



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE "G. PATRASSI"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: EPATOLOGIA CLINICA

CICLO XXIV

TITOLO TESI

**EFFETTO DELL'INFUSIONE DI ALBUMINA IN UN MODELLO
SPERIMENTALE DI CIRROSI CON ASCITE.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

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

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Angeli

Dottoranda: Dr.ssa Alessia Bortoluzzi

*A tutti coloro che
mi hanno sempre sostenuto*

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	1
1.1 NOTE STORICHE	1
1.2 DEFINIZIONE	3
1.3 MECCANISMI PATOGENETICI	3
1.3.1 Alterazione di funzione dei recettori β -adrenergici	6
1.3.2 Alterazione del Pathway di NO	7
1.3.3 Le funzioni del Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB)	9
1.4 ALBUMINA	12
2. SCOPO DELLO STUDIO	13
3. MATERIALI E METODI	15
3.1 ANIMALI	15
3.2 INDUZIONE DELLA CIRROSI	15
3.3 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	16
3.4 DETERMINAZIONE DELLA CONTRATTILITA'	17
3.4.1 Preparazione dei cuori	17
3.4.2 Perfusionazione del cuore isolato con il modello Langendorff	17

3.4.3 Registrazione dei parametri funzionali	19
3.5 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO NEL TESSUTO CARDIACO	20
3.5.1 Estrazione dell'RNA	20
3.5.2 Quantificazione dell'RNA totale	21
3.5.3 Retrotrascrizione dell'RNA totale (RT)	21
3.5.4 PCR Real-Time Quantitativa (Q-PCR)	22
3.6 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO NEL TESSUTO CARDIACO	25
3.6.1 Estrazione delle proteine	25
3.6.2 Dosaggio delle proteine	26
3.6.3 Espressione di Recettore Adrenergico- β 1 (β 1-ADR), Recettore Adrenergico- β 2 (β 2-ADR), Proteina $G\alpha$ i2, Proteina Gs, Adenilato ciclasasi 3 (Adcy3)	26
3.7 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DEL SISTEMA MULTIENZIMATICO NADPH-OSSIDASI NEL TESSUTO CARDIACO	28
3.8 DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI TNF- α NEL PLASMA, NELL'ASCITE E NEL TESSUTO CARDIACO	29
3.9 DETERMINAZIONE DELLA TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NF-kB	29
3.10 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI iNOS NEL TESSUTO CARDIACO	30

3.11 ANALISI STATISTICA	30
4. RISULTATI	31
4.1 CONTRATTILITA' CARDIACA	31
4.2 ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO	34
4.3 ESPRESSIONE PROTEICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO	35
4.4 ATTIVAZIONE DELLE NAD(P)H OSSIDASI	37
4.5 ATTIVAZIONE DI NF-kB	38
4.6 ESPRESSIONE DI iNOS	39
4.7 QUANTIFICAZIONE DI TNF- α	40
5. DISCUSSIONE	43
6. BIBLIOGRAFIA	49

Indice

RIASSUNTO

Background: La cirrosi epatica è associata ad alterazioni cardiovascolari che comprendono una circolazione iperdinamica, caratterizzata da una ridotta resistenza periferica e splancnica, bassa pressione media arteriosa e un'aumentata portata cardiaca. Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato la presenza di un'insufficienza cardiaca latente chiamata "cardiomiopatia cirrotica", che è caratterizzata da una disfunzione diastolica, anomalie elettrofisiologiche, una compromessa contrattilità cardiaca in risposta a stress farmacologici o fisiologici, malgrado l'aumentata portata cardiaca di base. L'infusione di albumina viene usata nella gestione dei pazienti con cirrosi epatica avanzata allo scopo di migliorare il volume circolante efficace attraverso un incremento della pressione oncotica. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che l'azione dell'albumina è più complessa ed è legata alla sua azione antiossidante e alla sua capacità di legare citochine e ossido nitrico.

Scopo: Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare in un modello animale di cirrosi avanzata il ruolo del sistema beta adrenergico, dello stress ossidativo e del TNF- α sulla patogenesi della miocardiopatia cirrotica.

Materiali e metodi: Sono stati utilizzati ratti maschi Wistar Kyoto 30 di controllo e 30 trattati con CCl₄, per indurre la cirrosi. In ogni gruppo 15 ratti sono stati trattati con albumina (1.5 g/Kg tre giorni prima del sacrificio e 0.5g/Kg un giorno prima) e 15 con lo stesso volume di soluzione fisiologica (come intervento sham). Il cuore è stato prelevato e la contrattilità è stata misurata stimolando il cuore con concentrazioni crescenti di isoproterenolo (da 10⁻¹⁰ a 10⁻⁶ M). Sul tessuto cardiaco

è stata analizzata l'espressione genica e proteica, mediante Real Time PCR e Western Blot rispettivamente, dei recettori beta adrenergici (beta 1 e beta2), della Adenilato ciclasi (Adcy3), della proteina G inibitoria α 2(Gai2), dell'isoforma inducibile della ossido nitrico sintetasi (iNOS) e delle NAD(P)H ossidasi. Abbiamo poi analizzato la concentrazione plasmatica e nel liquido ascitico del Tumor necrosis factor- α (TNF- α) e la traslocazione nel nucleo del fattore nucleare NF-kB, attraverso kit ELISA.

Risultati: La contrattilità cardiaca nei ratti ascitici era significativamente diminuita rispetto ai controlli ($p < 0.01$). Questa scoperta è stata associata con: a) un'aumentata espressione genica e proteica di beta2-AR ($p < 0.05$) e di Gai2 ($p < 0.05$), b) la diminuzione dell'espressione genica di Adcy3, c) un'aumentata attività delle NAD(P)H ossidasi, d) un'aumentata concentrazione plasmatica e nel liquido ascitico di TNF- α ($p < 0.05$), e) un'aumentata traslocazione nucleare di NF-kB e f) un'aumentata espressione proteica di iNOS. Dopo il trattamento con albumina la contrattilità cardiaca dei ratti ascitici è ritornata ai valori dei controlli ($p < 0.01$). L'espressione proteica nel tessuto cardiaco degli animali ascitici di Gai2 ($p < 0.05$), iNOS ($p < 0.05$) e l'attività delle NAD(P)H-ossidase ($p < 0.05$) è simile a quella dei ratti di controllo. Una significativa diminuzione dei livelli di TNF- nel plasma ($p < 0.05$) e nell'ascite ($p < 0.05$) e della traslocazione nucleare di NF-kB negli animali cirrotici è stata notata dopo il trattamento con l'albumina.

Conclusioni: I nostri risultati per la prima volta dimostrano che l'albumina esercita un effetto inotropo positivo sul cuore dei ratti cirrotici con ascite. Questo effetto coinvolge la sua capacità di contrastare gli effetti negativi sulla contrattilità cardiaca dei ROS e della pathway TNF- α -NF-kB- iNOS.

ABSTRACT

Background: There isn't therapeutic option for systolic dysfunction in decompensated cirrhosis. Previous data showed that albumin infusion may improve cardiac contractility in a model of septic shock through an inhibitory action on reactive oxygen species (ROS) or on tumor necrosis factor (TNF) α -inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathway.

Aim: To evaluate the effect of albumin infusion on cardiac contractility in experimental cirrhosis with ascites and its possible molecular mechanism.

Methods: 30 Wistar Kyoto rats with CCl₄-induced cirrhosis and ascites and 30 control rats were studied. For each groups, 15 rats have been treated with 40% solution of albumin, 15 with the same volume of saline. Isoproterenol-stimulated cardiac contractility was recorded in isolated hearts. Cardiac gene and protein expression of β 2 adrenergic receptor, of an inhibitory G-protein (G α i2), of adenylate cyclase 3 (Adcy3), of iNOS, and of NAD(P)H-oxidase activity, source of ROS, were obtained using real time PCR and Western Blot respectively. Serum level of TNF- α and NF- κ B translocation into nucleus in cardiac tissue were analyzed with ELISA.

Results: Baseline cardiac contractility was significantly reduced in rats with cirrhosis as compared to control rats ($p < 0.01$). This finding was associated with: a) an higher serum level of TNF- α ($p < 0.05$), b) an increased gene and protein expression of β 2-AR ($p < 0.05$), G α i2 ($p < 0.05$), iNOS ($p < 0.05$), c) an increased NAD(P)H-oxidase activity ($p < 0.05$), d) an increased nuclear translocation of NF- κ B ($p < 0.05$) and e) a lower expression of Adcy 3 ($p < 0.05$) in cardiac tissue of rats

Abstract

with cirrhosis. After albumin infusion the cardiac contractility was completely recovered in rats with cirrhosis ($p < 0.01$). Protein expression of G α i2 ($p < 0.05$), iNOS ($p < 0.05$) and NAD(P)H-oxidase activity ($p < 0.05$) in rats with cirrhosis were reversed to control levels. A significant decrease in serum level of TNF- α ($p < 0.05$) and in nuclear translocation of NF- κ B in cardiac tissue ($p < 0.05$) of cirrhotic rats was also observed.

Conclusions: These results showed that albumin exerts a positive cardiac inotropic effect in rats with cirrhosis and ascites, involving its capacity to counteract the negative effects on cardiac contractility of ROS and TNF- α -induced NF- κ B- iNOS pathway.

1. INTRODUZIONE

1.1 NOTE STORICHE

Oltre mezzo secolo fa, Gould et al. hanno descritto un incremento della portata cardiaca a riposo nei pazienti con cirrosi epatica.¹ Questo incremento della portata cardiaca a riposo non è stato considerato come espressione di una alterazione cardiaca primitiva ma è stato inquadrato nell'ambito di una Sindrome Circolatoria Iperdinamica avente come primum movens una riduzione delle resistenze vascolari periferiche. Infatti nel 1953, sulla base di osservazioni cliniche frequentemente presenti nei pazienti cirrotici, quali "estremità degli arti caldi, spider naevi cutanei, un ampio polso pressorio e pulsazioni palpabilmente percettibili nel letto ungueale". Kowalsky et al. dimostrarono, nel loro studio su pazienti con cirrosi epatica di Laennec, come la cirrosi fosse associata ad una Sindrome Circolatoria Iperdinamica caratterizzata da un aumento della portata cardiaca a riposo, un aumento della frequenza cardiaca e una riduzione della pressione arteriosa periferica. Tale condizione emodinamica è stata ribattezzata con il nome di "Sindrome da Progressiva Vasodilatazione" in quanto la vasodilatazione arteriosa, prevalentemente a livello del circolo splancnico, si scoprì essere il fattore iniziale delle modificazioni cardio-vascolari. Questa vasodilatazione progressiva è responsabile di altre numerose complicanze tra cui la comparsa di una alterazione della funzionalità renale con ritenzione renale di sodio e acqua. Tali alterazioni si traducono sul piano fisiopatologico in una espansione del volume plasmatico e sul piano clinico in ascite e iponatremia. La

risposta cardiaca, quindi, è stata più recentemente correlata alla vasodilatazione splancnica, all'espansione del volume plasmatico e all'aumento del ritorno venoso al cuore attraverso gli shunts porto-sistemici. L'unione di questi tre elementi è in grado di definire la Sindrome Circolatoria Iperdinamica.

A partire dagli anni '80 studi sperimentali condotti su modelli di cirrosi ottenuti con CCl₄ o legatura del coledoco hanno dimostrato: a) la presenza di una disfunzione ventricolare con riduzione della portata cardiaca in condizioni di espansione del volume plasmatico e b) un deficit di risposta cronotropa durante infusione di un beta-agonista. Queste alterazioni sono state accumulate nella definizione di "Cardiomiopatia Cirrotica". Con questa espressione si è inteso sottolineare il fatto che tali alterazioni sono secondarie alla cirrosi epatica in quanto tale indipendentemente dalla sua eziologia e non vanno confuse con le manifestazioni proprie della cardiomiopatia alcolica. Verso la fine degli anni '80 si cominciarono ad accumulare una serie di evidenze cliniche e sperimentali che confermarono l'ipotesi della presenza di un difetto cardiaco in pazienti cirrotici, indipendente dalla natura eziologica. Tali evidenze includono l'aumento delle portata cardiaca a riposo, la riduzione delle resistenze vascolari periferiche,² la riduzione delle contrattilità miocardica, smascherata in condizioni di stress sia fisico che farmacologico, l'aumento dello spessore del ventricolo sinistro associato a disfunzione diastolica ed infine le anomalie elettrofisiologiche.³

1.2 DEFINIZIONE

Per la prima volta nel 2005 al Congresso Mondiale di Gastroenterologia di Montreal, un working group di esperti epatologi e cardiologi ha definito la Cardiomiopatia Cirrotica e proposto dei criteri diagnostici per valutarla in modo adeguato, proponendo delle linee guida come base di partenza per lo sviluppo di nuove ipotesi eziopatogenetiche e terapeutiche.⁴

Secondo la definizione concordata, la cardiomiopatia cirrotica è una "disfunzione cardiaca presente nei pazienti con cirrosi epatica caratterizzata da alterazioni elettrofisiologiche con alterata fase di rilassamento diastolico e/o compromessa risposta contrattile allo stress in assenza di una conosciuta malattia cardiaca".⁴

1.3 MECCANISMI PATOGENETICI

La contrattilità miocardica è principalmente regolata dal sistema β -adrenergico. L'adrenalina e la noradrenalina legano e attivano i recettori β_1 e β_2 , recettori a sette domini transmembrana membri della superfamiglia dei recettori accoppiati a Proteine G (GPCR), che sono coinvolti nella contrazione cardiaca. Generalmente i β_1 costituiscono l'80% dei recettori β -adrenergici che popolano il tessuto cardiaco. Il recettore β attivato interagisce con la Proteina G stimolatoria (G_s), un eterodimero composto dalla subunità α , β e γ .⁵ L'interazione tra il recettore β -adrenergico attivato e la proteina G_s determina un cambiamento del nucleotide di guanina: la guanosina trifosfato (GTP) si lega alla subunità α della Proteina G_s . Quindi il complesso subunità α -GTP si separa dal complesso delle

subunità β e γ e attiva la Adenilato Ciclasi (Adcy), una proteina con dodici domini transmembrana che converte l'adenosina trifosfato (ATP) in 3'5'-adenosina monofosfato ciclica (cAMP) (Fig.1). A questo punto l'attività intrinseca GTPasica della subunità α -GTP permette l'idrolisi del GTP a GDP favorendo l'inattivazione della Proteina G stessa. L'aumento della concentrazione di cAMP intracellulare attiva la Protein Chinasi cAMP-dipendenti (PKA), che fosforilano delle proteine in modo selettivo continuando così il processo di trasduzione del segnale. La PKA fosforila i canali L-type del Ca^{2+} potenziando le correnti in entrata di calcio. Essa fosforila inoltre, attivandolo, il recettore della rianodina (RYR_2) espresso nella membrana del reticolo sarcoplasmatico aumentando così la concentrazione di calcio citosolica e quindi la contrazione. La subunità α -GTP è anche in grado di attivare direttamente, e non solo attraverso l'attivazione della PKA i canali L-type del Ca^{2+} . Contemporaneamente agli effetti diretti e PKA-mediati sulla concentrazione del calcio nel citosol dei cardiomiociti, la PKA fosforila la Troponina I, facilitando il cambiamento conformazionale del complesso troponinico e impedendo così al calcio di legare la Troponina C. Questa azione ostacola l'interazione tra miosina e actina dando il via il rilassamento. Inoltre la PKA fosforila il fosfolambano, che perde il suo effetto inibitorio sulle pompe del calcio del reticolo sarcoplasmatico contribuendo così a ridurre la concentrazione del calcio nel citosol.⁵ L'attività ATPasica delle pompe del calcio ne risulta, infatti, potenziata e, quindi, una quantità maggiore di ioni Ca^{2+} vengono attivamente pompate dentro il reticolo sarcoplasmatico. Tutto ciò porta però anche ad una riduzione del tempo di rilassamento con conseguente aumento della frequenza cardiaca.(Fig. 1)

Negli ultimi anni, nuove evidenze hanno dimostrato che i recettori β_1 e β_2 , espressi nel tessuto cardiaco, attivano cascate di signalling completamente diverse. Mentre i recettori β_1 sono associati esclusivamente alla Proteina G_s e attivano il pathway appena descritto, i recettori β_2 sono accoppiati sia alla Proteina G_s che G_i (inibitoria). L'accoppiamento del recettore β_2 alla G_i attiva il pathway $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ - PI3K-Akt che, in acuto, annulla il segnale di traduzione opposto G_s -AC-cAMP-PKA. La stimolazione cronica dei recettori β -adrenergici ha effetti opposti sul destino dei cardiomiociti: i recettori β_1 inducono ipertrofia miocardica e apoptosi attivando la Chinasi II Ca^{2+} -calmodulina dipendente (CaMK II) e non il classico pathway cAMP/PKA. Diversamente i recettori β_2 promuovono la sopravvivenza cellulare attraverso il segnale G_i - $G\beta\gamma$ - PI3K-Akt esplicando così un ruolo protettivo nei confronti del cuore.⁶

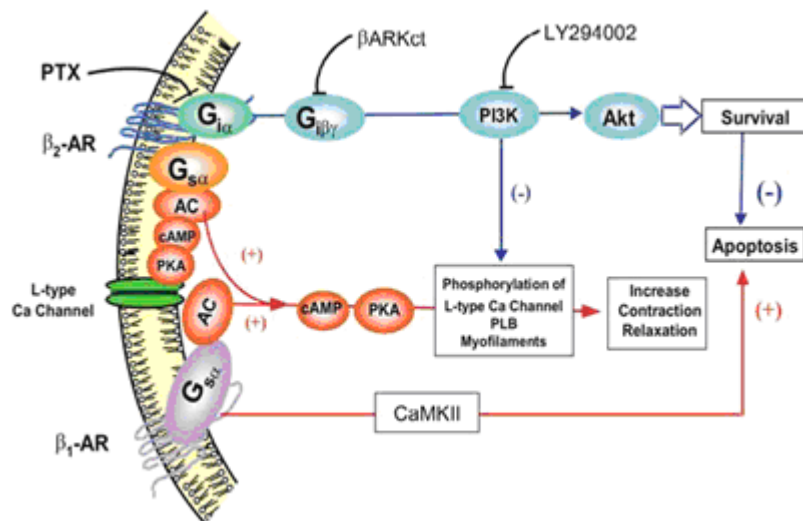


Figura 1. La trasduzione del segnale β -adrenergico nel cuore: i diversi pathway attivati dai recettori β_1 e β_2 .

1.3.1 Alterazione di funzione dei recettori β -adrenergici

Vista la relazione tra recettori β -adrenergici e contrattilità cardiaca, questo sistema è stato soggetto di numerose ricerche nell'ambito della cardiomiopatia cirrotica. Nel 1986 Gerbes et al. hanno osservato una riduzione significativa dei recettori β_2 nei linfociti di pazienti con cirrosi epatica scompensata avvalorando l'ipotesi di una desensibilizzazione di recettori β -adrenergici nella patogenesi della disfunzione sistolica in corso di cirrosi.⁷ Successivamente, sono state condotte molte altre ricerche su modelli animali per verificare questa ipotesi. In questo contesto, altri gruppi hanno dimostrato una ridotta densità dei recettori β -adrenergici nella membrana plasmatica dei cardiomiociti in modelli di ratti con cirrosi biliare.⁸ Il meccanismo in grado di favorire la "downregulation" dei recettori β adrenergici a livello cardiaco è stato correlato all'aumentata concentrazione plasmatica di norepinefrina presente nella cirrosi in fase avanzata. Infatti quando i recettori β sono esposti ad agonisti, quali norepinefrina, per un breve periodo di tempo questi vengono fosforilati da proteinchinasi con disaccoppiamento dalla Proteina G_s e conseguente inattivazione. La desensibilizzazione "short-term" viene recuperata molto velocemente senza necessità di sintesi di proteine recettoriali *de novo*, ma semplicemente attraverso la defosforilazione. Diversamente la desensibilizzazione "long-term" determina un'internalizzazione, un sequestro e quindi una vera e propria "downregulation" dei recettori β sulla membrana plasmatica. E' stato pertanto ipotizzato che le anomalie del sistema β -adrenergico cardiaco presenti nella cirrosi epatica siano, almeno in parte, riconducibili ad una "downregulation" dei recettori β adrenergici indotta dalla esposizione prolungata ad aumentati livelli circolanti i tissutali di

catecolamine.⁹ Tuttavia, a partire dal 1996 studi sperimentali in modelli sperimentali di cirrosi epatica hanno evidenziato anche un'alterazione della trasduzione del segnale β -adrenergico a diversi livelli in assenza di un'alterata espressione dei recettori β -adrenergici a livello di membrana plasmatica. In particolare sono stati descritte una riduzione della concentrazione e della funzione della proteina G_s , una ridotta espressione dell'attività dell'Adcy, un'aumentata espressione della proteina inibitrice G_i e della fosfodiesterasi 2a (PDE2a).¹⁰ Questi dati suggeriscono che una complessa alterazione del "signalling" legato ai recettori β -adrenergici a livello cardiaco, associato non solo ad una loro "downregulation," svolga un ruolo importante nella patogenesi della disfunzione sistolica in corso di cirrosi.¹¹

1.3.2 Alterazione del Pathway di NO

L'Ossido nitrico (NO) è un potente vasodilatatore sintetizzato a partire dalla L-arginina attraverso l'azione dell'NO Sintetasi (NOS). Sono riconosciute tre isoforme di NOS: neuronale (nNOS o NOS1), inducibile (iNOS o NOS2) ed endoteliale (eNOS o NOS3).¹² Nel 1991 è stato ipotizzato da Vallance e Moncada che i livelli elevati di citochine presenti nella cirrosi epatica determinino un'induzione di iNOS con produzione di quantità elevate di NO.¹³ Questa ipotesi non è stata avvalorata dagli studi su modelli sperimentali sia di cirrosi che di ipertensione portale pre-epatica. In tali studi è stato infatti dimostrato, con poche eccezioni,¹⁴ che l'aumentata disponibilità di NO a livello splancnico in questi modelli sperimentali era prevalentemente legata ad un'aumentata espressione ed attività della eNOS.¹⁵ L'azione dell'NO a livello del tessuto cardiaco nella cirrosi

è stata poco indagata. Tuttavia, Balligand et al. hanno dimostrato che l'inibizione di NOS con un antagonista aspecifico (L-NAME, "*N-omega-monomethyl-L-arginine*"), in grado quindi di inibire sia l'iNOS che l'eNOS, aumentava in modo significativo la contrattilità dei miociti ventricolari in ratti cirrotici stimolati con isoproterenolo.¹⁶ Successivamente Liu et al. hanno scoperto che il livelli di espressione di iNOS mRNA, TNF- α , IL-1 e cGMP erano molto elevati nei cardiomiociti isolati da ratti con cirrosi epatica, mentre non c'era una significativa differenza di concentrazione di eNOS in questi rispetto ai controlli. Questi risultati suggeriscono che il pathway citochine (TNF- α)-iNOS-cGMP rappresenta la modalità con cui l'NO contribuisce alla patogenesi della cardiomiopatia cirrotica (Fig. 2).¹⁷ Probabilmente l'NO influenza la risposta inotropa e cronotropa del cuore interagendo con il sistema beta-adrenergico¹⁸ perché l'aumento di cGMP da un lato inibisce l'attività dell'Adcy e dall'altro riduce la corrente in entrata di calcio bloccando l'attività dei canali L-type del Ca²⁺ e il recettore RyR2 del reticolo sarcoplasmatico.¹⁹

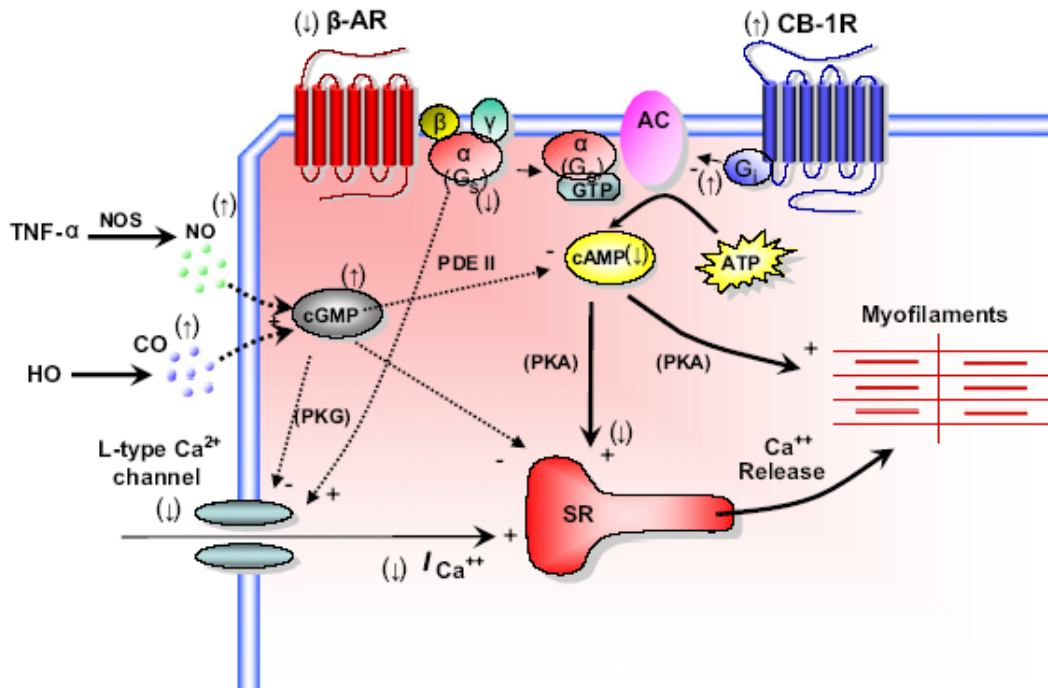


Figura 2. Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale adrenergico e gli effetti di NO e CO nei cardiomiociti.¹²

1.3.3 Le funzioni del Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)

E' noto che il Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) è un fattore di trascrizione che regola non solo l'espressione genica di diverse citochine infiammatorie quali: TNF- α , IL-1, IL-6, ICAM-1 ma anche quella di iNOS. Sono stati recentemente evidenziati aumentati livelli di attivazione dell'NF- κ B nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi epatica parallelamente ad altri studi in modelli di miocardiopatia di varia eziologia che hanno dimostrato una stretta correlazione tra NF- κ B e TNF- α . Inoltre NF- κ B è coinvolto sia nella patogenesi dell'ipertrofia cardiaca che nell'alterazione della funzione cardiaca. E' stato quindi ipotizzato che l'attivazione di NF- κ B rappresenti uno dei pathway comuni coinvolti nella disfunzione sistolica e

diastolica della cardiomiopatia cirrotica. A conferma di ciò, nel 2008 Liu et al. hanno riportato un aumento dell'attività di NF- κ B e della concentrazione di TNF- α nei miocardiociti isolati dal cuore di ratti cirrotici, ed hanno, inoltre, osservato che il trattamento con inibitori di NF- κ B ne riduceva l'attività e contemporaneamente determinava una diminuzione della concentrazione di TNF- α . In conclusione NF- κ B può contribuire alla patogenesi della disfunzione sistolica della cardiomiopatia cirrotica attraverso un'aumentata espressione di citochine prof infiammatorie, di iNOS. (Fig. 3)²⁰

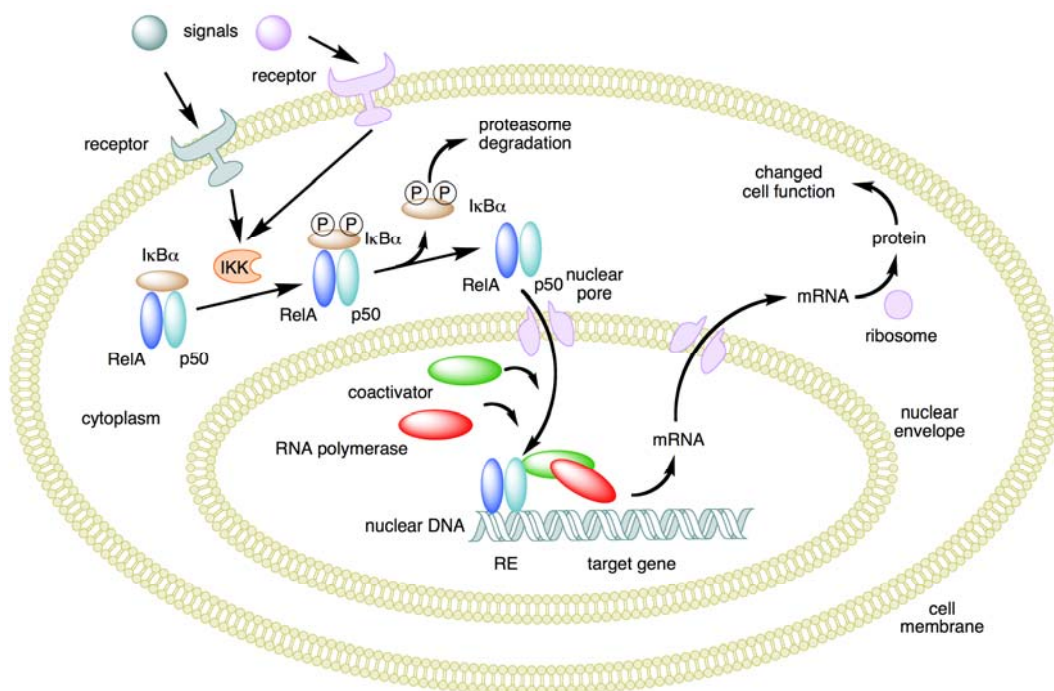


Figura 3. Meccanismo d'azione di NF- κ B.

Uno dei fattori noti per stimolare l'espressione di NF- κ B è rappresentato dai radicali liberi, in particolar modo dal perossido di idrogeno (H_2O_2).²¹ Uno stress ossidativo e la conseguente formazione di radicali liberi è stata ipotizzata nella cirrosi epatica in fase avanzata come conseguenza sia di infezioni batteriche sia di fenomeni di traslocazione batterica e conseguente rilascio di endotossine.

Un'infezione quindi potrebbe essere in grado di contribuire alla riduzione della portata cardiaca attraverso la liberazione di endotossine e citochine pro-infiammatorie da un lato e attraverso lo sviluppo di uno stato di stress ossidativo dall'altro. Infatti endotossine, citochine pro-infiammatorie e stress ossidativo favoriscono un incremento dell'espressione e della funzione di iNOS con conseguente aumento di sintesi e liberazione di sostanze con effetto inotropo negativo quali NO e monossido di carbonio (CO). (Fig.2) Pertanto è stato ipotizzato che l'attivazione del pathway NO-CO attraverso NF-kB,²⁰ possa essere il fattore determinante nella patogenesi della disfunzione sistolica in questo contesto clinico. In aggiunta a quanto descritto fino ad ora, la comparsa di un'insufficienza cortico-surrenalica frequentemente presente nei pazienti con cirrosi in fase avanzata in corso di sepsi,²² potrebbe accentuare l'attivazione del "pathway" NO-CO attraverso la mancata inibizione dell'espressione di NF-kB da parte del cortisolo.²³ Questa sequenza patogenetica potrebbe tuttavia essere valida anche per i pazienti che sviluppano una sindrome epatorenale (HRS) in assenza di una qualsiasi evidenza clinica o microbiologica di infezione batterica. Infatti, la sola traslocazione batterica, cioè il passaggio di batteri dal lume intestinale ai linfonodi mesenterici e da questi al sangue portale, senza alcuna evidenza clinica e microbiologica di infezione, è di per sé in grado di alimentare un pattern endotossiemico-citochinico analogo a quello descritto precedentemente. E' stato infatti dimostrato che la presenza di DNA batterico (bactDNA), osservabile in una percentuale di pazienti cirrotici ascitici che può raggiungere il 34%, simula i livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie e di NO riscontrabili nei pazienti cirrotici con PBS.²⁴

1.4 ALBUMINA

La somministrazione di albumina è stata usata per molti anni nel trattamento dei pazienti cirrotici con ascite. In particolare, una delle indicazioni del suo uso è la prevenzione della sindrome Epato-Renale (HRS) durante episodi di Peritonite batterica spontanea (PBS).

Il razionale del suo uso in queste condizioni cliniche è l'aumento del volume efficace circolante attraverso la capacità dell'albumina di prevenire la caduta della gittata cardiaca a causa di infezioni batteriche.^{25,26} Sebbene l'effetto dell'albumina sulla gittata cardiaca è semplicemente attribuito alla sua abilità di espansore plasmatico, la sua azione potrebbe essere più complessa. In primo luogo, l'albumina lega molte sostanze come l'ossido nitrico, le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e citochine pro-infiammatorie²⁷⁻³⁰ che potrebbero essere coinvolti nella patogenesi della vasodilatazione arteriosa periferica e della disfunzione cardiaca durante la cirrosi scompensata con ascite. Inoltre, è stato ipotizzato che durante la cirrosi, come nella sepsi, l'albumina può esercitare un effetto isotropico positivo nel tessuto cardiaco attraverso un effetto inibitorio sull'espressione di iNOS.³¹

2. SCOPO DELLO STUDIO

La cardiomiopatia cirrotica è una "disfunzione cardiaca presente nei pazienti con cirrosi epatica caratterizzata da alterazioni elettrofisiologiche con alterata fase di rilassamento diastolico e/o compromessa risposta contrattile allo stress in assenza di una conosciuta malattia cardiaca".

La somministrazione di albumina è stata usata per molti anni nel trattamento dei pazienti cirrotici con ascite. Sebbene l'effetto dell'albumina sulla gittata cardiaca è semplicemente attribuito alla sua abilità di espansore plasmatico, la sua azione potrebbe essere più complessa.

Lo scopo del nostro studio è stato, in primo luogo, quello di verificare in un modello animale di cirrosi con ascite la presenza della cardiomiopatia cirrotica e i meccanismi molecolari che possono essere alla sua base, in secondo luogo, analizzare se l'infusione di albumina può aumentare la contrattilità cardiaca attraverso meccanismi indipendenti dall'aumento del precarico e i possibili meccanismi molecolari coinvolti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ANIMALI

Sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar Kyoto (peso di 200-250g) provenienti dallo stabulario del Centro di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Padova. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni controllate di temperatura ed umidità, esposti a cicli luce-buio di 12 h, nutriti con dieta standard ed acqua contenete fenobarbital (0.3 g/L) ad libitum, in osservanza alla normativa internazionale sulla sperimentazione animale. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dalla Direzione dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità.

3.2 INDUZIONE DELLA CIRROSI

La cirrosi epatica è stata indotta sottoponendo ratti Wistar-Kyoto ad una somministrazione periodica di tetracloruro di carbonio (CCl₄) per via inalatoria due volte la settimana in una camera di inalazione con periodi di esposizione di durata progressivamente crescente (da 0.5 a 5 minuti) secondo il metodo proposto da McLean e modificato da Lopez-Novoa.³² I ratti cirrotici con scompenso ascitico sono stati studiati tra la 13^a e 15^a settimana dopo l'avvio del programma di induzione della cirrosi epatica.(Fig.4) Un gruppo di animali di controllo è stato studiato nello stesso intervallo di tempo. La cirrosi epatica è stata documentata postmortem con un esame microscopico di una sezione di fegato colorato con

ematossilina/eosina. L'ascite è stata documentata postmortem dalla presenza di liquido ascitico nell'addome dell'animale.

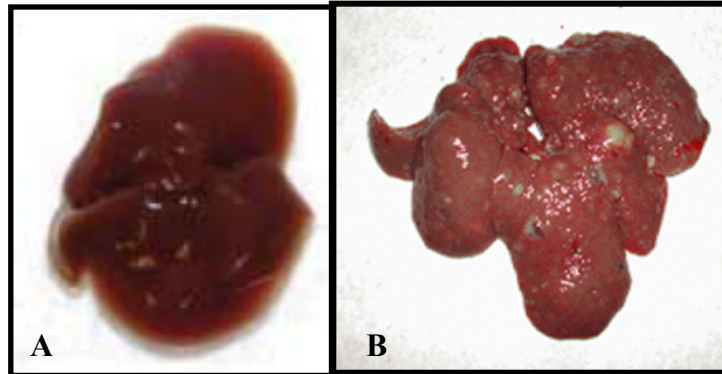


Figura 4. (A) Parte di fegato sano di ratto. (B) Parte di fegato cirrotico di ratto.

3.3 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Alla fine del trattamento con CCl_4 , i ratti sono stati suddivisi in 4 gruppi:

1. 10 ratti controllo sottoposti ad infusione di soluzione salina 0.9% (fisiologica)
2. 10 ratti controllo sottoposti ad infusione di albumina in soluzione salina
3. 10 ratti cirrotici con ascite sottoposti ad infusione di soluzione salina
4. 10 ratti cirrotici con ascite sottoposti ad infusione di albumina con soluzione salina.

L'albumina plasmatica e la fisiologica sono state iniettate nella vena caudale. Sono state somministrate 2 dosi di albumina ai ratti: la prima pari a 1.5 g/kg di peso corporeo tre giorni prima il sacrificio dei ratti e l'altra pari a 1 g/kg di peso corporeo il giorno prima il sacrificio. Lo stesso volume di fisiologica è stato

iniettato nella vena caudale.(Fig. 5)

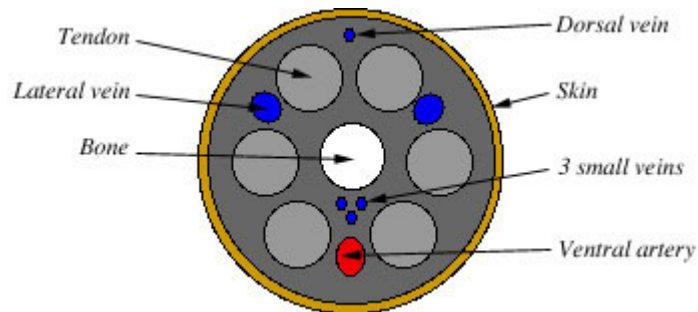


Figura 5. Sezione della coda di ratto.

3.4 DETERMINAZIONE DELLA CONTRATTILITA'

3.4.1 Preparazione dei cuori

Gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione previa somministrazione intraperitoneale di eparina (5.000 U/ml). Il torace è stato aperto longitudinalmente ed il cuore è stato rapidamente espantato con rimozione degli atri, incannulato attraverso l'aorta e quindi inserito in un apparato per la perfusione per via retrograda secondo il metodo di Langendorff, come precedentemente descritto.³³

3.4.2 Perfusione del cuore isolato con il modello Langendorff

La perfusione *ex vivo* del cuore *in toto* per via retrograda attraverso l'aorta mediante il modello Langendorff permette di mantenere vitale l'organo per diverse ore e di monitorarne la forza di contrazione a livello ventricolare, l'attività

elettrica e la pressione coronarica. L'apparecchio di Langendorff utilizzato in questo studio è stato progettato e messo in opera dal gruppo del Prof. Bova del Dipartimento di Farmacologia e Anestesiologia dell'Università di Padova in collaborazione con l'officina meccanica del Dipartimento di Chimica-Fisica. La particolarità di questo apparecchio consiste nel fatto che è contenuto all'interno di una culla termica per neonati, consentendo una perfetta e costante termostatazione del cuore e del liquido di perfusione durante gli esperimenti. Lo strumento è composto da una camera di perfusione termostata a 37°C nella quale viene sospeso il cuore, da una cannula inserita nel moncone dell'aorta al fine di effettuare la perfusione retrograda, da una pompa peristaltica a flusso variabile, da un contenitore per il liquido di perfusione, da un gorgogliatore con il filtro per l'ossigeno e l'anidride carbonica e da un elettrodo per la stimolazione del cuore. Per registrare la forza di contrazione ventricolare e la pressione coronarica vengono utilizzati dei trasduttori, mentre per la registrazione dell'elettrocardiogramma vengono utilizzati degli elettrodi. La Fig. 6 illustra come è costituito l'apparecchio di Langendorff da noi utilizzato:

MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosio 11.1 mM, gasata con una miscela di O₂:CO₂ (95%:5%), pH 7.35 e mantenuta alla temperatura costante di 37°C. La misurazione della forza di contrazione è stata effettuata inserendo nel ventricolo sinistro una cannula collegata ad un trasduttore di pressione (2B instruments, Varese, Italia). La pressione coronarica è stata misurata collegando all'aorta un ulteriore trasduttore di pressione. I dati inerenti alla forza di contrazione e alla pressione coronarica sono stati registrati con un sistema computerizzato (BIOPAC, USA) e analizzati mediante apposito software (Aknowledge, USA). La contrazione cardiaca è stata così monitorata sia a livello basale che dopo l'aggiunta alla soluzione di perfusione di dosi crescenti di isoproterenolo, un β -agonista non selettivo, (da 10⁻¹⁰ a 10⁻⁸). LVDP è stata calcolata mediante la differenza dei valori medi di pressione della sistole e della diastole del ventricolo sinistro.

3.5 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO NEL TESSUTO CARDIACO

3.5.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto utilizzando il Kit per l'estrazione totale di RNA da tessuti cardiaci (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). 20-30mg di tessuto cardiaco sono stati sospesi in 600 μ l di una soluzione di lisi contenente β -mercaptoetanololo. Il tessuto è stato poi completamente distrutto mediante omogenizzazione per 40-60 secondi (MagNA Lyser, Roche). La sospensione tissutale è stata incubata con

proteinasasi K per 10 min a 55°C. Dopo centrifugazione e successivi lavaggi con una soluzione di etanolo 70%, il supernatante è stato trasferito in apposite colonnine capaci di legare solo l'RNA estratto. Dopo centrifugazione, il filtrato è stato eliminato e la colonnina eluita con 20-30 µl di H₂O sterile. L'RNA totale così ottenuto è stato conservato a -80°C.

3.5.2 Quantificazione dell'RNA totale

La determinazione della concentrazione dell'RNA (µg/µl) è stata determinata mediante lettura del valore di assorbanza ottenuto tramite spettrofotometro (Beckman UV-Vis) alle λ di 260, di 280 e di 230 nm. Il valore di assorbanza alla λ di 260 nm ci permette di quantificare l'RNA totale estratto, mentre il rapporto tra i valori di assorbanza 260/280 e 260/230 ci indicano il grado di qualità di RNA. L'integrità dell'acido nucleico è stata verificata con lo strumento 2100 BioAnalyzer usando RNA nanolabChips (Agilent Technologies, Cernusco, MI, Italy).

3.5.3 Retrotrascrizione dell'RNA totale (RT)

La reazione di RT viene utilizzata per amplificare il DNA a doppio filamento a partire da RNA estratto a singolo filamento. Nella fase RT (retrotrascrizione) l'enzima trascrittasi inversa sintetizza una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA templato.

La reazione di RT è stata condotta utilizzando il Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad). Il gradiente di temperatura consiste di una prima fase a 25°C per 5 minuti, una seconda a 42°C per 30 minuti tale da attivare la trascrittasi inversa e una terza a 85°C per 5 minuti al fine di inattivare la trascrittasi inversa.

3.5.4 PCR Real-Time Quantitativa (Q-PCR)

La quantificazione dell'espressione genica di Recettore Adrenergico- β 1 (β 1-AR), Recettore Adrenergico- β 2 (β 2-AR), Proteina Gai2, Proteina Gas, Adenilato ciclasi 3 (Adcy3) è stata ottenuta mediante reazione di PCR-Real Time con l'uso di specifici primers e di una molecola fluorescente (SYBR-Green). Questa molecola fluorescente ha la particolarità di intercalarsi nel doppio filamento di DNA e di emettere fluorescenza solamente quando si lega al doppio filamento del prodotto di amplificazione della sequenza oligonucleotica (circa 300 bp) del gene di interesse. Ne consegue che l'aumento del segnale di fluorescenza sarà proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione ottenuto dalla reazione di PCR che corrisponde al valore al ciclo di amplificazione definito Ciclo Soglia o Threshold Cycle (Ct). Infatti, nella reazione di PCR Real-Time, monitorata in tempo reale per 40 cicli, si ottiene una curva sigmoideale dove i primi 10-15 cicli corrispondono a valori di fluorescenza dati dal rumore di fondo (background), poi tra i 15-25 cicli la reazione ha un andamento esponenziale per poi flettere e raggiungere il plateau (30-40 cicli). Il valore di Ct, utilizzato per quantificare il prodotto della reazione di PCR, corrisponde al ciclo dove l'aumento di fluorescenza risulta essere significativamente maggiore a quello del livello basale (background) misurato nei primi cicli di amplificazione.

La reazione di PCR Real-Time è stata eseguita mediante il sistema di rilevazione i-Cycler iQ5 Real Time (Bio-Rad). La reazione di PCR Real-Time è stata eseguita utilizzando il Kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e i primers specifici per i geni di interesse. La reazione di PCR viene fatta in 20 μ l finali contenenti 10 μ l di PCR-SYBR Green Master Mix 2x (Biorad), 2 μ l forward

primer (50 nM), 2 μ l reverse primer (50 nM), 2 μ l H₂O e 4 μ l di cDNA (pari a 1/5 del prodotto di retrotrascrizione). Il profilo termico della reazione prevede un ciclo di reazione a 95°C per 5 min (attivazione dell'enzima Taq Polimerasi) e 40 cicli con 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C (fase di ibridizzazione ed estensione). Le sequenze oligonucleotidiche dei primers e per il gene housekeeping (HPRT, ipoxantina fosforibosil transferasi) sono state disegnate nel nostro laboratorio utilizzando i programmi Primer3 e Operon e sono riportate nella Tabella seguente.

Gene	For Sequence	Rev Sequence	Tm	Prodotto di amplificazione (bp)
β 1-AR	agagcagaaggcgctcaag	agccagcagagcgtgaac	60°C	286
β 2-AR	cctcactggtaagtattaaggataa	tccaagggtacaggaagaaaac	60°C	305
Gai2	tcaatgactcagccgcttac	ggtgaagtgtgttcgacgat	60°C	244
Gas	cagtgggtggaagcagtccttgc	agcaggagagccagaggag	60°C	246
Adcy3	gccttagagaagatgcaggt	acagtcacgagtacttgggaag	60°C	255
HPRT	ggccattcctatgactgtagatattt	caatcaagacgttcttccagtt	60°C	209

Tabella 1. Sequenze oligonucleotidiche dei primers per Recettore Adrenergico- β 1 (β 1-AR), Recettore Adrenergico- β 2 (β 2-AR), Proteina Gai2, Proteina Gs, Adenilato ciclastasi 3(Adcy3) e per il gene housekeeping HPRT, temperatura di melting e prodotto di amplificazione.

La specificità dei primers è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e mediante analisi della curva di Melting che consente di ottenere la temperatura alla quale metà delle molecole complementari sono ibridate. Quest'ultima consente di verificare l'eventuale presenza di dimeri dei primers o la presenza di prodotti aspecifici nella reazione di PCR. Dopo avere

verificato che la scelta dei primers è stata ottimale, sono state fatte delle curve di calibrazione per ciascun gene a concentrazioni scalari (diluizione 1:2) di RNA totale. Questo ha permesso di ottenere l'efficienza della reazione di PCR che deve essere all'incirca del 100%. La Fig. 7 rappresenta un tipico esempio di curva di amplificazione (pannello A) e di curva di Melting (pannello B) del gene $\beta 1$ -AR. Mediante la curva di calibrazione sono stati ottenuti i valori di pendenza (slope), l'intercetta della retta di regressione (r) e il coefficiente di correlazione dei punti. Il valore della pendenza viene poi utilizzato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR: $E(\text{eff}) = 10^{-1/\text{slope}}$.

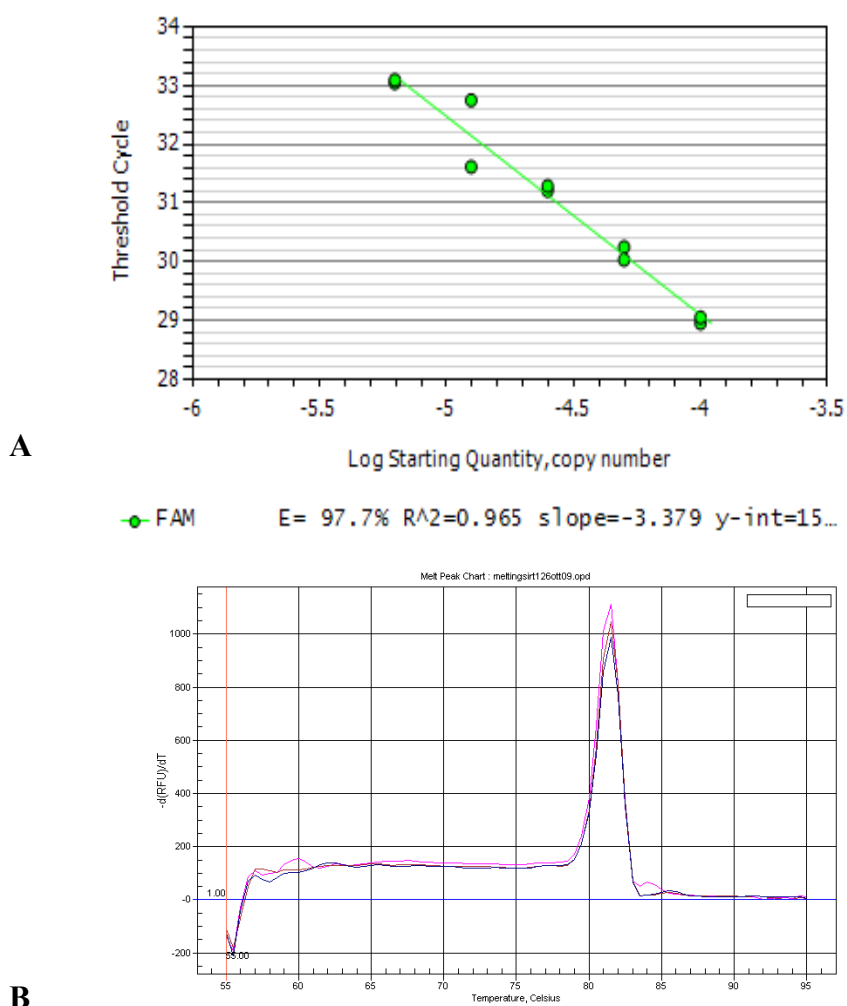


Figura 7. A) Curva di amplificazione del gene $\beta 1$ -AR; B) Curva di Melting del gene $\beta 1$ -AR.

La quantificazione della espressione del gene di interesse è di tipo relativo in quanto viene normalizzata per un gene housekeeping (HPRT) e viene calcolata applicando la formula matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$; dove $-\Delta\Delta Ct = [(Ct(\text{gene di interesse di un campione}) - Ct(\text{HPRT di un campione})) - [(Ct(\text{gene di interesse di un normalizzatore}) - (Ct(\text{HPRT di un normalizzatore}))]$. Per normalizzatore si definisce un campione il cui valore di espressione corrisponde a 1. Tra i vari geni housekeepings analizzati (GADPH, β -actina), è stato scelto HPRT come gene housekeeping per la quantificazione relativa in quanto la sua espressione permane stabile nelle nostre condizioni sperimentali.

3.6 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO NEL TESSUTO CARDIACO

3.6.1 Estrazione delle proteine

Il cuore è stato sezionato in piccole parti ed omogeneizzato (sonicatore Branson) a 4°C in un tampone di lisi ipotonico, (RIPA buffer), contenente 20mM HEPES, 2 mM EGTA, 10 mM β -glicerofosfato, 2mM Vanadato, 1 μ g/ml di leupeptina e 5 μ g/ml di aprotinina, per l'estrazione delle proteine. L'omogenato è stato poi centrifugato a 4°C a 10000g per 10 minuti per separare la frazione solubile dai detriti di tessuto non omogenati. La frazione solubile è stata congelata e conservata a -80°C.

3.6.2 Dosaggio delle proteine

La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il metodo di Lowry, utilizzando come standard concentrazioni note di albumina umana. I campioni delle proteine in esame e quelli di albumina sono stati fatti reagire per 10 minuti con una soluzione preparata al momento (Na_2CO_3 2% in NaOH 0,1 N; CuSO_4 1% in H_2O ; Na^+ tartrato 2% in H_2O) e poi con un colorante specifico Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma) ed incubate per 1 ora a temperatura ambiente. La lettura spettrofotometrica è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 540 nm. Mediante una curva di regressione delle concentrazioni note di albumina è stata calcolata la concentrazione del campione in esame.

3.6.3 Espressione di Recettore Adrenergico- β 1 (β 1-AR), Recettore Adrenergico- β 2 (β 2-AR), Proteina Gai2, Proteina Gs, Adenilato ciclasi 3 (Adcy3)

L'analisi della espressione proteica di Recettore Adrenergico- β 1 (β 1-AR), Recettore Adrenergico- β 2 (β 2-AR), Proteina Gai2, Proteina Gs, Adenilato ciclasi 3 (Adcy3) nei lisati proteici di cuore è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e Western Blot. Le proteine (50-200 μ g) sono state denaturate nel tampone di Laemmli, contenente Ditiotritolo (DTT) ed SDS a 100°C per 5 minuti. La separazione delle proteine è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide SDS-PAGE 10%, con il tampone di elettroforesi contenente Tris 0,12 M; Glicina 1,23 M; SDS 0,01 M. Le proteine sono poi state trasferite mediante elettroblotting (per 180 minuti a 100 V a 4°C) su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un apparecchio Transblot (Elettrofor, Padova) con la

soluzione di blotting contenente Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% e Metanolo 20% (vol/vol).

Le proteine, una volta trasferite su membrana, sono state incubate con una soluzione di PBS contenente 0.05% (vol/vol) di Tween (T- PBS) e 5% di latte overnight a 4°C. Le membrane sono state poi incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario anti- β 1-AR (diluizione 1:1000) and anti- β 2-AR (diluizione 1:1000), anti-G α_{i2} (diluizione 1:1000), anti-G α_s (diluizione 1:1000), anti-Adcy3 (diluizione 1:1000). Poi, le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (Amersham), coniugato all'enzima perossidasi di rafano.

La rivelazione del legame dell'anticorpo con la proteina in esame è stata realizzata mediante reazione chemiluminescente (ECL) utilizzando il sistema imaging Versa-Doc 3000 (BioRad). (Fig. 8) L'analisi densitometrica delle bande corrispondenti alla proteina in esame è stata analizzata mediante il software Quantity One (Biorad) che consente di quantificare l'espressione della proteina in esame. L'anticorpo primario è stato poi rimosso dalla membrana mediante incubazione a 50°C per 30 minuti in una soluzione contenente Tris Base 0,76 g, SDS 2 g, β -mercaptoetanol 700 μ l pH 6,8 e di nuovo incubata con l'anticorpo primario anti-GAPDH (gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi, 1:5000, Chemicon). L'analisi densitometrica della espressione di GAPDH è stata utilizzata per normalizzare l'espressione della proteina in esame e per correggere eventuali errori di caricamento dei campioni. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, che è stato posto uguale a 1.

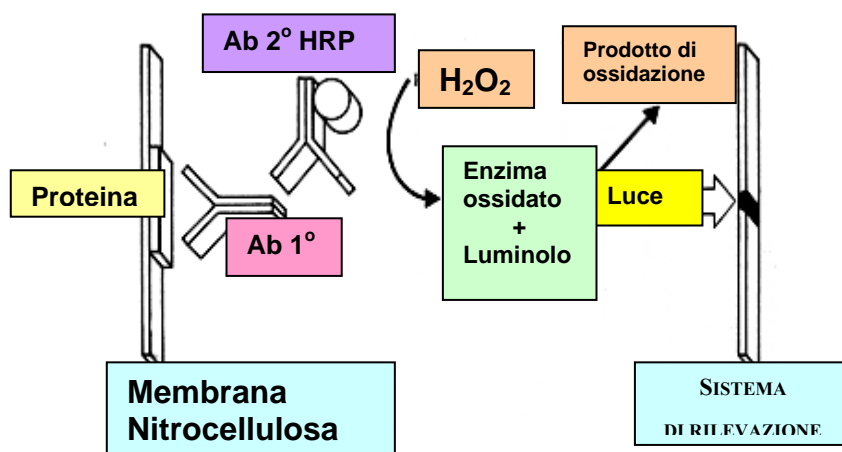


Figura 8. Rivelazione chemiluminescente di una proteina legata alla membrana di nitrocellulosa.

3.7 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DEL SISTEMA MULTIENZIMATICO NADPH-OSSIDASI NEL TESSUTO CARDIACO

L'analisi dell'attivazione delle subunità p47^{phox} e Rac-1 è stata determinata sia nella frazione citosolica sia in quella di membrana mediante gel elettroforesi su SDS 10% e Western Blot dopo ultracentrifugazione del lisato proteico a 35000 g a 4°C. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate overnight a 4°C con gli anticorpi policlonali primari specifici per le subunità p47^{phox} e Rac-1 (diluizione 1:3000, Santa Cruz Biotechnology). Successivamente le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (diluizione 1:5000, Amersham) coniugato all'enzima perossidasi di rafano. La rivelazione del legame dell'anticorpo con le proteine in esame è stata realizzata con metodo chemiluminescente e rivelazione con il sistema di analisi di immagine VersaDoc 3000 (Bio-Rad). Il rapporto tra l'intensità della banda della proteina presente nella

frazione di membrana cellulare e quella presente nella frazione citosolica consente di misurare la quantità di traslocazione della proteina stessa.³⁴

3.8 DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI TNF- α NEL PLASMA, NELL'ASCITE E NEL TESSUTO CARDIACO

Dopo il sacrificio è stato prelevato il sangue degli animali in provette contenenti EDTA. Per ottenere il plasma il sangue è stato centrifugato a 2000g per 15 minuti a 4°C e poi conservato a -20°C. Il liquido ascitico è stato prelevato dopo il sacrificio e conservato a -20°C. Il dosaggio del TNF- α è stato eseguito mediante tecnica ELISA utilizzando il kit Bendere Med Systems. Il limite di rilevamento è pari a 11pg/ml. Il dosaggio è stato effettuato in duplicato.

L'omogenato è stato ottenuto con lo stesso metodo utilizzato per l'estrazione delle proteine, è stato centrifugato a 4°C a 10000g per 10 minuti per separare la frazione solubile dai detriti di tessuto non omogenati. La frazione solubile è stata congelata e conservata a -80°C. La determinazione della quantità di TNF- α nel tessuto cardiaco è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e Western Blot, come descritto in precedenza. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, che è stato posto uguale a 1.

3.9 DETERMINAZIONE DELLA TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NF-kB

NF-kB è un fattore di trascrizione che si trova nel citoplasma legato al suo inattivatore, I κ B, quando viene attivato, I κ B viene degradato e NF-kB trasloca nel

nucleo e attiva la trascrizione di determinati geni. Per analizzare l'attivazione di NF-kB è stata separata la fase nucleare del tessuto da quella citosolica attraverso l'utilizzo del kit Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, Rockford, IL, USA). La quantificazione di NF-kB è stata effettuata mediante il kit ELISA Cayman (Temecula, CA, USA).

3.10 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI iNOS NEL TESSUTO CARDIACO

L'analisi della espressione proteica di iNOS nei lisati proteici di cuore è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e Western Blot, come descritto in precedenza.. La membrana è stata incubata overnight con l'anticorpo primario (diluizione 1:1000) e poi con l'anticorpo secondario (diluizione 1:10000) a temperatura ambiente per 1 ora. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, che è stato posto uguale a 1.

3.11 ANALISI STATISTICA

L'analisi dei dati è stata condotta con software SPSS (versione 15 , SPSS Inc. Chicago, Illinois,USA). Nel confronto tra le medie dei parametri è stato utilizzata l'ANOVA univariata per i confronti multipli. Il test è stato considerato significativo per valori di $P < 0.05$. I dati sono stati espressi come $media \pm ES$ (errore standard).

4. RISULTATI

4.1 CONTRATTILITA' CARDIACA

La contrattilità cardiaca è stata valutata *ex vivo* attraverso il metodo di Langendorff stimolando i cuori isolati e perfusi con dosi crescenti di isoproterenolo. La somministrazione di albumina non ha prodotto nessuna modificazione significativa sulla contrattilità rispetto alla soluzione fisiologica nei ratti di controllo (Fig. 9).

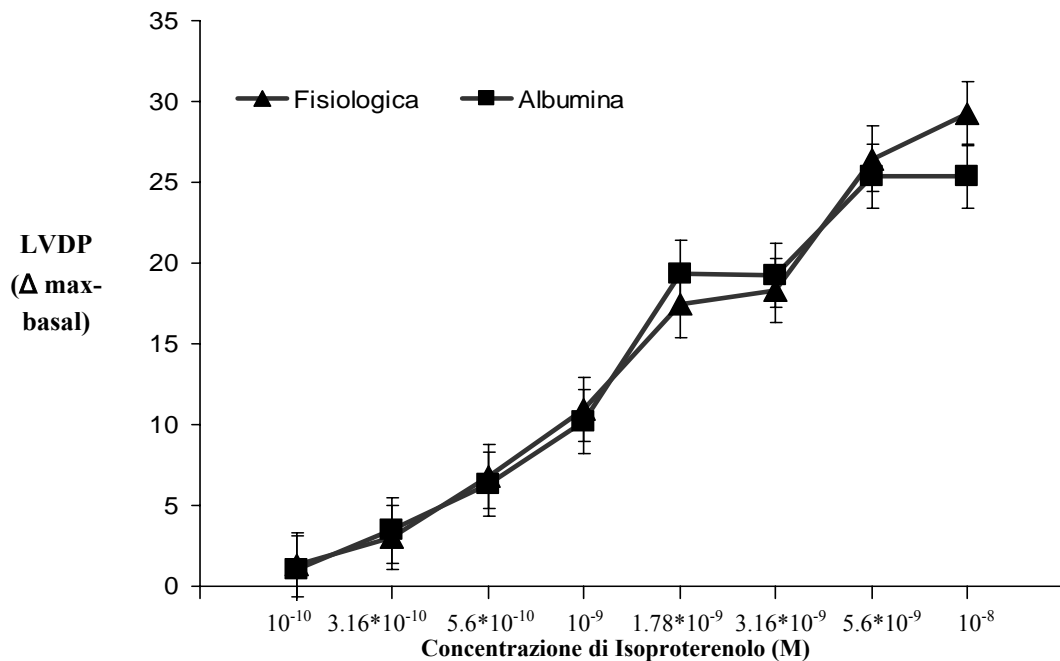


Figura 9. Effetti dell'albumina (■) vs fisiologica(▲) sulla contrattilità cardiaca in ratti di controllo. Il cuore è stato inserito nell'apparecchio di Langendorff, come descritto nei metodi. LVDP è stata calcolata come la differenza tra i valori di pressione del ventricolo sinistro durante la sistole e la diastole.

E' stata poi analizzata la contrattilità cardiaca nei ratti cirrotici con ascite trattati con la soluzione fisiologica ed è stata rilevata significativamente diminuita rispetto alla contrattilità degli animali di controllo $p < 0.01$ (Fig. 10).

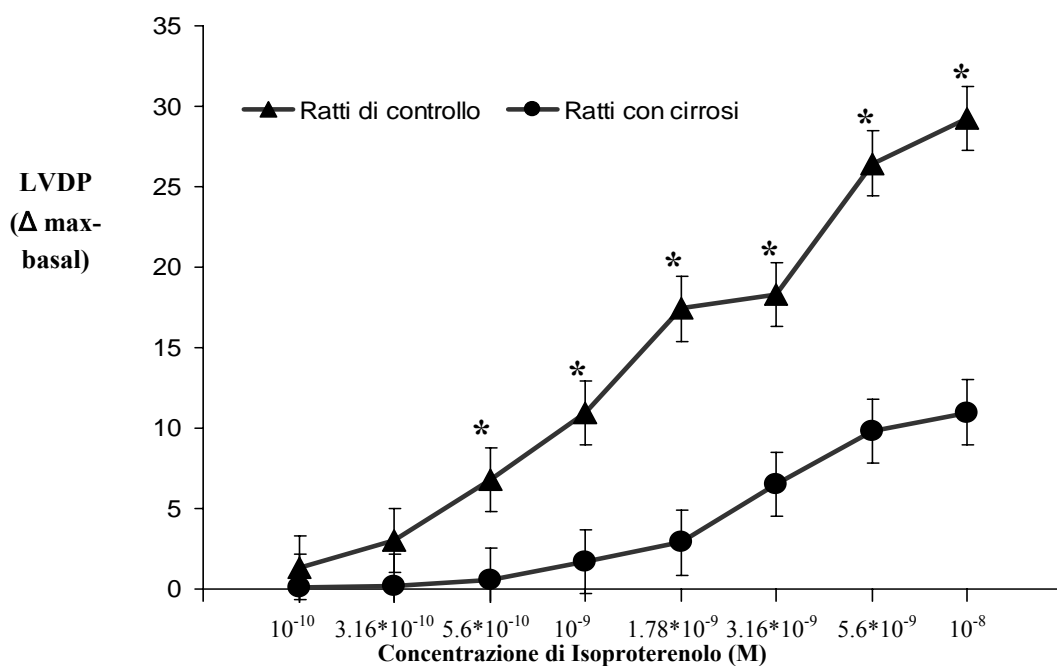


Figura 10. Contrattilità cardiaca in ratti di controllo (▲) e in ratti con cirrosi e ascite (●) dopo il trattamento con fisiologica. I valori sono espressi come media \pm ES; * $p < 0.01$ vs controlli trattati con fisiologica.

La somministrazione di albumina nei ratti cirrotici con ascite si è tradotta in un incremento significativo della contrattilità cardiaca rispetto agli animali cirrotici con ascite trattati con fisiologica $p < 0.01$ (Fig. 11). Questo miglioramento è tale da riportare la contrattilità a livelli simili a quelli dei controlli (Fig. 12).

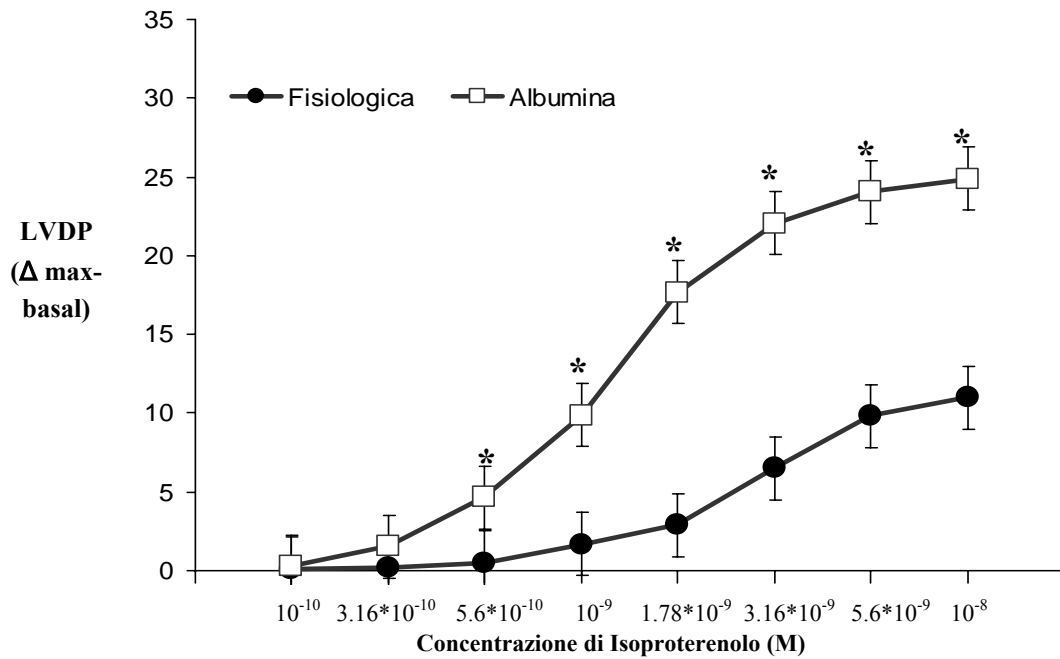


Figura 11. Effetti dell'albumina (□) vs fisiologica (●) sulla contrattilità cardiaca in ratti cirrotici con ascite. I valori sono espressi come media ±ES; * p<0.01 vs animali cirrotici con ascite trattati con fisiologica.

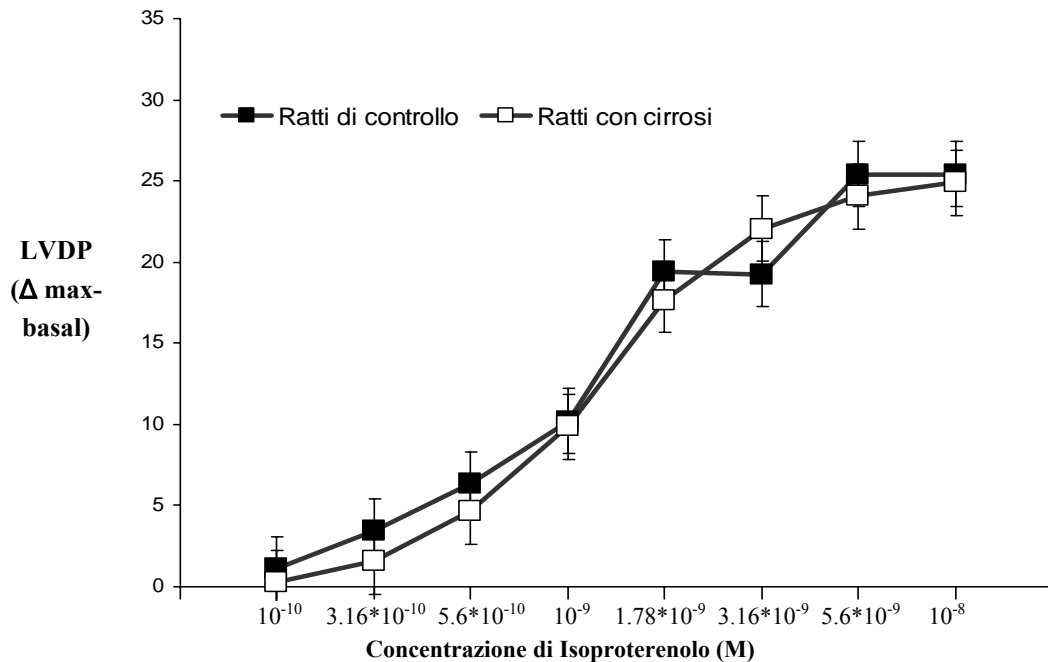


Figura 12. Contrattilità cardiaca in animali di controllo e di ratti con cirrosi e ascite dopo la somministrazione di albumina.

4.2 ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO

I livelli di mRNA dei geni β 1-AR, β 2-AR, *Gai2*, *Gas* e *Adcy3* sono stati valutati con la tecnica di RT-PCR ed estratti dal tessuto cardiaco dei quattro gruppi di animali.

Non sono state riscontrate differenze rilevanti tra i gruppi di animali di controllo trattati con fisiologica (F) o albumina (A). L'espressione genica di β 1-AR e di *Gas* non è risultata essere significativamente differente nei quattro gruppi di animali (Fig.13).

Differenze significative sono state rilevate nei geni β 2-AR, *Gai2* e *Adcy3*. L'espressione genica di β 2-AR e *Gai2* è aumentata significativamente di 2-volte, mentre quella di *Adcy3* è risultata essere il 50% nei cuori isolati di ratti cirrotici con ascite rispetto ai controlli ($p < 0.05$ vs controlli) (Fig.13).

La somministrazione di albumina nei ratti cirrotici con ascite ha indotto una riduzione della espressione di *Gai2* e un incremento di *Adcy3* riportandoli a valori quasi simili a quelli presenti nei cuori isolati di ratti di controllo ($p < 0.05$ vs ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica) (Fig.13).

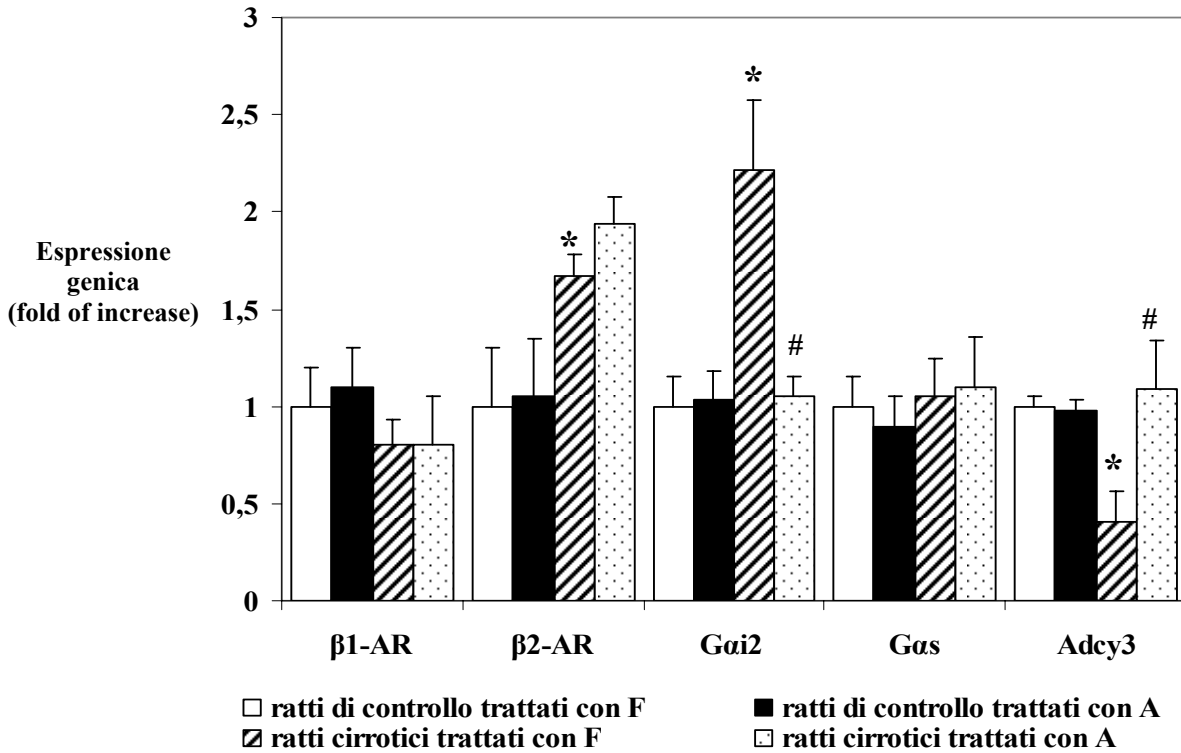


Figura 13. Espressione genica di $\beta 1$ -AR, $\beta 2$ -AR, Gai2, Gas e Adcy3 valutati con la RT-PCR in animali di controllo e ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica (F) o albumina (A). I valori sono espressi come media \pm ES; * $p < 0.05$ vs ratti di controllo trattati con fisiologica; # $p < 0.05$ vs animali cirrotici con ascite trattati con fisiologica.

4.3 ESPRESSIONE PROTEICA DEL PATHWAY β -ADRENERGICO

L'espressione proteica di $\beta 1$ -AR, $\beta 2$ -AR, Gai2, Gas e Adcy3 è stata misurata attraverso la tecnica Western Blot con anticorpi specifici contro le varie proteine nei cuori da animali di controllo e animali cirrotici con ascite trattati con albumina (A) o con fisiologica (F). Le proteine sono separate attraverso elettroforesi su gel di acrilamide ed è stato effettuato il transfer su membrana di nitrocellulosa. Il pannello superiore della Fig.14 mostra un immunoblot rappresentativo di $\beta 1$ -AR, $\beta 2$ -AR, Gai2, $G\alpha_s$, Adcy3 e del corrispondente

housekeeping GAPDH. Il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica dopo la normalizzazione mediante l'housekeeping. I dati sono espressi come β 1-AR/GAPDH, β 2-AR/GAPDH, *Gai2*/GAPDH, *Gas*/GAPDH e *Adcy3*/GAPDH e normalizzati rispetto ai controlli trattati con fisiologica.

L'analisi densitometrica mostra che l'espressione proteica di β 2 e *Gai2* è significativamente aumentata, mentre l'espressione di *Adcy3* diminuisce in modo significativo nel tessuto cardiaco di ratti cirrotici con ascite rispetto ai cuori di ratti di controllo ($p < 0.05$). Dopo l'infusione di albumina l'espressione proteica di *Gai2* diminuisce nei ratti cirrotici con ascite trattati con albumina rispetto a quelli trattati con fisiologica ritornando a livelli simili a quelli dei controlli trattati con fisiologica ($p < 0.05$) (Fig. 14).

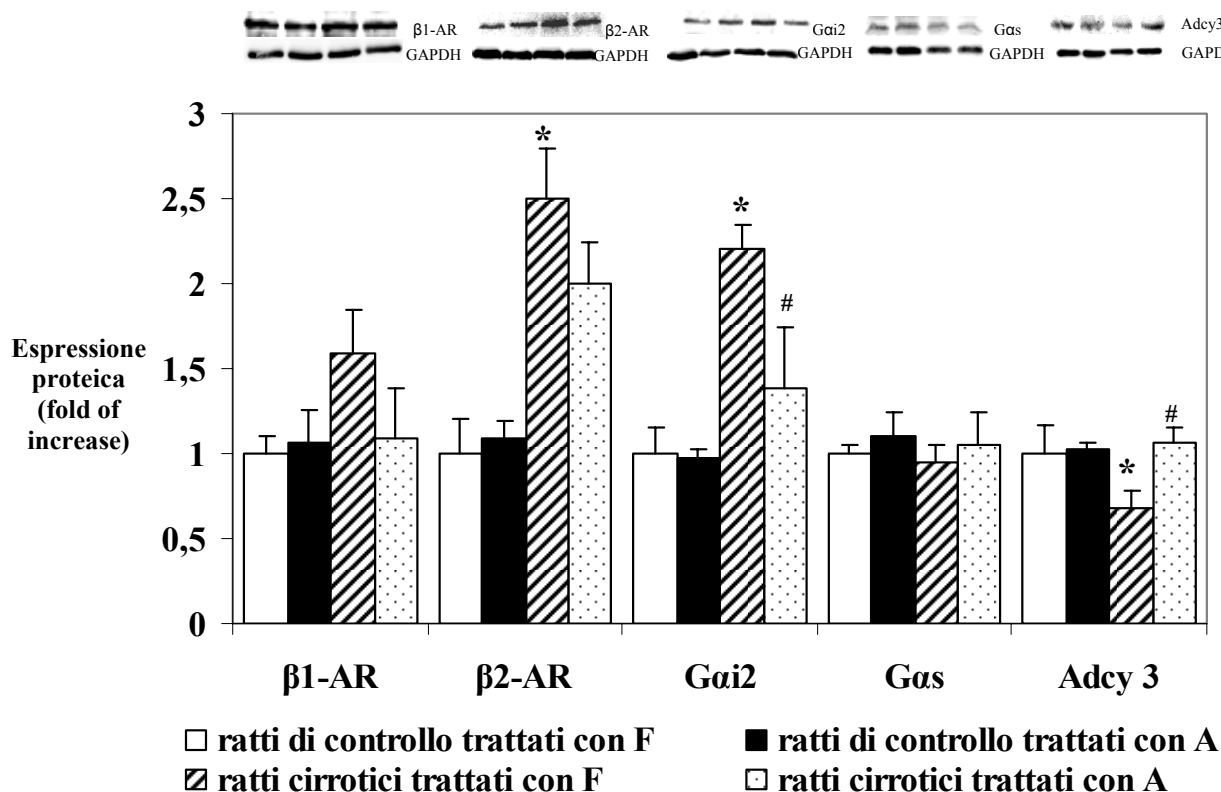


Figura 14. Espressione proteica di β 1-AR, β 2-AR, *Gai2*, *Gas* e *Adcy3* analizzata con Western Blot in animali di controllo e ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica (F) o albumina (A). Il pannello superiore mostra degli immunoblot

rappresentativi di ogni proteina e il corrispondente GAPDH, il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi e ascite trattati con fisiologica.

4.4 ATTIVAZIONE DELLE NAD(P)H OSSIDASI

La NAD(P)H ossidasi è un enzima formato da varie sub unità, due tra queste sono citosoliche (Rac-1 and p47-phox) e traslocano sulla membrane cellulare quando sono attivate, ciò induce la produzione di ROS.

La Fig. 15 mostra l'aumentata traslocazione in membrane di p47-phox and Rac-1 dopo la somministrazione di fisiologica in ratti cirrotici con ascite rispetto agli animali di controllo ($p < 0.05$), questa attivazione è completamente normalizzata se gli animali vengono trattati con albumina ($p < 0.05$).

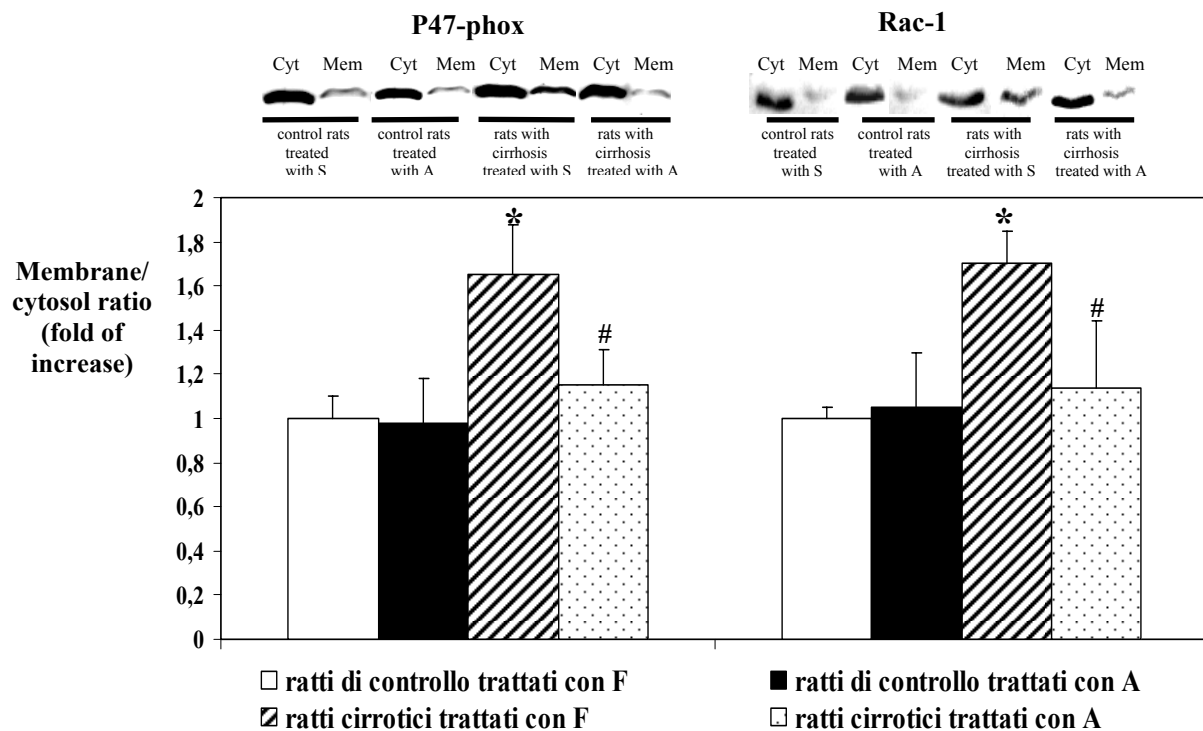


Figura 15. Western blot delle membrane (Mem) e delle frazioni citosoliche (Cyt) delle subunità p47-phox e RAC-1 delle (NAD(P)H) ossidasi da ratti di controllo e ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica (F) o con albumina (A). Il pannello superiore mostra degli immunoblot rappresentativi di ogni proteina, il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi e ascite trattati con fisiologica.

4.5 ATTIVAZIONE DI NF-kB

NF-kB è un fattore di trascrizione che, quando attivato, trasloca nel nucleo inducendo la trascrizione di diversi geni, tra cui TNF- α e iNOS. La Fig. 15 mostra che la traslocazione nucleare di questo fattore di trascrizione nel tessuto cardiaco è significativamente aumentata nei ratti cirrotici con ascite a cui è stata somministrata la soluzione fisiologica rispetto ai controlli ($p < 0.05$). Il trattamento con l'albumina invece causa in ratti cirrotici con ascite un ritorno a livelli simili a quelli dei controlli ($p < 0.05$). (Fig. 16)

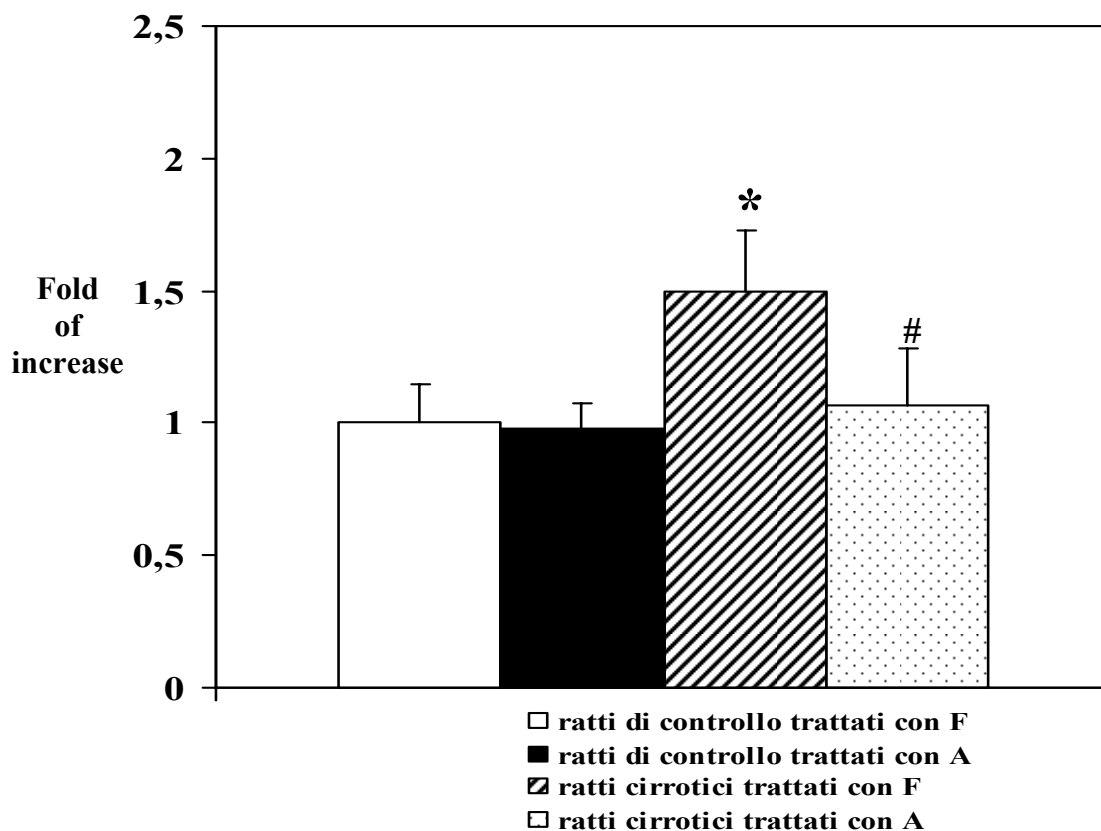


Figura 16. Traslocazione di NF-kB a livello del miocardio in animali di controllo e animali cirrotici con ascite trattati con soluzione fisiologica (F) o con albumina (A) valutata con kit ELISA. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi trattati con fisiologica.

4.6 ESPRESSIONE DI iNOS

La Fig. 17 mostra che l'aumentata espressione proteica di iNOS, che è stata osservata dopo la somministrazione di fisiologica ($p < 0.05$), è riportata dal trattamento con albumina ai livelli degli animali di controllo ($p < 0.05$)

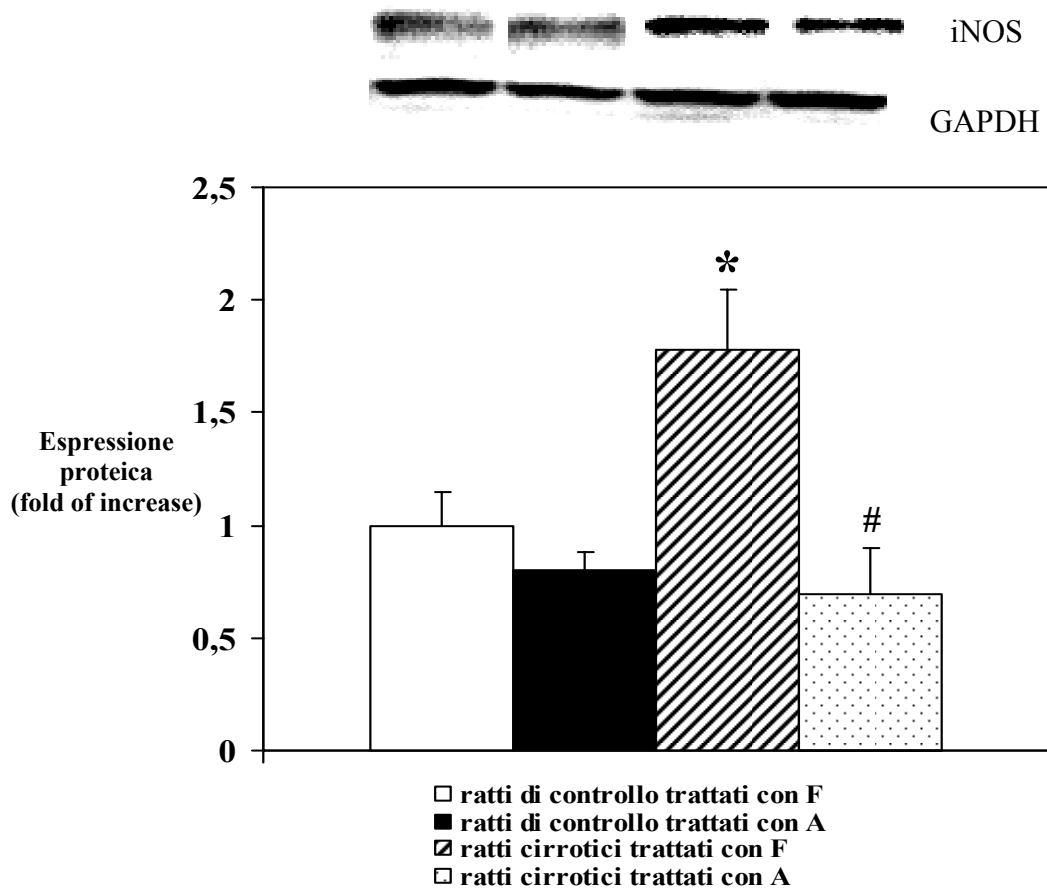


Figura 17. Analisi dell'espressione proteica di iNOS attraverso Western blot da ratti di controllo e ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica (F) o con albumina (A). Il pannello superiore mostra un immunoblot rappresentativo, il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi e ascite trattati con fisiologica.

4.7 QUANTIFICAZIONE DI TNF- α

La Fig. 18 rappresenta la quantificazione di TNF- α nel plasma e nel liquido ascitico di ratti di controllo e di ratti cirrotici con ascite trattati con fisiologica o albumina. Nei ratti cirrotici trattati con la soluzione salina i livelli plasmatici di questa citochina sono significativamente aumentati di due volte rispetto agli animali di controllo ($p < 0.05$). L'albumina riduce i livelli plasmatici in questi animali a quelli osservati negli animali di controllo ($p < 0.05$).

Allo stesso modo, la somministrazione di albumina causa un significativa diminuzione della concentrazione di TNF- α nel liquido ascitico dei ratti con cirrosi ($p < 0.05$).

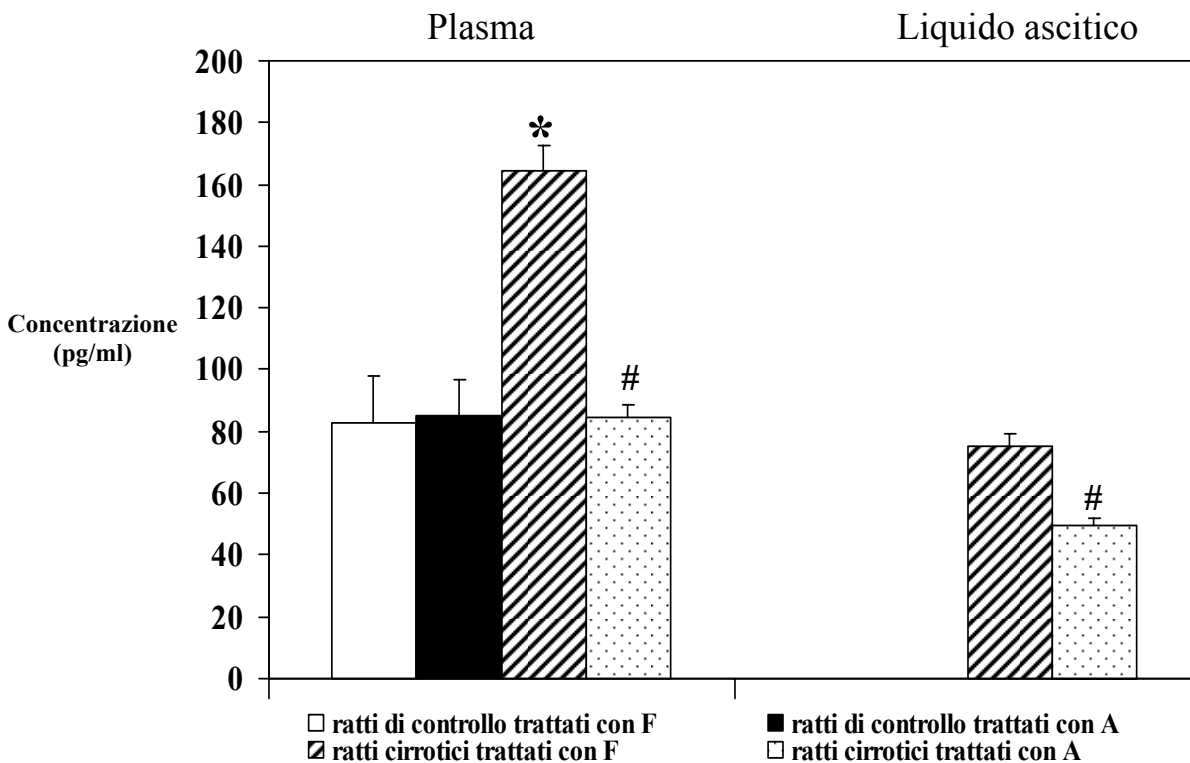


Figura 18. Livelli plasmatici e del liquido ascitico del TNF- α in animali di controllo e in ratti con cirrosi e ascite trattati con la soluzione fisiologica (F) o con albumina (A) analizzati con kit ELISA. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi e ascite trattati con fisiologica.

La FIG. 19 riporta l'espressione proteica di TNF- α nel tessuto cardiaco dei ratti dopo la somministrazione di soluzione salina o albumina analizzata con la tecnica Western Blot. Dopo l'iniezione di salina, i livelli cardiaci della citochina sono superiori nei ratti con cirrosi e ascite rispetto ai controlli ($p < 0.05$). Dopo la somministrazione di albumina, nei ratti con cirrosi e ascite i livelli di TNF- α sono riportati a quelli osservati negli animali di controllo ($p < 0.05$).

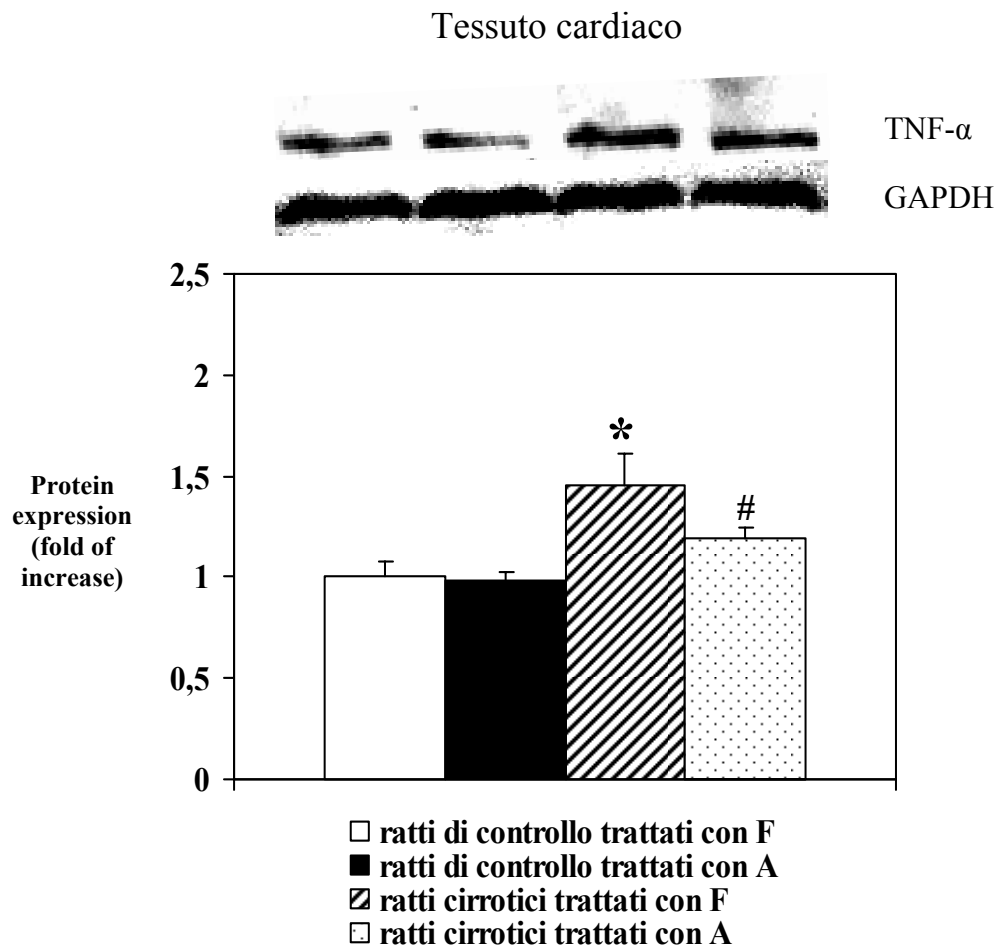


Figura 19. Espressione proteica di TNF- α mediante Western Blot nel tessuto cardiaco di animali di controllo e in ratti con cirrosi e ascite trattati con la soluzione fisiologica (F) o con albumina (A). Il pannello superiore mostra un immunoblot rappresentativo, il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica. * $p < 0.05$ vs controlli; # $p < 0.05$ vs ratti con cirrosi e ascite trattati con fisiologica.

5 DISCUSSIONE

Il più importante risultato del nostro studio è l'osservazione che l'infusione intravenosa di albumina quasi normalizza i difetti della contrattilità cardiaca analizzata in ratti cirrotici con ascite (Fig. 12). Questa azione sembra essere mediata da due meccanismi molecolari: a) la diminuzione dell'overespressione e dell'aumentata attività di iNOS (Fig 17), e b) la riduzione dell'espressione della proteina G inibitoria del pathway β -adrenergico nel tessuto cardiaco (Fig. 13 e Fig. 14).

Per quanto riguarda il primo pathway, è stato recentemente dimostrato che l'aumentata sintesi di NO nel tessuto cardiaco di topi con la legatura del dotto biliare (BDL) è correlata ad un aumento dei livelli di TNF- α .¹⁷ Inoltre, è stato osservato che la delezione genica, come l'inibizione farmacologica di TNF- α , diminuiscono i livelli di ossido nitrico in topi BDL, e questo cambiamento è accompagnato dalla correzione della disfunzione contrattile dei cardiomiociti.³⁵ D'accordo con queste osservazioni, l'effetto inotropico positivo dell'albumina osservato nel nostro studio è associate con la sua capacità di legare il TNF- α sierico e di diminuire l'overespressione di TNF- α nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi e ascite.

Studi precedenti hanno riscontrato che l'overespressione di TNF- nel tessuto cardiaco può essere correlata a due fattori principali a) stress ossidativo^{35,36} e b) un aumento della traslocazione nucleare di NF- κ B.²⁰ In più il TNF- α è capace di indurre lo stress ossidativo in cardiomiociti di ratti adulti e di attivare NF- κ B. Compatibilmente con queste considerazioni, la traslocazione in

membrana di p47-phox e Rac-1 (Fig. 15), un indice di stress ossidativo, e la traslocazione nucleare di NF-κB (Fig. 16) sono state trovate essere significativamente aumentate in ratti con cirrosi e ascite se comparati con i ratti di controllo. Il trattamento con albumina comporta una significativa diminuzione di entrambe, l'attivazione di p47-phox e Rac-1 (Fig. 15) e l'aumentata traslocazione nel nucleo di NF-κB (Fig. 16) in ratti con cirrosi. Come conseguenza di questi due effetti, l'infusione di albumina diminuisce l'espressione proteica di iNOS (Fig. 17) nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi e ascite a livelli simili a quelli dei controlli. Questi effetti del trattamento di albumina nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi e ascite sono simili a quelli osservati in un modello sperimentale di sepsi.³¹

Per quanto riguarda il secondo punto, il ruolo importante dello stress ossidativo deve essere considerato l'attenuazione della trasduzione del segnale legata ai recettori beta adrenergici attraverso i suoi effetti sulle proteine G sia inibitorie (*Gai2*) che stimolatorie (*Gas*)³⁷ e/o sull'adenilato ciclasi, che è stato osservato sia nell'insufficienza cardiaca cronica sia nel danno cardiaco da ischemia/riperfusion.³⁸ I risultati del nostro studio confermano i dati già pubblicati dal nostro gruppo¹⁰ di una riduzione dell'espressione genica e proteica di *Adcy 3* nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi. In più mostrano per la prima volta che questa riduzione è corretta dalla somministrazione di albumina. Sulla base di questa considerazione, una diretta azione dello stress ossidativo sull'espressione di *Adcy 3* non può essere esclusa.

Ciononostante, l'interpretazione dell'espressione di *Adcy 3* con o senza il trattamento con albumina non può essere separata dall'espressione di *Gai2* o *Gas*.

Infatti, l'aumentata espressione di RNA e proteina di *Gαi2*, che è stata osservata nel tessuto cardiaco degli animali cirrotici trattati con la fisiologica e quindi considerati in condizione basale, sicuramente contribuisce all'inibizione di *Adcy 3*. Le proteine *Gi*, inclusa *Gαi2*, sono accoppiate a $\beta 2$ -AR, i quali, quando vengono stimolati, possono indurre un aumento dell'attivazione del β -recettore-proteina-*Gi*.^{6,10} Per la prima volta, il nostro studio riscontra un aumento sia dell'espressione genica che proteica di $\beta 2$ -AR nel tessuto cardiaco di ratti con cirrosi e ascite rispetto ai controlli (Fig. 13 e Fig. 14). Quindi, un'aumentata espressione delle proteine G inibitorie, a causa dell'incrementato segnale dato dai recettori $\beta 2$ -AR, può essere ipotizzato contribuire alla riduzione di contrattilità in ratti con cirrosi, come è stato dimostrato in un modello sperimentale di insufficienza cardiaca scompensata.^{39,40} Ciononostante, l'espressione di $\beta 2$ -AR non è significativamente cambiata dopo somministrazione di albumina mentre, come discusso precedentemente, l'aumentata espressione di *Gαi2* osservata alle condizioni basali è stata quasi normalizzata (Fig. 13 e Fig. 14). Conseguentemente, i nostri risultati suggeriscono che l'effetto dell'albumina sulla trasduzione del segnale dei recettori β adrenergici non è correlata ad un cambiamento dell'espressione di $\beta 1$ -AR e/o $\beta 2$ -AR, ma ad una diminuzione dell'espressione di *Gαi2* probabilmente mediata dall'effetto dell'albumina sullo stress ossidativo.

Tutti assieme, i nostri risultati ci hanno portato a confermare e a consolidare l'ipotesi, precedentemente avanzata in campo clinico, che l'azione dell'albumina nel mantenere la gittata cardiaca osservata in pazienti con cirrosi e peritonite batterica spontanea, è lontana dall'essere dovuta solo all'aumento del

precarico.⁴¹ L'albumina aumenta direttamente la contrattilità cardiaca riducendo a) l'effetto inotropo negativo del pathway NF-kB-iNOS-NO e b) l'overespressione di proteine Gi e la down-espressione di Adcy 3 mediata dallo stress ossidativo.

Gli ultimi due punti che devono essere discussi sono i più critici dato che ci si può chiedere quale sia l'origine dell'aumentata disponibilità sistemica del TNF- α in ratti con cirrosi e come l'albumina esercita i suoi effetti sui cardiomiociti di ratto con cirrosi e ascite. Le risposte a queste domande sono strettamente collegate. Per prima cosa, come precedentemente dimostrato, in un modello sperimentale di cirrosi, la traslocazione batterica può indurre una risposta infiammatoria sistemica con livelli di TNF- α simili a quelli osservati in animali con infezione del liquido ascitico.²⁴ In più, è stato già osservato che la diminuzione della disponibilità di TNF- α attraverso iniezioni intraperitoneali di specifici anticorpi è possibile contrastare lo stress ossidativo e l'aumento dell'espressione di iNOS indotto da questa citochina nel tessuto cardiaco di topi BDL.³⁵ Quindi, gli effetti del trattamento con albumina sui cardiomiociti di ratto con cirrosi e ascite possono essere collegati alla sua capacità di legare TNF- α nella circolazione sistemica inibendo gli effetti di questa citochina sul tessuto cardiaco. A conferma di ciò, nel nostro studio abbiamo dimostrato una diminuzione dei livelli di TNF- α nel plasma e nel liquido ascitico di ratti con cirrosi scompensata.

In conclusione, i risultati dello studio sostengono la tesi che l'albumina esercita un effetto inotropico positivo in animali con cirrosi e ascite e che questo effetto è indipendente dall'effetto dell'albumina sul volume plasmatico. La

modalità di azione dell'albumina nel tessuto cardiaco di ratti cirrotici è complesso e coinvolge la sua capacità di contrastare l'effetto negativo del TNF- α e dello stress ossidativo sulla contrattilità cardiaca.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Gould L, Shariff M, Zahir M, et al. *Cardiac hemodynamics in alcoholic patients with chronic liver disease and a presystolic gallop*. Journal of Clinical Investigation 1969;58:860-868.
2. Kowalsk HJ, Abelmann WH. *The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis*. Journal of Clinical Investigations 1953;32:1025-1033.
3. Wong F. *Cirrhotic cardiomyopathy*. Hepatol Int. 2009 Mar;3(1):294-304
4. Møller S, Henriksen JH. *Cardiovascular complications of cirrhosis*. Gut 2008;57(2):268-78.
5. Tilley DG. *G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function*. Circ Res. 2011 Jul 8;109(2):217-30.
6. Zheng M, Han QD, Xiao RP. *Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance*. Acta Physiologica Sinica 2004 25;56(1):1-15.
7. Gerbes AL, Remien J, Jünger D, et al. *Evidence for down-regulation of beta-2-adrenoceptors in cirrhotic patients with severe ascites*. Lancet. 1986 21;1(8495):1409-11.
8. Ma Z, Meddings JB, Lee SS. *Membrane physical properties determine cardiac beta-adrenergic receptor function in cirrhotic rats*. Am J Physiol. 1994;267(1 Pt 1):G87-93.
9. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function*. FASEB J. 1990;4(11):2881-9.
10. Ceolotto G, Papparella I, Sticca A, et al. *An abnormal gene expression of the beta-adrenergic system contributes to the pathogenesis of cardiomyopathy in cirrhotic rats*. Hepatology 2008;48:1913-1923.
11. Ma Z, Miyamoto A, Lee SS. *Role of altered beta-adrenoceptor signal transduction in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in rats*. Gastroenterology. 1996;110(4):1191-8.
12. Lee RF, Glenn TK, Lee SS. *Cardiac dysfunction in cirrhosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(1):125-40.

13. Vallance P, Moncada S. *Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?* Lancet. 1991 30;337(8744):776-8.
14. Angeli P, Fernández-Varo G, Dalla Libera V, et al. *The role of nitric oxide in the pathogenesis of systemic and splanchnic vasodilation in cirrhotic rats before and after the onset of ascites.* Liver Int. 2005;25(2):429-37.
15. Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, et al. *Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283(5):G1074-81.
16. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, et al. *Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 1;90(1):347-51.
17. Liu H, Ma Z, Lee SS. *Contribution of nitric oxide to the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats.* Gastroenterology. 2000;118(5):937-44.
18. Hare JM, Colucci WS. *Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function.* Prog Cardiovasc Dis. 1995;38(2):155-66.
19. Liu H, Song D, Lee SS. *Cirrhotic cardiomyopathy.* Gastroenterol Clin Biol. 2002;26(10):842-7.
20. Liu H, Lee SS. *Nuclear factor-kappaB inhibition improves myocardial contractility in rats with cirrhotic cardiomyopathy.* Liver Int. 2008;28(5):640-8.
21. Barnes PJ. *Nuclear factor-kappa B.* Int J Biochem Cell Biol. 1997;29(6):867-70.
22. Tsai MH, Peng YS, Chen YC, et al. *Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock.* Hepatology. 2006;43(4):673-81.
23. Marik PE. *Mechanisms and clinical consequences of critical illness associated adrenal insufficiency.* Curr Opin Crit Care. 2007;13(4):363-9.
24. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, et al. *Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis.* Hepatology. 2008;47(3):978-85.
25. Sort P, Navasa M, Arroyo V, et al. *Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis.* N Engl J Med 1999;341:403-409.

26. Ginès P, Angeli P, Lenz K, et al. *EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. J Hepatol. 2010;53:397-417.
27. Quilan GJ, Munby S, Martin GS, et al. *Albumin influences total plasma antioxidant capacity favourably in patients with acute lung injury*. Crit Care Med 2004;32:755-759.
28. Evans TW. *Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure*. Aliment Pharmacol Ther 2002;16(s5):6-11.
29. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. *Albumin: biochemical properties and therapeutic potential*. Hepatology 2005;41:1211-1219.
30. Arroyo V, Fernandez J. *Pathophysiological basis of albumin use in cirrhosis*. Ann Hepatol 2011;10(suppl. 1):s6-s14.
31. Meziani F, Kremer H, Tesse A, et al. *Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses*. Am J Pathol 2007;171:1753-1761.
32. Angeli P, Jimenez W, Veggian R, et al. *Increased activity of guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase in the renal tissue of cirrhotic rats with ascites*. Hepatology 2000;31:304-310.
33. Bova S, Cargnelli G, D'Amato E, et al. *Calcium-antagonist effects of norbormide on isolated perfused heart and cardiac myocytes of guinea-pig: a comparison with verapamil*. Br J Pharmacol 1997;120:19-24.
34. Papparella I, Ceolotto G, Berto L, et al. *Vitamin C prevents zidovudine-induced NAD(P)H oxidase activation and hypertension in the rat*. Cardiovasc Res 2007;73:432-438.
35. Yang YY, Liu H, Nam SW, et al. *Mechanisms of TNFalpha-induced cardiac dysfunction in cholestatic bile duct-ligated mice: interaction between TNFalpha and endocannabinoids*. J Hepatol. 2010;52:298-306.
36. Cailleret M, Amadou A, Andrieu-Abadie N, et al. *N-acetylcysteine prevents the deleterious effect of tumor necrosis factor-(alpha) on calcium transients and contraction in adult rat cardiomyocytes*. Circulation. 2004;109:406-411.
37. Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, et al. *Gai and Gao target proteins of reactive oxygen species*. Nature. 2000; 408: 492-495.

38. Persad S, Panagia V, Dhalla NS. *Role of H₂O₂ in changing beta-adrenoceptor and adenylyl cyclase in ischemia-reperfused hearts.* Mol Cell Biochem. 1998;186:99-106.
39. Steinberg SF. *The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes.* Circ Res. 1999;85:1101-1111.
40. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circ Res. 2003; 93: 896-906.
41. Fernández J, Navasa M, Garcia-Pagan JC, et al. *Effect of intravenous albumin on systemic and hepatic hemodynamics and vasoactive neurohormonal systems in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis.* J. Hepatol. 2004; 41: 384-390.