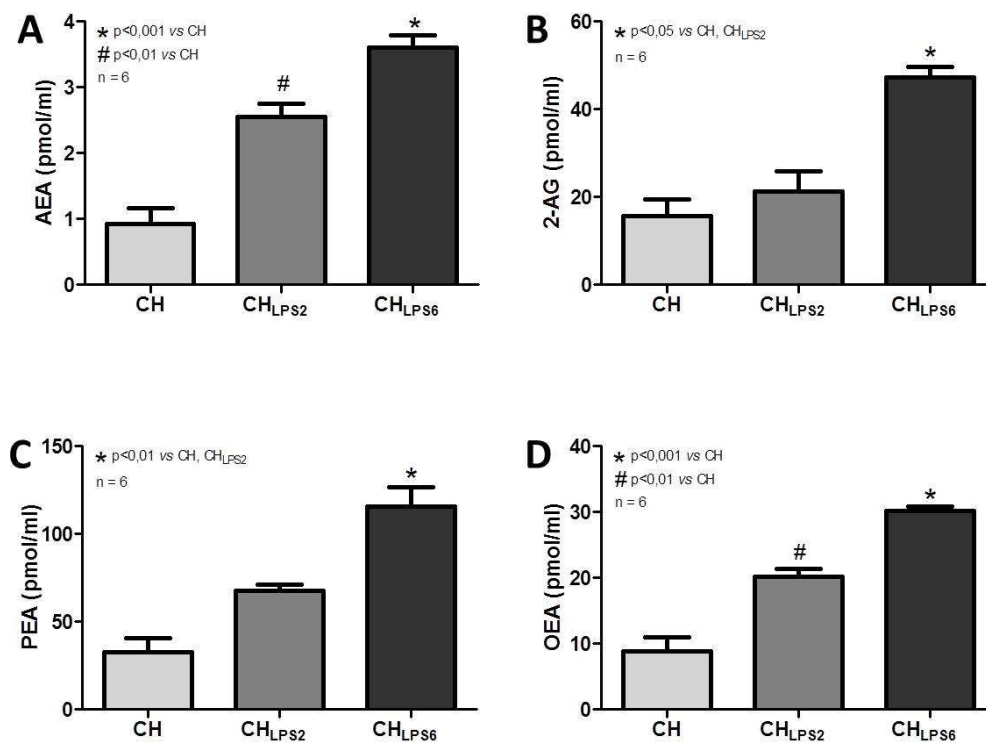


FIGURA 9. Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier per i due gruppi di ratti trattati con LPS per via intraperitoneale alla dose di 10mg/kg e placebo (CH_{LPS.PL}), o con LPS per via intraperitoneale alla dose di 10mg/kg e Rimonabant alla dose di 10mg/kg tramite gavaggio (CH_{LPS.SR}).

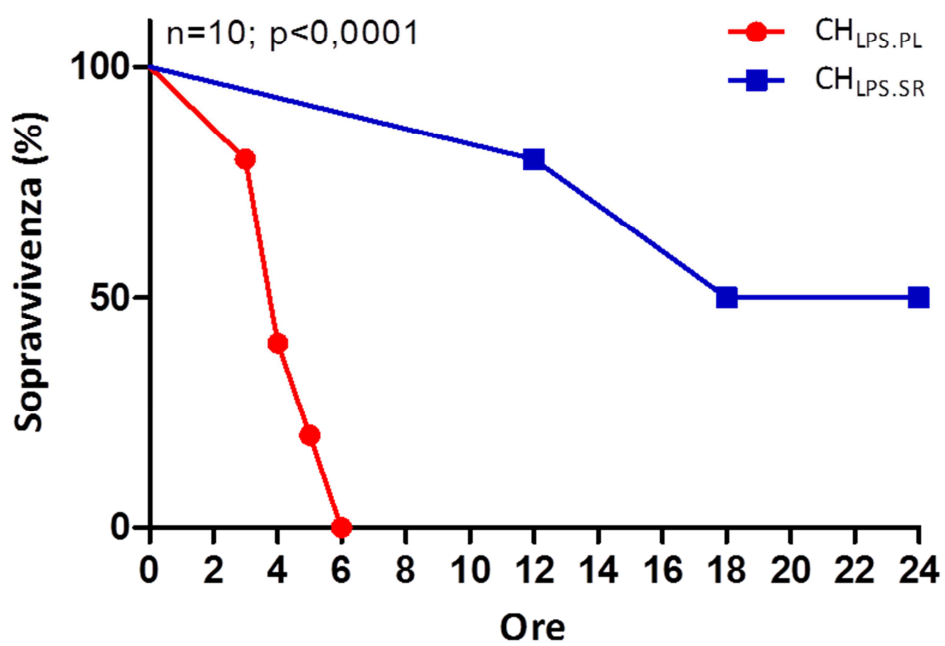


FIGURA 10. Espressione genica epatica degli enzimi coinvolti nella sintesi (NAPE-PLD; **A**) e degradazione (FAAH; **B**) dei NAE dopo 6 e 24 ore dalla somministrazione di LPS in ratti trattati con placebo (PL) o Rimonabant (SR). I dati sono espressi come media \pm SEM.

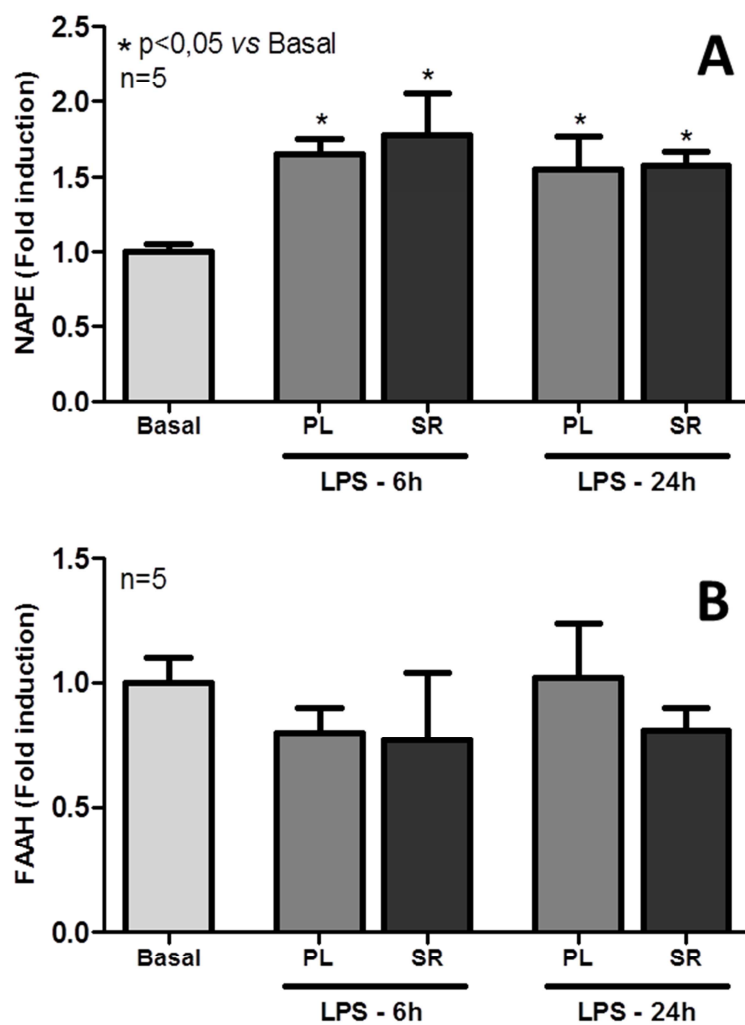


FIGURA 11. Espressione genica epatica delle citochine pro infiammatorie TNF- α (A) ed IL-6 (B) dopo 6 e 24 ore dalla somministrazione di LPS in ratti trattati con placebo (PL) o Rimonabant (SR). I dati sono espressi come media \pm SEM.

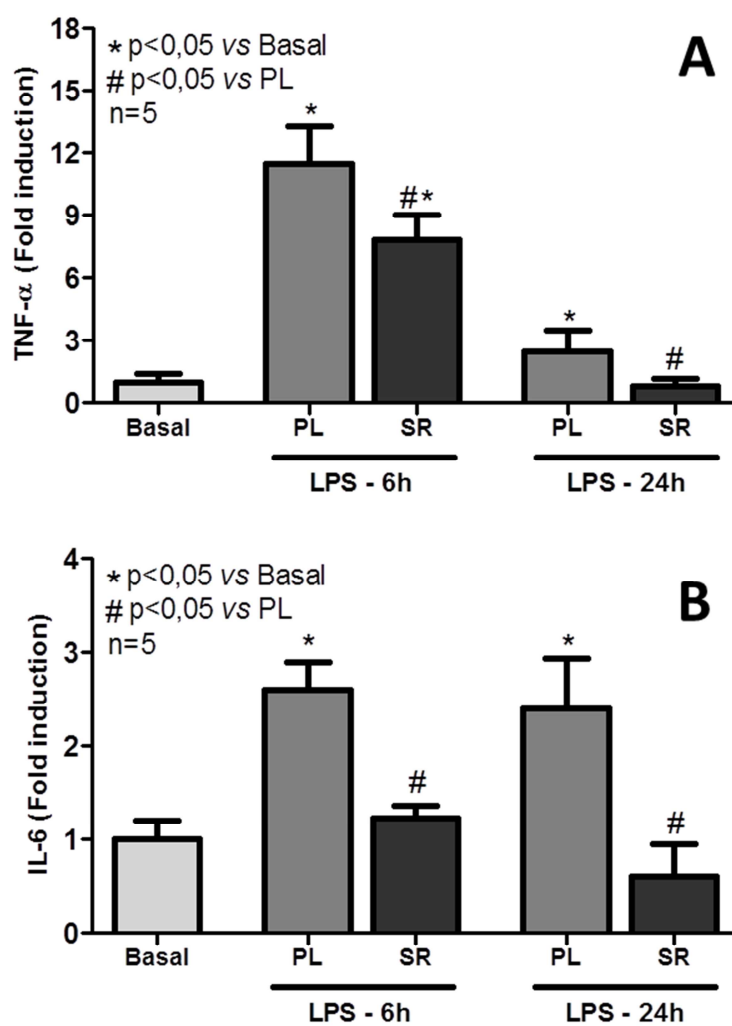


FIGURA 12. Espressione genica epatica dell'isoforma inducibile (iNOS; **A**) ed endoteliale (eNOS; **B**) dell'enzima ossido nitrico sintasi dopo 6 e 24 ore dalla somministrazione di LPS in ratti trattati con placebo (PL) o Rimonabant (SR). I dati sono espressi come media \pm SEM.

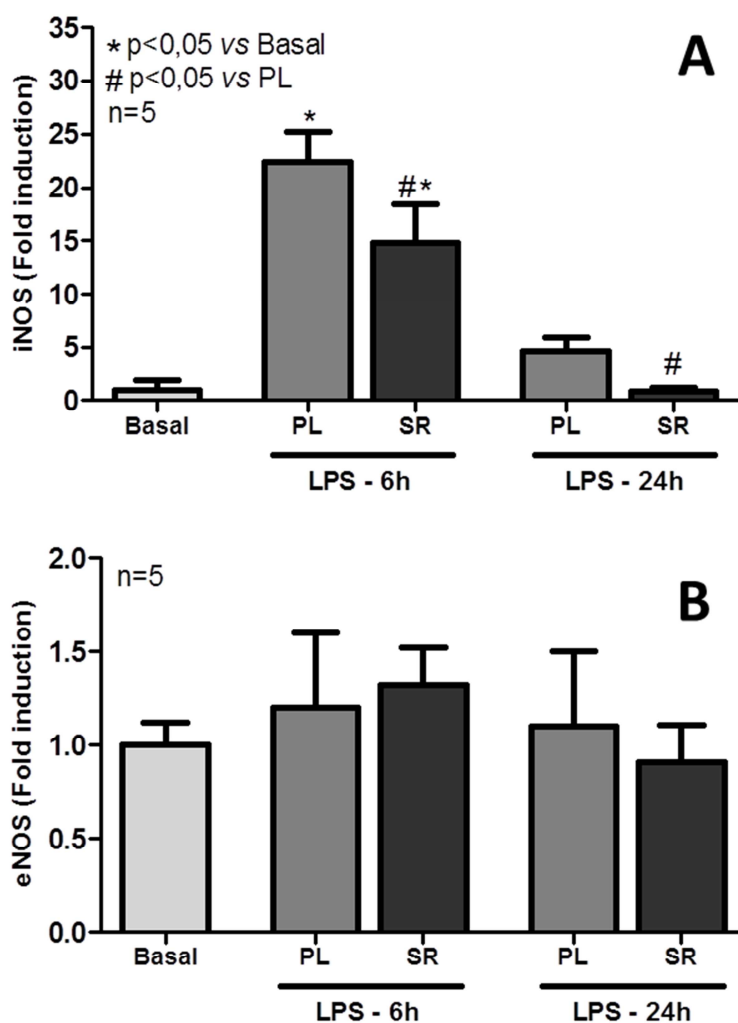


FIGURA 13. Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per i due gruppi di pazienti individuati dalla mediana della distribuzione della variabile PEA trasformata (1:PEA \leq 0,959; 2:PEA $>$ 0,959).

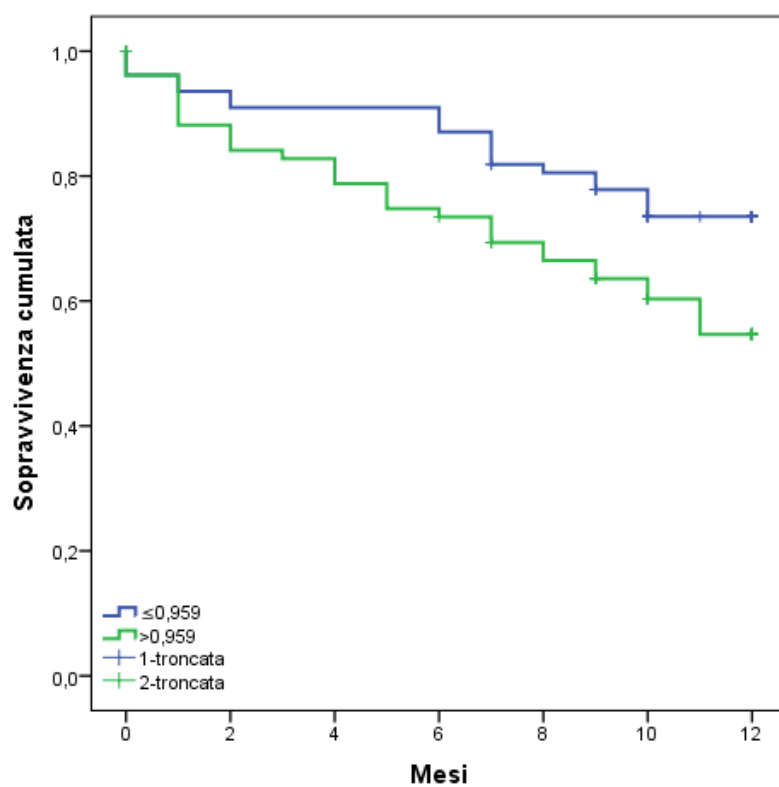
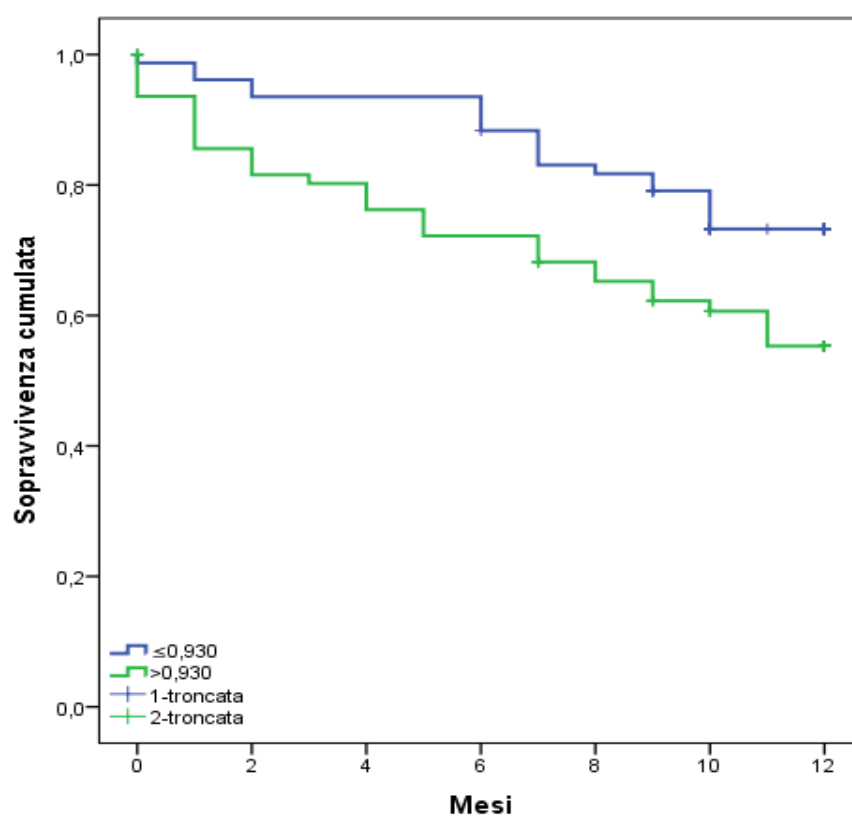


FIGURA 14. Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per i due gruppi di pazienti individuati dalla mediana della distribuzione della variabile OEA trasformata (1:OEA \leq 0,930; 2:OEA $>$ 0,930).



Appendice II

TABELLE

TABELLA 2. Parametri demografici, antropometrici e clinico-laboratoristici dei pazienti cirrotici e dei volontari non cirrotici.

	<i>Volontari non cirrotici</i> <i>(N=108)</i>	<i>Pazienti cirrotici</i> <i>(N=156)</i>
Età (anni)	59,63 ± 11,18*	60,25 ± 11,52
Sesso (M/F)	70/38 (65%/35%)*	103/53 (66%/34%)
Eziologia (Virale/Alcolica/altro)	-	78/41/37 (50%/27%/23%)
MELD	-	15,93 ± 7,20
Child-Pugh (A/B/C)	-	37/84/32 (24%/54%/22%)
Child-Pugh Score	-	8,02 ± 1,93
Pressione arteriosa media (mmHg)	-	73,33 ± 14,16
Frequenza cardiaca (battiti/min)	-	83,58 ± 10,85
Bilirubina (mg/dl)	-	3,89 ± 5,40
Albumina (g/dl)	-	3,34 ± 0,65
Creatinina (mg/dl)	-	1,10 ± 0,64
Sodio (mmol/dl)	-	137,88 ± 4,89
INR	-	1,54 ± 0,43
Ittero	-	15 (10%)
Encefalopatia di grado III-IV	-	14 (9%)
Sanguinamento varici	-	9 (6%)
Ascite	-	70 (45%)
Infezioni batteriche	-	43 (28%)
Insufficienza renale (creat>1,5)	-	31 (20%)
Beta bloccanti	-	81 (52%)
Profilassi antibiotica	-	38 (24%)

TABELLA 3. Differenze nella concentrazione plasmatica di endocannabinoidi legate al sesso nei volontari non cirrotici.

	Maschi (n=70)	Femmine (n=38)	p
AEA (pmol/ml)	1,03±0,25	1,30±0,46	0,001
2-AG (pmol/ml)	2,08±1,17	1,88±0,84	0,325
PEA (pmol/ml)	15,65±2,84	18,81±5,12	0,001
OEA (pmol/ml)	4,84±1,27	6,44±2,19	0,001

TABELLA 4. Correlazione tra il livelli circolanti dei differenti endocannabinoidi appartenenti alle famiglie dei NAE e dei MAG nei volontari non cirrotici.

	AEA	2-AG	PEA	OEA	
AEA	1	0,139	0,877	0,733	<i>Correlazione di Pearson</i>
		<i>0,150</i>	0,001	0,001	<i>p</i>
2-AG	0,139	1	0,136	0,015	<i>Correlazione di Pearson</i>
	<i>0,150</i>		<i>0,161</i>	<i>0,874</i>	<i>p</i>
PEA	0,877	0,136	1	0,790	<i>Correlazione di Pearson</i>
	0,001	<i>0,161</i>		0,001	<i>p</i>
OEA	0,733	0,015	0,790	1	<i>Correlazione di Pearson</i>
	0,001	<i>0,874</i>	0,001		<i>p</i>

TABELLA 5. Correlazione tra concentrazione plasmatica di endocannabinoidi ed età nei volontari non cirrotici.

	Correlazione di Pearson	p
AEA (pmol/ml)	0,243	0,011
2-AG (pmol/ml)	-0,196	0,042
PEA (pmol/ml)	0,213	0,027
OEA (pmol/ml)	0,371	0,001

TABELLA 6. Differenze nella concentrazione plasmatica di endocannabinoidi legate al sesso nei pazienti cirrotici.

	Maschi (n=103)	Femmine (n=53)	p
AEA (pmol/ml)	1,33±0,59	1,67±0,76	0,001
2-AG (pmol/ml)	3,82±4,40	6,84±11,18	0,017
PEA (pmol/ml)	24,69±7,94	31,71±13,00	0,001
OEA (pmol/ml)	10,17±4,74	13,91±6,35	0,001

TABELLA 7. Correlazione tra i livelli circolanti dei differenti endocannabinoidi appartenenti alle famiglie dei NAE e dei MAG nei pazienti cirrotici.

	AEA	2-AG	PEA	OEA	
AEA	1	0,223	0,582	0,668	<i>Correlazione di Pearson</i>
		0,005	0,001	0,001	<i>p</i>
2-AG	0,223	1	0,015	0,052	<i>Correlazione di Pearson</i>
		0,005	0,851	0,517	<i>p</i>
PEA	0,582	0,015	1	0,855	<i>Correlazione di Pearson</i>
		0,851		0,001	<i>p</i>
OEA	0,668	0,052	0,855	1	<i>Correlazione di Pearson</i>
		0,517	0,001		<i>p</i>

TABELLA 8. Correlazione tra concentrazione plasmatica di endocannabinoidi ed età nei pazienti cirrotici.

	Correlazione di Pearson	p
AEA (pmol/ml)	0,320	0,001
2-AG (pmol/ml)	0,207	0,009
PEA (pmol/ml)	0,090	0,262
OEA (pmol/ml)	0,148	0,065

TABELLA 9. Differenze nella concentrazione plasmatica di endocannabinoidi tra maschi cirrotici (CH) e maschi non cirrotici (CT).

	Maschi CH (n=103)	Maschi CT (n=70)	p
AEA (pmol/ml)	1,33±0,59	1,03±0,25	0,001
2-AG (pmol/ml)	3,82±4,40	2,08±1,17	0,001
PEA (pmol/ml)	24,69±7,94	15,65±2,84	0,001
OEA (pmol/ml)	10,17±4,74	4,84±1,27	0,001

TABELLA 10. Differenze nella concentrazione plasmatica di endocannabinoidi tra femmine cirrotiche (CH) e femmine non cirrotiche (CT).

	FEMMINE CH (N=53)	FEMMINE (CT) (N=38)	P
AEA (pmol/ml)	1,67±0,76	1,30±0,46	0,008
2-AG (pmol/ml)	6,84±11,18	1,88±0,84	0,008
PEA (pmol/ml)	31,71±13,00	18,81±5,12	0,001
OEA (pmol/ml)	13,91±6,35	6,44±2,19	0,001

TABELLA 11. Valori delle variabili trasformate nei pazienti maschi e femmine affetti da cirrosi epatica.

	Maschi (n=103)	Femmine (n=53)	p
AEA (ratio)	1,00±0,45	1,00±0,45	1,000
2-AG (ratio)	1,00±1,51	1,00±1,63	1,000
PEA (ratio)	1,00±0,32	1,00±0,41	1,000
OEA (ratio)	1,00±0,47	1,00±0,46	1,000

TABELLA 12. Correlazione tra i livelli di EC circolanti ed il MELD e CHID-PUGH score.

	MELD		CHILD-PUGH	
	Correlazione di Pearson	p	Correlazione di Pearson	p
AEA (ratio)	0,006	0,937	-0,082	0,311
2-AG (ratio)	-0,11	0,892	-0,087	0,285
PEA (ratio)	0,402	0,001	0,320	0,001
OEA (ratio)	0,429	0,001	0,349	0,001

TABELLA 13. Correlazione tra i livelli di EC circolanti e i parametri emodinamici.

	MAP		FC	
	Correlazione di Pearson	p	Correlazione di Pearson	p
AEA (ratio)	-0,083	0,300	0,205	0,010
2-AG (ratio)	0,147	0,067	0,211	0,008
PEA (ratio)	-0,141	0,078	0,220	0,006
OEA (ratio)	-0,236	0,003	0,241	0,002

TABELLA 14. Differenze nei livelli di EC circolanti nei pazienti con e senza ascite.

	Con ascite (n=70)	Senza ascite (n=86)	p
AEA (ratio)	1,01±0,49	0,99±0,41	0,789
2-AG (ratio)	1,04±1,67	0,97±0,98	0,741
PEA (ratio)	1,02±0,36	0,98±0,35	0,474
OEA (ratio)	1,08±0,50	0,93±0,42	0,043

TABELLA 15. Differenze nei livelli di EC circolanti nei pazienti con e senza encefalopatia di grado III e IV.

	Encefalopatici (n=14)	Non encefalopatici (n=142)	p
AEA (ratio)	1,08±0,52	0,99±0,44	0,566
2-AG (ratio)	0,73±0,78	1,03±1,37	0,236
PEA (ratio)	1,23±0,48	0,98±0,33	0,011
OEA (ratio)	1,29±0,60	0,97±0,44	0,012

TABELLA 16. Differenze nei livelli di EC circolanti nei pazienti con e senza ittero.

	Itterici (n=15)	Non itterici (n=141)	p
AEA (ratio)	0,92±0,39	1,01±0,46	0,418
2-AG (ratio)	0,69±0,48	1,03±1,39	0,053
PEA (ratio)	1,21±0,36	0,97±0,34	0,031
OEA (ratio)	1,27±0,46	0,97±0,45	0,030

TABELLA 17. Differenze nei livelli di EC circolanti, nella concentrazione ematica di sodio e bilirubina, e nell'INR nei pazienti con insufficienza renale (creatinina>1,5mg/dl) e con normale funzionalità renale.

	Creatinina>1,5mg/dl (n=31)	Creatinina<1,5mg/dl (n=125)	p
Sodio (mmol/dl)	135,35±5,57	138,51±4,51	0,006
Bilirubina (mg/dl)	5,78±7,27	3,43±4,75	0,030
INR	1,73±0,45	1,51±0,43	0,018
AEA (ratio)	1,01±0,46	0,99±0,45	0,889
2-AG (ratio)	1,04±1,58	0,99±1,27	0,866
PEA (ratio)	1,06±0,41	0,98±0,33	0,332
OEA (ratio)	1,19±0,60	0,95±0,40	0,007

TABELLA 18. Regressione logistica con metodo backward selection per i predittori indipendenti di insufficienza renale.

		B	E.S.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Passo 1 ^a	INR	-,552	,599	,847	1	,357	,576
	Bilirubina	-,004	,046	,008	1	,927	,996
	OEA (ratio)	-,615	,473	1,692	1	,193	,540
	Sodio	,111	,047	5,504	1	,019	1,117
	Costante	-12,273	6,657	3,399	1	,065	,000
Passo 2 ^a	INR	-,588	,452	1,689	1	,194	,556
	OEA (ratio)	-,619	,471	1,725	1	,189	,538
	Sodio	,111	,047	5,567	1	,018	1,118
	Costante	-12,269	6,650	3,404	1	,065	,000
Passo 3 ^a	OEA (ratio)	-,779	,458	2,898	1	,089	,459
	Sodio	,118	,047	6,293	1	,012	1,126
	Costante	-14,020	6,578	4,543	1	,033	,000

TABELLA 19. Differenze nei livelli di EC circolanti nei pazienti con o senza infezione batterica.

	Infetti (n=43)	Non infetti (n=113)	p
AEA (ratio)	1,08±0,54	0,97±0,41	0,148
2-AG (ratio)	1,21±1,60	0,92±1,21	0,286
PEA (ratio)	1,03±0,39	0,99±0,33	0,587
OEA (ratio)	1,15±0,52	0,94±0,43	0,025

TABELLA 20. Analisi della sopravvivenza con il modello della regressione di Cox stratificato per età.

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Passo 1	MELD	,041	,029	1,985	1	,159	1,042
	PEA (ratio)	-,304	,960	,100	1	,751	,738
	OEA (ratio)	1,235	,740	2,788	1	,095	3,438
Passo 2	MELD	,041	,029	1,959	1	,162	1,042
	OEA (ratio)	1,055	,474	4,949	1	,026	2,873
Passo 3	OEA (ratio)	1,427	,406	12,351	1	,000	4,165

