

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina -DIMED-

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: EPATOLOGIA E CHIRURGIA EPATOBILIARE E
TRAPIANTOLOGICA
CICLO XXVI

**RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE NELLA PATOGENESI
DELL'ACUTE ON CHRONIC LIVER FAILURE**

Direttore della Scuola: Ch. mo Prof. GAETANO THIENE

Coordinatore d'indirizzo: Ch. mo Prof. ANGELO GATTA

Supervisore: Ch. mo Prof. PAOLO ANGELI

Dottorando: Dott. ssa ELISABETTA GOLA

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE.....	1
<i>1.1 ACLF: Acute on Chronic Liver Failure.....</i>	1
<i>1.2 PRRs (Pathogen Recognition Receptors) E INFIAMMAZIONE.....</i>	4
<i>1.2.1 Struttura e ligandi dei recettori di membrana TLRs.....</i>	5
<i>1.2.2 Recettori NOD-like receptors (NLRs) e Inflammasoma.....</i>	8
<i>1.3 RUOLO DELL'INFLAMMASOMA NELLE PATOLOGIE EPATICHE.....</i>	12
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	17
3. MATERIALI E METODI.....	19
<i>3.1 PAZIENTI.....</i>	19
<i>3.2 SEPARAZIONE DEI PBMCs.....</i>	19
<i>3.3 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLE CITOCHINE.....</i>	20
<i>3.4 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY DELL'INFLAMMASOMA.....</i>	21
<i>3.4.1 Estrazione dell'RNA.....</i>	21
<i>3.4.2 Quantificazione dell'RNA totale.....</i>	21
<i>3.4.3 Retrotrascrizione dell'RNA totale.....</i>	22
<i>3.4.4 Q-PCR: Real-Time PCR Quantitativa.....</i>	22
4. RISULTATI.....	27
<i>4.1 CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLE CITOCHINE.....</i>	27
<i>4.2 ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY INFIAMMATORIO.....</i>	29
5. DISCUSSIONE.....	31
6. BIBLIOGRAFIA.....	39

RIASSUNTO

Background. L'Acute on Chronic Liver Failure (ACLF) è una condizione clinica che colpisce i pazienti con cirrosi ed è caratterizzata da un peggioramento acuto della funzionalità epatica, danno ad uno o più organi ed elevata mortalità a breve termine. Recentemente è stata proposta una nuova classificazione dell'ACLF sulla base del Chronic Liver Failure-Sequential Organ Failure Assessment (CLIF-SOFA) score. Nel quadro complesso dell'ACLF, l'infiammazione sistemica sembra avere un ruolo cruciale essendo coinvolta apparentemente nello sviluppo di ACLF e nel danno d'organo; i dati in letteratura riguardanti la risposta infiammatoria in questa condizione clinica sono scarsi e lacunosi.

In questo scenario, la nostra ricerca è stata indirizzata nell'identificare e descrivere il profilo citochinico pro e anti infiammatorio nei pazienti con ACLF e senza ACLF, al fine di caratterizzare il legame tra la risposta infiammatoria e ACLF. E' stata inoltre studiata l'espressione genica dei principali mediatori dell'infiammazione (NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , CASP-1) e dell'apoptosi (CASP-3) nei Peripheral Blood Mononucleated Cells (PBMCs) dei pazienti con o senza ACLF.

Scopo. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il profilo citochinico pro e anti infiammatorio all'ammissione e durante la prima settimana di ricovero in pazienti con e senza ACLF in modo da caratterizzare il link tra risposta infiammatoria e ACLF e valutare il possibile ruolo dell'inflammasoma e della sua iper-attivazione nella patogenesi dell'ACLF.

Materiali e metodi. Sono stati raccolti i dati (parametri vitali quali: pressione arteriosa sistemica, frequenza cardiaca e saturazione O₂, dati anamnestici, dati di laboratorio: emocromo, bilirubina totale e diretta, AST, ALT, GGT, ALP, creatinina, urea, sodio, potassio, PT, INR, albumina, ammoniemia, emocolture, urocolture, di microbiologia e scores clinici ed epatici, Child-Pugh, MELD score, all'ammissione in ospedale e al

momento dell'inclusione-ricovero in unità specializzata, giorno 1) di 72 pazienti consecutivi con cirrosi e ospedalizzati per complicazioni della patologia epatica in corso (età= 59.1 ± 12.4 anni, MELD= 17.6 ± 7.8), 21 di questi con ACLF (secondo il CLIF-SOFA score). I livelli di citochine circolanti (TNF- α , IL-6, IL-10) sono stati misurati tramite test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) nei giorni 2 e 7 dopo il ricovero. Il rapporto TNF- α /IL-10 è stato usato per valutare l'equilibrio pro/anti infiammatorio. I livelli di espressione genica di NF-kB, caspasi-3, caspasi-1, TNF- α e IL-1 β sono stati misurati nei Peripheral Blood Mononucleated Cells (PBMCs) di pazienti con e senza ACLF.

Risultati. L'infezione batterica è stata riscontrata nel 52.4% e 37.3% di pazienti con e senza ACLF rispettivamente (p= NS [0.35]). I livelli di TNF- α e IL-6 sono risultati significativamente più alti in pazienti con ACLF che in pazienti no-ACLF (TNF- α : p=0.015; IL-6: p=0.011). Il rapporto TNF- α /IL-10 è risultato maggiore nel gruppo con ACLF vs no-ACLF (p=0.019).

Al giorno 7 dal ricovero, il gruppo ACLF ha mostrato una riduzione significativa dei livelli di IL-10 rispetto al gruppo no-ACLF (Δ IL-10= -1.58 pg/ml-IQT: -6.15 to 0.42 pg/ml vs 0.05 pg/ml-IQT: 0.00 to 4.61 pg/ml, p=0.026).

L'analisi dell'espressione genica mostra un aumento significativo dei livelli di espressione di NF-kB (p=0.03), caspasi-3 (p=0.03), caspasi-1 (p=0.05), TNF- α (p=0.05) e IL-1 β (p=0.05) nei PBMCs di pazienti con ACLF vs no-ACLF.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test di significatività non parametrico di Mann-Whitney.

Conclusioni. I risultati hanno evidenziato un significativo e progressivo squilibrio pro infiammatorio nei pazienti con ACLF vs no-ACLF; il pathway effettore (espressione genica di NF-kB, caspasi-1 and IL-1 β) è risultato significativamente over-espresso in PBMCs di pazienti con ACLF vs no-ACLF.

ABSTRACT

Background. Acute on Chronic Liver Failure (ACLF) is a clinical syndrome that affect patients with cirrhosis, characterized by an acute deterioration of liver function, failure of one or more organs and high short term mortality. Recently it has been proposed a new classification of ACLF according to chronic liver failure-sequential organ failure assessment (CLIF-SOFA) score. Systemic inflammation seems to play a critical role in the development of ACLF and organ failure, however limited data are available regarding the inflammatory response in patients with ACLF.

Aim. The aim of the study was to evaluate the pro-anti inflammatory cytokine profile on admission and during the first week of hospitalization in patients with and without ACLF, in order to characterize the link between inflammatory response and ACLF and to evaluate a possible role of inflammasome iper-activation in the pathogenesis of ACLF.

Methods. Seventy-two consecutive patients (Age= 59.1 ± 12.4 years, MELD= 17.6 ± 7.8) who were hospitalized for an acute decompensation of cirrhosis were included. 21 of them (29.2%) were defined ACLF (according to CLIF-SOFA score). The plasma TNF- α , IL-6, IL-10 expression levels were detected by ELISA method at day 2 and 7 after admission. TNF- α /IL-10 ratio was used to evaluate the pro-inflammatory/anti-inflammatory balance. Gene expression levels of NF-kB, caspase-3, caspase-1, TNF- α and IL-1 β were detected in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) from ACLF and no-ACLF patients. In order to compare data between patients with and without ACLF, no-parametrical analysis (Mann-Whitney test) was performed.

Results: The plasma levels of TNF- α and IL-6 were found to be significantly higher in patients with ACLF than in those without ACLF ($p < 0.05$, $p < 0.05$, respectively). Gene expression levels of NF-kB ($p = 0.03$), caspase-3 ($p = 0.03$), caspase-1 ($p = 0.05$), TNF- α ($p = 0.05$) e IL-1 β ($p = 0.05$) resulted significantly higher in PBMCs from ACLF vs no-

ACLF patients. The rates of bacterial infection as precipitating event of ACLF did not differ statistically in a significant way between the 2 groups of patients (52.4% vs 37.3%, respectively, p=NS).

Conclusions. These results showed a significant and progressive pro inflammatory imbalance in patients with ACLF as compared with patients without ACLF; the effector pathway (gene expression of NF-kB, caspase-1 and IL-1 β) is significantly over-expressed in PBMCs from patients with ACLF vs no-ACLF. This may contribute to the pathophysiology of inflammation in these patients.

1. INTRODUZIONE

1.1 ACLF: Acute on Chronic Liver Failure

L'Acute Decompensation (AD), definita come l'insorgenza di una o più complicanze delle patologie epatiche (per esempio ascite, encefalopatia, emorragie gastrointestinali, infezioni batteriche) rappresenta la maggior causa di ospedalizzazione di pazienti con cirrosi. L'AD insorge in molti pazienti cirrotici in assenza di altri significativi eventi precipitanti, in altri è associata a danno d'organo/i (es. peggioramento della funzionalità epatica e/o danno ad altri organi). Pazienti con AD e danno d'organo sono ad alto rischio di morte a breve termine. E' diventata consuetudine considerare questi pazienti come soggetti con Acute on Chronic Liver Failure (ACLF). Fino al 2012 le definizioni di ACLF differivano molto le une dalle altre e si basavano più su base teorica che sperimentale, mancando ancora una definizione condivisa, accettata e usata universalmente. A causa di questa carenza altre importanti caratteristiche dell'ACLF rimanevano sconosciute tra cui la frequenza di fattori precipitanti, la storia naturale e i meccanismi patogenetici.

Recentemente, l'acute on chronic liver failure (ACLF) è stata definita dal Canonic Study come (a) scompenso acuto in corso di cirrosi (ascite, encefalopatia epatica HE, emorragie gastrointestinali, infezioni batteriche o combinazioni di queste); (b) danno ad almeno un organo; (c) aumento del tasso di mortalità (>15%) a breve termine (28 giorni). Il danno d'organo è stato definito sulla base del SOFA score modificato adattato per pazienti con cirrosi (CLIF-SOFA score). (1)

Il Canonic Study ha descritto i criteri diagnostici, la prevalenza, le caratteristiche, il grado di severità, il corso naturale della condizione clinica, i predittori di sopravvivenza e i potenziali meccanismi fisiopatologici di ACLF. (2)

Sommando i punteggi attribuiti ad ogni danno d'organo sulla base del CLIF-SOFA score, sono stati differenziati i pazienti con ACLF e senza ACLF (cioè con “semplice” AD). E' stato inoltre possibile stabilire il diverso grado di ACLF rendendo possibile la classificazione in no-ACLF, ACLF grade 1, ACLF grade 2 e ACLF grade 3 (Tabella 1).

Tabella 1: definizione e stratificazione di ACLF stabilita sulla base di dati ottenuti dall'arruolamento di 1287 pazienti che non hanno ricevuto trapianto di fegato nei 28 giorni di arruolamento.

ACLF grade*	Diagnostic criteria for ACLF and ACLF grades	Prevalence (N=1343)	28-day transplant-free mortality rate	90-day transplant-free mortality rate
No ACLF	- No organ failure - One organ failure (either liver failure, coagulation failure, circulatory or respiratory failure) with serum creatinine <133 µmol/L and no hepatic encephalopathy. - Single cerebral failure and serum creatinine <133 µmol/L	1040 (77.4)	47/1007 (4.7)	130/928 (14.0)
ACLF	Presence of ACLF, any grade	303 (22.6)	95/280 (33.9)	131/256 (51.2)
ACLF grade 1	- Single kidney failure - Single “non-kidney” organ failure with serum creatinine ranging from 133 µmol/L to 176 µmol/L and/or mild-to-moderate hepatic encephalopathy*	148 (11.0)	31/140 (22.1)	50/123 (40.7)
ACLF grade 2	Presence of 2 organ failures	108 (8.0)	31/97 (32.0)	47/90 (52.2)
ACLF grade 3	Presence ≥3 organ failures	47 (3.4)	33/43 (76.7)	34/43 (79.1)

Questo studio ha mostrato come i pazienti cirrotici con AD e sola insufficienza epatica (o un altro danno ad organo singolo “non-kidney”) abbiano un basso rischio di morte a breve termine. Nel caso in cui il paziente presenti anche disfunzione renale e/o epatica con associata lieve-moderata encefalopatia, il rischio di mortalità a 28 giorni aumenta. Oltre alla presenza di insufficienza d'organo e rischio di mortalità molto elevato a breve termine, i pazienti con ACLF rispetto a quelli che non la sviluppano mostrano altre caratteristiche quali: età più bassa, eziologia più frequentemente alcolica e meno frequentemente da epatite C ed esposizione ad una maggiore prevalenza di potenziali eventi precipitanti (alcolismo particolarmente attivo, infezioni batteriche gravi e una risposta infiammatoria sistemica intensa, stabilita da alta conta leucocitaria e

concentrazione di proteina C-reattiva plasmatica). Dallo studio è emerso che l'intensità della risposta infiammatoria aveva un andamento parallelo alla gravità di ACLF.

Il CANONIC, a differenza degli studi precedenti, ha descritto l'ACLF come una patologia frequente e associata ad un'elevatissima mortalità a breve termine rispetto a pazienti no-ACLF (tasso di mortalità a 28 giorni nello studio è 15 volte superiore in pazienti con ACLF). L'ACLF è risultata infine costituire la maggior causa di morte nei pazienti cirrotici dello studio.

La diagnosi di infezione batterica, nel CANONIC, è stata fatta sulla base di procedure di routine. Nello studio gli autori ipotizzavano che il rilascio di pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) o di danger-associated molecular patterns (DAMPs) fossero decisivi "eventi precipitanti". Inoltre, dal lavoro, emergono due predittori inaspettati di ACLF associati a mortalità: il grado di reazione infiammatoria stimato dalla conta dei leucociti, risultato essere un predittore indipendente di sviluppo di ACLF post-enrollment e di mortalità associata ad ACLF, e il primo episodio di AD. Contrariamente a quanto ci si sarebbe potuto aspettare i pazienti senza precedente AD sviluppavano una forma più grave di ACLF con livelli elevati di mediatori infiammatori e più alti tassi di mortalità rispetto ai pazienti con storia di precedente AD. E' stato dimostrato che una risposta infiammatoria eccessiva, come quella osservata nei pazienti con ACLF, può indurre danno tissutale (processo chiamato immunopatologia) e organ failure. (3) D'altra parte è stato suggerito che l'infiammazione che induce danno tissutale dipenda non solo dall'intensità della risposta infiammatoria in sé, ma anche dalla capacità intrinseca degli organi di tollerare gli effetti della risposta infiammatoria. (3) La diminuzione della tolleranza degli organi all'insulto infiammatorio potrebbe spiegare il danno tissutale conseguente ad un moderato aumento della risposta infiammatoria. (3) Dai dati del CANONIC quindi, si evince che pazienti con ACLF potrebbero essere caratterizzati da una diminuzione della capacità di tolleranza alla

risposta infiammatoria verso un agente esterno; questa diminuzione sembra essere più marcata in pazienti senza una precedente storia di AD che in quelli con precedente storia di AD.

1.2 PRRs (Pathogen Recognition Receptors) E INFIAMMAZIONE

La risposta immunitaria si suddivide in innata e adattativa. L'immunità innata è, per definizione, universale, rapida, altamente conservata e presente dalla nascita; generalmente è la prima forma di difesa verso un insulto esterno. La risposta immunitaria adattativa è altamente specifica e si sviluppa molto più lentamente in seguito all'esposizione a tossine o a patogeni. La risposta immunitaria innata è coinvolta in diversi processi infiammatori ed ha un ruolo particolarmente rilevante nelle fasi iniziali e finali delle infezioni batteriche e virali. Gli effettori del sistema immunitario innato, i PRRs (pathogen recognition receptors), vengono attivati immediatamente dopo l'esposizione ad agenti infettivi limitandone, successivamente, la replicazione. I PRRs riconoscono e legano strutture altamente conservate, dal punto di vista evolutivo, chiamate PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). (4-6) I PRRs sono espressi da diversi tipi cellulari tra cui macrofagi, monociti, cellule dendritiche, neutrofilii, cellule epiteliali e, in generale, in tutte le cellule della risposta immunitaria adattativa. I PRRs comprendono i recettori di membrana Toll-like Receptors (TLRs) e C-type lectins (CTLs) che "controllano" la presenza di PAMPs nell'ambiente extracellulare e nei compartimenti endosomali. La trasduzione del segnale di questi recettori converge in un comune set di modulatori del segnale che spesso includono l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) e AP-1 (activator protein-1) che guidano la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie e dei membri della famiglia dei fattori di trascrizione di IRF che mediano la risposta antivirale dipendente dall'interferone di tipo 1 (IFN-dependent). Un altro gruppo di recettori PRRs sono quelli intracellulari denominati NOD-like receptors

(NLRs) che riconoscono e legano le PAMPs e altre molecole dette danger-associated molecular patterns (DAMPs). (7)

1.2.1 *Struttura e ligandi dei recettori di membrana TLRs*

I TLRs si dividono in 2 sottogruppi a seconda della loro localizzazione cellulare e del loro ligando (PAMP). Un gruppo è composto dai TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, espressi sulla superficie cellulare, che riconoscono e legano diversi substrati microbici quali ad esempio lipidi, lipoproteine e proteine; l'altro gruppo comprende TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, espressi esclusivamente in vescicole intracellulari così come nel reticolo endoplasmatico (ER), endosomi, lisosomi ed endolisosomi, che riconoscono e legano acidi nucleici microbici. I TLRs hanno un dominio transmembrana al quale si lega un dominio extracellulare ricco in leucina e un dominio intracellulare citoplasmatico (TIR) (Figura 1).

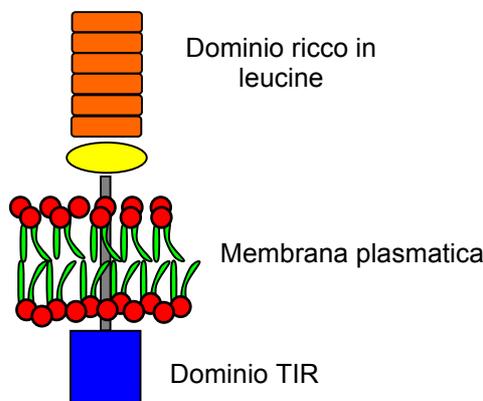


Figura 1: *struttura dei TLRs.*

Il TLR4, uno dei TLR maggiormente studiati e conosciuti, è stato identificato come il recettore del lipopolisaccaride (LPS), un componente della membrana cellulare dei batteri Gram-negativi. Il TLR4 è stato il primo TLR ad essere identificato e la cui struttura è stata cristallizzata (Protein Data Bank [PDB] ID: 3FXI) (Figura 2) (8)

rendendo possibile la simulazione computazionale del modello che predice il meccanismo di interazione con il ligando.

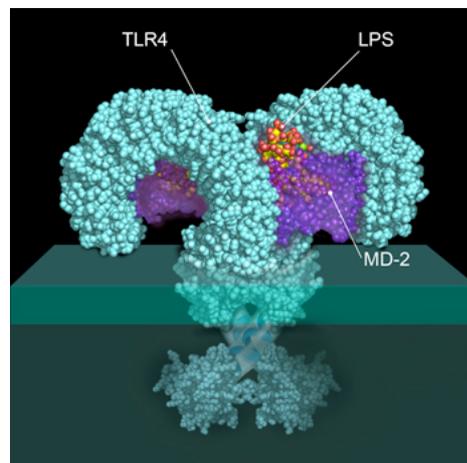


Figura 2: struttura molecolare del complesso Toll-like receptor 4. Il TLR4 forma un complesso con il fattore di differenziazione mieloide 2 (MD-2) e con LPS. Il complesso si forma quando il TLR4 incontra l'LPS sulla superficie dei batteri Gram negativi. Il riconoscimento dell'LPS innesca una cascata di segnali che porta alla produzione di fattori per combattere l'infezione. (medicalpress.com)

Il TLR4 forma un complesso con il fattore di differenziazione mieloide 2 (MD2) sulla superficie cellulare, che consente il legame con LPS. Uno studio strutturale del complesso TLR4-MD2 con LPS ha mostrato che cinque o sei catene lipidiche di LPS legano la parte idrofobica di MD2 e che le rimanenti catene lipidiche si associano con il TLR4 (Figura 3). (8, 9)

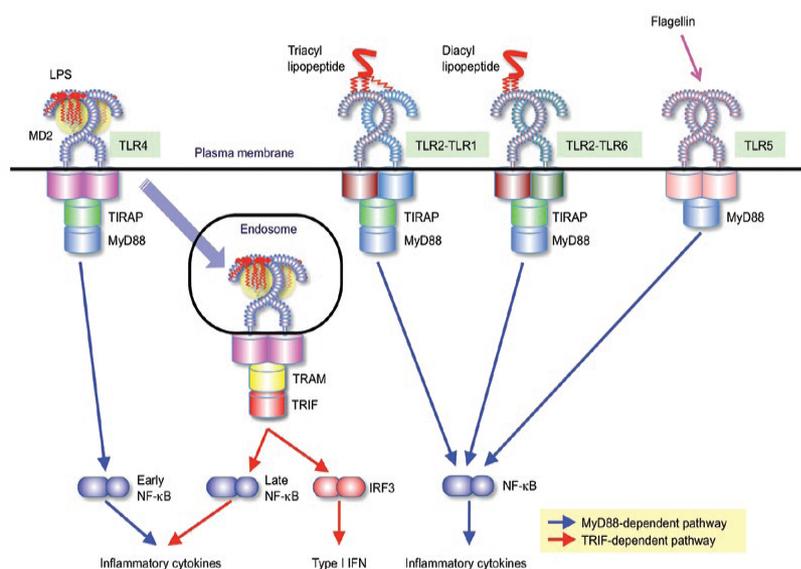


Figura 3: riconoscimento da parte dei TLRs delle PAMPs sulla superficie cellulare da Nature 458, 1191–1195 (2009).

Il TLR4 è espresso nelle cellule epiteliali, nelle cellule immunitarie e nelle cellule tumorali. Molte cellule umane esprimono bassi livelli di TLR4 ed elevati livelli di proteine antagoniste dei TLRs, come la proteina Toll-interacting protein (TOLLIP), che prevengono l'over-espressione di TLR. Il TLR4 risponde all'invasione di vari agenti patogeni esogeni (PAMPs) e riconosce i ligandi endogeni dalle cellule necrotiche (DAMPs).

Il dominio TIR, che presenta omologia con il recettore dell'interleuchina 1 (IL-1R), è responsabile della propagazione del segnale all'interno della cellula attraverso una cascata del segnale. (10)

Il legame del ligando al TLR4, porta all'attivazione del complesso TLR-4/MD2 che culmina con la produzione di citochine pro-infiammatorie attraverso il pathway myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) dipendente, e con la produzione dell'interferone di tipo-1 attraverso il pathway MyD88 indipendente (Figura 4). Il signaling MyD88-dependent recluta IRAK1 (IL-1R-associated kinase) e IRAK4, e TRAF6 [TNF (tumour necrosis factor)-receptor-associated factor 6] rendendo attivo il fattore trascrizionale NF-kB grazie alla dissociazione del suo inibitore IκB. Questo processo culmina con la traslocazione di NF-kB nel nucleo e con la conseguente attivazione della trascrizione dei geni immunoregolatori. MyD88 attiva anche MAPKs (mitogen-activated protein kinases) che stimola il pathway di AP-1 (activator protein-1).

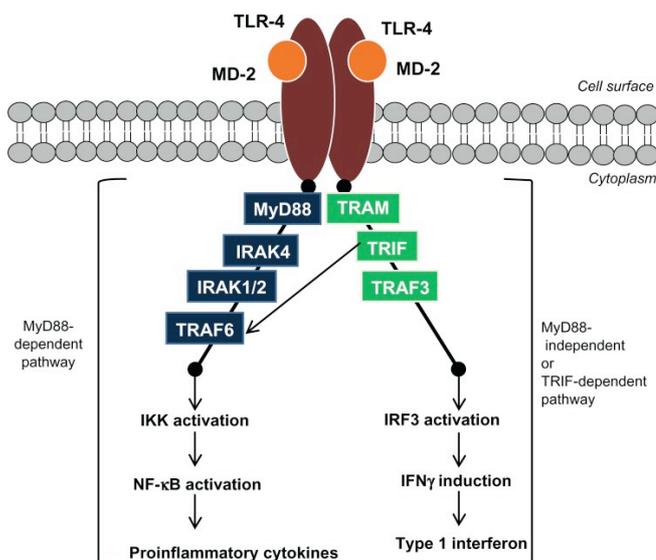


Figura 4: *illustrazione schematica del signaling del TLR4.*

1.2.2 Recettori NOD-like receptors (NLRs) e Inflammasoma

I NLRs sono recettori intracellulari appartenenti alla famiglia dei PRRs che riconoscono PAMPs e DAMPs. La famiglia dei NLRs è caratterizzata dalla presenza di un dominio centrale (NACHT) al quale si legano all'estremità C-terminale leucine-rich repeats (LRRs) e all'N-terminale un dominio caspase recruitment (CARD). Il dominio NACHT è l'unico comune a tutti i membri della famiglia dei NLRs. Filogeneticamente si distinguono 3 sottofamiglie di NLRs: NOD, NLRPs e IPAF.

Il recettore NLR forma un complesso con la molecola effettrice, pro-caspasi 1, con o senza il contributo di una molecola adattatrice come ad esempio l'apoptosis-associated speck CARD-domain (ASC). Il complesso così formatosi prende il nome di “inflammasoma”. Il concetto di inflammasoma fu introdotto per la prima volta da Tschopp e collaboratori nel 2002 che lo definirono un complesso multiproteico in grado, in seguito ad un insulto infiammatorio, di controllare la produzione di citochine pro-infiammatorie importanti quali l'interleuchina-1 β (IL-1 β) e l'interleuchina-18 (IL-18). (11) L'attivazione dell'inflammasoma consente il taglio proteolitico della pro-IL-1 β e della pro-IL-18 rendendole attive (IL-1 β e IL-18).

L'attivazione dell'inflammasoma avviene attraverso un processo composto da due fasi. La prima fase consiste nell'up-regolazione dell'espressione genica dell'inflammasoma, operata principalmente dall'attivazione dell'NF-kB via TLRs; la seconda consiste nell'attivazione dell'inflammasoma mediata da un suo ligando. I ligandi dell'inflammasoma includono sia PAMPs che DAMPs. (12, 13) Attualmente sono stati descritti 4 tipi di inflammasoma: NLRP1 (NALP1); NLRP3 (NALP3, cryporin); NLRC4 (IPAF) e AIM2. NLRP3 è stato il primo inflammasoma ad essere descritto da Hoffman. In un secondo momento Agostini *et al.* dimostrarono la capacità dell'inflammasoma NLRP3 di processare la pro-IL-1 β . (14) Ad oggi, l'NLRP3 è l'inflammasoma più studiato e meglio caratterizzato; è formato dal NOD-like receptor NLRP3, dalla molecola adattatrice ASC e dalla molecola effettrice pro-caspasi 1. L'espressione genica di NLRP3 è strettamente regolata dai livelli trascrizionali di NF-kB. È stato dimostrato come l'espressione di NLRP3 si riduce, in colture cellulari di macrofagi, in maniera dose-dipendente con un inibitore dell'NF-kB (Bay11-7082), confermando il ruolo cruciale dell'NF-kB nel priming dell'inflammasoma. (15)

Come già anticipato l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 richiede 2 segnali. Il primo segnale è costituito dall'attivazione trascrizionale di NLRP3 che avviene grazie all'induzione cellulare da parte di un attivatore dell'NF-kB, come ad esempio il legame dell'LPS al TLR4; il secondo segnale include il riconoscimento da parte dell'inflammasoma di una varietà di attivatori (DAMPs e PAMPs) (Tabella 2). (16)

Tabella 2: attivatori degli inflammasomi (*Journal of Hepatology* 2012 vol. 57:642–654).

Inflammasome	Activator
NLRP1 (NALP1)	<i>Bacillus anthracis</i> lethal toxin [8-11] MDP [10, 11]
NLRP3 (NALP3, cryoporin)	<p>Large particles via phagocytosis Monosodium urate crystals (MSU) [12] CPPD (calcium pyrophosphate dehydrate) [12] Alum [13] Silica [14] Asbestos [15] Amyloid beta [16] Hyaluronan [17] Hemozoin [18] Vaccine adjuvants (poly lactide-co-glycolide and polystyrene microparticles) [19] Cholesterol crystals [20]</p> <p>Bacterial toxins (pore-forming) <i>Listeria monocytogenes</i> Lysteriolysin O [21,22] <i>Staphylococcus aureus</i> alpha-toxin [21-23] <i>Aeromonas hydrophila</i> aerolysin [21,22] Streptolysin [24] Nigericin [21] Maitoxin (Dinoflagellates) [22]</p> <p>Ion channels and activators ATP(P2X7) [21] Influenza virus M2 channel protein [25] PAMPs (only if transferred to the cytoplasm by e.g. Streptolysin O pore-forming toxin) LPS, lipid A, PGN, MDP, LTA, Pam3, ssRNA, dsRNA, CpG DNA [26,27]</p>
NLR4 (IPAF)	<p>Gram - negative bacteria (flagellin-dependent and independent) <i>Salmonella typhimurium</i> [28] <i>Shigella flexneri</i> [28,29] <i>Legionella pneumophila</i> [30] <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [28]</p>
AIM2	<p>dsDNA bacterial [31,32] viral [31,32] mitochondrial [33] host [31]</p>

L'attivazione dell'inflammasoma culmina con l'attivazione della caspasi-1 e la secrezione di IL-1 β . I meccanismi molecolari di secrezione di IL-1 β non sono ancora completamente chiari. L'attività dell'inflammasoma e la disponibilità di pro-IL-1 β sono altamente influenzate dal pathway pro-infiammatorio come ad esempio quello coinvolto nel signaling intracellulare scatenato dal legame di LPS al TLR4. Per questo motivo diversi studi sperimentali hanno indagato l'attivazione dell'inflammasoma in seguito ad un "priming" operato da un agonista dei TLR o da una citochina pro-infiammatoria (TNF- α). Da questi studi è emerso un conseguente aumento significativo della secrezione di IL-1 β .

L'IL-1 presenta un loop di auto-regolazione: le sue subunità 1 β e 1 α mature possono legare il recettore IL-1R, aumentando così la trascrizione del precursore pro-IL-1 e la sintesi delle subunità dell'inflammasoma. (17-19) Questo loop di amplificazione

suggerisce come basse concentrazioni di IL-1 β possano avere un effetto importante a livello biologico, soprattutto nel processo infiammatorio (Figura 5). (16)

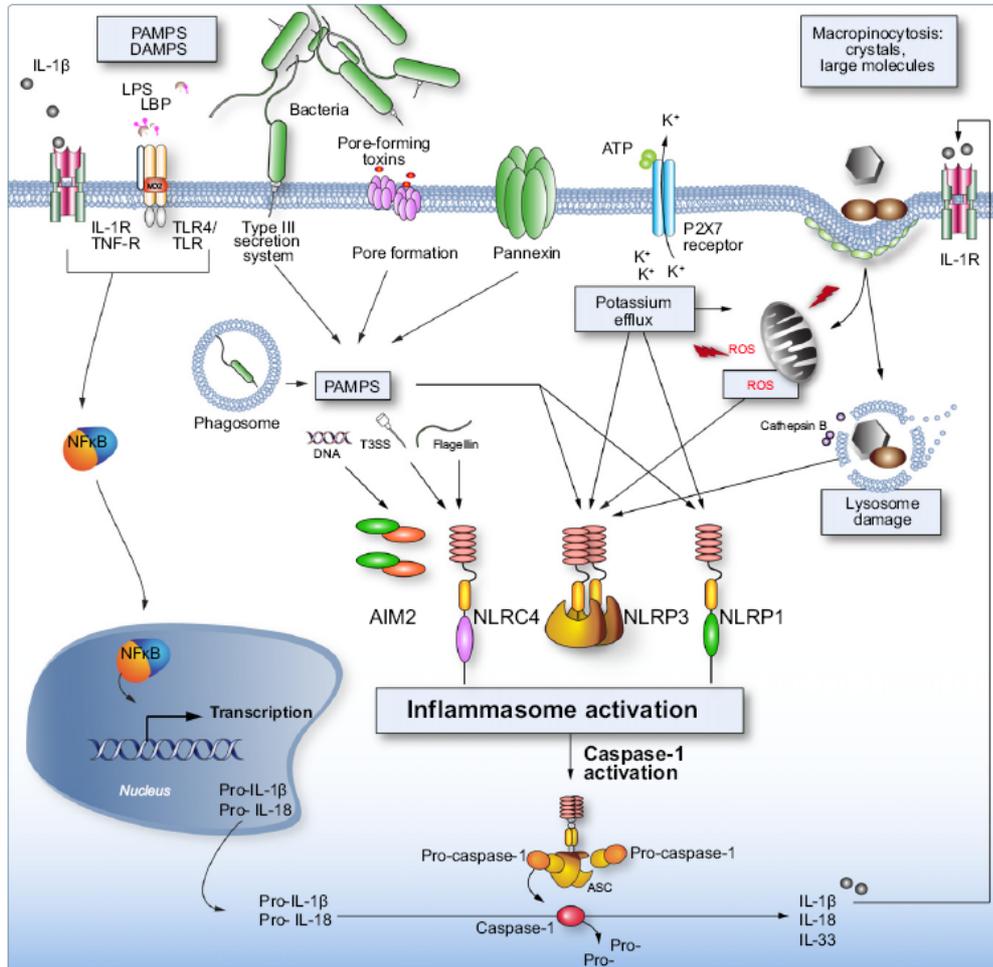


Figura 5: Pathways di attivazione dell'inflammasoma da *Journal of Hepatology* 2012 vol. 57:642–654

L'inflammasoma è coinvolto anche nella morte cellulare oltre che nel processo che sostiene l'infiammazione. NLRP1, NLRP4 (IPAF) e NAIP attivano la piroptosi mentre NLRP3 contribuisce alla pironecrosi. La piroptosi è un meccanismo di morte cellulare dipendente dalla caspasi-1 che mostra diverse analogie con l'apoptosi e il danno al DNA.

La lisi cellulare avviene in seguito alla formazione di pori del diametro di circa 1.1-2.4 nm, sulla membrana cellulare che causano la perdita del gradiente ionico cellulare.

Questo processo culmina con l' aumento della pressione osmotica e conseguente aumento di acqua nella cellula che porta alla rottura della stessa. Contemporaneamente tramite i pori fuoriescono dalla cellula i contenuti citoplasmatici. Successivamente le citochine pro-infiammatorie inattive vengono tagliate dalla caspasi-1 e rese attive. La piroptosi quindi, a differenza dell'apoptosi, non dipende da una cascata apoptotica ed è caratterizzata dalla perdita dell'integrità della membrana plasmatica e della mancanza di condensazione della cromatina. (20) Recentemente la piroptosi è stata proposta come meccanismo di rilascio dell'IL-1 β . (17)

La necroptosi è molto simile alla necrosi. La morte cellulare necrotica è stata da sempre definita come una forma di morte passiva. La necroptosi è una forma di morte cellulare programmata.

1.3 RUOLO DELL'INFLAMMASOMA NELLE PATOLOGIE EPATICHE

L'espressione dell'inflammasoma e la localizzazione subcellulare dei differenti NLRs varia nei diversi tessuti ed organi. Il fegato è costituito per la maggior parte da cellule parenchimali (epatociti) e da cellule immunitarie (macrofagi, neutrofilo, leucociti, cellule dendritiche, cellule T, cellule NK/NKT, linfociti B). L'inflammasoma è presente nelle cellule immunitarie. Recenti evidenze, hanno mostrato la presenza dell'inflammasoma anche nelle cellule non immunitarie come ad esempio negli epatociti (21, 22), nelle cellule stellate (23), nelle cellule endoteliali e nei miofibroblasti. Gli epatociti, le cellule epiteliali del dotto biliare e le cellule stellate esprimono la subunità ASC dell'inflammasoma (Figura 6). (16, 23, 24)

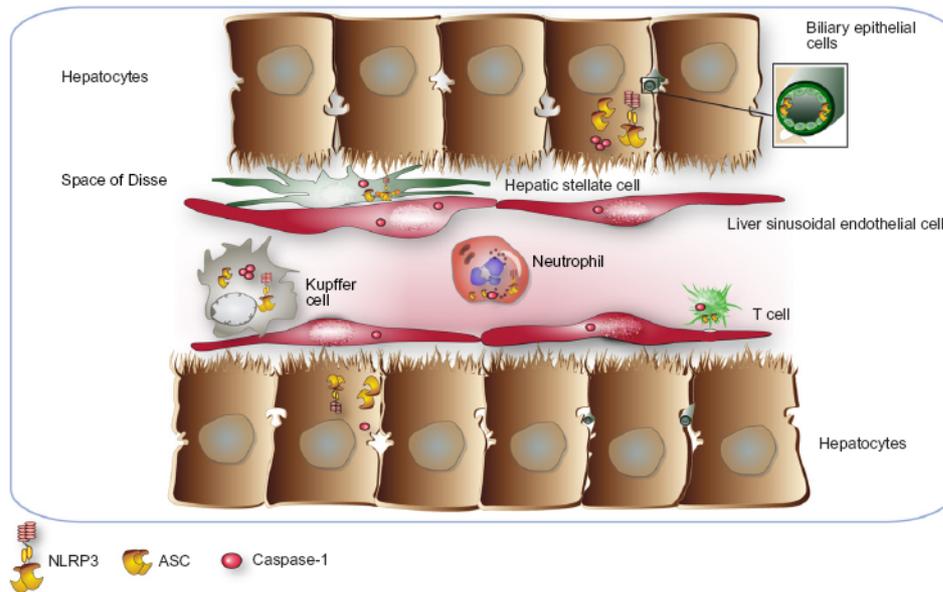


Figura 6: localizzazione delle subunità dell'inflammasoma nelle cellule epatiche da *Journal of Hepatology* 2012 vol. 57:642–654.

Le cellule di Kupffer producono elevati livelli di IL-1 β ed esprimono NLRs. La presenza dell'inflammasoma NLRP3 e/o della sua stessa attivazione è stata dimostrata nelle cellule sinusoidali endoteliali, nelle cellule stellate e negli epatociti. (16) Il coinvolgimento di IL-1 β e dell'inflammasoma è stato dimostrato sia nella patogenesi del danno epatico acuto, per esempio, da acetaminofene (25), da ischemia/riperfusion e da endotossina, sia nella patogenesi di epatopatie croniche con aumento della permeabilità intestinale, tra cui la steatoepatite alcolica e non. L'inflammasoma ha un ruolo centrale anche nella patogenesi delle epatiti virali (virus dell'epatite C e Schistosomiasi). L'attivazione dell'inflammasoma e/o il signaling di IL-1 β possono in aggiunta contribuire alla progressione del danno epatico regolando la fibrosi. A conferma di quanto appena affermato un lavoro sperimentale con animali modello trattati con CCl₄ ha evidenziato una riduzione di espressione di collagene-1 e TGF- β negli animali KO per NLRP3 e ASC. (23)

L'ischemia-riperfusion (I/R) è un evento con rilevanza clinica nel trapianto di fegato e nello shock ipovolemico. Le caratteristiche dell'I/R sono la morte degli epatociti, il

rilascio di DAMPs, l'infiltrazione di cellule dell'infiammazione, l'attivazione delle cellule di Kupffer, la produzione di ROS e il danno alle cellule sinusoidali endoteliali (LEC) del fegato che inducono l'attivazione dell'inflammasoma. (26) Il lavoro sperimentale di Zhu P *et al.* del 2011 ha dimostrato come il silenziamento di NLRP3 riesca a contenere il danno epatico indotto da I/R riducendo il rilascio di IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α , tramite l'inibizione dell'attivazione della caspasi-1 e di NF-kB. Il ruolo del complesso inflammasoma/caspasi-1 nel danno da I/R è stato anche confermato da evidenze che hanno correlato la riduzione del danno epatico, dell'infiammazione e della mortalità in modelli animali con il blocco del recettore IL-1R e il silenziamento di IL-18. (27)

L'endotossina (lipopolysaccharide LPS), componente della membrana cellulare dei batteri Gram negativi, è il principale mediatore del danno epatico indotto da sepsi, del danno multi organo e delle patologie epatiche croniche. L'LPS, ligando del TLR4, come detto in precedenza, è un potente induttore dell'espressione dell'mRNA di tutte le subunità dell'inflammasoma quali NLRP3, ASC, caspasi-1 e pannexina-1, della pro-IL-1 β e della pro-IL-18 tramite l'attivazione di NF-kB. In topi, la somministrazione di LPS *in vivo* aumenta l'espressione dell'mRNA delle subunità dell'inflammasoma e la concentrazione plasmatica di IL-1 β indicando l'attivazione del complesso caspasi-1/inflammasoma. (28) Consolidate evidenze dimostrano come la flora intestinale, l'aumento della permeabilità intestinale e la presenza dell'endotossina contribuiscono all'insorgenza di steatoepatiti alcoliche (ASH) e non (NASH). In modelli animali di epatite alcolica è stato riscontrato un aumento dei livelli plasmatici ed epatici di IL-1 β , dell'attivazione della caspasi-1 e up-regolazione delle componenti dell'inflammasoma (NLRP3, ASC, pro-caspasi-1). L'IL-1 β favorisce lo sviluppo di steatosi epatica attraverso la soppressione di PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) e la morte cellulare degli epatociti che hanno accumulato lipidi. Petrasek *et al.* hanno

dimostrato che l'IL-1 β agisce sul TNF- α aumentandone gli effetti epatotossici. Risulta evidente dunque come il crosstalk tra TLR e attivazione dell'inflammasoma sia un altro fattore importante nel determinare lo sviluppo di steatoepatiti e l'aumento della risposta infiammatoria nel fegato.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'ACLF è stata recentemente definita dal danno di uno o più organi e da un'elevata mortalità a breve termine in pazienti che vengono ospedalizzati per uno scompenso acuto in fase di cirrosi. È stato ipotizzato che l'infiammazione potrebbe avere un ruolo determinante nella fisiopatologia dell'ACLF.

Lo scopo del nostro studio è stato in primo luogo quello di valutare lo stato infiammatorio dei pazienti mediante il dosaggio di citochine pro e anti infiammatorie; in secondo luogo determinare il possibile coinvolgimento e ruolo dell'inflammasoma e della sua iper-attivazione nella patogenesi dell'ACLF.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Nello studio sono stati arruolati 72 pazienti consecutivi con cirrosi, ospedalizzati per uno scompenso acuto della patologia epatica di base.

Sono stati raccolti i parametri vitali (pressione arteriosa, frequenza cardiaca e saturazione O₂), i dati anamnestici, di laboratorio (emocromo, bilirubina totale e diretta, AST, ALT, GGT, ALP, creatinina, urea, sodio, potassio, PT, INR, albumina, ammoniemia, emocolture, urocolture), di microbiologia e gli scores clinici ed epatici (Child-Pugh, MELD score) all'ammissione in ospedale e al momento dell'arruolamento (ricovero in unità specializzata- giorno 1).

I pazienti sono stati sottoposti a prelievi venosi nei giorni 2, 7, 14 e 28 quando possibile. Il sangue prelevato dai pazienti è stato processato tramite centrifugazione a 3000 rpm per separare siero e plasma aliquotati e conservati a -80°C. Sono stati estratti i PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) tramite la metodica che prevede l'uso dell'Histopaque (SIGMA 1077-1). I linfociti sono stati conservati in azoto liquido in terreno RPMI e DMSO (Dimetilsolfossido, SIGMA 99%).

3.2 SEPARAZIONE DEI PBMCs

Il sangue periferico raccolto in EDTA è stato diluito con soluzione fisiologica 1:1 v/v. In una nuova provetta il sangue diluito è stato stratificato con la soluzione di Histopaque e la provetta centrifugata a 2200 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno. L'anello di linfociti formatosi all'interfaccia tra le due fasi (Histopaque/sangue) è stato trasferito in una falcon con un volume di fisiologica pari ad almeno il 50% di quello ottenuto dall'anello, il tutto mescolato per inversione e centrifugato per 10 minuti a 1600 rpm a temperatura ambiente attivando il freno. Il surnatante è stato poi eliminato

ed il pellet, costituito da PBMCs, risospeso con terreno di congelamento costituito da RPMI-1640 (SIGMA R 0883), DMSO (Dimetilsolfossido, SIGMA 99%), FBS (Fetal Bovine Serum, F7524), Penicillina-Streptomicina solution (SIGMA P0781), Glutamina (SIGMS G7513). Le cellule infine sono state congelate per alcune ore a -20°C e conservate a -80°C per un periodo determinato ed, infine, in azoto liquido.

3.3 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLE CITOCHINE

La concentrazione plasmatica delle citochine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 è stata determinata tramite il metodo Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) nei campioni di plasma ottenuti i giorni 2 e 7 dopo l'ammissione nell'unità medica.

Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. Il metodo diretto sandwich prevede la copertura del fondo del pozzetto con un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo misurare. Si esegue un lavaggio. In seguito si introduce l'antigene, che si legherà all'anticorpo. Si lava ulteriormente per togliere gli antigeni in eccesso. Si introduce un anticorpo specifico che legherà il complesso anticorpo e antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test. All'ultimo anticorpo che abbiamo aggiunto, era legato un enzima specifico, e aggiungendo il suo substrato si forma un prodotto colorato, che evidenzierà il pozzetto. Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e l'intensità della colorazione, misurabile grazie al spettrofotometro, è quantitativa secondo una scala di intensità calcolata tramite l'uso di una curva standard eseguita con diluizioni crescenti di un prodotto (standard) a concentrazione nota.

Il rapporto TNF- α /IL-10 è stato usato per valutare l'equilibrio pro/anti infiammatorio.

La quantificazione delle citochine IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 è stata effettuata mediante

kit ELISA RayBio (RayBiotech, Norcross, GA, USA). La quantificazione del TNF- α è stata misurata tramite il kit ELISA Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA).

3.4 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY DELL'INFLAMMASOMA

3.4.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto dai PBMCs, precedentemente separati dal sangue periferico di ciascun paziente, tramite gradiente con Histopaque (SIGMA 1077-1), e conservati a -80°C in terreno di congelamento costituito da RPMI-1640 (SIGMA R 0883), DMSO (Dimetilsolfossido, SIGMA 99%), FBS (Fetal Bovine Serum, F7524), Penicillina-Streptomicina solution (SIGMA P0781), Glutamina (SIGMS G7513). E' stato utilizzato il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Jesi, Italy) per l'estrazione dell'RNA totale. I PBMCs sono stati risospesi in PBS (Phosphate Buffer Solution) e centrifugati in modo da eliminare il terreno di congelamento. Le cellule così ottenute sono state lisate con un tampone di lisi. Al lisato cellulare è stata aggiunta una soluzione di etanolo al 70% e il tutto trasferito in colonnine capaci di legare solo l'RNA estratto. Dopo centrifugazione il filtrato è stato eliminato e la resina lavata con diverse soluzioni e centrifugazioni. Al termine l'RNA legato alla colonnina è stato eluito con 16 μ l di H₂O sterile. L'RNA totale ottenuto è stato conservato a -80°C.

3.4.2 Quantificazione dell'RNA totale

La determinazione della concentrazione dell'RNA (μ g/ μ l) è stata ottenuta mediante la lettura del valore di assorbanza tramite spettrofotometro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE USA). Il valore di assorbanza alla λ di 260 nm ci permette di

quantificare l'RNA totale estratto mentre il rapporto tra i valori di assorbanza 260/280 e 260/230 ci permettono di stabilire il grado di qualità dell'RNA.

3.4.3 Retrotrascrizione dell'RNA totale

La reazione di retrotrascrizione è stata utilizzata per amplificare il DNA a doppio filamento partendo dall'RNA estratto dalle cellule. Nella fase di retrotrascrizione (RT), l'enzima trascrittasi inversa sintetizza una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA.

La reazione di RT è stata condotta utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis (BioRad). Il ciclo della reazione, composto da diversi steps in base alla temperatura, si compone di una prima fase a 25°C per 5 minuti, una seconda a 42°C per 30 minuti tale da attivare la trascrittasi inversa e una terza a 85°C per 5 minuti al fine di inattivare la trascrittasi inversa.

3.4.4 Q-PCR: Real-Time PCR Quantitativa

La quantificazione dell'espressione genica del fattore trascrizionale NF-kB, della caspasi-1, della caspasi-3, dell'IL-1 β e del TNF- α è stata ottenuta mediante la reazione di Real-Time PCR. Per valutare in tempo reale la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione è stato inserito il SYBR Green, un composto fluorescente intercalante del DNA. La fluorescenza del SYBR Green aumenta considerevolmente nel momento in cui la molecola si intercala nel solco minore del DNA a doppio filamento, pertanto, la misura quantitativa della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente in ogni campione (che è, a sua volta, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione iniziale), a patto che la molecola intercalante sia presente in eccesso. La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione. Ne consegue che l'aumento del segnale di fluorescenza sarà proporzionale alla quantità di

prodotto di amplificazione ottenuto dalla reazione di PCR che corrisponde al valore del ciclo di amplificazione definito ciclo soglia o Threshold Cycle (Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR.

Nella PCR Real-Time, monitorata in tempo reale per 40 cicli, si ottiene una curva sigmoideale, dove i primi 10-15 cicli corrispondono a valori di fluorescenza dati dal rumore di fondo o background. Tra i 15-25 cicli la reazione ha un andamento esponenziale dove la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base (valore di Ct). Nei cicli finali (30-40), i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi fino a raggiungere il plateau. Il valore di Ct utilizzato per quantificare il prodotto della reazione di PCR corrisponde al ciclo dove l'aumento di fluorescenza è significativamente maggiore a quello del livello basale (background) misurato nei primi cicli di amplificazione.

La reazione di PCR Real-Time è stata fatta tramite il sistema di rilevazione CFX96 Real Time System (BioRad). La reazione è stata eseguita utilizzando il kit iQ SYBR Green Supermix (BioRad) e i primers specifici per i geni di interesse.

La reazione di PCR è stata fatta in 20 µl di volume finale nel quale sono stati messi 10 µl di PCR-SYBR Green Master Mix (BioRad), 2 µl di forward primer (50 nM), 2 µl di reverse primer (50 nM), 2 µl di H₂O sterile e 4 µl di cDNA. Il profilo termico della reazione è stato composto da un ciclo di reazione a 95°C per 5 minuti (attivazione dell'enzima Taq polimerasi) e 40 cicli costituiti da 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C (fase di ibridazione ed estensione). Le sequenze oligonucleotidiche dei primers e per il gene housekeeping (β -actina) sono state disegnate nel nostro laboratorio utilizzando i

programmi Primer BLAST e NCBI e sono riportate nella tabella 4 sottostante. Il controllo qualità delle sequenze ottenute è stato fatto con il programma Eurofins.

Tabella 4: sequenze oligonucleotidiche dei primers per *NF-κB* (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), *TNF-α* (Tumor necrosis factor), *IL-1β* (interleuchina 1 beta), *CASP-1* (caspasi-1) e *CASP-3* (caspasi-3).

Gene	For Sequence	Rev Sequence	Tm	Prodotto di amplificazione (bp)
NF-κB	GCCAACAGATGGCCCATACC	TGCTGGTCCCACATAGTTGC	60°C	169
TNF-α	CCAGACCAAGGTCAACCTCC	CCCTCCCAGATAGATGGGCT	60°C	106
IL-1β	CCACCTCCAGGGACAGGATA	CAACACGCAGGACAGGTACAG	60°C	132
CASP-1	ACATCCCACAATGGGCTCTG	TCCACATCACAGGAACAGGC	60°C	78
CASP-3	TGCATACTCCACAGCACCTG	TTCTGTTGCCACCTTTCGGT	60°C	154

La specificità dei primers è stata verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio e mediante analisi della curva di Melting che consente di ottenere la temperatura alla quale metà delle molecole complementari sono ibridate. Quest'ultima consente di verificare l'eventuale presenza di dimeri dei primers o la presenza di prodotti aspecifici nella reazione di PCR. Una volta verificata la scelta corretta dei primers sono state fatte delle curve di calibrazione per ciascun gene a concentrazioni scalari (diluizione 1:2) di RNA totale per ottenere l'efficienza della reazione di PCR. Mediante la curva di calibrazione sono stati ottenuti i valori di pendenza (slope), l'intercetta della retta di regressione (r) e il coefficiente di correlazione dei punti. Il valore della pendenza viene poi utilizzato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR: $E(\text{eff})=10^{-1/\text{slope}}$.

La quantificazione dell'espressione del gene di interesse è di tipo relativo in quanto viene normalizzata per un gene housekeeping e viene calcolata applicando la formula matematica $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dove $-\Delta\Delta C_t = [(C_t (\text{gene di interesse di un campione}) - C_t (\text{HPRT di un campione})) - [(C_t (\text{gene di interesse di un normalizzatore}) - (C_t (\text{HPRT di un$

normalizzatore)]. Per normalizzatore si intende un campione il cui valore di espressione corrisponde a 1. Tra i vari geni housekeeping è stato scelto la β -actina per la quantificazione relativa in quanto la sua espressione permane stabile nelle nostre condizioni sperimentali.

4. RISULTATI

4.1 CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLE CITOCHINE

La concentrazione plasmatica delle citochine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 è stata misurata tramite metodo ELISA nei pazienti con ACLF e no-ACLF.

La figura rappresenta la quantificazione di TNF- α , IL-6 e il rapporto TNF- α /IL-10. I livelli plasmatici di TNF- α e IL-6 sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con ACLF che in quelli senza ACLF (TNF- α : 38.9 pg/mL-IQT: 24.3 to 79.3 pg/ml vs 20.2 pg/ml-IQT: 9.1 to 45.5 pg/ml, $p=0.015$; IL-6: 34.9 pg/ml-IQT: 26.1 to 63.7 vs 15.4 pg/mL-IQT: 9.6 to 37.9 pg/ml, $p=0.011$). Anche il rapporto TNF- α /IL-10 è risultato più elevato nel gruppo con ACLF vs no-ACLF (7.9 pg/ml-IQT: 1.6 to 19.4 pg/ml vs 1.4 pg/ml-IQT: 0.4 to 2.9 pg/ml, $p=0.019$) (Figura 7).

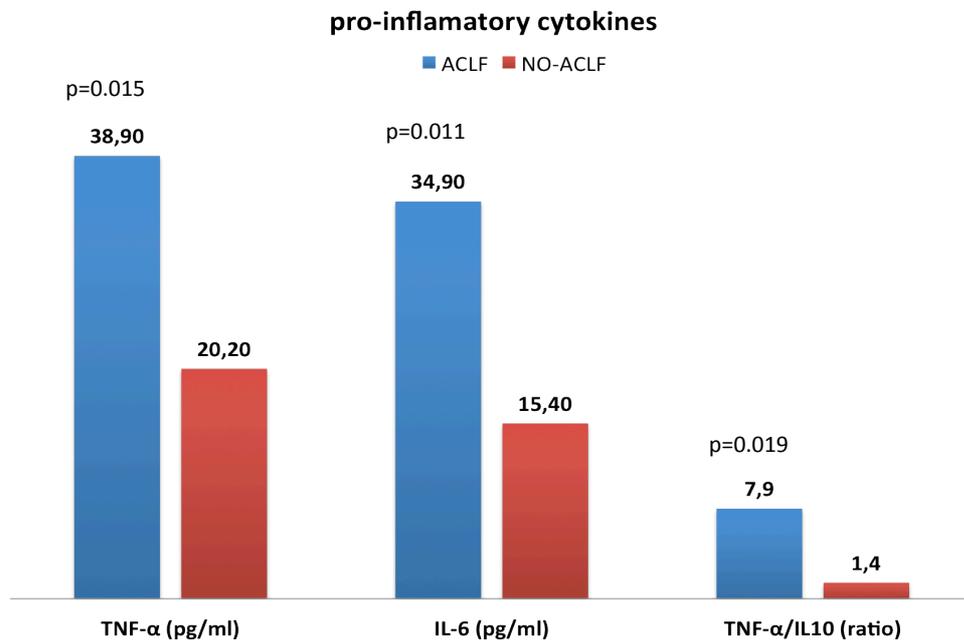


Figura 7: livelli plasmatici di TNF- α , IL-6 e TNF- α /IL-10 in pazienti con ACLF e non ACLF analizzati con kit ELISA.

Al giorno 7 dall'ospedalizzazione, il gruppo con ACLF ha mostrato una riduzione significativa di IL-10 rispetto al gruppo no ACLF (delta IL-10= -1.58 pg/ml-IQT: -6.15 to 0.42 pg/ml vs 0.05 pg/ml-IQT: 0.00 to 4.61 pg/ml, p=0.026) (Figura 8).

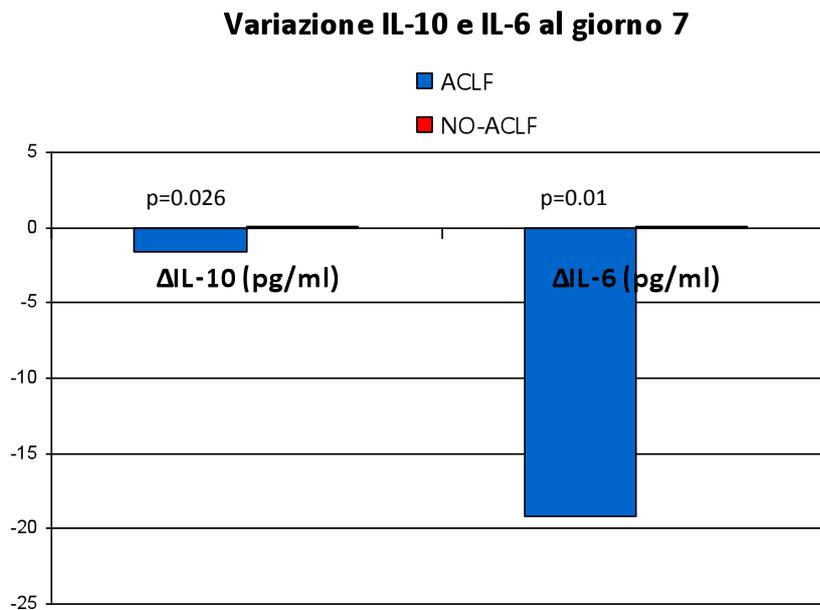


Figura 8: variazione (Δ) della concentrazione plasmatica delle citochine IL-10 e IL-6 al giorno 7 dall'ospedalizzazione in pazienti con e senza ACLF.

In un secondo momento il gruppo di pazienti con ACLF è stato suddiviso in sottogruppi per individuare eventuali predittori di ACLF valutandone l'andamento in base al grado di ACLF. Dall'analisi multivariata è emerso che il TNF- α è il predittore indipendente di ACLF (OR=1.039; IC=1.003-1.076; p=0.037) (Figura 9).

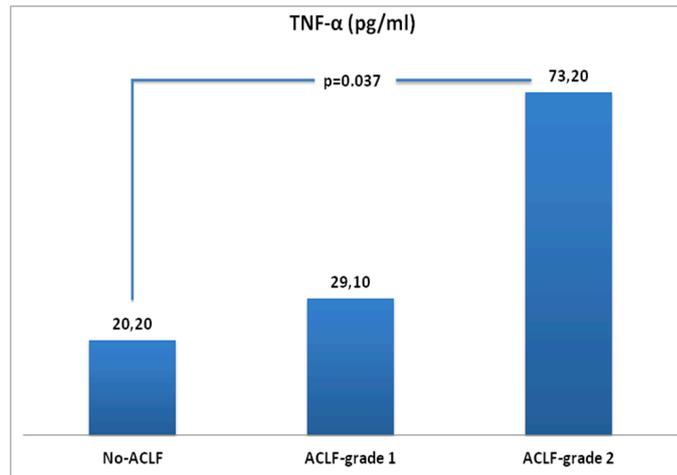


Figura 9: concentrazione plasmatica (pg/ml) di TNF- α nei pazienti al giorno 2 dall'arruolamento suddivisi per grado di ACLF. La concentrazione è risultata significativamente più elevata nel gruppo di pazienti con ACLF di grado 2 rispetto ai pazienti senza ACLF ($p=0.037$).

4.2 ESPRESSIONE GENICA DEL PATHWAY INFIAMMATORIO

Dopo aver riscontrato un aumento significativo della concentrazione plasmatica di alcune citochine pro infiammatorie che indicano uno squilibrio infiammatorio nei pazienti complicati, abbiamo pensato di andare ad indagare i livelli di espressione genica dell'RNA di queste citochine, del fattore di trascrizione che ne controlla la produzione (NF-kB) e delle componenti dell'inflammasoma responsabile del rilascio della forma matura di IL-1 β . I livelli di mRNA dei geni NF-kB, CASP-3, CASP-1, TNF- α e IL-1 β sono stati valutati con la tecnica di RT-PCR in seguito all'estrazione dell'RNA totale dai PBMCs dei pazienti con e senza ACLF.

E' stata riscontrata una differenza significativa dell'espressione di tutti e 5 i geni in esame tra i due gruppi di pazienti. La presenza di ACLF nel quadro clinico del paziente è responsabile di un aumento significativo dell'espressione genica dei geni dell'infiammazione. Nel dettaglio i livelli di espressione genica di NF-kB ($p=0.03$), CASP-3 ($p=0.03$), CASP-1 ($p=0.05$), TNF- α ($p=0.05$) e IL-1 β ($p=0.05$) sono risultati significativamente elevati nei PBMCs dei pazienti con ACLF vs no-ACLF (Figura 10).

Il contributo delle infezioni batteriche come evento precipitante di ACLF non è risultato significativamente diverso nei due gruppi di pazienti presi in esame (ACLF 52.4% vs no-ACLF 37.3%, $p=NS$).

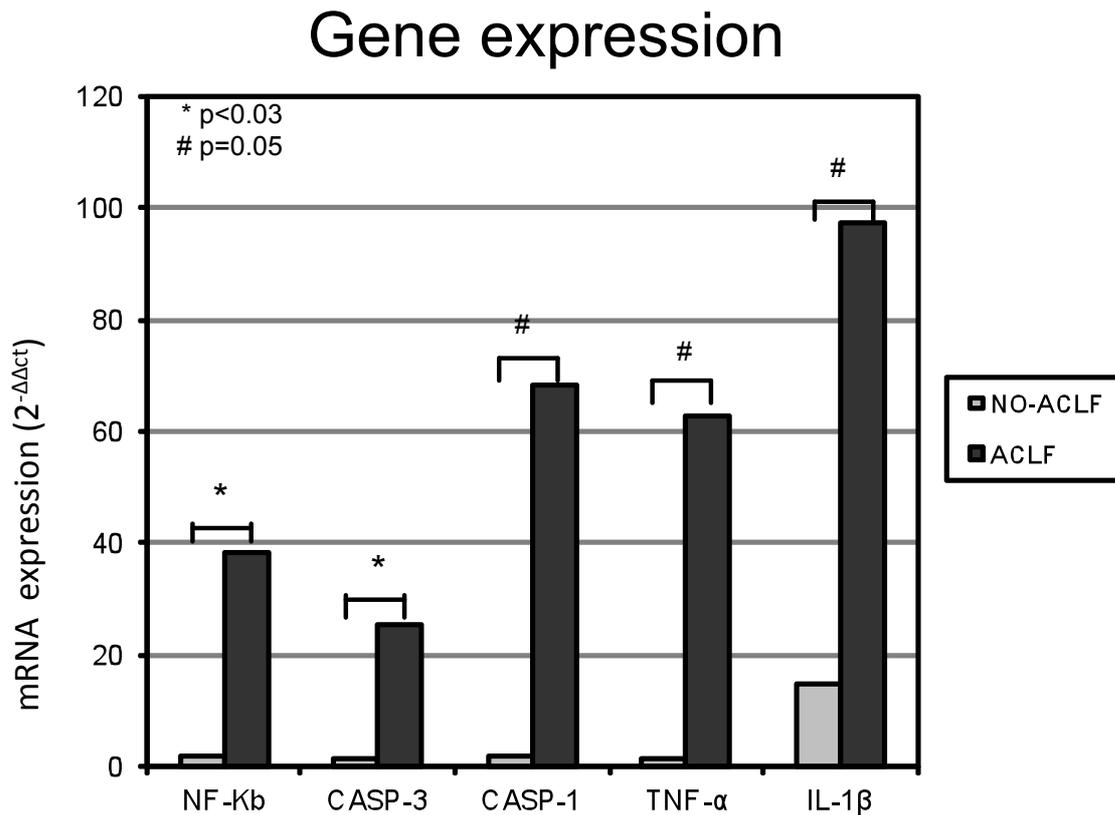


Figura 10: espressione genica di NF-kB, CASP-3, CASP-1, TNF-α, IL-1β valutata con la RT-PCR in pazienti con ACLF e senza ACLF. I valori sono espressi come media. * $p<0.03$ e # $p=0.05$

5. DISCUSSIONE

Il risultato più rilevante del nostro studio è stato la caratterizzazione del ruolo dell'infiammazione nello sviluppo dell'ACLF e del coinvolgimento dell'inflammasoma nella fisiopatologia dell'ACLF. L'aumento significativo della concentrazione plasmatica di citochine pro-infiammatorie ha confermato l'ipotesi di una correlazione tra l'esistenza e la persistenza dello stato infiammatorio e il peggioramento del quadro clinico, in pazienti con ACLF. A sostegno di tale ipotesi, durante lo studio sono stati misurati i livelli plasmatici di TNF- α , uno degli attori principali dell'infiammazione, che sono risultati significativamente aumentati nei pazienti con ACLF vs no-ACLF. La concentrazione di TNF- α , inoltre, ha mostrato un andamento crescente in accordo con la stratificazione della popolazione di studio secondo il grado di compromissione (ACLF grade 1 e 2), basata sui criteri clinico-laboratoristici del CLIF-SOFA score (1): all'aumentare del grado di ACLF è risultata aumentata la concentrazione plasmatica di TNF- α ($p < 0.05$).

La dimostrazione di un aumentato stato infiammatorio nell'ACLF, basata sul dosaggio delle citochine pro-infiammatorie, ha indotto la ricerca dei possibili meccanismi biomolecolari, identificati nel priming e nell'attività dell'inflammasoma.

Un apporto innovativo dello studio qui esposto è stato la dimostrazione del coinvolgimento e dell'iper-attivazione dell'inflammasoma nei pazienti con ACLF. Da recenti studi è emerso il ruolo centrale di IL-1 β e della caspasi-1, co-autori e componenti dell'inflammasoma, nello sviluppo di alcune patologie, tra cui l'aterosclerosi, la sindrome metabolica, il signaling dell'insulina e alcune patologie epatiche. (7, 11) Diversi protocolli sperimentali hanno studiato l'attivazione dell'inflammasoma mediante l'uso di agonisti dei TLRs (esempio: LPS) o di citochine pro-infiammatorie (esempio: TNF- α). L'attività dell'inflammasoma e l'espressione genica di IL-1 β sono risultate fortemente integrate con il pathway di signaling

infiammatorio via TLR e IL-1R a livello del fattore trascrizionale NF- κ B. Nello specifico, i relativi dati scientifici hanno dimostrato come il priming dell'inflammasoma NLRP3 sia dose dipendente rispetto ad un inibitore di NF- κ B, dimostrando un ruolo chiave di NF- κ B e del signaling via TLRs nell'attivazione trascrizionale delle subunità dell'inflammasoma. In accordo con queste osservazioni, il nostro studio ha mostrato come l'espressione genica di NF- κ B sia risultata significativamente più elevata nel gruppo di pazienti con ACLF, in concordanza con un aumento significativo dei livelli di espressione genica della caspasi-1 (effettrice dell'inflammasoma) e di IL-1 β , prodotto della caspasi-1.

Queste evidenze, che mettono in relazione aspetti clinici, biomolecolari e genetici, sostengono l'ipotesi fondamentale del ruolo chiave dell'infiammazione nella fisiopatologia dell'ACLF e confermano fortemente il link tra NF- κ B e inflammasoma nella cirrosi scompensata.

Le potenziali conseguenze dell'attivazione dell'inflammasoma sono in primo luogo la persistenza e l'amplificazione dell'insulto infiammatorio ad opera di IL-1 β via IL-1R. L'interleuchina IL-1 β , resa attiva dal clivaggio proteolitico via caspasi-1, fuoriesce dalla cellula e si lega al suo recettore IL-1R innescando una cascata del segnale che culmina con l'attivazione di NF- κ B e con un'ulteriore produzione di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-1 β stessa (loop autoregolatorio dell'IL-1 β). Appare quindi evidente come basse concentrazioni plasmatiche di IL-1 β possano avere un importante rebound a livello del signaling dell'inflammasoma. Nel caso della popolazione del nostro studio, la persistenza dell'insulto infiammatorio e la sua amplificazione, potrebbero entrambe sostenere il progredire del danno d'organo.

Il danno d'organo potrebbe essere legato all'infiammazione sia attraverso meccanismi di morte cellulare e/o di sviluppo di fibrosi sia attraverso alterazioni funzionali. Per esempio a livello epatico è stato dimostrato che nei pazienti con ACLF i livelli di

pressione portale sono più elevati che nei pazienti senza ACLF. A conferma di un ruolo fisiopatologico delle alterazioni funzionali legate all'infiammazione, la somministrazione acuta di un farmaco anti-TNF si è dimostrata in grado di ridurre la pressione portale nei pazienti con ACLF.

A livello renale sia in modelli animali, sia in pazienti affetti da ACLF è stato dimostrato che il danno renale è legato ad un'aumentata espressione del TLR 4. (29) L'espressione dei TLR4, diversa in termini di ubicazione e di estensione, è risultata evidente nei pazienti con HRS, ma è quasi completamente assente nella biopsia di controlli sani. L'espressione dei TLR4 è stata riscontrata a livello citoplasmatico, sulla superficie della zona apicale o sulla membrana delle cellule tubulari, e nettamente superiore per estensione ed intensità in pazienti con disfunzione renale non-HRS rispetto a quelli con HRS. Questo fenomeno è stato associato all'up-regolazione della caspasi-3, avente un ruolo primario nella apoptosi, confermando quindi il coinvolgimento di tale tipologia di morte cellulare in corso di disfunzione renale non-HRS. (29)

È stato dimostrato che l'endotossina sistemica ha accesso diretto ai siti renali in cui è espresso il TLR4. (30) La conseguente risposta infiammatoria persistente può portare all'attivazione di NF-kB e ad un conseguente aumento delle citochine pro-infiammatorie che può culminare nella morte cellulare con un ulteriore deterioramento della funzione renale. (31)

Anche a livello cardiaco una ridotta contrattilità è risultata associata ad un aumento dei livelli di espressione del TNF- α e dei livelli di traslocazione nucleare dell'NF-kB. (32)

Nel dettaglio lo sviluppo di stress ossidativo e il rilascio di citochine pro-infiammatorie nel tessuto cardiaco sono risultati responsabili dell'aumento dell'espressione e dell'attività di iNOS che agisce incrementando il rilascio di NO. Come conseguenza l'NO rilasciato agisce negativamente sulla funzione dei recettori β 1-adrenergici che risulta compromessa nei pazienti cirrotici. (32)

L'analisi dei nostri dati ha evidenziato uno stato infiammatorio importante e significativamente aumentato nei pazienti con ACLF sia sulla base della concentrazione plasmatica delle citochine pro-infiammatorie sia in termini di aumento dell'espressione genica di geni dell'infiammazione quali ad esempio il TNF- α , e la stessa IL-1 β , e componenti dell'inflammasoma.

Dati in letteratura hanno anche dimostrato come citochine anti-infiammatorie (es: IL-10), in modelli animali con stato infiammatorio sistemico, possano ridurre il danno tissutale limitando l'infiltrazione e l'attivazione neutrofila. Kabay B. et al. hanno dimostrato, in un modello murino, che l'aumento dell'espressione genica di IL-10 riduce significativamente le lesioni multiorgano causate dalla sepsi. (33)

Il nostro studio sullo stato infiammatorio nei pazienti con ACLF vs no-ACLF ha rilevato, oltre ad un livello maggiore d'infiammazione in ACLF, una riduzione tempo dipendente (a 7 giorni dal ricovero) dell'IL-10 (ACLF: delta IL-10= -1.58 pg/ml vs no-ACLF: 0.05 pg/ml, p=0.026). Quest'ultimo dato supporta ulteriormente l'ipotesi fisiopatologica dell'ACLF caratterizzandola ulteriormente in un aumento del livello d'infiammazione sistemica unito ad una riduzione della citochina anti-infiammatoria IL-10.

Sulla base dei nostri dati si può affermare che una componente fondamentale della fisiopatologia del danno d'organo in pazienti con ACLF sia l'infiammazione, confermando l'ipotesi avanzata dal Canonic Study. In letteratura viene sostenuta la tesi secondo cui il danno tissutale non sia solo correlato all'intensità della risposta infiammatoria ma anche all'intrinseca capacità di tollerare l'insulto da parte dei vari organi. (3) Una diminuzione della capacità di tolleranza degli organi vitali potrebbe renderli più suscettibili al danno tissutale causato da un moderato aumento della risposta infiammatoria. (3) I nostri risultati apportano ulteriori evidenze a favore dell'ipotesi secondo la quale favore di queste ipotesi; i pazienti con ACLF potrebbero essere

caratterizzati da una diminuzione della capacità di tolleranza organo specifica alla risposta infiammatoria sistemica. La capacità di tolleranza differisce tra i vari tessuti ed organi e processi fisiologici. (3) I fattori che definiscono il livello di tolleranza sono: la suscettibilità intrinseca al danno, la capacità di riparare il danno, l'autonomia funzionale e l'entità del danno conseguente. In genere quando i pathways cellulari di risposta allo stress infiammatorio vengono attivati da un agente esterno, questi diventano in un secondo momento più tolleranti ad insulti più severi, secondo un fenomeno denominato preconditioning. (3) Come già ipotizzato nello studio Canonic, questa diminuzione di tolleranza all'insulto infiammatorio, potrebbe essere amplificata nei pazienti cirrotici che non presentano storia di uno scompenso precedente. Nel caso del danno d'organo su base infiammatoria, l'esposizione a bassi livelli di stimolo infiammatorio, come ad esempio l'LPS, potrebbe proteggere da successive esposizioni a concentrazioni di LPS altrimenti letali.

In accordo con quanto affermato, in un modello sperimentale di cirrosi con legatura del coledoco (BDL) e somministrazione di LPS, l'analisi immunoistochimica ha evidenziato un aumento significativo dei TLR4 negli atri del miocardio dei controlli rispetto ai ratti cirrotici cronici con LPS suggerendo che la traslocazione batterica in corso di cirrosi è associata allo sviluppo di tolleranza all'effetto cardiaco cronotropo negativo dell'LPS nei ratti cirrotici. (34) La morbilità e la mortalità potrebbero quindi essere interpretate come conseguenti al fallimento dei meccanismi di tolleranza. E' stato ancora osservato in studi clinici e sperimentali che nella cirrosi e nella sovrainfezione/infiammazione può esserci un'up-regolazione dell'espressione dei TLR4 a livello del tubulo renale e che tale evento sia associato allo sviluppo di disfunzione renale con danno tubulare e apoptosi. (29, 35) I meccanismi che sottendono l'up-regolazione dei TLR4 a livello tubulare non sono tuttavia ancora completamente definiti. Nel modello animale di cirrosi è stato già dimostrato che la disfunzione renale

indotta da LPS potrebbe essere evitata nei ratti cirrotici attraverso la sterilizzazione intestinale mediata della norfloxacin. (35) Tutti questi studi delineano la possibilità del coinvolgimento del TLR4 come mediatore del danno renale in pazienti con ACLF, supportando l'ipotesi che nei pazienti cirrotici la traslocazione batterica abbia la funzione di priming più che di preconditionamento nel rene attraverso l'up-regolazione dei TLR4 tubulari rendendo, così, i reni suscettibili all'effetto di uno stato infiammatorio sovrapposto. (29, 35) Queste ipotesi, così come lo sviluppo di un danno tubulare renale, dovranno essere indagate negli studi futuri su pazienti con ACLF. I meccanismi di priming e l'up-regolazione dei TLR4 sopra descritti non sembrano essere alla base del danno d'organo in tutti gli organi coinvolti nell'ACLF. L'alterata espressione dei TLR4, inoltre, non risulta l'unico meccanismo responsabile della suscettibilità all'infiammazione nei pazienti con ACLF. In ratti cirrotici trattati con LPS, l'aumento della sensibilità all'insulto infiammatorio è risultato associato all'aumento della produzione di TNF- α , allo stress ossidativo, al rilascio di inibitori di ossido nitrico sintetasi endoteliale (NO) e all'aumento dell'espressione e dell'attività dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS). Le endotossine e le citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , hanno un ruolo fondamentale nella patogenesi murina ed umana del danno epatico. (36) Pazienti con ACLF affetti da cirrosi epatica su base alcolica, hanno mostrato elevati livelli plasmatici di TNF- α che possono contribuire ad un ulteriore aumento dell'ipertensione portale e allo sviluppo della sindrome epatorenale (HRS). (37, 38) Nell'ambito dello stress ossidativo, livelli significativamente elevati di AOPP (advanced oxidation protein products) sono stati riscontrati in pazienti con ACLF rispetto a pazienti con cirrosi, e inoltre è stata riscontrata una correlazione tra AOPP e bilirubina totale, Child-Pugh e MELD. (39) Ciò suggerisce che anche le specie reattive dell'ossigeno possono contribuire al danno acuto epatico in pazienti con ACLF. In

aggiunta lo stress ossidativo probabilmente può contribuire ad un ulteriore aumento delle resistenze intraepatiche riducendo il rilascio di NO in questi pazienti. (40)

Su queste basi, sarà di particolare interesse, per il futuro filone di ricerca, definire meglio i meccanismi genetici e molecolari alla base dell'attivazione e del controllo dell'infiammazione e dell'inflammasoma; ciò potrà consentire di comprendere meglio i meccanismi responsabili del mantenimento e dell'amplificazione dell'insulto infiammatorio nei pazienti con ACLF e di indagare in questo contesto il fenomeno di tolleranza. Un'ulteriore stratificazione dei pazienti sulla base della presenza o meno di un precedente episodio clinico preconditionante, potrà essere una nuova strategia per meglio comprendere l'interplay tra iper-attivazione dell'inflammasoma e della cascata infiammatoria, il fenomeno di tolleranza e l'entità del danno d'organo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, et al. Acute-on chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; **144**(7): 1426-37, 1437.e1-9.
2. Cordoba J, Ventura-Cots M, Simon-Talero M, Amoros A, Pavesi M, Vilstrup H, Angeli P, et al. Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol* 2013; .
3. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 2012; **335**(6071): 936-941.
4. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; **406**(6797): 782-787.
5. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; **113**(7): 1399-1407.
6. Kesar V, Odin JA. Toll-like receptors and liver disease. *Liver Int* 2014; **34**(2): 184-196.
7. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; **140**(6): 821-832.
8. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; **458**(7242): 1191-1195.
9. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. *Cell* 2007; **130**(5): 906-917.
10. Mai CW, Kang YB, Pichika MR. Should a toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: Its expression and effects in the ten most common cancers. *Onco Targets Ther* 2013; **6**: 1573-1587.

11. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; **10**(2): 417-426.
12. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 229-265.
13. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V. Inflammasomes: Current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**(5): 765-783.
14. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in muscle-wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; **20**(3): 319-325.
15. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; **183**(2): 787-791.
16. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol* 2012; **57**(3): 642-654.
17. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; **117**(14): 3720-3732.
18. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987; **139**(6): 1902-1910.
19. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, Kim HJ, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med* 2006; **355**(6): 581-592.

20. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(5): 372-379.
21. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011; **54**(1): 133-144.
22. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1beta via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol* 2012; **93**(Pt 2): 235-246.
23. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, Hashmi A, Nagata J, Sutterwala FS, Mahmood S, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**(6): G1248-57.
24. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 2007; **55**(5): 443-452.
25. Maher JJ. DAMPs ramp up drug toxicity. *J Clin Invest* 2009; **119**(2): 246-249.
26. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; **26 Suppl 1**: 173-179.
27. Harada H, Wakabayashi G, Takayanagi A, Shimazu M, Matsumoto K, Obara H, Shimizu N, et al. Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002; **74**(10): 1434-1441.
28. Ganz M, Csak T, Nath B, Szabo G. Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol* 2011; **17**(43): 4772-4778.

29. Shah N, Mohamed FE, Jover-Cobos M, Macnaughtan J, Davies N, Moreau R, Paradis V, et al. Increased renal expression and urinary excretion of TLR4 in acute kidney injury associated with cirrhosis. *Liver Int* 2013; **33**(3): 398-409.
30. El-Achkar TM, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher PC. Sepsis induces changes in the expression and distribution of toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**(5): F1034-43.
31. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van 't Veer C. In vivo expression of toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002; **168**(3): 1286-1293.
32. Bortoluzzi A, Ceolotto G, Gola E, Sticca A, Bova S, Morando F, Piano S, et al. Positive cardiac inotropic effect of albumin infusion in rodents with cirrhosis and ascites: Molecular mechanisms. *Hepatology* 2013; **57**(1): 266-276.
33. Kabay B, Kocafe C, Baykal A, Ozden H, Baycu C, Oner Z, Ozguc M, et al. Interleukin-10 gene transfer: Prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis. *World J Surg* 2007; **31**(1): 105-115.
34. Jazaeri F, Tavangar SM, Ghazi-Khansari M, Khorramizadeh MR, Mani AR, Dehpour AR. Cirrhosis is associated with development of tolerance to cardiac chronotropic effect of endotoxin in rats. *Liver Int* 2013; **33**(3): 368-374.
35. Shah N, Dhar D, El Zahraa Mohammed F, Habtesion A, Davies NA, Jover-Cobos M, Macnaughtan J, et al. Prevention of acute kidney injury in a rodent model of cirrhosis following selective gut decontamination is associated with reduced renal TLR4 expression. *J Hepatol* 2012; **56**(5): 1047-1053.
36. Takada Y, Ishiguro S, Fukunaga K, Gu M, Taniguchi H, Seino KI, Yuzawa K, et al. Increased intracranial pressure in a porcine model of fulminant hepatic failure using amatoxin and endotoxin. *J Hepatol* 2001; **34**(6): 825-831.

37. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges SJ, Williams R, Jalan R. Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003; **52**(8): 1182-1187.
38. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; **119**(6): 1637-1648.
39. Liu H, Han T, Tian J, Zhu ZY, Liu Y, Li Y, Xiao SX, et al. Monitoring oxidative stress in acute-on-chronic liver failure by advanced oxidation protein products. *Hepatol Res* 2012; **42**(2): 171-180.
40. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008; **47**(4): 1248-1256.

Ringraziamenti

“Molte sono le persone che colgo l’occasione per ringraziare dell’aiuto e il sostegno che mi hanno dato in questi tre anni.

Innanzitutto mi preme ringraziare il Prof. Paolo Angeli che mi ha offerto da subito il suo aiuto, la sua disponibilità e la sua indubbia competenza. Lo voglio ringraziare anche per la passione e l’umiltà che lo contraddistinguono rendendolo un importante esempio per noi che cresciamo sotto la sua guida.

Un ringraziamento speciale ad Antonietta, un’amica ormai più che una collaboratrice, che con il suo supporto tecnico, morale ed affettivo ha permesso la realizzazione di vari progetti. Un ringraziamento a tutti i componenti (passati e presenti) del gruppo del Prof. Angeli: Salvatore, Filippo, Silvano, Giulio, Silvia, Marta, Antonella, Alessia, Elisa, Alessandra e Maria Luisa.

Ringrazio poi vivamente tutti i ragazzi dei Laboratori 1 e 2 in particolare Marco e Cristian sempre disponibili ad aiutarmi e consigliarmi.

Le persone che vorrei ringraziare con tutto il cuore sono i miei genitori, mio padre Claudio e mia madre Arianna per il loro continuo amore, sostegno e comprensione anche nei momenti difficili e di sconforto e per la fiducia che hanno sempre riposto in me. Un grazie speciale anche a mia sorella Alessandra che, con il suo essere solare e piena di vita, mi ha regalato sorrisi, spensieratezza e felicità permeati di concretezza. Ringrazio Fabio, che da quando è diventato parte fondamentale della mia vita mi ha sempre aiutato sia con l’affetto sempre dimostratomi che con preziosi contributi in ambito lavorativo. Un grazie speciale ai miei Nonni e a tutte le tribù Gola-Lazzarini e Ragazzo.

Un ringraziamento, infine, ai miei amici speciali (Filippo, Matteo, Marta, Serena, Cristina, Francesco, Giacomo, Federica, Sergio, Valentina, Alice, Cristiano, Ludovica, Elisa e Lorenzo) sempre presenti con risate, chiacchierate, consigli, confronti, discussioni di ogni tipo che mi hanno saputo sopportare e sostenere fino a qui”.