

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali
Indirizzo Epatologia e Chirurgia Epatobiliare e Trapiantologia
26° CICLO

**L'IPERAMMONIEMIA INDOTTA:
CORRELATI NEUROPSICHICI, CORRELATI ELETTROFISIOLOGICI
E NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore di Indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Gatta

Supervisori: Ch.mo Prof. Piero Amodio, Dott.ssa Sara Montagnese

Dottoranda: Dott.ssa Iolanda Daniela Raduazzo

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	15
1.1 ENCEFALOPATIA EPATICA	15
1.1.1 Terminologia	15
1.1.2 Patogenesi	17
1.1.2.1 Teoria ammoniogenica	17
1.1.2.2 Teorie alternative	20
1.1.3 Caratteristiche cliniche	22
1.1.4 Diagnosi	23
1.1.5 Terapia	31
1.1.5.1 Studi clinici sul LOLA	34
1.2 SONNO ED ENCEFALOPATIA EPATICA	39
1.2.1 Regolazione fisiologica del sonno	39
1.2.1.1 Regolazione circadiana del sonno	39
1.2.1.2 Regolazione omeostatica del sonno	39
1.2.2 Alterazioni ritmo sonno-veglia ed encefalopatia	40
1.2.2.1 Ritmi circadiani	43
1.2.2.2 Indici di sonno omeostatico	43
2. SCOPO DELLA TESI	45
3. METODOLOGIA GENERALE	47
3.1 POPOLAZIONE STUDIATA	47
3.2 VALUTAZIONE CLINICA	48
3.3 QUALITÀ DI VITA	49
3.4 VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA	49
3.4.1 PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score)	49
3.4.2 SCAN Test	50
3.5 VALUTAZIONE ELETTROFISIOLOGICA	50
3.5.1 EEG di veglia	50
3.6 CARICO DI AMINOACIDI	51
3.7 AMMONIEMIA	52
3.8 APPROVAZIONE COMITATO ETICO	52
4. EFFETTI DELLA IPERAMMONIEMIA SU PRESTAZIONE NEUROPSICHICA ED EEG DI VEGLIA. STUDIO 1.	53
4.1 INTRODUZIONE	53
4.2 DISEGNO DELLO STUDIO	53
4.3 MATERIALI E METODI	56
4.3.1 Popolazione di studio	56
4.3.2 Valutazione clinica e nutrizionale	56
4.3.3 Qualità di vita	56
4.3.4 Valutazione neuropsicologica	57
4.3.5 Valutazione elettrofisiologica	57
4.3.5.1 Registrazione ed analisi dell'EEG di veglia	57
4.3.5.2 Composizione delle mappe	57
4.3.6 Carico orale di aminoacidi (COAA)	58
4.3.7 Ammoniemia	58
4.3.8 Analisi statistica	58
4.4 RISULTATI	60
4.4.1 Dati demografici	60
4.4.2 Valutazione psicometrica basale	61
4.4.3 EEG di veglia basale	63
4.4.4 Valutazione post-carico	63
4.4.4.1 Ammoniemia	63
4.4.4.2 Prestazione neuropsichica	64
4.4.4.3 Distribuzione potenza spettrale	65
4.4.4.4 Distribuzione frequenza spettrale	65
4.5. DISCUSSIONE	68
4.5.1 Considerazioni generali	68
4.5.2 Effetti dell'iperammoniemia indotta	69

5. EFFETTO DELLA IPERAMMONIEMIA SULLA SONNOLENZA E SU EEG DI SONNO. STUDIO 2.	73
5.1 INTRODUZIONE	73
5.2 DISEGNO DELLO STUDIO	74
5.3 MATERIALI E METODI	76
5.3.1 Valutazione del sonno	76
5.3.1.1 <i>Questionari del sonno</i>	76
5.3.1.2 <i>Diari del sonno</i>	77
5.3.1.3 <i>Actigrafo</i>	78
5.3.1.4 <i>Sonnolenza</i>	79
5.3.3 EEG di sonno	79
5.3.4 Analisi statistica	80
5.4 RISULTATI	81
5.4.1 Qualità sonno	81
5.4.2 Sonnolenza soggettiva	82
5.4.3 EEG di sonno-nap EEG	84
5.5 DISCUSSIONE	87
6. EFFETTI DI L-ORNITINA-L-ASPARTATO E CAFFEINA SU PRESTAZIONE COGNITIVA, EEG DI VEGLIA E SONNO IN CONDIZIONI DI IPERAMMONIEMIA INDOTTA. STUDIO 3.	90
6.1 INTRODUZIONE	90
6.2 DISEGNO DELLO STUDIO	91
6.3 MATERIALI E METODI	93
6.3.1 Popolazione studiata	93
6.3.2 Valutazione clinica	93
6.3.3 Qualità di vita e valutazione del sonno	93
6.3.4 Sonnolenza	94
6.3.5 Valutazione neuropsicologica	94
6.3.6 Valutazione elettrofisiologica	94
6.3.7 Carico di aminoacidi	94
6.3.8 Ammoniemia	94
6.3.9 L-ornitina-L- aspartato (LOLA)	95
6.3.10 Caffaina	95
6.3.11 Analisi statistica	95
6.4 RISULTATI	97
6.4.1 Dati demografici	97
6.4.2 Valutazione neuropsichica	98
6.4.3 Ammoniemia	100
6.4.4 Sonnolenza soggettiva	100
6.4.5 EEG di sonno- nap EEG	101
6.5 DISCUSSIONE	102
6.5.1 Limiti degli studi 1-3	104
7. CONCLUSIONI E IMPLICAZIONI	105
8. BIBLIOGRAFIA	107

RIASSUNTO

Introduzione.

L'encefalopatia epatica (EE) è una sindrome neuropsichica che può accompagnare l'insufficienza epatica acuta o cronica ed è legata principalmente all'effetto tossico dell'ammonio sul sistema nervoso centrale [83]. Clinicamente, l'EE è caratterizzata da uno spettro di manifestazioni che va da forme minime, evidenziabili solo con tecniche psicometriche ed elettrofisiologiche, fino al coma, passando per quadri clinici di encefalopatia conclamata, caratterizzati da alterazioni neurologiche e psichiatriche più o meno invalidanti [7, 8, 11, 145, 176, 191]. L'EE, anche nelle sue forme minime, si ripercuote non solo sull'autonomia e sulla qualità di vita del paziente [10, 76, 121, 165], ma anche su quelle familiari e sulle strutture socio-sanitarie. Inoltre, contribuisce ad individuare pazienti con ridotta aspettativa di vita, per i quali può essere indicato l'inserimento in lista per trapianto di fegato. La diagnosi elettrofisiologica dell'EE si basa sulla rilevazione di un rallentamento delle frequenze dell'EEG [8]. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che anche la distribuzione regionale dei ritmi dell'EEG di veglia può essere anormale nei pazienti con cirrosi e soprattutto in quelli con EE [127]. Il rilievo di EE mediante tecniche psicometriche ed elettrofisiologiche viene di solito effettuato in condizioni basali. Più di recente, è stato proposto di indurre un'iperammoniemia e quindi di simulare una condizione di EE minima/conclamata lieve tramite la somministrazione orale di un carico di aminoacidi (COAA) mimanti l'emoglobina (simulazione di encefalopatia/iperammoniemia associate al sanguinamento digestivo) e di studiarne l'effetto su psicometria ed elettroencefalogramma [4, 65], misurando quindi più direttamente la sensibilità del singolo paziente all'iperammoniemia.

I disturbi del ritmo sonno-veglia sono comuni nei pazienti con cirrosi epatica e incidono pesantemente sulla loro qualità di vita [130]. Il sonno è regolato dall'interazione tra due processi: un processo omeostatico e uno circadiano [31]. Il primo determina la propensione ad addormentarsi in rapporto alla precedente storia di sonno/veglia, facendo sì che la necessità di dormire aumenti con il prolungarsi della veglia. Invece il processo circadiano, che si riflette nel ritmo 24-ore dell'ormone melatonina (livelli plasmatici elevati la notte

e pressoché assenti di giorno), determina l'alternarsi di periodi di bassa/alta propensione all'addormentamento in relazione ai segnali ambientali di luce/buio. Il risultato dell'interazione fra questi due processi fa sì che la probabilità di addormentarsi sia alta quando sono passate numerose ore dal risveglio e quando si fa buio, vale a dire la sera.

Le alterazioni del ritmo sonno-veglia dei pazienti con cirrosi epatica sono state tradizionalmente interpretate come facenti parte del complesso sindromico dell'encefalopatia epatica [176]. Dati più recenti suggeriscono che l'eccessiva sonnolenza diurna sia effettivamente un tratto dell'EE, mentre l'insonnia abbia una patogenesi distinta [129]. Tuttavia le cause di questi disturbi restano dibattute. Le documentate alterazioni del sistema di regolazione circadiano (ridotta sensibilità alla luce e disturbato ritmo/metabolismo della melatonina) non offrono una spiegazione esauriente [129, 130]. Anche le informazioni disponibili in questi pazienti sulla regolazione omeostatica del sonno, che può essere studiata con la polisonnografia, sono scarse [180]. Le esatte correlazioni neurochimiche dell'omeostasi del sonno umano rimangono sconosciute, anche se sempre più numerose evidenze dimostrano un possibile importante ruolo nella trasmissione adenosinergica. Nei soggetti sani infatti la caffeina, un antagonista recettoriale dell'adenosina, influenza in modo significativo l'elettroencefalogramma di veglia (riduzione dell'attività theta, che aumenta con l'aumentare della pressione del sonno) e di sonno, e attenua la sonnolenza soggettiva associata alla veglia prolungata/deprivazione di sonno [107].

I miei studi di dottorato sono stati eseguiti allo scopo di valutare, in un gruppo di pazienti con la cirrosi epatica e in un gruppo di volontari sani, l'effetto dell'iperammonimia indotta:

- sulla prestazione neuropsichica e sull'EEG di veglia (Studio 1);
- sul rapporto tra sonnolenza diurna ed EE e sulle caratteristiche dell'EEG di sonno (Studio 2);
- sugli effetti di sostanze ipoammoniemizzanti (L-ornitina-L-aspartato, LOLA) e della caffeina (antagonista del recettore dell'adenosina) su EEG di veglia e su EEG di sonno (Studio 3).

Materiali e metodi.

Sono stati arruolati pazienti ben caratterizzati con cirrosi epatica compensata e con anamnesi negativa per EE minima o conclamata e volontari sani confrontabili per età, sesso e livello d'istruzione.

I soggetti sono stati sottoposti a:

- valutazione e monitoraggio della qualità e degli orari del sonno con questionari e diari del sonno;
- carico orale di aminoacidi (COAA), miscela di 54 gr di aminoacidi mimanti l'emoglobina contenuta in 400 ml di sangue, assunta al mattino per os;
- rilevazione oraria di sonnolenza soggettiva ed ammoniemia capillare;
- valutazione neuropsichica, comprendente psicometria carta e matita (batteria PHES), psicometria computerizzata e registrazione dell'EEG di veglia.
- registrazione polisonnografica. Ai pazienti veniva data la possibilità di dormire tra le 17:00 e le 19:00 in condizioni ambientali favorevoli (stanza buia ed isolata).
- somministrazione di LOLA 20gr in 500cc di soluzione fisiologica in infusione di 4 ore (8-12) o caffeina 200mg per os (ore 10) in corso di iperammoniemia dopo COAA (studio 3).

Risultati.

Studio 1. Effetti dell'iperammoniemia sulla prestazione neuropsichica e sull'EEG di veglia

- la popolazione di studio comprendeva 10 pazienti con cirrosi epatica (9 uomini; media \pm SD; età: 54 ± 14 anni) e 10 volontari sani appaiati per età e sesso (5 uomini, 49 ± 13 anni). Un paziente (maschio di 55 anni) è stato sottoposto a registrazione EEG anche dopo l'inserimento di uno shunt porto-sistemico trans-giugulare (TIPS), procedura associata ad un aumentato rischio di sviluppo di EE.
- I soggetti sono stati studiati con una valutazione neuropsichica e monitoraggio dell'ammoniemia oraria in condizioni basali (4° o 8° giorno di studio) e dopo carico orale di aminoacidi (COAA) (4° o 8° giorno di studio).
- Al basale, i pazienti avevano livelli di ammoniaca superiori a quelli dei volontari sani [mediana (range interquartile): 30 (22-44) vs 38 (34-47)

$\mu\text{mol/L}$, $p < 0.1$]. Il COAA ha prodotto l'atteso aumento dell'ammoniemia in entrambi i gruppi; il picco dell'ammoniemia è stato più alto (ammoniemia ore 11:00, $p < 0.03$) e più prolungato nei pazienti.

- Il COAA ha prodotto un rallentamento significativo dell'EEG di veglia tale da definire la presenza di EE minima in 2 (20%) pazienti. Per contro, il COAA non ha prodotto cambiamenti significativi della prestazione psicometrica carta&matita o computerizzata.
- Al basale, la frequenza dominante dell'attività EEG era più lenta nei pazienti rispetto ai volontari sani in diverse derivazioni ($p < 0.05$). Il COAA non ha alterato la frequenza dominante nei volontari sani, mentre ha rallentato ulteriormente quella dei pazienti lungo la linea mediana ($p < 0.05$)
- In condizioni basali, la potenza spettrale dell'EEG di veglia aveva una predominanza occipito-temporale in entrambi i gruppi. I pazienti avevano potenza superiore in tutte le derivazioni ($p < 0.05$). Il COAA ha indotto un aumento significativo di potenza in quasi tutte le derivazioni nei volontari sani ($p < 0.05$), mentre nessuna modifica della potenza è stata osservata nei pazienti.
- Nel paziente studiato in tre occasioni, la potenza dell'attività dominante dell'EEG è aumentata progressivamente dal basale, dopo COAA, dopo TIPS, mentre si è osservato un calo della frequenza dominante dell'EEG dopo l'inserimento della TIPS.

Studio 2. Effetto dell'iperammoniemia su sonnolenza ed EEG di sonno

- la popolazione di studio (vedi studio 1) è stata sottoposta a valutazione neuropsichica, rilevazione oraria di sonnolenza ed ammoniemia oraria e registrazione polisonnografica, in condizioni basali (4° o 8° giorno di studio) e dopo COAA (4° o 8° giorno di studio).

Il COAA ha prodotto

- un aumento della sonnolenza soggettiva parallela all'aumento delle concentrazioni dell'ammoniaca sia nei pazienti che nei volontari sani; in entrambi i gruppi il picco di sonnolenza (ore 11), assente in condizione basale, coincide con il picco di concentrazione dell'ammoniaca ($p < 0.01$)
- un aumento della durata del sonno nei volontari sani rispetto al basale (media \pm SD, 49.3 ± 26.6 vs 30.4 ± 15.6 min), sebbene le differenze non

siano statisticamente significative ($p= 0.08$). Nessuna modifica sulla durata del sonno nei pazienti.

- diminuzione significativa della potenza relativa beta (attività veloce) dell'EEG di sonno nei volontari sani ($p<0.05$);
- riduzione significativa della potenza relativa delta (attività molto lenta) del sonno in pazienti ($p<0.05$);

Studio 3. Effetti di L-ornitina-L-aspartato (LOLA, sostanza ipoammoniemizzante) e di caffeina (antagonista del recettore dell'adenosina) su prestazione cognitiva, EEG di veglia e sonno in condizioni di iperammoniemia indotta

- la popolazione di studio comprendeva 6 pazienti con cirrosi epatica (5 uomini; media \pm SD; età: 61 ± 9 anni) e 5 volontari sani appaiati per età, sesso e livello d'istruzione (4 uomini, 49 ± 12 anni).
- I soggetti sono stati studiati con valutazione neuropsichica, rilevazione oraria di sonnolenza ed ammoniemia oraria e registrazione polisonnografica, dopo COAA – COAA+LOLA- COAA + caffeina) il 4°, 11° e 18° giorno di studio.
- I pazienti rispetto ai volontari sani hanno presentato una prestazione psicométrica sia carta e matita che computerizzata significativamente peggiore rispetto ai volontari sani ($p<0.05$)
- i pazienti avevano livelli di ammoniaca superiori a quelli dei volontari sani in tutte le condizioni; il COAA ha prodotto l'atteso aumento dell'ammoniemia in entrambi i gruppi, con un picco più elevato e più prolungato nei pazienti.
- il LOLA ha determinato una riduzione seppur non significativa dei livelli plasmatici dell'ammonio in entrambi i gruppi
- né il LOLA né la caffeina hanno determinato cambiamenti significativi su la sonnolenza soggettiva, su prestazione psicométrica e su EEG di veglia
- i dati sull'EEG di sonno sono in corso di analisi (presso l'Istituto Farmacologia e Tossicologia dell'Università di Zurigo, Svizzera).

Conclusioni.

- l'EEG di veglia è estremamente sensibile all'iperammoniemia
- un iperammoniemia moderata/cronica (pazienti in basale) o acuta (volontari sani dopo COAA) si traduce in una maggiore potenza del ritmo dominante di

EEG, specialmente sulle zone posteriori dello scalpo.

- un'iperammoniemia acuta su cronica (pazienti dopo COAA) rallenta ulteriormente la frequenza dominante dell'EEG
- parametri EEG basati sulla potenza possono fornire informazioni utili alla definizione neurofisiologica dell'EE.
- l'iperammoniemia comporta un notevole aumento della sonnolenza diurna soggettiva
- l'iperammoniemia provoca cambiamenti opposti nell'EEG di sonno dei pazienti e dei controlli, rendendo il sonno dei pazienti più superficiale ed interrotto e quello dei volontari sani più profondo e stabile.
- l'EE può forse quindi essere inquadrata come un difetto di vigilanza, che rende simili l'EEG di sonno a quello di veglia, compromettendo quindi il raggiungimento di una veglia 'piena' e la produzione di un sonno 'ristoratore'.
- L-ornitina-L-aspartato determina una riduzione dei livelli di ammoniemia

SUMMARY

Introduction.

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychological syndrome which may accompany acute or chronic liver failure, being mainly due to the toxic effect of ammonia on the central nervous system [83]. HE encompasses a wide clinical spectrum, ranging from minimal forms, which are only detected by use of neuropsychological and/or electrophysiological techniques, to coma [7,8, 11, 144, 175, 190]. HE, even in its minimal form, impinges on quality of life and self-sufficiency [10, 76, 120, 164] and it carries negative prognostic value in terms of survival. Thus it is useful to identify patients with HE and reduced life expectancy, also for purposes of transplant selection procedures. The electrophysiological diagnosis of HE is based on the detection of slow wake-EEG frequencies [8]. However, some studies have shown that the regional distribution of the wake-EEG rhythms is also abnormal [126]. The detection of HE through psychometric and electrophysiological techniques is usually carried out in 'standard' conditions. More recently, it has been proposed to artificially induce a condition of hyperammonaemia, thus simulating HE, by the oral administration of an amino-acid load (AAL). These amino-acids mimic the composition of hemoglobin, thus reproducing, at least to some extent, the HE which is observed after a gastrointestinal bleed [4, 65]. This allows doctors and researchers to measure more directly a patient's sensitivity to hyperammonaemia.

Disorders of the sleep-wake rhythm are common in patients with cirrhosis, heavily affecting their quality of life [129]. Sleep is regulated by the interaction of two processes: a homeostatic and a circadian process [31]. The former determines the propensity to fall asleep in connection to prior sleep-wake history (i.e. the need for sleep increases with prolonged wakefulness). The latter, which is reflected in the 24-hour rhythm of the hormone melatonin (high plasma levels at night and extremely low levels in the daytime), determines the alternation of periods of low/high sleep propensity in relation to environmental light/dark conditions. The interaction of such two processes results in a high likelihood of falling asleep after a prolonged period of wakefulness and when it

gets dark, namely in the evening.

The alterations of the sleep-wake rhythm in patients with liver have traditionally been interpreted as being part of the HE syndrome [175]. More recent data suggest that this is the case for excessive daytime sleepiness, while insomnia probably has a different pathogenesis [128]. The causes of sleep-wake abnormalities in patients with cirrhosis are not completely clear. The documented changes in the circadian system (reduced sensitivity to light and altered rhythm/metabolism of melatonin) do not offer a complete explanation [128, 129]. Sleep can also be studied by polysomnography, which reflects homeostatic regulation. Information on homeostatic regulation in these patients is limited [179]. The exact neurochemical correlates of human sleep homeostasis remain unknown, although adenosinergic neurotransmission is likely to be implicated. In healthy subjects caffeine, an adenosine receptor antagonist, significantly affects both the wake EEG (reduction in theta activity, which increases with the increase of sleep pressure) and the sleep EEG, and attenuates the subjective sleepiness which is associated with prolonged wakefulness and sleep deprivation [106].

This set of studies was performed in order to evaluate:

- the effect of induced hyperammonaemia on neuropsychological performance and the wake EEG (Study 1);
- the relationship between daytime sleepiness, HE, and the sleep EEG (Study 2);
- the effects of ammonia-lowering drugs (L-ornithine-L-aspartate, LOLA) and caffeine on the wake and sleep EEG (Study3).

Materials and methods.

Well-characterized patients with compensated cirrhosis and with no history of HE and matched healthy volunteers were enrolled and underwent:

- Assessing and monitoring the quality and time of sleep with questionnaires and sleep diaries.
- Oral load of amino acids (AAL), mixture of 54 grams of amino acids mimicking the hemoglobin contained in 400 ml of blood, taken in the morning per os.
- Detection time of subjective sleepiness and capillary ammonia.

- Neuropsychological assessment, including psychometric paper and pencil (PHES battery), computerized psychometry and EEG recording of wakefulness.
- Polysomnographic recording. Patients were given the opportunity to sleep between 17:00 and 19:00 in favorable environmental conditions (dark and isolated room).
- Administration of LOLA 20g in 500cc of saline in 4-hour infusion (8-12) or 200mg caffeine per os (at 10 am) under induced hyperammonemia (Study 3).

Results.

Study 1. Effects of hyperammonaemia on neuropsychological performance and waking EEG.

- The study population included 10 patients with liver cirrhosis (9 men, mean \pm SD, age: 54 ± 14 years) and 10 healthy volunteers matched for age and sex (5 men, 49 ± 13 years). One patient (male 55 years) underwent EEG recording also after the insertion of a trans-jugular portal-systemic shunt (TIPS), a procedure which is associated with increased risk of HE.
- The subjects were studied with a neuropsychological evaluation and monitoring of capillary ammonia at baseline (4th or 8th day of the study) and after oral amino acids (AAL) (4th or 8th day of the study).
- At baseline, patients had higher ammonia levels than healthy volunteers [median (interquartile range): 30 (22-44) vs. 38 (34-47) mmol/L, $p < 0.1$]. The AAL has produced the expected increase in ammonia in both groups, the peak of ammonia was higher (ammonia 11:00, $p < 0.03$) and more prolonged in patients.
- The AAL has produced a significant slowing of EEG waking such as to define the presence of a minimal HE in 2 (20 %) patients. By contrast, the AAL no significant changes in the psychometric performance paper & pencil or computerized.
- At baseline, the dominant frequency EEG activity was slower in patients compared to healthy volunteers in most derivations ($p < 0.05$). The AAL did not alter the dominant frequency in healthy volunteers, while that of patients slowed further along the midline ($p < 0.05$).
- At baseline, the waking EEG spectral power had an occipital-temporal predominance in both groups. The patients had higher power in all derivations

($p < 0.05$). The AAL induced a significant increase of power in almost all derivations in healthy volunteers ($p < 0.05$), while it did not affect power in patients.

- In the patient studied on three occasions, the spectral power of dominant wake EEG progressively increased from baseline after AAL and after TIPS, while there was a decrease in the frequency of the wake EEG after insertion of TIPS.

Study 2. Effect of hyperammonaemia on sleepiness and sleep EEG.

- The study population (see Study 1) was subjected to neuropsychological assessment, detection time of sleepiness and ammonia and polysomnographic recording, in basal conditions (4th or 8th day of the study) and after AAL (4th or 8th day of the study).

The AAL has produced

- an increase in subjective sleepiness parallel to increased concentrations of ammonia both in patients and in healthy volunteers; in both groups, the peak of sleepiness (at 11 am), absent in basal condition, coincides with the peak concentration of ammonia ($p < 0.01$);
- an increase in sleep duration in healthy volunteers compared with baseline (mean \pm SD, 49.3 ± 26.6 vs. 30.4 ± 15.6 min), although the differences are not statistically significant ($p 0.08$). No changes have been observed on the duration of sleep in patients;
- significant decrease in the relative power beta (fast activity) of the sleep EEG in healthy volunteers ($p < 0.05$);
- significant reduction in the relative power of delta (activity very slow) of the sleep EEG in patients ($p < 0.05$).

Study 3. Effects of L-ornithine-L-aspartate (LOLA, substance that reduce ammonia) and caffeine (adenosine receptor antagonist) on cognitive performance, wake and sleep EEG in conditions of induced hyperammonaemia.

- The study population consisted of 6 patients with liver cirrhosis (5 men, mean \pm SD, age: 61 ± 9 years) and 5 healthy volunteers matched for age, sex and level of education (4 men, 49 ± 12 years).
- The subjects were studied with neuropsychological assessment, detection

sleepiness and ammonia hourly and polysomnographic recording, after AAL – AAL+LOLA – AAL+caffeine) on the 4th, 11th and 18th day of the study.

- patients presented a paper and pencil and computerized psychometric performance significantly worse than the healthy volunteers ($p < 0.05$);
- patients had levels of ammonia above those of healthy volunteers in all conditions;

the AAL has produced the expected increase of ammonia in both groups, with a peak higher and more prolonged in patients.

- The LOLA has resulted in a reduction although not significant levels of plasmatic ammonia in both groups.
- Neither the LOLA nor caffeine resulted in significant changes of subjective sleepiness, on psychometric performance and the wake EEG.
- Sleep EEG data are being analyzed (at the Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, Switzerland).

Conclusions.

- The waking EEG is extremely sensitive to hyperammonaemia.
- A moderate/chronic (patients in baseline) or acute (healthy volunteers after AAL) hyperammonaemia results in an increased power of the dominant EEG rhythm, especially over posterior–central areas of the scalp.
- An acute on chronic hyperammonaemia (patients after AAL) slows further the dominant EEG frequency.
- EEG parameters based on power can provide useful information to the neurophysiological definition of HE.
- Hyperammonaemia leads to a significant increase in subjective daytime sleepiness.
- Hyperammonaemia causes opposing changes in the sleep EEG of patients and controls, making the sleep of patients fragmented and more superficial, and that of healthy volunteers deeper and more stable.
- L-ornithine-L-aspartate leads to a reduction in the levels of ammonia.

1. INTRODUZIONE

1.1 ENCEFALOPATIA EPATICA

1.1.1 Terminologia

Il termine encefalopatia si riferisce ad una alterazione del cervello dovuta ad agenti neurotossici con deterioramento funzionale e/o anatomico rispetto ad una situazione precedente.

Con encefalopatia epatica (EE) si applica questa definizione alle alterazioni neuropsichiche che insorgono in pazienti con insufficienza epatica acuta o cronica e/o presenza di shunt porto-sistemici [40, 54, 138, 139, 194, 199].

Durante il congresso mondiale di Gastroenterologia del 2002 è stata proposto una classificazione dell'EE che la distingue in tre categorie principali [69] (**Tabella 1.1**):

- Tipo A: EE associata ad insufficienza epatica acuta. Essa è rapidamente progressiva e si manifesta con convulsioni, rigidità da decerebrazione, coma e frequentemente ha un esito infausto. L'edema di natura citotossica che s'instaura nell'insufficienza epatica acuta interessa selettivamente gli astrociti ed è rilevante, tanto da poter causare erniazione cerebrale da ipertensione intracranica.
- Tipo B: EE associata a shunt porto-sistemico, senza malattia epatica associata.
- Tipo C: EE associata a cirrosi epatica con ipertensione portale e/o shunt porto-sistemico.

Il tipo B e il tipo C di EE possono essere clinicamente evidenti, e tale modalità di espressione della sindrome viene detta **conclamata**, oppure non evidenti clinicamente: il termine di **encefalopatia epatica minima (EEM)** è utilizzato per descrivere la circostanza in cui si riscontrino alterazioni psicometriche e/o neurofisiologiche in pazienti con cirrosi epatica che appaiano normali ad un'accurata valutazione clinica [69, 74, 163, 186, 194].

L'EE conclamata può essere classificata, in base alla durata e alle caratteristiche d'insorgenza, in tre forme:

1. episodica/occasionale: è la forma più frequente e si presenta con singolo

episodio di alterazione neuropsichica della durata da qualche ora a qualche giorno. Questi episodi sono tipicamente innescati da fattori precipitanti ben riconoscibili e non mutualmente esclusivi, quali stipsi, eccessiva assunzione di proteine carnee con la dieta, infezioni intercorrenti, sovradosaggio di diuretici, sanguinamento gastroenterico o il confezionamento di uno shunt porto-sistemico chirurgico o trans giugulare. Gli episodi di EE occasionale normalmente regrediscono dopo il trattamento che è focalizzato ad eliminare le cause scatenanti.

2. **persistente:** interessa un numero minore di pazienti con cirrosi che presenta una costante alterazione dello stato mentale, più o meno peggiorato da episodi acuti intercorrenti [69, 160, 161]. È in genere associato ad una maggiore alterazione della funzione epatica oppure alla presenza di shunt porto-sistemici indotti (anastomosi chirurgiche o radiologiche) o spontanei.
3. **ricorrente:** è costituita da episodi di alterazione neuropsichica multipli apparentemente senza causa scatenante o con una causa scatenante anche modesta, alternati a periodi nei quali lo stato mentale è clinicamente normale, in un soggetto pronò a sviluppare encefalopatia epatica. Non è escluso che tecniche fini d'indagine psicométrica o EEG possano rilevare lievi alterazioni funzionali negli intervalli di remissione clinica.

Tabella 1.1. Classificazione dell'encefalopatia epatica

Tipo di Encefalopatia Epatica	Nomenclatura	Sottocategorie	Suddivisioni
Tipo A	Associato ad insufficienza epatica acuta		
Tipo B	Associato a by-pass posto-sistemico senza patologia epatocellulare		
Tipo C	Associato a cirrosi ed ipertensione portale o shunt porto-sistemico	Episodica	- <i>Precipitata</i> - <i>Ricorrente</i> - <i>Spontanea</i>
		Persistente	- <i>Moderata</i> - <i>Severa</i> - <i>Trattamento-dipendente</i>
		Minima	

1.1.2 Patogenesi

La natura essenzialmente reversibile dell'EE suggerisce che essa sia la manifestazione clinica di un'affezione metabolica più che di un disordine cerebrale strutturale, anche se recenti studi sembrano dimostrare la persistenza di alterazioni cognitive dopo la risoluzione di encefalopatia epatica conclamata [20, 162].

Le teorie ipotizzate sulla patogenesi dell'EE, che non si escludono completamente a vicenda, sono numerose, ma la validità di ognuna non è ancora stata completamente definita. C'è tuttavia un generale consenso sul fatto che a causa dell'insufficienza epatica e/o della presenza di shunt porto-sistemici, il fegato abbia una ridotta capacità di detossificare il sangue da neurotossine derivanti dal metabolismo intestinale, con conseguenti cambiamenti nella neurotrasmissione cerebrale (**Figura 1.1**).

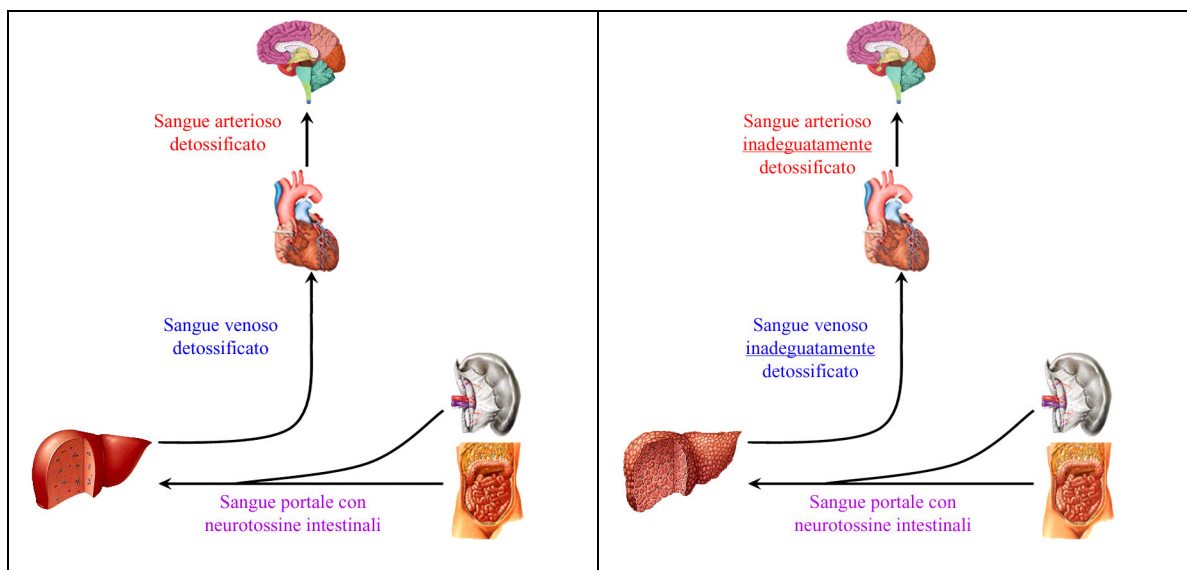


Figura 1.1. Rappresentazione schematica del modello patogenetico dell'EE attualmente accettato. In condizioni normali (schema a sinistra), le neurotossine d'origine intestinale sono metabolizzate dal fegato, il sangue venoso detossificato arriva al cuore e il sangue arterioso detossificato arriva al cervello. Nei pazienti con cirrosi (schema a destra), la detossificazione epatica è ridotta a causa dell'insufficienza epatica/shunts porto-sistemici e le neurotossine d'origine intestinali raggiungono il cervello.

1.1.2.1 Teoria ammoniogenica

Tra le neurotossine implicate nella patogenesi dell'EE, la più importante è indubbiamente il sistema ammoniacale NH_3 /ammonio NH_4^+ [42, 43, 82, 140]. Le

concentrazioni di ammonio sia arteriose che venose sono frequentemente elevate nei pazienti con EE [39, 42, 43, 113, 115, 142] e studi sperimentali su modelli animali con insufficienza epatica rivelano concentrazioni cerebrali di ammonio aumentate [42, 43, 113, 142]. L'ammonio è prodotto a livello intestinale dalla deaminazione della glutamina e dal metabolismo della flora batterica delle sostanze azotate; in condizioni normali viene metabolizzato in urea nel fegato. Nei pazienti con cirrosi le attività enzimatiche che catalizzano il ciclo dell'urea sono ridotte e di conseguenza i livelli dell'ammonio nel sangue aumentano [120]. Anche i reni sembra possano contribuire all'aumento della produzione dell'ammoniaca in questi pazienti, soprattutto in presenza di sanguinamento gastro-intestinale o grave disidratazione [141] (**Figura 1.2**).

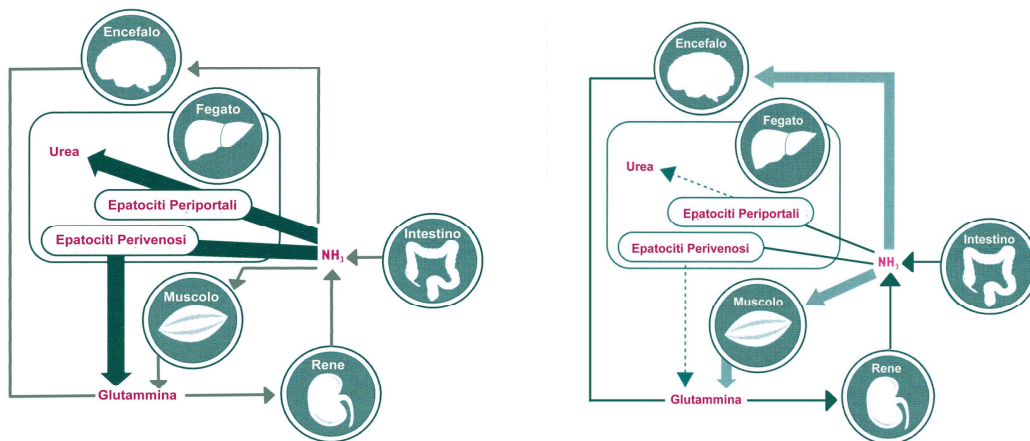


Figura 1.2. Rappresentazione schematica del metabolismo dell'ammonio NH₄ in condizioni normali (figura a sinistra) e in corso di iperammoniemia (a destra).

In condizioni normali (a sinistra), l'ammonio viene rimosso per circa il 50% dalle masse muscolari, per il 14% dal fegato, e per il 7% dal cervello. Nei soggetti con cirrosi epatica ed encefalopatia epatica, la quota di ammoniaca rimossa dal cervello aumenta considerevolmente (circa del 165%) a causa dell'aumento dei livelli ematici di ammonio.

Studi sulla cinetica dell'ammoniaca hanno rilevato che, nel soggetto normale, l'ammonio viene rimosso per circa il 50% dalle masse muscolari, per il 14% dal fegato, e per il 7% dal cervello [114]. Gli alti livelli plasmatici di ammoniaca vengono tamponati fino ad un certo punto dal muscolo scheletrico, il quale utilizza ammoniaca per convertire il glutammato in glutammina. Questo spiega perché l'atrofia muscolare e lo stato di malnutrizione in cui spesso versano i pazienti cirrotici possano contribuire all'iperammoniemia e allo sviluppo dell'EE, soprattutto nei casi di errati consigli alimentari [6, 96, 133].

Nei soggetti cirrotici con insufficienza epatica grave e anamnesi positiva per EE conclamata, la quota di ammoniaca rimossa dal cervello aumenta

considerevolmente (circa del 165%) a causa dell'aumento dei livelli ematici di ammonio [114]. L'ammoniaca attraversa la BEE per diffusione nella sua forma neutra (NH₃) e attraverso trasportatori nella sua forma protonata (NH₄⁺) [144]. Alcuni studi di imaging funzionale effettuati utilizzando la PET con tracciante ¹³NH₃ hanno dimostrato un aumento del metabolismo cerebrale per l'ammonio e un aumento dell'ammonio nelle aree cerebrali prossime alla BEE, suggerendo che, nell'insufficienza epatica cronica, la BEE diventi maggiormente permeabile all'ammonio [115]. I livelli liquorali o intracerebrali di ammoniaca sono notevolmente più elevati di quelli ematici, dell'ordine di quattro volte, e danno origine ad elevate quantità di glutamina ad opera della glutamina-sintetasi astrocitaria, come è stato documentato in vivo mediante spettroscopia in RMN [101]. Con la spettroscopia in RMN è stato anche dimostrato che la glutamina cerebrale aumenta in modo direttamente proporzionale alla gravità dell'EE [108].

L'esposizione degli astrociti ad ammoniaca, in acuto, dà luogo ad edema cerebrale citotossico secondario alla sintesi di glutamina che è un potente osmolita [29, 30]. In cronico invece l'ammoniaca induce una modificazione caratteristica della struttura degli astrociti, detta astrocitosi di tipo II di Alzheimer, nella quale gli astrociti assumono una forma rigonfiata con un nucleo largo e pallido, nucleoli prominenti e marginazione della cromatina [41]. Questo tipo di astrocitosi si osserva anche nel cervello di pazienti con iperammoniemia cronica dovuta a disordini congeniti del ciclo dell'urea [79].

Nonostante le ben documentate alterazioni morfologiche degli astrociti, la citoarchitettura neuronale è generalmente conservata o le sue alterazioni strutturali sembrano insufficienti per spiegare le caratteristiche dell'EE. In studi istopatologici eseguiti in pazienti deceduti per cirrosi scompensata con EE, i neuroni appaiono in uno stato di sostanziale salute e presenti in normale quantità [44]. La teoria ammoniogenica, quindi, spiegherebbe la presenza dell'EE non attraverso l'induzione di un danno diretto dei neuroni provocato dall'ammonio, ma attraverso l'induzione da parte dell'iperammoniemia di modificazioni degli astrociti, che esita in alterazioni dell'ambiente perineuronale della neurotrasmissione eccitatoria ed inibitoria [184] e quindi a disfunzione neuronale secondaria.

A supporto di tale teoria ci sarebbero dati che dimostrano che:

- ad alte concentrazioni l'ammonio provoca convulsioni negli animali per effetto dell'azione depolarizzante sulle membrane della cellule nervose [87].
- un'esposizione prolungata a basse dosi di ammonio induce uno stato di stupor e di coma, suggerendo un effetto iperpolarizzante [152].
- studi in vitro su tessuto cerebrale esposto all'ammonio in concentrazioni e per tempi diversi, hanno confermato gli effetti depolarizzanti e iperpolarizzanti dell'ammonio con un'azione più o meno diretta sulla trasmissione cerebrale pre e post sinaptica [67, 153]. L'iperammoniemia cerebrale è inoltre in grado d'inibire l'enzima α -ketoglutarato deidrogenasi [105], che fa parte del ciclo di Krebs, con possibile riduzione della produzione cerebrale di ATP e aumento del metabolismo anaerobico. Infatti la concentrazione di lattato a livello intracerebrale e nel liquido cerebrospinale è risultata elevata nei soggetti con EE [206]. Tuttavia, da quanto emerge dai modelli animali sperimentali e da rilievi sull'uomo, sembra che tale deficit energetico compaia solo tardivamente [40].

1.1.2.2 Teorie alternative

E' impossibile spiegare completamente la patogenesi dell'EE prendendo in causa la sola ammoniaca, e ciò ha portato a ricercare altri meccanismi patogenetici indotti dall'insufficienza epatica e dall'ipertensione portale, che potrebbero spiegare lo sviluppo dell'EE.

All'azione dell'ammoniaca si può associare in modo sinergico l'effetto neurotossico di altre sostanze di origine intestinale quali: i mercaptani, derivati dal metabolismo della metionina da parte della flora batterica intestinale ed in grado di aumentare la concentrazione cerebrale di ammonio; gli indoli, derivati dal metabolismo del triptofano; gli acidi grassi a catena breve, prodotti dalla fermentazione anaerobica nel grosso intestino; le sostanze simili alle benzodiazepine [22, 47, 134, 135, 193, 208]; il manganese [45].

Recentemente è stato suggerito un importante ruolo patogenetico dell'infiammazione [175]. Le infezioni sono da tempo riconosciute essere fattori precipitanti dell'EE [176]. E' anche noto che in soggetti altrimenti sani, in

particolare gli anziani, episodi infettivi possono causare deterioramento mentale [75]. In modelli animali è stato dimostrato che il lipopolisaccaride aumenta i cambiamenti dell'emodinamica cerebrale indotti dall'ammonio [146] e infezioni asintomatiche sono comuni in pazienti con cirrosi scompensata [182]. Infine, marcatori di risposta infiammatoria sistemica sono stati rilevati in pazienti con insufficienza epatica acuta e presenza di deterioramento neuropsichiatrico [164]. È stato quindi ipotizzato che la risposta infiammatoria possa aumentare la permeabilità della barriera emato-encefalica (BEE), potenziando gli effetti dell'ammonio o di altre neurotossine e forse spiegando episodi di EE senza evidenti fattori precipitanti [89]. L'ipotesi che l'infiammazione sistemica possa concorrere alle alterazioni neuropsichiche dell'EE è affrontata anche in un recente studio che mostra come l'iperammoniemia e l'aumento degli indici di flogosi sono correlati a diversi aspetti del fenotipo dell'EE, probabilmente perché espressione di diversi meccanismi patofisiologici. Sia l'iperammoniemia che l'aumento degli indici di infiammazioni risulterebbero comunque fattori prognostici dell'outcome dei pazienti [126].

Negli ultimi anni inoltre l'iponatremia è considerata non più solo come fattore aggravante o concomitante all'encefalopatia epatica, ma sembra rivestire anche un possibile ruolo eziopatogenetico a se stante: l'encefalopatia epatica ed iponatremica sono quindi considerate cause comuni e spesso coesistenti dell'encefalopatia metabolica in corso di cirrosi [53]. A conferma di questa recente ipotesi, ci sono studi che hanno mostrato come l'incidenza di EE sia associata ai livelli di natremia (>135 mEq/L:15%, 130–135 mEq/L: 24%, e <130 mEq/L: 38 %) [13] e come basse concentrazioni sieriche del sodio siano un fattore predittivo indipendente di alterazioni elettroencefalografiche [56], di sviluppo di EE conclamata in pazienti con cirrosi avanzata [78] e di resistenza alla terapia con lattulosio in pazienti con EEM [174].

Qualunque sia la causa esatta, l'EE è caratterizzata da deficit in multipli sistemi di neurotrasmissione cerebrale [40]. Studi eseguiti su tessuti cerebrali di pazienti deceduti in coma epatico dimostrano importanti alterazioni dei sistemi glutamatergico e monoaminergico [109]. Inoltre, sono state isolate sia in pazienti con cirrosi che in animali da esperimento sostanze che legano il recettore cerebrale GABAergico delle benzodiazepine [24]. Si sono osservate alterazioni nell'attività dei recettori cerebrali dell'istamina [117] e anche nella

sintesi di neurosteroidi [2]. Alcuni di queste alterazioni appaiono direttamente legate alla tossicità da ammonio e dal suo prodotto metabolico, la glutammina; altre invece dipendono da differenti e ancora sconosciute vie neurotossiche.

1.1.3 Caratteristiche cliniche

Una delle prime descrizioni delle manifestazioni cliniche dell'EE risale al 1954 e si deve a Sherlock e collaboratori, che descrissero una serie di alterazioni neurologiche in diciotto pazienti con patologia epatica di diversa gravità ed eziologia. In questi soggetti, oltre all'ottundimento della coscienza, erano presenti alterazioni del sistema motorio quali asterissi, tremore, aumento del tono muscolare e della vivacità dei riflessi tendinei, andatura atassica. Inoltre, in tutti i pazienti, anche nelle prime fasi della malattia, si erano osservati un tono dell'umore altalenante e vari gradi di cambiamento della personalità [176].

Il quadro clinico che caratterizza l'EE è complesso e variabile.

A fine descrittivo, le caratteristiche cliniche dell'EE possono essere riassunte con:

- *disturbi della coscienza*, che possono manifestarsi con apatia, letargia e ipersonnia, confusione e disorientamento dapprima nel tempo e poi nello spazio, talora in un contesto di diminuita vigilanza e sopore, talaltro in un contesto di agitazione e franco delirium. Con il peggiorare del quadro si può arrivare allo stupor e al coma più o meno profondo.
- *cambiamenti della personalità*, che includono l'infantilismo, l'irritabilità, la perdita d'interesse per le vicissitudini familiari e per gli impegni professionali, la disinibizione, un umore euforico e poco adeguato alle circostanze. Queste precoci alterazioni, spesso lamentate dai parenti del paziente, sono compatibili con un iniziale coinvolgimento delle funzioni modulatorie ed inibitorie delle aree prefrontali.
- *deterioramento intellettuale*, con difficoltà nel mantenere l'attenzione sostenuta o ad adempiere prove cognitive complesse o ad elencare nomi che appartengano alla stessa categoria semantica, ad esempio animali. Si può osservare aprassia costruttiva quando ai pazienti viene richiesto di riprodurre un semplice disegno (**Figura 1.3**) [58].

- *anomalie del linguaggio*, che si presentano con eloquio rallentato, biasciato e con tono di voce monotono. Negli stadi avanzati di EE è presente disfasia spesso accompagnata con perseverazione.

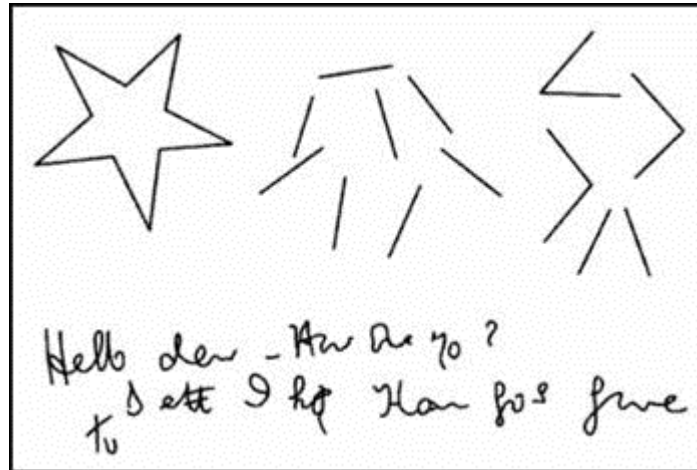


Figura 1.3. Aprassia costruttiva in paziente con EE conclamata. In assenza di tremori grossolani e di alterazioni visive, il paziente presenta aprassia costruttiva che si manifesta con l'incapacità di copiare la stella a cinque punte e difficoltà nella scrittura. Frase originale: "Hello dear. How are you? Better I hope. That goes for me too." .

Accanto alle alterazioni dello stato di coscienza, l'EE si esprime con alterazioni motorie, la più nota delle quali è l'asterissi, costituita da sequenze di scosse a livello degli arti superiori, che ricordano il battito d'ali degli uccelli, facilmente evocabili con braccia e mani iperestese a dita allargate. Specialmente in corso di encefalopatia cronica possono essere presenti segni di tipo extrapiramidale e cerebellare: ipomimia, bradicinesia, tremore, atassia, disartria e persino movimenti coreo-atetosici.

1.1.4 Diagnosi

La diagnosi di EE crea poche difficoltà quando la malattia si presenta in pazienti con cirrosi epatica nota e segni evidenti di alterazioni mentali, per esempio dopo un'emorragia digestiva. Tuttavia, spesso le alterazioni dello stato mentale non sono così conclamate, i fattori eziologici/favorenti meno eclatanti e, di conseguenza, la diagnosi diventa meno agevole.

Il procedimento diagnostico si avvale dell'anamnesi e dell'esame obiettivo nel quale andrà valutata l'entità del disturbo di coscienza e andranno rilevati segni di tipo generale e specificatamente neurologico. Solamente dopo un'adeguata

raccolta di dati si potrà avviare un procedimento diagnostico differenziale che consideri le altre possibili cause di alterazione dello stato di coscienza al termine del quale potrà emergere la diagnosi di encefalopatia epatica.

Non esistono raccomandazioni/linee guida ben definite in merito alla diagnosi clinica di EE. Tuttavia, un utile iter diagnostico ragionevole dovrebbe prevedere:

- un'accurata raccolta anamnestica, ottenuta anche con l'aiuto dai familiari, focalizzando l'attenzione sulle la modalità di esordio del disturbo di coscienza, i sintomi di accompagnamento, i possibili fattori scatenanti, le patologie preesistenti, assunzione di farmaci o tossici, le modificazioni del comportamento del paziente nelle normali attività quotidiane, e sul ciclo sonno-veglia nell'ultimo periodo.
- un accurato esame neurologico, che includa la valutazione dello stato mentale attraverso l'uso di due scale:
 - la scala di Glasgow (**Tabella 1.2**) [188] strutturata per quantificare il grado di compromissione della coscienza, di qualsiasi natura essa sia, e quindi valutare l'evoluzione del disturbo nel tempo
 - la scala di West Haven (**Tabella 1.3**) [43] specifica per l'EE.

Tabella 1.2. Scala di Glasgow [188]

Test	Risposta	Punteggio
Apertura degli occhi	Mai	1
	Al dolore	2
	Allo stimolo verbale	3
	Spontaneamente	4
Risposta verbale	Nessuna risposta	1
	Suoni incomprensibili	2
	Parole inappropriate	3
	Disorientato, frasi sconnesse	4
	Orientato ed appropriata	5
Risposta motoria	Nessuna risposta	1
	In estensione (rigidità decerebrata)	2
	In flessione (rigidità ecorticata)	3
	Risposta flessoria di allontanamento	4
	Localizza il dolore	5
	Obbedisce ai comandi	6

Tabella 1.3: Criteri classificativi di West Haven dell'EE conclamata [50].

Grado di encefalopatia epatica	Caratteristiche cliniche
0	Nessuna anomalia rilevata
I	Lieve mancanza di consapevolezza Euforia o ansia immotivate Ridotte capacità attentive Riduzione delle capacità aritmetiche (compiere addizioni)
II	Apatia o letargia Lieve disorientamento temporo-spaziale Lievi cambiamenti di personalità Comportamento inadeguato Riduzione delle capacità aritmetiche (compiere sottrazioni)
III	Semistupor o sonnolenza (permane la risposta agli stimoli verbali) Confusione mentale Marcato disorientamento Comportamento bizzarro
IV	Coma, impossibilità di testare stato mentale

- ammoniemia (non è sensibile, né specifica). Tuttavia in presenza di stupor o coma l'assenza di iperammoniemia rende molto dubbia la diagnosi di encefalopatia epatica [142].
- esami bioumorali, che comprendano un emocromo (per rilevare leucocitosi che orienti ad un fatto infettivo, anemia che orienti ad un sanguinamento delle prime vie digerenti), glicemia, azotemia, sodiemia, calcemia, potassiemia, emogasanalisi, attività protrombinica (come indicatore di funzione epatica e di rischio di emorragia), esame urine (per individuare segni di un'infezione urinaria). Indagini più approfondite, come esame del liquido ascitico, ricerche tossico-farmacologiche o esame del liquor, sono indicate rispettivamente in caso di sospetta peritonite batterica spontanea, intossicazione da benzodiazepine, oppioidi, alcoolemia, triciclici, meningite o encefalite.
- l'esclusione, attraverso approfondimenti di imaging, di patologie focali o altre potenziali cause di deterioramento cognitivo, come per esempio eventi ischemici cerebrali, ematomi subdurali, la sindrome di Wernicke.
- l'esecuzione di una valutazione della performance psicomotoria. Tra i vari test neurocognitivi utilizzati, la Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES) [199] è una batteria di test carta e matita standardizzata per EE di

facile applicabilità ed alta specificità anche per la diagnosi dell'encefalopatia epatica minima. Essa include cinque test: il Line Tracing Test, il Serial Dotting Test, il Digit Symbol Test, il Trial Making Test A e B. Attraverso la PHES vengono esaminate le capacità neurocognitive maggiormente compromesse nei pazienti con cirrosi epatica, quali: la velocità e l'accuratezza motoria, l'orientamento visuo-spaziale e l'attenzione, specialmente sostenuta nel tempo; viene espressa con un punteggio che è considerato normale tra +6 e -4.

- l'esecuzione, ove possibile, di uno studio neurofisiologico quantitativo, ad esempio l'elettroencefalogramma (EEG) con l'analisi spettrale del tracciato, utilizzando come parametro almeno la frequenza dominante [49]. L'elemento specifico dell'EE è che il tracciato EEG rallenta, mostrando una riduzione generalizzata della frequenza media con aumento del ritmo theta (attività lenta) e con una riduzione della potenza relativa dell'attività alfa (attività normale), soprattutto nelle derivazioni occipitali, in modo progressivo e sostanzialmente parallelo alla gravità dell'EE (**Figura 1.4**) [102].

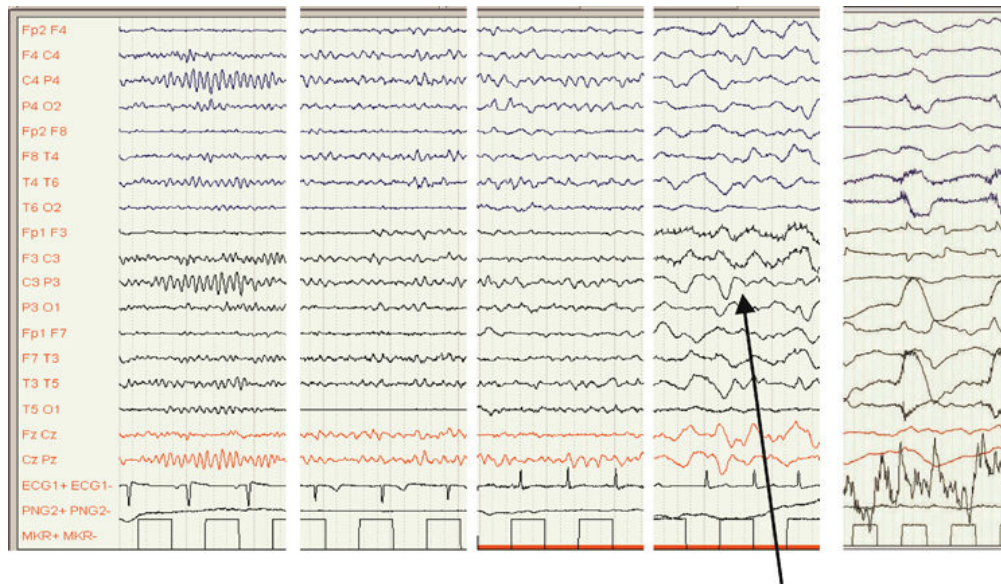


Figura 1.4. Rallentamento progressivo del tracciato EEG. Sono indicati l'estrutturazione del ritmo alpha e l'aumento dei ritmi lenti theta e delta con l'aumentare della gravità dell'EE.

L' EEG è un indicatore sensibile della presenza e dell'entità dell'encefalopatia, ed in casi di encefalopatia epatica conclamata può evidenziare quadri con onde trifasiche che, pur non essendo patognomoniche

dell'EE, ne sono suggestivi. Inoltre, può evidenziare quadri indicativi di altre patologie (encefalite erpetica, stato di male non convulsivo, scariche periodiche lateralizzate epilettiformi dopo fatti ischemici, ecc).

Anormalità elettroencefalografiche nei pazienti con cirrosi ed EE sono note fin dal 1950, quando Foley *et al.* descrissero un rallentamento del ritmo e una riduzione dei voltaggi nei tracciati EEG eseguiti nei pazienti in coma epatico [70]. Le caratteristiche nell'analisi visiva dell'EEG dei pazienti con cirrosi sono state descritte e classificate, in base alla loro relazione con lo stato mentale-neurologico, da Parsons-Smith e collaboratori [145]. L'interpretazione dell'EEG lasciata alla sola lettura visiva dell'operatore è soggetta però a una variabilità inter- e, forse, intra-osservatore, fatto che può renderla scarsamente idonea a fornire parametri utili per confrontare variazioni minime del tracciato EEG. Vista la necessità di individuare criteri quantitativi per stadiare le alterazioni EEG in corso di cirrosi, Conn *et al.* nel 1977 [50] ha proposto una classificazione in gradi crescenti di gravità basata sulla misurazione visiva della frequenza dell'attività di fondo del tracciato (**Tabella 1.4**).

Tabella 1.4. Classificazione delle alterazioni EEG nell'EE basata sulla valutazione visiva dell'attività di fondo secondo Conn et al. [50]

Grado di EE	Frequenza dell'attività di fondo
0	Normale ritmo di 8,5-12 Hz
1	Attività di fondo di 7-8Hz
2	Attività di fondo di 5-7 Hz
3	Attività di fondo di 3-5 Hz
4	Attività di fondo di 3 Hz

Basandosi sulla trasformazione del segnale EEG analogico in segnale digitale e sulla sua successiva analisi per mezzo di un algoritmo basato sulla trasformata di Fourier (Fast Fourier Transform), Van der Rijt *et al.* [191] proposero un criterio classificativo basato sull'analisi automatica di 10 segmenti (epoche) di 10 sec del tracciato EEG, per un tempo complessivo di 100 secondi (**Tabella 1.5**). Tale classificazione basata sui parametri quantitativi dell'analisi spettrale dell'EEG, è stata successivamente modificata da Amodio *et al.* nel

1999 (**Tabella 1.6**) [8]. Nell'analisi spettrale, ottenuta con un calcolo automatico delle frequenze dominanti dell'EEG, l'intero spettro della potenza è scomposto nelle quattro bande di attività: la potenza relativa delle attività alpha (8-13 Hz), beta (13-25 Hz), theta (4-8 Hz) e delta (1-4 Hz) oltre alla frequenza dominante media (MDF). Le attività relative di queste bande di frequenza sono calcolate come percentuali della potenza totale [191].

Tabella 1.5: Classificazione dell'encefalopatia epatica secondo Van Der Rijt. [191]

Grado EEG	MDF (Hz)	Theta %	Delta %
0	> 6.4	< 35	
I	> 6.4	≥ 35	
II	≤ 6.4		< 70
III	≤ 6.4		≥ 70

MDF: mean dominant frequency (frequenza dominante media)

Tabella 1.6: Classificazione dell'encefalopatia epatica secondo Amodio [8]

Grado EEG	MDF (Hz)	Theta %	Delta %
0	>7.3	< 35	
I	>7.3	≥ 35	
II	<7.3		<44%
III	<7.3		>44%

MDF: mean dominant frequency (frequenza dominante media)

Tecniche di rilevazione funzionale per immagine hanno prevalentemente valore di ricerca; la loro applicazione clinica può essere considerata solo in casi particolari. Studi di Risonanza Magnetica Spettroscopica (MRS), attraverso la misurazioni di vari neurometaboliti cerebrali in aree specifiche, hanno dimostrato un incremento del picco glutamina-glutamato che presenta un rapporto col grado di encefalopatia epatica [168, 187]. I cirrotici con encefalopatia epatica severa presentano una diffusa diminuzione del flusso cerebrale medio nella corteccia cerebrale sia alla PET con $[150] \text{H}_2\text{O}$ [115] che alla ^{133}Xe - SPECT [57]. In pazienti con encefalopatia minima è stata altresì segnalata una diffusa riduzione di flusso nelle aree corticali e sottocorticali [38], come anche una redistribuzione del flusso cerebrale con decremento dello stesso a livello corticale ed aumento a livello sottocorticale [115]. La riduzione

del flusso cerebrale correla con il deficit neuro-cognitivo [48, 189]; a tale riguardo sarebbe particolarmente rilevante la riduzione del flusso cerebrale ai gangli della base [88]. Lo studio del metabolismo cerebrale effettuato mediante misurazione dell'utilizzo cerebrale di glucosio (Fluoro-Deossiglucosio) tramite PET in soggetti con encefalopatia minima ha fornito rilievi contrastanti in rapporto alla tecnica utilizzata: decremento della utilizzazione del glucosio nelle aree corticali con relativo aumento nelle regioni sottocorticali e cervelletto; successivamente una selettiva diminuzione del flusso cerebrale nelle aree occipitale e infero-temporale [115] e riduzione diffusa dell'utilizzo di glucosio nelle aree corticali e sottocorticali [37].

Sono poi utilizzabili nella diagnostica dell'encefalopatia epatica lieve anche tecniche computerizzate di cronometria mentale volte a valutare tempi di reazione semplici o complessi, come quelli basati sul paradigma di Sternberg [9].

Diagnosi dell'encefalopatia epatica minima

In caso di EEM il paziente appare "clinicamente normale", ma evidenzia alterazioni cognitive ed elettrofisiologiche se sottoposto ad indagini più fini. Secondo i nuovi criteri classificativi, l'EEM e l'EE di grado I vengono classificati come encefalopatia epatica "covert", mentre la presenza di alterazioni cliniche continua ad essere definita encefalopatia epatica conclamata [18].

La diagnosi di EEM è a tutt'oggi oggetto di discussione, tanto che manca ancora di un gold standard di riferimento.

Per la diagnosi di encefalopatia minima è sufficiente la presenza di alterazioni di almeno uno dei test neuropsicologici tarati per età ed istruzione della batteria PHES o di alterazioni elettrofisiologiche, in assenza di altra causa di alterazione delle funzioni cerebrali.

Studi sull'iperammoniemia indotta

Proprio per meglio comprendere l'associazione tra iperammoniemia, sintomi clinici e alterazioni all'EEG, fin dagli anni trenta vari studiosi cercarono di indurre tale variazione biumorale rilevando in contemporanea i cambiamenti correlati.

Il primo esempio su un'intossicazione da ammoniaca in un paziente con cirrosi epatica si deve a Burchi, che nel 1927 somministrò un carico con 5 g di acetato di ammonio [36]. Van Caulaert *et al.*, in diversi lavori degli anni 30,

studiando il metabolismo dell'ammonio in corso di cirrosi, registrarono alterazioni psiconeurologiche legate all'iperammoniemia venosa indotta da sali d'ammonio [190]. Negli anni 50 si iniziò a correlare i cambiamenti clinici successivi all'iperammoniemia indotta (flapping tremor, alterazioni della coscienza e confusione) ad alterazioni concomitanti dell'EEG [147]: Mc Dermott e Adams, in un paziente portatore di anastomosi chirurgica porto-cava, indussero il coma completo dopo somministrazione di cloruro d'ammonio, registrando alterazioni e miglioramenti all'EEG, contemporanei alla clinica [125]. Anche Sherlock nel 1954 rilevò su un paziente con EE porto-cavale, dopo carico di ammoniaca o azoto, delle poussée di onde delta bilaterali e sincrone, concomitanti con l'iperammoniemia venosa [176].

In seguito vari studi successivi su carichi di ammonio, sostanze ammoniogeniche (glutamina) o ad alto contenuto proteico sono stati eseguiti, ma l'associazione tra il dato biumorale (iperammoniemia), clinico ed elettrofisiologico non è risultata sempre chiara. In studi più recenti, Oppong *et al.* studiarono in un gruppo di 17 pazienti, prima e dopo trapianto di fegato, la risposta psicométrica, elettroencefalografica e dell'ammoniemia ad un carico di 10 o 20gr di glutamina, sostanza ammoniogenica in quanto metabolizzata dalla glutaminasi intestinale in ammonio e glutammato [143]. Il carico di glutamina determinò un'iperammoniemia correlata all'aumento dei tempi di reazione alla luce e all'ampiezza delle onde elettroencefalografiche; tali modifiche non erano presenti dopo il trapianto.

Anche gli studi di Romero-Gómez definirono come una risposta alterata ad un carico orale di 10 gr di glutamina fosse un fattore prognostico per lo sviluppo di EE conclamata e di mortalità; in questi studi la risposta patologica a tale carico è associata a EE minima, ma non correla con nessun test psicométrico somministrato [165, 166].

Lo studio che meglio riproduce i meccanismi fisiologici dell'iperammoniemia è quello di Douglass *et al.* [65] che nel 2001 proposero un carico orale di aminoacidi (COAA) mimanti l'emoglobina contenuta in 400 mL di sangue al fine di definire un test applicabile a pazienti asintomatici con cirrosi epatica per studiare gli effetti cognitivi e neurologici associati a sanguinamento digestivo. Il razionale del test COAA si basa sull'osservazione che l'assunzione di aminoacidi mimanti l'emoglobina ha un notevole potenziale encefalopatogeno a

causa della carenza di isoleucina, che rende la miscela aminoacidica inidonea ai fini anabolici e, quindi, iperammoniizzante [26, 64]. In questo studio, i test psicometrici (eccetto il TMT A) si sono dimostrati insensibili ai deterioramenti rapidi dell'iperammonemia, mentre si è osservato un incremento delle attività lente all'EEG [aumento del rapporto (theta+delta)/(alfa+beta)].

1.1.5 Terapia

Le varie opzioni terapeutiche, che peraltro non si escludono fra loro, da prendersi in considerazione sono:

1. *Ricerca e rimozione dei fattori scatenanti*

Esistono molti fattori che possono precipitare o esacerbare l'encefalopatia epatica nel cirrotico. L'incidenza degli episodi d'encefalopatia secondaria ad eventi precipitanti è differente nelle varie casistiche, ma sembrerebbe che i fattori precipitanti sono alla base del 75% degli episodi d'encefalopatia epatica ricorrente e del 97% dei casi d'encefalopatia epatica occasionale [73].

È evidente quindi come la ricerca ed il trattamento dei fattori precipitanti sia di primaria importanza per la fase acuta e per la prevenzione dell'EE.

Tabella 1.7. Fattori precipitanti l'encefalopatia epatica (modificato da: Strauss e da Costa, 1998)

Fattore precipitante	Encefalopatia occasionale (%)	Encefalopatia ricorrente (%)
Nessuno	2	25.5
Infezioni batteriche	33	26
Emorragia gastro-intestinale	30	3.5
Disturbi idro-elettrici	11	33
Stipsi	0	7
Terapia con diuretici in atto	24	5

2. *Riduzione del carico di ammonio e altre tossine provenienti dal tratto intestinale*

Disaccaridi non assorbibili, quali lattulosio e lattitolo, dopo somministrazione

orale, non vengono assorbiti nel piccolo intestino e passano inalterati nell'intestino crasso, dove vengono ampiamente metabolizzati dai batteri del colon. Il loro effetto terapeutico dipende da: i) le loro proprietà lassative, e quindi la riduzione del tempo di transito e di conseguenza del tempo di assorbimento dell'ammoniaca e forse di altre sostanze encefalopogene; ii) i cambiamenti che inducono del pH intra-luminale, favorendo l'assorbimento di ammoniaca da parte dei batteri del colon; iii) la loro interferenza a livello del piccolo intestino sullo sviluppo di flora saccarolitica a scapito di quella produttrice di ammoniaca, con conseguente riduzione della produzione e quindi dell'assorbimento di ammoniaca nel piccolo intestino [51, 192] (**Figura 1.5**).

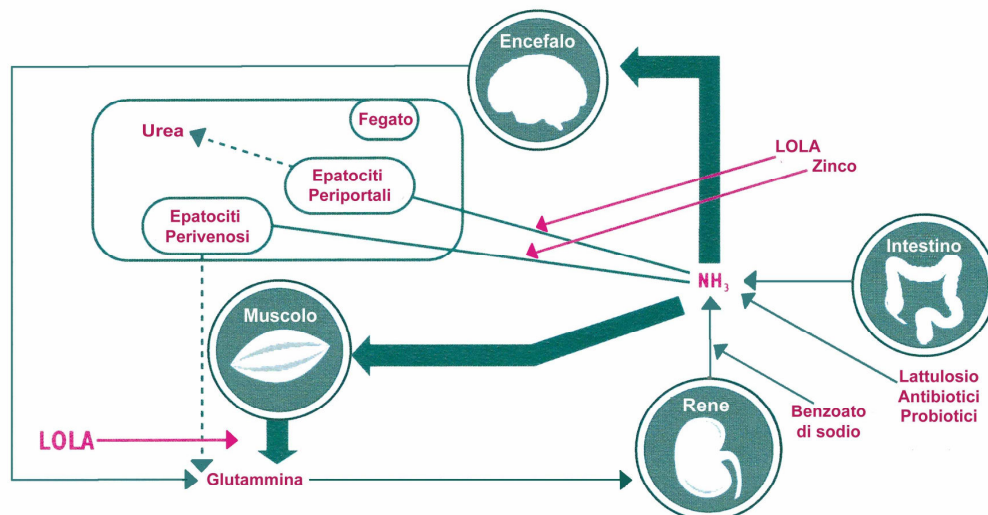


Figura 1.5 . Modalità d'azione di alcuni agenti ipoammoniemizzanti. Le strategie per ridurre l'ammonio circolante agiscono riducendo la produzione intestinale dell'ammonio (disaccaridi ed antibiotici non assorbibili) o aumentando la rimozione dell'ammonio dagli epatociti periportal e perivenosi del fegato (LOLA, zinco), dal muscolo e dal rene (LOLA, benzoato di sodio)

Antibiotici non assorbibili, come la neomicina e rifaximina, agiscono riducendo la flora batterica intestinale produttrice di ureasi, e quindi la produzione di ammoniaca [103, 181].

Disaccaridi non assorbibili e antibiotici non assorbibili possono essere usati singolarmente o in combinazione [51] (**Figura 1.5**).

Negli ultimi anni vari studi hanno dimostrato l'efficacia di *probiotici*, *prebiotici* e *sinbiotici* (*Lactobacillus acidophilus*, l'*Enterococcus faecium* SF68) sulla riduzione dell'ammonio di derivazione intestinale; la loro efficacia sembra

dipendere anche dalla riduzione dei livelli di endotossine circolanti, suggerendo proprietà antinfiammatorie, efficaci nella terapia dell'EE [116, 118, 119] (**Figura 1.5**).

3. Aumento del metabolismo dell'ammonio

Un altro mezzo terapeutico efficace per diminuire ammoniaca è la stimolazione della sua rimozione dal ciclo dell'urea nel residuo 10-15% degli epatociti periportali e aumentando la sintesi di glutammina negli epatociti perivenosi residui.

L-ornitina-L-aspartato è stato dimostrato avere proprietà ipoammoniemizzanti; agisce come substrato per la sintesi dell'urea negli epatociti periportali residui, attiva l'enzima carbamil-fosfato sintetasi, aumentando la sintesi dell'urea ed aumenta inoltre la detossificazione dell'ammonio da parte del muscolo stimolando la glutamino-sintetasi [97, 178] (**Figura 1.5**).

Il *benzoato di sodio* viene usato nella terapia dell'iperammoniemia da disfunzioni del ciclo dell'urea su base genetica. Agisce incrementando l'eliminazione urinaria di ammonio, rimuovendo l'aminoacido ammoniogenico glicina sotto forma di ippurato [183] (**Figura 1.5**).

Gli *aminoacidi a catena ramificata* sono stati introdotti in terapia per correggere lo squilibrio fra i livelli plasmatici di aminoacidi ramificati (leucina, isoleucina e valina) ed aminoacidi aromatici, di significato patogenetico secondo la teoria dei "falsi neurotrasmettitori" [5, 205]. In realtà il meccanismo degli effetti benefici non è ancora noto, ma è evidente che può derivare da maggiore disponibilità di substrati di sintesi proteica nel parenchima epatica e potrebbero anche aumentare l'utilizzo periferico di ammonio a livello muscolare [122].

La supplementazione orale di *zinco* (cofattore di enzimi dell'urea) sembra avere un significato terapeutico soprattutto qualora ne venga evidenziato un quadro carenziale (frequente nei pazienti con cirrosi epatica) [123, 159] (**Figura 1.5**).

4. Utilizzo di farmaci attivi sul SNC

Il *flumazemil* è un antagonista delle benzodiazepine, il cui impiego sarebbe giustificato dall'ipotesi che l'encefalopatia epatica sia dovuta, almeno in parte,

all'eccessiva produzione endogena di molecole benzodiazepino-simili, con conseguente attivazione della trasmissione GABA-ergica e depressione dell'attività cerebrale [5, 23].

Tentativi di trattamento dell'encefalopatia epatica cronica con *farmaci ad azione dopaminergica* (L-DOPA, bromocriptina, amantadina) hanno mostrato effetti positivi marginali e risultati contrastanti [132].

5. riduzione dello shunt porto-sistemico

La presenza di importanti circoli collaterali spleno-renali o gastro-renali, la cui visualizzazione può essere ottenuta con indagini eco-doppler o angiografiche, è associata alla comparsa di episodi di encefalopatia epatica non associati ad evidenti fattori scatenanti [185]. In pazienti selezionati, in cui tali circoli siano particolarmente cospicui, e nei quali la tradizionale terapia medica abbia fallito, vi può essere indicazione alla loro chiusura, attraverso tecniche radiologiche tra le quali il posizionamento di spirali occludenti il lume vasale [171].

1.1.5.1 Studi clinici sul LOLA

L-ornitina-L-aspartato è il sale stabile di due aminoacidi, rapidamente assorbito e diviso nei due singoli aminoacidi; è stato dimostrato avere proprietà ipoammoniemicizzanti. L'ornitina, essendo essa stessa substrato del ciclo dell'urea, agisce come substrato per la sintesi dell'urea negli epatociti periportalari residui ed inoltre attiva l'enzima carbamil-fosfato sintetasi, aumentando la sintesi dell'urea.

alla pubblicazione di diversi studi clinici randomizzati, controllati su umani.

L'efficacia clinica del LOLA nelle epatopatie è stata investigata con l'uso di infusioni intravenose, somministrazione orale o combinazione di entrambi in pazienti cirrosi. La durata dei trattamenti varia da alcuni giorni a qualche settimana (**Tabella 1.8**).

Tabella 1.8. Trial clinici controllati sulla somministrazione di LOLA in pazienti con iperammoniemia ed EE

Studio	Disegno	Durata	N° di pazienti	Eziologia dell'iperammoniemia	Trattamento	Efficacia
Staedt (1993) [177]	randomizzato doppio cieco, cross over	8 ore	10	Cirrosi; iperNH3 indotta (carico proteico 0.25 o 0.5 g/kg)	LOLA e.v. (5, 20 o 40 g/die) vs placebo e.v. (salina 0.9%)	prevenzione dell'↑ del NH4 dose dip (p<0.05) ↓ significativa dell'NH3 post-prandiale
Kircheis (1997) [97]	randomizzato doppio cieco	7 giorni	126	Cirrosi	LOLA e.v. (20 g/die) vs placebo e.v. (fruttosio 5%)	↓ NH4 (p<0.05) ↓ t NCT-a (p<0.001) Miglioramento funz mentali
Stauch (1998) [178]	randomizzato doppio cieco	14 giorni	63	Cirrosi	LOLA per os (3 x 6 gr/die) vs placebo per os	↓NH4 (p<0.01) ↓ t NCT-a (p<0.05) Miglioramento funz mentali
Poo (2006) [148]	randomizzato doppio cieco	14 giorni	20	Cirrosi	LOLA os (3g x 3/die) vs lattulosio (10ml x 3)	↓NH4 Miglioramento stato fisico-mentale ↓ degenza ospedaliera
Reynolds (1999) [158]	randomizzato doppio cieco	7 giorni	16	Cirrosi	LOLA IV (40g/8h) vs placebo	↑ tasso di sintesi proteica muscolare post-prandiale Inibizione catabolismo proteico muscolare
Rees (2000) [155]	randomizzato doppio cieco	60 min	8	Cirrosi, carico orale di glutammina (20gr)	LOLA IV (5gr/h) vs placebo	↓ dell'aumento NH4 Significativa stabilizzazione di funzioni psicometriche
Delcker (2002) [62]	aperto	24 ore	246	Cirrosi, EE I, II	LOLA IV (40g/8h)	↓NH4 ↓ rapporto glutamato+glutammina/creatina cerebrale (S-RMN) Correlazione dei due parametri
Feher (1997) [68]	randomizzato doppio cieco	7 giorni	80	Cirrosi	LOLA IV (20g/4h) vs placebo	↓NH4

IV: intravenoso; NH4: ammonio; S-RMN: risonanza magnetica nucleare spettroscopica; EE: encefalopatia epatica; NCT-A: test di connessione numerica A.

Nei vari studi si conferma l'efficacia ipoammoniemizzante del LOLA, associata ad una migliore prestazione di test psicometrici e miglioramento dello stato mentale. Questi miglioramenti sono stati quasi sempre limitati ai pazienti con EE conclamata e più evidenti dopo il settimo giorno di terapia.

Gli effetti collaterali sono stati di tipo gastrointestinali (nausea e vomito) e sono stati osservati dal 5 al 15% dei pazienti trattati.

Dai dati finora disponibili, sembrerebbe che il LOLA è più efficace in infusione endovenosa e in pazienti con grave encefalopatia epatica. Ciò può riflettere il fatto che, dopo somministrazione orale la maggior parte dell'aspartato subisce una transaminazione nella mucosa intestinale, e quindi l'efficacia del LOLA orale è largamente dipendente della sola porzione ornitina.

Il farmaco, attualmente non disponibile in Italia, è presente in formulazioni orali ed intravenose. Per quanto riguarda la formulazione intravenosa, le ampolle contengono 5 gr in 10 ml; il dosaggio massimo raccomandato è di 20 gr (4 ampolle) da diluire in soluzione fisiologica o glucosio e somministrare in 4 ore (5 g/h) (velocità di infusione più elevate sono associate ad una significativa incidenza di nausea e vomito) [97]. Controindicazione alla somministrazione è un grado severo di insufficienza renale (creatinina > 3mg/dL). Gli effetti collaterali riportati sono di tipo gastrointestinale (nausea e raramente vomito); sono di solito momentanei e non comportano la sospensione del farmaco, regredendo dopo la riduzione della dose o della velocità di infusione.

1.2 SONNO ED ENCEFALOPATIA EPATICA

1.2.1 Regolazione fisiologica del sonno

Sono attualmente accettati due processi, che interagiscono tra loro per la regolazione del sonno umano: quello circadiano, con un periodo di quasi 24 ore, e quello omeostatico che si accumula durante la veglia e diminuisce durante il sonno [31].

1.2.1.1 Regolazione circadiana del sonno

La regolazione circadiana del sonno è responsabile dell'alternanza di periodi di alta e bassa propensione al sonno, in rapporto al ciclo buio/luce, indipendentemente dal precedente comportamento sonno-veglia. Nei nuclei sovra-chiasmatici (NSC) dell'ipotalamo ha sede il principale orologio circadiano che genera i ritmi circadiani della melatonina, cortisolo e della temperatura corporea. Negli uomini il periodo circadiano endogeno è in media di circa 24.18 ore (h) e deve essere costantemente sincronizzato alle 24-h giornaliere da influenze esterne [55]. La luce, che è il maggiore fattore temporale esterno, giunge ai NSC attraverso il tratto retino-ipotalamico (RIT) [131]. A sua volta, i NSC proiettano alla ghiandola pineale che regola la produzione di quello che può essere considerato il trasduttore neuroendocrino del ciclo luce/buio: la melatonina (MT) [131].

Di conseguenza, negli individui sani, la sintesi della MT aumenta subito dopo l'insorgenza del buio, raggiunge il picco a metà della notte, e poi si riduce gradualmente [15, 150]. L'aumento notturno della sintesi della MT è associato ad una maggiore propensione al sonno [110] ed è rapidamente soppressa dall'esposizione alla luce [99, 111]. La MT è metabolizzata soprattutto a livello epatico in 6-sulfatossi-melatonina (aMT6s) [91], che viene successivamente escreta con le urine [16].

1.2.1.2 Regolazione omeostatica del sonno

La regolazione omeostatica del sonno è responsabile dell'aumento della propensione al sonno quando questo è ridotto o assente e della sua dissipazione durante il sonno. Il termine omeostatico si riferisce al fatto che il sistema bilancia le deviazioni da un "livello di riferimento" medio del sonno. Gli

studi pionieristici di Blake e Gerard mostrarono che la dominanza di onde EEG lente è maggiore nella parte iniziale del sonno e progressivamente si riduce [28]. La dominanza iniziale dell'attività a onde lente (Slow Wave Activity- SWA) è stata confermata in studi successivi [33] e l'utilizzo di analisi quantitative dell'EEG registrati durante la notte ha reso possibile delineare l'insorgenza di SWA in modo più preciso [198]. È stato anche dimostrato che la deprivazione parziale o totale di sonno produce un aumento nel SWA nella notte successiva [32]. Al contrario, sonnecchiare durante il giorno attenua la SWA del sonno seguente [200]. Presi assieme questi dati indicano che la SWA riflette affidabilmente la storia precedente di sonno e veglia.

Le esatte correlazioni neurochimiche dell'omeostasi del sonno umano rimangono sconosciute, anche se sempre più numerose evidenze dimostrano un possibile importante ruolo nella trasmissione adenosinergica [106]. Un polimorfismo funzionale dell'enzima che metabolizza l'adenosina, la adenosina-deaminasi, probabilmente contribuisce alla alta variabilità interpersonale della durata ed intensità della SWA nel sonno profondo [157].

La caffeina, un antagonista recettoriale dell'adenosina, influenza significativamente marcatori elettroencefalografici dell'omeostasi del sonno sia durante la veglia (attività theta) che durante il sonno (SWA) [107]. Infine, meccanismi mediati dall'adenosina modulano la vulnerabilità individuale agli effetti dannosi della deprivazione del sonno sulla performance neuro-comportamentale [156].

1.2.2 Alterazioni ritmo sonno-veglia ed encefalopatia

I cosiddetti "disturbi classici" del ritmo sonno-veglia possono essere così semplificati: (1) insonnia, o una difficoltà a raggiungere e/o sostenere il sonno; (2) ipersonnia o eccessiva sonnolenza, che è la propensione a dormire in momenti inopportuni, (3) eventi insoliti associati al sonno, come russare pesantemente, apnea, o movimenti degli arti.

Sherlock e colleghi, studiando un gruppo di 17 pazienti con vari gradi di disfunzione epatica associata a gravi alterazioni neurologiche, furono i primi nel 1954 a riconoscere come segno di EE conclamata la cosiddetta 'inversione' del ritmo sonno-veglia, che si presenta con incapacità di riposare la notte ed eccessiva sonnolenza diurna [176]. Ci sono anche evidenze aneddotiche che in

pazienti con cirrosi le alterazioni del sonno siano peggiorate dall'inserzione di shunts intraepatici porto-sistemici [203], e migliorino dopo l'instaurazione di terapia con lattulosio [25]. Questi riscontri suggeriscono che la patogenesi dei disturbi del sonno è strettamente legata a quella dell'EE e che in pazienti con cirrosi le alterazioni del sonno e quelle neuropsichiche sono associate [81].

Tuttavia le prove a sostegno di questa teoria, soprattutto in studi su umani, sono limitate. Inoltre, la mancanza di sonno di per sé può causare anomalie neuropsicologiche, e quindi confondere potenzialmente la diagnosi di EE minima / lieve.

Nel primo studio formale sui comportamenti del sonno in pazienti con cirrosi epatica, il gruppo di Córdoba stimò la qualità del sonno in 44 pazienti, di cui 24 (55%) con EEM; il 47% lamentava importanti disturbi del sonno, ma non trovò differenze tra le prevalenze dei disturbi del sonno in relazione alla performance psicométrica [52].

Bianchi *et al.*, ricavando dati sul comportamento del sonno da un questionario sul benessere psicologico eseguito in 156 pazienti con cirrosi, riporta una prevalenza del 69% di disturbi del sonno, non associati con EE conclamata [27].

In uno studio eseguito da Mostacci, utilizzando un'intervista semi-strutturata e somministrando questionari validati, veniva riscontrata su una popolazione di 178 pazienti con cirrosi, la presenza di disturbi del sonno notturno nel 26% dei casi; inoltre il 18% lamentava un'eccessiva sonnolenza diurna e più del 50% sonnecchiava regolarmente. In questo studio si dimostrò che pazienti con EEM presentavano maggiore insonnia e sonnolenza rispetto ai pazienti senza EE, anche se la storia di EE non era associata ad alterazioni del comportamento sonno-veglia [136].

Comunque, pochi tentativi sono stati fatti per caratterizzare le alterazioni del sonno in questo gruppo di pazienti. A parte lo studio di Córdoba, che descrisse una ridotta qualità di sonno notturno, un'eccessiva sonnolenza diurna, una preferenza serale con ritardo nelle abitudini del sonno [52], molti dati sono basati su risposte ad interviste non strutturate (disturbi del sonno presenti/assenti) o misure non specifiche del sonno derivanti da scale sulla qualità di vita o sul benessere psicologico [27, 121].

Uno studio più recente eseguito con misurazioni validate della qualità del

sonno e della sonnolenza diurna da Montagnese et al. [130] dimostra che quasi il 70% di una popolazione di 87 pazienti con cirrosi presentava una ridotta efficienza del sonno, maggiore insonnia ed eccessiva sonnolenza diurna. Tuttavia i disturbi notturni del sonno e la sonnolenza diurna non risultavano associati tra loro. Le alterazioni sonno-veglia infine influenzano significativamente la qualità di vita del paziente.

I differenti dati sulla prevalenza riportati nei vari studi sono imputabili alle diverse popolazioni studiate e all'eterogeneità dei metodi utilizzati per la valutazione delle variabili del sonno.

La profonda sonnolenza diurna è stata riconosciuta come un segno di EE conclamata da Sherlock et al. nel 1954. Tuttavia, la popolazione di pazienti studiati era piccola ed eterogenea, e le anomalie neurologiche estremamente gravi. L'eccessiva sonnolenza diurna è stata successivamente descritta in pazienti con cirrosi e lieve alterazione neuropsichiatrica e in almeno due studi, è stata osservata un'associazione tra l'eccessiva sonnolenza e la presenza/gravità dell'EE.

In un recente ed ampio studio [61], in una popolazione di 106 pazienti con cirrosi epatica e assenza/grado I di EE seguiti per un periodo di 8 ± 6 mesi, il 71% lamentava sonnolenza diurna, che è risultata significativamente correlata con un rallentamento dell'EEG, con la storia di EE e con un aumento del rischio di ospedalizzazione per EE (valore predittivo negativo del 92%), mentre nessuna associazione è stata osservata tra difficoltà ad addormentarsi/frequenti risvegli notturni ed EE. Inoltre, l'eccessiva sonnolenza diurna è risultata essere associata alla presenza di shunts porto-sistemici, condizione risaputa essere implicata nella patofisiologia dell'EE [160].

Dagli studi finora eseguiti sembra quindi che il disturbo del sonno sia un problema rilevante per il paziente con cirrosi e che forse le alterazioni notturne del sonno e la sonnolenza diurna siano delle manifestazioni cliniche di differenti processi patologici.

Complessivamente, le caratteristiche delle alterazioni del sonno in questi pazienti, le loro relazioni con l'EE e la loro patofisiologia rimangono ancora poco definite.

1.2.2.1 Ritmi circadiani

Poiché la melatonina è metabolizzata a livello epatico, una prima teoria ha supposto che il suo metabolismo potrebbe essere ritardato o in qualche modo compromesso in questa popolazione. A sostegno di questa tesi ci sono studi che mostrano come in pazienti con cirrosi siano presenti elevati livelli diurni di melatonina, bassi livelli urinari di aMT6s ed una diminuita clearance di melatonina esogena somministrata [86]. Queste ed altre alterazioni circadiane, ad esempio il ritardo nell'incremento notturno e del picco della melatonina, suggeriscono una disfunzione del NSC e dell'asse retino-ipotalamico, confermata dalla ridotta sensibilità della melatonina all'esposizione della luce nei pazienti con cirrosi. In diversi studi inoltre si sono dimostrate correlazioni tra il ritardo nella tempistica dei picchi di melatonina/aMT6s e il grado di insufficienza epatica [129, 179, 180].

Qualche tentativo è stato fatto per correlare le variazioni nel ritmo della melatonina endogena con i disturbi del sonno osservata nei pazienti con cirrosi, ma i risultati sono stati inconcludenti [129]. È stato suggerito che i ritardi del ritmo circadiano possono essere associate alle abitudini di sonno ritardate, anche se non necessariamente con una alterata qualità del sonno. La combinazione di preferenza serale, abitudini ritardate di sonno, qualità di sonno insufficiente e ritmi circadiani ritardati ricordano la sindrome della fase del sonno ritardata (DSPS), un disturbo del ritmo circadiano del sonno caratterizzata da notevoli ritardi nei tempi di insorgenza di sonno/veglia. L'obiettivo del trattamento per la DSPS è risincronizzare l'orologio circadiano col ciclo luce/buio di 24 ore, e l'esposizione alla luce intensa del mattino è stato dimostrata utile [201]. Un case report incoraggiante suggerisce che il trattamento con la luce del mattino potrebbe essere efficace anche nella gestione della sindrome simile DSPS dei pazienti con cirrosi [60].

1.2.2.2 Indici di sonno omeostatico

Meno informazioni sono disponibili sull'omeostasi del sonno in pazienti con cirrosi. La polisonnografia è stata eseguita in un numero limitato di studi, ma con lo scopo di valutare indici elettroencefalografici di EE [21, 197].

In uno studio del 1972, Kurtz e collaboratori studiarono il sonno notturno spontaneo in 15 pazienti con cirrosi e differenti gradi di EE con registrazioni

polisonnografiche, misurando quindi la durata totale di sonno, il tempo di addormentamento, le variazioni e la durata dei vari stadi del sonno. Lo studio dimostrò correlazioni tra la clinica, la gravità elettroencefalografica e i livelli di ammoniemia da una parte e le caratteristiche elettroencefalografiche, la durata e l'organizzazione del sonno dall'altra. Inoltre, con il peggiorare dell'EE, il sonno mostrava progressive variazioni patologiche, seppur reversibili, che vennero imputate all'alterato metabolismo dell'ammonio [104].

Infine, in uno studio di risonanza magnetica nucleare (RMN) è stato osservata una ridotta densità del recettore A₁AR dell'adenosina nelle regioni cerebrali corticali e sottocorticali di pazienti con cirrosi; implicando anche una alterazione della regolazione omeostatica nei loro disturbi del sonno [34].

2. SCOPO DELLA TESI

Gli obiettivi dei miei studi di dottorato sono stati di individuare, in un gruppo di pazienti ben caratterizzati con la cirrosi epatica e in un gruppo di volontari sani, l'effetto dell'iperammonimia indotta:

- sulla prestazione neuropsichica e sull'EEG di veglia (Studio 1).
- Sul rapporto tra sonnolenza diurna e EE e sulle caratteristiche dell'EEG di sonno (Studio 2).
- Sugli effetti di sostanze ipoammoniemizzanti (L-ornitina-L-aspartato, LOLA) e della caffeina (antagonista del recettore dell'adenosina) su EEG di veglia e di sonno (Studio 3).

3. METODOLOGIA GENERALE

Questa sezione include i dettagli sui metodi utilizzati in tutti gli studi. I metodi utilizzati esclusivamente nei singoli studi sono descritti nei relativi capitoli.

3.1 POPOLAZIONE STUDIATA

I pazienti con cirrosi epatica sono stati arruolati tra quelli seguiti nella Clinica Medica 5, nell'Ambulatorio dei Disturbi Cognitivi o nel Centro Regionale Malattie del Fegato del Policlinico Ospedaliero dell'Università di Padova.

La diagnosi e l'eziologia della malattia epatica sono state definite in base a criteri anamnestici, clinici, biumorali, endoscopici, radiologici e, ove necessario, istologici.

Il grado di insufficienza epatica è stato definito utilizzando il punteggio Child-Pugh. Questo sistema si basa su due variabili cliniche e tre variabili di laboratorio; a ciascuna variabile è assegnato un punteggio da 1 a 3; i punteggi sommati vengono suddivisi in tre classi di gravità [149]. Per comodità clinica, il punteggio è stato ulteriormente suddiviso in ≤ 7 (cirrosi epatica compensata) o ≥ 8 (cirrosi epatica scompensata) (**Tabella 3.1**).

Tabella 3.1 Sistema modificato di classificazione di Child-Pugh per il grado d'insufficienza epatica in pazienti con cirrosi.

Variabile (range di riferimento)	Punteggio		
	1	2	3
Albumina (35-50 g/dl)	> 35	28-35	< 28
Bilirubina (5-17 μ mol/l)	< 34	34-50	> 50
INR	<1.7	1.7-2.2	> 2.21
Ascite	Assente	Lieve	Moderata/Severa
Encefalopatia	Assente	Grado I/II (trattabile)	Grado III/IV (refrattaria)

Punteggio Pugh 5-6	Classe Child A	Punteggio Pugh ≤ 7	compensata
Punteggio Pugh 7-9	Classe Child B	Punteggio Pugh ≥ 8	scompensata
Punteggio Pugh ≥ 10	Classe Child C		

Criteri di esclusione allo studio sono stati:

- età al di sotto dei 20 anni o al di sopra degli 80;
- analfabetismo o cattiva padronanza della lingua italiana;
- EE conclamata e/o terapia in atto per l'EE;
- abuso di bevande alcoliche nei 6 mesi precedenti la valutazione;
- classe Child-Pugh ≥ 8 /cirrosi scompensata;
- gravi patologie polmonari con insufficienza respiratoria;
- grave insufficienza renale (creat $>3\text{mg/dL}$);
- coronaropatia o insufficienza cardiaca di qualsiasi origine con classe NYHA (New York Heart Association) ≥ 2 ;
- storia di tachicardia, palpitazione, aritmia;
- distiroidismo;
- infezioni o sanguinamento nei 15 giorni precedenti lo studio;
- patologie neurologiche o psichiatriche significative;
- assunzione di farmaci psicoattivi, ipnoinducenti o con effetti noti sul ritmo circadiano;
- viaggi in più di due fusi orari nei precedenti 3 mesi o lavoro a turni nei precedenti 5 anni;
- gravidanza o allattamento;
- mancanza del consenso informato.

Nello stesso arco di tempo sono stati reclutati dieci controlli tra volontari ospedalieri, parenti di pazienti o personale medico-infermieristico, confrontabili per età e sesso. Nessuno aveva anamnesi positiva per abuso alcolico, epatopatie croniche o disturbi psichiatrici/neurologici. Nessuno assumeva alcolici al di sopra dei livelli raccomandati o farmaci psicoattivi, ipnoinducenti o con effetti noti sul ritmo circadiano.

3.2 VALUTAZIONE CLINICA

In linea con le ultime raccomandazioni sulla valutazione dello stato neuropsichico dei pazienti con cirrosi [69], ogni paziente è stato sottoposto ad una valutazione clinica, che includeva una dettagliata raccolta anamnestica, un esame neurologico completo, l'esclusione di disturbi neurologici concomitanti, una classificazione clinica delle anomalie neuropsichiche secondo i criteri di West Haven [50] (**Tabella 3.2**).

Tabella 3.2 Criteri di West Haven per la classificazione clinica delle alterazioni dello stato mentale in pazienti con cirrosi [50]

Grado di EE	Caratteristiche cliniche
0	Nessuna anomalia rilevata
I	Lieve mancanza di consapevolezza Euforia o ansia immotivate Ridotte capacità attentive Riduzione delle capacità aritmetiche (compiere addizioni)
II	Apatia o letargia Lieve disorientamento temporo-spaziale Lievi cambiamenti di personalità Comportamento inadeguato Riduzione delle capacità aritmetiche (compiere sottrazioni)
III	Semistupor o sonnolenza (permane la risposta agli stimoli verbali) Confusione mentale Marcato disorientamento Comportamento bizzarro
IV	Coma, impossibilità di testare stato mentale

3.3 QUALITÀ DI VITA

Ai partecipanti allo studio veniva chiesto di completare il seguente questionario:

- **SF-36 (Short Form Health Profile), versione 1** [196]. Questo questionario autosomministrato sullo stato di salute è composto da 36 domande sulla salute e sul benessere funzionale, riferite ad otto domini di salute, che vengono poi riassunti in due punteggi sommario finali: *SF-36 fisico* e *SF-36 mentale*. I valori dei domini vengono trasformati in una scala da 0 (peggiore) a 100 (migliore) [196]. I punteggi finali SF-36 fisico e mentale sono calcolati usando dei coefficienti e i risultati standardizzati per sesso ed età sulla popolazione italiana [14].

3.4 VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA

3.4.1 PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score)

La batteria di test psicometrici carta e matita che compongono la PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) è attualmente considerata il “gold standard” per la diagnosi dell’encefalopatia epatica minima [199]. La batteria è stata somministrata in ambienti ben illuminati e in condizioni standardizzate. I test che la compongono sono cinque: Trail Making Test A, Trail Making Test B,

Serial Dotting, Digit Symbol Test e il Line Tracing Test.

I dati grezzi di ogni *test* effettuato sono stati trasformati in punteggi Z, espressi come residui standardizzati dai valori attesi per età e istruzione, secondo standard italiani [7]. Sono considerati alterati i punteggi Z superiori a 2 [3, 12, 199]. La performance psicomotoria globale è data dalla somma delle deviazioni standard di tutti i test (punteggio PHES) ed è considerata alterata se $\leq - 4$.

3.4.2 SCAN Test

È un test computerizzato di memoria di lavoro, basato sul compito di Sternberg, utilizzato per la diagnosi e quantificazione dell'EE [9]. Dopo una sessione di pratica, al soggetto viene chiesto di premere diversi tasti a seconda della presenza (tasto 1) o assenza (tasto 3) di numeri in comune tra due serie numeriche (composte da due a quattro cifre) che compaiono consecutivamente sullo schermo del computer. Nel risultato del test vengono considerate l'accuratezza (percentuale di risposte date e risposte corrette date) ed il tempo di reazione delle risposte corrette, standardizzate per età e livello d'istruzione.

3.5 VALUTAZIONE ELETTROFISIOLOGICA

3.5.1 EEG di veglia

L'attività elettrica spontanea cerebrale a occhi chiusi è stata registrata con un elettroencefalografo digitale Brain Quick 3200 (Micromed, Italia) nella tarda mattinata, immediatamente dopo la valutazione psicometrica.

Il tracciato EEG è stato registrato per 10 minuti durante i quali il paziente veniva invitato a tenere gli occhi chiusi e a rilassarsi; è stata posta particolare attenzione ad evitare sonnolenza e artefatti muscolari, oculari o di altra natura. La rilevazione del segnale elettrico è stata effettuata mediante una cuffia a 21 canali (Micromed, Italia) con elettrodi distribuiti sullo scalpo secondo il Sistema Internazionale 10-20 (terra: Fpz, riferimento: Oz) [90]. L'impedenza di ciascun elettrodo è stata mantenuta sotto i 5k Ω . L'EEG è stato ispezionato visivamente per escludere attività focale e per selezionare una sezione continua di 80 sec libera da artefatti per eseguire una successiva analisi spettrale attraverso un algoritmo basato sulla trasformata di Fourier (Fast Fourier Transform) [8].

I parametri spettrali considerati sono stati i seguenti:

- i. la Frequenza Media Dominante (MDF: mean dominant frequency) definita dall'equazione: $MDF = \frac{\sum_i (f_i S_i)}{\sum_i S_i}$ (f_i = frequenza e S_i = potenza della frequenza i)
- ii. la potenza relativa del ritmo delta ($1 \leq Hz < 4$)
- iii. la potenza relativa del ritmo theta ($4 \leq Hz < 8.5$)
- iv. la potenza relativa del ritmo alfa ($8.5 \leq Hz < 13.5$)
- v. la potenza relativa del ritmo beta ($13.5 \leq Hz < 27$)

ove per potenza relativa si intende il rapporto tra la potenza di ogni singolo ritmo e la potenza totale nella banda di frequenza analizzata.

Il tracciato EEG è stato quindi classificato secondo i criteri proposti da Amodio e collaboratori e definito alterato se venivano rilevate modifiche di Grado I-III (**Tabella 1.6 pag 28**) [8].

3.6 CARICO DI AMINOACIDI

Il carico orale di aminoacidi, consistente in una miscela di 54 gr di aminoacidi mimanti il contenuto aminoacidico dell'emoglobina presente in 400 ml di sangue. Il composto, opportunamente edulcorato e aromatizzato, è stato diluito in circa 50 ml di acqua e ingerito in un periodo di 10-15 min.

La miscela di aminoacidi puri in forma libera è stata fornita dalla Volchem srl, azienda produttrice di integratori alimentari, secondo i rapporti di seguito elencati [65] (**Tabella 3.3**).

Tabella 3.3 Composizione aminoacidica della miscela.

Aminoacido	Gr	Aminoacido	Gr
Glicina	4.00	L-Tirosina	1.25
L-Alanina	7.00	L-Acido aspartico	3.00
L-Serina	3.00	L-Asparagina	2.00
L-Treonina	3.00	L-Acido glutammico	2.00
L-Prolina	3.00	L-Arginina	1.25
L-Valina	6.00	L-istidina	4.00
L-Leucina	7.00	L-lisina	4.50
L-Fenilalanina	3.00	Totale	54.00

3.7 AMMONIEMIA

Per la rilevazione dei livelli capillari dell'ammonio è stato utilizzato l'Ammonia Checker (Menarini Diagnostics, Firenze), un dispositivo automatico che permette di misurare rapidamente (200 s) l'ammoniemia capillare con piccoli volumi di sangue (20 μ L). L'intervallo di misura è tra 10-400 μ g/dL, v.n. < 75 μ g/dL (7-286 μ mol/L, v.n. 54 μ mol/L).

In ogni giorno di studio sono state ottenute l'ammoniemia basale a digiuno al mattino e successivo monitoraggio orario dell'ammoniemia per 12 ore dopo il carico.

3.8 APPROVAZIONE COMITATO ETICO

Lo studio è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki (modifica di Hong Kong) e secondo le linee guida europee di Good Clinical Practice. Tutti i protocolli sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Tutti i partecipanti hanno letto e firmato il consenso informato.

4. EFFETTI DELLA IPERAMMONIEMIA SU PRESTAZIONE NEUROPSICHICA ED EEG DI VEGLIA. STUDIO 1.

4.1 INTRODUZIONE

L'EEG di veglia nei soggetti sani è dominato dal cosiddetto 'ritmo di fondo', che ha una frequenza tra 8–13 Hz (attività alfa) ed una potenza maggiore nelle aree posteriori del cervello. L'EEG di veglia è sensibile all'iperammoniemia, ma i meccanismi sottostanti sono solo parzialmente conosciuti [124]. La diagnosi dell'EE si basa sulla rilevazione visiva o spettrale del rallentamento della frequenza dell'EEG [8]. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che anche la distribuzione regionale dei ritmi dell'EEG di veglia può essere alterata nei pazienti con cirrosi, soprattutto in quelli con EE [127].

Lo scopo del nostro studio era di individuare, in un gruppo di pazienti con la cirrosi e in un gruppo di volontari sani, l'effetto dell'iperammoniemia indotta su:

1. prestazione cognitiva;
2. caratteristiche "standard" dell'EEG di veglia;
3. distribuzione topografica dei ritmi EEG di veglia.

4.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Ogni studio individuale è stato condotto in un periodo di otto giorni e si è svolto in due separate sedi: l'Ambulatorio per i Disturbi Cognitivi della Clinica Medica V (Policlinico Universitario di Padova) e il domicilio del partecipante allo studio.

Presso l'ospedale il soggetto ha eseguito un incontro preliminare per la spiegazione del protocollo di studio, la firma del consenso informato, la valutazione clinica e nutrizionale e la consegna dei questionari (vedi in seguito). Al quarto e all'ottavo giorno del periodo di studio sono state eseguite al mattino valutazione neuropsichica completa ed EEG di veglia (**Figura 4.1**).

Alle ore 7 del quarto o dell'ottavo giorno, secondo un'assegnazione randomizzata, il soggetto ha assunto a domicilio il carico orale di aminoacidi. Sei pazienti (60%) e cinque volontari sani (50%) hanno effettuato prima la

valutazione post-carico (4° giorno) e quindi la valutazione basale (8° giorno). Il giorno del carico il paziente ha eseguito una misurazione oraria dell'ammoniemia.

La durata complessiva delle valutazioni eseguite in quarta ed ottava giornata era di circa 6 ore.



Figura 4.1. Schema riassuntivo del disegno di studio 1.

COAA: Carico Orale AminoAcidi

4.3 MATERIALI E METODI

4.3.1 Popolazione di studio

Secondo i criteri già descritti nel capitolo 3 di metodologia generale, sono stati reclutati dieci pazienti [nove maschi (90%)] con età media di 54.5 anni \pm 14.1 anni (30-72) affetti da cirrosi epatica senza storia e segni clinici di EE.

Un paziente maschio di 55 anni ha eseguito una valutazione anche dopo l'inserimento di uno shunt porto-sistemico trans-giugulare (TIPS), procedura associata ad aumentato rischio di sviluppare EE.

Nello stesso arco di tempo sono stati reclutati dieci volontari sani, [cinque maschi (50%)] con età media di 49,4 anni [\pm 13,2 anni (30-62)].

4.3.2. Valutazione clinica e nutrizionale

Oltre al colloquio per raccogliere la storia anamnestica, valutare i criteri d'esclusione, la compliance del soggetto e le condizioni cliniche generali dei pazienti (vedi Valutazione clinica, cap. Metodologia Generale), i partecipanti allo studio sono stati sottoposti ad una valutazione nutrizionale specialistica (Ambulatorio di Nutrizione Clinica) che comprendeva la misurazione del peso, dell'altezza, la determinazione dell'indice di massa corporea o BMI [Body Mass Index, peso (Kg)/altezza (m)²], la determinazione della composizione corporea mediante antropometria con la misurazione della circonferenza del braccio (cm) e della plica tricipitale (mm). Da questi dati è stata poi calcolata l'area muscolare del braccio, indicatore della massa muscolare, secondo la seguente formula [84]:

$$\text{MAMC} = \text{circonferenza del braccio} - (\text{TSF} \times \pi)$$

I risultati così ottenuti sono stati quindi confrontati con i percentili di riferimento per sesso ed età secondo Frisancho [71].

4.3.3 Qualità di vita

Oltre al questionario SF-36 (Short Form Health Profile), versione 1 [196] sullo sulla salute ed sul benessere funzionale, ai partecipanti allo studio veniva

chiesto di completare il seguente questionario:

- **CLDQ (Chronic Liver Disease Questionnaire) versione italiana** [169, 207]. Questo questionario autosomministrato sulla qualità di vita specifico per le epatopatie è articolato in 28 domande, raggruppate in sei domini riguardanti la salute e il benessere. La risposta ad ogni domanda è quantificata da 1 (sempre) a 6 (mai) e i punteggi vengono sommati. Il punteggio di ogni dominio è la media dei punteggi delle domande di pertinenza del dominio stesso. Infine, il punteggio CLDQ totale (1-6) è dato dalla media dei punteggi dei sei domini.

4.3.4 Valutazione neuropsicologica

Oltre alla batteria di test psicometrici carta e matita che compongono la PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) [199] ed al test computerizzato SCAN [9], veniva somministrato anche un altro test computerizzato, il Simon Test.

4.3.5 Valutazione elettrofisiologica

4.3.5.1 Registrazione ed analisi dell'EEG di veglia

L'EEG è stata registrato alle ore 11:00 (tempo di picco di ammoniaca previsto dopo COAA), secondo le modalità descritte nella metodologia generale [8]. L'attività dominante dell'EEG è stata identificata in ogni derivazione rilevando il suo picco entro l'intervallo di frequenza 6-13 Hz dello spettro di densità di potenza (funzione MATLAB 'findpeaks'). In un paziente, entrambe le registrazioni avevano bassa potenza e non erano presenti picchi nella maggior parte delle derivazioni; questo paziente è stato escluso.

In ogni derivazione, inoltre è stato calcolata la potenza dell'attività dominante in un intervallo di 2.5 Hz intorno al picco globale individuale (cioè picco a 10 Hz, il potere è stato calcolato tra 8.75 e 11.25 Hz).

4.3.5.2 Composizione delle mappe

Le mappe rappresentano i valori della potenza e della frequenza codificati in colore e tracciati nella posizione corrispondente sulla proiezione planare del modello del cuoio capelluto, utilizzando la funzione 'topoplot' da laboratorio

EEG [63]. La figura rappresenta lo scalpo visto dall'alto, con il naso davanti. I valori tra gli elettrodi sono stati interpolati.

Nelle mappe statistiche, i cerchi pieni raffigurano gli elettrodi in cui il t-test è stato significativo ($p < 0.05$); i cerchi vuoti non indicano alcuna differenza significativa. Le posizioni dei 19 elettrodi e la loro sigla secondo il sistema 10-20 sono indicate su una mappa aggiuntiva.

4.3.6 Carico orale di aminoacidi (COAA)

Seguendo le modalità descritte nel capitolo 3 di metodologia generale, il COAA è stato somministrato alle ore 07.00 del quarto o dell'ottavo giorno, secondo un'assegnazione randomizzata. Sei pazienti (60%) e cinque volontari sani (50%) hanno effettuato prima la valutazione post-carico (4° giorno) e quindi la valutazione basale (8° giorno). La miscela di aminoacidi è stata ben tollerata: due pazienti e tre controlli hanno lamentato nausea.

4.3.7 Ammoniemia

Seguendo le modalità descritte nel capitolo 3 di metodologia generale, concentrazioni di ammoniaca capillare sono stati misurati sulla punta del dito.

In ogni giorno di studio sono state ottenute l'ammoniemia basale a digiuno al mattino e successivo monitoraggio orario dell'ammoniemia per 7 ore dopo il carico. L'ammoniemia basale a digiuno è stata misurata in ogni soggetto il giorno in cui eseguiva la valutazione basale.

4.3.8 Analisi statistica

La distribuzione delle variabili è stata studiata con il test di normalità di Shapiro-Wilks. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, se non altrimenti specificato. I confronti tra gruppi sono stati effettuati con il test t-student/ANOVA a una via per variabili distribuite normalmente, con il test U di Mann-Whitney/ANOVA di Kruskal-Wallis per variabili distribuite non normalmente.

La frequenza dominante e il logaritmo della potenza sono stati analizzati mediante test ANOVA a misure ripetute e con modello misto, identificando quali fattori il "gruppo" (pazienti vs volontari sani), la "condizione" (livelli basali vs. COAA) e la "posizione" degli elettrodi, prevedendo anche l'opzione di interazione tra fattori.

Per quanto attiene alla potenza, sono risultati significativi i fattori “gruppo”, “condizione”, “posizione” e le interazioni “gruppo*posizione” e “gruppo*condizione”. Per quanto attiene alla frequenza sono risultati significativi i fattori “gruppo”, “condizione” e “posizione”. In presenza delle predette significatività, quale analisi post-hoc si è eseguito il t-Test di student, per ogni singola posizione degli elettrodi.

L’analisi di correlazione è stata eseguita utilizzando la r di Pearson per variabili distribuite normalmente e i ranghi di Spearman per variabili distribuite non normalmente.

4.4 RISULTATI

4.4.1 Dati demografici

Lo studio è stato completato da dieci pazienti e da dieci volontari sani, le cui caratteristiche demografiche, cliniche e bioumorali sono riportate nella **Tabella 4.1**.

I due gruppi sono risultati omogenei per età e livello d'istruzione. Tra i pazienti era maggiore il numero dei maschi (χ^2 3.8, $p=0.05$). Sei pazienti sono stati classificati come Child A e 4 come Child B.

Tabella 4.1. Caratteristiche demografiche della popolazione

	Pazienti	Volontari sani
Età (media \pm DS)	54,5 \pm 14anni	49,4 \pm 13,2
Sesso (m/f)	9/1	5/5
Livello d'istruzione (anni di studio)	14,1 \pm 3,8	13,8 \pm 4,9
Eziologia		
- Alcolica n (%)	3 (30)	—
- Post-epatitica n (%)	6 (60)	—
- Mista n (%)	1 (10)	—
CHILD-PUGH		
- A n (%)	6 (60)	—
- B n (%)	4 (40)	—
- C n (%)	0 (0)	—

Non sono state rilevate differenze nel punteggio sommario *SF-36 mentale* del questionario SF-36 di qualità di vita tra i due gruppi, mentre il punteggio *SF-36 fisico* è risultato significativamente ridotto nei pazienti rispetto ai controlli (50.4 \pm 7.7 vs 41.1 \pm 9.6, $p=0.02$) (**Tabella 4.2; Figura 4.2**).

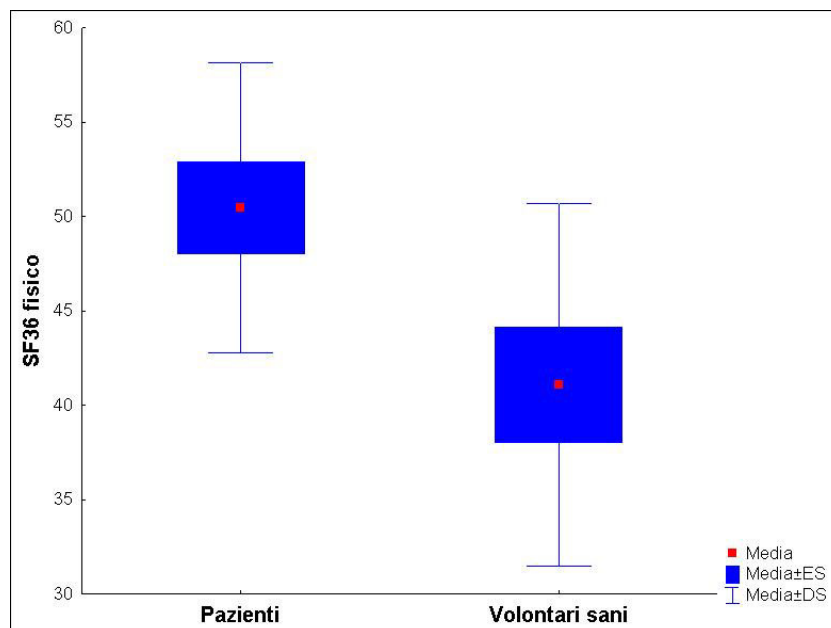


Figura 4.2 Qualità di vita dei pazienti e dei volontari. Il punteggio sommario fisico del questionario SF-36 (Short Form Health Profile) di qualità di vita è significativamente minore nei pazienti rispetto ai volontari sani ($p=0.02$).

4.4.2 Valutazione psicometrica basale

Nei test carta e matita tutti i partecipanti allo studio avevano una prestazione basale ai test entro i limiti di norma; tuttavia i pazienti presentavano prestazioni medie significativamente peggiori rispetto ai controlli (z-PHES 1.6 ± 2.7 vs 4.2 ± 1.2 , $p=0.01$; z-TMT A 0.7 ± 0.7 vs 1.6 ± 0.6 , $p=0.01$) (**Tabella 4.2; Figura 4.3**).

Tabella 4.2. Valutazione psicometrica basale nei pazienti con cirrosi e nei volontari sani.

TEST	Pazienti	Volontari sani	p
PHES			
- DST-z	0.8 ± 1.5	2.0 ± 1.3	0.06
- TMT A-z	0.7 ± 0.7	1.6 ± 0.6	0.01
- TMT B-z	0.6 ± 1.3	1.4 ± 0.8	0.13
- SD-z	0.9 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.04
- W-LTT-z	0.6 ± 1.5	1.6 ± 0.9	0.09
- MPZS	0.7 ± 0.9	1.6 ± 0.6	0.02
- PHES-z	1.6 ± 2.7	4.2 ± 1.2	0.01
SCAN-test			
- RT (ms)	1581 ± 316	1200 ± 187	0.01
- Acc (%)	92 ± 5.1	90 ± 5.6	0.44
- z-score	-1.0 ± 1.3	0.2 ± 0.9	0.02

PHES: psychometric hepatic encephalopathy score; DST: digit symbol; TMT-A/B: trial making test A/B; SD: serial dotting; W-LTT: tempo pesato per errori al test line tracing time/error; RT: tempo di reazione; Acc: accuratezza.

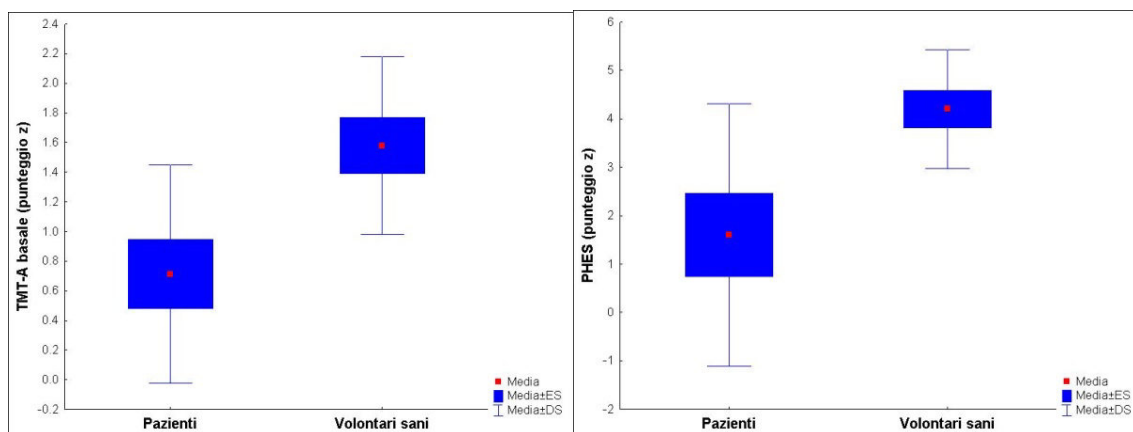


Figura 4.3. Prestazione PHES basale nei pazienti e nei volontari sani. In condizioni basali i pazienti hanno una prestazione ai test carta e matita significativamente peggiore rispetto ai volontari sani ($p=0.01$).

Pannello a sinistra: punteggio z-TMT A (Trail Making Test A) $p=0.01$

Pannello a destra: punteggio z-PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) $p=0.01$

Nel test Scan sia i pazienti che i controlli avevano una prestazione di base nei limiti di norma. Anche in questo caso la prestazione dei pazienti è risultata significativamente peggiore rispetto ai volontari sani nel tempo di reazione (1581 ± 316 vs 1200 ± 187 ms, $p=0.004$) e quindi nel punteggio z (-1.0 ± 1.3 vs 0.2 ± 0.9 , $p=0.02$) (**Figura 4.4**). Le accuratèzze del test sono invece risultate confrontabili tra i due gruppi.

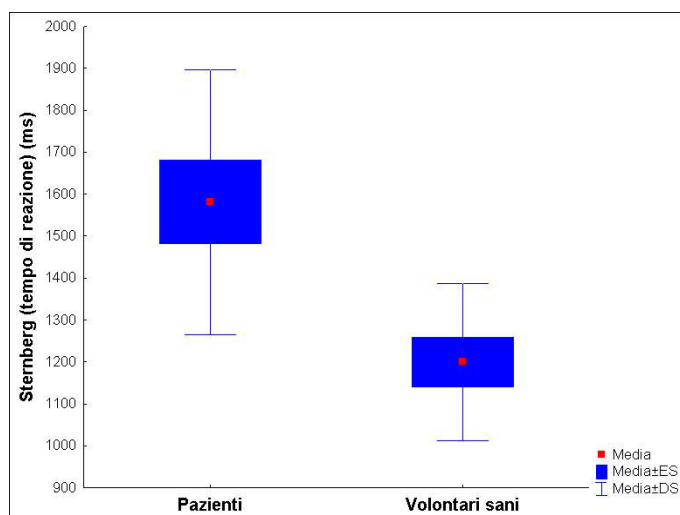


Figura 4.4. Tempo di reazione al test Sternberg nei pazienti e nei volontari sani in condizioni basali. Nella prestazione al test di Sternberg, in condizioni basali i pazienti risultano significativamente più lenti rispetto ai volontari sani ($p=0.004$).

4.4.3 EEG di veglia basale

Tutti i controlli e nove pazienti avevano un EEG di base nella norma; un paziente ha presentato un grado I di rallentamento EEG secondo Amodio et al. [8] Tuttavia, in media, i pazienti avevano un EEG molto più lento rispetto volontari sani (**Tabella 4.3**).

Tabella 4.3. Indici dell'analisi spettrale dell'EEG in condizioni basali nei pazienti e nei volontari sani

EEG	Pazienti	Volontari sani	p
MDF (Hz)	10.4±(2.0)	11.3±1.7	0.16
δ (%)	12±8	20±12	0.09
θ (%)	20±1	11±3	0.06
α (%)	50±20	41±12	0.23
β (%)	18±15	28±11	0.11
Picco dominante (Hz)	9.0±0.9	9.9±0.2	<0.01

MDF: mean dominant frequency; δ (%): potenza relativa delta; θ (%): potenza relativa theta; α (%): potenza relativa alfa; β (%): potenza relativa beta.

4.4.4 Valutazione post-carico

Quattro pazienti (40%) e cinque volontari sani (50%) hanno effettuato prima la valutazione basale (4° giorno) e quindi la valutazione post-carico (8° giorno). Nei rimanenti partecipanti l'ordine delle valutazioni è stato invertito (prima nel post-carico e poi in basale).

4.4.4.1 Ammoniemia

I pazienti avevano livelli plasmatici di ammoniemia più elevati dei volontari sani in condizioni basali (202.3±60.6 vs 147.3±44.7µg/dL, p=0.03).

Il carico di aminoacidi ha determinato un notevole aumento dei livelli plasmatici dell'ammonio in entrambi i gruppi; tuttavia, tale aumento è risultato significativo a due ore dal carico solo nei pazienti (202.3±60.57 vs 292.8±82ug/dL, p=0.01).

Inoltre, l'aumento dell'ammoniemia si presentava prima nei pazienti ed era più elevato e più prolungato nei pazienti rispetto ai volontari sani.

L'andamento plasmatico dell'ammoniemia ha presentato sia nei pazienti che nei volontari sani un picco alle ore 11:00 (**Figura 4.5**).

L'andamento delle concentrazioni è risultato simile fino al picco; successivamente, la diminuzione delle concentrazioni di ammoniaca è risultata più ripida nei volontari sani, anche se l'effetto interazione non è risultato significativo [tempo: $F = 2.1$, $p = 0.05$; gruppo (pazienti vs volontari sani): $F = 15.3$, $p = 0.00$; tempo*gruppo: $F = 0.7$, $p = 0.66$].

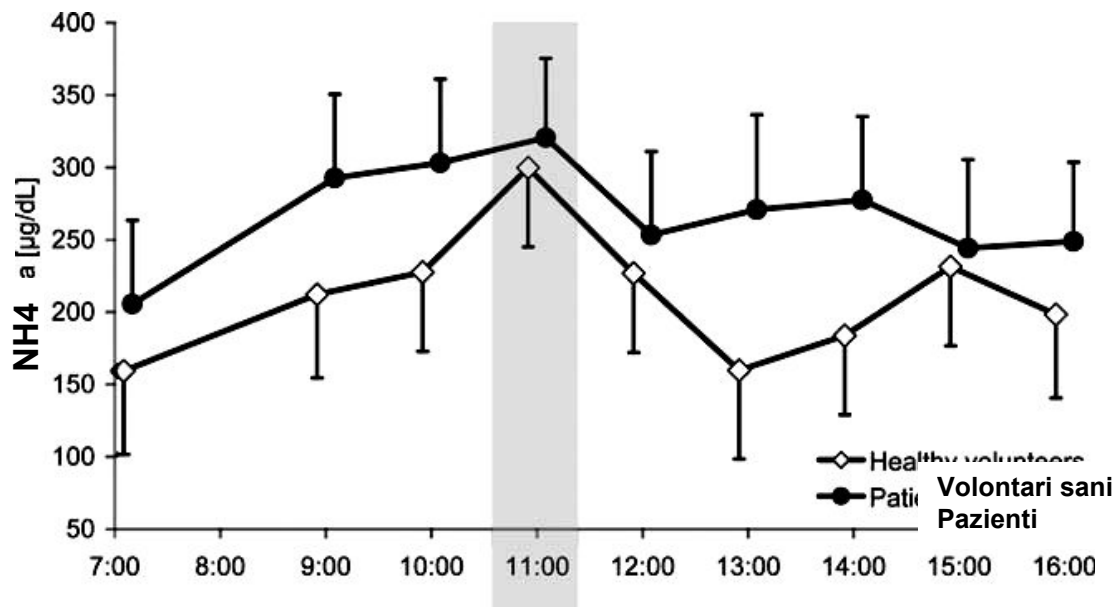


Figura 4.5. Livelli ematici dell'ammonio post-COAA nei pazienti (linea nera, cerchi neri) e nei volontari sani (linea nera, rombi bianchi). Al basale (ore 7) i pazienti avevano livelli di ammoniaca superiore rispetto ai volontari sani ($p < 0.03$). Sia nei pazienti che nei volontari sani il COAA determina un aumento dell'ammoniemia, maggiore e più rapido nei pazienti, che partono da livelli ematici pre-COAA maggiori rispetto ai volontari sani. Sia i pazienti che i volontari sani presentavano un picco di concentrazione plasmatica alle ore 11. NH4: ammonio.

4.4.4.2 Prestazione neuropsichica

La somministrazione orale degli aminoacidi non ha provocato cambiamenti significativi rispetto ai valori basali nella prestazione alla PHES, al test SCAN e al test Simon né nei pazienti né nei volontari sani (**Tabella 4.4**).

Per quanto attiene all'EEG di veglia, il carico non ha determinato nessun cambiamento significativo degli EEG di veglia dei volontari sani. In due pazienti che avevano EEG basale nella norma, il carico ha determinato un significativo rallentamento, tale da definire la presenza di EE di grado I. L'EEG del paziente che presentava alterazioni di grado I al basale non è cambiato in modo significativo. In media, i parametri spettrali dell'EEG non si sono modificati significativamente dopo COAA (**Tabella 4.4**).

Tabella 4.4. Valutazione psicometrica ed EEG di veglia nei volontari sani e in pazienti con cirrosi, prima e dopo COAA

		Volontari Sani		Pazienti con Cirrosi	
Variabile		Basale	Post COAA	Basale	Post COAA
Psicomетria	PHES (punteggio z)	4.2 (1.2)	3.4 (1.8)	1.6 (2.7)*	2.0 (2.7)
	Sternberg (punteggio z)	0.2 (0.9)	0.4 (1.3)	-1.0 (1.3)*	-0.8 (0.9)
EEG di veglia	MDF (Hz)	11.3 (1.7)	11.3 (1.2)	10.4 (2.0)	10.4 (1.6)
	Picco dominante	9.9 (0.2)	9.3 (1.5)	9.0 (0.9)*	8.9 (0.8)
	Potenza relativa theta (%)	11 (3)	11 (3)	20 (1)*	23 (1)

*P < 0.05.

COAA carico orale aminoacidi. MDF: mean dominant frequency.

4.4.4.3 Distribuzione potenza spettrale

In condizioni basali, la potenza spettrale dell'attività EEG dominante aveva una predominanza occipito-temporale sia nei pazienti che nei volontari sani (**Figura 4.9, A1 e B1**). Al basale, i pazienti avevano una potenza superiore rispetto a volontari sani nella maggior parte delle derivazioni ($p < 0.05$), fatta eccezione quelle molto posteriori (**Figura 4.9, A3**). Il COAA ha indotto un aumento significativo della potenza nella maggior parte delle derivazioni nei volontari sani ($p < 0.05$, **Figura 4.9 C1**), mentre nessuna modifica è stata osservata nella potenza dei pazienti (**Figura 4.9 C2**).

4.4.4.4 Distribuzione frequenza spettrale

Al basale, la frequenza dell'attività dominante era omogeneamente distribuita sullo scalpo, ed era più lenta nei pazienti rispetto ai volontari sani nella maggior parte delle derivazioni ($p < 0.05$, **Figura 4.10, A3**). Il COAA non ha modificato la frequenza dominante dei volontari sani (**Figura 4.10, C1**), mentre ha ulteriormente rallentato quella dei pazienti lungo la linea mediana antero-posteriore ($p < 0.05$, **Figura 4.10, C2**).

Nel paziente studiato in tre occasioni (**Figura 4.9 e 4.10, Case Report**), la potenza dell'attività EEG dominante è aumentata progressivamente dal basale, dopo COAA e dopo TIPS. L'inserimento della TIPS ha comportato inoltre una diminuzione della frequenza dominante su tutto il cuoio capelluto rispetto sia al COAA che al basale.

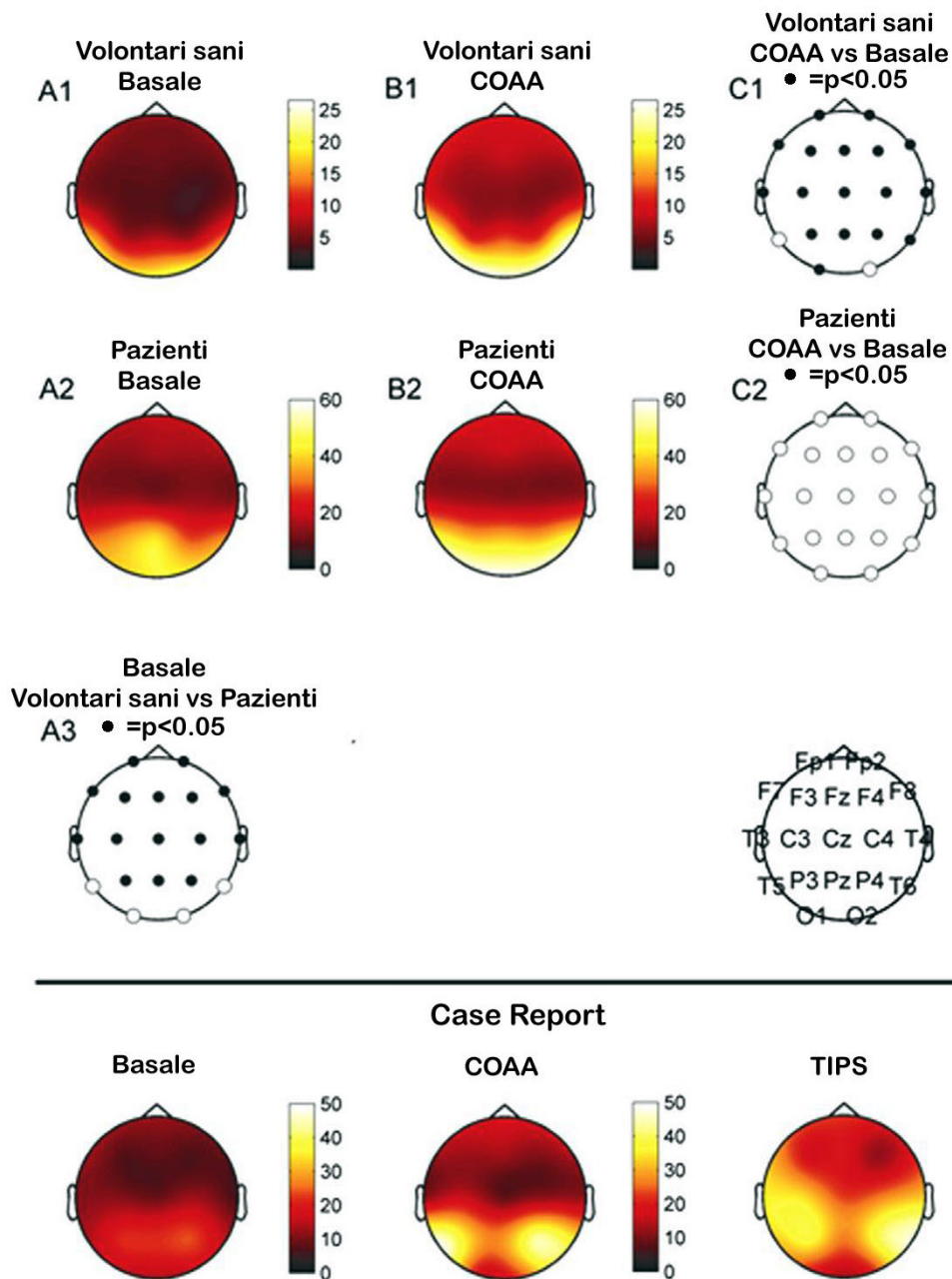
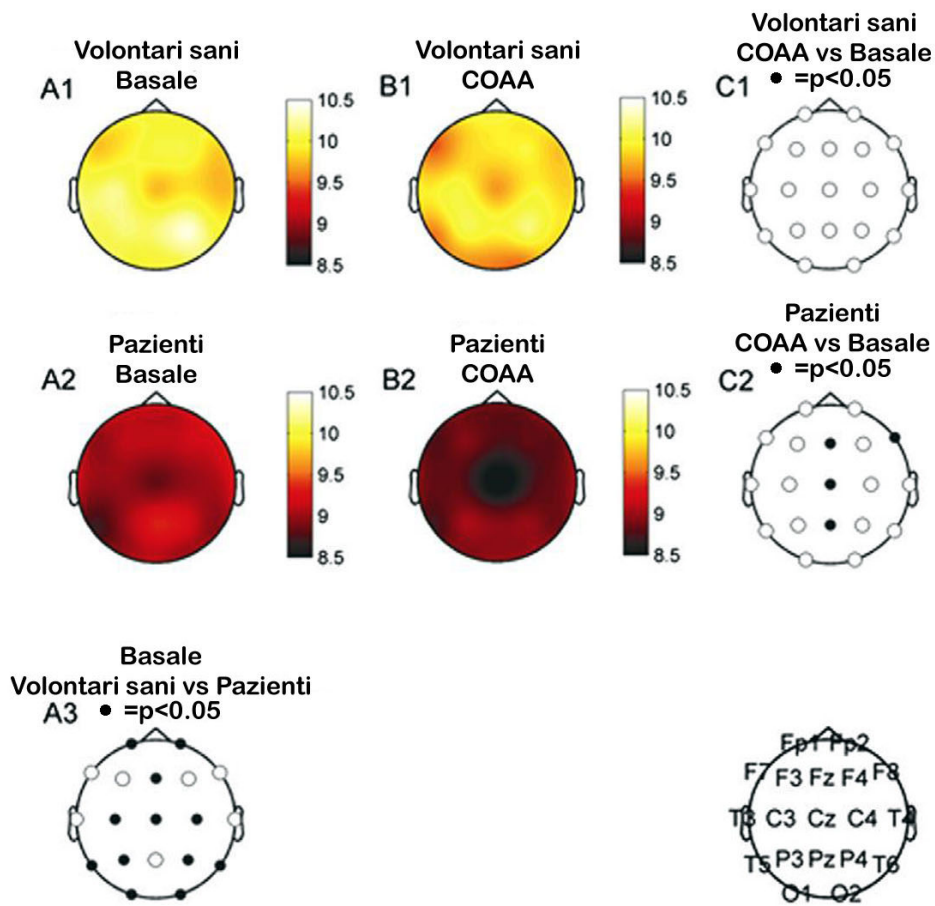


Figura 4.6 Topografia della potenza spettrale [μV^2] dell'attività EEG dominante. Al basale, la potenza ha una predominanza occipito-temporale sia nei volontari sani ($n = 10$, A1) che nei pazienti ($n = 9$, B1); i pazienti avevano una potenza maggiore in tutte le derivazioni tranne in quelle molto posteriori (A3). Il COAA ha determinato un aumento della potenza in quasi tutte le derivazioni nei volontari sani (B1, C1), mentre non ha influenzato la potenza dei pazienti (B2, C2). Case report: un progressivo aumento della potenza su tutto il cuoio capelluto è stata osservata dopo COAA e dopo TIPS, rispetto al basale.

Nota: le scale di colore sono diverse per le due popolazioni e per il case report



Case Report

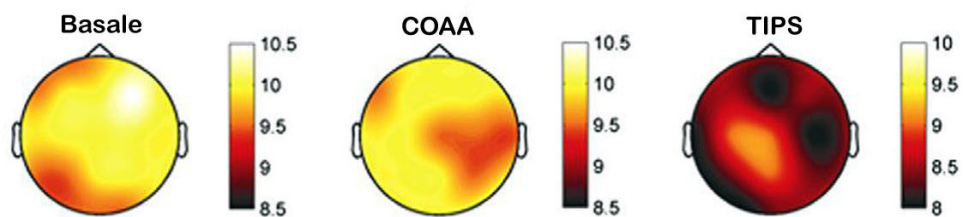


Figura 4.7 Topografia della frequenza [Hz] dell'attività EEG dominante. Al basale, la frequenza dominante era distribuita piuttosto omogeneamente sul cuoio capelluto ed era maggiore nei volontari sani ($n = 10$, A1) rispetto ai pazienti ($n = 9$, A2) nella maggior parte delle derivazioni (A3). Il COAA non ha modificato la frequenza dominante dei volontari sani (B1, C1), mentre ha rallentato quella dei pazienti lungo la linea mediana antero-posteriore e in F8 (B2, C2). Case report: l'inserimento della TIPS ha comportato una diminuzione della frequenza dominante su tutto il cuoio capelluto rispetto sia al COAA che al basale.

Nota: Le mappe del case report hanno una scala di colore diversa rispetto alle altre mappe.

4.5. DISCUSSIONE

Nel nostro studio il carico orale di aminoacidi mimanti un sanguinamento digestivo ha determinato il previsto aumento dei livelli ematici dell'ammonio e modifiche significative dell'EEG di veglia; per contro, il carico non ha determinato significativi cambiamenti sulla prestazione psicometrica.

4.5.1 Considerazioni generali

La popolazione di pazienti con cirrosi epatica reclutata per lo studio era costituita da individui in discreto compenso: sei pazienti erano in classe Child Pugh A e quattro in classe Child Pugh B, nessuno presentava EE conclamata o minima.

Nonostante ciò, è stata osservata una significativa riduzione della qualità di vita nei pazienti, soprattutto nella componente di salute fisica valutata con il questionario SF36. Questo dato riveste un'importanza anche maggiore se si considera che nessuno dei pazienti presentava una malattia scompensata.

Anche la prestazione neuropsichica basale, seppur entro i limiti di norma, era in media peggiore nei pazienti rispetto ad un gruppo di riferimento omogeneo per età e livello d'istruzione. Le differenze erano più evidenti per quel che riguarda i tempi di reazione; i pazienti con cirrosi quindi sembrano meno accurati ma soprattutto più lenti dei controlli sani, anche quando la malattia epatica non è avanzata ed anche in assenza di EE definita in base a criteri standard. Questi dati concordano con precedenti studi che hanno dimostrato come anche in pazienti cirrotici in condizioni stabili ci fossero alterazioni della prestazione neuropsicomotoria e dei tempi di reazione [9, 76, 151]. Anche il riscontro di un rallentamento elettroencefalografico nei pazienti in condizioni basali, non tale da definire un quadro di EE, concorda con precedenti lavori [9, 127].

Nessuno dei partecipanti allo studio aveva insufficienza renale e la valutazione nutrizionale specialistica ha escluso la presenza di malnutrizione e/o sarcopenia.

4.5.2 Effetti dell'iperammoniemia indotta

Nel presente studio, la somministrazione orale di aminoacidi mimante l'emoglobina ha determinato incrementi plasmatici dei livelli di ammonio, con un picco a circa 180min in entrambi i gruppi studiati. Nei pazienti con cirrosi tuttavia, la ridotta funzione epatica, seppure solo lieve-moderata, ha determinato oltre che un'elevazione più precoce dell'ammoniemia, la presenza di un picco più elevato e più prolungato. Quest'ultimo dato è verosimilmente sottostimato in quanto il limite massimo di ammoniemia rilevabile con l'Ammonia Checker è di 400µg/dL e in tre pazienti si sono avuti valori di ammoniemia massimali per 3-4 ore consecutive, suggerendo la presenza di un picco non rilevabile > 400µg/dL. Questi dati sono in buona parte sovrapponibili con quelli dello studio di Douglass *et al.*, a cui abbiamo fatto riferimento per il dosaggio e la composizione del carico. Il picco dell'ammoniemia nei pazienti, che nel nostro studio avviene a circa 180 min e contemporaneamente a quello dei volontari sani, nello studio inglese era rilevato a 120 min; questa differenza può essere in parte dovuta al fatto che nello studio inglese i pazienti presentavano insufficienza epatica in media più severa (56% Child B e il 32% Child C), e/o per il fatto che misurazioni orarie di ammoniaca possono essere insufficienti per una definizione accurata del tempo di picco.

Inoltre, il dato che la diminuzione dell'ammoniaca dopo il picco è stata più ripida nei volontari sani, è in accordo con le nozioni che: (1) l'iperammoniemia dopo COAA è in gran parte dovuta all'assorbimento/ossidazione degli aminoacidi, (2) l'ammoniaca è una molecola ad alta estrazione, che viene eliminata dal fegato in maniera flusso-dipendente; si spiega così la clearance ridotta nei pazienti.

Il carico non ha causato significative modifiche della prestazione psicometrica né nei pazienti né nei volontari sani. Per contro, il carico ha determinato un rallentamento dell'EEG nei pazienti con comparsa di EE minima nel 20%. Questi dati sono in linea con quanto riportato in alcuni degli studi su carichi di aminoacidi mimanti l'emoglobina [4, 65], che osservavano un incremento delle attività lente all'EEG, espresse come rapporto $(\theta + \delta) / (\alpha + \beta)$, senza evidenti influenze sui test psicometrici. La diversa 'sensibilità' tra psicometria ed EEG osservata nel nostro studio concorda con quello di Douglass, che mostrava come il TMT A risultasse

efficace nel distinguere alterazioni croniche basali, ma poco sensibile a cambiamenti rapidi (post-carico). Inoltre, i restrittivi ma necessari criteri di esclusione possono aver portato alla selezione di un gruppo di soggetti che non era particolarmente incline a sviluppare anomalie neuropsichiche, e infatti ha ottenuto un'ottima performance alle prestazioni psicometrica nonostante i livelli di ammoniemia leggermente aumentati. Infine, come è stato recentemente suggerito, l'EEG e le alterazioni psicometriche associate a EE possono avere diversi correlati biochimici, il primo essendo più legato all'aumento delle concentrazioni di neurotossine di origine intestinale, l'ultimo ad attivazione di cascata infiammatoria [126].

Inoltre, i risultati sulla distribuzione topografica della potenza e della frequenza dei ritmi EEG suggeriscono che l'iperammoniemia possa avere effetti diversi sull'EEG di veglia in relazione non solo dei livelli, ma anche dell'andamento delle concentrazioni dell'ammoniaca. Un'iperammoniemia moderata cronica (pazienti al basale) o acuta (volontari sani dopo AAC) si traduce in una maggiore potenza del ritmo dominante dell'EEG, soprattutto sulle zone centrali e posteriori del cuoio capelluto. Un'iperammoniemia più elevata, o 'acuta su cronica' (pazienti dopo AAC; case report dopo TIPS) risulta rallentare la frequenza dominante dell'EEG. I cambiamenti nella potenza dominante dell'EEG sono stati sporadicamente segnalati in pazienti con cirrosi [127, 170], ma essi non sono utilizzati per la diagnosi neurofisiologica di EE, che si basa principalmente sul rilevamento visuale o automatizzato del rallentamento della frequenza [77]. L'osservazione che, prima del suo effetto sulla frequenza EEG, l'iperammoniemia incide sulla potenza dell'EEG, cioè sull'ampiezza dell'attività dominante, suggerisce che l'EEG di veglia è più sensibile ai livelli di ammoniaca di quanto si pensasse. Potrebbe essere utile quindi pensare a parametri basati anche sulla potenza dell'EEG per la definizione neurofisiologica di EE.

È nota la presenza di cambiamenti nella potenza EEG lungo la linea mediana antero-posteriore, simili a quelli osservati in questo studio, all'esordio del sonno [59]; questi riscontri, che sostengono la tesi che il sonno possa iniziare in tempi diversi in aree cerebrali diverse [137], forse spiegano anche le discrepanze tra le definizioni comportamentali (ad esempio cessazione/rallentamento delle risposte) e quelle basate sull'EEG dell'insorgenza di sonno [59].

È interessante notare che ci sono analogie comportamentali tra la transizione veglia-sonno e l'EE, che è caratterizzata da sonnolenza/letargia e diminuita reattività agli stimoli esterni [11]. Inoltre, gli effetti neurofisiologici e comportamentali della iperammoniemia/EE non necessariamente coincidono (sovrappongono), soprattutto se l'iperammoniemia/EE è di lieve entità [11, 126].

Un ultimo interessante aspetto dei nostri studi è l'effetto neurofisiologico dell'iperammoniemia nei volontari sani. Nei soggetti sani, l'iperammoniemia può verificarsi a seguito di esercizio fisico intenso, e i suoi livelli possono anche superare quelli misurati nei pazienti con cirrosi [66]. I nostri dati supportano l'ipotesi che l'iperammoniemia indotta da esercizio fisico può influenzare la funzione cerebrale e che la fatica da esercizio fisico potrebbe essere mediata, almeno in parte, da meccanismi cerebrali [202].

5. EFFETTO DELLA IPERAMMONIEMIA SULLA SONNOLENZA E SU EEG DI SONNO. STUDIO 2.

5.1 INTRODUZIONE

Disturbi del sonno-veglia sono comuni nei pazienti con cirrosi e sono stati tradizionalmente associati con l'encefalopatia epatica (EE). Dati più recenti sembrano indicare che la sonnolenza diurna sia parte dello spettro EE, mentre i disturbi del sonno notturno possono avere una fisiopatologia diversa [16]. Questa distinzione ha implicazioni importanti in termini di diagnosi/gestione tanto dell'EE che dell'insonnia in questi pazienti.

Le informazioni disponibili sulle caratteristiche elettroencefalografiche del sonno in pazienti con cirrosi sono limitate. I più grandi studi risalgono al 1970 e sono stati condotti in pazienti scompensati con EE grave e conclamata; questi studi hanno rilevato correlazioni tra la gravità clinica dell'encefalopatia e il grado di alterazione architettónica del sonno.

La transizione tra la veglia e il sonno, come pure le transizioni tra sonno REM (rapid eye movement) e non-REM, hanno caratteristiche elettroencefalografiche ben definite. Il sonno non-REM è diviso in fasi da 1 a 4, dove le fasi 3 e 4 rappresentano sonno profondo. Lo stadio 1 non-REM è considerato uno stato di transizione tra la veglia e il sonno. Lo stadio 2 non-REM è caratterizzato da complessi K e fusi del sonno, mentre le fasi 3 e 4 (o sonno ad onde lente) sono dominate da onde di alta ampiezza e bassa frequenza (onde delta). L'attività delta (potenza tra 0,75-4,5 Hz dello spettro EEG) durante il sonno non-REM è un indicatore affidabile dell'omeostasi del sonno, che riflette l'effetto della storia di sonno/veglia sulla propensione al sonno: attività delta aumenta in funzione della durata della veglia precedente e si riduce con il dissiparsi del sonno [1, 154].

Brevi registrazioni EEG del sonno di 90-120 minuti, o studi "pisolino", sono più facili da eseguire rispetto alla polisonnografia dell'intera notte, soprattutto in ambito clinico. I "pisolini" hanno dimostrato riflettere accuratamente il livello attuale di pressione omeostatica del sonno, che si accumula durante il periodo di veglia. Inoltre, i sonnellini delle ore più tarde del giorno sono caratterizzati da

un livello superiore di pressione del sonno, e quindi una maggiore quantità di onde lente [200]. I protocolli con sonnellini ripetuti richiedono orari regolari del ritmo sonno-veglia prima e durante gli studi clinici, quindi solo soggetti clinicamente stabili possono essere inclusi.

Gli scopi del presente studio sono:

- testare l'ipotesi che un carico di ammoniaca aumenti la sonnolenza diurna soggettiva in pazienti con cirrosi,
- stabilire se l'iperammoniemia indotta/aumentata sonnolenza diurna incide sulle EEG, in particolare sull'attività ad onde lente, registrato durante il successivo episodio di sonno.

5.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio è stato condotto in parallelo con il precedente, ha utilizzato gli stessi soggetti, ai quali venivano anche consegnati questionari e diari del sonno ed applicato un actigrafo. Al soggetto veniva chiesto di mantenere un ritmo sonno-veglia regolare ed assumere quantità abituali di caffeina, the ed alcool. Al quarto e all'ottavo giorno del periodo di studio sono state eseguite, oltre alla valutazione neuropsichica completa ed EEG di veglia, un EEG di sonno nel pomeriggio tra le 17 e le 19 (**Figura 3.1**). Alle ore 7 del quarto o dell'ottavo giorno, secondo un'assegnazione randomizzata, il soggetto ha assunto a domicilio il carico orale di aminoacidi. Sei pazienti (60%) e cinque volontari sani (50%) hanno effettuato prima la valutazione post-carico (4° giorno) e quindi la valutazione basale (8° giorno). Il giorno del carico il paziente ha eseguito una misurazione oraria dell'ammoniemia e della sonnolenza.

La durata complessiva delle valutazioni eseguite in quarta ed ottava giornata era di circa 10 ore.

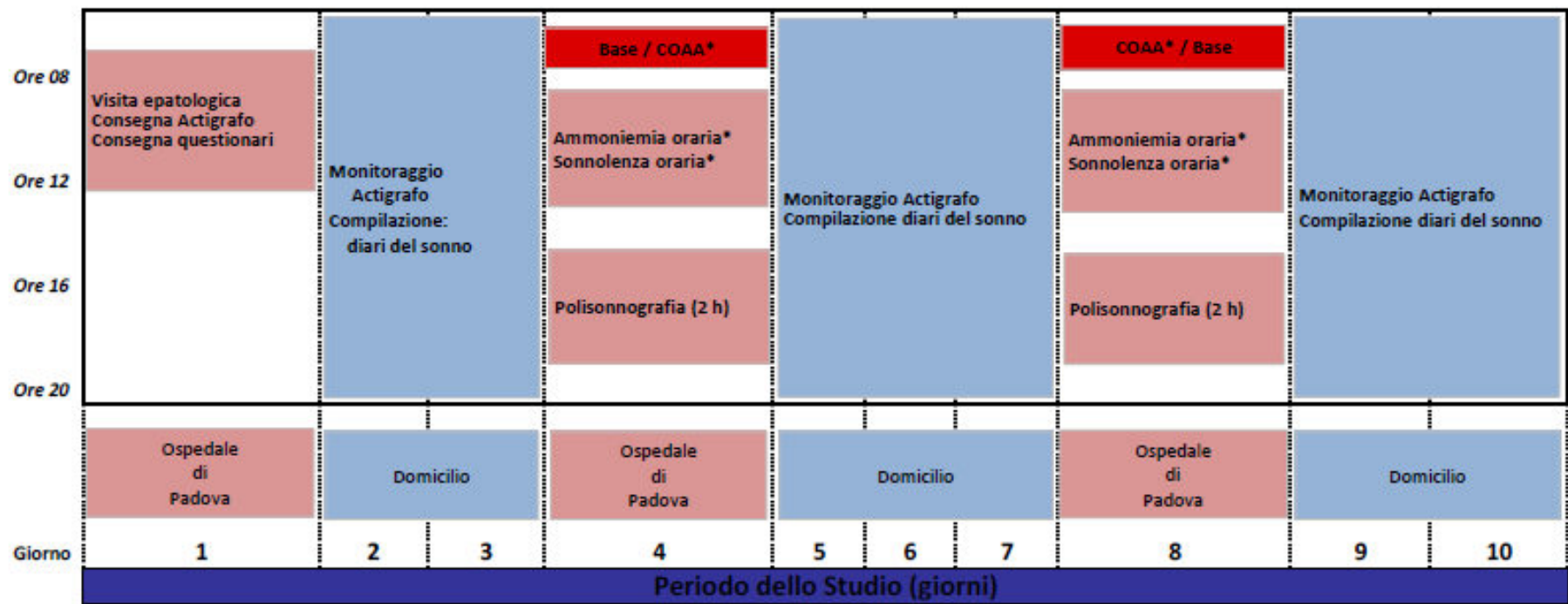


Figura 5.1. Schema riassuntivo del disegno di studio 2.

COAA: Carico Orale AminoAcidi

5.3 MATERIALI E METODI

Di seguito verranno descritti i materiali e metodi specifici per questo studio. Per i restanti si fa riferimento a quanto descritto nella “METOLOGIA GENERALE” e nei “MATERIALI E METODI” dello studio 1.

Si ricorda inoltre che i criteri d'esclusione allo studio prevedevano anche:

- assunzione di farmaci psicoattivi, ipnoinducanti o con effetti noti sul ritmo circadiano;
- viaggi in più di due fusi orari nei precedenti 3 mesi o lavoro a turni nei precedenti 5 anni.

5.3.1 Valutazione del sonno

5.3.1.1 Questionari del sonno

Ai partecipanti allo studio veniva chiesto di completare i seguenti questionari autosomministrati:

- ***Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)*** [46], usato per stimare la qualità del sonno nell'ultimo mese e per differenziare tra sonno 'buono' e 'scadente'. Dalle risposte ad 11 domande si generano sette componenti, ognuna con un punteggio da 0 a 3, dove 3 indica l'estremo negativo. Il punteggio delle componenti viene quindi sommato e si ottiene il punteggio PSQI totale (range: 0-21); un valore >5 identifica una qualità di sonno 'scadente'.
- ***Epworth Sleepiness Scale (ESS)*** [93]. Questa scala si usa per valutare la sonnolenza diurna. I soggetti stimano la loro probabilità di assopirsi in otto differenti situazioni (ad esempio guardando la TV), su una scala che va da 0 (improbabile) a 3 (molto probabile). Il punteggio finale è dato dalla somma dei singoli otto punteggi e varia da 0 a 24; un valore ≥ 11 è considerato indicativo di sonnolenza diurna eccessiva [94].
- ***Horne-Östberg (HÖ) questionario*** [85], usato per definire la preferenza diurna, classificando i soggetti come *decisamente mattinieri* (punteggio 70-86), *moderatamente mattinieri* (59-69), *intermedi* (42-58), *moderatamente nottambuli* (31-41) e *decisamente nottambuli* (16-30).

5.3.1.2 Diari del sonno

Tutti i partecipanti allo studio hanno compilato per i tre giorni precedenti e nei giorni dello studio i diari del sonno, in cui sono stati annotati: l'orario in cui andavano a letto, l'orario in cui provavano a dormire, l'orario in cui si addormentavano, l'orario del risveglio, l'orario in cui si erano alzati, il numero di risvegli notturni ed il numero di riposi durante il giorno [112]. Veniva inoltre segnata la qualità del sonno della notte trascorsa con un punteggio da 1 (ottima) a 9 (pessima) (**Figura 3.2**).

Diario del Sonno	
Data	_____
	<i>(Esempio formato data: notte 24/25 Giugno 2009)</i>
Questa tabella deve essere compilata ogni mattina.	
A che ora sei andato a letto?	
A che ora hai cominciato a provare a dormire?	
Quanto ci hai messo ad addormentarti? (minuti)	
Quante volte ti sei svegliato?	
Quanto sei rimasto sveglio? (minuti). Per favore, prova a stimare ora e durata di ciascun risveglio notturno.	
A che ora ti sei svegliato la mattina?	
A che ora ti sei alzato?	
Come definiresti la qualità del tuo sonno durante la notte appena passata?	
1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Ottima	Pessima
Questa tabella deve essere compilata dopo ogni pisolino diurno.	
A che ora è cominciato il pisolino?	
A che ora è finito il pisolino?	
Quanto è durato il pisolino? (minuti)	

Figura 5.2 Diario del sonno. Il soggetto ogni mattina compila il diario del sonno con gli orari e la qualità del sonno riguardante l'ultima notte trascorsa ed indica eventualmente l'orario e la durata del riposo diurno.

5.3.1.3 Actigrafo

Un actigrafo è uno strumento che registra il movimento tramite un accelerometro; ha le dimensioni di un orologio da polso e può essere indossato senza interferire con le attività quotidiane. Nel nostro studio i pazienti hanno indossato un Sensewear® Armband (Sensormedics Italia Srl, Milano) (**Figura 3.3**) sul braccio non dominante per tutta la durata dello studio, rimuovendolo solo durante la doccia ed il bagno. Le informazioni sull'*ora in cui si cerca di dormire* e *ora del risveglio* sono state ottenute dai corrispondenti diari del sonno. Le altre informazioni quantitative sono ottenute da un programma che calcola i seguenti indici: *tempo del sonno effettivo* (durata in ore), *latenza del sonno* (tempo per addormentarsi), *efficienza del sonno* $\{100 \times [\text{durata del sonno effettivo} / (\text{ora del rialzo dal letto} - \text{ora in cui si cerca di dormire})]\}$, *tempo immobile* (percentuale del tempo tra il tentativo di iniziare a dormire e il risveglio), *attività notturna* (numero totale di attività tra il tentativo per addormentarsi e il risveglio) e *indice di frammentazione* (la somma della percentuale del tempo in movimento e della percentuale delle fasi immobili della durata di 1 min) [17].

L'efficienza del sonno è stata usata come parametro sommario degli indici ottenuti con l'actigrafo.

5.3.1.4 Sonnolenza

Per valutare la sonnolenza è stata usata la **Karolinska Sleepness Scale (KSS)** [3], una scala validata autosomministrata di sonnolenza soggettiva. Il soggetto deve indicare su una scala da 1 (*molto sveglio*) a 9 (*molto sonnolento, molta fatica a stare sveglio*) il suo grado di sonnolenza negli ultimi 10min.

La scala veniva compilata con una frequenza oraria per 12 ore, in ospedale nei giorni in cui il partecipante eseguiva lo studio e a domicilio, in un giorno a scelta escluso il fine settimana.

È stato poi calcolato l'incremento di sonnolenza (incremento KSS) sottraendo il valore di KSS in condizioni basali dal valore di KSS il giorno del carico, alla stessa ora.

5.3.3 EEG di sonno

L'EEG di sonno è stata eseguita con brevi registrazioni dell'EEG del sonno di 90-120 minuti, o studi "pisolino" (naps). Gli studi pisolino, che sono più facili da eseguire rispetto alla registrazione polisonnografica dell'intera notte, soprattutto in ambito clinico, riflettono accuratamente il livello di pressione omeostatica del sonno, che si accumula durante il periodo di veglia [100]. Inoltre, naps registrati tardi durante il giorno sono caratterizzati da un livello superiore di pressione omeostatica del sonno ed una maggiore quantità di onde lente [200].

Protocolli che utilizzano i naps richiedono orari regolari di sonno-veglia prima e durante lo studio, quindi solo soggetti clinicamente stabili possono essere inclusi.

La registrazione nap è stata eseguita tra le 17:00 e le 19:00, quindi dopo un congruo numero di ore di veglia, in condizioni ambientali favorevoli (stanza buia ed isolata). L'EEG è stato registrato come descritto in precedenza; contemporaneamente si sono eseguite registrazioni dell'elettromiografia (elettrodi sottomentonieri e oculari) e dell'elettrocardiogramma. L'impedenza di ciascun elettrodo è stata mantenuta sotto i 5k Ω .

L'analisi dell'EEG del sonno è stata eseguita in collaborazione con l'Istituto di Farmacologia e Tossicologia dell'Università di Zurigo, Svizzera (Professor Achermann, Dr.ssa Bersagliere), centro di eccellenza per la caratterizzazione dei disturbi del sonno, in particolare delle caratteristiche elettrofisiologiche della

regolazione del sonno omeostatico. La collaborazione è attiva da oltre un anno ed è operativo un sistema per il trasferimento diretto server-server dei dati elettrofisiologici, in cieco. L'EEG di sonno è stato analizzato visivamente su epoche da 20 s (derivazioni C3-A2) in base a criteri standard (Rembrandt Analysis Manager, v. 8; Embla Systems, Broomfield, CO) da uno degli autori che non aveva informazioni sul soggetto e sulla condizione sperimentale.

Sono stati selezionati episodi di sonno non-REM stadio 2 + stadio 3-4 (sonno ad onde lente) di durata minima comune a tutti i soggetti nelle due condizini sperimentali (lunghezza minima 8 minuti) per la successiva analisi spettrale. Sono stati quindi calcolati spettri di potenza mediante la Fast Fourier Transform (2 secondi epoche, finestra Hanning, frequenza risoluzione 0,5 Hz).

Gli artefatti sono stati identificati mediante ispezione visiva o ogniqualvolta la potenza delta superava la soglia specificata del soggetto .

5.3.4 Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm DS, salvo diversamente specificato.

La distribuzione delle variabili è stata valutata mediante prova la Shapiro-Wilks e i confronti tra gruppi è stato eseguito utilizzando il test t di Student o il test U di Mann-Whitney, a seconda dei casi.

Il confronto tra variabili pre- e post-COAA è stato eseguito mediante analisi della varianza (ANOVA) a misure ripetute, utilizzando la variabile volontari sani rispetto a pazienti come un fattore di "gruppo". Spettri di potenza EEG di sonno medio Log-trasformati sono stati analizzati con il modello misto lineare ANOVA. Sono stati testati il fattore gruppo (pazienti rispetto volontari sani) e condizione (AAC rispetto al basale), così come la loro interazione. Ogni volta che la condizione di fattore o la loro l'interazione sono risultati significativi, è stato eseguito un test t di student per dati appaiati post-hoc . Sono state eseguite le analisi statistiche con SAS 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC) e Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK).

5.4 RISULTATI

5.4.1 Qualità sonno

La qualità e gli orari del sonno, la preferenza diurna e la sonnolenza diurna non sono risultati significativamente diversi nei pazienti e nei volontari sani (**Tabella 5.1**).

Tabella 5.1 Valutazione della qualità e orari del sonno nei pazienti e nei volontari sani.

Dominio	Strumenti	Pazienti	Volontari sani
Sonnolenza	ESS	4.4±3.1	5.2±1.9
Insonnia	PSQI	5.3±2.7	6.3±3.8
Preferenza diurna	HO	58.1±8.1	57.9±11.6
Orari abituali del sonno	Diari del sonno		
	- Ora di coricamento	24:06±1.30	23.30±1.06
	- Ora di tentativo di addormentarsi	24.30±1.18	23.42±1.06
	- Ora dell'addormentamento	24.42±1.24	24±1.06
	- Ora del risveglio	7.15±1.18	7±0.54
	- Ora di alzarsi dal letto	7.24±1.24	7.24±0.54
	- Tempo per addormentarsi (min)	10±6.7	13.4±0.2
- Risvegli (n)	1.1±0.7	1.2±1.2	
Actigrafia	Efficienza del sonno (%)	68.5±15.9	81.0±9.0

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

L'efficienza del sonno stimata con l'actigrafo è risultata inferiore nei pazienti rispetto ai volontari sani (68,5±15,9 vs 81.0±9.0%; p=0.06) (**Figura 5.4**)

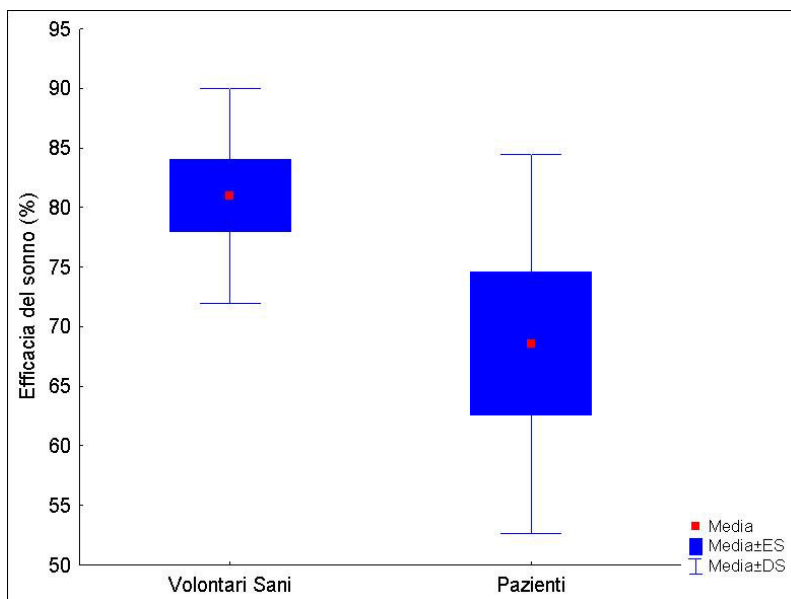


Figura 5.3 Efficienza del sonno nei volontari sani e nei pazienti. L'efficienza del sonno (sonno effettivo/tempo speso a letto) stimata con l'actigrafo è risultata minore nei pazienti rispetto ai volontari sani ($p=0.06$).

5.4.2 Sonnolenza soggettiva

Il COAA ha determinato un aumento della sonnolenza soggettiva stimata con la scala KSS, sia nei pazienti che nei volontari sani, rispetto ai valori di sonnolenza in condizione di pre-carico (**Figura 5.5, B e C**).

L'aumento della sonnolenza prodotto dal COAA ha presentato un andamento parallelo all'atteso aumento dell'ammoniemia ($p=0.04$), dato evidente sia nei pazienti che nei controlli (**Figura 5.5**).

In entrambi i gruppi alle ore 11 è presente un picco di sonnolenza soggettiva, non presente al basale, che coincide con il momento in cui l'ammoniaca ha raggiunto concentrazioni massime (**Figura 5.5**, barra grigia).

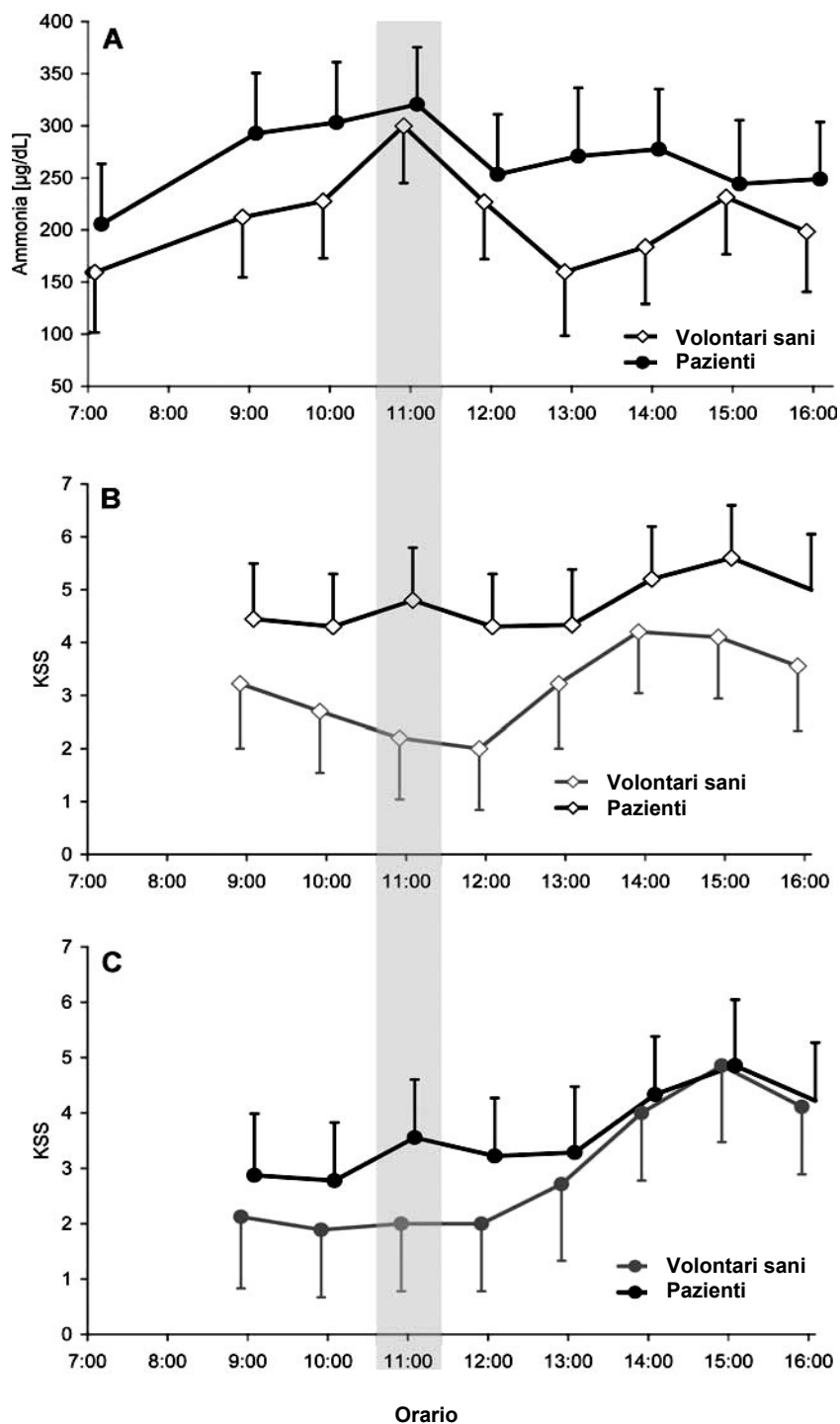


Figura 5.4 Ammoniemia oraria (A) nei volontari sani (linea nera, rombi bianchi) e nei pazienti con cirrosi (linea nera, cerchi neri). e sonnolenza soggettiva oraria nei volontari sani (B) e nei pazienti con cirrosi (C) al basale (linea grigia) e dopo COAA (linea nera). Il COAA ha comportato un aumento dei livelli di ammoniaca, che ha raggiunto il massimo a 4 ore dalla somministrazione in entrambi i gruppi. Inoltre, il COAA ha determinato la comparsa di un picco di sonnolenza soggettiva al mattino, che non era presente al basale, e coinciso con il picco di ammoniaca (barra verticale grigia di tutti i pannelli). KSS: Karolinska Sonnolenza Scala, COAA: carico orale aminoacido.

L'aumento della sonnolenza soggettiva dopo COAA era prominente nelle ore del mattino nei pazienti e durante tutta la valutazione nei volontari sani [tempo:

F = 6.0, p < 0.001; gruppo (pazienti rispetto volontari sani): F = 8.7, p < 0.001; condizione (COAA rispetto al basale): F = 36 , p < 0.001 ; condizione*gruppo F = 5.9, p = 0.02; **Figura 5.5 B, C**].

5.4.3 EEG di sonno-nap EEG

Otto volontari sani e otto pazienti hanno raggiunto il sonno non-REM stadi 2-4 durante il pisolino in entrambe le condizioni sperimentali, così l'analisi dell'EEG è stata limitata a questi soggetti.

In condizioni basali, i pazienti hanno dormito significativamente più a lungo dei volontari sani (51.0 ± 14.5 vs 30.4 ± 15.6 minuti; $p=0.002$; **Tabella 5.2**). Tuttavia, la lunghezza dei blocchi di sonno consolidato non-REM selezionato per l'analisi spettrale era comparabile nei due gruppi (**Tabella 5.2**). Gli spettri di potenza (1,5-25 Hz) del pisolino basale EEG erano comparabili nei pazienti e volontari sani [fattore gruppo (pazienti rispetto volontari sani) non significativo; **Figura 5.6**].

Tabella 5.2 EEG di sonno

Variabile		Volontari Sani		Pazienti con Cirrosi	
		Basale	Post COAA	Basale	Post COAA
EEG sonno	Sonno non-REM (min)	30.4 (15.6)	49.3 (26.6)†	51.0 (14.5)*	51.8 (34.9)
	Stadio 1 (min)	8.9 (6.8)	13.5 (11.8)	9.7 (4.2)	13.1 (10.8)
	Stadio 2 (min)	19.7 (10.0)	30.5 (17.3)	33.2 (13.1)*	30.8 (22.9)
	Stadio 3-4 (min)	4.7 (3.8)	10.6 (8.3)	12.9 (7.7)	20.7 (19.6)

*P < 0.05

†P = 0.08 trend di significatività.

Dopo il COAA, i volontari sani hanno mostrato una tendenza ad avere un sonno non-REM più lungo rispetto al basale (49.3 ± 26.6 vs 30.4 ± 15.6 minuti; $p=0.08$). I pazienti avevano durata comparabile di sonno non-REM nelle due condizioni sperimentali (51.8 ± 34.9 vs 51.0 ± 14.5 minuti; **Tabella 5.2**).

Nei volontari sani, il COAA ha determinato una significativa diminuzione dell'attività EEG tra 15 e 23 Hz (frequenza veloce). Al contrario, nei pazienti il COAA ha indotto una riduzione significativa dell'attività EEG tra 2 e 6,5 Hz

(delta, o sonno ad onde lente) (**Figura 5.6**).

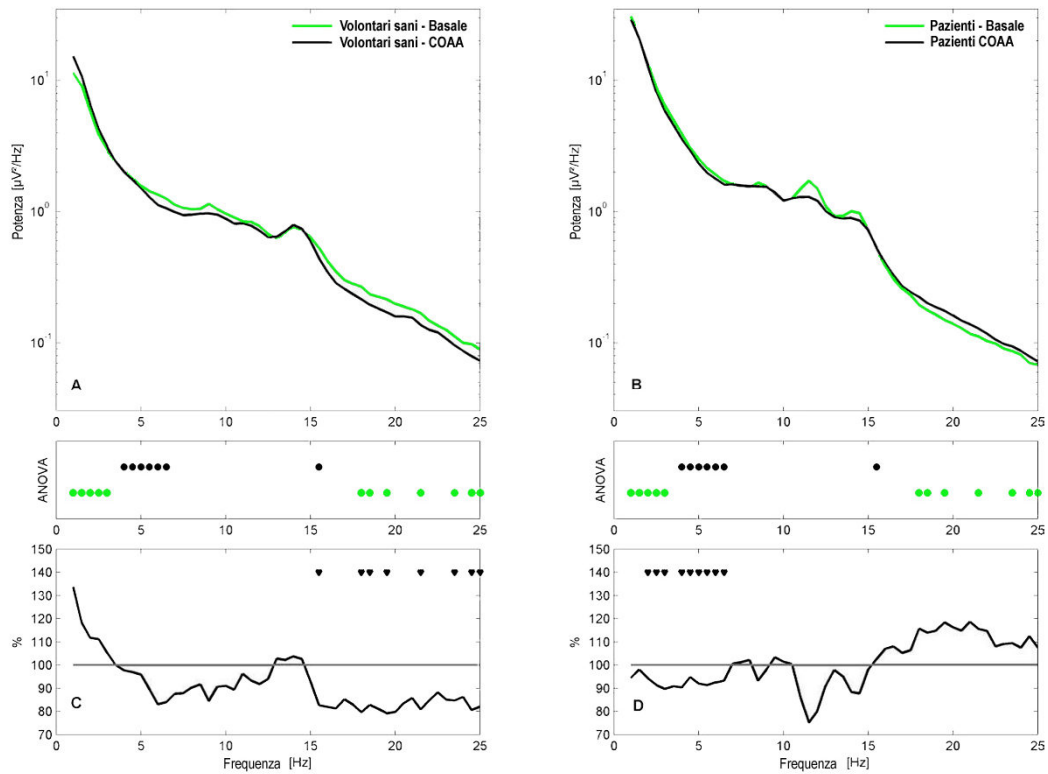


Figura 5.5 (A, B) Spettri di potenza del nap EEG in volontari sani (A) e in pazienti con cirrosi (B) al basale (linee grigie) e dopo COAA (linee verdi).

(C, D) Potenza relativa, dove la frequenza nap EEG dopo COAA (linea nera) viene espressa come percentuale del valore basale (linea grigia) in volontari sani (C) e nei pazienti con cirrosi (D).

I pannelli centrali indicano la significatività statistica: cerchi neri indicano una significatività del fattore condizione (COAA rispetto al basale), mentre cerchi verdi indicano una significatività dell'interazione gruppo (volontari sani rispetto ai pazienti) e condizione (COAA rispetto al basale).

Nei volontari sani (pannello A e C) il carico ha comportato una riduzione della potenza tra 16 e 25 (spettro ad attività veloce, triangoli neri: significatività del t test post-hoc) rispetto al basale.

Nei pazienti con cirrosi (pannello B e D), il carico ha comportato una riduzione di potenza tra 2 e 6.5 Hz (delta, triangoli neri: significativa del t test post-hoc).

COAA: carico orale di aminoacidi

5.5 DISCUSSIONE

Nel nostro studio il carico orale di aminoacidi mimanti un sanguinamento digestivo ha determinato un aumento della sonnolenza soggettiva e modifiche significative dell'EEG di sonno sia nei pazienti che nei volontari sani.

Per quanto riguarda il comportamento del sonno nei pazienti con cirrosi, il nostro studio ha riscontrato un ritardo generalizzato delle abitudini del sonno e, per quanto attiene alla qualità del sonno, una riduzione dell'efficienza stimata con l'actigrafia ed una prolungata latenza del sonno stimata con i diari. Questi risultati, pur presentando solo un trend di significatività, concordano con i lavori precedenti sulle abitudini/qualità del sonno dei pazienti con cirrosi [27, 52, 128, 136]. La mancanza di significatività statistica è verosimilmente ascrivibile alla bassa numerosità del campione e alla notevole selezione della popolazione.

Un dato molto interessante emerso dal presente studio è l'aumento della sonnolenza soggettiva nel post-carico rispetto ai valori basali in entrambi i gruppi. Il grado di sonnolenza soggettiva in corso di iperammoniemia non è stato mai quantificato in passato, nonostante la sonnolenza, a volte qualificata come letargia o come difetto di vigilanza, sia un tratto clinico tipico dell'EE. Questo studio mostra come un individuo abbia la capacità di definire con una certa precisione il grado della propria sonnolenza, il cui andamento temporale rispecchia sorprendentemente l'andamento dei livelli plasmatici dell'ammoniemia.

I risultati del nostro studio suggeriscono che la sonnolenza soggettiva può essere aumentata anche per livelli di ammoniaca che non comportano alterazioni neuropsichiatriche (vedi Studio 1). Questo nuovo riscontro ha implicazioni rilevanti sia teoriche, sostenendo il parallelismo fra encefalopatia e difetto di vigilanza (diminuzione dell'attivazione reticolo-corticale e delle afferenze cortico-reticolo-corticali già ipotizzate in diversi studi [127, 168]) che pratiche, introducendo la possibilità di usare la sonnolenza, un parametro la cui quantificazione soggettiva e oggettiva è ben definita [95], come misura surrogata di encefalopatia.

Le caratteristiche del nap-EEG in pazienti con cirrosi epatica ben compensata sono in gran parte sconosciuti; in questa piccola popolazione erano paragonabili a quelli di volontari sani, sebbene i pazienti tendono a

dormire più a lungo durante l'opportunità fornitagli di fare un pisolino. Questo può essere correlato agli aumentati livelli di ammoniemia osservati in condizione basale e/o aumento dei livelli di sonnolenza diurna, che sono stati descritti in questi individui, anche in associazione con alterati ritmi di melatonina.

Entrambi i gruppi hanno presentato un nap-EEG con caratteristiche simili in condizione basale, con capacità comparabile di generare attività delta, ed entrambi hanno riportato sonnolenza soggettiva dopo COAA.

Tuttavia, le registrazioni polisonnografiche hanno documentato alterazioni quantitative e qualitative dell'EEG di sonno post-carico anche maggiori di quelle attese. L'effetto del COAA sulla struttura del sonno e sul nap-EEG è stato diverso nei due gruppi; mentre nei volontari sani la sonnolenza si traduce in sonno NREM profondo (prolungamento della durata degli episodi di sonno, soppressione dell'attività veloce), nei pazienti l'effetto è opposto ed il sonno diventa più superficiale (riduzione della durata degli episodi di sonno e riduzione dell'attività delta). Questo non è il primo caso in cui la manipolazione del sonno/sonnolenza ha effetti opposti nei sani e nei malati. Ad esempio, la deprivazione di sonno in pazienti con disturbo bipolare e schizofrenia è una terapia standard per stabilizzarne l'umore [204]. Per contro, è noto come la deprivazione di sonno abbia effetti estremamente negativi sull'umore e sul benessere generale di individui sani.

Sonno e veglia hanno una regolazione omeostatica, e la capacità di generare sonno ristoratore dipende, in una certa misura, dalla qualità del periodo di veglia precedente (la necessità di dormire si 'accumula' man mano che aumentano le ore di veglia). Così, la potenza theta dell'EEG di veglia aumenta in funzione della durata di veglia, e l'aumento della propensione al sonno si riflette in un aumento dell'attività delta del sonno non-REM nell'EEG di sonno; in queste condizioni ottimali, i passaggi veglia-sonno e sonno-veglia sono veloci e il sistema neurotransmissoriale che li sottende funziona come un interruttore 'on-off' [172]. I pazienti con cirrosi epatica ed iperammoniemia hanno un EEG di veglia 'lento', con caratteristiche che a volte sono state avvicinate a quelle del dormiveglia [35, 127], cioè quando dovrebbero essere svegli e attivi sono in parte sonnolenti. Per contro, l'iperammoniemia superficializza il loro EEG di sonno, che è più veloce e non si associa a sonno

ristoratore. È possibile che nei pazienti con cirrosi e iperammoniemica/encefalopatica, che mostrano eccessiva sonnolenza diurna e un aumento cronico dell'attività theta dell'EEG di veglia, la vigilanza potrebbe essere un pò "inefficiente", compromettendo così l'accumulo della risposta omeostatica, e conseguente incapacità di generare un sonno profondo e riposante.

Pertanto, può essere ipotizzato che le strategie terapeutiche volte a ridurre la sonnolenza diurna possono anche portare ad un miglioramento nell'architettura del sonno notturno in questi pazienti.

In conclusione, in risposta al COAA si sono osservati profondi cambiamenti di parametri clinici (sonnolenza soggettiva) e dell'EEG del sonno, suggerendo che tali tecniche sono molto sensibili ai livelli di ammoniaca. Questi risultati hanno importanti implicazioni cliniche: (1) la sonnolenza soggettiva può essere un utile e facile indice di EE, (2) la correzione di una eccessiva sonnolenza diurna, sia con mezzi farmacologici che con strategie cronoterapeutiche, può anche tradursi in una migliore notte di sonno.

6. EFFETTI DI L-ORNITINA-L-ASPARTATO E CAFFEINA SU PRESTAZIONE COGNITIVA, EEG DI VEGLIA E SONNO IN CONDIZIONI DI IPERAMMONIEMIA INDOTTA. STUDIO 3.

6.1 INTRODUZIONE

Anche sulla base degli studi precedenti, questo studio pilota si proponeva di valutare, in un gruppo di pazienti con cirrosi epatica e un gruppo di volontari sani in condizioni di iperammoniemia indotta, gli effetti della somministrazione di L-ornitina-L-aspartato (LOLA) e di caffeina sulla:

1. prestazione cognitiva;
2. caratteristiche dell'elettroencefalogramma di veglia e di sonno;
3. sonnolenza soggettiva.

Il LOLA è il sale stabile di 2 aminoacidi (ornitina e acido aspartico), che stimola il ciclo dell'urea/sintesi della glutammina, riduce i livelli di ammoniemia e migliora la prestazione neuropsichica in pazienti con iperammoniemia ed EE [97, 98, 177, 178]. L'ipotesi è che, in corso di iperammoniemia indotta, il LOLA possa ridurre i livelli plasmatici di ammoniaca, riducendo anche la sonnolenza soggettiva e ripristinando l'accumulo della pressione omeostatica di sonno (**Figura 6.1**).

La Caffeina, o 1,3,7-trimethylxantina, è un antagonista recettoriale dell'adenosina rapidamente e completamente assorbito dopo ingestione orale; il suo metabolismo attraverso l'isoenzima 1A2 del citocromo P450 è sostanzialmente invariato in pazienti con cirrosi compensata [92, 173]. L'ipotesi è che, in corso di carico orale di aminoacidi, la caffeina possa contrastare gli effetti dell'iperammoniemia sull'elettroencefalogramma di veglia e, di conseguenza, su quello del sonno (**Figura 6.1**).

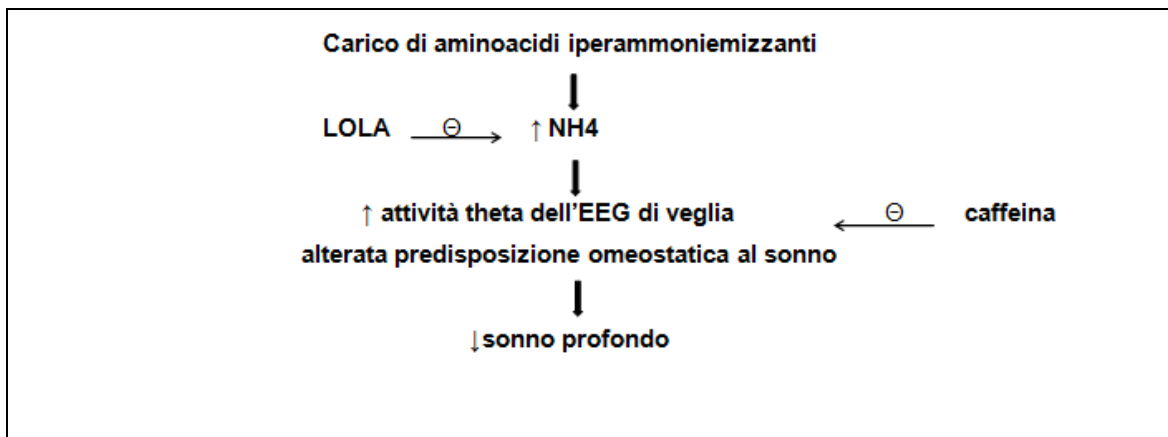


Figura 6.1. Ipotesi di meccanismi d'azione di LOLA e caffeina.

6.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Ogni studio individuale è stato condotto in un periodo di 18 giorni e si è svolto in due separate sedi: l'Ambulatorio per i Disturbi Cognitivi della Clinica Medica V (Policlinico Universitario di Padova) e il domicilio del partecipante allo studio (**Figura 6.2**).

Presso l'ospedale il soggetto ha eseguito un incontro preliminare per la spiegazione del protocollo di studio, la firma del consenso informato, la valutazione clinica e la consegna dei questionari e dei diari del sonno. Al soggetto veniva chiesto di mantenere un ritmo sonno-veglia regolare ed astenersi dall'assunzione di caffeina, the ed alcool.

Al quarto, 11° e 18° giorno del periodo di studio, cioè a distanza di 1 settimana l'uno dall'altro, sono state eseguite una valutazione neuropsichica completa ed EEG di veglia al mattino e nel pomeriggio ripetizione dell'EEG di veglia e tra le 17 e le 19 EEG di sonno (**Figura 6.2**). Alle ore 8 del quarto, 11° e 18° giorno, il soggetto ha assunto il carico orale di aminoacidi (COAA) e successiva misurazione oraria di sonnolenza ed ammoniemia capillare.

Nei predetti giorni di studio, dopo l'assunzione del COAA alle ore 8.00 e secondo un'assegnazione randomizzata, è stata iniziata infusione di 4 ore di 20 gr di LOLA/placebo e.v. e dopo 2 ore dal carico somministrazione per os di 200 mg di caffeina/placebo, secondo il profilo e la durata d'azione delle diverse sostanze (vedi parte Materiali e metodi per le specifiche modalità di somministrazione e dosaggi, pag 89).

La durata complessiva delle valutazioni eseguite in quarta, 11° e 18° giornata era di circa 10 ore.

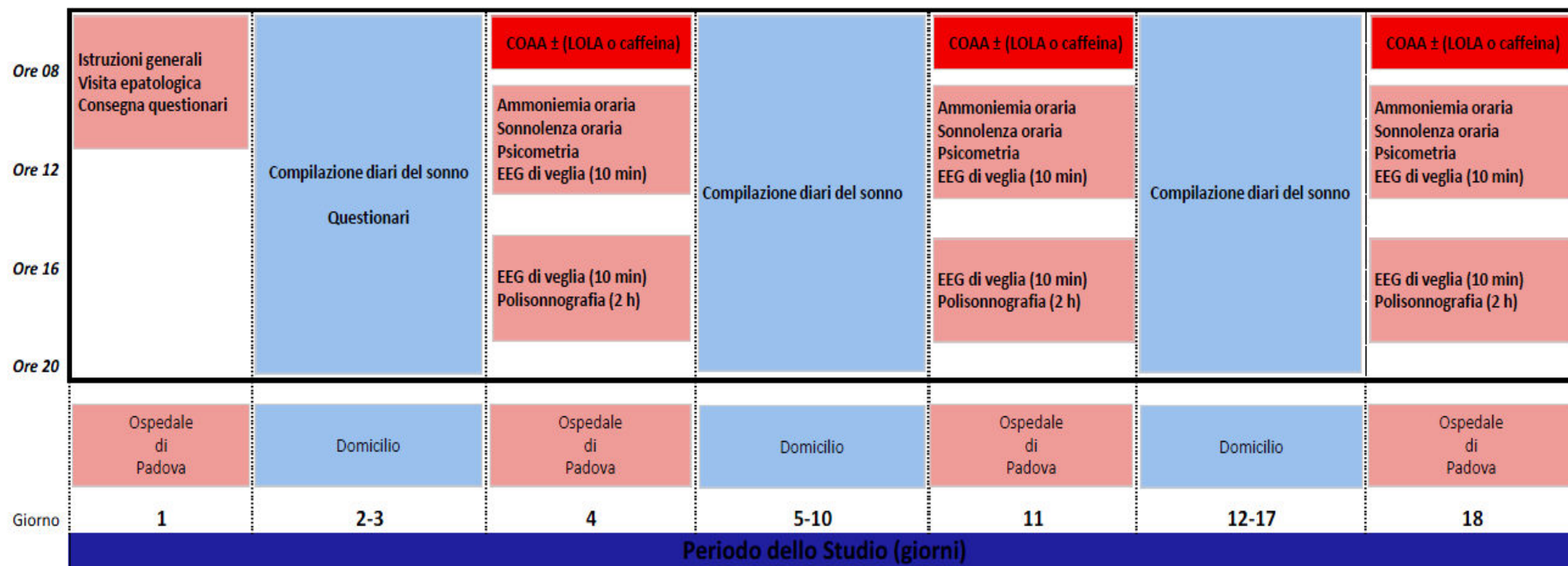


Figura 6.2. Schema riassuntivo del disegno di studio 3. Alle ore 8.00 dei giorni di studio (4°-11° e 18°) i soggetti assumevano il COAA per os, successiva infusione di 4 ore di 20 gr di LOLA (o placebo) e alle ore 10.00 assunzione di 200mg di caffeina (o placebo) per os. Venivano eseguite ammoniemia e sonnolenza oraria e valutazione psicomelica al mattino; nel pomeriggio alle ore 17 si eseguiva registrazione polisonnografica di 2 ore.

COAA: Carico Orale AminoAcidi. LOLA: L-ornitina L aspartato

6.3 MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno descritti i metodi specifici utilizzati in questo studio. Per tutte le descrizioni dei materiali e metodi in comune con i precedenti studi si rimanda al capitolo di metodologia generale e/o materiali e metodi dei precedenti studi.

6.3.1 Popolazione studiata

Per questo studio stati reclutati sei pazienti [cinque maschi (83%)] con età media di 61.4 anni [\pm 9.15 anni (50-71 anni)] affetti da cirrosi epatica ben compensata (Child-Pugh \leq B7) e senza EE conclamata.

La diagnosi di cirrosi epatica, l'eziologia della cirrosi, il grado di insufficienza epatica ed i criteri di esclusione sono stati definiti secondo le modalità già descritte nel capitolo di metodologia generale.

Nello stesso arco di tempo sono stati reclutati cinque volontari sani, [quattro maschi (80%)] con età media di 49,1 anni [\pm 11.8 anni (38-64)]. Nessuno aveva anamnesi positiva per abuso alcolico, epatopatie croniche o disturbi psichiatrici/neurologici. Nessuno assumeva alcolici al di sopra dei livelli raccomandati o farmaci psicoattivi, ipnoinducenti o con effetti noti sul ritmo circadiano. La comparabilità d'età e di genere tra pazienti e soggetti sani sarà assicurata arruolando prima i pazienti, e, mano a mano, volontari sani confrontabili per età e sesso.

6.3.2 Valutazione clinica

È stato eseguito un breve colloquio con i partecipanti allo studio per raccogliere la storia anamnestica, valutare i criteri d'esclusione, la compliance del soggetto e le condizioni cliniche generali dei pazienti.

6.3.3 Qualità di vita e valutazione del sonno

Ai partecipanti allo studio veniva chiesto di completare i seguenti questionari: **SF-36 (Short Form Health Profile), versione 1** [196] sulla qualità del sonno, **Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)** [46], sulla stima della qualità del

sonno, **Epworth Sleepiness Scale (ESS)** [93], sulla valutazione della sonnolenza diurna e **Horne-Östberg (HÖ) questionario** [85] usato per definire la preferenza diurna.

Ai soggetti inoltre veniva chiesto di compilare per i 18 giorni consecutivi i diari del sonno.

6.3.4 Sonnolenza

Per valutare la sonnolenza è stata usata la **Karolinska Sleepiness Scale (KSS)** [3], compilata con una frequenza oraria per 10 ore durante i tre giorni di studio.

6.3.5 Valutazione neuropsicologica

Al soggetto veniva somministrato la batteria di test psicometrici carta e matita che compongono la PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) [199]. e il test SCAN computerizzato [9].

Le valutazioni neuropsicologiche sono state ripetute nei tre giorni di studio.

6.3.6 Valutazione elettrofisiologica

Comprendente la registrazione dell'EEG di veglia, secondo le modalità già descritte, al mattino ore 12 (presunto picco delle sostanze somministrate) e nel pomeriggio, subito prima della registrazione dell'EEG di sonno-nap EEG, che avveniva tra le ore 17-19.

Le valutazioni elettrofisiologiche sono state ripetute nei tre giorni di studio.

6.3.7 Carico di aminoacidi

Ogni partecipante allo studio ha assunto alle ore 8 del quarto, 11° e 18° giorno, il carico orale di aminoacidi (COAA).

La miscela di aminoacidi è stata ben tollerata: un paziente (17%) e due controlli (20%) hanno lamentato nausea.

6.3.8 Ammoniemia

L'ammoniemia basale a digiuno e oraria per 10 ore è stata misurata in ogni soggetto durante i giorni di studio, utilizzando l'Ammonia Checker (Menarini Diagnostics, Firenze).

6.3.9 L-ornitina-L- aspartato (LOLA)

Secondo una randomizzazione casuale, in uno dei 3 giorni di studio (quarto o 11° o 18°) al soggetto è stata somministrata L-ornitina-L-aspartato, sale stabile di due aminoacidi (ornitina e aspartato) 20 g (quattro fiale da 10 ml ciascuno in 500cc di soluzione fisiologica) in infusione endovenosa alla velocità di 5g/h [97], per una durata complessiva di 4 ore, dalle ore 8 alle ore 12.

Nei restanti giorni di studio, è stato somministrato placebo (soluzione fisiologica 500cc) in infusione endovenosa per 4 ore.

Il farmaco è stato discretamente tollerato dai soggetti, causando nausea in un paziente e in un volontario sano e vomito in un paziente e un volontario sano.

Si segnala possibile accentuazione degli effetti collaterali gastrointestinali in quanto in comune con il COAA.

6.3.10 Caffaina

Secondo una randomizzazione casuale, in uno dei 3 giorni di studio (quarto o 11° o 18°) al soggetto è stata somministrata caffeina per os (200 mg di caffè-due caffè espresso) [107], alle ore 10, quindi a 2 ore di distanza dalla somministrazione di COAA.

La Caffaina, o 1,3,7-trimethylxantina, è un antagonista recettoriale dell'adenosina rapidamente e completamente assorbito dopo ingestione orale; il suo metabolismo attraverso l'isoenzima 1A2 del citocromo P450 è sostanzialmente invariato in pazienti con cirrosi compensata [92, 173]. Si ricorda che erano esclusi pazienti con storia aritmie, palpitazioni, distiroidismo per evitare effetti collaterali simpaticomimetici e/o interazioni farmacologiche.

Nei restanti giorni di studio, alla stessa ora, il paziente ha assunto per os uno stesso volume di caffè decaffeinato.

6.3.11 Analisi statistica

I dati sono espressi come media±deviazione standard, se non altrimenti specificato. La distribuzione delle variabili è stata studiata con il test di normalità di Shapiro-Wilks. I confronti tra gruppi sono stati effettuati con il test t-student/ANOVA a una via per variabili distribuite normalmente, con il test U di Mann-Whitney/ANOVA di Kruskal-Wallis per variabili distribuite non normalmente.

I confronti tra il pre- (CAA) e post-trattamento (CAA + LOLA/caffeina) della sonnolenza e della durata del sonno saranno eseguiti con analisi della varianza con disegno cross-over, utilizzando i confronti CAA vs. CAA più LOLA/caffeina come fattore 'condizione' e i confronti volontari sani vs. pazienti come fattore 'gruppo'. La composizione spettrale dell'EEG di sonno sarà analizzata con un'ANOVA a modelli misti. Saranno testati il fattore 'gruppo' e 'condizione', nonché la loro interazione. Ogni volta che la condizione di fattore o l'interazione risulteranno significative, sarà eseguito un post-hoc t-test per dati appaiati.

La numerosità prevista dello studio completo, data la complessità e gli evidenti limiti di reclutamento sarà di 15 pazienti e 15 volontari sani.

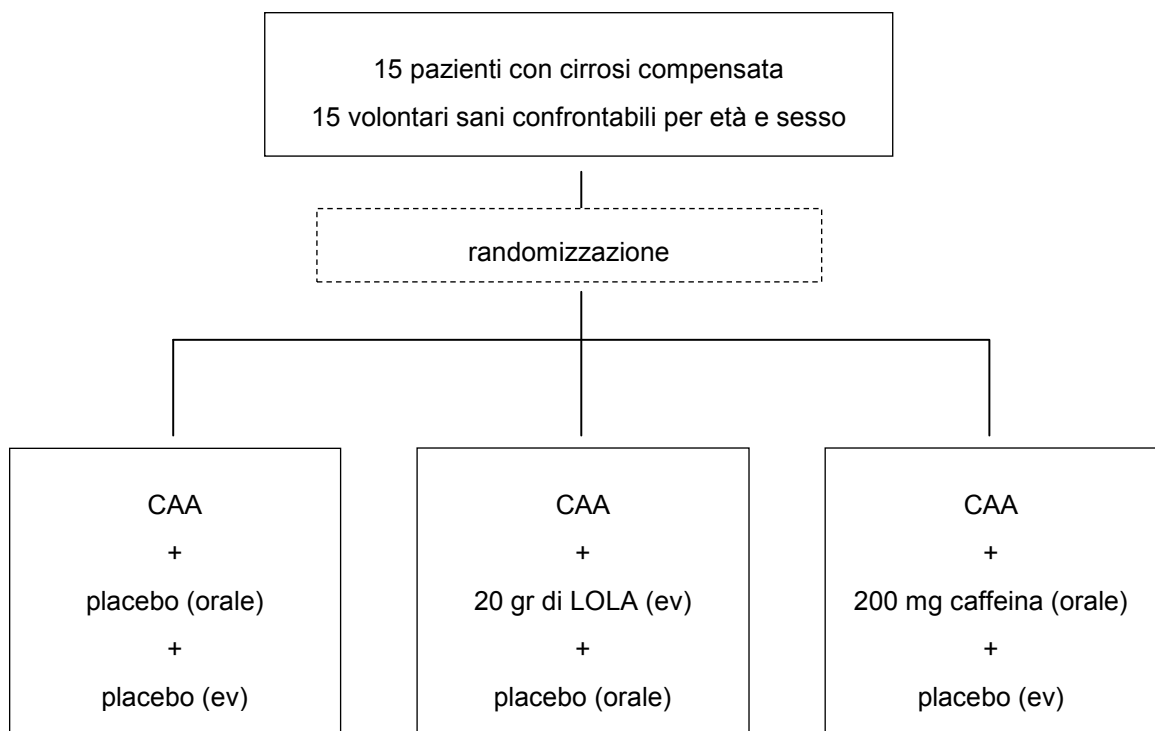


Figura 6.3. Schema dello svolgimento dello studio.

Tuttavia nel presente elaborato si fa riferimento all'analisi ad interim del predetto studio, ancora in corso.

6.4 RISULTATI

6.4.1 Dati demografici

Lo studio è stato finora completato da sei pazienti e da cinque volontari sani, le cui caratteristiche demografiche sono riportate nella **Tabella 6.1**.

I due gruppi sono risultati omogenei per età e livello d'istruzione. In entrambi i gruppi era maggiore il numero di maschi (5 su 6 nei pazienti e 4 su 5 nei volontari sani). Tutti i pazienti erano in classe Child-Pugh ≤ 7 ; nessun paziente presentava segni di encefalopatia conclamata.

Tabella 6.1. Caratteristiche demografiche della popolazione

	Volontari sani	Pazienti
Età (anni)	49.1 \pm 11.8 anni	61.4 \pm 9.1 anni
Sesso (m/f)	5/6	4/5
Livello d'istruzione (aa studio)	15.8 \pm 4.4	10.3 \pm 3.3

La qualità e gli orari del sonno, la preferenza diurna e la sonnolenza diurna non sono risultati significativamente diversi nei pazienti e nei volontari sani, ad eccezione del numero di risvegli, che è risultato significativamente maggiore nei pazienti ($p < 0.05$) (**Tabella 6.2**).

Tabella 6.2. Valutazione della qualità e orari del sonno nei pazienti e nei volontari sani.

Dominio	Strumenti	Volontari sani	Pazienti	p
Sonnolenza	ESS	5.4 \pm 2.7	2.8 \pm 1.7	0.09
Insonnia	PSQI	4.6 \pm 3.8	6.7 \pm 3.4	0.36
Preferenza diurna	HO score	56.6 \pm 15.4	61.5 \pm 11.3	0.56
Orari abituali del sonno	Diari del sonno			
	- Ora di coricamento	23:40 \pm 1.4	22.47 \pm 1.34	0.17
	- Ora di tentativo di addormentarsi	23.53 \pm 1.3	23.47 \pm 0.52	1.00
	- Ora dell'addormentamento	24.07 \pm 1.5	23.38 \pm 0.49	0.88
	- Ora del risveglio	6.58 \pm 1.35	7.07 \pm 0.56	0.73
	- Ora di alzarsi dal letto	7.27 \pm 1.4	7.38 \pm 0.52	0.73
	- Tempo per addormentarsi (min)	8.9 \pm 5.7	19.4 \pm 10.7	0.08
	- Risvegli (n)	0.6 \pm 0.5	2.7 \pm 1.8	<0.05

6.4.2 Valutazione neuropsichica

Nei test carta e matita tutti i partecipanti allo studio avevano una prestazione ai test entro i limiti di norma. Né la somministrazione di LOLA né quella di caffeina ha provocato cambiamenti nella prestazione alla PHES e al test SCAN, né dei pazienti né dei volontari sani, in condizioni di iperammoniemia indotta. Tuttavia i pazienti presentavano prestazioni medie significativamente peggiori rispetto ai controlli [z-PHES, fattore categoria (volontari sani vs pazienti) $F: 19.60$; $p=0.002$] (**Tabella 6.3**)

Nel test Sternberg sia i pazienti che i controlli avevano una prestazione nei limiti di norma. Non si sono apprezzate differenze nelle tre condizioni (COAA- COAA + Caffè- COAA + LOLA). Anche in questo caso la prestazione dei pazienti è risultata significativamente peggiore rispetto ai volontari sani nel tempo di reazione totale ($p=0.001$), nell'accuratezza ($p=0.04$) e nel punteggio z ($p=0.002$) (**Tabella 6.3**).

Per quanto attiene all'EEG di veglia, tutti i pazienti e i controlli avevano un EEG di veglia nella norma.

Né il LOLA né la caffeina hanno determinato cambiamenti significativi dell'EEG di veglia eseguito sotto carico di aminoacidi, sia nei pazienti che nei volontari sani (**Tabella 6.3**).

Tabella 6.3. Valutazione psicometrica ed EEG di veglia nei volontari sani e in pazienti con cirrosi in corso di COAA, COAA + Caffè e COAA + LOLA

Variabile	Volontari sani			Pazienti			F; p (categoria)	F; p (condizione)	F; p (cat*cond)	
	COAA	Caffè	LOLA	COAA	Caffè	LOLA				
PHES	MPZS	1.71±0.98	1.97±0.55	1.98±0.67	0.75±0.5	0.78±0.57	0.64±0.63	11.01; 0.009*	0.38; 0.70	0.71; 0.51
	Punteggio z	3.8±1.79	4.6±0.55	4.6±0.55	1.5±1.22	1.83±1.17	1.83±1.6	19.60; 0.002*	1.25; 0.31	0.21; 0.81
SCAN Test	Punteggio z	1.08±1.2	0.92±0.92	0.64±0.63	-0.66±0.62	-1.1±0.83	-1.01±0.57	20.00; 0.002*	1.43; 0.27	0.33; 0.72
EEG di veglia	MDF (Hz)	11.51±6.94	11.68±0.93	11.6±1.08	11.89±1.76	11.02±2.22	11.47±1.9	0.02; 0.89	1.43; 0.27	3.06; 0.07
	Potenza theta (%)	12.35±3.41	13.25±3.44	13.87±3.95	17.6±13.86	26.07±17.08	21.64±18.71	1.41; 0.26	2.43; 0.12	1.63; 0.22
	Potenza delta (%)	6.94±2.76	8.52±6.12	5.81±1.1	5.53±2.7	6.88±3.3	6.67±2.29	0.16; 0.70	1.60; 0.23	1.08; 0.36
	Potenza alfa (%)	52.94±11.65	46.21±16.69	50.32±12.64	40.56±12.58	37.21±14.39	38.16±14.75	2.21; 0.85	1.20; 0.33	0.17; 0.85
	Potenza beta (%)	27.77±7.48	32.02±11.74	30±12.35	36.32±14.86	29.84±17.36	33.52±15.65	0.16; 0.69	0.17; 0.84	3.66; 0.06

PHES: psychometric hepatic encephalopathy score. **MDF**: mean dominant frequency; **δ (%)**: potenza relativa delta; **θ (%)**: potenza relativa theta; **α (%)**: potenza relativa alfa; **β (%)**: potenza relativa beta.

6.4.3 Ammoniemia

I pazienti avevano livelli plasmatici di ammoniemia più elevati dei volontari sani in entrambe le condizioni (h 9:00, COAA 253.2 ± 80.9 vs 187.7 ± 69.2 $\mu\text{g/dL}$; LOLA 244.7 ± 61.7 vs 162.8 ± 57.5 $\mu\text{g/dL}$).

L'aumento dell'ammoniemia si presentava prima nei pazienti ed era più prolungato nei pazienti rispetto ai volontari sani.

L'andamento plasmatico dell'ammoniemia ha presentato sia nei pazienti che nei volontari sani un picco tra le ore 11:00 e le ore 12:00 (**Figura 6.6**).

Il LOLA ha determinato una riduzione seppur non significativa dei livelli plasmatici dell'ammonio in entrambi i gruppi (**Figura 6.6**).

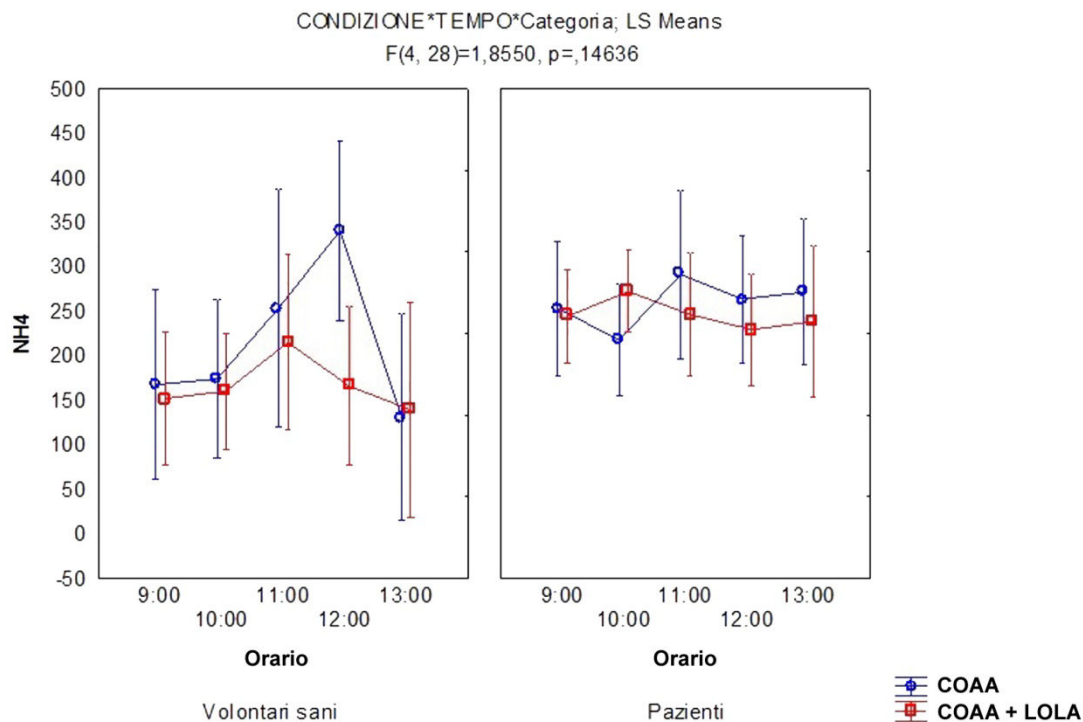


Figura 6.4 Livelli ematici dell'ammonio post-COAA nei pazienti e nei volontari sani.

Sia nei volontari sani (a sinistra) che nei pazienti (a destra) il COAA (linea blu) determina un aumento dell'ammoniemia, più rapido e duraturo nei pazienti, che partono da livelli ematici pre-COAA maggiori rispetto ai volontari sani.

Il LOLA (linea rossa) determina una riduzione dei livelli ematici di NH₄ sia nei pazienti che nei volontari sani.

NH₄: ammonio, COAA: ammonio, LOLA: L-ornitina-L-aspartato.

6.4.4 Sonnolenza soggettiva

La valutazione della sonnolenza soggettiva con la scala KSS non ha evidenziato differenze significative tra pazienti con cirrosi e volontari sani.

La caffeina somministrata alle ore 10, a due ore dall'assunzione del carico di aminoacidi, non ha determinato riduzioni della sonnolenza soggettiva, né nei pazienti né nel gruppo di controllo (**Figura 6.7**).

Il LOLA e la riduzione osservata dei livelli di ammoniemia, non ha determinato riduzione della sonnolenza soggettiva in nessuno dei due gruppi (**Figura 6.7**).

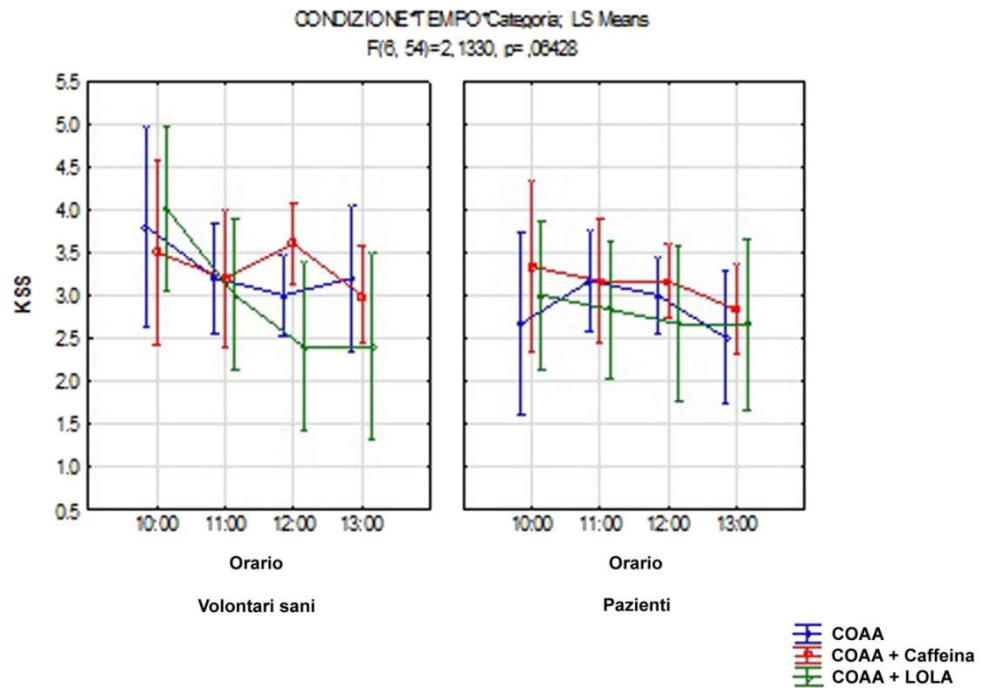


Figura 6.5 *Sonnolenza soggettiva dopo carico orale di aminoacidi (COAA, linea blu), assunzione di caffeina (COAA + caffeina, linea rossa) e dopo somministrazione di LOLA (COAA + LOLA, linea verde). Sia nei volontari sani (sinistra) che nei pazienti (destra), né la caffeina né il LOLA hanno determinato cambiamenti significativi nella sonnolenza soggettiva stimata con la scala KSS rispetto al COAA.*
KSS: Karolinska Sleepiness Scale.

6.4.5 EEG di sonno- nap EEG

L'analisi degli EEG di sonno, eseguita in collaborazione con l'Istituto di Farmacologia e Tossicologia dell'Università di Zurigo, è in corso.

Gli EEG di sonno sono stati trasferiti attraverso un sistema operativo diretto server-server, in cieco.

6.5 DISCUSSIONE

Dall'analisi dei dati analizzati finora, risulta che il carico orale di aminoacidi mimanti un sanguinamento digestivo ha determinato il previsto aumento dei livelli ematici dell'ammonio, non associato ad un significativo aumento di sonnolenza soggettiva né a modifiche significative dell'EEG di veglia. Il LOLA si è dimostrato efficace nel ridurre l'ammoniemia plasmatica; tuttavia né la caffeina né il calo dell'iperammoniemia in corso di infusione di LOLA ha determinato un significativo calo della sonnolenza soggettiva.

Anche in questo studio, come nel primo, la popolazione di pazienti con cirrosi epatica reclutata era costituita da individui in discreto compenso (classe Child Pugh ≤ 7), nessuno presentava EE conclamata o minima. Nonostante ciò anche in questo studio la prestazione neuropsichica, seppur entro i limiti di norma, era in media peggiore nei pazienti rispetto ad un gruppo di riferimento omogeneo per età e livello d'istruzione. Risultati questi che concordano con precedenti studi che hanno dimostrato come anche in pazienti cirrotici in condizioni stabili ci fossero alterazioni della prestazione neuropsichica e dei tempi di reazione [9, 76, 151].

Come nello studio 1, la somministrazione orale di aminoacidi mimante l'emoglobina ha determinato incrementi plasmatici dei livelli di ammonio, in entrambi i gruppi studiati, ma con un picco dopo 180-240 min. Ed anche in questo caso, nei pazienti, che partivano da livelli plasmatici più elevati, nonostante il discreto compenso di malattia, la ridotta funzione epatica ha determinato oltre che un'elevazione più precoce dell'ammoniemia, la presenza più prolungata di valori elevati di ammoniemia. Il valore verosimilmente è sottostimato, perché come già ricordato, il limite massimo di ammoniemia rilevabile con l'Ammonia Checker è di 400 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e in tre pazienti si sono avuti valori di ammoniemia massimali per 3-4 ore consecutive, suggerendo la presenza di un picco non rilevabile $> 400 \mu\text{g}/\text{dL}$.

La somministrazione del L-ornitina-L-aspartato si è dimostrata efficace nel ridurre i livelli ematici di iperammoniemia indotta, sia nei pazienti che nei volontari sani. Questi dati concordano con i precedenti studi sull'efficacia ipoammoniizzante del LOLA in corso di iperammoniemia indotta [97, 177,

178]. Anche nel nostro studio, nonostante la piccola numerosità, si sono verificati effetti collaterali di tipo gastrointestinali (1 caso di nausea ed 1 di vomito, sia nei pazienti che nei volontari sani), a pronta risoluzione dopo riduzione della velocità/sospensione momentanea dell'infusione. Occorre però notare che nel nostro studio, entrambe le somministrazioni (COAA e LOLA) presentavano effetti collaterali di questo tipo, che forse quindi possono essersi sommate. Probabilmente, la stimolazione del centro del vomito in corso di infusione di LOLA avviene attraverso la zona chemorecetttrice di attivazione del vomito (CTZ), importante sorgente di stimolazione emetica situata nell'area postrema sul pavimento del quarto ventricolo. La CTZ ha un'attività modulata da vari recettori, comprendenti i dopaminergici, gli istaminici, i muscarinici e i serotoninergici; si caratterizza dal non essere protetta dalla barriera ematoencefalica e può quindi essere stimolata da tossine e farmaci circolanti.

Nonostante il LOLA riduca l'ammoniemia dopo carico, tuttavia questo non si è tradotto in un cambiamento significativo della sonnolenza soggettiva stimata attraverso la scala KSS, né a modifiche significative della prestazione psicometrica e dell'EEG di veglia.

Occorre però notare che gli studi eseguiti sull'efficacia ipoammoniemizzanti del LOLA [148] mostravano una migliore prestazione dei test psicometrici e miglioramento dello stato mentale, ma questi risultati erano quasi sempre limitati a pazienti con EE conclamata. I mancati cambiamenti osservati nel nostro studio forse sono ascrivibili, almeno in parte, alla notevole selezione della popolazione con cirrosi epatica (pazienti senza segni di EE e con cirrosi \leq B7) dovuta alla necessità di scegliere pazienti in condizioni cliniche buone per poter somministrare un carico iperammoniemico.

Anche la somministrazione di caffeina, o 1,3,7-trimethylxantina, antagonista recettoriale dell'adenosina, non ha modificato la sonnolenza soggettiva in corso di iperammonimia indotta; né si sono osservate modifiche significative della prestazione neuropsichica. La caffeina è rapidamente e completamente assorbita dopo ingestione orale ed il suo metabolismo è sostanzialmente invariato in pazienti con cirrosi compensata [92, 173]. In studi precedenti eseguiti su soggetti sani deprivati di sonno, la caffeina si è dimostrata efficace

nel ridurre la sonnolenza soggettiva e nel determinare una riduzione dell'attività theta (che aumenta dopo veglia prolungata) dell'EEG di sonno [107]. Nel nostro studio non si sono osservate modifiche significative dell'EEG di veglia dopo somministrazione di caffeina in corso di iperammoniemia indotta, né nei pazienti né nei volontari sani.

Verosimilmente, la mancanza di significatività statistica attuale è ascrivibile alla notevole selezione della popolazione e alla bassa numerosità del campione che ha concluso lo studio finora, che risulta circa 1/3 della prevista numerosità finale.

6.5.1 Limiti degli studi 1-3

- Data la complessità e le possibili conseguenze dell'induzione di iperammoniemia, la popolazione di pazienti utilizzata è stata selezionata molto attentamente, cosa che potrebbe rendere i risultati non direttamente applicabili a popolazioni più ampie e meno omogenee.
- L'effetto iperammoniizzante del carico è stato probabilmente sottostimato, a causa del massimo valore dell'ammoniemia rilevabile (400 µg/dL) dall'Ammonia Checker.
- Gli effetti del LOLA probabilmente si sono limitati al calo dell'iperammoniemia indotta in quanto la somministrazione è stata singola ed i pazienti avevano una cirrosi ben compensata senza segni clinici di encefalopatia; gli studi precedenti mostravano effetti sulla prestazione neuropsicometrica più evidenti dopo una settimana di terapia ed in soggetti con encefalopatia epatica conclamata.

7. CONCLUSIONI E IMPLICAZIONI

In conclusione, il COAA ha determinato:

- il previsto aumento dell'ammoniemia, con un picco a circa 3 ore dall'assunzione;
- un significativo aumento della sonnolenza soggettiva parallelo all'aumento dell'ammoniemia;
- diversi effetti sull'EEG di veglia dei pazienti, in relazione non solo dei livelli, ma anche dell'andamento delle concentrazioni dell'ammoniaca, influenzando non solo la distribuzione della frequenza, ma anche della potenza spettrale;
- cambiamenti opposti dell'EEG di sonno nei pazienti e nei controlli, con sonno più superficiale ed interrotto nei primi, più profondo e stabile nei secondi.

Il LOLA infine ha mostrato efficacia ipoammoniemizzante in corso di iperammoniemia indotta.

Gli obiettivi degli studi presentano risvolti clinici, oltre che puramente sperimentali:

- individuazione di soggetti con cirrosi epatica a rischio di sviluppare l'EE. I pazienti con cirrosi presentano una predisposizione soggettiva allo sviluppo di EE, non sempre correlata al grado di insufficienza epatica. Il test di sensibilità all'iperammoniemia indotta consente di individuare soggetti a rischio, nei quali possono essere indicati provvedimenti dietetici o farmacologici atti a controllare l'iperammoniemia e per i quali procedure quali l'inserimento di shunt porto-sistemico per controllo emorragia o ascite andranno valutati con particolare cautela;
- complemento della stadiazione dei pazienti in attesa di trapianto di fegato. Studi dimostrano come alterate risposte a carichi di induzione in pazienti con cirrosi predispongono allo sviluppo di EE conclamata e si associno a ridotta sopravvivenza [12]. Una valutazione neuropsicologica

con eventuale test da carico offrirebbe una completa valutazione in questo gruppo di pazienti;

- uso di markers di sonnolenza per EE. I pazienti con EE lamentano spesso sonnolenza diurna, che interferisce con le normali attività quotidiane. La valutazione della presenza di questo disturbo con una scala validata (KSS) e l'eventuale dimostrazione dell'efficacia delle sostanze testate, potrebbe portare a miglioramenti della gestione di questo disturbo e, di riflesso, della qualità di vita;
- possibile individuazione di nuovi criteri diagnostici che meglio identifichino e caratterizzino l'EE. L'analisi dell'EEG di veglia dopo CAA ha mostrato cambiamenti non solo della frequenza dell'attività dominante (attuale criterio diagnostico di EEG), ma anche sulla distribuzione topografica della della frequenza e della potenza dei ritmi EEG, suggerendo che l'iperammoniemia possa avere effetti diversi sull'EEG di veglia in relazione non solo dei livelli, ma anche dell'andamento delle concentrazioni dell'ammoniaca;
- migliore caratterizzazione clinica dell'EE. Come già accennato, l'eccessiva sonnolenza diurna e l'insonnia/abitudini ritardate del sonno sembrano avere una patogenesi distinta [19]. Riuscire a definire meglio l'eziologia ed i meccanismi patogenetici dell'una e delle altre potrebbe preludere ad un approccio terapeutico mirato e più efficace: la correzione di una eccessiva sonnolenza diurna, sia con mezzi farmacologici che con strategie cronoterapeutiche, può anche tradursi in una migliore notte di sonno;
- possibile uso di sostanze come LOLA in pazienti con cirrosi epatica ed iperammoniemia, che lamentano sonnolenza diurna, sulla base dei meccanismi fisiopatologici implicati.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Achermann, P., A.A. Borbely, *Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In: Kryger MH, ed. Principles and Practice of Sleep Medicine. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010.*
2. Ahboucha, S., R.F. Butterworth, *The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. Neurochem Int, 2008. 52(4-5): p. 575-87.*
3. Akerstedt, T., M. Gillberg, *Subjective and objective sleepiness in the active individual. Int J Neurosci, 1990. 52(1-2): p. 29-37.*
4. Al Mardini, H., A. Douglass, C. Record, *Amino acid challenge in patients with cirrhosis and control subjects: ammonia, plasma amino acid and EEG changes. Metab Brain Dis, 2006. 21(1): p. 1-10.*
5. Als-Nielsen, B., R.L. Koretz, L.L. Kjaergard, C. Gluud, *Branched-chain amino acids for hepatic encephalopathy. Cochrane Database Syst Rev, 2003(2): p. CD001939.*
6. Amodio, P., C. Bemeur, R. Butterworth, J. Cordoba, et al., *The nutritional management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism Consensus. Hepatology, 2013. 58(1): p. 325-36.*
7. Amodio, P., F. Campagna, S. Olanas, P. Iannizzi, et al., *Detection of minimal hepatic encephalopathy: normalization and optimization of the Psychometric Hepatic Encephalopathy Score. A neuropsychological and quantified EEG study. J Hepatol, 2008. 49(3): p. 346-53.*
8. Amodio, P., P. Marchetti, F. Del Piccolo, M. de Tourtchaninoff, et al., *Spectral versus visual EEG analysis in mild hepatic encephalopathy. Clin Neurophysiol, 1999. 110(8): p. 1334-1344.*
9. Amodio, P., P. Marchetti, F. Del Piccolo, C. Rizzo, et al., *Study on the Sternberg paradigm in cirrhotic patients without overt hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis, 1998. 13(2): p. 159-72.*
10. Amodio, P., A. Pellegrini, P. Amista, S. Luise, et al., *Neuropsychological-neurophysiological alterations and brain atrophy in cirrhotic patients. Metab Brain Dis., 2003. 18(1): p. 63-78.*
11. Amodio, P., J.C. Quero, F. Del Piccolo, A. Gatta, et al., *Diagnostic tools for the*

- detection of subclinical hepatic encephalopathy: comparison of standard and computerized psychometric tests with spectral-EEG.* Metab Brain Dis., 1996. 11(4): p. 315-327.
12. Amodio, P., S. Schiff, F. Del Piccolo, D. Mapelli, et al., *Attention dysfunction in cirrhotic patients: an inquiry on the role of executive control, attention orienting and focusing.* Metab Brain Dis., 2005. 20(2): p. 115-127.
 13. Angeli, P., F. Wong, H. Watson, P. Gines, *Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey.* Hepatology, 2006. 44(6): p. 1535-42.
 14. Apolone, G., P. Mosconi, *The Italian SF-36 Health Survey: translation, validation and norming.* J Clin Epidemiol, 1998. 51(11): p. 1025-36.
 15. Arendt, J., *Light-dark control of melatonin synthesis. In: Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. 1st ed. London Chapman & Hall, 1995: p. 66-109.*
 16. Arendt, J., C. Bojkowski, C. Franey, J. Wright, et al., *Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol.* J Clin Endocrinol Metab, 1985. 60(6): p. 1166-73.
 17. Arendt, J., B. Middleton, P. Williams, G. Francis, et al., *Sleep and circadian phase in a ship's crew.* J Biol Rhythms, 2006. 21(3): p. 214-21.
 18. Bajaj, J.S., J. Cordoba, K.D. Mullen, P. Amodio, et al., *Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy--an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement.* Aliment Pharmacol Ther, 2011. 33(7): p. 739-47.
 19. Bajaj, J.S., K. Saeian, C.M. Schubert, M. Hafeezullah, et al., *Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test.* Hepatology, 2009. 50(4): p. 1175-1183.
 20. Bajaj, J.S., C.M. Schubert, D.M. Heuman, J.B. Wade, et al., *Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy.* Gastroenterology, 2010. 138(7): p. 2332-40.
 21. Baldy-Moulinier, M., A. Besset, B. Clavet, H. Michel, *Etude polygraphique nycthemerale des endormissements et des reveils au cors des encephalopathies hepatiques.* Rev E E G Neurophysiol, 1981. 11: p. 123-132.
 22. Baraldi, M., R. Avallone, L. Corsi, I. Venturini, et al., *Endogenous benzodiazepines.* Therapie, 2000. 55(1): p. 143-6.
 23. Basile, A.S., *The contribution of endogenous benzodiazepine receptor ligands to*

the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Synapse, 1991. 7(2): p. 141-50.

24. Basile, A.S., N.L. Ostrowski, S.H. Gammal, E.A. Jones, et al., *The GABAA receptor complex in hepatic encephalopathy. Autoradiographic evidence for the presence of elevated levels of a benzodiazepine receptor ligand*. Neuropsychopharmacology, 1990. 3(1): p. 61-71.
25. Bergonzi, P., A. Bianco, S. Mazza, G. Mennuni, et al., *Organizzazione del sonno notturno in pazienti con cirrosi epatica: modificazioni prima e dopo trattamento con l-dopa e lattulosio*. Riv Neurol, 1975. 45: p. 118-123.
26. Bessman, A.N., G.S. Mirick, *Blood ammonia levels following the ingestion of casein and whole blood*. J Clin Invest, 1958. 37(7): p. 990-8.
27. Bianchi, G., G. Marchesini, F. Nicolino, R. Graziani, et al., *Psychological status and depression in patients with liver cirrhosis*. Dig Liver Dis, 2005. 37(8): p. 593-600.
28. Blake, H., R.W. Gerard, *Brain potentials during sleep*. Am J Physiol, 1937. 119: p. 692-703.
29. Blei, A.T., J. Cordoba, *Subclinical encephalopathy*. Dig Dis, 1996. 14 Suppl 1: p. 2-11.
30. Blei, A.T., S. Olafsson, G. Therrien, R.F. Butterworth, *Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis*. Hepatology, 1994. 19(6): p. 1437-1444.
31. Borbely, A.A., *A two process model of sleep regulation*. Hum Neurobiol, 1982. 1(3): p. 195-204.
32. Borbely, A.A., F. Baumann, D. Brandeis, I. Strauch, et al., *Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1981. 51(5): p. 483-95.
33. Born, J., S. Muth, H.L. Fehm, *The significance of sleep onset and slow wave sleep for nocturnal release of growth hormone (GH) and cortisol*. Psychoneuroendocrinology, 1988. 13(3): p. 233-43.
34. Boy, C., P.T. Meyer, G. Kircheis, M.H. Holschbach, et al., *Cerebral A1 adenosine receptors (A1AR) in liver cirrhosis*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. 35(3): p. 589-97.
35. Broughton, R., J. Hasan, *Quantitative topographic electroencephalographic mapping during drowsiness and sleep onset*. J Clin Neurophysiol, 1995. 12(4): p. 372-86.

36. Burchi, R., *I saggi della funzionalità epatica e la prova dell'ammoniemia spontanea e provocata con lo studio della insufficienza funzionale del fegato.* Folia clin chim micr, 1927. 2: p. 5.
37. Burra, P., M. Dam, F. Chierichetti, U. Tedeschi, et al., *18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography study of brain metabolism in cirrhosis: effect of liver transplantation.* Transplant Proc, 1999. 31(1-2): p. 418-20.
38. Burra, P., G. Pizzolato, F. Orlando, A. Rossato, et al., *Single-photon emission computed tomography with 99mTC-hexamethylpropyleneamineoxide in cirrhotic patients before and after liver transplantation.* Transplant Proc, 1994. 26(6): p. 3677-8.
39. Butterworth, J., C.R. Gregory, L.R. Aronson, *Selective alterations of cerebrospinal fluid amino acids in dogs with congenital portosystemic shunts.* Metab Brain Dis, 1997. 12(4): p. 299-306.
40. Butterworth, R.F., *The neurobiology of hepatic encephalopathy.* Semin Liver Dis, 1996. 16(3): p. 235-244.
41. Butterworth, R.F., *Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia.* Metab Brain Dis, 2002. 17(4): p. 221-227.
42. Butterworth, R.F., *Hepatic encephalopathy.* Alcohol Res Health, 2003. 27(3): p. 240-246.
43. Butterworth, R.F., *Pathogenesis of hepatic encephalopathy: update on molecular mechanisms.* Indian J Gastroenterol, 2003. 22 Suppl 2: p. S11-S16.
44. Butterworth, R.F., *Neuronal cell death in hepatic encephalopathy.* Metab Brain Dis, 2007. 22(3-4): p. 309-320.
45. Butterworth, R.F., L. Spahr, S. Fontaine, G.P. Layrargues, *Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy.* Metab Brain Dis, 1995. 10(4): p. 259-267.
46. Buysse, D.J., C.F. Reynolds, 3rd, T.H. Monk, S.R. Berman, et al., *The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research.* Psychiatry Res, 1989. 28(2): p. 193-213.
47. Carpenedo, R., G. Mannaioni, F. Moroni, *Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure.* J Neurochem, 1998. 70(5): p. 1998-2003.
48. Catafau, A.M., J. Kulisevsky, L. Berna, J. Pujol, et al., *Relationship between*

- cerebral perfusion in frontal-limbic-basal ganglia circuits and neuropsychologic impairment in patients with subclinical hepatic encephalopathy.* J Nucl Med, 2000. 41(3): p. 405-10.
49. Chu, N.S., S.S. Yang, Y.F. Liaw, *Evoked potentials in liver diseases.* J Gastroenterol Hepatol, 1997. 12(9-10): p. S288-S293.
50. Conn, H.O., *Trailmaking and number-connection tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy.* Am J Dig Dis, 1977. 22(6): p. 541-550.
51. Conn, H.O., C.M. Leevy, Z.R. Vlahcevic, J.B. Rodgers, et al., *Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial.* Gastroenterology, 1977. 72(4 Pt 1): p. 573-583.
52. Cordoba, J., J. Cabrera, L. Lataif, P. Penev, et al., *High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis.* Hepatology, 1998. 27(2): p. 339-45.
53. Cordoba, J., R. Garcia-Martinez, M. Simon-Talero, *Hyponatremic and hepatic encephalopathies: similarities, differences and coexistence.* Metab Brain Dis, 2010. 25(1): p. 73-80.
54. Cordoba, J., F. Sanpedro, J. Alonso, A. Rovira, *IH magnetic resonance in the study of hepatic encephalopathy in humans.* Metab Brain Dis, 2002. 17(4): p. 415-429.
55. Czeisler, C.A., J.F. Duffy, T.L. Shanahan, E.N. Brown, et al., *Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker.* Science, 1999. 284(5423): p. 2177-81.
56. Czeisler, C.A., G.S. Richardson, R.M. Coleman, J.C. Zimmerman, et al., *Chronotherapy: resetting the circadian clocks of patients with delayed sleep phase insomnia.* Sleep, 1981. 4(1): p. 1-21.
57. Dam, M., P. Burra, U. Tedeschi, A. Cagnin, et al., *Regional cerebral blood flow changes in patients with cirrhosis assessed with ^{99m}Tc-HM-PAO single-photon emission computed tomography: effect of liver transplantation.* J Hepatol, 1998. 29(1): p. 78-84.
58. Davidson, E.A., W.H. Summerskill, *Psychiatric aspects of liver disease.* Postgrad Med J, 1956. 32(372): p. 487-494.
59. De Gennaro, L., M. Ferrara, G. Curcio, R. Cristiani, *Antero-posterior EEG changes during the wakefulness-sleep transition.* Clin Neurophysiol, 2001. 112(10): p. 1901-11.

60. De Rui, M., S. Gaiani, B. Middleton, D.J. Skene, et al., *Bright times for patients with cirrhosis and delayed sleep habits: a case report on the beneficial effect of light therapy*. Am J Gastroenterol, 2011. 106(11): p. 2048-9.
61. De Rui, M., S. Schiff, D. Aprile, P. Angeli, et al., *Excessive daytime sleepiness and hepatic encephalopathy: it is worth asking*. Metab Brain Dis, 2013. 28(2): p. 245-8.
62. Delcker, A., B. Turowski, U. Mihm, P. Raab, et al., *Proton MR spectroscopy of neurometabolites in hepatic encephalopathy during L-ornithine-L-aspartate treatment--results of a pilot study*. Metab Brain Dis, 2002. 17(2): p. 103-11.
63. Delorme, A., S. Makeig, *EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis*. J Neurosci Methods, 2004. 134(1): p. 9-21.
64. Deutz, N.E., P.L. Reijven, M.C. Bost, C.L. van Berlo, et al., *Modification of the effects of blood on amino acid metabolism by intravenous isoleucine*. Gastroenterology, 1991. 101(6): p. 1613-20.
65. Douglass, A., H. Al Mardini, C. Record, *Amino acid challenge in patients with cirrhosis: a model for the assessment of treatments for hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 2001. 34(5): p. 658-64.
66. Dudley, G.A., R.S. Staron, T.F. Murray, F.C. Hagerman, et al., *Muscle fiber composition and blood ammonia levels after intense exercise in humans*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983. 54(2): p. 582-6.
67. Fan, P., J. Lavoie, N.L. Le, J.C. Szerb, et al., *Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action*. Neuroscience, 1990. 37(2): p. 327-334.
68. Fehér, J., I. Lång, A. Gogl, *Effect of ornithine-aspartate infusion on elevated serum ammonia concentration in cirrhotic patients--results of a randomized, double-blind multicentre trial*. Med Sci Monit, 1997. 3: p. 669-673.
69. Ferenci, P., A. Lockwood, K. Mullen, R. Tarter, et al., *Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998*. Hepatology, 2002. 35(3): p. 716-721.
70. Foley, J.M., C.W. Watson, R.D. Adams, *Significance of the electroencephalographic changes in hepatic coma*. Trans Am Neurol Assoc, 1950. 51: p. 161-165.

71. Frisancho, A.R., *New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status*. Am J Clin Nutr, 1981. 34(11): p. 2540-5.
72. Gebhardt, R., G. Beckers, F. Gaunitz, W. Haupt, et al., *Treatment of cirrhotic rats with L-ornithine-L-aspartate enhances urea synthesis and lowers serum ammonia levels*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. 283(1): p. 1-6.
73. Georgiev, I., I. Lolova, T. Bojinova, *On the correlation between the clinical and morphological findings in cases of benign pseudodystrophic forms of muscular atrophy*. Neurol Psychiatr (Bucur), 1976. 14(1): p. 35-40.
74. Gitlin, N., D.C. Lewis, L. Hinkley, *The diagnosis and prevalence of subclinical hepatic encephalopathy in apparently healthy, ambulant, non-shunted patients with cirrhosis*. J Hepatol, 1986. 3(1): p. 75-82.
75. Gleckman, R.A., *Urinary tract infection*. Clin Geriatr Med, 1992. 8(4): p. 793-803.
76. Groeneweg, M., J.C. Quero, B. De, I, I.J. Hartmann, et al., *Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning*. Hepatology, 1998. 28(1): p. 45-49.
77. Guerit, J.M., A. Amantini, C. Fischer, P.W. Kaplan, et al., *Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines*. Liver Int, 2009. 29(6): p. 789-96.
78. Guevara, M., M.E. Baccaro, A. Torre, B. Gomez-Anson, et al., *Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a prospective study with time-dependent analysis*. Am J Gastroenterol, 2009. 104(6): p. 1382-9.
79. Harper, A.E., *Nutritional regulations and legislation--past developments, future implications*. J Am Diet Assoc, 1977. 71(6): p. 601-609.
80. Hass, H.G., T. Nagele, U. Seeger, F. Hosl, et al., *[Detection of subclinical and overt hepatic encephalopathy and treatment control after L-ornithine-L-aspartate medication by magnetic resonance spectroscopy ((1)H-MRS)]*. Z Gastroenterol, 2005. 43(4): p. 373-8.
81. Hassanein, T.I., R.C. Hilsabeck, W. Perry, *Introduction to the Hepatic Encephalopathy Scoring Algorithm (HESA)*. Dig Dis Sci, 2008. 53(2): p. 529-538.
82. Haussinger, D., *Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis*. Hepatology, 2006. 43(6): p. 1187-1190.

83. Hazell, A.S., R.F. Butterworth, *Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. 222(2): p. 99-112.
84. Heymsfield, S.B., C. McManus, J. Smith, V. Stevens, et al., *Anthropometric measurement of muscle mass: revised equations for calculating bone-free arm muscle area*. Am J Clin Nutr, 1982. 36(4): p. 680-90.
85. Horne, J.A., O. Ostberg, *A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms*. Int J Chronobiol, 1976. 4(2): p. 97-110.
86. Iguchi, H., K.I. Kato, H. Ibayashi, *Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. 54(5): p. 1025-7.
87. Iles, J.F., J.J. Jack, *Ammonia: assessment of its action on postsynaptic inhibition as a cause of convulsions*. Brain, 1980. 103(3): p. 555-578.
88. Iwasa, M., M. Kaito, Y. Adachi, Y. Watanabe, et al., *Cerebral blood flow in basal ganglia is correlated with clinical signs of hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2002. 97(3): p. 763-4.
89. Jalan, R., J. Bernuau, *Induction of cerebral hyperemia by ammonia plus endotoxin: does hyperammonemia unlock the blood-brain barrier?* J Hepatol, 2007. 47(2): p. 168-171.
90. Jasper, H.H., G. ARFEL-CAPDEVILLE, T. RASMUSSEN, *Evaluation of EEG and cortical electrographic studies for prognosis of seizures following surgical excision of epileptogenic lesions*. Epilepsia, 1961. 2: p. 130-137.
91. Jepson, J.B., P. Zaltzman, S. Udenfriend, *Microsomal hydroxylation of tryptamine, indoleacetic acid and related compounds, to 6-hydroxy derivatives*. Biochim Biophys Acta, 1962. 62: p. 91-102.
92. Jodynys-Liebert, J., J. Flieger, A. Matuszewska, J. Juszczuk, *Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function*. J Clin Pharmacol, 2004. 44(4): p. 338-47.
93. Johns, M.W., *A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale*. Sleep, 1991. 14(6): p. 540-5.
94. Johns, M.W., *Sensitivity and specificity of the multiple sleep latency test (MSLT), the maintenance of wakefulness test and the epworth sleepiness scale: failure of the MSLT as a gold standard*. J Sleep Res, 2000. 9(1): p. 5-11.
95. Johns, M.W., *Sleep propensity varies with behaviour and the situation in which*

it is measured: the concept of somnificity. J Sleep Res, 2002. 11(1): p. 61-7.

96. Kearns, P.J., H. Young, G. Garcia, T. Blaschke, et al., *Accelerated improvement of alcoholic liver disease with enteral nutrition.* Gastroenterology, 1992. 102(1): p. 200-205.
97. Kircheis, G., R. Nilius, C. Held, H. Berndt, et al., *Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study.* Hepatology, 1997. 25(6): p. 1351-60.
98. Kircheis, G., M. Wettstein, S. Dahl, D. Haussinger, *Clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy.* Metab Brain Dis, 2002. 17(4): p. 453-62.
99. Klein, D.C., J.L. Weller, *Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase.* Science, 1970. 169(950): p. 1093-5.
100. Knowles, J.B., A.W. MacLean, L. Salem, C. Vetere, et al., *Slow-wave sleep in daytime and nocturnal sleep: an estimate of the time course of "Process S".* J Biol Rhythms, 1986. 1(4): p. 303-8.
101. Kreis, R., B.D. Ross, N.A. Farrow, Z. Ackerman, *Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 MR spectroscopy.* Radiology, 1992. 182(1): p. 19-27.
102. Kullmann, F., S. Hollerbach, G. Lock, A. Holstege, et al., *Brain electrical activity mapping of EEG for the diagnosis of (sub)clinical hepatic encephalopathy in chronic liver disease.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. 13(5): p. 513-522.
103. Kunin, C.M., T.C. Chalmers, C.M. Leevy, S.C. Sebastyen, et al., *Absorption of orally administered neomycin and kanamycin with special reference to patients with severe hepatic and renal disease.* N Engl J Med, 1960. 262: p. 380-5.
104. Kurtz, D., J.P. Zenglein, M. Imler, M. Girardel, et al., *[Night sleep in porto-caval encephalopathy].* Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972. 33(2): p. 167-78.
105. Lai, J.C., A.J. Cooper, *Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors.* J Neurochem, 1986. 47(5): p. 1376-1386.
106. Landolt, H.P., *Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans?* Biochem Pharmacol, 2008. 75(11): p. 2070-9.

107. Landolt, H.P., J.V. Reitey, K. Tonz, J.M. Gottselig, et al., *Caffeine attenuates waking and sleep electroencephalographic markers of sleep homeostasis in humans*. Neuropsychopharmacology, 2004. 29(10): p. 1933-9.
108. Laubenberger, J., D. Haussinger, S. Bayer, H. Gufler, et al., *Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis*. Gastroenterology, 1997. 112(5): p. 1610-1616.
109. Lavoie, J., J.F. Giguere, G.P. Layrargues, R.F. Butterworth, *Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy*. J Neurochem, 1987. 49(3): p. 692-697.
110. Lerner, A.B., J.J. Nordlund, *Melatonin: clinical pharmacology*. J Neural Transm Suppl, 1978(13): p. 339-47.
111. Lewy, A.J., T.A. Wehr, F.K. Goodwin, D.A. Newsome, et al., *Light suppresses melatonin secretion in humans*. Science, 1980. 210(4475): p. 1267-9.
112. Lockley, S.W., D.J. Skene, J. Arendt, *Comparison between subjective and actigraphic measurement of sleep and sleep rhythms*. J Sleep Res, 1999. 8(3): p. 175-83.
113. Lockwood, A.H., *Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy*. Metab Brain Dis, 2004. 19(3-4): p. 345-349.
114. Lockwood, A.H., J.M. McDonald, R.E. Reiman, A.S. Gelbard, et al., *The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia*. J Clin Invest, 1979. 63(3): p. 449-460.
115. Lockwood, A.H., E.W. Yap, W.H. Wong, *Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy*. J Cereb Blood Flow Metab, 1991. 11(2): p. 337-341.
116. Loguercio, C., R. Abbiati, M. Rinaldi, A. Romano, et al., *Long-term effects of Enterococcus faecium SF68 versus lactulose in the treatment of patients with cirrhosis and grade 1-2 hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 1995. 23(1): p. 39-46.
117. Lozeva, V., L. Tuomisto, J. Tarhanen, R.F. Butterworth, *Increased concentrations of histamine and its metabolite, tele-methylhistamine and down-regulation of histamine H3 receptor sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma*. J Hepatol, 2003. 39(4): p. 522-7.
118. Luo, B., L. Liu, L. Tang, J. Zhang, et al., *ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 286(2): p. G294-303.

119. Macbeth, W.A., E.H. Kass, W.V. McDermott, Jr., *Treatment of Hepatic Encephalopathy by Alteration of Intestinal Flora with Lactobacillus Acidophilus*. Lancet, 1965. 1(7382): p. 399-403.
120. Maier, K.P., H. Talke, W. Gerok, *Activities of urea-cycle enzymes in chronic liver disease*. Klin Wochenschr, 1979. 57(13): p. 661-5.
121. Marchesini, G., G. Bianchi, P. Amodio, F. Salerno, et al., *Factors associated with poor health-related quality of life of patients with cirrhosis*. Gastroenterology, 2001. 120(1): p. 170-8.
122. Marchesini, G., G. Bianchi, M. Merli, P. Amodio, et al., *Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial*. Gastroenterology, 2003. 124(7): p. 1792-801.
123. Marchesini, G., A. Fabbri, G. Bianchi, M. Brizi, et al., *Zinc supplementation and amino acid-nitrogen metabolism in patients with advanced cirrhosis*. Hepatology, 1996. 23(5): p. 1084-92.
124. Marchetti, P., C. D'Avanzo, R. Orsato, S. Montagnese, et al., *Electroencephalography in patients with cirrhosis*. Gastroenterology, 2011. 141(5): p. 1680-9 e1-2.
125. McDermott, W.V., R.D. Adams, *Episodic Stupor Associated with an Eck Fistula in the Human with Particular Reference to the Metabolism of Ammonia*. J Clin Invest, 1954. 33(1): p. 1-9.
126. Montagnese, S., A. Biancardi, S. Schiff, P. Carraro, et al., *Different biochemical correlates for different neuropsychiatric abnormalities in patients with cirrhosis*. Hepatology, 2010: p. In press.
127. Montagnese, S., C. Jackson, M.Y. Morgan, *Spatio-temporal decomposition of the electroencephalogram in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 2007. 46(3): p. 447-58.
128. Montagnese, S., B. Middleton, A.R. Mani, D.J. Skene, et al., *Sleep and circadian abnormalities in patients with cirrhosis: features of delayed sleep phase syndrome? Metab Brain Dis*, 2009. 24(3): p. 427-39.
129. Montagnese, S., B. Middleton, A.R. Mani, D.J. Skene, et al., *On the origin and the consequences of circadian abnormalities in patients with cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2010. 105(8): p. 1773-81.
130. Montagnese, S., B. Middleton, D.J. Skene, M.Y. Morgan, *Night-time sleep disturbance does not correlate with neuropsychiatric impairment in patients*

- with cirrhosis*. Liver Int, 2009. 29(9): p. 1372-82.
131. Moore, R.Y., *Neural control of the pineal gland*. Behav Brain Res, 1996. 73(1-2): p. 125-30.
 132. Morgan, M.Y., A.W. Jakobovits, I.M. James, S. Sherlock, *Successful use of bromocriptine in the treatment of chronic hepatic encephalopathy*. Gastroenterology, 1980. 78(4): p. 663-70.
 133. Morgan, T.R., T.E. Moritz, C.L. Mendenhall, R. Haas, *Protein consumption and hepatic encephalopathy in alcoholic hepatitis. VA Cooperative Study Group #275*. J Am Coll Nutr, 1995. 14(2): p. 152-158.
 134. Moroni, F., R. Carpenedo, G. Mannaioni, A. Galli, et al., *Studies on the pharmacological properties of oxindole (2-hydroxyindole) and 5-hydroxyindole: are they involved in hepatic encephalopathy?* Adv Exp Med Biol, 1997. 420: p. 57-73.
 135. Moroni, F., R. Carpenedo, I. Venturini, M. Baraldi, et al., *Oxindole in pathogenesis of hepatic encephalopathy*. Lancet, 1998. 351(9119): p. 1861-.
 136. Mostacci, B., M. Ferlisi, A. Baldi Antognini, C. Sama, et al., *Sleep disturbance and daytime sleepiness in patients with cirrhosis: a case control study*. Neurol Sci, 2008. 29(4): p. 237-40.
 137. Nobili, L., M. Ferrara, F. Moroni, L. De Gennaro, et al., *Dissociated wake-like and sleep-like electro-cortical activity during sleep*. Neuroimage, 2011. 58(2): p. 612-9.
 138. Norenberg, M.D., Z. Huo, J.T. Neary, A. Roig-Cantesano, *The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission*. Glia, 1997. 21(1): p. 124-33.
 139. Norenberg, M.D., Y. Itzhak, A.S. Bender, *The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy*. Adv Exp Med Biol, 1997. 420: p. 95-111.
 140. Norenberg, M.D., A.R. Jayakumar, K.V. Rama Rao, K.S. Panickar, *New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling*. Metab Brain Dis, 2007. 22(3-4): p. 219-234.
 141. Olde Damink, S.W., R. Jalan, N.E. Deutz, D.N. Redhead, et al., *The kidney plays a major role in the hyperammonemia seen after simulated or actual GI bleeding in patients with cirrhosis*. Hepatology, 2003. 37(6): p. 1277-1285.
 142. Ong, J.P., A. Aggarwal, D. Krieger, K.A. Easley, et al., *Correlation between*

- ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. Am J Med, 2003. 114(3): p. 188-93.*
143. Oppong, K.N., H. Al-Mardini, M. Thick, C.O. Record, *Oral glutamine challenge in cirrhotics pre- and post-liver transplantation: a psychometric and analyzed EEG study. Hepatology, 1997. 26(4): p. 870-6.*
 144. Ott, P., F.S. Larsen, *Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. Neurochem Int, 2004. 44(4): p. 185-198.*
 145. Parsons-Smith, B.G., W.H.J. Summerskill, A.M. Dawson, S. SHERLOCK, *The electroencephalograph in liver disease. The Lancet, 1957. 2: p. 867-871.*
 146. Pedersen, H.R., H. Ring-Larsen, N.V. Olsen, F.S. Larsen, *Hyperammonemia acts synergistically with lipopolysaccharide in inducing changes in cerebral hemodynamics in rats anaesthetised with pentobarbital. J Hepatol, 2007. 47(2): p. 245-52.*
 147. Phillips, G.B., R. Schwartz, G.J. Gabuzda, Jr., C.S. Davidson, *The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. N Engl J Med, 1952. 247(7): p. 239-46.*
 148. Poo, J.L., J. Gongora, F. Sanchez-Avila, S. Aguilar-Castillo, et al., *Efficacy of oral L-ornithine-L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. Results of a randomized, lactulose-controlled study. Ann Hepatol, 2006. 5(4): p. 281-8.*
 149. Pugh, R.N., I.M. Murray-Lyon, J.L. Dawson, M.C. Pietroni, et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg, 1973. 60(8): p. 646-649.*
 150. Quay, W.B., *Circadian and Estrous Rhythms in Pineal Melatonin and 5-Hydroxy Indole-3-Acetic Acid. Proc Soc Exp Biol Med, 1964. 115: p. 710-3.*
 151. Quero, J.C., S.W. Schalm, *Subclinical hepatic encephalopathy. Semin Liver Dis, 1996. 16(3): p. 321-328.*
 152. Raabe, W., *Ammonium decreases excitatory synaptic transmission in cat spinal cord in vivo. J Neurophysiol, 1989. 62(6): p. 1461-1473.*
 153. Raabe, W., *Ammonium ions abolish excitatory synaptic transmission between cerebellar neurons in primary dissociated tissue culture. J Neurophysiol, 1992. 68(1): p. 93-99.*
 154. Rechtschaffen, A., A. Kales, *A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects. Bethesda,*

MD: National Institutes of Health, 1968.

155. Rees, C.J., K. Oppong, H. Al Mardini, M. Hudson, et al., *Effect of L-ornithine-L-aspartate on patients with and without TIPS undergoing glutamine challenge: a double blind, placebo controlled trial*. Gut, 2000. 47(4): p. 571-4.
156. Retey, J.V., M. Adam, J.M. Gottselig, R. Khatami, et al., *Adenosinergic mechanisms contribute to individual differences in sleep deprivation-induced changes in neurobehavioral function and brain rhythmic activity*. J Neurosci, 2006. 26(41): p. 10472-9.
157. Retey, J.V., M. Adam, E. Honegger, R. Khatami, et al., *A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(43): p. 15676-81.
158. Reynolds, N., S. Downie, K. Smith, G. Kircheis, et al., *Treatment with L-ornithine-L-aspartate (LOLA) infusion restores muscle protein synthesis responsiveness to feeding in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 1999. 30((Suppl)): p. 65.
159. Riggio, O., F. Ariosto, M. Merli, M. Caschera, et al., *Short-term oral zinc supplementation does not improve chronic hepatic encephalopathy. Results of a double-blind crossover trial*. Dig Dis Sci, 1991. 36(9): p. 1204-8.
160. Riggio, O., C. Efrati, C. Catalano, F. Pediconi, et al., *High prevalence of spontaneous portal-systemic shunts in persistent hepatic encephalopathy: a case-control study*. Hepatology, 2005. 42(5): p. 1158-65.
161. Riggio, O., A. Masini, C. Efrati, F. Nicolao, et al., *Pharmacological prophylaxis of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a randomized controlled study*. J Hepatol, 2005. 42(5): p. 674-9.
162. Riggio, O., L. Ridola, C. Pasquale, S. Nardelli, et al., *Evidence of persistent cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. 9(2): p. 181-3.
163. Ridders, L., P. Jenko, D. Rudman, D. Freides, *Subclinical hepatic encephalopathy: detection, prevalence, and relationship to nitrogen metabolism*. Gastroenterology, 1978. 75(3): p. 462-469.
164. Rolando, N., J. Wade, M. Davalos, J. Wendon, et al., *The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure*. Hepatology, 2000. 32(4 Pt 1): p. 734-739.
165. Romero-Gomez, M., L. Grande, I. Camacho, *Prognostic value of altered oral glutamine challenge in patients with minimal hepatic encephalopathy*.

Hepatology, 2004. 39(4): p. 939-43.

166. Romero-Gomez, M., L. Grande, I. Camacho, S. Benitez, et al., *Altered response to oral glutamine challenge as prognostic factor for overt episodes in patients with minimal hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 2002. 37(6): p. 781-7.
167. Rose, C., A. Michalak, P. Pannunzio, G. Therrien, et al., *L-ornithine-L-aspartate in experimental portal-systemic encephalopathy: therapeutic efficacy and mechanism of action*. Metab Brain Dis, 1998. 13(2): p. 147-57.
168. Ross, B.D., S. Jacobson, F. Villamil, J. Korula, et al., *Subclinical hepatic encephalopathy: proton MR spectroscopic abnormalities*. Radiology, 1994. 193(2): p. 457-63.
169. Rucci, P., G. Taliani, L. Cirrincione, A. Alberti, et al., *Validity and reliability of the Italian version of the Chronic Liver Disease Questionnaire (CLDQ-I) for the assessment of health-related quality of life*. Dig Liver Dis, 2005. 37(11): p. 850-60.
170. Sagales, T., V. Gimeno, M.D. de la Calzada, F. Casellas, et al., *Brain mapping analysis in patients with hepatic encephalopathy*. Brain Topogr, 1990. 2(3): p. 221-8.
171. Sakurabayashi, S., S. Sezai, Y. Yamamoto, M. Hirano, et al., *Embolization of portal-systemic shunts in cirrhotic patients with chronic recurrent hepatic encephalopathy*. Cardiovasc Intervent Radiol, 1997. 20(2): p. 120-4.
172. Saper, C.B., T.E. Scammell, J. Lu, *Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms*. Nature, 2005. 437(7063): p. 1257-63.
173. Scott, N.R., D. Stambuk, J. Chakraborty, V. Marks, et al., *The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease*. Br J Clin Pharmacol, 1989. 27(2): p. 205-13.
174. Sharma, P., B.C. Sharma, S.K. Sarin, *Predictors of nonresponse to lactulose for minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis*. Liver Int, 2009. 29(9): p. 1365-71.
175. Shawcross, D., R. Jalan, *The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(19-20): p. 2295-304.
176. Sherlock, S., W.H. Summerskill, L.P. White, E.A. Phear, *Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease*. Lancet, 1954. 267(6836): p. 454-457.

177. Staedt, U., H. Leweling, R. Gladisch, C. Kortsik, et al., *Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis. A double-blind, randomized study using a four-fold crossover design.* J Hepatol, 1993. 19(3): p. 424-30.
178. Stauch, S., G. Kircheis, G. Adler, K. Beckh, et al., *Oral L-ornithine-L-aspartate therapy of chronic hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled double-blind study.* J Hepatol, 1998. 28(5): p. 856-64.
179. Steindl, P.E., P. Ferenci, W. Marktl, *Impaired hepatic catabolism of melatonin in cirrhosis.* Ann Intern Med, 1997. 127(6): p. 494.
180. Steindl, P.E., B. Finn, B. Bendok, S. Rothke, et al., *Disruption of the diurnal rhythm of plasma melatonin in cirrhosis.* Ann Intern Med, 1995. 123(4): p. 274-7.
181. Strauss, E., R. Tramote, E.P. Silva, W.R. Caly, et al., *Double-blind randomized clinical trial comparing neomycin and placebo in the treatment of exogenous hepatic encephalopathy.* Hepatogastroenterology, 1992. 39(6): p. 542-5.
182. Such, J., R. Frances, C. Munoz, P. Zapater, et al., *Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites.* Hepatology, 2002. 36(1): p. 135-41.
183. Sushma, S., S. Dasarathy, R.K. Tandon, S. Jain, et al., *Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial.* Hepatology, 1992. 16(1): p. 138-44.
184. Szerb, J.C., R.F. Butterworth, *Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system.* Prog Neurobiol, 1992. 39(2): p. 135-153.
185. Takashi, M., M. Igarashi, S. Hino, K. Takayasu, et al., *Portal hemodynamics in chronic portal-systemic encephalopathy. Angiographic study in seven cases.* J Hepatol, 1985. 1(5): p. 467-76.
186. Tarter, R.E., A.M. Hegedus, D.H. Van Thiel, *Neuropsychiatric sequelae of portal-systemic encephalopathy: a review.* Int J Neurosci, 1984. 24(3-4): p. 203-216.
187. Taylor-Robinson, S.D., J. Sargentoni, C.D. Marcus, M.Y. Morgan, et al., *Regional variations in cerebral proton spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy.* Metab Brain Dis, 1994. 9(4): p. 347-59.
188. Teasdale, G., B. Jennett, *Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale.* Lancet, 1974. 2(7872): p. 81-84.

189. Trzepacz, P.T., R.E. Tarter, A. Shah, R. Tringali, et al., *SPECT scan and cognitive findings in subclinical hepatic encephalopathy*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1994. 6(2): p. 170-5.
190. Van Caulaert, C., C. Deviller, *Ammoniémie expérimentale après ingestion de chlorure d'ammonium chez l'homme à l'état normal et pathologique*. C R Soc Biol (Paris), 1932. 111: p. 50.
191. Van der Rijt, C.C., S.W. Schalm, G.H. De Groot, M. De Vlieger, *Objective measurement of hepatic encephalopathy by means of automated EEG analysis*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1984. 57(5): p. 423-426.
192. van Leeuwen, P.A., C.L. van Berlo, P.B. Soeters, *New mode of action for lactulose*. Lancet, 1988. 1(8575-6): p. 55-6.
193. Venturini, I., L. Corsi, R. Avallone, F. Farina, et al., *Ammonia and endogenous benzodiazepine-like compounds in the pathogenesis of hepatic encephalopathy*. Scand J Gastroenterol, 2001. 36(4): p. 423-5.
194. Victor, M., R.D. Adams, M. Cole, *The acquired (non-Wilsonian) type of chronic hepatocerebral degeneration*. Medicine (Baltimore), 1965. 44(5): p. 345-396.
195. Vogels, B.A., B. van Steynen, M.A. Maas, G.G. Jorning, et al., *The effects of ammonia and portal-systemic shunting on brain metabolism, neurotransmission and intracranial hypertension in hyperammonaemia-induced encephalopathy*. J Hepatol, 1997. 26(2): p. 387-95.
196. Ware, J.E., Jr., C.D. Sherbourne, *The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection*. Med Care, 1992. 30(6): p. 473-83.
197. Watanabe, A., *Cerebral changes in hepatic encephalopathy*. J Gastroenterol Hepatol, 1998. 13(7): p. 752-60.
198. Webb, W.B., H.W. Agnew, Jr., *Stage 4 sleep: influence of time course variables*. Science, 1971. 174(16): p. 1354-6.
199. Weissenborn, K., J.C. Ennen, H. Schomerus, N. Ruckert, et al., *Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 2001. 34(5): p. 768-773.
200. Werth, E., D.J. Dijk, P. Achermann, A.A. Borbely, *Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations*. Am J Physiol, 1996. 271(3 Pt 2): p. R501-10.

201. Weyerbrock, A., J. Timmer, F. Hohagen, M. Berger, et al., *Effects of light and chronotherapy on human circadian rhythms in delayed sleep phase syndrome: cytokines, cortisol, growth hormone, and the sleep-wake cycle*. Biol Psychiatry, 1996. 40(8): p. 794-7.
202. Wilkinson, D.J., N.J. Smeeton, P.W. Watt, *Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link*. Prog Neurobiol, 2010. 91(3): p. 200-19.
203. Wiltfang, J., W. Nolte, J. von Heppe, E. Bahn, et al., *Sleep disorders and portal-systemic encephalopathy following transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt in patients with liver cirrhosis. Relation to plasma tryptophan*. Adv Exp Med Biol, 1999. 467: p. 169-76.
204. Wirtz-Justice, A., F. Benedetti, M. Terman, *Chronotherapeutics for Affective Disorders*. Ed. Karger, Milano, 2009.
205. Yamamoto, M., M. Iwasa, K. Matsumura, Y. Nakagawa, et al., *Improvement of regional cerebral blood flow after oral intake of branched-chain amino acids in patients with cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2005. 11(43): p. 6792-9.
206. Yao, K.Q., Q.M. Qu, H.P. Lei, *Effect of (+/-)-, (+)- and (-)-gossypol on the lactate dehydrogenase-X activity of rat testis*. J Ethnopharmacol, 1987. 20(1): p. 25-29.
207. Younossi, Z.M., G. Guyatt, M. Kiwi, N. Boparai, et al., *Development of a disease specific questionnaire to measure health related quality of life in patients with chronic liver disease*. Gut, 1999. 45(2): p. 295-300.
208. Zieve, L., *The mechanism of hepatic coma*. Hepatology, 1981. 1(4): p. 360-365.