



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE E CLINICA
COORDINATORE: PROF. A. TUTTOLOMONDO

DIPARTIMENTO DELLA PROMOZIONE DELLA SALUTE, MATERNO-INFANTILE, DI
MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DI ECCELLENZA



Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro"
Direttore: Prof. A. Carroccio

*Il “milieu” citochinico del paziente cirrotico tra
circolazione iperdinamica e bilancio simpato-
vagale: il ruolo di Osteopontina, IL-22, IL-6, IL-
17, IL1Ra quali indicatori biomolecolari di
severità d’ipertensione portale e markers
predittivi di rischio di sanguinamento di varici
esofagee*

Tesi di Dottorato di Ricerca del

Dott. Giuseppe Miceli

Relatore: Chiar.mo Prof. Antonino Tuttolomondo

Indice

Capitolo 1

Cirrosi Epatica	pag. 5
1.1 Generalità e patogenesi	pag. 5
1.2 Manifestazioni cliniche	pag. 7
1.3 Circolazione iperdinamica	pag. 9
1.4 Diagnosi	pag. 11
1.5 Score prognostici	pag. 13

Capitolo 2

Ipertensione Portale	pag. 15
2.1 Fisiopatologia E Clinica	pag. 15
2.2 Diagnosi Di Ipertensione Portale e HVPG	pag. 17
2.3 Varici esofagee e sanguinamento	pag. 19
2.4 Terapia e profilassi del sanguinamento delle varici esofagee	pag. 21
2.5 Carvedilolo	pag. 24
2.6 Ascite refrattaria e betabloccanti	pag. 25

Capitolo 3

Il “Milieu” citochinico del paziente cirrotico	pag. 30
3.1 Generalità e meccanismi infiammatori nella cirrosi	pag. 30

3.2 Circolazione iperdinamica, SNA e immunomodulazione	pag. 35
3.3 Pattern citochinico dell'ipertensione portale	pag. 38
3.4 Pathways infiammatori nel sanguinamento varici esofagee	pag. 40
3.5 Pathways infiammatori nell' Encefalopatia porto- sistemica	pag. 42
3.6 Pathways infiammatori nel HCC	pag. 42
3.7 Citochine nello scompenso ascitico	pag.43

Capitolo 4

Variabilità della frequenza cardiaca (HRV)	pag. 45
4.1 Definizione e aspetti generali	pag. 45
4.2 Analisi del dominio del tempo	pag. 47
4.3 Analisi del dominio della frequenza	pag. 51
4.4 Componenti oscillatorie	pag 53
4.5 Significato prognostico dell'HRV	pag. 55

Capitolo 5

Il Sistema Nervoso Autonomo e il bilancio simpato-vagale nel Paziente Cirrotico	pag. 48
5.1 Fisiologia del SNA	pag. 58
5.2 Il bilancio simpato-vagale	pag. 60
5.3 HRV e cirrosi	pag. 61
5.4 La "Disfunzione Autonoma" del paziente cirrotico	pag. 64
QT e neuropatia autonoma nel paziente cirrotico	pag. 65

Capitolo 6

L'Osteopontina, IL-22, IL-6, IL-17, IL1Ra: biomarkers di severità d'ipertensione portale, rischio di sanguinamento di varici e alterazione autonómica nel paziente cirrotico. pag. 68

6.1 Introduzione pag. 68

6.2 Scopo dello studio pag. 70

6.2 Materiali e metodi pag. 71

6.3 Analisi e statistica pag. 76

6.4 Risultati pag. 77

6.5 Discussione pag. 86

6.6 Conclusioni pag. 104

BIBLIOGRAFIA

Capitolo 1 – Cirrosi epatica

1.1 Generalità e patogenesi

La cirrosi epatica è una patologia con grande impatto su scala mondiale sia per mortalità che per spesa sanitaria, rappresentando l'ottava causa di morte negli Stati Uniti [1]. Viene generalmente definita come una condizione patologica cronica, progressivamente ingravescente caratterizzata da fibrosi diffusa e dal sovvertimento della normale architettura epatica con formazione di noduli rigenerativi, che conduce alla disfunzione delle cellule epatiche e ad ipertensione portale [2]. È generalmente considerata irreversibile nei suoi stadi più avanzati, al contrario gli interventi precoci volti a risolvere le cause sottostanti possono notevolmente migliorare o addirittura invertire il processo patogenetico che conduce alla cirrosi. I pazienti affetti da cirrosi sono soggetti a numerose complicanze che possono ridurre sensibilmente l'aspettativa di vita e la qualità della stessa. In Italia nel 2017 la cirrosi epatica ha occupato il ventesimo posto tra le cause di morte più frequenti [3]. Ciononostante se a questi decessi venissero sommati quelli di una delle complicanze più frequenti ovvero l'epatocarcinoma, la cirrosi epatica rientrerebbe tra le prime dieci cause di morte. La cirrosi rappresenta una tappa finale comune a diverse patologie caratterizzate da danno d'organo a livello epatico [4-6]. Numerose sono le cause di malattia di fegato che possono esitare in cirrosi attraverso meccanismi che coinvolgono sia

infiammazione a livello del parenchima epatico che colestasi. Circa l'80% delle cause nei paesi occidentali è secondario a danno epatico alcool correlato, infezione da virus dell'epatite C (HCV) ed epatite grassa non alcolica (NAFLD) [7]. Tra le altre cause più frequenti di danno epatico responsabile di cirrosi vi sono: infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV), emocromatosi, epatite autoimmune, colingite biliare primaria e secondaria. Infine troviamo cause più rare come la colangite sclerosante primitiva, morbo di Wilson, danno da farmaci, deficit di alfa1 antitripsina, malattia celiaca, fibrosi portale idiopatica, scompenso cardiaco destro. Sebbene le cause di cirrosi epatica siano multifattoriali, vi sono caratteristiche fisiopatologiche che accomunano tutti i casi di cirrosi epatica e che includono degenerazione e necrosi degli epatociti con fenomeni di rigenerazione nodulare del parenchima epatico associate a formazione di tessuto fibroso con perdita di attività funzionale da parte del fegato. In risposta al danno parenchimale e alla perdita epatocitaria infatti, vengono rilasciati fattori di crescita che inducono iperplasia epatocellulare e angiogenesi. Quest'ultima è responsabile della formazione di nuovi vasi all'interno dei setti fibrosi che circondano i noduli. Tali vasi mettendo in comunicazione il sistema dell'arteria epatica e portale con quello delle vene epatiche ricostituisce i pathway di circolazione intraepatica. Ciononostante i vasi neoformati garantiscono esclusivamente un basso volume con elevate pressioni di afflusso venoso che non possono far fronte alla quantità di sangue che in condizioni fisiologiche accoglie il letto vascolare intraepatico contribuendo alla costituzione di una circolazione iperdinamica e dunque all'ipertensione portale [8].

1.2 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della cirrosi epatica possono includere sintomi non specifici quali anoressia, astenia, perdita di peso e sintomi legati alla quota d'insufficienza epatica e di scompenso che si instaura cronicamente a seguito del danno epatocitario. Alcuni pazienti con cirrosi epatica compensata possono presentarsi asintomatici o paucisintomatici non manifestando segni e sintomi caratteristici; in altri casi invece un esame obiettivo accurato può mettere in evidenza alcuni dei principali segni di ipofunzionalità epatocitaria come l'ittero, prurito, segni di sanguinamento gastro-intestinale, addome teso per presenza di ascite, eritema palmare, spider naevi, splenomegalia ed asterixis. In considerazione della soppressione ipotalamo-ipofisaria e del danno gonadico che spesso caratterizza questi pazienti è possibile riscontrare incremento dei valori di FSH con conseguenti alterazioni del ciclo mestruale nella donna fertile (dismenorrea, cicli anovulatori ecc) e ginecomastia, impotenza ed ipofertilità nell'uomo [9]. Con il progredire del danno parenchimale i pazienti cirrotici spesso presentano una progressiva riduzione della pressione arteriosa [10] associata allo sviluppo di alcune delle complicanze più severe come la sindrome epatorenale. L'ascite, ovvero l'accumulo di liquido nella cavità peritoneale, rappresenta una delle principali manifestazioni cliniche del paziente cirrotico in fase di scompenso. Lo sviluppo di liquido ascitico è la conseguenza finale di una serie di alterazioni anatomiche, fisiopatologiche e biochimiche che intervengono durante la storia naturale della cirrosi epatica. In passato le due teorie più accreditate sulla formazione dell'ascite ovvero la teoria dell'"underfill"

[11] e quella dell'overflow [12] sono state a lungo ritenute mutualmente esclusive. Oggi invece sappiamo che i meccanismi fisiopatologici chiamati in causa per descrivere le due teorie potrebbero rappresentare momenti e stadi diversi della malattia di fegato [13], e la più recente teoria che vede protagonista la vasodilatazione arteriosa [14] sembra essere quella più accettabile, essendo in grado di sintetizzare le due precedenti fornendo una spiegazione compatibile con i dati emodinamici a nostra disposizione. Un altro riscontro frequente nel paziente affetto da cirrosi epatica è la splenomegalia, che si ritiene sia secondaria alla congestione della polpa rossa in risposta all'ipertensione portale, sebbene la dimensione della milza non sembra correlare bene con i valori pressori del sistema portale [15,16]. Sono disponibili diversi esami ematochimici in grado di riflettere la condizione del fegato. Spesso ci si riferisce a questi test con la denominazione di "test della funzionalità epatica" sebbene non abbiano una specificità assoluta e possano essere anche perfettamente nel range di normalità nei pazienti con danno epatico cronico. Le alterazioni laboratoristiche più frequentemente riscontrate in caso di cirrosi sono anch'esse secondarie al danno parenchimale e alla ridotta funzionalità epatocitaria. Un incremento delle transaminasi e degli indici di colestasi (bilirubina, fosfatasi alcalina (FA), gamma glutamil transferasi (GGT)) sono di consueto riscontrabili in corso di cirrosi [17-22]. La ridotta attività epatica di sintesi proteica con riduzione della quota di albumina e della maggior parte dei fattori della coagulazione spesso conduce ad ipoalbuminemia ed incremento dei valori di INR con conseguente iponchia e tendenza alla diatesi emorragica [23-26]. L'ipersplenismo che accompagna la cirrosi epatica invece si traduce in un'esaltazione del fisiologico processo

emocateretico a livello splenico con comparsa di piastrinopenia, anemia e/o leucopenia all'aumento del grado di severità della ipertensione portale e della cirrosi [27]. Caratteristica, inoltre, è la iposodiemia del paziente con cirrosi epatica avanzata. Tale disturbo idroelettrolitico si istaura cronicamente ed è correlato alle modificazioni emodinamiche e ad un processo di adattamento neurormonale che coinvolge vari fattori tra cui il principale è la vasodilatazione sistemica e che esita in una alterata capacità di escrezione di liquidi. Diversi studi inoltre hanno dimostrato che la severità dell'iponatriemia è direttamente correlata alla severità della cirrosi [28].

1.3 Circolazione iperdinamica

La vasodilatazione sistemica svolge un ruolo centrale nella formazione del liquido ascitico e nella patogenesi dell'iponatriemia nel paziente cirrotico. Si caratterizza per una marcata riduzione delle resistenze vascolari periferiche e della pressione arteriosa media con aumento dell'output cardiaco [29-31]. Il territorio vascolare in cui la riduzione delle resistenze vascolari è maggiore è quello dei vasi splanchnici [32]. Negli ultimi anni il processo che conduce alla vasodilatazione splanchnica è stato ulteriormente chiarito e sembra riconoscere un ruolo fondamentale alla generazione dell'ossido nitrico e prostaglandine. La produzione di ossido nitrico, infatti, sembrerebbe essere incrementata a seguito di un esaltato assorbimento di endotossine a livello gastrointestinale a sua volta secondario allo shunt porto-sistemico e alla riduzione della funzione delle cellule reticoloendoteliali nel paziente con cirrosi epatica [33-34]. La

presenza di vasodilatazione a livello splancnico può avere effetti differenti sulla circolazione renale a seconda del grado di severità della cirrosi epatica. Infatti, negli stadi più precoci l'azione vasodilatatrice delle suddette sostanze può esercitare il medesimo effetto a livello dei vasi renali determinando un incremento del filtrato glomerulare [35]. Negli stadi più avanzati invece la vasodilatazione splancnica diventa più marcata portando ad un effetto paradossale che determina caduta della pressione arteriosa media e dunque del grado di perfusione renale che può precipitare nella sindrome epatorenale [36].

La riduzione della pressione arteriosa media conduce all'attivazione di meccanismi neuroormonali determinanti ritenzione idrosalina nel tentativo di ristabilire la normale perfusione incrementando il volume circolante effettivo. I principali sistemi implicati sono il sistema renina-angiotensina, il sistema nervoso simpatico e la vasopressina/ADH. L'attivazione di questi tre sistemi neuroormonali è direttamente proporzionale al grado di vasodilatazione splancnica e quindi all'insufficienza emodinamica e alla severità della cirrosi epatica [37-39]. L'effetto che ne deriva è un incremento della ritenzione di acqua che conduce alla formazione di ascite e alla conseguente iponatriemia ipotonica [40]. Poiché il grado d'iponatriemia è direttamente proporzionale all'attivazione del sistema di vasopressina/ADH a sua volta legato al grado di severità della cirrosi epatica, il valore del sodio plasmatico ha un discreto valore prognostico. Un valore di natriemia al di sotto di 130 mEq/L è associato ad una cattiva prognosi, così come un valore inferiore a 125 mEq/L sembrerebbe associarsi ad elevato rischio di sindrome epatorenale [41-44]. La severità della ritenzione del sodio si incrementa infatti, con il progredire della storia della

malattia, poiché la progressione delle alterazioni emodinamiche sistemiche e portali e l'attivazione consensuale dei sistemi vasoattivi neuroormonali contribuisce ad intensificare il grado di riassorbimento di sodio e acqua a livello renale [45,46]. Allo stesso tempo la perfusione renale e il filtrato glomerulare a livello del tubulo contorto prossimale aumentano marcatamente e il volume che raggiunge i segmenti più distali del nefrone risulta di conseguenza ridotto. Dunque, il riassorbimento di sodio avviene soprattutto prossimalmente rispetto al sito di azione dei diuretici dell'ansa e inibitori dei mineralcorticoidi. Questo potrebbe fornire una spiegazione sul fallimento della terapia diuretica nei pazienti che si trovano a questo stadio di malattia [47]. Inoltre, la ridotta risposta cardiovascolare ai sistemi vasocostrittori [48] perpetua l'ipoperfusione relativa del letto arterioso peggiorando l'effetto ipovolemizzante dei diuretici.

1.4 Diagnosi

Nei pazienti con sospetta cirrosi epatica il primo step diagnostico prevede l'esecuzione di un esame strumentale, generalmente ecografico, per valutare le caratteristiche morfologiche del fegato. Secondo una recente metanalisi [49] i fattori che presentano una capacità predittiva di cirrosi più elevata sarebbero: la presenza di ascite (likelihood ratio (LR) 7,2), una conta piastrinica $< 160000/\text{mm}^3$ (LR 6,3), la presenza di spider naevi (LR 4,3) e lo score di Bonacini con un punteggio maggiore di 7 (LR 9,4). L'ecografia dell'addome è il primo test tipicamente utilizzato nel sospetto di cirrosi epatica essendo non invasivo, ben tollerato e utilizzabile su larga scala. Permette di valutare con una certa accuratezza le caratteristiche

morfologiche del fegato, le dimensioni della milza, la presenza di ascite, trombosi portale ed indagare l'eventuale presenza di carcinoma epatocellulare (HCC). Nelle cirrosi avanzate il fegato appare piccolo e con superficie nodulare che però può anche essere presente in alcune forme di steatosi epatica [50, 51]. Tipico è inoltre il riscontro di atrofia del lobo destro ed ipertrofia delo lobo caudato o di lobi sinistri. In uno studio che utilizzava l'ecografia epatica nei pazienti con sospetta cirrosi che eseguivano biopsia epatica, la sensibilità della metodica ultrasonografica era del 91% e la specificità del 94% nel determinare la diagnosi corretta [52]. Lo studio tomografico del fegato non viene routinariamente utilizzato nella diagnostica delle patologie epatiche poiché fornisce dati molto simili a quello ecografico ma con un costo maggiore e con esposizione a radiazioni e a mezzi di contrasto. Anche il ruolo della risonanza magnetica è ormai limitato nella diagnosi di malattia ma svolge un ruolo più importante nella valutazione di alcune delle complicanze della cirrosi (HCC, trombosi portale). Un aumento dell'interesse nei confronti dell'elastografia si è registrato negli ultimi anni. Questa metodica non invasiva ed a basso costo infatti, è capace di valutare il grado di rigidità del parenchima epatico e splenico fornendo dunque una stima indiretta del grado di fibrosi e quindi della severità della patologia a carico del parenchima epatico [53, 54]. La biopsia epatica che rappresenta il gold standard, può essere utilizzata per confermare la diagnosi. Generalmente però, non si rende necessario il ricorso alla biopsia nella pratica clinica qualora le caratteristiche anamnestiche, cliniche, laboratoristiche e radiologiche suggeriscano fortemente la diagnosi [55].

1.5 Score prognostici

I modelli prognostici sono degli utili strumenti per valutare la severità della patologia e la sopravvivenza dei pazienti cirrotici, potendo anche essere utilizzati nel processo del decision-making per indirizzare l'iter diagnostico-terapeutico. I vari modelli sono stati sviluppati attraverso precise metodologie statistiche utilizzate per valutare l'impatto di alcune variabili, demografiche, cliniche, laboratoristiche sull'outcome dei pazienti. I due principali modelli adoperati con più frequenza nella pratica clinica sono il Child-Pugh e Il MELD score. Il primo è costituito da cinque variabili ed è usato per stimare la prognosi del danno epatico cronico e della cirrosi. Le tre classi Child-Pugh (A, B e C) originariamente sono state sviluppate nel 1964 [56, 57] per predire la mortalità operatoria in pazienti che presentavano sanguinamento delle varici esofagee e dovevano essere sottoposti a procedure di shunt portosistemico. Da allora ha subito un processo di modificazione e perfezionamento che lo ha condotto ad essere largamente impiegato come strumento prognostico. Lo score è costituito da cinque fattori, tre dei quali rappresentano la funzione sintetica del fegato (bilirubina totale, albumina sierica e INR) e i restanti due si basano su caratteristiche cliniche (grado di ascite e grado di encefalopatia epatica). Un sistema di calcolo prevede l'assegnazione di punti per ogni variabile a seconda del grado di alterazioni. La sopravvivenza stimata ad 1 anno e 5 anni sono rispettivamente del 95% e 75% per i pazienti con Child-Pugh classe B e 85% e 50% per i pazienti con Child-Pugh classe C. Dopo la comparsa delle principali complicanze quali ascite, sanguinamento delle varici esofagee, ittero o encefalopatia, il

tasso di sopravvivenza per questi pazienti è significativamente ridotto. Il MELD score è stato originariamente sviluppato per predire la mortalità a tre mesi dopo posizionamento di shunt portosistemico intraepatico transgiugulare (TIPS) in 231 pazienti e successivamente validato in una coorte di pazienti indipendente [58]. Anche in questo caso si tratta di un modello prospettico validato per stimare la severità della cirrosi epatica che prende in considerazione i valori sierici di bilirubina, creatinina sierica, INR per predire la mortalità a tre mesi. Data la sua accuratezza nel predire il tasso di sopravvivenza nel breve periodo è spesso adoperato per valutare il rischio dei pazienti in attesa di trapianto epatico [59]. La versione originale prevedeva anche la distinzione in base all'eziologia della malattia di fegato ma fu successivamente rimossa dallo score perché poneva difficoltà nel categorizzare soggetti che presentavano multiple eziologie e non modificava significativamente la capacità predittiva dello score. Nel 2016 inoltre è stato inserito il sodio sierico tra le variabili del MELD score. Numerosi studi [60-67] hanno dimostrato come la presenza delle concentrazioni di sodio sierico nello score abbia incrementato l'accuratezza nei pazienti con iponatriemia. Ciononostante, la severa iponatriemia (sodio < 125 mEq/L) sembra essere un miglior predittore del MELDNa score nei pazienti con ascite refrattaria [68]

Capitolo 2 – Ipertensione portale

2.1 Fisiopatologia E Clinica

L'ipertensione portale è una complicanza quasi inevitabile della cirrosi epatica e rappresenta il primum movens per lo sviluppo di altre complicanze quali le varici gastriche ed esofagee, il sanguinamento di quest'ultime, la gastropatia da ipertensione portale, la peritonite batterica spontanea (PBS), la formaione di ascite, la sindrome epatorenale, l'ipersplenismo con le alterazioni ematologiche che ne derivano e l'encefalopatia portosistemica (EPS).

La pressione portale è data dal prodotto del flusso venoso portale in ingresso e della resistenza al flusso in uscita offerta dal sistema venoso portale. Il primo è determinato dal tono delle arteriole mesenteriche, dunque una riduzione di tale tono arteriolare determina un aumento del flusso venoso portale e quindi della pressione portale i cui valori normali sono compresi tra i 5 e i 10 mmHg.

La resistenza offerta al flusso in uscita dal sistema portale può invece essere considerata come la somma di due resistenze in parallelo. La prima è dovuta alla resistenza del flusso attraverso la vena porta, fegato e vene epatiche; la seconda invece è secondaria alla resistenza offerta al flusso da vasi collaterali che conducono il sangue alla circolazione sistemica in maniera indipendente dal sistema portale. L'aumento delle resistenze al flusso verso il fegato è in parte dovuto alla vasocostrizione epatica secondaria all'alterata produzione di ossido nitrico nei soggetti epatopatici. È stato stimato che circa il 30 % delle resistenze intraepatiche può essere reversibile e non è dovuto ad alterazioni della parete del vaso [69,70].

Nei pazienti cirrotici, l'incremento del flusso portale è conseguente all'incremento del flusso in ingresso secondario alla vasodilatazione arteriolare splancnica e all'elevata resistenza che incontra il flusso a livello dell'architettura sinusoidale alterata. Le varici esofagee

agiscono come meccanismo di compenso decomprimendo la vena porta e veicolando il sangue verso la circolazione sistemica nei pazienti con ipertensione portale. Il normale gradiente pressorio tra la porta e le vene epatiche (Hepatic venous pressure gradient o HVPG) è compreso tra 1 e 5 mmHg. Le varici si formano quando tale gradiente sale intorno ai 10 mmHg e sono a rischio sanguinamento sopra i 12mmHg. [71]. Tali pazienti presentano inoltre un rischio aumentato di sviluppare scompenso (ascite, sanguinamento, ittero, encefalopatia) e carcinoma epatocellulare [72-74]. Vi sono dunque due componenti principali che partecipano all'incremento della pressione portale: le alterazioni strutturali e le modificazioni dinamiche [75]. La prima dipende dalla distorsione della microcircolazione epatica secondaria ai processi di fibrosi, rigenerazione nodulare, angiogenesi e occlusione vascolare. Le modificazioni dinamiche invece fanno riferimento alla contrazione delle cellule epatiche stellate attivate e dei miofibroblasti che circondano i sinusoidi epatici e la contrazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi intraepatici. Queste modificazioni del tono contrattile sembrerebbero essere secondarie alla produzione di sostanze vasocostrittrici (endoteline, angiotensina II, norepinefrina, trombassano A2) e al ridotto rilascio di sostanze endoteliali con effetto vasodilatatore (ossido nitrico). Man mano che l'ipertensione portale peggiora, il flusso in ingresso a livello splanchnico si incrementa a causa del rilascio a livello locale di ossido nitrico e altre molecole vasodilatatrici e angiogenetiche. Contribuiscono inoltre a peggiorare la severità dell'ipertensione portale anche l'ipotensione sistemica, la stimolazione dei sistemi vasoattivi endogeni, l'espansione del volume plasmatico e gli altri fattori responsabili della formazione di ascite. Il

ruolo del sistema nervoso, in particolare del sistema nervoso simpatico, nello sviluppo della circolazione iperdinamica e quindi della ipertensione portale è stato più volte chiamato in causa [76-78]. È stato dimostrato infatti come l'atrofia dei nervi simpatici osservata a livello delle arterie mesenteriche nei topi con ipertensione portale contribuisca alla vasodilatazione e/o all'ipocontrattilità di queste arterie [79, 80]. Il ruolo del sistema nervoso nella riduzione della risposta contrattile non è però stato chiarito del tutto e ancora oggi rappresenta una importante area in corso di esplorazione [81].

2.2 Diagnosi Di Ipertensione Portale e HVPG

La diagnosi d'ipertensione portale può essere effettuata se un paziente che presenta i fattori di rischio (per esempio: cirrosi epatica) manifesti le caratteristiche cliniche d'ipertensione portale anche senza eseguire test diagnostici di conferma.

In alcuni casi se la diagnosi è dubbia, si può ricorrere alla determinazione della HVPG. Nonostante i costi e l'invasività, la misurazione dell'HVPG rappresenta uno strumento utile e preciso. I valori normali di HVP sono compresi tra 1 e 5 mmHg [82-83]. Si parla di ipertensione portale quando i valori di HVPG superano i 6 mmHg. I primi sintomi clinici compaiono quando la pressione portale sale al di sopra dei 10 mmHg, con possibile comparsa delle varici esofagee. Una riduzione dell'HVPG sotto i 12 mmHg, infatti, virtualmente elimina il rischio di sanguinamento delle varici esofagee [72, 84-90]. Fino ad oggi la misurazione invasiva della pressione portale mediante HVPG rappresenta l'unico metodo accurato per la diagnosi di ipertensione portale [91].

A causa però dell'invasività della metodica e dei costi connessi, tale misurazione non trova spazio nella routine clinica [92].

L'HVPG è calcolata sottraendo la pressione epatica libera (che riflette la pressione intraddominale) dalla pressione di incuneamento a livello delle vene epatiche (che riflette la pressione venosa portale) ottenute mediante cateterizzazione delle vene epatiche. L'obiettivo terapeutico consiste nel ridurre, attraverso l'uso dei betabloccanti, la HVPG del 10% o comunque ad un valore inferiore a 12 mmHg. Inoltre il rischio di sviluppare complicanze dovute all'ipertensione portale nonché il rischio di exitus, aumentano con l'incremento dei valori di HVPG come riassunto nella tabella 3 [93].

Altri test non invasivi sono stati proposti per la diagnosi non invasiva d'ipertensione portale tra cui i principali sono l'ecografia e l'elastografia. Alcune delle immagini ultrasonografiche addominali possono supportare la diagnosi di ipertensione portale ma mancano di sensibilità [94-96]. Tra queste vi sono il riscontro di: ascite, splenomegalia, fegato nodulare, velocità media di flusso portale < 12 cm/sec, inversione del flusso nella vena porta, circoli collaterali portosistemici, diametro portale > 13 mm, scarsa o assente modulazione respiratoria nelle vene splenica e mesenterica superiore e trombosi portale splenica o della vena mesenterica superiore. L'elastografia ad ultrasuoni è un'altra metodica non invasiva per la determinazione di fibrosi epatica. Diversi studi hanno evidenziato come l'elastografia sia in grado di predire la presenza di ipertensione portale con valori cutoff di stiffness che vanno da 13,6 a 34,9 kPa [95-99]. È stato suggerito che un valore inferiore a 13,6 kPa può essere utilizzato per escludere la diagnosi di ipertensione portale mentre

valori superiori a 21,1 kPa possano essere utilizzati per diagnosticarla [92.]

2.3 Varici esofagee e sanguinamento

Lo sviluppo di varici esofagee e il loro sanguinamento rappresentano la causa principale di mortalità e morbidità dei pazienti con cirrosi epatica [100]. Ogni episodio di sanguinamento delle varici esofagee è associato ad un 30% di rischio di mortalità e il rischio di nuovo sanguinamento ad un anno nei soggetti sopravvissuti a rottura delle varici esofagee è di circa il 70% [101, 102]. La prevalenza delle varici esofagee è di circa il 40% nei pazienti asintomatici compensati [71]. Lo sviluppo delle varici esofagee ha un'incidenza di circa il 6% per anno. L'incidenza è circa il doppio nei pazienti con HVPG > 10 mmHg che rappresentano una popolazione ad alto rischio. Al di là della pressione intravascolare, il rischio di sanguinamento delle varici è ulteriormente influenzato da altri fattori quali il diametro delle varici e lo spessore delle loro pareti [103]. Questi fattori sono correlati fra loro nella legge di Laplace circa il concetto di tensione di parete (t), secondo la quale: $t = \text{pressione trasmurale delle varici} \times \text{raggio delle varici} / \text{spessore di parete}$. Il sanguinamento delle varici dunque avviene quando la tensione delle varici eccede il limite elastico del vaso [104]. Questo concetto spiega perché i pazienti a più alto rischio siano quelli con alcune caratteristiche quali: varici grandi, presenza di "red wales" (ovvero aree a ridotto spessore), insufficienza epatica avanzata (Child-Pugh classe B e C) [104, 105]. I siti più comuni di formazione delle varici sono l'esofago distale, lo stomaco e il retto sebbene teoricamente le varici possano svilupparsi a qualunque

livello del tratto gastro intestinale tra l'esofago e il retto. Si sviluppano all'interno della sottomucosa nella parte media dell'esofago ma diventano via via più superficiali nella porzione distale. Dunque le varici esofagee alla giunzione gastroesofagea presentano uno strato di rivestimento molto sottile e sono più facilmente soggette a sanguinamento. Altrettanto soggette a sanguinamento sono anche le varici del fondo gastrico che vengono classificate in accordo alla loro posizione che correla con il loro rischio emorragico. Si distinguono in: varici che sono in continuità diretta con l'esofago lungo la piccola e la grande curvatura dello stomaco e sono chiamate gastroesofagee (GOV) rispettivamente di tipo 1 e tipo 2; varici gastriche isolate (IGV1) meno frequenti delle prime [106]. Come già ricordato, la dimensione delle varici rappresenta un fattore di rischio indipendente di sanguinamento. Vi sono diversi metodi per quantificare le dimensioni delle varici e tutti per lo più prevedono una valutazione soggettiva. Un sistema di classificazione comunemente utilizzato è quello riportato nella tabella 1 [107, 108].

2.4 Terapia E Profilassi Del Sanguinamento Delle Varici Esofagee

L'obiettivo della terapia profilattica, sia essa farmacologica o endoscopica, è quello di ridurre la pressione portale. La profilassi può essere distinta in pre-primaria, primaria e secondaria. La profilassi

pre-primaria ha come obiettivo quello di prevenire lo sviluppo delle varici nei pazienti con ipertensione portale che non le presentano. In tali pazienti il trattamento delle cause che sottendono alla malattia di fegato può aiutare a prevenire lo sviluppo delle varici. Ciononostante, non è raccomandato in tali circostanze l'utilizzo dei farmaci betabloccanti poiché nessuno studio è riuscito a dimostrare un effettivo beneficio [108, 109]. Con profilassi primaria invece si intende la prevenzione del primo sanguinamento in un paziente con varici. La profilassi secondaria invece è volta ad evitare un secondo, o successivi sanguinamenti, in pazienti che hanno già presentato rottura delle varici esofagee. L'effetto dei betabloccanti in profilassi secondaria sembra essere maggiore rispetto a quello in profilassi primaria. Infatti in quest'ultimo caso, la riduzione del rischio assoluto di sanguinamento associata al trattamento con betabloccanti è del 10%, dunque 10 pazienti (number needed to treat -NNT) devono ricevere la terapia per prevenire un episodio di sanguinamento in un periodo di 2 anni [110]. Invece, la riduzione del rischio assoluto di un ulteriore episodio di sanguinamento delle varici esofagee dopo terapia con betabloccante, risulta essere del 21% con un NNT di 5 pazienti. Inoltre nella profilassi secondaria, il trattamento con betabloccanti non selettivi riduce la mortalità del 7% con un NNT di 14 pazienti [110].

In considerazione dell'alto rischio di complicanze riscontrato nei pazienti con elevata pressione portale, è nato un grande interesse negli ultimi anni nei confronti delle strategie farmacologiche e non, volte a ridurre il grado di ipertensione portale nei pazienti affetti da cirrosi epatica e dunque prevenire le complicanze, lo scompenso clinico e il decesso ad essa correlate [111]. Il beneficio della riduzione della HVPG è stato più volte dimostrato per i pazienti che hanno

evidenziato una buona risposta emodinamica all'utilizzo dei betabloccanti non selettivi. Infatti, i pazienti che hanno mostrato una riduzione della HVPG maggiore del 20% o una riduzione dei valori al di sotto dei 12 mmHg rispetto al controllo basale, hanno evidenziato una riduzione dell'incidenza di sanguinamento [112-115]. Come già ricordato i pazienti più a rischio di rottura e sanguinamento delle varici esofagee non sono solo quelli con elevati valori di pressione portale, ma anche i pazienti che presentano varici di grandi dimensioni, con segni rossi o malattia avanzata (Child-Pugh classe B o C) (tabella 2). Le attuali linee guida raccomandano la terapia profilattica in pazienti con varici che presentano una delle suddette caratteristiche [116, 117].

Nella pratica clinica dunque andrebbero trattati gran parte dei pazienti con varici eccetto quelli con Child-Pugh A con piccole varici senza, segni rossi. La terapia raccomandata per la profilassi primaria include la somministrazione di betabloccanti non selettivi o la legatura endoscopica delle varici esofagee mediante lacci [116, 117]. Diverse metanalisi hanno evidenziato come la legatura endoscopica sia più efficace nel prevenire il sanguinamento senza però fornire un reale beneficio in termini di sopravvivenza [118, 119]. Ciononostante, una recente review ha messo in dubbio queste conclusioni, sostenendo che limitando l'analisi agli studi di buona qualità non vi fossero differenze in termini di frequenza di sanguinamento a causa della ridotta durata dei follow-up e degli effetti incerti sulle piccole varici esofagee. È stato inoltre evidenziato come la legatura endoscopica presenti meno effetti collaterali rispetto all'impiego di betabloccanti non selettivi (propranololo e nadololo) sebbene le complicanze derivanti dalla profilassi farmacologica siano di lieve entità e

generalmente facilmente risolvibili mediante riduzione della posologia o sospensione del farmaco. Al contrario le complicanze scaturite dalla legatura endoscopica spesso richiedono l'ospedalizzazione e in alcuni casi possono mettere a rischio la vita del paziente [119]. Appare dunque ragionevole un approccio che preveda l'inizio, nei pazienti selezionati, di una profilassi con betabloccanti e riservare la legatura endoscopica per i pazienti con varici molto grandi o che presentino controindicazioni all'impiego di betabloccanti o che abbiano sviluppato effetti collaterali che hanno richiesto la sospensione di tali farmaci. I pazienti che sono stati sottoposti a legatura endoscopica delle varici esofagee devono essere tenuti sotto uno stretto monitoraggio che prevede un follow-up ad 1 mese dall'ultima seduta endoscopica, per confermare l'eradicazione, e successivamente a 3 e 6 mesi. I betabloccanti non selettivi più utilizzati sono nadolo e propranololo. Il loro meccanismo di azione si esplica bloccando il tono adrenergico dilatatore delle arteriole mesenteriche che comporta un incremento dell'attività alfa adrenergica in grado di mediare la vasocostrizione e dunque una riduzione del flusso portale in ingresso [120]. Numerosi sono i trials e le metanalisi che hanno dimostrato l'efficacia dei betabloccanti non selettivi nella profilassi primaria [121-127].

Una volta iniziata la terapia, la dose del farmaco può essere titolata basandosi in maniera approssimativa ma non invasiva sulla riduzione della frequenza cardiaca oppure misurando la HVPG che riflette il grado di riduzione della pressione portale raggiunta ma attraverso una procedura invasiva non scevra di complicanze [72, 84, 128]. Non vi sono biomarkers o test non invasivi considerati validi e sensibili per valutare l'efficacia de BBNS, né in grado di predire la risposta

emodinamica a tali farmaci se si esclude la misurazione mediante HVPG prima e durante terapia con BBNS [129]. La risposta acuta alla somministrazione di propranololo ev può rappresentare un eccellente surrogato della risposta a lungo termine, ma comunque richiede la misurazione invasiva mediante HVPG [84]. La somministrazione orale o endovenosa di propranololo è in grado di determinare una riduzione della HVPG compresa tra il 9 e il 23% grazie anche alla riduzione della frequenza e della portata cardiaca che contribuisce alla riduzione del flusso a livello splancnico [120, 130, 131]. La mancata risposta alla profilassi con betabloccante che si registra in alcuni pazienti potrebbe essere secondaria ad un concomitante incremento nella resistenza dei sinusoidi a livello epatico e/o dei vasi collaterali o ad un incremento riflesso del flusso a livello dell'arteria epatica.

2.5 Carvedilolo

Il carvedilolo è un potente betabloccante non selettivo dotato di una modesta attività anti alfa 1 adrenergica (circa un decimo dell'effetto betabloccante). Al pari del propranololo, è in grado di ridurre l'afflusso portale e dunque la pressione portale nei pazienti cirrotici grazie alla riduzione della frequenza cardiaca e dell'output cardiaco e stimolando la vasocostrizione a livello splancnico. Inoltre, grazie all'effetto alfa 1 bloccante, il carvedilolo è in grado di ridurre il tono vascolare epatico e le resistenze epatiche con una ulteriore riduzione netta della pressione portale. Ciononostante, l'effetto vasodilatatore del carvedilolo può contribuire a pronunciare maggiormente l'ipotensione e la ritenzione di sodio in misura più rilevante nei casi di cirrosi epatica scompansata [132-134]. Vi sono molti studi che hanno evidenziato l'effetto del carvedilolo nei pazienti con ipertensione

portale [135-141], la maggior parte dei quali hanno evidenziato un effetto sulla HVPG. I risultati evidenziano come il carvedilolo determini una riduzione dose correlata dei valori di HVPG, di circa il 20% rispetto ai valori di base, e decisamente superiore rispetto al propranololo. Il carvedilolo sembra essere responsabile di una marcata riduzione dell'output cardiaco e del flusso venoso a livello della vena azigos rispetto al propranololo, ma al prezzo di una maggiore caduta pressoria di circa il 10 % con una dose di 25 mg/die [132]. Inoltre, i pazienti con cirrosi epatica avanzata (classe B e C di Child) mostrano una riduzione maggiore dei valori di HVPG rispetto ai pazienti ben compensati sebbene ricevano dosi di carvedilolo inferiori, probabilmente a causa di una ridotta capacità di metabolizzare il farmaco [132, 133].

2.6 Ascite refrattaria e Betabloccanti

L'effetto dei BBNS conduce ad una riduzione dei valori di HVPG e dunque produce un effetto emodinamico che è tanto maggiore quanto severo è lo stato di circolazione iperdinamica. I BBNS infatti, agiscono riducendo la frequenza cardiaca e inibendo la vasodilatazione splanchnica. Questo potrebbe suggerire che è più probabile attendersi una risposta in pazienti con una pronunciata circolazione iperdinamica come i pazienti con ascite refrattaria [47]. A causa dell'invasività e della scarsa diffusione della misurazione della HVPG, la dose di BBNS è spesso titolata sulla base della frequenza cardiaca, fino a raggiungere un valore di circa 50-55 bpm [142]. In considerazione dell'elevata frequenza cardiaca a riposo, elevati valori di BBNS sarebbero necessari per raggiungere il target di frequenza nei pazienti decompensati rispetto a quelli compensati. In questo

contesto, l'upregulation del SNS associato all'incremento dell'attività adrenergica a livello dell'output cardiaco rappresenta un sistema adattativo di compenso che ha come scopo quello di garantire il corretto volume circolante effettivo. Nelle situazioni in cui la riserva cardiaca è ridotta (paracentesi con drenaggio di grandi quantità di liquido ascitico, sanguinamento delle varici, peritonite batterica spontanea ecc) i pazienti con cirrosi frequentemente sviluppano una compromissione progressiva del compenso emodinamico sistemico che può condurre ad insufficienza renale acuta [143, 144]. In questo scenario i BBNS potrebbero compromettere l'incremento della gittata cardiaca mediata dalla stimolazione beta adrenergica, essenziale per garantire la perfusione renale e sistemica nella cirrosi avanzata [145-147]. Il ruolo critico del SNS nel mantenere ad un livello sufficiente la circolazione sistemica durante alcune condizioni di scompenso è confermato dall'effetto benefico della somministrazione di noradrenalina in corso di sindrome epatorenale e indirettamente dall'effetto deleterio dei BBNS sulla funzionalità renale e sulla pressione arteriosa di questi pazienti [148, 149]. Un crescente numero di evidenze testimonia come non vi siano effetti negativi nell'utilizzo dei BBNS nei pazienti con ascite in generale [119, 150]. Ciononostante, l'utilizzo della profilassi farmacologica dovrebbe essere basata su una attenta valutazione dei rischi nei pazienti con ascite refrattaria, con segni di disfunzione emodinamica sistemica [143,150-152] e di progressione verso gli stadi terminali di patologia come iponatriemia, ipotensione, incremento dei valori di creatinemia. In presenza di tali condizioni andrebbe sempre considerata la sospensione della terapia con BBNS [105, 153, 154]. Il dibattito circa il potenziale effetto dannoso dei BBNS nella patologia

epatica avanzata ed in particolare nei pazienti con ascite refrattaria è iniziato a seguito della pubblicazione di alcuni studi [105, 153] che riportavano un incremento della mortalità nei pazienti con cirrosi epatica e ascite refrattaria che praticavano profilassi farmacologica con BBNS. In uno dei primi trial osservazionali, dei 151 pazienti arruolati con cirrosi epatica e ascite refrattaria, il 51% aveva varici esofagee e stava assumendo propranololo, mentre la restante parte non presentava varici e non assumeva betabloccanti. In questo studio i pazienti trattati con propranololo avevano una sopravvivenza media significativamente più bassa dei pazienti non in trattamento con propranololo (5 mesi contro 20 mesi). Le analisi multivariate confermavano inoltre che il trattamento con betabloccanti era uno dei quattro predittori di mortalità indipendente in questa popolazione di cirrosi. Secondo una più recente teoria, definite "ipotesi finestra" proposta da Krag et al. [146], vi sarebbe ristretto range di dose terapeutica per il trattamento con BBNS che diventa sempre più ristretta con l'avanzare della patologia e l'aggravarsi del quadro emodinamico. Come già ricordato l'effetto maggiore dei BBNS si esplica nella profilassi secondaria con una netta riduzione dei sanguinamenti e della mortalità [110] ed avviene attraverso un effetto di blocco dei recettori beta adrenergici dei vasi splancnici e dei recettori beta1 posti a livello del miocardio che sono stimolati dal SNS. Tale approccio terapeutico che mira a ridurre le conseguenze dell'ipertensione portale deve però tenere in considerazione lo scenario del paziente che si ha di fronte. Per mantenere la stabilità emodinamica, due sono i principali meccanismi compensatori sviluppati. Il primo è un ulteriore incremento nel rilascio di sostanze vasocostrittrici per accrescere le resistenze vascolari periferiche e il

secondo è un aumento dell'output cardiaco nel tentativo di aumentare il volume circolante effettivo nel letto vascolare iperespanso. Quest'ultimo meccanismo risulta essere operativo durante gran parte del decorso clinico dei pazienti con cirrosi epatica. Ciononostante, quando la malattia epatica progredisce e la vasodilatazione arteriosa diventa più marcata, il cuore può non essere più in grado di fronteggiare la marcata vasodilatazione sistemica [143, 152, 155]. A questo stadio, l'ipotensione arteriosa può essere tamponata e prevenuta solo attraverso un'ulteriore attivazione delle sostanze endogene vasoattive (sistema renina angiotensina aldosterone, SNS, e ADH/vasopressione). La riduzione della perfusione renale e l'ulteriore ritenzione di sodio e acqua rappresentano le naturali conseguenze di tale risposta fisiopatologica caratterizzata dalla ipoperfusione arteriosa relativa. In queste condizioni si assiste all'aumento della formazione di versamento ascitico e in molti casi allo sviluppo di sindrome epatorenale di tipo 2. Con la progressione della patologia di fegato e l'incremento della pressione portale, l'attivazione del SNS e la circolazione iperdinamica diventano più pronunciate [146, 156]. Nei casi in cui si assista ad un peggioramento del grado di ipertensione portale o sia sopraggiunta una complicanza come un'infezione severa o un episodio di peritonite batterica spontanea le resistenze sistemiche vascolari tenderanno a decrescere [157]. In uno scenario di questo tipo, nei pazienti non in trattamento con BBNS, vi sarà un tentativo di compenso caratterizzato dall'aumento della frequenza e della gittata cardiaca volto a mantenere stabile la circolazione sistemica e a garantire un buon grado di perfusione degli organi vitali e del rene. Alcuni studi hanno sottolineato come nella cirrosi avanzata, la gittata cardiaca diventi criticamente dipendente dalla frequenza

cardiaca [158]. Dunque alcuni segni clinici come ipotensione o segni di insufficienza renale durante il trattamento con BBNS devono lasciar pensare ad una condizione di instabilità circolatoria e ad un effetto negativo dei BBNS in tali pazienti con cirrosi epatica scompensata.

Capitolo 3 - Il “Milieu” citochinico del paziente cirrotico

3.1 Generalità e meccanismi infiammatori nella cirrosi

La fibrosi epatica, che caratterizza da un punto di vista istologico la cirrosi, è il risultato di un'esaltata risposta rigenerativa associata al danno epatico cronico. Essa è il prodotto dell'accumulo di matrice extracellulare e formazioni di cicatrici [159]. A seguito del danno epatico le cellule epatiche stellate, infatti, subiscono un processo di transdifferenziazione e si trasformano in cellule simil miofibroblaste acquisendo capacità contrattile, proinfiammatoria e fibrogenetica

[159-160]. Inoltre, come è noto, anche il sistema immunitario gioca un ruolo importante nella progressione del danno epatico. Numerosi componenti del sistema immune (neutrofili, monociti/macrofagi e linfociti) sono coinvolti nella genesi della fibrosi epatica attraverso il controllo dei miofibroblasti [161]. Negli ultimi anni numerosi studi hanno valutato l'espressione di alcune proteine infiammatorie nel paziente cirrotico, nel tentativo di utilizzarle quali markers di danno epatico, severità di ipertensione portale e predire l'insorgenza di altre complicanze [162-169]. Tra queste, quelle che più recentemente sembrano correlare con il grado di ipertensione portale e le complicanze ad essa legate sono: interleuchina-22 (IL-22), interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-17 (IL-17), l'antagonista del recettore per l'interleukina-1 (IL1Ra) e l'osteopontina. IL-22 è un membro della famiglia dell'IL-10 [170]. L'IL-22 esercita la sua attività biologica attraverso un complesso recettore transmembrana costituito da due subunità (IL-22 recettore 1 e IL-10 recettore 2) che sono principalmente espresse a livello delle cellule intestinali, epiteliali respiratorie, cheratinociti ed epatociti [171]. Il legame tra IL-22 e IL-22R1-IL-10R2 avviene mediante interazione multistep che porta ad attivazione di una via JAK/STAT che conduce a sua volta alla fosforilazione di questi recettori e delle proteine STAT [172]. Questo segnale innesca la regolazione dell'espressione di numerosi geni coinvolti in processi di apoptosi, progressione del ciclo cellulare e angiogenesi. IL-22 è prodotta da numerose cellule del sistema immunitario tra cui linfociti T CD4+ e CD8+, natural killer (NK). Alcuni studi hanno dimostrato che IL-22 protegge il fegato contro diversi tipi di danno grazie alla promozione di meccanismi di sopravvivenza e proliferazione epatocitaria [173-177]. Inoltre la sovraespressione di

IL-22 tramite stimolazione genica sembra proteggere i topi da danno epatico, necrosi ed apoptosi in modelli sperimentali di danno epatico indotto [178]. Altri studi hanno dimostrato che IL-22 promuove la rigenerazione cellulare epatica determinando proliferazione e migrazione degli epatociti in vitro attraverso l'attivazione di segnali quali AKT e STAT3 [179]. Dall'altro lato alcune evidenze suggeriscono che IL-22 possa giocare un ruolo patologico nell'esacerbazione della infiammazione epatica cronica e della fibrosi nei soggetti HBV e HCV [180, 181]. Questo secondo ruolo esplicito da IL-22, in contrasto con quello epatoprotettivo sopradescritto, sembrerebbe essere prevalente in presenza di IL-17 [182-183]. Quest'ultima è una citochina proinfiammatoria che è prodotta dai linfociti Th 17 e che sembra svolgere un ruolo importante nella progressione del danno da epatite da HCV a cirrosi e fibrosi epatica [184-185]. Questa citochina è espressa maggiormente in corso di infiammazione ed agisce su un numero elevato di cellule: endoteliali, epiteliali, fibroblasti e cellule mieloidi, rappresentando un potente stimolo alla migrazione ed infiltrazione neutrofila. Il ruolo fibrogenico di IL-17 è stato sottolineato in un elevato numero di recenti pubblicazioni [186-187]. Il sottotipo linfocitario Th17 sembra essere aumentato in quasi tutte le patologie croniche di fegato che comportino danno acuto, cronico e fibrogenesi (epatite autoimmune, colangite primitiva sclerosante, steatoepatite non alcolica e virale) [188-190]. Nelle epatiti virali, in particolare, alcune proteine del virus sono riconosciute dai toll-like-receptor (TLR2 e TLR4) espressi sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche, macrofagi e macrociti) con conseguente attivazione delle stesse [191, 192]. Tali cellule attivate a loro volta attivano i pathways di segnale legati alla protein kinasi attivata da

mitogeno (MAPK) producendo dunque una cascata citochinica che coinvolge IL-1, IL-6, IL-21 ed IL-23 e attiva la differenziazione dei Th17 [193-197]. A loro volta, dopo la differenziazione le cellule Th17 produrranno elevate quantità di IL-17 e IL-22 mettendo in moto i processi fibrotici e proinfiammatori [198-200]. Questo dimostra il ruolo determinante che IL-17 esplica nelle patologie di fegato, sebbene i meccanismi che ne sono alla base non siano stati del tutto delucidati. L'asse Th17/IL-17 è associato ad una elevata severità di malattia nei soggetti con epatite virale come dimostrato da studi in cui vi erano percentuali di cellule Th17 più elevate nel circolo periferico di soggetti con epatite rispetto ai sani [201]. Anche nella progressione verso la cirrosi, in studi che includevano pazienti con malattie croniche di fegato è stato riscontrato un incremento significativo dei livelli sierici di IL-17 e del mRNA di IL-17 rispetto ai controlli sani e in tali pazienti le concentrazioni elevate di questa citochina correlavano anche con elevata mortalità [202]. La riduzione di livelli di Th17 e quindi di IL-17 dopo terapia virale con entecavir nei pazienti con HBV rappresenta un ulteriore dato a testimonianza del ruolo dell'asse Th17/IL-17 [203-204]. Anche se nel fegato, l'IL-17 sembra essere la citochina che più di tutte condiziona la progressione verso la cirrosi [205], altre citochine correlate a Th17 come IL-6 sono coinvolte nella progressione del danno epatico [206]. IL-6 è una citochina che appartiene al gruppo delle citochine a quattro eliche ed è prodotta in misura maggiore da adipociti e cellule immunitarie. È stato dimostrato un suo ruolo nella rigenerazione tissutale, infiammazione e difesa da patogeni [207-211] nonché nell'induzione della risposta epatica di fase acuta [212]. Gli effetti dell'IL-6 a livello epatocitario proteggono gli animali dall'infiammazione epatica e dall'insulino-resistenza. In un modello

preclinico di malattia di fegato, topi pretrattati con IL-6 subivano un danno epatico minore e viceversa nei topi con deficit di IL-6 la disfunzione epatica e la morte epatocitaria erano incrementate [213, 214]. Il meccanismo attraverso il quale IL-6 dovrebbe agire sulla storia naturale di tale patologia passerebbe attraverso l'upregulation di p-STAT3 invece che p-STAT1. IL-6 inoltre, sembrerebbe avere un ruolo nell'avanzamento della patologia di fegato e raggiungere concentrazioni nel liquido ascitico due volte superiori rispetto a quelle plasmatiche e valori sierici superiori nei pazienti con ascite rispetto ai pazienti compensati [215]. La maggior parte degli studi mostra quindi un incremento dei valori di IL-6 nei pazienti con cirrosi, con valori che si incrementano nelle classi più elevati del Child-Pugh Score [216, 217]. Ciononostante, l'analisi immunohistochimica ha fallito nel riscontrare IL-6 nel fegato di pazienti cirrotici, escludendo dunque l'aumento della produzione epatica di questa citochina potesse essere correlata agli alti livelli plasmatici [216]. Diversi studi hanno mostrato elevati livelli plasmatici di IL-1 alfa, IL-1 Beta e IL1Ra nei pazienti con cirrosi epatica [218, 219] ma tra questi solo i livelli di IL-1Ra sembrano correlare con la severità della patologia espressa mediante score (Child-Pugh e MELD). I livelli plasmatici di IL-1Ra nei pazienti cirrotici sembrerebbero essere secondari alla risposta immune innata dovuta alla disfunzione a carico della barriera mucosa intestinale [220]. La famiglia dell'IL-1 comprende 11 proteine la cui funzione principale è quella di controllo della reazione proinfiammatoria in risposta ad un danno tissutale [221]. I macrofagi e i monociti sono le cellule principalmente coinvolte nella produzione di questa famiglia di citochine. Nei pazienti affetti da cirrosi epatica, IL-1 è rilasciata dai macrofagi epatici. Le attività dell'IL-1 sono parzialmente regolate dalla

naturale attività inibitoria di IL-1Ra, la quale inibisce specificatamente le attività di IL-1 legandosi al suo recettore ma non svolgendo attività agonista [222]. Un altro marker recentemente utilizzato nella valutazione della severità dell'ipertensione portale è l'osteopontina. È una proteina multifunzionale fisiologicamente espressa quasi esclusivamente nel rene e nell'osso [223]. In condizioni patologiche la sua espressione però è stata identificata anche in altri organi ed è stata attribuita alla presenza di diverse condizioni patologiche che includono fenomeni infiammatori, angiogenetici, fibrotici e di carcinogenesi [224]. La concentrazione sierica di questa proteina è stata più volte correlata all'ipertensione portale e utilizzato come parametro prognostico indipendente di sopravvivenza nel paziente cirrotico. Sembra inoltre essere implicata nell'attivazione e migrazione macrofagica in sede epatica e in un ritardo nella risoluzione della fibrosi epatica in soggetti con cirrosi alcolica e non alcolica [225].

3.2 Circolazione iperdinamica, sistema nervoso autonomo e immunomodulazione

Nella cirrosi, la circolazione iperdinamica è caratterizzata da aumento della gittata cardiaca e della frequenza cardiaca e diminuzione delle resistenze vascolari sistemiche con bassa pressione arteriosa [226, 227]. La causa principale dell'insorgenza della sindrome è la vasodilatazione sistemica e splancnica, che alla fine porta ad anomalie del sistema cardiovascolare e di diversi letti vascolari regionali.

Al processo d'instaurazione della circolazione iperdinamica sappiamo prendere parte anche l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), l'incremento dell'ADH ma soprattutto il sistema

nervoso autonomo (SNA). Attraverso le fibre simpatiche e parasimpatiche il SNA regola ed integra molte funzioni del nostro organismo. Le ricerche degli ultimi anni hanno evidenziato come le fibre autonome esercitino un ruolo importante nell'identificazione e controllo dell'infiammazione nonché nella modulazione della risposta immune. Molte cellule del sistema immunitario infatti esprimono recettori adrenergici e colinergici e la loro interazione con il SNA potrebbe essere la chiave del sottile e delicato equilibrio tra risposta infiammatoria e non infiammatoria. È stato dimostrato che le fibre nervose possono promuovere il rilascio di norepinefrina dai nervi splenici. A sua volta la norepinefrina induce il rilascio di acetilcolina da parte di cellule T inibendo altresì la produzione di TNF nei macrofagi splenici che esprimono lo specifico recettore α_7 nAChR [228]. Altre evidenze arrivano da esperimenti animali dove il blocco non selettivo dei recettori Beta adrenergici e l'ablazione farmacologica del sistema nervoso simpatico con 6-idrossidopamina attenuava alterazioni immunologiche, preveniva infezioni e migliorava la sopravvivenza [229]. Un interessante punto di incontro da sistema nervoso simpatico e infiammazione è rappresentato altresì nella condizione di obesità. Okamoto et al [230] hanno ipotizzato che il livello di infiammazione sistemica associato all'obesità possa essere mediato dalle alterazioni autonome tipiche di questi pazienti che presentano incremento dell'attività simpatica e riduzione dell'attività parasimpatica e che l'attivazione della cascata infiammatoria dipende anche dal sito in cui viene prodotta l'IL-6. Per elicitarne il rilascio di PCR, l'IL-6 deve essere prodotta nel tessuto adiposo viscerale ed immessa direttamente nella circolazione portale, secondo gli autori [230]. Già in precedenza, inoltre, la stimolazione dei recettori Beta-adrenergici

con isoprotenerolo aveva mostrato incremento delle concentrazioni di IL-6 in adipociti isolati e in soggetti umani [231] e inoltre in rari pazienti con deficit di dopamina-beta- idrossilasi, enzima essenziale per convertire la dopamina in norepinefrina, i livelli di IL-6 si presentavano notevolmente ridotti. Diversi studi, come già detto, hanno evidenziato un incremento delle concentrazioni sistemiche di IL-6 nei pazienti con cirrosi epatica [216, 232-235]. Tali concentrazioni sembrerebbero più elevati nei pazienti con eziologia alcolica rispetto agli HCV o cirrosi criptogenetica [236-238] e a parità di eziologia si registra un incremento proporzionale al punteggio di Child-Pugh [216, 232, 235, 236]. Anche questo se messo in relazione con una alterazione del bilancio simpato-vagale presente nei pazienti con eziologia alcolica può suggerirci un effetto immunomodulatore da parte del SNA. Anche il RAAS sembra svolgere un ruolo importante nella regolazione della risposta infiammatoria. È ben noto, infatti, che il sistema renina-angiotensina-aldosterone è un forte stimolatore della sintesi di OPN, citochina iperespressa in corso di cirrosi. In uno studio in vitro, Abe et al. [239] hanno dimostrato che l'espressione di OPN indotta da angiotensina II veniva bloccata da valsartan nelle cellule muscolari lisce vascolari di ratto. Altri studi hanno riportato che l'aldosterone è responsabile dell'aumento di OPN e che tale aumento può essere abolito dall'antagonista del recettore dei mineralcorticoidi, lo spironolattone, nei fibroblasti renali [240] mentre l'utilizzo del valsartan riduce le citochine proinfiammatorie come l'IL-6 e OPN [240, 241]. In uno studio in vivo, Kramer et al. [242] hanno riportato che la nefropatia da adriamicina induceva l'espressione di OPN renale e il trattamento con l'inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina e la combinazione di inibitore

dell'enzima di conversione dell'angiotensina/spironolattone riduceva l'espressione di OPN renale. Questi studi precedenti e presenti indicano che la riduzione di angiotensina II e aldosterone da parte di valsartan può inibire l'espressione di OPN. Negli studi trascrizionali, sia l'Angiotensina II che l'aldosterone hanno indotto l'espressione di OPN attraverso la proteina 1 dell'attivatore del fattore trascrizionale che viene attivato dagli stimoli pro-infiammatori. [243]

I bloccanti del recettore per angiotensina II riducono l'OPN sia direttamente che indirettamente, attraverso la soppressione dell'infiammazione, l'inibizione dell'accumulo di macrofagi e la riduzione dello stress ossidativo [244]. Inoltre alcune evidenze hanno suggerito un ruolo del RAAS nella regolazione delle cellule T, nella modulazione della risposta infiammatoria TH1 e TH17 e nelle condizioni autoimmuni ad esse legate [245], nonché una downregulation di IL-17 mediata da TNF alfa e IL-6 attraverso la via di regolazione p38/MAPKinasi [246]. L'effetto benefico degli inibitori del RAAS a livello vascolare è dovuto ad una riduzione dell'infiammazione, dello stress ossidativo, della disfunzione endoteliale e dagli effetti rigenerativi esercitati sulle cellule progenitrici endoteliali attraverso la modulazione di alcuni fattori dell'infiammazione come ICAM-1, VCAM-1, TNF alfa e IL-6 [247]. Nonostante queste evidenze nel paziente cirrotico molti trials che utilizzavano

3.3 Pattern citochinico nell'ipertensione portale

Il razionale per l'utilizzo di alcune citochine proinfiammatorie sieriche come misura indiretta dell'ipertensione portale e del grado di HVPG

risiede nel fatto che l'ipertensione portale è, da un punto di vista patogenetico, legata al processo di fibrosi e di danno epatico e che a loro volta questi sono legati all'attivazione di processi infiammatori specifici. L'HVPG rappresenta inoltre, un fattore prognostico affidabile per la sopravvivenza a lungo termine in corso di cirrosi [248] e può altresì riflettere la progressione della malattia nella fase pre-cirrotica. Infatti, esiste un'associazione tra la gravità dell'infiammazione e della fibrosi epatica e l'HVPG anche prima che si sviluppi la malattia conclamata [249]. In letteratura abbondano i dati sulla capacità dell'HVPG di predire le complicanze dell'ipertensione portale in particolare lo scompenso ascitico [250] e l'emorragia da varici [251]. In uno studio di Ripoll et al [250], i pazienti con un HVPG < 10 mmHg avevano una probabilità del 90% di non sviluppare scompenso clinico dopo un follow-up mediano di 4 anni; tuttavia, i dati di sopravvivenza in questo studio non venivano adeguatamente mostrati. Una riduzione dell'HVPG a meno di 12 mmHg o una riduzione di oltre il 20% rispetto al valore basale sono stati associati a un ridotto rischio di emorragia da varici e ad una migliore sopravvivenza [252, 253]. In un interessante studio condotto su 154 pazienti per lo più ad eziologia alcolica [254] è stato evidenziato come un valore di cut-off HVPG di 10 mmHg, ottenuto durante una singola misurazione, ha permesso di stratificare i pazienti cirrotici in due gruppi con diverse prognosi riguardo alla probabilità di sopravvivenza e il dosaggio l'OPN in questi pazienti si è rivelato un attendibile predittore di sopravvivenza nei pazienti, con validità paragonabile a quella della misurazione del HVPG.

L'ipertensione portale conduce ad un incremento della permeabilità riducendo la velocità di flusso sanguigno a livello mucosale, causanfo

flebectasia e congestione dei capillari e vene sottomucose [255]. Nonostante un incremento del flusso splancnico totale secondario alla vasodilatazione [256] vi è un contestuale disturbo della microcircolazione della mucosa intestinale caratterizzato da incremento della espressione di alcune citochine tra cui IL-6 accompagnato da iperemia, edema, ischemia e potenzialmente anche erosioni mucose. Secondo recenti studi [257] l'utilizzo dei betabloccanti non selettivi avrebbe dei benefici non solo emodinamici nel paziente cirrotico ma anche associati ad una riduzione delle permeabilità intestinale e con essa del rischio di traslocazione batterica e delle concentrazioni circolanti di molecole proinfiammatorie come IL-6 sia nei pazienti considerati "responders" che nei "non-responders" da un punto di vista emodinamico.

In un lavoro interessante [258], è stata dimostrata una netta riduzione dei valori di HVPG e consensuale riduzione del grado di infiammazione epatica espressa dalle concentrazioni di IL-6 e IL-8 dopo somministrazione di infliximab a testimonianza del ruolo della cascata infiammatoria nello sviluppo e mantenimento dell'ipertensione portale [259]. Un recente lavoro ha dimostrato come i livelli plasmatici di IL-1Ra correlino con la funzionalità epatica e con i valori di HVPG nei pazienti con cirrosi epatica e come IL-1Ra possa anche predire le complicanze legate all'ipertensione portale e alle infezioni batteriche indipendentemente da gli altri markers di prognosi [260]. Un altro studio ha confermato tale dato limitando però la correlazione tra i valori di IL-1Ra e i valori di HVPG ad una coorte di pazienti con cirrosi epatica compensata senza varici esofagee [202].

3.4 Pathways infiammatori nel sanguinamento delle varici esofagee

Con il progredire del danno epatico e del grado di ipertensione portale, lo sviluppo di varici e il rischio di rottura diventa sempre più probabile rappresentando la prima causa di morte tra le complicanze nei pazienti cirrotici [261]. È stato dimostrato che un valore di HVPG di 12 mmHg rappresenta un cut-off sensibile di aumentato rischio di sanguinamento delle varici esofagee. Sebbene modalità come l'esofagogastroduodenoscopia e il monitoraggio del gradiente di pressione venosa epatica siano state sviluppate per studiare questa complicanza fatale in determinati scenari clinici [262, 263], queste metodiche invasive sono limitate in queste popolazioni ad alto rischio e spesso addirittura controindicate. Pertanto, trovare biomarcatori ottimali non invasivi che consentano una diagnosi precoce prima della formazione o della rottura delle varici per ridurre ulteriormente la mortalità dei pazienti cirrotici rimane una priorità. In passato diversi studi hanno dimostrato chiaramente come le concentrazioni plasmatiche di IL-6 si presentavano sovraespresse in caso di circolazione iperdinamica portando ad un incremento della permeabilità gastroduodenale e intestinale nei pazienti cirrotici [164, 264]. Tale incremento di permeabilità espone ad un rischio maggiore di infezione batterica nei pazienti con sanguinamento gastrointestinale per aumento di traslocazione batterica.

Jung-Ta Kao et al [264], hanno dimostrato in uno studio trasversale condotto su 158 pazienti con cirrosi epatica che le concentrazioni di IL-6 non solo svolgono un ruolo determinante nel promuovere la progressione di malattia e lo sviluppo e sanguinamento di varici

esofagee ma sono implicate anche nella sopravvivenza dei soggetti con cirrosi epatica. Infatti i valori di IL-6 presentavano una correlazione molto forte con la mortalità a 3 e 6 mesi. Qualche autore ha suggerito che il dosaggio della IL-6 plasmatica prima di altre procedure diagnostiche invasive come la EGDS o l'HVPG, potrebbe essere d'aiuto al clinico per prevedere e diagnosticare precocemente l'eventuale sviluppo di varici e la loro rottura. In un altro interessante studio, livelli ridotti di IL-6 sono stati associati a una più bassa incidenza di sanguinamento delle varici esofagee in pazienti cirrotici in trattamento con betabloccanti non selettivi. In un campione di pazienti con varici esofagee recentemente Huang et al [266] hanno inoltre confermato il ruolo dell'infiammazione sistemica nello sviluppo di trombosi portale, in particolare, dimostrando un'associazione indipendente tra le concentrazioni di IL-6 e la trombosi.

3.5 Pathways infiammatori nell'Encefalopatia porto-sistemica

Uno studio ha analizzato se vi fosse associazione tra valori di IL-6 sistemici ed episodi di encefalopatia epatica e gli autori hanno riscontrato delle associazioni positive tra le concentrazioni sieriche di IL-6 e i valori di ammonemia plasmatica e la severità di encefalopatia portosistemica [267]. Un recente studio [268] ha riscontrato come l'incidenza cumulativa di episodi di encefalopatia porto sistemica fosse più elevata nei pazienti con concentrazioni di IL-6 al di sopra di 9 pg/ml rispetto ai pazienti che presentavano concentrazioni inferiori, mostrando una capacità predittiva superiore al MELD score con una sensibilità e specificità rispettivamente del 89,3% e 89,5%.

3.6 Pathways infiammatori nel HCC

Shang et al [269] hanno dimostrato come l'OPN sia significativamente incrementato in casi di HCC rispetto a controlli cirrotici senza patologia oncologica. Nabih et al [270] suggeriscono inoltre che l'OPN possa essere un marker tumorale che potrebbe essere usato come test di screening per la diagnosi di HCC nei pazienti con cirrosi epatica causata da HCV. La sovraespressione dell'osteopontina è stata riscontrata in altri studi [271] in caso di HCC mentre una sua riduzione sembrerebbe essere associata con la prognosi del colangiocarcinoma intraepatico. L'OPN derivato dagli epatociti agisce infatti come soppressore del tumore a livelli fisiologici controllando la risposta acuta al DEN e la presenza di CSC, mentre l'induzione di OPN è pro-tumorigena. Ciò è dovuto principalmente a eventi intracellulari piuttosto che alla secrezione della proteina e all'attivazione del recettore [271].

Inoltre, in uno studio del 2006 [216], i livelli sierici di IL-6 nei pazienti con HCC si presentavano superiori a quelli nei pazienti con cirrosi epatica e nei controlli sani, suggerendo un aumento della produzione di questa citochina da parte delle cellule neoplastiche, invece i valori del recettore solubile di IL-6 erano simili in tutti i gruppi, aumentando solo nei pazienti con HCC in stadio III suggerendo che tale incremento fosse più da attribuire alla massa neoplastica piuttosto che alla quota di tessuto epatico residuo funzionante.

3.7 Citochine nello scompenso ascitico

Alcuni studi hanno dimostrato come IL-6 si presenti incrementata nei pazienti con ascite [215, 236] ed sia rappresentata in concentrazioni 12 volte più alte nell'ascite rispetto al siero a dimostrazione di una verosimile elevata produzione a livello della cavità addominale che insieme ad una ridotta eliminazione epatica può giustificare l'incremento in questo genere di pazienti. L'eliminazione epatica di IL-6 però non sembra essere condizionata dai valori di HVPG, non a caso la riduzione di tali valori mediante posizionamento di TIPS non influisce sulle concentrazioni di tale citochina [236, 237]. Dunque nei pazienti ascitici i livelli di IL-6 non sembrano essere associati al grado di ipertensione portale. Un recente studio [162] condotto su 63 pazienti affetti da cirrosi epatica non ha riscontrato differenze in termini di concentrazioni di IL-1Ra tra pazienti in fase di compenso a pazienti scompensati sebbene i pazienti che presentavano versamento ascitico avessero in media valori plasmatici più elevati IL-1Ra.

Capitolo 4 - Variabilità della frequenza cardiaca (HRV)

4.1 Definizione e aspetti generali

La frequenza cardiaca può essere definita come il numero di cicli sisto-diastolici, e dunque di battiti, che il cuore effettua in un minuto. Questo numero, che in condizioni normali si aggira tra i 60 e i 100 battiti/minuto, rappresenta solo un valore medio. Il tempo che intercorre tra un battito cardiaco e l'altro, è soggetto a continue variazioni. La frequenza cardiaca in un soggetto normale anche in condizioni di riposo e senza influenze provenienti dall'ambiente esterno o da processi emozionali, non è mai costante. Essa infatti presenta un certo grado di variabilità dipendente dall'interazione tra diversi meccanismi fisiologicamente attivi. Tra questi, i principali sono rappresentati dalla pressione arteriosa, sistema endocrino e ormoni circolanti, respirazione e bilancio simpato-vagale. Come già illustrato precedentemente, le due sezioni del sistema nervoso vegetativo agiscono contemporaneamente sul nodo del seno generando un certo equilibrio, in modo tale da garantire una modulazione battito-battito della frequenza cardiaca. Il sistema nervoso simpatico agendo con una stimolazione noradrenergica è responsabile di un incremento nella scarica del nodo del seno; il sistema parasimpatico invece agisce con una stimolazione colinergica determinando una riduzione della

depolarizzazione spontanea del nodo del seno, assieme ad altri effetti a livello del nodo atrioventricolare, tessuto di conduzione etc. Tutto ciò provoca variazioni dell'intervallo R-R ad ogni battito.

La Heart Rate Variability o HRV rappresenta dunque la naturale fluttuazione della frequenza cardiaca attorno ad un valore medio in risposta ad alcuni fattori che fisiologicamente possono determinare una modificazione dell'omeostasi dell'organismo come: il ritmo del respiro, gli stimoli emozionali, l'ansia, rabbia stress etc. Nei soggetti sani, soprattutto nei giovani, il cuore risponde a tutte queste condizioni con un'intensa attività modulatrice della propria frequenza di contrazione e dunque la frequenza cardiaca mostra un buon grado di variabilità che corrisponde ad altrettanto buona capacità di adattabilità psicofisica alle modificazioni interne ed esterne all'organismo[272].

L'analisi della variabilità della frequenza cardiaca viene effettuata mediante tecniche computerizzate che consentono di ottenere una elaborazione della variabilità mediante opportuni calcoli statistici. Esistono diverse metodiche che vengono usate per la valutazione della HRV e possono essere classificate in base alla durata della registrazione della frequenza cardiaca in: short-term recordings e long-term recordings [272]. Le prime sono registrazioni della frequenza in un breve periodo di tempo, generalmente 10-15 minuti di registrazione elettrocardiografica continua o mediante un sensore fotoplethysmografico applicato ad un dito della mano, il quale funziona attraverso l'emissione e la captazione di luce infrarossa assorbita dal sangue permettendo di registrare le variazioni del volume sanguigno nei vasi e di ricavarne dunque la variabilità della frequenza. Le long-term recordings invece, sono registrazioni più prolungate nel tempo.

In questo caso la tecnica più frequentemente usata è la registrazione di 24 ore dell'ECG dinamico secondo Holter. Questa tecnica non invasiva permette di effettuare un monitoraggio elettrocardiografico per 24-48 ore mediante posizionamento di 5 o 7 elettrodi a livello del torace del paziente, connessi ad un apposito lettore computerizzato in grado di digitalizzare le informazioni raccolte. L'importanza di questa metodica risiede nella possibilità di valutare la funzionalità cardiaca durante le normali attività giornaliere del paziente. I dati vengono registrati, digitalizzati e analizzati attraverso un software che permette di calcolare la distanza tra due battiti per tutta la durata della registrazione. La distanza tra un battito e un altro viene espressa in millisecondi e viene definita distanza R-R. Le metodiche di analisi della variabilità della frequenza cardiaca possono basarsi sul calcolo di un indice mediante operazioni statistiche sull'intervallo R-R, ovvero secondo l'analisi del dominio del tempo oppure mediante analisi spettrale degli intervalli R-R, mediante analisi del dominio della frequenza [273].

4.2 Analisi del dominio del tempo

L'analisi del dominio del tempo scaturisce dalla constatazione che la maggior parte dei metodi utilizzati per la misurazione dell'HRV permettono di ottenere dati espressi nell'unità di tempo (millisecondi). L'analisi del dominio del tempo fornisce un certo numero di parametri che caratterizzano la frequenza cardiaca ad ogni istante o un intervallo tra cicli cardiaci successivi. Dunque in una registrazione elettrocardiografica continua vengono individualizzati tutti i

complessi QRS e calcolati gli intervalli R-R sinusali che rappresentano la misurazione della frequenza cardiaca per tutto il periodo della misurazione. Nell'analisi del dominio del tempo possono essere distinti due tipi di indici della HRV, gli indici beat-to-beat ovvero espressione della variabilità a breve termine e delle rapide fluttuazioni del ritorno cardiaco (come nel caso di aritmia respiratoria sinusale); e gli indici di variabilità a lungo termine che esprimono variazioni minori di 6 per minuto, quindi più lente e influenzate dalla termoregolazione e dall'attivazione barocettoriale [274]. Entrambi i tipi di indici vengono calcolati sulla base degli intervalli R-R presenti all'interno di una ristretta finestra temporale di registrazione (generalmente 0,5-5 minuti). Gli indici più frequentemente utilizzati sono la deviazione standard degli intervalli R-R beat to beat per quanto riguarda la variabilità a breve termine, e la deviazione standard di tutti gli intervalli R-R o la differenza tra R-R massimo e R-R minimo per quanto riguarda la variabilità a lungo termine. Soprattutto in ambito cardiologico vengono usate registrazioni ECG di 24 ore per calcolare la variabilità del ritmo cardiaco in un periodo di tempo sicuramente più lungo. Con queste metodiche possono essere calcolati la deviazione standard di tutti gli intervalli R-R della registrazione oppure la media delle deviazioni standard di intervalli R-R in periodi successivi a 5 minuti. Questo tipo di monitoraggio ed elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza di ritmi molto lenti. In una registrazione ECG continua ogni complesso QRS viene identificato e vengono calcolati i cosiddetti intervalli Normale-Normale (NN) che rappresentano tutti gli intervalli tra complessi QRS adiacenti che risultano dalla depolarizzazione del nodo del seno. Le variabili più semplici [272] del dominio del tempo che possono essere

calcolate includono l'intervallo NN medio, la frequenza cardiaca media, la differenza tra intervallo NN più lungo e quello più corto, la differenza tra frequenza notturna e frequenza diurna ecc. Altre misure che possono essere calcolate sono le variazioni della frequenza cardiaca istantanea secondaria alla respirazione, test tilt, manovra di Valsalva, o secondarie all'infusione di fenilefrina. A partire da questi parametri più semplici è possibile calcolare misure statistiche del dominio del tempo più complesse (vedi tabelle A). Queste possono essere divise in due classi. Alla prima classe appartengono quelle derivate dalle misure dirette degli intervalli NN o della frequenza cardiaca istantanea; alla seconda quelle che derivano dalle differenze tra intervalli NN. Queste variabili possono essere derivate dall'analisi della registrazione elettrocardiografica totale o può essere calcolato usando segmenti più piccoli del periodo di registrazione. Il secondo metodo permette la comparazione dell'HRV valutato durante varie attività per esempio riposo, sonno ecc. La più semplice variabile da calcolare è la deviazione standard dell'intervallo NN (SDNN) e la radice quadrata della varianza. Poiché la varianza è matematicamente uguale al potere totale dell'analisi spettrale, la SDNN riflette tutte le componenti cicliche responsabili della variabilità nel periodo di registrazione. In molti studi l'SDNN è calcolato per un periodo di 24h e questo comprende sia le variazioni ad alta frequenza e a breve termine che le componenti a più bassa frequenza viste in un periodo di 24h. Se il periodo di monitoraggio diminuisce, la SDNN stima una durata del ciclo sempre più corta. È stato notato inoltre che la varianza totale dell'HRV aumenta con la lunghezza della registrazione analizzata. Perciò negli ECG selezionati arbitrariamente l'SDNN non rappresenta una quantità statistica ben definita a causa della sua

dipendenza dalla lunghezza del periodo di registrazione. In pratica è inappropriato comparare le misure SDNN ottenute da registrazioni di durate differenti. Le durate delle registrazioni usate per determinare i valori di SDNN (ed altre misure dell'HRV simili) dovrebbero essere standardizzate. Le più appropriate sono le registrazioni a breve termine di 5 minuti e quelle a lungo termine di 24h. Altre variabili statistiche usate calcolate a partire da segmenti del monitoraggio totale includono la SDANN, la deviazione standard dell'intervallo medio NN calcolato in periodi brevi generalmente 5 minuti, che rappresenta una stima del cambiamento della frequenza cardiaca dovuti a cicli più lunghi di 5 minuti, e l'indice SDNN, la media della deviazione standard di 5 minuti dell'intervallo NN calcolato nelle 24h, che misura la variabilità presente nei cicli più corti di 5 minuti. Le misure più comunemente usate derivate dalle differenze dell'intervallo includono la RMSSD, la radice quadrata della media dei quadrati delle differenze degli intervalli NN successivi più grandi di 50 ms, e pNN50 il rapporto derivato dalla divisione di NN50 con il totale degli intervalli NN. Tutte queste misurazioni della variazione a breve termine stimolano le variazioni ad alta frequenza nella frequenza cardiaca e quindi altamente correlate.

4.3 Analisi del dominio della frequenza

L'analisi del dominio della frequenza si basa sul principio per cui ogni segnale periodico come la pressione arteriosa o la frequenza cardiaca può essere scomposto o campionato in una serie di componenti oscillatorie caratterizzate da diverse frequenze ed ampiezze [275]. Il principale vantaggio di questa metodica risiede nella possibilità di studiare le singole componenti oscillatorie ottenendo così informazioni non solo sulla quantità di variazioni, ma anche sulla frequenza di oscillazione. Il software è in grado di elaborare un diagramma che esprime la distanza R-R tra un battito e un altro in funzione del numero totale di battiti. Questo diagramma prende il nome di tacogramma. Esso costituisce la rappresentazione di una serie discreta di valori della durata degli intervalli R-R in funzione del numero dei valori rilevati. Il tacogramma normalmente viene calcolato nell'arco di 4-5 minuti conteggiando circa 300 battiti. La difficoltà principale nell'ottenere questi dati risiede nell'estrazione del segnale di variabilità cardiaca a partire dal segnale ECG. Il software, infatti, deve essere in grado di tradurre una funzione continua nel tempo, come il tracciato ECG, in una funzione discreta nel tempo che possa rappresentare dunque la frequenza cardiaca istantanea. Vengono innanzitutto identificati i complessi QRS in modo tale da poter poi identificare l'intervallo R-R attraverso diversi approcci. Il metodo [276, 277] più semplice e classicamente utilizzato è forse quello che, a partire dalla derivazione del segnale, utilizza una soglia adattativa che permette di ottenere un fiducial point per filtrare tutti i complessi QRS all'interno di vari campioni consecutivi e distinguerli così dagli

artefatti e picchi anomali. Fondamentale sarà inoltre il calcolo della funzione intervallo capace di distribuire gli intervalli R-R in funzione del tempo. Attraverso diverse interpolazioni, ovvero ricerche fra campioni consecutivi, il software è in grado di individuare un segnale continuo nel tempo e considerato come campionamento irregolare. A questo punto il segnale potrà essere campionato ad intervalli regolari per permettere l'elaborazioni digitale. Il campionamento può essere effettuato con frequenze differenti. L'Hearth American Association raccomanda una frequenza di campionamento di 500 Hz e almeno 12 bits [278]. Frequenze di campionamento più basse infatti permetterebbero di aumentare la velocità di calcolo ma aumenterebbe proporzionalmente il grado di errore che viene commesso con qualunque metodica di calcolo nel valutare l'intervallo R-R su un segnale di ECG campionato. Il software successivamente esegue analisi complesse che si basano su operazioni chiamate «Resamplin del tacogramma», la trasformata di Fourier e il calcolo dello spettro di Potenza del tacogramma. Il calcolo della trasformata di Fourier richiede il campionamento regolare della frequenza che come già accennato non corrisponde al ritmo sinusale, ma richiede l'interpolazione lineare del ritmo cardiaco con le modalità precedentemente descritte. Lo spettro di Potenza permette di rappresentare le componenti della frequenza campionata del tacogramma ed esprimere, in millisecondi al quadrato, la potenza delle frequenze comprese tra 0,01 e 0,4 Hz.

4.4 Componenti oscillatorie

In un soggetto sano è possibile identificare 3-4 componenti oscillatorie:

- Una componente ad alta frequenza (HF, high frequency) compresa tra 0,15 e 0,40 Hz, sincrona con la frequenza respiratoria e determinata dalla modulazione vagale sul nodo del seno. Durante la fase inspiratoria del processo della respirazione si determina un aumento della pressione intratoracica che provoca una diminuzione del volume pulsatorio. Questo a sua volta si traduce in una diminuzione della gittata cardiaca e in una variazione della pressione arteriosa che viene percepita a livello barocettoriale, innescando così un segnale di inibizione vagale. La conseguenza di questo meccanismo sarà un aumento della frequenza cardiaca e della gittata, generando quindi una cosiddetta "aritmia sinusale respiratoria", cioè una condizione in cui la frequenza cardiaca si adatta alla frequenza respiratoria attraverso opportune fluttuazioni. L'aritmia sinusale respiratoria è dunque mediata dall'attività vagale e non a caso può essere abolita dalla somministrazione di atropina.
- Una componente a bassa frequenza (LF, low frequency) tra 0,04 e 0,15 Hz corrispondente all'oscillazione ritmica della pressione arteriosa. Essa viene considerata secondaria all'attività modulatrice del sistema nervoso simpatico e mediata da riflessi barocettoriali. Infatti, in caso di abbassamento della pressione arteriosa, i barocettori inviano degli impulsi ai centri cerebrali che a loro volta determineranno inibizione parasimpatica e incremento dell'attività simpatica a cui conseguirà aumento della frequenza cardiaca e della gittata. Queste fluttuazioni della frequenza che originano dal così detto loop dei riflessi barocettivi vengono anche chiamate «ritmo dei 10

secondi» e si accompagnano a delle oscillazioni pressorie che intervengono sincronicamente, denominate «onde di Mayer».

- Una componente a bassissima frequenza (VLF, veri low frequency) compresa tra 0,01 e 0,04 Hz che generalmente non è rappresentata da un picco spettrale discreto ma piuttosto da una progressiva riduzione della potenza man mano che il range di frequenza si avvicina a quello della LF. La banda VLF è dovuta in parte all'attività del Sistema Nervoso Simpatico che interviene nei processi di termoregolazione, ed in ambito psicologico sembra essere influenzata dalle preoccupazioni e dai pensieri ossessivi. Le variazioni della temperatura dovute ai processi ortosimpatici di termoregolazione provocano delle oscillazioni nelle resistenze arteriose periferiche che determinano modificazioni dei valori tensivi innescando il meccanismo riflesso mediato dai barocettori di cui sopra. Come già noto anche il sistema renina-angiotensina-aldosterone agisce sulle resistenze periferiche vascolari ma con una latenza di alcuni minuti. Quindi più lunga dei meccanismi di controllo simpato-vagali. Per questo motivo produrrà oscillazioni molto lente della pressione arteriosa.

- Nelle lunghe registrazioni è possibile inoltre riconoscere una quarta componente di frequenza minore di 0,003 Hz. Il significato di tale banda non è al momento del tutto chiaro. Alcune fra le ipotesi più accreditate riconoscono tra i fattori responsabili di tali oscillazioni le variazioni circadiane sonno/veglia della modulazione autonoma e umorale o le variazioni in rapporto all'attività fisica e al riposo. Le componenti HF e LH che danno indicazione rispettivamente dell'attività simpatica e parasimpatica possono essere espresse sia in valore assoluto sia in modo tale da ridurre al minimo il rumore di

fondo della componente VLF e per valutare in maniera più precisa il peso relativo delle due branche del SNA sulla variabilità. Un possibile metodo può essere quello di utilizzare le unità normalizzate. Esprimendo sotto questa forma le sole componenti HF e LF può essere analizzato il comportamento delle due sezioni del sistema neurovegetativo sul cuore. Tuttavia, dato che le interazioni fra i due sistemi sono molteplici e numerose sono le variabili esterne che possono contribuire alle modificazioni dell'HRV, sarebbe fin troppo semplicistico considerare una componente come espressione esclusiva di una sola branca. Per tale ragione si preferisce valutare il rapporto LF/HF come espressione dell'equilibrio simpato-vagale.

4.5 Significato prognostico dell'HRV

Lo studio dell'HRV sia nel dominio del tempo che in quello della frequenza è stato ed è ancora oggi oggetto di numerosi studi che coinvolgono cardiopatia ischemica e aritmica e altre patologie non cardiache. Attualmente però soltanto in due condizioni cliniche ben precise la valutazione dell'HRV è ritenuta una sicura e accettata metodica con capacità di predire il rischio di mortalità: nel post-IMA e come precoce indicatore di neuropatia diabetica. Diversi studi [279-281] hanno dimostrato che una riduzione della variabilità totale nel post-infarto è associata ad un aumento del rischio di mortalità cardiaca rispetto a coloro che non presentano alterazioni della variabilità fisiologica degne di nota. Su tali studi si basa anche il razionale dell'utilizzo in questi pazienti dei betabloccanti e della loro efficacia nel ridurre la mortalità post-infarto. Questi farmaci infatti garantiscono un buon controllo del tono simpatico riportando il

rapporto LF/HF nei limiti fisiologici. Il valore predittivo dell'HRV è indipendente da altri fattori già riconosciuti come la frazione di eiezione del ventricolo sinistro, l'incremento dell'attività ectopica ventricolare e la presenza di potenziali tardivi. Nel predire il rischio di mortalità per qualunque causa, l'HRV è simile alla frazione di eiezione ma è superiore nel predire eventi aritmici. L'HRV inoltre diminuisce precocemente dopo IMA e comincia a risalire dopo qualche settimana. Risulta quasi del tutto recuperata dopo 6-12 mesi. Ciononostante la valutazione dell'HRV mantiene un buon valore prognostico negli stadi precoci (2-3 giorni dopo l'IMA) che a 1-3 settimane dall'IMA nella valutazione prima della dimissione del paziente.

Nei pazienti diabetici [279, 280] invece caratteristicamente lo spettro di potenza mostra una potenza totale significativamente più bassa senza variazione del rapporto LF/HF, permettendo quindi di accertare l'insorgenza di neuropatie diabetiche sia attraverso variazioni della potenza totale degli spostamenti nella distribuzione della frequenza. Infatti la neuropatia diabetica è caratterizzata da una precoce e diffusa degenerazione neuronale delle piccole fibre nervose appartenenti al sistema simpatico e parasimpatico. Le manifestazioni cliniche sono ubiquitarie ed includono ipotensione posturale, tachicardia persistente, alterazioni gustative, gastroparesi, atonia vescicale e diarrea notturna. Non appena compare la sintomatologia clinica della neuropatia, la mortalità stimata a 5 anni è maggiore del 50%. La rilevazione subclinica della neuropatia diabetica è un importante indice per la stratificazione del rischio e per il management del paziente.

Capitolo 5- Il Sistema Nervoso Autonomo e il bilancio simpato-vagale nel Paziente Cirrotico

5.1 Fisiologia del SNA

Il SNA esercita i suoi effetti principali sul controllo della muscolatura liscia, di quella cardiaca e delle funzioni dei tessuti ghiandolari attraverso degli archi riflessi viscerali. Esso è coadiuvato nella maggior parte dei casi dal sistema endocrino, agendo così sulla modulazione della frequenza cardiaca, pressione arteriosa, attività gastroenterica, secrezione ghiandolare etc. Al contrario del sistema endocrino, il SNA è in grado di esercitare una risposta modulatrice estremamente rapida volta al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo in risposta agli stimoli esterni e capace di garantire un continuo adattamento dell'organismo stesso alle modificazioni dell'ambiente esterno tramite un rapido ripristino delle condizioni di stabilità [159, 160].

Claude Bernard nel suo libro "Costanza dell'ambiente interno", fu il primo a proporre la teoria del mantenimento di una stabilità dell'ambiente interno (*milieu intérieur*) in risposta alle variazioni delle condizioni esterne. Questa teoria fu poi ripresa e sviluppata dal fisiologo americano Walter B. Cannon nel suo libro "The Wisdom Of The Body" in cui viene proposto per la prima volta il concetto di "omeostasi" per definire l'insieme dei meccanismi fisiologicamente attivi in un organismo in grado di assicurare il mantenimento della stabilità dell'ambiente interno. Secondo la teoria di Cannon, sulla quale si basano molte delle nostre attuali conoscenze, il mantenimento dell'omeostasi in un organismo è garantito da meccanismi di regolazione a feedback positivi e negativi capaci di attivare risposte effettrici estremamente rapide e soggette a modulazione tonica e continua nel tempo. Non si tratta dunque di un'attività di controllo unitaria e scandita in un preciso arco temporale ma di un equilibrio dinamico raggiungibile solo mediante una continua interazione tra afferenze provenienti dal distretto viscerale, informazioni derivanti

dall'ambiente esterno e risposte effettrici garantite dalle due principali sezioni del SNA: il sistema simpatico e il sistema parasimpatico [272].

Secondo Cannon inoltre il primo sarebbe particolarmente attivo e utile in condizioni di emergenza, quando l'individuo è costretto a fronteggiare situazioni di pericolo, lotta o fuga (fight or flight). Esso agisce mediante l'aumento di segnali inviati al cuore, alla muscolatura liscia dei vasi, alle ghiandole sudoripare e alla midollare del surrene determinando così un incremento della risposta contrattile cardiaca, un aumento del tono della parete arteriosa, mobilitazione di flussi sanguigni verso gli organi nobili e incremento di metaboliti energetici circolanti (iperglicemia), nonché la stimolazione delle cellule cromaffini al rilascio di noradrenalina e adrenalina. L'importanza del sistema simpatico nell'affrontare determinate condizioni di stress adattativi è testimoniata anche da numerosi esperimenti che sono stati condotti su animali simpatectomizzati. Tali animali non risultavano più in grado di difendersi, di compiere attività faticose, né in condizioni di mobilitare i depositi epatici di glucosio o di reagire al freddo con una opportuna vasocostrizione [282-284].

Sempre secondo Cannon, il sistema nervoso parasimpatico sarebbe maggiormente attivo durante le fasi di riposo e assimilazione (rest and digest) favorendo dunque i processi anabolici digestivi e garantendo in condizioni basali normali il mantenimento della frequenza cardiaca, della pressione arteriosa e dell'attività respiratoria e metabolica [284, 285].

5.2 Bilancio simpato-vagale

Oggi sappiamo che i rapporti tra le vie ortosimpatiche e parasimpatiche non sono così semplici e indipendenti gli uni dagli altri come li aveva descritti Cannon. Non si tratta, infatti, di un'alternanza nell'attivazione di un sistema o dell'altro, ma entrambe le sezioni sono costitutivamente attive a diversi livelli e agiscono di concerto grazie alle influenze, per lo più antagoniste e opposte, che esercitano nei confronti di diversi organi e apparati. Inoltre, operando in accordo con il sistema motore somatico, permettono la regolazione dei comportamenti nonché il mantenimento di un ambiente interno stabile sia in condizioni normali che di emergenza. Per tale ragione oggi si tende sempre più a parlare di "Bilancio simpato-vagale" per riferirsi all'equilibrio dinamico ottenuto mediante l'attività tonica del sistema simpatico e del vago (principale nervo del sistema parasimpatico) sui vari apparati ma soprattutto a livello cardiocircolatorio [284, 285].

5.3 HRV e cirrosi

La funzionalità e le caratteristiche del SNA possono essere valutate attraverso test fisiologici e farmacologici. I primi sono utili principalmente per individuare le lesioni autonome, mentre i secondi sono utilizzati per meglio chiarire le alterazioni fisiopatologiche e sviluppare nuove terapie [286]. Generalmente, per esaminare il funzionamento del SNA e riconoscere eventuali anomalie si utilizzano una batteria di test cardiovascolari [287]. Alcuni sono più specifici per uno dei due bracci del SNA (simpatico e parasimpatico,

altri invece forniscono informazioni utili per entrambi [288]. Tra i principali test che sono in grado di valutare la funzionalità del SNA nella sua estrinsecazione parasimpatica troviamo: la risposta della frequenza cardiaca alla manovra di Valsalva, la variazione della frequenza cardiaca durante respirazione profonda, risposta della frequenza cardiaca al clinostatismo. I test più utilizzati per valutare l'attività del sistema nervoso simpatico invece sono: la risposta pressoria al clinostatismo e risposta pressoria all'impugnatura sostenuta con mano. Una delle metodiche che negli ultimi anni è stata utilizzata per trarre informazioni circa l'attività del sistema nervoso simpatico e parasimpatico è lo studio della variabilità della frequenza cardiaca. Attraverso uno strumento a basso costo e non invasivo come il monitoraggio Holter, è possibile, tramite analisi del dominio del tempo e della frequenza, valutare l'attività del SNA in termini di bilancio simpato-vagale. Come è già stato fatto per altre condizioni patologiche come cardiopatia ischemica [279, 289], diabete mellito [290] e ipertensione arteriosa [291], anche nel caso della cirrosi epatica diversi studi hanno utilizzato i parametri HRV per meglio indagare l'attività del SNA nei pazienti affetti da tale patologia. In uno studio del 2006 [292] condotto su soli 14 pazienti cirrotici ad eziologia varia, matchati con un gruppo controllo, veniva evidenziato un HRV ridotto e alterazione dell'autoregolazione cerebrale nei soggetti malati rispetto ai controlli sani con una riduzione dei parametri HRV (sia del parasimpatico che del simpatico) proporzionale alla severità di malattia espressa tramite Child-Pugh. L'esiguo campione e la grande eterogeneità di eziologia della cirrosi però non permette probabilmente di dare grande potere statistico ai risultati. Un altro studio con campione più numeroso [287] ha valutato la variabilità dei

RR nei pazienti affetti da cirrosi epatica non notando alcuna differenza tra eziologia alcolica e non alcolica ma confermando la stratificazione della disautonomia sulla scorta della classe di Child Pugh. Gli autori però non sembrano aver esplicitato l'età media dei soli pazienti con Child-Pugh classe C (più numerosi della classe B) e inoltre non hanno chiarito se i dati della variabilità della frequenza cardiaca siano stati corretti per l'età. Kim et al [293] hanno valutato l'azione del propranololo su QTc e HRV in 50 pazienti cirrotici in trattamento, matchati con altrettanti individui malati non in trattamento con BBNS. I pazienti in trattamento con propranololo hanno presentato un QTc ridotto e un RMSSD più elevato a dimostrazione di una probabile superiore regolazione parasimpatica che potrebbe associarsi con una minore insorgenza di aritmie e mortalità in pazienti in attesa di trapianto. Lo studio però presentando pazienti con MELD score tendenzialmente basso e avendo un disegno retrospettivo non consente di speculare ulteriormente sulla prognosi di questi pazienti. In un interessante studio del 2015 [294] condotto su 28 pazienti (21 cirrotici e 7 controlli sani), è stata dimostrata una disfunzione autonoma su 21 pazienti mediante alcuni dei test di funzionalità cardiovascolare (riduzione della pressione arteriosa in risposta all'ortostatismo, risposta della frequenza cardiaca alla manovra di Valsalva e al clinostatismo) e monitoraggio Holter per 500 RR consecutivi. Se solo uno dei precedenti test risultava positivo si parlava di probabile disfunzione, nel caso di due test positivi invece si identificava una disfunzione definitiva. Non è stata trovata alcuna differenza significativa tra pazienti con Child A e controlli sani, invece i pazienti con Child C e malattia sostenuta risultavano essere quelli con PNN50 più basso probabilmente per una precoce alterazione del

sistema parasimpatico già dall'esordio di malattia. SDNN non sembrava ridursi proporzionalmente alla severità di patologia, secondo gli autori perché non risulta attendibile nelle lunghe registrazioni. Sebbene interessante questo lavoro presenta alcune limitazioni: l'esiguo campione di pazienti e l'eterogeneità del reclutamento con pochi criteri di esclusione (6 pazienti ad eziopatologia alcolica, 23% diabetici e alcuni in trattamento con betabloccanti anche se sospesi 48 ore prima dell'esecuzione dei test). In accordo con la maggior parte dei precedenti risultati, Fleisher et al. hanno dimostrato in una coorte di 30 pazienti affetti da cirrosi epatica e stratificati sulla base della classe di Child-Pugh, una relazione statisticamente significativa tra riduzione del HRV e severità di malattia di fegato [295]. Inoltre, dopo un follow-up di 2 anni, i valori di HRV nel dominio del tempo (sia quelli che meglio rappresentano l'attività del sistema nervoso simpatico che quelli del parasimpatico) erano significativamente maggiori nei soggetti sopravvissuti rispetto agli altri. In un ulteriore studio [296] in accordo con i risultati del precedente, la disfunzione autonoma valutata attraverso test cardiovascolari e HRV sembra essere un fattore predittivo indipendente per mortalità a breve termine (10 mesi) di pazienti con cirrosi epatica avanzata. A differenza dello studio precedente però, in questo studio di Fleckenstein et al [296] sono esplicitate le principali cause di morte (sepsi, sanguinamento gastrointestinale ed insufficienza epatica) ma non è chiaro quanti pazienti fossero in trattamento con betabloccanti e quanti meno.

5.4 La "Disfunzione Autonoma" del paziente cirrotico

Il ruolo del SNS nello sviluppo dell'ipertensione portale è stato più volte chiarito. Una significativa produzione di noradrenalina è stata dimostrata nel sistema vascolare epatosplancnico nei pazienti con cirrosi [297]. Rimane ancora, in parte, oggetto di dibattito la presenza di un funzionamento non fisiologico del sistema nervoso simpatico e se il suo ruolo nella circolazione iperdinamica ed ipertensione portale sia effettivamente condizionato da un certo grado di disfunzionamento e/o da un eventuale danno neuronatomico. Mentre alcuni autori riportano un'incidenza di "neuropatia epatica" compresa tra il 19 e il 100% [298-302] altri dubitano circa l'esistenza di questa entità nosologica [303]. La maggioranza comunque concorda nel dire che qualora presente la neuropatia osservata nei pazienti cirrotici è generalmente minima o subclinica ma nessuno studio è in grado di stabilire con certezza la natura della presunta neuropatia [298, 299, 301, 303]. Questa discrepanza di risultati tra i vari studi è principalmente dovuta alle diverse metodologie di usate per individuare e quantificare la presenza e la severità della neuropatia e la variabilità di criteri usati per definire la presenza di neuropatia [304-308]. Altri fattori in causa possono essere le differenze nella severità di malattia di fegato dei pazienti arruolati e l'utilizzo di campioni non numerosi e spesso eterogenei [309-312]. L'effetto dell'introito cronico di alcool sul SNA è ben noto [313-315] e i soggetti che fanno abuso di alcool sembrano particolarmente inclini ad una disfunzione autonoma quando è presente una malattia cronica di fegato [316]. Un certo grado di neuropatia autonoma è stato però descritto in gruppi eterogenei di paziente con cirrosi alcolica e non alcolica [317, 318]. Diversi studi inoltre hanno evidenziato un incremento della mortalità nei pazienti cirrotici che sembrerebbe

correlare con la presenza di disfunzione autonoma diagnosticata mediante una batteria di test cardiovascolari [292, 296, 319] ma nessuno sembra chiarire in maniera conclusiva, sfruttando un campione sufficientemente ampio, se la presenza di tale alterazione autonoma rappresenti un fattore di rischio indipendente per mortalità [320] o se sia semplicemente legato alla maggiore severità di malattia epatica che si accompagna ad un grado maggiore di ipertensione portale e dunque ad tono simpatico alterato.

5.5 QTc e neuropatia autonoma nel paziente cirrotico

L'allungamento del QTc, sia nelle sue forme congenite che acquisite, è stato correlato a numerosi fattori come le alterazioni elettrolitiche (ipokaliemia, ipomagnesiemia e ipocalcemia), alterazioni del sistema nervoso autonomo con prevalenza del tono simpatico ed ischemia miocardica [320-322]. Numerose evidenze suggeriscono una relazione diretta tra le sindromi da QT lungo e il sistema nervoso simpatico [323]. Non a caso molte aritmie riconoscono come trigger gli eventi che determinano incremento dell'attività simpatica; l'allungamento del QTc può essere riprodotto dalle alterazioni asimmetriche nel tono simpatico come la stimolazione del ganglio stellato sinistro; i farmaci betabloccanti o l'ablazione del ganglio stellato sinistro sono efficaci nel trattamento della sindrome da QT lungo congenito. Come già, ricordato l'iperattività adrenergica è una condizione riconosciuta nel paziente cirrotico [324-326] e confermata anche in studi che hanno riscontrato livelli plasmatici elevati di norepinefrina plasmatica [327]. Inoltre, l'impatto di questo tono iperadrenergico sulla funzione cardiaca può essere incrementato da un tono vagale depresso prevalente nei soggetti cirrotici [328]

generando quindi uno squilibrio del bilancio simpato-vagale che rappresenta il background riconosciuto per il prolungamento del QT nelle sindromi congenite [329]. In tal senso, vale la pena sottolineare che una correlazione tra il prolungamento del QT e la presenza di “disfunzione” del tono parasimpatico è stata in passato riconosciuta [319]. In un elegante studio prospettico di Bernardi et al [327] il prolungamento dell’intervallo QT correlato ad incremento dei valori plasmatici di noradrenalina in un gruppo di pazienti cirrotici con varie eziologie, è stato associato ad un riscontro di ridotta sopravvivenza; dimostrando inoltre che l’allungamento del QT non si limita alla cirrosi epatica secondaria ad abuso alcolico, ma la tossicità dell’alcool rappresenta semplicemente un altro fattore che può concorrere a determinare tale condizione. Diversi studi in tal senso hanno dimostrato all’interno di gruppi di pazienti eterogenei per eziologia di cirrosi, un’alterazione del bilancio simpato-vagale peggiore nei pazienti con eziologia alcool correlata [318, 329-332]. Secondo alcuni autori inoltre, il prolungamento dell’intervallo QT può rappresentare un segno utile per identificare i pazienti con cirrosi epatica ad alto rischio di cardiomiopatia [333]. Il prolungamento di altri parametri secondari quali il QT max, il QT min, QTdisp e TpTe sono stati altresì valutati in uno studio originale che ha mostrato un loro potenziale valore predittivo diagnostico [334]. Anche se il QT non può essere utilizzato da solo per la diagnosi di severità di neuropatia autonoma, può comunque rappresentare un test semplice addizionale per identificare gli individui con un rischio cardiovascolare aumentato [335].

Capitolo 6- L'Osteopontina, IL-22, IL-6, IL-17, IL1Ra: biomarkers di severità d'ipertensione portale, rischio di sanguinamento di varici e alterazione autonoma nel paziente cirrotico.

6.1 Introduzione

La cirrosi epatica è una patologia con grande impatto su scala mondiale sia per mortalità che per spesa sanitaria, rappresentando l'ottava causa di morte negli Stati Uniti. L'ipertensione portale è la principale complicanza della cirrosi epatica e rappresenta il primum movens per lo sviluppo di altre complicanze quali le varici gastriche

ed esofagee, il sanguinamento di quest'ultime, la gastropatia da ipertensione portale, la peritonite batterica spontanea (PBS), la formazione di ascite, la sindrome epatorenale, l'ipersplenismo con le alterazioni ematologiche che ne derivano e l'encefalopatia portosistemica (EPS).

Lo sviluppo di varici esofagee e il loro sanguinamento rappresentano la causa principale di mortalità e morbilità dei pazienti con cirrosi epatica. L'ipertensione portale e la circolazione iperdinamica determinano una riduzione della pressione arteriosa media che conduce all'attivazione di meccanismi neuroormonali determinanti ritenzione idrosalina nel tentativo di ristabilire la normale perfusione incrementando il volume circolante effettivo. I principali sistemi implicati sono il sistema renina angiotensina, il sistema nervoso simpatico e la vasopressina/ADH. L'attivazione di questi tre sistemi neuroormonali è direttamente proporzionale al grado di vasodilatazione splacnica e quindi all'insufficienza emodinamica e alla severità della cirrosi epatica. Nonostante i costi e l'invasività, la misurazione dell'HVPG rappresenta uno strumento utile e preciso per la diagnosi e il follow-up dell'ipertensione portale. Il ruolo del SNS nello sviluppo dell'ipertensione portale è stato più volte chiarito. Rimane ancora, in parte, oggetto di dibattito la presenza di un funzionamento non fisiologico del sistema nervoso simpatico e se il suo ruolo nella circolazione iperdinamica ed ipertensione portale sia effettivamente condizionato da un certo grado di disfunzionamento e/o da un eventuale danno istologico. L'HRV rappresenta un metodo a basso costo e non invasivo per valutare il bilancio simpato-vagale. La fibrosi epatica, che caratterizza da un punto di vista istologico la cirrosi, è il risultato di un'esaltata risposta rigenerativa associata al

danno epatico cronico. Numerosi componenti del sistema immune (neutrofili, monociti/macrofagi e linfociti) sono coinvolti nella genesi della fibrosi epatica attraverso il controllo dei miofibroblasti [161]. Negli ultimi anni diversi studi hanno valutato l'espressione di alcune proteine infiammatorie nel paziente cirrotico, nel tentativo di utilizzarle quali markers di danno epatico, severità di ipertensione portale e predire l'insorgenza di altre complicanze.

Il razionale nella ricerca di biomarkers infiammatori quale misura indiretta l'HVPG si basa sul fatto che l'ipertensione portale è intimamente legata al danno epatico e alla fibrosi e questi, a loro volta, sono connessi all'attivazione di specifici pathways infiammatori. [202]

6.2 Scopo dello studio

Gli obiettivi che lo studio si prefigge sono:

- 1) valutare la possibile associazione tra la severità dell'ipertensione portale, espressa tramite dimensione delle varici esofagee e l'espressione di osteopontina, IL-22, IL-6, IL-1Ra, IL-17.
- 2) valutare la possibile associazione tra la severità della cirrosi epatica, espressa tramite classe di CHILD PUGH e MELD score e le concentrazioni di osteopontina, IL-22, IL-6, IL-1Ra, IL-17
- 3) Valutare eventuali associazioni tra le concentrazioni delle citochine prese in esame (IL-22; IL-17; IL-6; OPN; IL-1 Ra) e tutte le variabili anamnestiche (età, sesso, durata malattia, eziologia, terapia

antivirale, eradicazione), cliniche (classe child Pugh, MELD score, presenza di ascite, quantità ascite, pregressa PBS, encefalopatia, SER, trombosi portale, HCC, diabete, ipertensione), variabili endoscopiche (presenza di varici, dimensioni varici, dimensioni %, occupazione lume, pregresso sanguinamento, RED weal MARK, grado gastropatia portale, pregressa legatura), variabili ecografiche (splenomegalia, diametro milza, diametro vena porta), farmacologiche (furosemide, canreonato, calcio antagonisti, sartani, ACE I, profilassi beta bloccante, altri antipertensivi, PPI), variabili laboratoristiche (emoglobina, GB, piastrine, sodio, albumina, INR, bilirubina tot, AST, ALT, APRI, filtrato renale, creatinina)

- 4) Valutare eventuali associazioni tra le concentrazioni delle citochine prese in esame (IL-22; IL-17; IL-6; OPN; IL-1 Ra) e le variabili HRV (FC 24h; FC giorno, FC notte; PNN50 24h; RMSSD 24h; ASDNN/5 min; SDANN 5min; SD 24 h) nel tentativo di approfondire il legame tra bilancio simpato-vagale e infiammazione nel paziente cirrotico.

- 5) Indagare circa il potenziale ruolo delle concentrazioni di una o più citochine nel predire l'assenza di varici esofagee nonché il recente sanguinamento delle stesse.

- 6) individuare nel contesto dei biomarkers recentemente associati alla severità ipertensione portale, l'espressione di alcuni marcatori che possano fungere da stima indiretta del grado di ipertensione portale

6.3 Materiali e metodi

Dal marzo 2018 al febbraio 2020 è stato condotto il reclutamento dei pazienti presso le UU.OO. di Medicina Interna con Stroke Care e Gastroenterologia ed Epatologia dell'AOUP P. Giaccone.

Sono stati presi in considerazione tutti i soggetti con diagnosi di cirrosi epatica e candidati alla esecuzione di esofagogastroduodenoscopia (EGDS) per la diagnosi e il follow-up di ipertensione portale. All'ingresso in reparto per ogni paziente sono stati effettuati raccolta anamnestica, esame obiettivo completo, esami di laboratorio (emocromo, INR, elettroliti, funzionalità epatica, funzionalità renale, profilo lipidico, profilo glucidico, esame delle urine, elettroforesi sieroproteica, VES, PCR) e i seguenti esami strumentali: ecografia dell'addome, EGDS, ECG-Holter. Sono stati esclusi i pazienti affetti da cirrosi epatica alcool correlata. Qualora non fosse già chiarito dalla storia clinica e dai suddetti esami, la diagnosi eziologica di cirrosi epatica è stata approfondita mediante esami di secondo livello quali la biopsia e l'elastografia epatica. Sono stati dunque reclutati 150 pazienti totali.

Sono stati altresì esclusi dallo studio i pazienti che hanno presentato al monitoraggio ECG Holter:

- aritmie sopraventricolari sostenute (n=22)
- durata del monitoraggio inferiore alle 22 ore (n=15)
- numero di artefatti e battiti ectopici maggiore del 20% rispetto al totale dei battiti (n=12)

e i pazienti in cui la biopsia o gli altri esami diagnostici hanno sconfessato la diagnosi di cirrosi epatica (n=5).

In tutti i pazienti è stato inoltre effettuato prelievo per dosaggio delle concentrazioni sieriche di osteopontina, IL-22, IL-6, IL-1Ra, IL-17. I

campioni di sangue ottenuti al mattino dopo almeno dieci ore di digiuno, sono stati sottoposti a centrifugazione e i sieri ottenuti sono stati conservati mediante crioconservazione a -80°.

È stato altresì costituito un gruppo di controllo di n 50 soggetti sani reclutati tra i donatori di sangue presso la U.O. di Medicina Trasfusionale dell'AOUP P. Giccone di Palermo abbinati in base al sesso e all'età media.

Ad agosto 2021 è stato effettuato il dosaggio delle concentrazioni citochiniche mediante tecnica ELISA presso il laboratorio di "Biochimica clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'AOUP P. Giaccone di Palermo in accordo con le istruzioni specifiche indicate dal produttore dei kit (Bio-Teche, Milano).

Sulla scorta delle dimensioni delle varici i pazienti arruolati sono stati successivamente suddivisi, in accordo con il grado di ipertensione portale in 3 gruppi:

- Gruppo 1: pazienti cirrotici senza segni endoscopici d'ipertensione portale
- Gruppo 2: pazienti cirrotici con varici F1
- Gruppo 3: pazienti cirrotici con varici F2/F3

Sulla scorta dei criteri di esclusione ed inclusione elencati sono stati selezionati 106 pazienti in totale, 64 uomini e 43 donne di età compresa tra i 31 e gli 86 anni (età media 67,3 anni). Diciassette pazienti (15,9%) non presentavano segni endoscopici d'ipertensione portale, 41 pazienti (38,3%) presentavano varici F1 e in 49 pazienti (47,8%) sono state riscontrate varici F2 o F3.

Il 66,4% dei pazienti reclutati apparteneva alla classe Child-Pugh A, il 25,2% alla B e il 7,5 % alla classe C.

Per l'esecuzione dell'ECG Holter delle 24 ore sono stati utilizzati degli apparecchi Sorin Spiderview Digital Holter Recorder e l'analisi dei dati raccolti effettuata tramite il programma ELA Medical SyneScope versione 3.10.

L'apparecchio veniva posizionato tra le 08.30 e le 09.30 del mattino e portato dal paziente per 24 ore. Il registratore Holter prevedeva il posizionamento di dieci elettrodi in regione precordiale. Durante il monitoraggio il paziente era invitato a svolgere la normale attività quotidiana evitando l'esercizio fisico intenso.

Il tracciato veniva registrato in un'apposita card contenuta nell'apparecchio e analizzato successivamente al computer tramite 3 canali di registrazione.

L'analisi, effettuata da un singolo operatore addestrato all'uso del software, prevedeva inizialmente la distinzione tra artefatti, battiti normali e battiti ventricolari e successivamente la valutazione da parte dell'operatore degli eventi selezionati dal computer.

Per evento si intende:

- RR minimo e massimo
- FC minima e massima
- Tachicardie Sopraventricolari (TSV) (FC > 150 bpm)
- Tachicardie Vntricolari (TV) (FC > 50 bpm)
- Bradicardie (FC < 45 bpm)
- Pause (NN maggiore di 2500 msec)
- Battiti mancanti

- Battiti ectopici sopraventricolari (BESV) e ventricolari (BEV), singoli, in coppia e in run breve (da tre a quindici battiti)
- BESV e BEV a cadenza bigemina o trigemina
- Instabilità NN
- Accelerazione e/o rallentamento NN

L'operatore si riservava di rivalutare la restante parte della traccia, anche ove non venissero automaticamente rilevati uno o più eventi, per il corretto inquadramento degli stessi.

Il monitoraggio dell'ECG Holter è stato considerato non valido nei seguenti casi:

- Durata della registrazione < 22 ore
- Numero di artefatti e battiti ectopici > 20 % del numero totale di battiti (in presenza di battiti ectopici, venivano esclusi dall'analisi finale sia l'intervallo NN rappresentato dalla copula che quello rappresentato dalla pausa post-extrasistolica)

Di ogni monitoraggio sono stati presi in considerazione le misure di HRV del dominio del tempo nelle ore diurne (ore 8-21), notturne (ore 23-6) e delle 24 ore. Abbiamo scelto di non prendere in considerazione le misure del dominio della frequenza perché queste ultime sono preferibili per riprodurre il bilancio simpato-vagale dei monitoraggi di breve durata poiché la minore stabilità delle modulazioni della frequenza cardiaca nelle registrazioni di lunga durata rende le misure del dominio della frequenza meno facilmente interpretabili [272]. Sono state invece preferite le misure del dominio del tempo, considerate ideali per le analisi di registrazioni di lunga durata. Sono state analizzate le seguenti misure HRV del dominio del tempo:

- Frequenza cardiaca media
- Differenza tra NN massimo e NN minimo

- Differenza tra frequenza cardiaca media diurna e notturna
- Differenza percentuale tra due intervalli NN consecutivi superiori a 50 ms (pNN50)
- Differenza percentuale tra due intervalli NN consecutivi superiori a 30 ms (pNN30)
- Radice quadrata della media delle differenze successive di NN (RMSSD)
- Deviazione standard o radice quadrata della varianza (SD)
- Media delle deviazioni standard calcolate su un periodo di cinque minuti (ASDNN)
- Deviazione standard delle medie degli intervalli NN calcolati su un periodo di cinque minuti (SDANN)
- Percentuale delle deviazioni medie tra due complessi successivi (Index V)

Se uno dei monitoraggi presentava un valore di artefatti o di battiti ectopici superiore al 20% rispetto ai battiti normali o una durata di registrazione inferiore alle 22 ore, il monitoraggio veniva ripetuto entro un mese dalla esecuzione della EGDS.

Mediante ecotomografia dell'addome un unico operatore esperto ha valutato la presenza di splenomegalia, versamento ascitico, dimensioni e flusso della vena porta e presenza di HCC che, in caso di necessità, veniva confermata mediante test di secondo livello (TC con mezzo di contrasto, RMN).

6.4 Analisi e statistica

Per l'analisi descrittiva delle variabili in studio sono state utilizzate frequenze, medie, mediane \pm deviazione standard.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test chi-quadro per le variabili categoriche e il test t-Student per le variabili continue. È stata eseguita l'analisi univariata della varianza (ANOVA) per valutare la differenza delle concentrazioni citochiniche tra i gruppi. Le variabili statisticamente significative all'analisi univariata sono state identificate e utilizzate in un'analisi multivariata per valutare ulteriori significatività.

Sono state costruite curve ROC per valutare la capacità predittiva delle citochine nei confronti dell'assenza di varici esofagee e del loro recente sanguinamento.

Sono stati considerati statisticamente significativi i valori di p value < 0.05.

6.5 Risultati

Analisi descrittiva

I dati riguardanti le caratteristiche cliniche, ecografiche ed endoscopiche sono riassunti nella Tabella 3. Vi era una prevalenza del sesso maschile rispetto al sesso femminile (M=59,8%, F= 40,2). Il 76,6 % circa dei pazienti presentava un'infezione virale (HCV e HBV) quale eziologia della cirrosi epatica, nel 15,9 % era stata diagnosticata una cirrosi epatica post NASH e nel restante 7% criptogenetica. La maggior parte dei soggetti reclutati apparteneva alla Classe A di Child-Pugh (n=71, 64%), un quarto circa del campione apparteneva alla classe B di Child-Pugh (n=27, 25,2%); e la restante quota dei pazienti alla classe Child C (n=8; 7,5%). In base alla dimensione delle varici i

pazienti sono stati inoltre suddivisi in tre gruppi: assenza di varici (n=17, 15,9%), varici F1 (n=41, 38,3%) e varici F2/F3 (n=49, 47,8%).

Regressione Univariata di citochine e variabili anamnestiche, cliniche, ematochimiche e HRV.

Analisi Univariata per IL-6

All'analisi di regressione univariata i valori medi di IL-6 hanno mostrato associazione statisticamente significativa con l'eziologia della cirrosi. In particolare la forma criptogenetica ha presentato valori superiori di IL-6 rispetto alle forme virali (B=12,054; $p < 0,001$; CI 95%); associazione inversa statisticamente significativa con l'eradicazione virale (B= -20,17; $p < 0,024$; CI 95%), altresì estremamente significativa l'associazione con la classe di Child Pugh (B= 37,87; $p < 0,0001$; CI 95%), con il MELD score (B=6,35; $p < 0,0001$; CI 95%), con APRI score (B= 10,54; $p < 0,0001$; CI 95%), con la presenza di ascite (B=40,49; $p < 0,0001$; CI 95%) (Tabella. 4) e con la quantità di liquido ascitico stimata ecograficamente (B=22,05; $p < 0,0001$; CI 95%) (Tabella. 5). Un'associazione statisticamente

significativa è stata riscontrata anche tra i livelli di IL-6 con la diagnosi di EPS (B= 79,09; $p < 0,0001$; CI 95%) (Tabella. 5), con il grado di gastropatia portale (B= 7,56; $p < 0,0001$; CI 95%), l'utilizzo di furosemide (B= 23,71; $p < 0,01$; CI 95%), canreonato di potassio (B= 24,62; $p = 0,012$; CI 95%) (Tabella. 6). Per ciò che concerne le variabili ematochimiche, IL-6 ha mostrato un'associazione inversa statisticamente significativa con emoglobina (B= -4,25; $p = 0,013$; CI 95%), sodio (B= -3,96; $p < 0,001$; CI 95%), albumina (B= -28,68; $p < 0,0001$; CI 95%) e filtrato glomerulare (B= -0,39; $p = 0,006$; CI 95%); ha mostrato invece un'associazione diretta statisticamente significativa con International Normalized Ratio (INR) (B= 103,27; $p < 0,0001$; CI 95%), bilirubina tot (B= 6,66; $p = 0,002$; CI 95%), AST (B= 0,24; $p = 0,045$; CI 95%), creatinina (B= 9,61; $p = 0,022$; CI 95%) (Tabella. 6). All'analisi di regressione univariata con le variabili HRV, l'IL-6 ha mostrato associazione statisticamente significativa con la frequenza cardiaca media delle 24h (FC24) (B= 1,30; $p < 0,001$; CI 95%), la frequenza media del giorno (FC giorno) (B= 1,030; $p = 0,008$; CI 95%) e della notte (Fc notte) (B= 1,27; $p < 0,001$; CI 95%); infine associazione inversa con SDANN 5min 24h (B= -0,53; $p < 0,0001$; CI 95%) ed SD 24 (B= -0,36; $p = 0,002$; CI 95%) (Tabella. 7).

Analisi Multivariata IL-6

Dopo analisi multivariata inserendo tutte le variabili risultate statisticamente significative all'univariata, si confermavano significative le associazioni di IL-6 con classe e score di Child Pugh, quantità di ascite, diagnosi di EPS, INR, FC 24 h, Fc notte e SD 24h (Tabella. 8).

Analisi Univariata per OPN

All'analisi di regressione univariata i valori medi di OPN hanno mostrato associazione inversa statisticamente significativa con l'eradicazione virale ($B=-2,971$; $p=0,006$; CI 95%) e associazione diretta statisticamente significativa con la classe di Child Pugh ($B=3,52$; $p<0,0001$; CI 95%), con il MELD score ($B=0,38$; $p=0,008$; CI 95%) (Tabella. 4), con la presenza di ascite ($B=4,87$; $p<0,0001$; CI 95%) e con la quantità di liquido ascitico stimata ecograficamente ($B=2,95$; $p<0,0001$; CI 95%) (Tabella. 5). Un'associazione statisticamente significativa è stata riscontrata anche tra livelli di OPN e tromboosi portale ($B=4,34$; $p=0,014$; CI 95%), la diagnosi di EPS ($B=4,69$; $p=0,016$; CI 95%), HCC ($B=4,17$; $p<0,001$; CI 95%) e dimensioni della vena porta ($B=0,44$; $p=0,029$; CI 95%) (Tabella. 5). Ancora, i valori medi di OPN hanno mostrato associazione statisticamente significativa con l'utilizzo di furosemide ($B=3,29$; $p=0,003$; CI 95%) (Tabella. 6). Per ciò che concerne le variabili ematochimiche, OPN ha mostrato un'associazione inversa statisticamente significativa con emoglobina ($B=-0,63$; $p=0,002$; CI 95%), sodio ($B=-0,426$; $p=0,002$; CI 95%), albumina ($B=-4,14$; $p<0,0001$; CI 95%) e filtrato glomerulare ($B=-0,77$; $p<0,0001$; CI 95%); ha mostrato invece un'associazione diretta statisticamente significativa con globuli bianchi ($B=0,001$; $p<0,0001$; CI 95%), INR ($B=7,24$; $p=0,011$; CI 95%), bilirubina tot ($B=1,09$; $p<0,0001$; CI 95%), AST ($B=0,053$; $p<0,0001$; CI 95%), GGT ($B=0,018$; $p=0,021$; CI 95%), FA ($B=0,034$; $p<0,0001$; CI 95%) (Tabella.

6). Una tendenza alla significatività statistica è stata, inoltre, riscontrata anche nell'associazione tra OPN e APRI score ($B= 0,60$; $p=0,053$; CI 95%)(Tabella. 4). All'analisi di regressione univariata con le variabili HRV, OPN ha mostrato associazione statisticamente significativa con RMSSD 24h ($B= 0,020$; $p=0,031$; CI 95%); infine associazione inversa con SDANN 5min 24h ($B= -0,42$; $p=0,14$; CI 95%) (Tabella. 7).

Analisi Multivariata OPN

Dopo analisi multivariata inserendo tutte le variabili risultate statisticamente significative all'univariata, si confermavano significative le associazioni di OPN con MELD score, diametro vena porta, globuli bianchi, filtrato, RMSSD 24 h, (Tabella.9).

Analisi Univariata per IL-1Ra

All'analisi di regressione univariata i valori medi di IL-1Ra hanno mostrato associazione statisticamente significativa con l'eziologia della cirrosi, in particolare la forma criptogenetica ha presentato valori maggiori di IL-1Ra rispetto alle forme virali ($B=150,14$; $p=0,035$; CI 95%); altresì statisticamente significativa l'associazione con la classe di Child Pugh ($B= 274,89$; $p=0,031$; CI 95%), con il MELD score ($B=66,29$; $p=0,002$; CI 95%), con APRI score ($B= 156,74$; $p<0,001$; CI 95%) (Tabella. 4), Un'associazione statisticamente

significativa è stata riscontrata anche dei livelli di IL-1Ra con la presenza di EPS (B= 793,09; p=0,008; CI 95%) (Tabella. 5), Per quanto riguarda le variabili ematochimiche, IL-1Ra ha mostrato un'associazione diretta statisticamente significativa con i valori di INR (B= 1196,93; p=0,006; CI 95%) (Tabella. 6). All'analisi di regressione univariata con le variabili HRV, l'IL-1Ra ha mostrato associazione statisticamente significativa con la FC24 (B= 24,87; p< 0,001; CI 95%), FC giorno (B= 19,99; p= 0,006; CI 95%) e Fc notte) (B= 23,43; p< 0,001; CI 95%); infine associazione inversa con SDANN 5min 24h (B= -6,43; p=0,016; CI 95%) ed SD 24 (B= -4,79; p=0,030; CI 95%) (Tabella. 7).

Analisi Multivariata per IL-1RA

Dopo analisi multivariata inserendo tutte le variabili risultate statisticamente significative all'univariata, si confermava significativa l'associazione di IL-1Ra con diagnosi di EPS. (Tabella. 10)

Analisi Univariata per IL-22

All'analisi di regressione univariata i valori medi di IL-22 hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa con la classe di Child Pugh (B= 13,47; p< 0,0001; CI 95%), con il MELD score (B=2,46; p<0,0001; CI 95%), con APRI score (B= 6,17; p< 0,0001; CI 95%)(Tabella. 4), con la presenza di ascite (B=15,98; p<0,0001; CI 95%) e con la quantità di liquido ascitico valutata ecograficamente (B=7,05; p<0,0001; CI 95%). Un'associazione statisticamente significativa è stata riscontrata anche tra i livelli di IL-22 con la

diagnosi di EPS (B= 28,86; $p < 0,0001$; CI 95%) (Tabella. 5), l'utilizzo di furosemide (B= 11,43; $p=0,006$; CI 95%), canreonato di potassio (B= 10,27; $p=0,020$; CI 95%) (Tabella. 6). Per ciò che concerne le variabili ematochimiche, IL-22 ha mostrato un'associazione inversa statisticamente significativa con emoglobina (B= -2,34; $p= 0,002$; CI 95%), sodio (B= -1,61; $p=0,002$; CI 95%), albumina (B= -12,70; $p < 0,0001$; CI 95%) e filtrato glomerulare (B= -0,22; $p= 0,001$; CI 95%); IL-22 ha mostrato invece un'associazione diretta statisticamente significativa con i globuli bianchi (B= 0,002; $p=0,014$; CI 95%) il valore di INR (B= 37,07; $p < 0,0001$; CI 95%), bilirubina tot (B= 4,92; $p < 0,0001$; CI 95%), AST (B= 0,18; $p=0,001$; CI 95%), ALT (B= 0,12; $p=0,031$; CI 95%), GGT (B= 90,76; $p= 0,007$; CI 95%), FA (B= 0,125; $p < 0,0001$; CI 95%) (Tabella. 6). All'analisi di regressione univariata con le variabili HRV, l'IL-22 ha mostrato associazione statisticamente significativa con FC24 (B= 0,41; $p=0,023$; CI 95%), Fc notte (B= 0,39; $p < 0,018$; CI 95%) e tendenza alla significatività statistica nella associazione FC giorno (B= 0,33; $p= 0,056$; CI 95%); infine associazione inversa con SDANN 5min 24h (B= -0,22; $p < 0,0001$; CI 95%) ed SD 24 (B= -0,15; $p=0,003$; CI 95%) (Tabella. 7).

Analisi Multivariata per IL-22

Dopo analisi multivariata inserendo tutte le variabili risultate statisticamente significative all'univariata, si confermavano significative le associazioni di IL-22 con EPS, furosemide, canreonato di potassio, FA e APRI score e SD 24h (Tabella. 11).

Analisi Univariata per IL-17

All'analisi di regressione univariata i valori medi di IL-17 non hanno mostrato associazioni statisticamente significative con le variabili cliniche, ematochimiche e dell'HRV (Tabella. 4,5,6,7). Non è stata dunque effettuata analisi multivariata per IL-17.

ANOVA per IL-6, OPN, IL-22, IL-17 in pazienti cirrotici e gruppo controllo

All'analisi di confronto tra il gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica e i soggetti sani, è risultato statisticamente significativa la maggiore concentrazione di IL-6 ($p < 0,001$), OPN ($p < 0,0001$), IL-22 ($p < 0,016$), IL-17 ($p < 0,0001$) nei pazienti affetti da cirrosi (Tabella. 12).

Curve ROC per predittività di assenza di varici e recente sanguinamento di varici esofagee

Attraverso la costruzione di curve ROC abbiamo riscontrato buona specificità ma ridotta sensibilità di IL-6 nel predire l'assenza di varici esofagee (AUC 0,63; $p = 0,043$; valore di cut off $> 10,3$; sensibilità 47,7% e specificità 82,35%) (Grafico. 1); discreta sensibilità e buona specificità di IL-1Ra nel predire l'assenza di varici esofagee (AUC 0,72; $p = 0,0018$; valore di cut off > 435 ; sensibilità 56,6% e specificità

88,24%) (Grafico.1). Inoltre IL-6 ha dimostrato buona sensibilità e discreta specificità (AUC 0,73; $p < 0,0001$; valore di cut off $> 9,96$; sensibilità 88,8% e specificità 62,92%) e OPN ridotta sensibilità ma buona specificità (AUC 0,64; $p = 0,0325$; valore di cut off $> 6,56$; sensibilità 50% e specificità 77,5%) nel predire il recente sanguinamento di varici. (Grafico. 2) Le restanti citochine non risultavano capaci di predire l'assenza di varici e il recente sanguinamento.

IL-6, OPN, IL-22 e IL-17 e classe di Child-Pugh

I valori medi di IL-6, OPN, IL-22 e IL-17 sono risultati progressivamente ridotti all'aumentare della severità di malattia di fegato stimata attraverso Child-Pugh score (IL-6 Child A $9,38 \pm 11,26$, IL-6 Child B $49,37 \pm 51,62$; IL-6 Child C $82,46 \pm 110,30$ $p < 0,0005$; OPN Child A $4,63 \pm 3,82$, OPN Child B $8,86 \pm 7,24$; OPN Child C $10,79 \pm 7,52$ $p < 0,0005$; IL-22 Child A $14,19 \pm 14,09$, IL-22 Child B $23,99 \pm 18,88$; IL-22 Child C $45,75 \pm 44,49$ $p < 0,0005$, IL-17 Child A $3,77 \pm 3,85$, IL-17 Child B $4,66 \pm 4,33$; IL-17 Child C $2,57 \pm 1,92$ $p < 0,0005$.) (Tabella. 13)

Tali risultati sono stati confermati post hoc con il test di Bonferroni per l'analisi fra i gruppi.

IL-6, OPN, IL-22 e scompenso ascitico

Infine nel confronto tra il gruppo di pazienti con ascite e il gruppo di pazienti in fase di compenso, i valori medi di IL-6, OPN, IL-22 sono risultati significativamente aumentati nel gruppo dei pazienti ascitici (IL-6 assenza ascite $9,45 \pm 11,50$, IL-6 ascite $49,54 \pm 64,96$; $p < 0,0005$; OPN assenza ascite $4,31 \pm 3,06$, OPN ascite $9,18 \pm 7,21$; $p < 0,0005$; IL-22 assenza ascite $12,76 \pm 8,39$, IL-22 ascite $28,74 \pm 28,82$; $p < 0,0005$) (Tabella.15)

6.6 Discussione

Nel nostro studio abbiamo valutato le concentrazioni di alcune importanti citochine coinvolte in numerosi pathways infiammatori in 106 pazienti affetti da cirrosi epatica ad eziologia non alcolica. È stata inoltre effettuata per ogni paziente la registrazione di un ECG secondo Holter per la determinazione dei parametri HRV secondo analisi del dominio del tempo al fine di valutare indirettamente il bilancio simpato-vagale in questi pazienti.

In questo studio abbiamo deciso di utilizzare rigidi criteri di esclusione per ottenere un campione omogeneo ed escludere pazienti affetti da condizioni predisponenti per grave neuropatia autonoma (es: storia

di abuso di alcool) che potessero quindi inficiare i parametri HRV delle 24 ore o condizioni che potessero alterare la risposta infiammatoria e citochinica (esempio sepsi, pancreatite, obesità severa e altre condizioni pro-infiammatorie). Il presente studio ha mostrato come le concentrazioni di IL-6, OPN, IL-22, IL-17 e IL1Ra nei pazienti cirrotici siano per gran parte associate alla severità di patologia espressa tramite Child-Pugh e MELD score, all'ipertensione portale e ad alcune sue complicanze, nonché ai parametri HRV delle 24 ore che meglio rappresentano l'attività del sistema nervoso simpatico ed il bilancio simpato-vagale nella sua totalità (rispettivamente SDANN e SDNN).

CIRROSI EPATICA CRIPTOGENETICA

Le concentrazioni di IL-6 e IL-1 Ra hanno dimostrato una robusta associazione con la forma di cirrosi epatica criptogenetica rispetto alle forme virali e post NASH. In studi precedenti, IL-6, che rappresenta una citochina iper-espressa in tutte le forme di cirrosi, è risultata maggiormente associata a forme alcoliche piuttosto che virali e criptogenetiche [236-238]. Il nostro dato, inedito in letteratura, che inserisce anche IL-1Ra insieme a IL-6, sebbene smorzato dalla scarsa rappresentazione di forme criptogenetiche nel nostro campione, può rappresentare un importante punto di partenza per lo studio dei processi infiammatori alla base delle forme di cirrosi ad eziologia ignota. Entrambe le citochine infatti sono legate alla risposta immune innata dovuta alla disfunzione a carico della barriera mucosa intestinale [220].

ERADICAZIONE VIRALE

La grande prevalenza di pazienti affetti da cirrosi epatica ad eziologia virale HCV nel nostro campione ha permesso di valutare anche la diversa espressione delle citochine prese in esame nel sottogruppo di soggetti che hanno praticato con successo una terapia eradicante. Nel nostro studio abbiamo riscontrato un'associazione inversa tra livelli di IL-6 e OPN e l'eradicazione virale. L'associazione, inoltre, con IL-6 rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata. (Tabella. 8) In linea con il nostro dato, in uno studio recente condotto su 90 pazienti affetti da HCV e iperglicemia [336] è stato riscontrato una riduzione delle concentrazioni di IL-6, IL-17, IL-23, and IL-27 in soggetti sottoposti a terapia eradicante. Nessuno studio, invece, al meglio delle nostre conoscenze, ha dimostrato un'associazione tra le concentrazioni di OPN e l'eradicazione di HCV. Il nostro dato però sembra essere in linea con recenti evidenze che hanno dimostrato una riduzione di incidenza di HCC nei pazienti sottoposti ad eradicazione virale [337] considerando l'ormai ben noto link tra HCC e OPN quale potenziale marker di tale condizione oncologica. Purtroppo dai dati in nostro possesso non è possibile risalire alle specifiche terapie antivirali usate nei singoli pazienti per l'eradicazione ma il nostro dato rappresenta un utile punto di partenza per approfondire la risposta di OPN nei pazienti HCV e la capacità di questa citochina nel predire il rischio di HCC attraverso lo studio delle concentrazioni residue post eradicazione.

SEVERITÀ DI MALATTIA

Al test ANOVA che confrontava le concentrazioni delle citochine prese in esame nel campione di pazienti cirrotici con le concentrazioni sieriche nel gruppo di soggetti sani, il nostro studio ha riscontrato ulteriori conferme riguardo il complesso pattern citochinico che caratterizza i pazienti con patologia cronica di fegato. Abbiamo infatti evidenziato concentrazioni più elevate di IL-6, IL-22, IL-17 e OPN nel gruppo di pazienti cirrotici rispetto ai soggetti sani (Tabella 12). Inoltre, in linea con quanto presente in letteratura [216, 217, 236] le concentrazioni di IL-6, OPN, IL-1Ra hanno presentato una robusta associazione con la severità di patologia di fegato espressa sia tramite Child-Pugh score che tramite Meld Score [218, 219, 338.]. L'associazione riguardante IL-6, inoltre, rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata (Tabella. 8). Tale dato è corroborato altresì dalla significativa associazione riscontrata ai successivi test T-student e Bonferroni che hanno evidenziato un progressivo incremento delle concentrazioni sieriche di IL-6, IL-22, OPN e IL-17 nei tre gruppi di pazienti distinti sulla scorta della severità di patologia di fegato espressa tramite classe di Child-Pugh. (Tabella.13) Il milieu citochinico del paziente cirrotico è infatti intimamente legato alle alterazioni anatomopatologiche e dunque all'espressione di malattia a livello clinico ed ematochimico [166, 265,

339]. Gli score di Child-Pugh e Meld che ben riflettono l'avanzamento nei vari stadi di patologia non possono che correlare anche con il substrato infiammatorio che sta alla base di tali alterazioni espresso dal complesso pattern citochinico.

Interessante anche l'associazione riscontrata all'analisi univariata tra le suddette citochine e l'APRI score. In una meta-analisi di 40 studi, i ricercatori hanno concluso che un punteggio APRI maggiore di 1,0 aveva una sensibilità del 76% e una specificità del 72% per predire la cirrosi. Inoltre, hanno concluso che un punteggio APRI maggiore di 0,7 aveva una sensibilità del 77% e una specificità del 72% per predire una fibrosi epatica significativa.

Per il rilevamento della cirrosi, l'utilizzo di un punteggio di cutoff APRI di 2,0 inoltre era più specifico (91%) ma meno sensibile (46%). Più basso è il punteggio APRI (inferiore a 0,5), maggiore è il valore predittivo negativo (e capacità di escludere la cirrosi) e più alto è il punteggio (maggiore di 1,5) maggiore sarà il valore predittivo positivo (e capacità di escludere la cirrosi). L'APRI da solo non è probabilmente sufficientemente sensibile per escludere malattie significative [340, 341]. Il nostro dato, rafforzato dal noto ruolo che queste citochine svolgono nel processo di fibrosi e stravolgimento dell'architettura epatica, contribuisce a rendere ancora più suggestivo il potenziale utilizzo di IL-6, OPN, IL-22 e IL-1Ra quali markers capaci di predire la presenza di cirrosi e di fibrosi epatica. Infine i nostri dati rinforzano ancora di più le evidenze che attribuiscono a IL-6, OPN e IL-22 un ruolo nell'esprimere la severità di patologia di fegato, anche in considerazione della diretta associazione tra le suddette citochine con i valori di INR, creatinina, bilirubina, FA, GGT, AST e l'associazione

inversa riscontrata invece con i valori di sodio, emoglobina, filtrato glomerulare e albumina (Tabella. 6).

IPERTENSIONE PORTALE E COMPLICANZE

Diversi studi hanno cercato di validare il ruolo di numerose citochine tra cui soprattutto IL-6 e IL-1Ra quali misure indirette del grado di ipertensione portale e di HVPG [202], soffermandosi anche sull'associazione delle loro concentrazioni sieriche e lo sviluppo delle principali complicanze dell'ipertensione portale [265, 266, 268, 342]. Nel nostro capione abbiamo riscontrato una forte associazione tra i livelli sierici di IL-6, OPN e IL-22 e la presenza di ascite, nonché la quantità di ascite stessa stimata attraverso ecografia dell'addome. L'associazione riguardante IL-6, inoltre, rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata. Il dato in linea con numerose evidenze presenti in letteratura [215, 236], e corroborato anche dall'associazione riscontrata con alcuni farmaci, quali furosemide e canreonato di potassio, utilizzati prevalentemente in caso di scompenso ascitico, è spiegato anche dalle elevate concentrazioni di queste citochine, soprattutto di IL-6, riscontrate nel liquido ascitico a causa di una verosimile produzione in cavità peritoneale [215] che può almeno in parte contribuire ad innalzare le concentrazioni sistemiche. Nel nostro studio abbiamo altresì voluto

condurre un'analisi dedicata all'espressione delle citochine prese in esame nei pazienti cirrotici. Abbiamo quindi diviso in due gruppi il campione di pazienti sulla scorta della presenza o meno di ascite all'ecografia dell'addome e abbiamo valutato le differenze tra i due gruppi in termini concentrazioni citochiniche. In linea con quanto precedentemente descritto abbiamo riscontrato livelli sierici notevolmente superiori di IL-6, OPN e IL-22 nei pazienti in fase di scompenso ascitico rispetto ai pazienti che non presentavano ascite. Questo dato conferma ancora una volta l'associazione tra queste citochine e la storia naturale dell'ipertensione portale.

L'ipertensione portale conduce alla formazione di ascite ed è positivamente correlata con IL-6. L'eliminazione epatica di IL-6 non sembrerebbe invece essere associata con l'HVPG e inoltre la riduzione del regime pressorio portale a seguito di TIPS non sembra avere effetti sui livelli sistemici di IL-6 [236, 237]. Dunque l'ipertensione portale non sembrerebbe influenzare i livelli di IL-6 nei pazienti ascitici. Altri studi [265] però hanno attribuito a IL-6 un ruolo determinante nel promuovere la progressione di malattia di fegato verso lo sviluppo di ipertensione portale e di varici esofagee nonché nell'influenzare la mortalità di tali pazienti. Altri studi ancora hanno analizzato il link tra IL-6 e alcune complicanze dell'ipertensione portale come l'encefalopatia porto sistemica (EPS) [267, 268] e la trombosi portale [266] evidenziando rispettivamente un'associazione positiva dei livelli di questa citochina con l'ammonemia plasmatica e la severità clinica dell'EPS e una associazione significativa con le alterazioni coagulative e incidenza di trombosi portale. Nel nostro studio IL-6 insieme a OPN, IL-1Ra e IL-22 ha dimostrato di essere associata in maniera significativa con la diagnosi di EPS. L'associazione di IL-6, IL-

22 e IL-1Ra con EPS, inoltre, rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata (Tabella 8, 10, 11). Anche in questo caso è probabile che i meccanismi infiammatori alla base dell'insorgenza delle complicanze dell'ipertensione portale siano più complessi di quello che pensiamo e conducano ad un'attivazione di pathways infiammatori che coinvolgono numerose molecole. In quest'ottica la ricerca di un singolo marcatore molecolare capace di esprimere da solo una condizione clinica complessa può essere non agevole. In questo senso anche l'assenza di associazione significativa della trombosi portale con IL-6 ma la presenza di significatività con OPN, riscontrata nel nostro lavoro, la dice lunga circa la diversificazione dei pathways infiammatori e la capacità pleiotropica delle citochine analizzate.

Non avendo a disposizione dati a sufficienza dei valori HVPG per tutti i nostri pazienti abbiamo cercato di valutare l'impatto dell'ipertensione portale sulle concentrazioni delle citochine prese in esame, dividendo il nostro campione di pazienti in tre gruppi sulla scorta delle dimensioni delle varici esofagee (gruppo 1: assenza di varici; gruppo 2: varici di piccole dimensioni F1; gruppo 3: varici di grandi dimensioni F2-F3). Nessuna delle citochine prese in esame si è dimostrata correlare bene con la severità dell'ipertensione portale espressa tramite dimensione delle varici (Tabella. 14). Questo dato è comunque degno di interesse a nostro parere perché riflette il fatto che la dimensione delle varici esofagee è il prodotto di una complessa interazione tra vasodilatazione splanchnica, circolazione iperdinamica, attivazione del sistema renina angiotensina-aldosterone (RAAS), sistema nervoso autonomo (SNA) e volume circolante. Tale

complessità che riflette anche quella dell'ipertensione portale probabilmente non si presta ad una semplice rappresentazione tramite espressione di un singolo pattern citochinico. Questo spiegherebbe anche la presenza di dati contrastanti in letteratura riguardo la capacità di alcune citochine di predire i valori di HVPG, o di farlo ma solo in pazienti in fase di compenso o che non presentano varici esofagee [202]. Nel nostro studio IL-6 e OPN sembrano essere le citochine con associazione più significativa con i segni indiretti di ipertensione portale e le sue complicanze. Come dimostrato anche dalla significativa associazione tra OPN e le dimensioni della vena porta da noi riscontrata all'analisi univariata e confermata all'analisi multivariata dopo correzione per le altre variabili risultate significative all'univariata. (Tabella. 9)

HCC E OPN

Una trattazione a parte merita la stretta associazione, ormai più volte dimostrata in letteratura, tra HCC e OPN. In linea con quanto già descritto in altri studi [225, 271], abbiamo riscontrato l'incremento delle concentrazioni sistemiche di OPN avvalorando il suo potenziale ruolo quale marker prognostico e diagnostico [343]. Il ruolo di OPN nella progressione di HCC è stato oggetto di studi che hanno suggerito un ruolo nell'attivazione estracellulare di CD44 e di numerose integrine [344-346]. Secondo un affascinante studio [271], la quota di OPN prodotta dagli epatociti presenterebbe effetti differenti durante l'esordio e la progressione del tumore epatico. A livelli fisiologici OPN esercita un effetto antitumorale ed è coinvolto durante le prime fasi della carcinogenesi diminuendo la risposta alle dietilnitrosamine (DEN) e aumentando le cancer stem cell (CSC) in topi con ablazione

del gene epatocitario per OPN (Opn Δ Hep); tuttavia, non stimola la progressione delle CSC a HCC, come dimostrato dalla presenza di più tumori a 12 mesi in Opn Δ Hep e non prima. Quando l'OPN è sovraespresso, ha effetto pro-tumorigenico principalmente interessando gli ultimi stadi della carcinogenesi, come dimostrato dal numero di CSC che non aumentano nei topi OpnHep Transgenico ma esprimono i segnali della carcinogenesi.

In questo studio, è stato dimostrato che l'espressione negli epatociti aumenta insieme alla progressione della malattia epatica cronica verso l'HCC. Sebbene sia stato riportato un aumento dell'OPN nell'HCC, gli autori hanno mostrato un'espressione intermedia nei noduli displastici, suggerendo un ruolo dell'OPN derivato dagli epatociti nell'insorgenza dell'HCC. Ciò è stato confermato dimostrando un'associazione significativa tra l'mRNA dell'OPN e l'incidenza dell'HCC nei pazienti con cirrosi. Quindi, è ipotizzabile che l'aumento dell'OPN derivato dagli epatociti sia un fattore di epatocarcinogenesi, come confermato in modelli murini di HCC. Poiché l'effetto pro-tumorigeno della sovraespressione di Opn si è verificato in tre genotipi di topo (WT, Opn $^{-/-}$ e Cd44 $^{-/-}$), ciò induce a pensare al contributo di un elevato OPN di derivazione epatocitaria nella carcinogenesi. Nel nostro campione non è stato possibile distinguere tra pazienti con HCC di nuova insorgenza e pazienti con lunga storia di tumore epatico ma il nostro dato corrobora comunque l'importanza di OPN quale potenziale biomarker di carcinogenesi e progressione tumorale.

SISTEMA NERVOVO SO AUTONOMO E PATTERN CITOCHINICO

Una delle caratteristiche principali che fornisce originalità al nostro studio è aver considerato, nei nostri pazienti, anche la funzionalità del bilancio simpato-vagale espresso tramite i parametri dell'analisi del dominio del tempo della variabilità della frequenza cardiaca (HRV). L'upregulation del SNS associato all'incremento dell'attività adrenergica, nel paziente cirrotico, agisce a livello dell'output cardiaco rappresentando un sistema adattativo di compenso che ha come scopo quello di ridurre il volume circolante effettivo. Come già evidenziato in altri lavori, la progressione della patologia di fegato e l'incremento della pressione portale si accompagnano ad una maggiore attivazione del SNS ed un incremento della circolazione iperdinamica [146, 156]. I dati riguardanti la riduzione dei valori di SDANN e SDNN, che meglio esprimono rispettivamente il bilancio simpato-vagale nella sua interezza e l'attività adrenergica, associata ad incremento dei livelli sierici di IL-6, OPN, IL-1Ra e IL-22 dimostrano ancora una volta la complessità di interazione dei pathways citocinici e del bilancio autonomo. L'associazione IL-6 e con SDNN 24h, inoltre, rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata (Tabella.8). Allo stesso tempo mette in risalto il possibile punto di contatto tra questi due sistemi, immunomolecolare e nervoso, più volte accennato o solo sfiorato in alcuni studi ma quasi mai posto in posizione di rilievo. In passato altri studi hanno dimostrato, tramite la valutazione dei parametri HRV nel dominio del tempo, un ipertono adrenergico nei pazienti cirrotici [287, 332]. Tuttavia, questa

alterazione del bilancio simpato-vagale è stata quasi sempre interpretata come indice di disfunzione autonoma che correlava anche ad una peggiore prognosi [347]. La causa di tale disfunzione autonoma è però sempre stata oggetto di speculazione. È stato, infatti, ipotizzato che un eventuale danno a carico del SNA potesse essere presente al livello del sistema nervoso centrale, nei nervi periferici o fosse espressione di un'alterata modulazione ormonale della neurotrasmissione. Nessuno studio però ha mai confermato tale ipotesi. Studi epidemiologici hanno mostrato una correlazione significativa tra i livelli circolanti di IL-6 e gli indici di ridotta variabilità della frequenza cardiaca in varie condizioni cliniche [348]. Sebbene questi rapporti suggeriscano un ruolo dell'IL-6 nella riduzione della variabilità della frequenza cardiaca durante l'infiammazione, la dimostrazione di una relazione causa-effetto non è semplice da riscontrare in letteratura. Il "riflesso antinfiammatorio" è stato recentemente descritto in uno studio da Tracey e colleghi [349] e si riferisce al ruolo che il sistema nervoso autonomo svolge nella regolazione della difesa dell'ospite e nelle risposte fisiologiche ai patogeni. Sembra che il cervello moduli le risposte infiammatorie sistemiche ai patogeni mediante l'attivazione delle fibre efferenti vagali. L'acetilcolina, il principale neurotrasmettitore vagale, ha significativamente attenuato il rilascio di citochine pro-infiammatorie (es. IL-6) attraverso l'attivazione dei recettori $\alpha 7$ -nicotinici sui macrofagi [349]. In altre parole, nei pazienti con "riflesso antinfiammatorio" compensato, l'aumento dell'attività vagale (elevata variabilità della frequenza cardiaca) potrebbe sopprimere la produzione di IL-6 (basso IL-6 circolante). Allo stesso modo, i pazienti con "riflesso antinfiammatorio" compromesso mostrerebbero

un'attività vagale inappropriata (ridotta variabilità della frequenza cardiaca) e alti livelli di IL-6 circolanti e prognosi infausta [349]. Un fenomeno simile è stato riportato nei muscoli papillari isolati da ratti cirrotici [350]. Jaue et al. hanno riportato un'inibizione significativamente inferiore alle concentrazioni incrementali di un agonista colinergico nei muscoli cardiaci cirrotici rispetto ai controlli. La cirrosi epatica, essendo collegata ad alti livelli circolatori di IL-6, è associata sia alla perdita della variabilità della frequenza cardiaca che alla ridotta risposta alla stimolazione colinergica [350, 351]. Jaue et al. hanno anche mostrato che la densità del recettore muscarinico cardiaco e l'affinità di legame erano simili nei cuori di ratto cirrotico rispetto ai controlli e suggerito che i cambiamenti nei fattori post-recettoriali potrebbero spiegare l'ipo-reattività agli stimoli colinergici. Quesito che merita sicuramente uno studio approfondito con altri esperimenti come ha fatto recentemente uno studio [352] che ha mostrato come la somministrazione intraperitoneale di IL-6 si associ ad una riduzione significativa di SDNN.

Anche l'associazione tra OPN e funzioni autonome è stata studiata in alcune patologie come diabete e alcune condizioni ortopediche [353, 354]. In questi studi OPN si associava con una ridotta funzione parasimpatica soprattutto nei giovani affetti da diabete mellito di tipo 2, anche se non era chiaro quale ruolo OPN svolgesse nei confronti del SNA se protettivo, dannoso o fosse semplice spettatore.

L'ischemia neuronale con conseguente disfunzione nervosa può anche essere associata a livelli elevati di OPN. L'OPN può modulare la proliferazione, la migrazione e l'accumulo di cellule muscolari lisce vascolari e cellule endoteliali nella riparazione del sistema vascolare [355]. Inoltre, Wada, McKee, Steitz e Giachelli (1999) hanno suggerito

che l'OPN potrebbe far parte di un meccanismo protettivo volto a prevenire la calcificazione del tessuto vascolare. Queste funzioni dell'OPN insieme alla sua capacità di aumentare la sopravvivenza delle cellule endoteliali [356] possono suggerire un ruolo protettivo dell'OPN per il sistema microvascolare.

In alternativa, è possibile che l'aumento delle concentrazioni di OPN possa essere un marker di processi patogeni coinvolti nello sviluppo della neuropatia (come l'infiammazione). È stato dimostrato un aumento dei livelli plasmatici di OPN in varie malattie caratterizzate da infiammazione cronica (ad es. obesità) [355, 357]. L'OPN, ampiamente distribuito in diversi tessuti umani, è localizzato all'interno e intorno alle cellule infiammatorie e spesso agisce regolandone la risposta infiammatoria [355]. Pertanto è possibile che, come mediatore dell'infiammazione, il rilascio cronico di OPN possa essere tossico, portando potenzialmente alla disfunzione e alla degenerazione dei neuroni [358]. La natura trasversale di questo studio, tuttavia, non consentiva la determinazione del ruolo dell'OPN e della sua associazione con la funzione autonoma cardiovascolare. Inoltre, le diverse funzioni fisiologiche dell'OPN possono essere il risultato della struttura dell'OPN, dell'interazione con vari recettori e delle diverse isoforme. Nel nostro studio OPN non solo si associa ad una riduzione degli indici che esprimono l'attività simpatica nel contesto del bilancio simpato-vagale in toto (SDANN 5 min e SDNN 24) ma risulta associato anche ad incremento di RMSSD ovvero uno dei principali parametri HRV che meglio esprime l'attività paraimpatica. L'associazione OPN e RMSSD, inoltre, rimaneva statisticamente significativa all'analisi multivariata dopo correzione per tutte le variabili significative riscontrate all'analisi univariata. Alla luce di tali

risultati possiamo ipotizzare che OPN sia dunque in associazione con una alterazione del bilancio simpato-vagale verosimilmente legata ad upregulation della componente parasimpatica. Questo riscontro apparentemente inedito in letteratura sembra comunque essere in linea con quanto precedentemente segnalato. Infatti, l'alterazione del fisiologico bilancio simpato-vagale già noto nel cirrotico esprime il grado di severità della patologia di fegato. L'OPN ancora una volta sembra candidarsi come marker affidabile di severità di patologia e di alterazioni che si accompagnano all'evoluzione della cirrosi e dell'ipertensione portale, come l'alterazione del bilancio autonomico. In tal senso non è chiaro ancora se il rapporto tra OPN e tale alterazione simpatica sia di danno o protezione ma l'associazione riscontrata nel nostro studio con l'upregolazione del sistema nervoso parasimpatico forse fa ipotizzare maggiormente un ruolo protettivo come supportano alcune evidenze recenti riguardo l'effetto dell'attività parasimpatica sull'outcome dei pazienti cirrotici [359].

In base alla nostra conoscenza della letteratura attuale, questo è il primo studio che ha dimostrato un incremento dell'attività adrenergica misurata indirettamente attraverso i parametri HRV in una coorte così ampia ed omogenea di pazienti cirrotici. Inoltre, è il primo studio che ha correlato il grado di attivazione del sistema nervoso simpatico e di alterazione del bilancio simpato-vagale alla severità dell'ipertensione portale in un gruppo di pazienti cirrotici suddivisi in base alla dimensione delle varici.

Nonostante la mole di studi che dimostrano in maniera indiretta un disfunzionamento del SNA e ipotizzano un danno spesso periferico e centrale, nessuna ricerca ha mai chiarito fino in fondo l'eziologia di questa disfunzione autonoma né evidenziato un danno

neuroanatomico, assonale o centrale, a livello del SNA di pazienti o cavie animali. Rimangono quindi non spiegati i meccanismi fisiopatologici che condurrebbero a questo danno. In tale contesto appare lecito domandarsi se è razionale sostenere allo stesso tempo che il SNA nel paziente cirrotico prenda parte ad un sofisticato meccanismo di tentativo di compenso che è alla base della circolazione iperdinamica e della ipertensione portale e allo stesso tempo sia disfunzionante. Come può essere contemporaneamente “danneggiato” e non fisiologicamente responsivo, come si stabilisce in alcuni studi, ma iperattivo a tal punto da essere alla base della fisiopatologia dell’ipertensione portale e costituire in parte un bersaglio terapeutico, attraverso il blocco dei recettori beta adrenergici degli sfinteri arteriolarari splancnici? Trevisani et al. [256] hanno in qualche modo cercato di rispondere a questo interrogativo sostenendo che una neuropatia autonoma è presente ed è tanto più pronunciata quanto più è avanzata la cirrosi epatica ma non essendo necessaria per lo sviluppo di una circolazione iperdinamica, la neuropatia autonoma può solo partecipare alla sua patogenesi.

Infine, interessante è anche l’associazione diretta da noi riscontrata tra livelli sierici di IL-6, IL1-Ra e IL-22 con la frequenza cardiaca media registrata all’ECG-Holter. Essendo l’incremento della frequenza cardiaca uno degli elementi fondamentali della circolazione iperdinamica del paziente cirrotico, la sua associazione con le suddette citochine lascia immaginare ancora una volta lo stretto legame tra pathways infiammatori, circolazione iperdinamica, bilancio simpato-vagale ed ipertensione portale del paziente cirrotico.

PREDITTIVITÀ DI VARICI ESOFAGEE E RECENTE SANGUINAMENTO

La costruzione di curve ROC ha permesso di valutare la potenzialità delle citochine prese in esame nel predire attraverso le concentrazioni sieriche l'assenza di varici esofagee e il loro recente sanguinamento. La maggior parte dei pazienti con cirrosi muore a causa di una complicanza dell'aumento della pressione venosa portale, come l'emorragia da rottura delle varici esofagee, ascite, encefalopatia epatica, sindrome epatopolmonare o sindrome epatorenale [360, 361]. Il gradiente di pressione della vena epatica (HVPG), è un indicatore prognostico per la sopravvivenza a lungo termine nella cirrosi [360, 361]. Inoltre, l'HVPG può riflettere la progressione della malattia anche nella fase di pre-cirrosi. Esiste infatti un'associazione tra la gravità dell'infiammazione e della fibrosi epatica e l'HVPG anche prima che si sviluppi la cirrosi [362]. Una delle complicanze gravi più frequenti dell'ipertensione portale è proprio l'emorragia da varici gastroesofagee. La riduzione dell'HVPG al di sotto di 12 mmHg, sia attraverso la reversione spontanea dopo la risoluzione dell'insulto, sia con interventi medici, radiologici o chirurgici, sappiamo essere efficace nel prevenire il sanguinamento ricorrente [363-366]. Attualmente, non vi è un test non invasivo capace di predire la pressione portale tra i pazienti che sono trattati con terapia betabloccante. Quindi, non c'è modo di prevedere né la risposta allo standard di cura né le complicanze dell'ipertensione portale (incluso il sanguinamento esofageo potenzialmente letale) se non l'esecuzione di screening dell'EGDS con l'aggiunta dei costi e di rischi insiti alla procedura. Dato che l'infiammazione del fegato dovuta a danno

epatico e/o a translocazione batterica caratterizza la cirrosi epatica con ipertensione portale, [367-372] molti studi hanno tentato di utilizzare alcuni biomarcatori infiammatori come test non invasivo per predire la presenza di ipertensione portale grave e di rischio di sanguinamento di varici [202,361]. I pazienti a più elevato rischio di sanguinamento sono coloro i quali hanno già avuto un episodio di emorragia da rottura di varici esofagee. Inoltre tutti i pazienti con nuova diagnosi di cirrosi e sospetta ipertensione portale dovrebbero eseguire EGDS per escludere la presenza di varici esofagee. In quest'ottica attraverso la costruzione delle curve ROC nel nostro studio abbiamo voluto valutare sia la capacità delle citochine prese in esame di predire l'assenza di varici esofagee sia di individuare la popolazione ad elevato rischio di recidiva di sanguinamento per poter usare il dato in studi prospettici futuri. Secondo i nostri risultati IL-6 ha mostrato poca sensibilità (47%) ma elevata specificità (82%) nel predire l'assenza di varici (AUC 0,63). Allo stesso modo IL-1Ra ha presentato sensibilità non elevata (56%) ma ottima specificità (88%) nel predire l'assenza di varici (AUC 0,72). (Grafico 1). Inoltre tra le citochine testate IL-6 è risultata nuovamente quella con capacità maggiore nel predire il recente sanguinamento con buona specificità (63% circa) ed elevata sensibilità (89% circa) (AUC 0,73). Invece OPN ha mostrato sensibilità non elevata (50%) ma buona specificità (77,5%) per predire il recente sanguinamento di varici (AUC 0,64). Tale dato preliminare appare a nostro parere utile per indirizzare i futuri studi prospettici sui marcatori biomolecolari da prendere in considerazione quali predittori di comparsa di varici e di emorragia legata alla loro rottura. In tal senso, qualora i nostri risultati dovessero essere confermati da studi prospettici futuri, potrebbe essere utile

puntare su di un sistema che integri il potere predittivo negativo di IL-6 e il potere predittivo positivo di OPN per predire il sanguinamento di varici.

CONCLUSIONI

Questo studio ha confermato e avvalorato alcuni dati già presenti in letteratura riguardante l'elevata espressione di alcune citochine come IL-6, OPN, IL-22 nei soggetti affetti da cirrosi epatica rispetto ai soggetti sani e l'associazione tra queste citochine con la severità della cirrosi epatica espressa tramite classe di Child Pugh e Meld score; il ruolo fondamentale di OPN quale potenziale marker di carcinogenesi; nonché l'associazione di IL-6, OPN, IL-1Ra e IL-22 con segni indiretti di ipertensione portale (clinici, ematochimici, ecografici) e con le sue complicanze (trombosi portale, EPS, ascite). Inoltre questo studio getta le basi per nuovi studi che intendono indagare la capacità di alcune citochine come IL-6, IL-1Ra e OPN nel predire l'assenza di varici esofagee potendo così evitare l'esecuzione di alcune procedure endoscopiche invasive e costose e soprattutto la capacità di queste citochine di individuare una parte di popolazione ad alto rischio di recidiva di sanguinamento di varici.

Infine, per la prima volta, questo studio ha approfondito l'interazione tra l'alterazione del SNA e attivazione di pathways infiammatori che caratterizzano le patologie croniche di fegato. La conoscenza approfondita di tale interazione potrebbe fornire in futuro delucidazioni sui meccanismi che condizionano la responsività dei pazienti alla terapia betabloccante.

È possibile immaginare che la responsività a betabloccanti recentemente ipotizzata limitarsi ad un periodo "finestra" [146] possa

essere influenzata dalla risposta del SNA al pattern citochinico o viceversa. Inoltre, come dimostrato da studi che hanno approfondito la relazione tra HRV e IL-6 [352], la variabilità della frequenza cardiaca sembra modificarsi dopo somministrazione di IL-6 in base anche alla sede di inoculazione in cavie animali. La somministrazione a livello intraperitoneale, infatti, si accompagnava a modifiche dell'HRV, al contrario della somministrazione a livello intracerebrale che non provocava alcun effetto rilevabile sul SNA. Partendo da questi dati si potrebbe in tal senso ipotizzare che dopo il periodo finestra la produzione di citochine che hanno un effetto sul SNA si modifichi in termini non solo di pattern ma anche di sede di produzione, svolgendo dunque un'influenza sul SNA e un ruolo nella ridotta responsività ai betabloccanti. Ulteriori studi sono necessari per approfondire questo aspetto.

Tabella A- Principali parametri del dominio del tempo, definizione matematica e loro significato.

Parametri	Definizione	Significato
SDNN (ms)	Deviazione Standard	HRV Totale
SDANN (ms)	Deviazione Standard delle medie degli intervalli NN calcolati in un periodo di 5 minuti	Bilancio simpato-vagale nel lungo periodo
ASDNN (ms)	Media delle deviazioni standard calcolate su un periodo di 5 min	Bilancio simpato-vagale nel lungo periodo
PNN50 (%)	Differenza percentuale tra due intervalli NN consecutivi superiori a 50 msec	Attività parasimpatica
RMSSD (ms)	Radice quadrata della media delle differenze successive di NN	Attività parasimpatica

Tabella 1. Classificazione delle dimensioni delle varici esofagee

Tipologia varici	Descrizione
F1	Varici piccole con andamento rettilineo
F2	Varici larghe, tortuose che occupano meno di un terzo del lume dell'esofago
F3	Varici voluminose a forma di spirale che occupano più di un terzo del lume dell'esofago

Tabella 2. Probabilità di rischio di sanguinamento delle varici esofagee a un anno

Segni rossi	Child A			Child B			Child C		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
-	6	10	15	10	16	26	20	30	42
+	8	12	19	15	23	33	28	38	54
++	12	16	24	20	30	42	36	48	64
+++	16	23	34	28	40	52	44	60	76

De Franchis R, N England J med 1988; 319:938

Tabella B. Manifestazioni cliniche e valori di HVPG

Pazienti con cirrosi compensata	
HVPG 10 mmHg	Sviluppo di varici esofagee, rischio aumentato di HCC, scompenso dopo chirurgia per HCC
HVPG 12 mmHg	Sanguinamento delle varici
HVPG 16 mmHg	Primi segni di scompenso in pazienti con varici. Incremento della mortalità
Pazienti con cirrosi scompensata	
HVPG 16 mmHg	Sanguinamento delle varici esofagee. Incremento della mortalità
HVPG 20 mmHg	Difficoltà nel controllare il sanguinamento acuto delle varici. Aspettativa di vita inferiore ad un anno
HVPG 22 mmHg	Mortalità molto elevata in pazienti con cirrosi alcolica ed epatite alcolica acuta
HVPG 30 mmHg	Elevato rischio di peritonite batterica spontanea

Tabella 3- Principali variabili anamnestiche, cliniche, ecografiche ed endoscopiche

Caratteristiche	N	%
Sesso:		
M	64	59,8
F	43	40,2
Eziologia cirrosi:		
HCV	76	71
HBV	6	5,6
Post NASH	17	15,9
Criptogenetica	2	1,9
Altre (autoimmune, biliariare)	6	5,6
Eradicazione virale	46	56,6
Diabete	29	27,1
Ipertensione	43	40,2
Classe Child-Pugh:		
A	71	66,4
B	27	25,2
C	8	7,5
MELD Score		
6-10	74	69,1
11-16	24	24,2
17-20	3	3,7
>20	1	0,9
Ascite	42	39,3
PBS	5	4,6
Trombosi portale	11	10,3
EPS	9	8,4
HCC	24	22,4
Varici	90	84,1
Dimensioni varici:		
Assenza	17	15,9
F1	41	38,3
F2/F3	49	45,8
Red Weal Mark	10	13,5
Recente sanguinamento	18	16,8
Splenomegalia	76	71

Tabella 4. Analisi di regressione univariata per IL-6, OPN, IL-22, IL-1Ra e IL-17 con variabili cliniche e score di severità

Variabili		IL-6	OPN	IL-1 Ra	IL-22	IL-17
Eziologia cirrosi*	B	12,054	,311	150,146	1,992	,390
	p	,001	,500	,035	,239	,221
Eradicazione HCV	B	-20,178	-2,971	-154,181	-6,922	-1,406
	p	,024	,006	,368	,086	,063
Classe Child Pugh	B	37,873	3,521	274,893	13,471	-,026
	p	,0001	,0001	,031	,0001	,966
Child Pugh score	B	11,621	1,323	82,236	4,521	-,044
	p	,0001	,0001	,057	,0001	,830
MELD score	B	6,359	,387	66,295	2,461	-,021
	p	,0001	,008	,002	,0001	,837
APRI score	B	10,544	,608	156,740	6,175	,137
	p	,0001	,053	,001	,0001	,531

*la forma criptogenetica ha presentato livelli superiori di IL-6 e IL-1Ra rispetto alle forme virali

Tabella 5. Analisi di regressione univariata per IL-6, OPN, IL-22, IL-1Ra e IL-17 con variabili relative ad ipertensione portale e sue complicanze.

Variabili		IL-6	OPN	IL-1 Ra	IL-22	IL-17
Presenza ascite	B	40,496	4,876	205,681	15,980	,709
	p	,0001	,0001	,236	,0001	,359
Quantità di ascite	B	22,053	2,951	124,505	7,054	,020
	p	,0001	,0001	,113	,0001	,958
EPS	B	79,090	4,693	793,091	28,861	1,394
	p	,0001	,016	,008	,0001	,305
Trombosi portale	B	16,677	4,343	-170,893	,698	,009
	p	,256	,014	,541	,916	,994
HCC	B	6,594	4,174	-24,717	4,806	,105
	p	,538	,001	,903	,317	,908
Dimensioni varici	B	6,689	,953	-15,184	2,066	-,065
	p	,153	,095	,865	,327	,871
Diametro vena porta	B	1,411	,449	,500	-,003	-,222
	p	,406	,029	,988	,997	,120

Tabella 6. Analisi di regressione univariata per IL-6, OPN, IL-22, IL-1Ra e IL-17 con variabili relative ad esami ematochimici e farmaci

Variabili		IL-6	OPN	IL-1 Ra	IL-22	IL-17
Furosemide	B	23,715	3,293	169,931	11,435	-,240
	p	,010	,003	,340	,006	,763
Canreonato di K	B	24,625	1,438	-113,076	10,276	-,019
	p	,012	,236	,550	,020	,982
Betabloccante	B	5,670	,187	-11,357	-,143	,223
	p	,568	,878	,952	,974	,791
Emoglobina	B	-4,251	-,635	-32,282	-2,345	-,078
	p	,013	,002	,325	,002	,594

sodio	B	-3,961	-,426	-34,234	-1,617	-,060
	p	,001	,002	,122	,002	,546
albumina	B	-28,688	-4,147	-203,985	-12,703	-,476
	p	,0001	,0001	,113	,0001	,408
INR	B	103,272	7,243	1196,936	37,075	-1,342
	p	,0001	,011	,006	,0001	,500
Bilirubina totale	B	6,661	1,099	69,547	4,925	-,114
	p	,002	,0001	,094	,0001	,541
AST	B	,248	,053	2,538	,182	,011
	p	,045	,0001	,282	,001	,281
GGT	B	,044	,018	,326	,076	-,004
	p	,493	,021	,789	,007	,436
FA	B	,072	,034	-,838	,125	,003
	p	,371	,0001	,584	,0001	,654
Creatinina	B	9,616	,974	143,867	2,639	,367
	p	,022	,060	,074	,167	,308
Filtrato glomerulare	B	-,398	-,077	-1,015	-,222	-,009
	p	,006	,0001	,718	,001	,495

Tabella 7. Analisi di regressione univariata per IL-6, OPN, IL-22, IL-1Ra e IL-17 con variabili relative alla variabilità della frequenza cardiaca espressa tramite analisi del dominio del tempo

Variabili		IL-6	OPN	IL-1 Ra	IL-22	IL-17
FC 24h	B	1,309	,080	24,872	,417	,042
	p	,001	,109	,001	,023	,222
FC giorno	B	1,030	,062	19,997	,335	,030
	p	,008	,193	,006	,056	,360
Fc notte	B	1,275	,077	23,437	,398	,041
	p	,001	,092	,001	,018	,196

RMSSD 24 h	B	,0001	,020	-1,423	-,013	,003
	p	,996	,031	,328	,698	,605
SDANN 5 min 24h	B	-,531	-,042	-6,435	-,225	-,005
	p	,0001	,014	,016	,0001	,694
SD 24 h	B	-,364	-,005	-4,795	-,153	,001
	p	,002	,743	,030	,003	,915

Tabella. 8 ANALISI DI REGRESSIONE MULTIPLA PER IL 6 INSERENDO TUTTE LE VARIABILI SIGNIFICATIVE ALLA UNIVARIATA

Coefficients ^a								
Modello		Coefficients non standardizzati		Coefficients standardizzati	t	Sign.	95,0% Intervallo di confidenza per B	
		B	Errore std.	Beta			Limite inferiore	Limite superiore
1	(Costante)	-43,158	64,666		-,667	,506	-171,898	85,582
	EZIOLOGIA CIRROSI	-1,655	3,637	-,043	-,455	,650	-8,896	5,586
	TERAPIA ANTIVIRALE	-30,892	11,710	-,331	-2,638	,010	-54,205	-7,579
	ERADICAZIONE HCVHBV	14,803	9,993	,159	1,481	,143	-5,092	34,698
	CHILD PUGH CLASS	40,815	16,130	,556	2,530	,013	8,703	72,927
	CHILD PUGH SCORE	-17,149	6,158	-,689	-2,785	,007	-29,408	-4,889
	MELD SCORE	,604	1,512	,049	,399	,691	-2,406	3,614
	ASCITE (ECO)	-17,788	13,961	-,189	-1,274	,206	-45,581	10,006
	ASCITE QUANTITÀ	24,206	7,395	,540	3,273	,002	9,484	38,929
	ENCEFALOPATIA	65,544	15,311	,398	4,281	,000	35,062	96,027
	GRADO GASTROPATIA PORTALE	1,847	2,972	,049	,621	,536	-4,071	7,764
	FUROSEMIDE	-8,884	9,883	-,092	-,899	,371	-28,560	10,793
	CANRENONE	-2,448	10,450	-,024	-,234	,815	-23,252	18,357
	PPI	3,023	8,163	,031	,370	,712	-13,228	19,275
	EMOGLOBINA	3,026	1,626	,170	1,862	,066	-,210	6,263
	ALBUMINA	-8,829	7,715	-,127	-1,144	,256	-24,189	6,532

INR	88,572	23,669	,368	3,742	,000	41,451	135,693
BILIRUBINA TOT	-4,715	2,656	-,210	-1,775	,080	-10,004	,573
AST	-,105	,132	-,082	-,794	,429	-,368	,158
CREATININA	4,735	3,899	,109	1,214	,228	-3,027	12,497
FILTRATO	,030	,139	,019	,214	,831	-,247	,307
FC 24h	6,941	3,079	1,608	2,254	,027	,810	13,071
FC giorno	-2,747	1,773	-,670	-1,550	,125	-6,277	,782
FC Notte	-3,329	1,469	-,840	-2,266	,026	-6,255	-,404
SDANN 5 min 24h	,097	,187	,066	,519	,605	-,275	,469
SD 24 h	-,333	,138	-,277	-2,417	,018	-,608	-,059
APRI	3,795	2,752	,143	1,379	,172	-1,684	9,274

a. Variabile dipendente: IL6

Tabella. 9 Analisi regressione multipla per opn inserendo le variabili significative alla univariata

Modello		Coefficienti ^a						
		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati	t	Sign.	95,0% Intervallo di confidenza per B	
		B	Errore std.	Beta			Limite inferiore	Limite superiore
1	(Costante)	26,089	22,240		1,173	,244	-18,216	70,394
	TERAPIA ANTIVIRALE	-,363	1,355	-,032	-,268	,789	-3,062	2,336
	ERADICAZIONE HCVHBV	-,532	1,316	-,047	-,404	,687	-3,154	2,090
	CHILD PUGH CLASS	-2,703	2,023	-,303	-1,336	,185	-6,733	1,327
	CHILD PUGH SCORE	,769	,795	,253	,967	,337	-,815	2,352
	MELD SCORE	-,441	,190	-,294	-2,324	,023	-,819	-,063
	ASCITE (ECO)	-2,357	1,964	-,206	-1,200	,234	-6,269	1,555
	ASCITE QUANTITÀ	1,708	1,002	,313	1,704	,093	-,289	3,704
	TROMBOSI PORTALE	2,439	1,583	,133	1,541	,128	-,714	5,591
	ENCEFALOPATIA	-1,554	1,887	-,078	-,824	,413	-5,314	2,205
	HCC	,424	1,123	,032	,378	,707	-1,813	2,662
	dimensioni PERC	-,025	,056	-,121	-,452	,653	-,137	,086

occupazione lume	,058	,058	,260	,997	,322	-,058	,174
diametro vena porta (mm)	,409	,174	,193	2,347	,022	,062	,756
FUROSEMIDE	,080	1,046	,007	,076	,939	-2,003	2,163
PPI	-,439	1,032	-,037	-,426	,672	-2,495	1,616
EMOGLOBINA	-,272	,229	-,126	-1,189	,238	-,728	,184
globuli bianchi	,000	,000	,223	2,048	,044	,000	,001
sodio	-,212	,146	-,144	-1,447	,152	-,503	,080
ALBUMINA	-,327	1,019	-,039	-,321	,749	-2,358	1,704
INR	4,111	3,076	,140	1,336	,185	-2,017	10,239
BILIRUBINA TOT	,533	,330	,194	1,615	,110	-,124	1,189
AST	-,005	,023	-,032	-,218	,828	-,050	,040
GGT	,003	,006	,034	,428	,670	-,010	,015
FA	-,003	,011	-,029	-,269	,789	-,025	,019
FILTRATO	-,056	,017	-,301	-3,354	,001	-,089	-,023
RMSSD 24 h	,022	,008	,228	2,602	,011	,005	,039
SDANN 5 min 24h	,001	,015	,007	,085	,933	-,028	,031
APRI	,938	,504	,290	1,863	,066	-,065	1,942

a. Variabile dipendente: OPN

Tabella.10 ANALISI DELLA REGRESSIONE MULTIPLA PER IL 1RA INSERENDO LE VARIABILI SIGNIFICATIVE ALLA UNIVARIATA

Coefficienti ^a								
Modello		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati	t	Sign.	95,0% Intervallo di confidenza per B	
		B	Errore std.	Beta			Limite inferiore	Limite superiore
1	(Costante)	46,137	1125,286		,041	,967	-2188,778	2281,052
	EZIOLOGIA CIRROSI	62,067	66,576	,090	,932	,354	-70,158	194,293
	CHILD PUGH CLASS	489,589	372,013	,373	1,316	,191	-249,262	1228,439
	CHILD PUGH SCORE	-245,439	137,874	-,551	-1,780	,078	-519,268	28,391
	MELD SCORE	28,879	33,636	,131	,859	,393	-37,926	95,684

ENCEFALOPATIA	702,888	336,688	,239	2,088	,040	34,196	1371,580
INR	452,728	505,512	,105	,896	,373	-551,262	1456,717
FC 24h	41,197	69,819	,534	,590	,557	-97,469	179,863
FC giorno	-22,625	39,398	-,308	-,574	,567	-100,874	55,623
FC Notte	-3,523	33,217	-,050	-,106	,916	-69,495	62,448
SDANN 5 min 24h	,054	4,360	,002	,012	,990	-8,605	8,714
SD 24 h	-,709	3,095	-,033	-,229	,819	-6,855	5,438
APRI	93,725	48,509	,197	1,932	,056	-2,619	190,069

a. Variabile dipendente: IL1RA

Tabella. 11 ANALISI DELLA REGRESSIONE MULTIPLA PER IL 22 INSERENDO LE VARIABILI SIGNIFICATIVE ALLA UNIVARIATA

Coefficienti ^a								
Modello		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati	t	Sign.	95,0% Intervallo di confidenza per B	
		B	Errore std.	Beta			Limite inferiore	Limite superiore
1	(Costante)	2076,725	4709,022		,441	,660	-7298,218	11451,669
	diabete	-30,520	200,563	-,017	-,152	,879	-429,810	368,770
	CHILD PUGH CLASS	453,106	399,682	,345	1,134	,260	-342,600	1248,812
	CHILD PUGH SCORE	-254,214	154,895	-,571	-1,641	,105	-562,587	54,159
	MELD SCORE	17,896	40,706	,081	,440	,661	-63,144	98,936
	ASCITE (ECO)	82,429	365,877	,049	,225	,822	-645,976	810,834
	ASCITE QUANTITÀ	57,122	189,608	,071	,301	,764	-320,359	434,603
	ENCEFALOPATIA	754,773	360,649	,257	2,093	,040	36,775	1472,771
	FUROSEMIDE	542,620	246,326	,315	2,203	,031	52,223	1033,017
	CANRENONE	-603,983	258,379	-,331	-2,338	,022	1118,377	-89,589
	EMOGLOBINA	-8,172	42,392	-,026	-,193	,848	-92,567	76,223
	globuli bianchi	,028	,038	,088	,741	,461	-,047	,103
	sodio	-16,086	28,654	-,075	-,561	,576	-73,132	40,960
	ALBUMINA	139,585	193,783	,112	,720	,473	-246,207	525,377
	INR	600,108	612,736	,140	,979	,330	-619,755	1819,972
	BILIRUBINA TOT	45,971	69,809	,114	,659	,512	-93,009	184,951

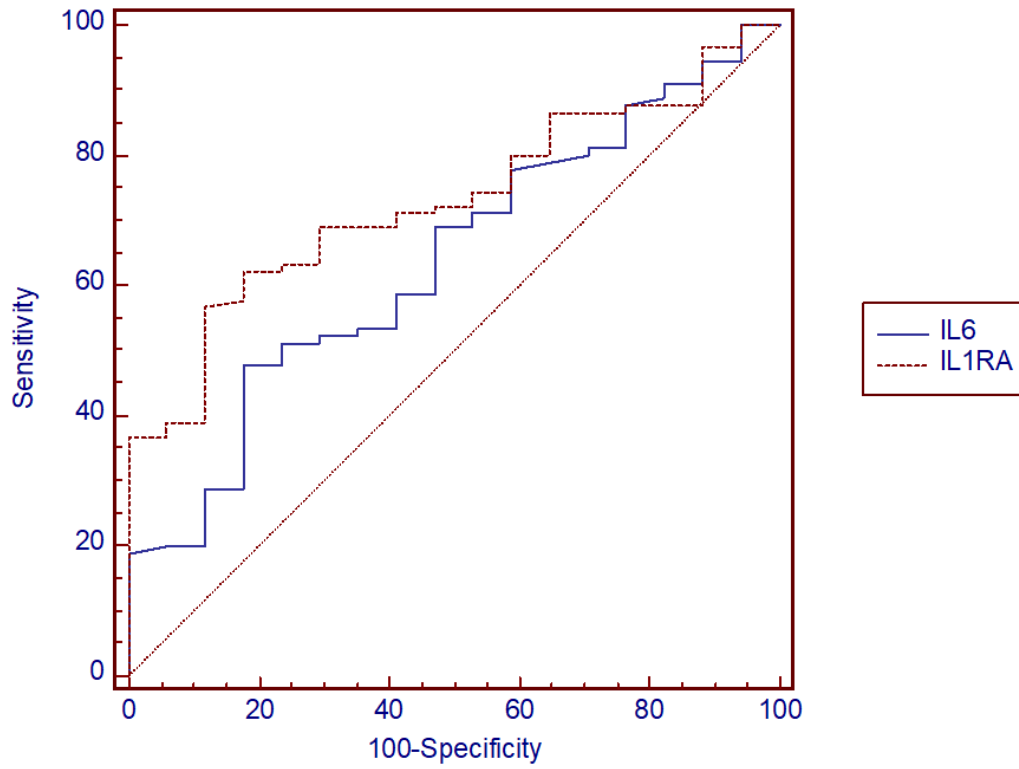
AST	-1,848	4,694	-,081	-,394	,695	-11,193	7,496
ALT	-,672	4,015	-,028	-,167	,867	-8,666	7,321
GGT	,865	1,280	,074	,676	,501	-1,682	3,413
FA	-4,366	2,103	-,296	-2,076	,041	-8,552	-,179
FILTRATO	-,444	3,305	-,016	-,134	,893	-7,024	6,135
FC 24h	52,627	76,439	,682	,688	,493	-99,551	204,806
FC giorno	-31,899	42,845	-,435	-,745	,459	-117,196	53,398
FC Notte	-6,493	36,431	-,092	-,178	,859	-79,021	66,034
SDANN 5 min 24h	-1,296	4,922	-,049	-,263	,793	-11,096	8,504
SD 24 h	,486	3,641	,023	,134	,894	-6,763	7,735
APRI	147,037	68,990	,310	2,131	,036	9,689	284,384
a. Variabile dipendente: IL1RA							

Tabella 12. Differenza di concentrazioni citochiniche tra pazienti cirrotici e controlli sani

Variabili	Cirrotici <i>n= 106</i>	controlli <i>n= 50</i>	<i>P</i>
IL-6	17326,166	1450,643	,001
OPN	744,601	21,963	,0001
IL1-Ra	218711,827	568558,366	,536
IL-22	2133,538	356,198	,016
IL-17	447,734	10,765	,000

I valori rappresentano le medie quadratiche

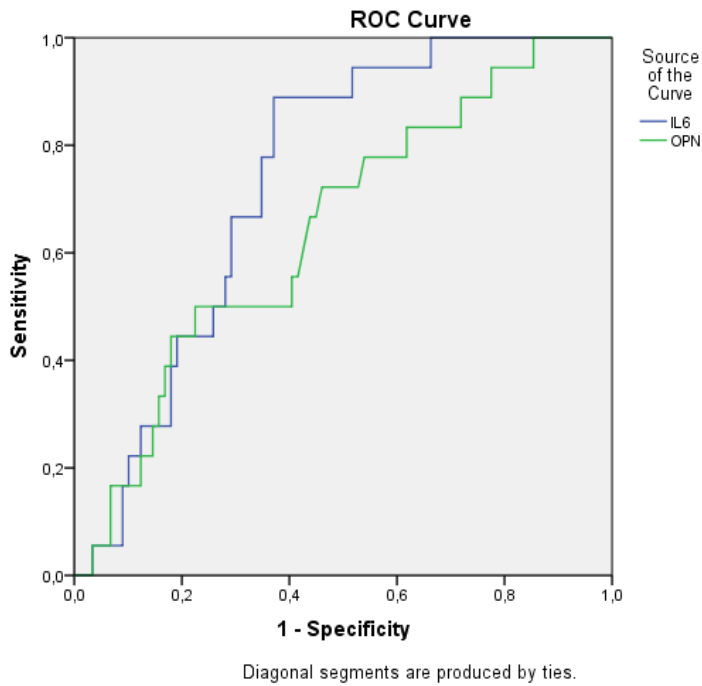
Grafico. 1 Curva ROC di IL-6 e IL1Ra per assenza di varici esofagee



AUC IL-6: 0,638 (0,539-0,729)

AUC IL-1Ra: 0,729 (0,635-0,810)

Grafico. 2- Curva ROCA di IL-6 e OPN per recente sanguinamento varici



AUC IL-6: 0,737 (0,637-0,837)

AUC OPN: 0,695 (0,512-0,779)

Tabella 13. Variabili citochiniche e classe di Child-Pugh

Variabili	Child-Pugh A <i>n</i> = 71	Child-Pugh B <i>n</i> = 27	Child-Pugh C <i>n</i> = 8	<i>P</i>
IL-6	9,38±11,26 [◦]	49,37±51,62 [*]	82,46±110,30	<0.0005
OPN	4,63± 3,82 [◦]	8,86±7,24 [*]	10,79±7,52	<0.0005
IL-1Ra	637,7±724,17	814,55±789,73	1310,87±1453,45	0.068
IL-22	14,19±14,09 [◦]	23,99±18,88 [*]	45,75±44,49	<0.0005
IL-17	3,77±3,85 [◦]	4,66±4,33 [*]	2,57±1,92	<0.0005

I valori rappresentano le medie ± DS. ^{*}*P*<0,0005 Child-Pugh B comparato con Child-Pugh C; [◦]*P*<0,0005 Child-Pugh A comparato con Child-Pugh C

Tabella 14. Variabili citochiniche e dimensioni varici esofagee

Variabili	Assenza Varici <i>n</i> = 17	Varici F1 <i>n</i> = 41	Varici F2-F3 <i>n</i> = 49	<i>P</i>
IL-6	10,58±12,12	27,37±63,19	27,88±34,48	0.375
OPN	5,86±5,72	4,90±4,77	7,45±6,04	0.094
IL-1Ra	1102,11±1154,22	624,56±734,39	760,10±854,85	0.166
IL-22	16,65±21,95	17,63±21,44	21,02±19,68	0.650
IL-17	4,09±3,98	3,84±4,02	3,87±3,80	0.969

I valori rappresentano le medie ± DS.

Tabella 15. Concentrazioni citochiniche nel confronto tra pazienti ascitici e non ascitici

Variabile	Assenza di Ascite (<i>n</i> =65)	Presenza di Ascite (<i>n</i> =41)	<i>P</i>
IL-6	9,04±11,50	49,54±64,96	<0.0005
OPN	4,31±3,06	9,18±7,21	<0.0005
IL-1Ra	681,77±837,47	887,45±920,51	0.236
IL-22	12,76±8,39	28,74±28,82	<0.0005
IL-17	3,59±3,66	4,30±4,20	0.359

I valori rappresentano le medie ± DS

BIBLIOGRAFIA

1. European Association for the Study of Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57:399.
2. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, et al. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol* 1978; 31:395.
3. ISTAT. L'evoluzione della mortalità per causa: le prime 25 cause di morte. www.istat.it. 2017
4. Melato M, Mucli E. Something new in liver cirrhosis epi- demiology. *Lancet* 1989; 2: 395-396
5. Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Kim WR. Underestimation of liver-related mortality in the United States. *Gastroenterology* 2013; 145: 375-82.e1-2.
6. Qua CS, Goh KL. Liver cirrhosis in Malaysia: peculiar epi- demiology in a multiracial Asian country. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 1333-1337.
7. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* 2015; 148:547.
8. WC Zhou, QB Zhang, L Qiao Pathogenesis of cirrhosis World J Gastroenterol. 2014 Jun 21; 20(23): 7312-7324.
9. van Thiel DH, Gavalier JS, Spero JA, et al. Patterns of hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction in men with liver disease due to differing etiologies. *Hepatology* 1981; 1:39.

10. Ge PS, Runyon BA. The changing role of beta-blocker therapy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2014; 60:643.
11. SHERLOCK S, SHALDON S. The aetiology and management of ascites in patients with hepatic cirrhosis: a review. *Gut* 1963; 4:95.
12. Lieberman FL, Denison EK, Reynolds TB. The relationship of plasma volume, portal hypertension, ascites, and renal sodium retention in cirrhosis: The overflow theory of ascites formation. *Ann N Y Acad Sci* 1970; 170:292.
13. Runyon, BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*, Feldman, M, Friedman, LS, Brandt, LJ (Eds), WB Saunders, Philadelphia 2016. p.1553.
14. Solà E, Ginès P. Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis: current management and future perspectives. *J Hepatol* 2010; 53:1135.
15. Soper NJ, Rikkers LF. Effect of operations for variceal hemorrhage on hypersplenism. *Am J Surg* 1982; 144:700.
16. Erlinger S, Benhamou J. Cirrhosis: Clinical aspects. In: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, Mcintyre N, Benhamou J, Rizzetto M, et al (Eds), University Press, Oxford 1991. p.380
17. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:44.
18. Williams AL, Hoofnagle JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95:734.
19. Pratt D, Kaplan M. Evaluation of the Liver A: Laboratory Tests. In: *Schiff's Diseases of the Liver*, Eighth Edition, Schiff E, Sorrell M, Maddrey W (Eds), Lippincott Williams & Wilkens, Philadelphia 1999. p.205.
20. Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 12:1.

21. Barouki R, Chobert MN, Finidori J, et al. Ethanol effects in a rat hepatoma cell line: induction of gamma-glutamyltransferase. *Hepatology* 1983; 3:323.
22. Krzeski P, Zych W, Kraszewska E, et al. Is serum bilirubin concentration the only valid prognostic marker in primary biliary cirrhosis? *Hepatology* 1999; 30:865.
23. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology* 1988; 8:385.
24. Rothschild MA, Oratz M, Zimmon D, et al. Albumin synthesis in cirrhotic subjects with ascites studied with carbonate-14C. *J Clin Invest* 1969; 48:344.
25. Northup PG, Caldwell SH. Coagulation in liver disease: a guide for the clinician. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1064.
26. Robert A, Chazouillères O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio? *Hepatology* 1996; 24:1392.
27. Qamar AA, Grace ND, Groszmann RJ, et al. Incidence, prevalence, and clinical significance of abnormal hematologic indices in compensated cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7:689.
28. Ginès P, Guevara M. Hyponatremia in cirrhosis: pathogenesis, clinical significance, and management. *Hepatology* 2008; 48:1002.
29. KOWALSKI HJ, ABELMANN WH. The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis. *J Clin Invest* 1953; 32:1025.
30. Abelman WH. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a historical perspective. *Hepatology* 1994; 20:1356.
31. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994; 20:1359.

32. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, et al. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8:1151.
33. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337:776.
34. Guarner C, Soriano G, Tomas A, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18:1139.
35. Wong F, Massie D, Colman J, Dudley F. Glomerular hyperfiltration in patients with well-compensated alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 104:884.
36. Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J, et al. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology* 1989; 97:1304
37. Asbert M, Ginès A, Ginès P, et al. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 104:1485.
38. Henriksen JH, Bendtsen F, Gerbes AL, et al. Estimated central blood volume in cirrhosis: relationship to sympathetic nervous activity, beta-adrenergic blockade and atrial natriuretic factor. *Hepatology* 1992; 16:1163.
39. Arroyo V, Bosch J, Gaya-Beltrán J, et al. Plasma renin activity and urinary sodium excretion as prognostic indicators in nonazotemic cirrhosis with ascites. *Ann Intern Med* 1981; 94:198.
40. Arroyo V, Clària J, Saló J, Jiménez W. Antidiuretic hormone and the pathogenesis of water retention in cirrhosis with ascites. *Semin Liver Dis* 1994; 14:44.
41. Angeli P, Wong F, Watson H, et al. Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey. *Hepatology* 2006; 44:1535.
42. Runyon BA. Ascites returns to the spotlight. *Clinical Care Options for Hepatitis*. <http://www.clinicaloptions.com/Hepatitis.aspx> (Accessed on August 26, 2014).

43. Heuman DM, Abou-Assi SG, Habib A, et al. Persistent ascites and low serum sodium identify patients with cirrhosis and low MELD scores who are at high risk for early death. *Hepatology* 2004; 40:802.
44. Biggins SW, Rodriguez HJ, Bacchetti P, et al. Serum sodium predicts mortality in patients listed for liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41:32.
45. Bernardi M, Domenicali M. The renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis. In: Schrier RW, Arroyo V, Rode's J, Gine's P, eds. *The Liver and the Kidney*. Malden, MA: Blackwell Sci Pub, 2005; 43-53.
46. Arroyo V, Colmenero J. Ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathophysiological basis of therapy and current management. *J Hepatol* 2003; 38: S69-89.
47. Salerno F, Guevara M, Bernardi M et al. Refractory ascites: pathogenesis, definition and therapy of a severe complication in patients with cirrhosis. *Liver International*. 2010; 1478-3223.
48. Bernardi M, Rubboli A, Trevisani F, et al. Reduced cardiovascular responsiveness to exercise-induced sympatho-adrenergic stimulation in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1991; 12: 207-16.
49. Udell JA, Wang CS, Tinmouth J, et al. Does this patient with liver disease have cirrhosis? *JAMA* 2012; 307:832.
50. Di Lelio A, Cestari C, Lomazzi A, Beretta L. Cirrhosis: diagnosis with sonographic study of the liver surface. *Radiology* 1989; 172:389.
51. Sanford NL, Walsh P, Matis C, et al. Is ultrasonography useful in the assessment of diffuse parenchymal liver disease? *Gastroenterology* 1985; 89:186.
52. Simonovský V. The diagnosis of cirrhosis by high resolution ultrasound of the liver surface. *Br J Radiol* 1999; 72:29.

53. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13:440.
54. Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ, et al. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:1207.
55. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344:495.
56. Child III, CG, Turcotte, JG. Surgery and portal hypertension. In: *The Liver and Portal Hypertension*, Child III CG (Ed), Saunders, Philadelphia 1964. p.50.
57. Pugh R.N.H., Murray-Lyon I.M., Dawson J.L. et al. *British J Of Surgery*, Transection of the oesophagus for bleeding oesophagel varices 1973; 60-646.
58. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, et al. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31:864.
59. Freeman RB Jr, Wiesner RH, Harper A, et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002; 8:851.
60. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med* 2008; 359:1018.
61. Heuman DM, Abou-Assi SG, Habib A, et al. Persistent ascites and low serum sodium identify patients with cirrhosis and low MELD scores who are at high risk for early death. *Hepatology* 2004; 40:802.
62. Luca A, Angermayr B, Bertolini G, et al. An integrated MELD model including serum sodium and age improves the prediction of early mortality in patients with cirrhosis. *Liver Transpl* 2007; 13:1174.

63. Londoño MC, Cárdenas A, Guevara M, et al. MELD score and serum sodium in the prediction of survival of patients with cirrhosis awaiting liver transplantation. *Gut* 2007; 56:1283.
64. Biggins SW, Kim WR, Terrault NA, et al. Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. *Gastroenterology* 2006; 130:1652.
65. Ruf AE, Kremers WK, Chavez LL, et al. Addition of serum sodium into the MELD score predicts waiting list mortality better than MELD alone. *Liver Transpl* 2005; 11:336.
66. Guy J, Somsouk M, Shiboski S, et al. New model for end stage liver disease improves prognostic capability after transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7:1236.
67. Biselli M, Gitto S, Gramenzi A, et al. Six score systems to evaluate candidates with advanced cirrhosis for orthotopic liver transplant: Which is the winner? *Liver Transpl* 2010; 16:964.
68. Broadwater JR, Henderson MA, Bell JL, et al. Outpatient percutaneous central venous access in cancer patients. *Am J Surg* 1990; 160:676.
69. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28:926.
70. Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985; 1:325.
71. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353:2254.
72. Groszmann RJ, Bosch J, Grace ND, et al. Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1990;99:1401-1407.

73. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al.; Portal Hypertension Collaborative Group. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:481-488.
74. Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, et al.; Portal Hypertension Collaborative Group. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2009;50:923-928.
75. García-Pagán JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol* 2012; 57:458.
76. Moleda L, Trebicka J, Dietrich P, et al. Amelioration of portal hypertension and the hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhotic rats by neuropeptide Y via pronounced splanchnic vasoaction. *Gut*. 2011.
77. Heinemann A, Wachter CH, Fickert P, et al. Vasopressin reverses mesenteric hyperemia and vasoconstrictor hyporesponsiveness in anesthetized portal hypertensive rats. *Hepatology*. 1998; 28:646–54.
78. Song D, Liu H, Sharkey KA, et al. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rats is dependent on central c-fos gene expression. *Hepatology*. 2002; 35:159–66.
79. Coll M, Martell M, Raurell I, et al. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver Int*. 2010; 30:593–602.
80. Ezkurdia N, Coll M, Raurell I, et al. Blockage of the afferent sensitive pathway prevents sympathetic atrophy and hemodynamic alterations in rat portal hypertension. *Liver Int*. 2012; 32:1295–305.
81. Iwakiri Y. Pathophysiology of portal Hypertension. *Clin Liver Dis*. 204; 18(2):281-291.

82. Groszmann RJ, Wongcharatrawee S. The hepatic venous pressure gradient: anything worth doing should be done right. *Hepatology* 2004; 39:280.
83. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25:281.
84. Villanueva C, Aracil C, Colomo A, et al. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology* 2009; 137:119.
85. Sacerdoti D, Merkel C, Gatta A. Importance of the 1-month-effect of nadolol on portal pressure in predicting failure of prevention of rebleeding in cirrhosis. *J Hepatol* 1991; 12:124.
86. Ferayorni L, Polio J, Groszmann RJ. Drug therapy for portal hypertension: A five year review. In: *Portal Hypertension II: Proceedings of the second Baveno International workshop on definitions, methodology and therapeutic strategies*, de Franchis R (Ed), Blackwell Science, Oxford 1996. p.68.
87. Merkel C, Bolognesi M, Sacerdoti D, et al. The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 32:930.
88. Grace ND, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, et al. Portal hypertension and variceal bleeding: an AASLD single topic symposium. *Hepatology* 1998; 28:868.
89. Bureau C, Péron JM, Alric L, et al. "A La Carte" treatment of portal hypertension: Adapting medical therapy to hemodynamic response for the prevention of bleeding. *Hepatology* 2002; 36:1361.
90. Albillos A, Bañares R, González M, et al. Value of the hepatic venous pressure gradient to monitor drug therapy for portal hypertension: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1116.
91. Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A, Abraldes JG. Measurement of portal pressure

- and its role in the management of chronic liver disease. *Semin Liver Dis* 2006;26:348–362.
92. Sanyal AJ. Hepatic venous pressure gradient: to measure or not to measure, that is the question. *Hepatology* 2000; 32:1175.
93. Berzigotti A, Seijo S, Reverter E, Bosch J. Assessing portal hypertension in liver diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 7:141.
94. Berzigotti A, Piscaglia F, EFSUMB Education and Professional Standards Committee. Ultrasound in portal hypertension--part 2--and EFSUMB recommendations for the performance and reporting of ultrasound examinations in portal hypertension. *Ultraschall Med* 2012; 33:8.
95. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45:1290.
96. Lemoine M, Katsahian S, Ziol M, et al. Liver stiffness measurement as a predictive tool of clinically significant portal hypertension in patients with compensated hepatitis C virus or alcohol-related cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:1102.
97. Bureau C, Metivier S, Peron JM, et al. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27:1261.
98. Sánchez-Conde M, Miralles P, Bellón JM, et al. Use of transient elastography (FibroScan®) for the noninvasive assessment of portal hypertension in HIV/HCV-coinfected patients. *J Viral Hepat* 2011; 18:685.
99. Llop E, Berzigotti A, Reig M, et al. Assessment of portal hypertension by transient elastography in patients with compensated cirrhosis and potentially resectable liver tumors. *J Hepatol* 2012; 56:103

100. Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med* 2010; 362:823.
101. Smith JL, Graham DY. Variceal hemorrhage: a critical evaluation of survival analysis. *Gastroenterology* 1982; 82:968; de Dombal FT, Clarke JR, Clamp SE, et al. Prognostic factors in upper G.I. bleeding. *Endoscopy* 1986; 18 Suppl 2:6.
102. Graham DY, Smith JL. The course of patients after variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1981; 80:800.
103. North Italian Endoscopic Club for the Study and Treatment of Esophageal Varices. Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. A prospective multicenter study. *N Engl J Med* 1988;319:983-989.
104. Rigau J, Bosch J, Bordas JM, Navasa M, Mastai R, Kravetz D, et al. Endoscopic measurement of variceal pressure in cirrhosis: correlation with portal pressure and variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1989; 96:873-880.
105. Abraldes JG, Villanueva C, Bañares R, Aracil C, Catalina MV, Garcia A-Pagán JC, et al.; Spanish Cooperative Group for Portal Hypertension and Variceal Bleeding. Hepatic venous pressure gradient and prognosis in patients with acute variceal bleeding treated with pharmacologic and endoscopic therapy. *J Hepatol* 2008;48:229-236.
106. Sarin SK, Lahoti D, Saxena SP, et al. Prevalence, classification and natural history of gastric varices: a long-term follow-up study in 568 portal hypertension patients. *Hepatology* 1992; 16:1343.
107. Beppu K, Inokuchi K, Koyanagi N, et al. Prediction of variceal hemorrhage by esophageal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1981; 27:213.
108. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology* 2017; 65:310

109. de Franchis R, Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015; 63:743;
110. D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Semin Liver Dis* 1999;19:475-505.
111. Bosch J. Carvedilol for portal hypertension in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2010; 2214-2218.
112. Feu F, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Luca A, Tere's J, Escorsell A, et al. Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis. *Lancet* 1995;346:1056-1059.
113. D'Amico G, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 2006;131:1611-1624.
114. La Mura V, Abraldes JG, Raffa S, Retto O, Berzigotti A, García-Pagán JC, et al. Prognostic value of acute hemodynamic response to i.v. propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2009;51:279-287.
115. Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Hernandez-Gea V, Lopez-Balaguer JM, Alvarez-Urturi C, et al. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology* 2009;137:119-128.
116. Garcia-Tsao G, Bosch J, Groszmann RJ. Portal hypertension and variceal bleeding-unresolved issues. Summary of an American Association for the study of liver diseases and European Association for the study of the liver single-topic conference. *HEPATOLOGY* 2008;47:1764-1772.
117. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W; Practice Guidelines Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters

- Committee of the American College of Gastroenterology. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2007;46:922-938.
118. Gluud LL, Klingenberg S, Nikolova D, Gluud C. Banding ligation versus beta-blockers as primary prophylaxis in esophageal varices: systematic review of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2007;102: 2842-2848. 16.
119. Garcia-Pagan JC, Bosch J. Endoscopic band ligation in the treatment of portal hypertension. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2: 526-535.
120. Sanyal AJ, Shiffman ML. The pharmacologic treatment of portal hypertension. *Annu Rev Gastrointest Pharmacol* 1996; :242.
121. Pascal JP, Cales P. Propranolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. *N Engl J Med* 1987; 317:856.
122. The Italian Multicenter Project for Propranolol in Prevention of Bleeding. Propranolol prevents first gastrointestinal bleeding in non-ascitic cirrhotic patients. Final report of a multicenter randomized trial. *J Hepatol* 1989; 9:75
123. The PROVA Study Group Prophylaxis of first hemorrhage from esophageal varices by sclerotherapy, propranolol or both in cirrhotic patients: a randomized multicenter trial. *Hepatology* 1991; 14:1016.
124. Andreani T, Poupon RE, Balkau BJ, et al. Preventive therapy of first gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: results of a controlled trial comparing propranolol, endoscopic sclerotherapy and placebo. *Hepatology* 1990; 12:1413.
125. Idéo G, Bellati G, Fesce E, Grimoldi D. Nadolol can prevent the first gastrointestinal bleeding in cirrhotics: a prospective, randomized study. *Hepatology* 1988; 8:6.
126. Lebrech D, Poynard T, Capron JP, et al. Nadolol for prophylaxis of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis. A randomized trial. *J Hepatol* 1988; 7:118.

127. Merkel C, Marin R, Angeli P, et al. A placebo-controlled clinical trial of nadolol in the prophylaxis of growth of small esophageal varices in cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 127:476.
128. de-Madaria E, Palazón JM, Hernández FT, et al. Acute and chronic hemodynamic changes after propranolol in patients with cirrhosis under primary and secondary prophylaxis of variceal bleeding: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22:507.
129. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:573–582.
130. Lebrec D, Hillon P, Muñoz C, et al. The effect of propranolol on portal hypertension in patients with cirrhosis: a hemodynamic study. *Hepatology* 1982; 2:523.
131. Bendtsen F, Henriksen JH, Sørensen TI. Long-term effects of oral propranolol on splanchnic and systemic haemodynamics in patients with cirrhosis and oesophageal varices. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26:933.
132. Banares R, Moitinho E, Piqueras B, Casado M, Garcia-Pagan JC, De Diego A, et al. Carvedilol, a new nonselective beta-blocker with intrinsic anti-Alpha1-adrenergic activity, has a greater portal hypotensive effect than propranolol in patients with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 1999;30:79-83
133. Banares R, Moitinho E, Matilla A, Garcia-Pagan JC, Lampreave JL, Píera C, et al. Randomized comparison of long-term carvedilol and propranolol administration in the treatment of portal hypertension in cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2002;36:1367-1373.
134. Hemstreet BA. Evaluation of carvedilol for the treatment of portal hypertension. *Pharmacotherapy* 2004;24:94-104.
135. Tripathi D, Therapondos G, Lui HF, Stanley AJ, Hayes PC. Haemodynamic effects of acute and chronic administration of low-dose carvedilol, a vasodilating beta-blocker, in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Aliment Pharmacol*

Ther 2002;16:373-380.

136. Stanley AJ, Therapondos G, Helmy A, Hayes PC. Acute and chronic haemodynamic and renal effects of carvedilol in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1999;30:479-484.
137. Lin HC, Yang YY, Hou MC, Huang YT, Lee FY, Lee SD. Acute administration of carvedilol is more effective than propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the reduction of portal pressure in patients with viral cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004;99: 1953-1958.
138. Forrest EH, Bouchier IA, Hayes PC. Acute haemodynamic changes alter oral carvedilol, a vasodilating beta-blocker, in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1996;25:909-915.
139. De BK, Das D, Sen S, Biswas PK, Mandal SK, Majumdar D, et al. Acute and 7-day portal pressure response to carvedilol and propranolol in cirrhotics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:183-189.
140. Bruha R, Vitek L, Petrtyl J, Lenicek M, Urbanek P, Zelenka J, et al. Effect of carvedilol on portal hypertension depends on the degree of endothelial activation and inflammatory changes. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:1454-1463.
141. Tripathi D, Ferguson JW, Kochar N, Leithead JA, Therapondos G, McAvoy NC, et al. Randomized controlled trial of carvedilol versus variceal band ligation for the prevention of the first variceal bleed. *HEPATOLOGY* 2009;50:825-833.

142. Patch D, Sabin CA, Goulis J, Gerunda G, Greenslade L, Merkel C, et al. A randomized, controlled trial of medical therapy vs. endoscopic ligation for the prevention of variceal rebleeding in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2002;123:1013–1019.
143. Ruiz-del-Arbol L, Urman J, Fernandez J, Gonzalez M, Navasa M, Monescillo A, et al. Systemic, renal, and hepatic hemodynamic derangement in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2003;38:1210–1218.
144. Reiberger T, Mandorfer M. Beta adrenergic blockade and decompensated cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2017; 66: 849-859.
145. Krag A, Moller S, Burroughs AK, Bendtsen F. Betablockers induce cardiac chronotropic incompetence. *J Hepatol* 2012;56:298–299.
146. Krag A, Wiest R, Albillos A, Gluud LL. The window hypothesis: haemodynamic and non-haemodynamic effects of beta-blockers improve survival of patients with cirrhosis during a window in the disease. *Gut* 2012;61:967–969.
147. Serste T, Francoz C, Durand F, Rautou PE, Melot C, Valla D, et al. Beta-blockers cause paracentesis-induced circulatory dysfunction in patients with cirrhosis and refractory ascites: a cross-over study. *J Hepatol* 2011;55: 794–799.
148. Serste T, Njimi H, Degre D, et al. The use of beta-blockers is associated with the occurrence of acute kidney injury in severe alcoholic hepatitis. *Liver Int* 2015;35:1974–1982.
149. Kalambokis GN, Baltayiannis G, Christou L, Christodoulou D. Red signs and not severity of cirrhosis should determine non-selective beta-blocker treatment in Child-Pugh C cirrhosis with small varices: increased risk of hepatorenal syndrome and death beyond 6 months of propranolol use. *Gut* 2016;65:1228–1230.
150. Serste T, Gustot T, Rautou PE, Francoz C, Njimi H, Durand F, et al. Severe hyponatremia is a better predictor of mortality than MELDNa in patients with cirrhosis and refractory ascites. *J Hepatol* 2012;57:274–280.

151. Llach J, Gines P, Arroyo V, Rimola A, Tito L, Badalamenti S, et al. Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites. *Gastroenterology* 1988;94:482–487.
152. Krag A, Bendtsen F, Henriksen JH, Moller S. Low cardiac output predicts development of hepatorenal syndrome and survival in patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2010;59:105–110.
153. Serste' TS, Melot C, Francoz C, et al. Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *HEPATOLOGY* 2010;52:1017-1022.
154. Wong F, Salerno F. Beta-Blockers in Cirrhosis: Friend and Foe? *Hepatology* 2010.; 52: 811-813.
155. Wong F, Liu P, Lilly L, et al. Role of cardiac structural and functional abnormalities in the pathogenesis of hyperdynamic circulation and renal sodium retention in cirrhosis. *Clin Sci (Lond.)* 1999; 97: 259–67.
156. Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20:2555–2563.
157. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *J Hepatol* 2015;63:1272–1284.
158. Cesari M, Fasolato S, Rosi S, Angeli P. Cardiac dysfunction in patients with cirrhosis: is the systolic component its main feature? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:660–666.
159. R. Bataller, D.A. Brenner, Liver fibrosis, *J. Clin. Investig.* 115 (2) (2005) 209–218.]
160. Marra, Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation, *J. Hepatol.* 31

(6) (1999) 1120–1130

161. S.L. Friedman, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Gastroenterology* 134 (6) (2008) 1655–1669
162. YunCheng Hsieh, kuei-Chuan Lee, Ying-Ying Yang et al. Interleukin-1 receptor antagonist correlates with hepatic venous pressure gradient and predicts occurrence of overall complications and bacterial infections in patients with cirrhosis. *Hepatology Research* 2015; 45: 294-304.;
163. Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E *et al.* Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004; **40**: 624–31. ;
164. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA *et al.* Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013; **58**: 911–21.
165. Navasa M, Follo A, Filella X *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 1998; **27**: 1227–32.;
166. Bruha R; Jachymova M, Petrtyl J et al. Osteopontin: a non-invasive parameter of portal hypertension and prognostic marker of cirrhosis. ;
167. **Leung TM**, Wang X, Kitamura N, Fiel MI, Nieto N. Osteopontin delays resolution of liver fibrosis. *Lab Invest* 2013; **93**: 1082-1089;
168. L.A. Zenewicz, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, M. Karow, R.A. Flavell, Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation, *Immunity* 27 (4) (2007) 647– 659. ;
169. X. Ren, B. Hu, L.M. Colletti, IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 298 (1) (2010) G74 - G80
170. L. Dumoutier, J. Louahed, J.C. Renauld, Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9, *J. Immunol.* 164 (4) (2000) 1814–1819.

171. S. Rutz, C. Eidenschenk, W. Ouyang, IL-22, not simply a Th17 cytokine, *Immunol. Rev.* 252 (1) (2013) 116–132
172. K. Wolk, S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, R. Sabat, IL-22 increases the innate immunity of tissues, *Immunity* 21 (2) (2004) 241–254
173. Radaeva, R. Sun, H.n. Pan, F. Hong, B. Gao, Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation, *Hepatology* 39 (5) (2004) 1332–1342.;
174. S.H. Ki, O. Park, M. Zheng, O. Morales-Ibanez, J.K. Kolls, R. Bataller, B. Gao, Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3, *Hepatology* 52 (4) (2010) 1291–1300.
175. X. Kong, D. Feng, S. Mathews, B. Gao, Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 (Suppl. 1) (2013) 56–60.;
176. X. Kong, D. Feng, H. Wang, F. Hong, A. Bertola, F.S. Wang, B. Gao, Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice, *Hepatology* 56 (3) (2012) 1150–1159.
177. W.-W. Xing, M.-J. Zou, S. Liu, T. Xu, J. Gao, J.-X. Wang, D.-G. Xu, Hepatoprotective effects of IL-22 on fulminant hepatic failure induced by d-galactosamine and lipopolysaccharide in mice, *Cytokine* 56 (2) (2011) 174–179
178. H. Pan, F. Hong, S. Radaeva, B. Gao, Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3, *Cell. Mol. Immunol.* 1 (1) (2004) 43–49.
179. S. Brand, J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann, M.H. Heeg, T.S. Weiss, T. Prüfer, T. Olszak, C.J. Steib, M. Storr, IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (4) (2007) G1019–G1028.
180. L.-Y. Wu, S. Liu, Y. Liu, C. Guo, H. Li, W. Li, X. Jin, K. Zhang, P. Zhao, L. Wei, Up-regulation of interleukin-22 mediates liver fibrosis via activating hepatic stellate

- cells in patients with hepatitis C, *Clin. Immunol.* 158 (1) (2015) 77–87.
181. J. Zhao, Z. Zhang, Y. Luan, Z. Zou, Y. Sun, Y. Li, L. Jin, C. Zhou, J. Fu, B. Gao, Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment, *Hepatology* 59 (4) (2014) 1331–1342.
182. S. Rolla, E. Alchera, C. Imarisio, V. Bardina, G. Valente, P. Cappello, C. Mombello, A. Follenzi, F. Novelli, R. Carini, The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice, *Clin. Sci.* 130 (3) (2016) 193–203.
183. G.F. Sonnenberg, M.G. Nair, T.J. Kirn, C. Zaph, L.A. Fouser, D. Artis, Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A, *J. Exp. Med.* 207 (6) (2010) 1293–1305.
184. Wang J, Liu Y, Xie L, Li S, Qin X. Association of IL-17A and IL-17F gene polymorphisms with chronic hepatitis B and hepatitis B virus-related liver cirrhosis in a Chinese population: a case-control study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* (2016) 40:288–96. doi:10.1016/j.clinre.2015.10.004;
185. Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, Zheng ZM, Xu Y, Qin LY, et al. Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagn Pathol* (2013) 8:40. doi:10.1186/1746-1596-8-40
186. Seo W, Eun HS, Kim SY, Yi H-S, Lee Y-S, Park S-H, et al. Exosome-mediated activation of toll-like receptor 3 in stellate cells stimulates interleukin-17 production by $\gamma\delta$ T cells in liver fibrosis. *Hepatology* (2016) 64:616–31. doi:10.1002/hep.28644.
187. Peng X, Xiao Z, Zhang J, Li Y, Dong Y, Du J. IL-17A produced by both $\gamma\delta$ T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol* (2015) 235:79–89. doi:10.1002/path.4430
188. Lee H-C, Sung S-SJ, Krueger PD, Jo Y-A, Rosen HR, Ziegler SF, et al. Hepatitis C virus promotes t-helper (Th)17 responses through thymic stromal lymphopoietin production by infected hepatocytes. *Hepatology* (2013) 57:1314–24. doi:10.1002/hep.26128

189. Longhi MS, Liberal R, Holder B, Robson SC, Ma Y, Mieli-Vergani G, et al. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25⁻ cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* (2012) 142:1526–35.e6. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.041;
190. Kunzmann L, Schoknecht T, Stein S, Ehlken H, Hartl J, Pannicke N, et al. Increased in vivo and in vitro TH17 differentiation in patients with primary sclerosing cholangitis. *Z Gastroenterol* (2016) 54:1343–404. doi:10.1055/s-0036-1597393;
191. Zhao R-R, Yang X-F, Dong J, Zhao Y-Y, Wei X, Huang C-X, et al. Toll-like receptor 2 promotes T helper 17 cells response in hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8:7315–23.
192. Lu X, Xu Q, Bu X, Ma X, Zhang F, Deng Q, et al. Relationship between expression of toll-like receptors 2/4 in dendritic cells and chronic hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Pathol* (2014) 7:6048–55.
193. Shrivastava S, Mukherjee A, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J Virol* (2013) 87:12284–90. doi:10.1128/JVI.01962-13
194. Wang Q, Zhou J, Zhang B, Tian Z, Tang J, Zheng Y, et al. Hepatitis B virus induces IL-23 production in antigen presenting cells and causes liver damage via the IL-23/IL-17 axis. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003410. doi:10.1371/journal.ppat.1003410
195. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* (2007) 8:967–74. doi:10.1038/ni1488
- 196.107. Benwell RK, Lee DR. Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells. *Clin Immunol* (2010) 134:178–87. doi:10.1016/j.clim.2009.09.013
197. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* (2007) 448:484–7. doi:10.1038/nature05970
198. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* (2012) 143:765–76. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.049

199. Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Bérubé J, Olivenstein R, et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol* (2010) 184:4531–7. doi:10.4049/jimmunol.0903162
200. Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Dig Dis Sci* (2012) 57:381–9. doi:10.1007/s10620-011-1997-z
201. Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, Zheng ZM, Xu Y, Qin LY, et al. Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagn Pathol* (2013) 8:40. doi:10.1186/1746-1596-8-40
202. Buck M, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Stalling C, Grace ND, Burroughs AK, Patch D, Matloff DS, Clopton P, Chojkier M. Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):1052-9. doi: 10.1002/hep.26755.
203. Tian Z-F, You Z-L, Yi H, Kuang X-M, Wang Y-M. Effect of entecavir on CD4+ T-cell subpopulations in patients with chronic hepatitis B. *Ann Hepatol* (2016) 15:174–82. doi:10.5604/16652681.1193705;
204. Jimenez-Sousa MA, Almansa R, de la Fuente C, Caro-Paton A, Ruiz L, Sanchez-Antolín G, et al. Increased Th1, Th17 and pro-fibrotic responses in hepatitis C-infected patients are down-regulated after 12 weeks of treatment with pegylated interferon plus ribavirin. *Eur Cytokine Netw* (2010) 21:84–91. doi:10.1684/ecn.2010.0191
205. Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, Zou ZS, Wang FS, Jia JH. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis. *J Viral Hepat* (2012) 19:396–403. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01561.
206. Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* (2003) 71:212–8. doi:10.1002/jmv.1047
207. D.E. Cressman, L.E. Greenbaum, R.A. DeAngelis, G. Ciliberto, E.E. Furth, V. Poli, R.

- Taub, Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice, *Science*, 274 (1996) 1379-1383.
208. E. Galun, E. Zeira, O. Pappo, M. Peters, S. Rose-John, Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury, *FASEB J*, 14 (2000) 1979-1987.
209. S. Grivennikov, E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G.Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, M. Karin, IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer, *Cancer Cell*, 15 (2009) 103-113
210. S. Matsumoto, T. Hara, K. Mitsuyama, M. Yamamoto, O. Tsuruta, M. Sata, J. Scheller, S. Rose-John, S. Kado, T. Takada, Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model, *J Immunol*, 184 (2010) 1543-1551.
211. E. Fattori, M. Cappelletti, P. Costa, C. Sellitto, L. Cantoni, M. Carelli, R. Faggioni, G. Fantuzzi, P. Ghezzi, V. Poli, Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice, *J Exp Med*, 180 (1994) 1243-1250
212. C.R. Gomez, J. Goral, L. Ramirez, M. Kopf, E.J. Kovacs, Aberrant acute-phase response in aged interleukin-6 knockout mice, *Shock*, 25 (2006) 581-585.
213. Wunderlich, F.T.; Strohle, P.; Konner, A.C.; Gruber, S.; Tovar, S.; Bronneke, H.S.; Juntti-Berggren, L.; Li, L.S.; van Rooijen, N.; Libert, C.; et al. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 237–249
214. Klein, C.; Wustefeld, T.; Assmus, U.; Roskams, T.; Rose-John, S.; Muller, M.; Manns, M.P.; Ernst, M.; Trautwein, C. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 860–869.; Kovalovich, K.; DeAngelis, R.A.; Li, W.; Furth, E.E.; Ciliberto, G.; Taub, R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* **2000**, *31*, 149–159
215. Attar, B.M.; Moore, C.M.; George, M.; Ion-

- Nedelcu,N.;Turbay,R.;Zachariah,A.;Ramadori,G.;Fareed,J.; Van Thiel, D.H. Procalcitonin, and cytokines document a dynamic inflammatory state in non-infected cirrhotic patients with ascites. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 2374–2382
216. Soresi, M.; Giannitrapani, L.; D’Antona, F.; Florena, A.M.; La Spada, E.; Terranova, A.; Cervello, M.; D’Alessandro, N.; Montalto, G. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 2563–2568
217. Streetz, K.L.; Tacke, F.; Leifeld, L.; Wustefeld, T.; Graw, A.; Klein, C.; Kamino, K.; Spengler, U.; Kreipe, H.; Kubicka, S.; et al. Interleukin 6/GP130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* **2003**, *38*, 218–229. ; Wiest, R.; Weigert, J.; Wanninger, J.; Neumeier, M.; Bauer, S.; Schmidhofer, S.; Farkas, S.; Scherer, M.N.; Schaffler, A.; Scholmerich, J.; et al. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine* **2011**, *53*, 178–183
218. Ludwiczek O, Vannier E, Moschen A *et al.* Impaired counter-regulation of interleukin-1 by the soluble IL-1 receptor type II in patients with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2008; **43**: 1360–5. ;
219. Tilg H, Wilmer A, Vogel W *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; **103**: 264–74.;
220. Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; **11**: 755–9.
221. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 89–102
222. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; **343**: 732–4
223. Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 8819–8823

224. **Nagoshi S.** Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases. *Hepatol Res* 2014; **44**: 22-30
225. Bruha R, Jachymova M, Petrtyl J, Dvorak K, Lenicek M, Urbanek P, Svestka T, Vitek L. Osteopontin: A non-invasive parameter of portal hypertension and prognostic marker of cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2016 Mar 28;22(12):3441-50. doi: 10.3748/wjg.v22.i12.3441.
226. **Blendis L, Wong F.** The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol Ther* 2001; **89**: 221-231 [PMID: 11516477 DOI: 10.1016/S0163-7258(01)00124-3]
227. **Garcia-Tsao G.** Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; **19**: 250-258 [PMID: 15703565]
228. **Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ.** Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334: 98–101, 2011.
229. **Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A.** Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198: 725–736, 2003.
230. **Okamoto LE, Raj SR, Gamboa A, Shibao CA, Arnold AC, Garland EM, Black BK, Farley G, Diedrich A, Biaggioni I.** Sympathetic activation is associated with increased IL-6, but not CRP in the absence of obesity. Lessons from postural tachycardia syndrome and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309: 2015. doi:10.1152/ajpheart.00409.2015.

231. **Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, York DA, Pinkney J.** β -Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5864–5869, 2001.
232. Streetz, K.L.; Tacke, F.; Leifeld, L.; Wustefeld, T.; Graw, A.; Klein, C.; Kamino, K.; Spengler, U.; Kreipe, H.; Kubicka, S.; et al. Interleukin 6/GP130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* **2003**, *38*, 218–229
233. Meng,Z.;Zhang,Y.;Wei,Z.;Liu,P.;Kang,J.;Ma,D.;Ke,C.;Chen,Y.;Luo,J.;Gong,Z.Highserum resistin associates with intrahepatic inflammation and necrosis: An index of disease severity for patients with chronic HBV infection. *BMC Gastroenterol.* **2017**, *17*, 6.
234. Goral, V.; Atalay, R.; Kucukoner, M. Insulin resistance in liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* **2010**, *57*, 309–315.
235. Mortensen,C.;Andersen,O.;Krag,A.;Bendtsen,F.;Moller,S.High-sensitivityC-reactiveproteinlevels predict survival and are related to haemodynamics in alcoholic cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *24*, 619–626
236. Wiest, R.; Weigert, J.; Wanninger, J.; Neumeier, M.; Bauer, S.; Schmidhofer, S.; Farkas, S.; Scherer, M.N.; Schaffler, A.; Scholmerich, J.; et al. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine* **2011**, *53*, 178–183
237. Lemmers,A.;Gustot,T.;Durnez,A.;Evrard,S.;Moreno,C.;Quertinmont,E.;Vercruysse, V.;Demetter,P.; Franchimont, D.; Le Moine, O.; et al. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *156*, 518–527.
238. Zuwala-Jagiello,J.;Pazgan-Simon,M.;Simon,K.;Warwas,M.Advancedoxidationproteinproductsand inflammatory markers in liver cirrhosis: A comparison between alcohol-related and HCV-related cirrhosis. *Acta Biochim. Pol.* **2011**, *58*, 59–65.

239. Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN et al. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res* 2008; 31: 987–998.
240. Kurata M, Okura T, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Jotoku M, Miyoshi K, Desilva VR, Higaki J. Angiotensin II receptor blockade with valsartan decreases plasma osteopontin levels in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2011 May;25(5):334-9. doi: 10.1038/jhh.2010.73.
241. Manabe S, Okura T, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. Effects of angiotensin II receptor blockade with valsartan on pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 735–739.
242. Kramer AB, van der Meulen EF, Hamming I, van Goor H, Navis G. Effect of combining ACE inhibition with aldosterone blockade on proteinuria and renal damage in experimental nephrosis. *Kidney Int* 2007; 71: 417–424.
243. Irita J, Okura T, Kurata M, Miyoshi K, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin in rat renal fibroblasts: functional properties and transcriptional regulation by aldosterone. *Hypertension* 2008; 51: 507–513.
244. Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 440–444.
245. Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, Phillips LK, Goldstein MJ, Bhat R, Raine CS, Sobel RA, Steinman L. Blocking angiotensin-converting enzyme

- induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 1;106(35):14948-53. doi: 10.1073/pnas.0903958106.
246. Weber J, Tiriveedhi V, Takenaka M, Lu W, Hachem R, Trulock E, Patterson GA, Mohanakumar T. Inhibition of renin angiotensin aldosterone system causes abrogation of obliterative airways disease through inhibition of tumor necrosis factor- α -dependant interleukin-17. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Apr;31(4):419-26. doi: 10.1016/j.healun.2011.12.012.
247. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam*. 2014;2014:689360. doi: 10.1155/2014/689360.
248. **Bosch J**, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. Portal hypertension and gastrointestinal bleeding. *Semin Liver Dis* 2008; **28**: 3-25 [PMID: 18293274 DOI: 10.1055/s-2008-1040318]
249. **Burroughs AK**, Groszmann R, Bosch J, Grace N, Garcia-Tsao G, Patch D, Garcia-Pagan JC, Dagher L. Assessment of therapeutic benefit of antiviral therapy in chronic hepatitis C: is hepatic venous pressure gradient a better end point? *Gut* 2002; **50**: 425-427 [PMID: 11839726]
250. **Ripoll C**, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Makuch R, Patch D, Matloff DS, Bosch J. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2007; **133**: 481-488 [PMID: 17681169 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.024]

251. **D'Amico G**, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006; **44**: 217-231 [PMID: 16298014 DOI: 10.1016/j.jhep.2005.10.013]
252. Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology* 2003; **37**: 902-908 [PMID: 12668985 DOI: 10.1053/jhep.2003.50133]
253. **D'Amico G**, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1611-1624 [PMID: 17101332 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.09.013]
254. Bruha R, Jachymova M, Petrtyl J, Dvorak K, Lenicek M, Urbanek P, Svestka T, Vitek L. Osteopontin: A non-invasive parameter of portal hypertension and prognostic marker of cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2016 Mar 28;22(12):3441-50. doi: 10.3748/wjg.v22.i12.3441. PMID: 27022226;
255. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121–S131. [12]
256. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17:1081–1085.

257. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, Lammert F, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Vogelsang H; Vienna Hepatic Hemodynamic Lab. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):911-21. doi: 10.1016/j.jhep.2012.12.011.
258. 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 Aug;52(8):1182-7. doi: 10.1136/gut.52.8.1182.
259. **Tilg H**, Jalan R, Kaser A, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003;**38**:419–25.
260. Hsieh YC, Lee KC, Yang YY, Huo TI, Huang YH, Lin HC. Interleukin-1 receptor antagonist correlates with hepatic venous pressure gradient and predicts occurrence of overall complications and bacterial infections in patients with cirrhosis. *Hepatol Res*. 2015 Mar;45(3):294-304. doi: 10.1111/hepr.12355.
261. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008;48(Suppl. 1): 68e92.
262. Imperiale TF, Chalasani N, Klein RW. Measuring the hemodynamic response to primary pharmacoprophylaxis of variceal bleeding: a cost-effectiveness analysis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2742e50.

263. Sarin SK, Kumar A, Angus PW, Baijal SS, Baik SK, Bayraktar Y, et al. Diagnosis and management of acute variceal bleeding: Asian Pacific Association for Study of the Liver recommendations. *Hepatol Int* 2011;5:607e24.
264. Lee FY, Lu RH, Tsai YT, Hou MC, Li CP, Liao TM, et al. Plasma interleukin-6 levels in patients with cirrhosis. Relationship to endotoxemia, tumor necrosis factor-alpha, and hyperdynamic circulation. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:500e5.
265. Kao JT, Yu CJ, Feng CL, Tsai SM, Chen YL, Wu YY. IL-6 significantly correlates with p-STAT3 expression and presents high variceal bleeding with mortality in cirrhotic patients: A cross-sectional study. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017 Jun;50(3):286-296. doi: 10.1016/j.jmii.2015.03.001.
266. Huang X, Fan X, Zhang R, Jiang S, Yang K, Chen S. Systemic inflammation and portal vein thrombosis in cirrhotic patients with gastroesophageal varices. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2020 Mar;32(3):401-405. doi: 10.1097/MEG.0000000000001526.
267. Luo, M.; Li, L.; Yang, E.N.; Dai, C.Y.; Liang, S.R.; Cao, W.K. Correlation between interleukin-6 and ammonia in patients with overt hepatic encephalopathy due to cirrhosis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2013**, *37*, 384–390.
268. Labenz C, Toenges G, Huber Y, Nagel M, Marquardt JU, Schattenberg JM, Galle PR, Labenz J, Wörns MA. Raised serum Interleukin-6 identifies patients with liver cirrhosis at high risk for overt hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019 Nov;50(10):1112-1119. doi: 10.1111/apt.15515.
269. **Shang S**, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen HR, Sangrajrang S, Hainaut P, Marrero JA, Beretta L. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; **55**: 483-490 [PMID: 21953299 DOI: 10.1002/hep.24703]
270. **Nabih MI**, Aref WM, Fathy MM. Significance of plasma osteopontin in diagnosis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol* 2014; **15**: 103-107 [PMID: 25249230 DOI: 10.1016/j.ajg.2014.08.002]

271. Desert R, Ge X, Song Z, Han H, Lantvit D, Chen W, Das S, Athavale D, Abraham-Enachescu I, Blajszczak C, Chen Y, Musso O, Guzman G, Hoshida Y, Nieto N. Role of Hepatocyte-Derived Osteopontin in Liver Carcinogenesis. *Hepatol Commun*. 2021 Nov 3. doi: 10.1002/hep4.1845.
272. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*. 1996; 17: 354-381.
273. Lombardi F, Frequency domain analysis of heart rate variability. In: Zareba W, Maison-Blanche P, Locati EH, *Noninvasive Electrocardiology in Clinical Practice*. Futura publishing company, Amonk New York, 2001; 163-180.
274. Lombardi F, Mallian A, Pagani M, et al. Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation . *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 208-216.
275. Mallian A , Pagani M ,Lombardi F, et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991; 84: 482- 491.
276. Berger RD, Askelrod S, Gordon D et al. An efficient algorithm for spectral analysis of heart rate variability. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1986; 33: 900-904.
277. De Boer RW, Karemaker JM, Strackee J. Spectrum of a series of point events, generated by the integral pulse frequency modulation model. *Med Biol Comput*, 1985; 2: 138-142.
278. ACC/AHA. Guidelines for Ambulatory Electrocardiography: Executive Summary and Recommendations. *Circulation*. 2007; 100: 886-893.

279. Lombardi F, Sandrone G, Pemprumer S, et al. Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987; 60: 1239-1245.
280. Acharya UR, Joseph KP, Choo Min Lim et al. Heart rate variability: a review. *International Federation for Medical and Biological Engineering.* 2006; 44: 1031-1041.
281. Bekheit S, Tangella M, el-SAkR A et al. Use of heart rate spectral analysis to study the effects of calcium channel blockers on sympathetic activity after myocardial infarction. *Am Heart J.* 1990; 119: 79-85.
282. Purves D et al. (eds). *Neuroscience.* 3rd edition. Sunderland (MA). Sinauer Associates, Inc.; 2004.
283. Gershon M. *The Second Brain.* New York: Harper Collins. 1998.
284. Kandel ER, Schwartz JM, Jessel TM. *Principles of neural science.* 3rd edition. New York: McGraw-Hill Co. 2003.
285. Conti F et al. *Fisiologia medica.* Milano: Edi. Ermes; 2005.
286. Ropper AH, Brown RH. Disorders of the autonomic nervous system, respiration, and swallowing. In: Ropper AH, Brown RH, editors. *Adams and Victor's principles of neurology,* 8th edn. New York: McGraw-Hill; 2005
287. Dillon JF, Plevris JN, Nolan J, Ewing DJ, Neilson JM, Bouchier IA, et al. Autonomic function in cirrhosis assessed by cardiovascular reflex tests and 24-hour heart rate variability. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1544-7.
288. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;285:916-18.
289. Carney RM, Blumenthal JA, Stein PK et al. Depression, heart rate variability, and acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 104: 2024-2028.

290. Acharya UR, Joseph KP, Choo Min Lim et al. Heart rate variability: a review. *International Federation for Medical and Biological Engineering*. 2006; 44: 1031-1041.
291. Di Raimondo D, Miceli G, Casuccio A, Tuttolomondo A, Buttà C, Zappulla V, Schimmenti C, Musiari G, Pinto A. Does sympathetic overactivation feature all hypertensives? Differences of sympathovagal balance according to night/day blood pressure ratio in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 2016 Jun;39(6):440-8.
292. Frøkjær VG, Strauss GI, Mehlsen J et al. Autonomic dysfunction and impaired cerebral autoregulation in cirrhosis. *Clin Auton Res*. 2006; 16: 208-216.
293. Kim Y.K, Hwang GS, Shin WJ et al. Effect of propranolol on the relationship between QT interval and vagal modulation of heart rate variability in cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2011; 43:1654-1659.
294. Fleisher LA, Fleckenstein JF, Frank SM et al. Heart rate variability as a predictor of autonomic dysfunction in patients awaiting liver transplantation. 2000; 45: 340-344.
295. Ates F, Topal E, Kosar F et al. The relationship of heart rate variability with severity and prognosis of cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2006; 51: 1614-1618.
296. Fleckenstein JF, Frank SM, Thuluvath J. Presence of autonomic neuropathy is a poor prognostic indicator in patients with advanced liver disease. *Hepatology*. 1996; 23:471-475.
297. HENRIKSEN. H., RING-LARSEHN. & CHRISTENSEN. J. Hepatic intestinal uptake and release of catecholamines in alcoholic cirrhosis. Evidence of enhanced hepatic intestinal sympathetic nervous activity. *Gut*, 1987; 28, 1637-1642.
298. Dayan AD, Williams R. Demyelinating peripheral neuropathy and liver disease. *Lancet* 1967;2:133-134.

299. Chari VR, Katiyar BC, Rastogi BL, Bhattacharya SK. Neuropathy in hepatic disorders. A clinical, electrophysiological and histopathological appraisal. *J Neurol Sci* 1977; 31: 93-111.
300. Knill Jones RP, Goodwill CJ, Dayan AD, Williams R. Peripheral neuropathy in chronic liver disease: clinical, electrodiagnostic, and nerve biopsy findings. *J Neurol Neurosurg Psych* 1972; 35:22-30.
301. Kardel T, Nielsen VK. Hepatic neuropathy. A clinical and electrophysiological study. *Acta Neurol Scand* 1974;50:513-526.
302. Thomas PK. Metabolic neuropathies. In: Aguayo AJ, Karpatis G, eds. *Current Topics in Nerve and Muscle Research*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1979:255.
303. Seneviratne KN, Peiris OA. Peripheral nerve function in chronic liver disease. *J Neurol Neurosurg Psych* 1970;33:609-614
304. Chaudhry V, Eisenberger MA, Sinibaldi VJ, Sheikh K, Griffin JW, Cornblath DR. A prospective study of suramin-induced peripheral neuropathy. *Brain* 1996;119:2039-2052.
305. Dyck PJ, Karnes JL, O'Brien PC, Litchy WJ, Low PA, Melton LJ. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: reassessment of tests and criteria for diagnosis and staged severity. *Neurology* 1992;42:1164-1170.
306. Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve* 1988;11:21-32.
307. Dyck PJ, Kratz KM, Lehman KA, Karnes JL, Melton LJ, O'Brien PC, Litchy WJ, et al. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: design, criteria for types of neuropathy,

- selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. *Neurology* 1991;41:799-807.
308. Feldman EL, Brown MB, Stevens MJ, Canal N, Thomas PK, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994;17:1281-1289.
309. Thuluvath PJ, Triger DR. Autonomic neuropathy and chronic liver disease. *Q J Med* 1989;72:737-747.
310. Trevisani F, Sica G, Bernardi M. Autonomic neuropathy in advanced liver disease. *HEPATOLOGY* 1996;24:1549.
311. Oliver MI, Miralles R, Rubies-Prat J, Navarro X, Espadaler JM, Sola R, Andreu M. Autonomic dysfunction in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *J Hepatol* 1997;26:1242-1248.
312. Kempler P, Varadi A, Szalay F. Autonomic neuropathy in liver disease. *Lancet* 1989;2:1332.
313. Duncan G, Lambie DG, Johnson RH, Whiteside EA. Evidence of vagal neuropathy in chronic alcoholics. *Lancet* 1980; ii: 10.53-7. 2.
314. Low PA, Walsh JC, Huang CY, McLeod JG. The sympathetic nervous system in alcoholic neuropathy. A clinical and pathological study. *Brain* 1975; 98: 357-64.
315. Miralles R, Espadaler JM, Navarro X, Rubies-Prat J. Autonomic neuropathy in chronic alcoholism: evaluation of cardiovascular, pupillary and sympathetic skin responses. *Eur Neurol* 1995; 35: 287-92.

316. Barter F, Tanner AR. Autonomic neuropathy in an alcoholic population. *Postgrad Med J* 1987; 63: 1033-6. Kempler R, Varadi A, Szalay E. Autonomic neuropathy in liver disease. *Lancet* 1989; ii: 1332.
317. Thuluvath PJ, Triger DR. Autonomic neuropathy and chronic liver disease. *QJM* 1989; 72: 737-47.
318. Hendrickse MT, Triger DR. Autonomic dysfunction and hepatic function in chronic liver disease. *Gut* 1990; 31: All64. Dillon JF, Plevris JN, Nolan J, Ewing DJ, Neilson JMM, Bouchier IAD, Hayes PC. Autonomic function in cirrhosis assessed by cardiovascular reflex tests and 24-hour heart rate variability. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1544-7.
319. Mohamed R, Forsey PR, Davies MK, Neuberger JM. Effect of liver transplantation on QT interval prolongation and autonomic dysfunction in end-stage liver disease. *Hepatology* 1996;23:1128-34.
320. Surawicz B. Electrolytes and the electrocardiogram. *Am J Cardiol* 1963;12:656-662.
321. Ong JJ, Sarma JSM, Venkataramen K, Levin SR, Singh BN. Circadian rhythmicity of heart rate and QT_c interval in diabetic autonomic neuropathy: implications for the mechanism of sudden death. *Am Heart J* 1993;125:744-752.
322. Schwartz PJ, Wolf S. QT interval prolongation as a predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1978;57:1074-1077.

323. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. The long Q-T syndrome. *Am Heart J* 1975;89:378-390.
324. Bichet DG, Van Putten VJ, Schrier RW. Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis. *N Engl J Med* 1982;307:1552-1557.
325. Henriksen JH, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Sympathetic nervous activity in cirrhosis: a survey of plasma catecholamine studies. *J Hepatol* 1984;1:55-65.
326. Bernardi M, Trevisani F, De Palma R, Ligabue A, Capani F, Baraldini M, Gasbarrini G. Chronobiological evaluation of sympathoadrenergic function in cirrhosis. Relationship with arterial pressure and heart rate. *Gastroenterology* 1987;93:1178-1186.
327. Bernardi M, Calandra S, Colantoni A et al. Q-T interval prolongation in cirrhosis: prevalence, relationship with severity, and etiology of the disease and possible pathogenetic factors. *Hepatology* 1998; 27:28-34.
328. Hendrikse MT, Tuluvath PJ, Triger DR. Natural history of autonomic neuropathy in chronic liver disease. *Lancet* 1992;339:1462-1464.
329. Murakawa Y, Inoue H, Nozaki A, Sugimoto T. Role of sympathovagal interaction in diurnal variation of Q-T interval. *Am J Cardiol* 1992;69: 339-343.
330. Chaudhry V, Corse AM, O'Brian R, Cornblath DR, Klein AS, Thuluvath PJ. Autonomic and peripheral (sensorimotor) neuropathy in chronic liver disease: a clinical and electro-physiologic study. *Hepatology* 1999;29:1698-703.

331. Bal JS, Thuluvath PJ. Prolongation of QTc interval: relationship with etiology and severity of liver disease, mortality and liver transplantation. *Liver Int* 2003;23:243e248.
332. Genovesi S, Prata Pizzala DM, Pozzi M, et al. QT interval prolongation and decreased heart rate variability in cirrhotic patients: relevance of hepatic venous pressure gradient and serum calcium. *Clin Sci* 2009; 116:851e859.
333. Hanton G, Yvon A, Provost JP, et al. Quantitative relationship between plasma potassium levels and QT interval in beagle dogs. *Lab Anim* 2007;41:204e217
334. Tuttolomondo a, Buttà C, Casuccio A et al. QT indexes in cirrhotic patients: relationship with clinical variables and potential diagnostic predictive value. *Arch of Medical Res.* 2015. 46: 207-2013.
335. Bossi A, Baresi A, Ballini A et al. Autonomic neuropathy and corrected QT interval prolongation. *Diabetes care.*1994; 17: 454-456. ; Kempler P, Varadi A, Szalay F. Autonomic neuropathy and prolongation of QT interval in liver disease. *The Lancet.* 1992; 340: 318.
336. Mahmoud, B., Moneim, A.A. & Mabrouk, D. The impact of HCV eradication on hyperglycemia, insulin resistance, cytokine production, and insulin receptor substrate-1 and 2 expression in patients with HCV infection. *Clin Exp Med* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00773-1>
337. Celsa C, Stornello C, Giuffrida P, Giacchetto CM, Grova M, Rancatore G, Pitrone C, Di Marco V, Cammà C, Cabibbo G. Direct-acting antiviral agents and risk of Hepatocellular carcinoma: Critical appraisal of the evidence. *Ann Hepatol.* 2021 Oct 23:100568. doi: 10.1016/j.aohep.2021.100568
338. Saha B, Tornai D, Kodys K, Adejumo A, Lowe P, McClain C, Mitchell M, McCullough A, Dasarathy S, Kroll-Desrosiers A, Barton B, Radaeva S, Szabo G. Biomarkers of Macrophage Activation and Immune Danger Signals Predict Clinical Outcomes in

- Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*. 2019 Oct;70(4):1134-1149. doi: 10.1002/hep.30617
339. Buechler C, Haberl EM, Rein-Fischboeck L, Aslanidis C. Adipokines in Liver Cirrhosis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 29;18(7):1392. doi: 10.3390/ijms18071392.
340. Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. *Hepatology*. 2011;53:726-36
341. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2013;158:807-20
342. Bruha R, Vitek L, Smid V. Osteopontin - A potential biomarker of advanced liver disease. *Ann Hepatol*. 2020 Jul-Aug;19(4):344-352. doi: 10.1016/j.aohp.2020.01.001.
343. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment. *J Cell Mol Med* 2010;14:2037-2044.
344. Song Z, Chen W, Athavale D, Ge X, Desert R, Das S, et al. Osteopontin takes center stage in chronic liver disease. *Hepatology* 2021;73:1594-1608.
345. Zhao J, Dong LI, Lu B, Wu G, Xu D, Chen J, et al. Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology* 2008;135:956-968.
346. Dong Q, Zhu X, Dai C, Zhang X, Gao X, Wei J, et al. Osteopontin promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma through regulating vimentin. *Oncotarget* 2016;7:12997-13012.

347. Atesı F, Topal E, Kosar F et al. The relationship of heart rate variability with severity and prognosis of cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2006; 51: 1614-1618.
348. Aronson et al., 2001; Carney et al., 2007; González-Clemente et al., 2007 ; Janszky et al., 2004; Mani et al., 2009; Marsland et al., 2007; Shinohara et al., 2008; Tateishi et al., 2007; von Känel et al., 2008
349. Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117, 289–296.
350. Jaue, D.N., Ma, Z., Lee, S.S., 1997. Cardiac muscarinic receptor function in rats with cirrhotic cardiomyopathy. *Hepatology* 25, 1361–1365.
351. Mani, A.R., Montagnese, S., Jackson, C.D., Jenkins, C.W., Head, I.M., Stephens, R.C., Moore, K.P., Morgan, M.Y., 2009. Decreased heart rate variability in patients with cirrhosis relates to the presence and degree of hepatic encephalopathy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G330–G338.
352. Hajiasgharzadeh K, Mirnajafi-Zadeh J, Mani AR. Interleukin-6 impairs chronotropic responsiveness to cholinergic stimulation and decreases heart rate variability in mice. *Eur J Pharmacol.* 2011 Dec 30;673(1-3):70-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.10.013
353. Maser RE, Lenhard MJ, Pohlig RT, Balagopal PB. Osteopontin and osteoprotegerin levels in type 2 diabetes and their association with cardiovascular autonomic function. *J Diabetes Complications.* 2016 Apr;30(3):507-10. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.12.012.
354. Nagao M, Feinstein TN, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Izu Y, Takeda S, Wang K, Rittling S, Nakamoto T, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty

- G, Denhardt DT, Vilaradaga JP, Noda M. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 25;108(43):17767-72. doi: 10.1073/pnas.1109402108.
355. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27:2302-2309.
356. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: Inhibition by osteopontin. *Circulation Research*. 1999; 84:166-178.
357. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, ... Fruhbeck G. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007; 92:3719-3727.
358. Brown A. Osteopontin: A key link between immunity, inflammation and the central nervous system. *Translational Neuroscience*. 2012; 3:288-293. [PubMed: 23565338]
359. Kim E, Choi DL, Jung JY, Byun SH, Kim JD, Jwa EK, Kim TY, Kim DH, Kim JH. Shift in Sympathovagal Balance Toward Parasympathetic Predominance Is Associated With Attenuation of Portal Hyperperfusion in Cirrhotic Recipients Undergoing Living Donor Liver Transplant. *Transplant Proc*. 2019 Jun;51(5):1511-1515. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.01.117.
360. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. Portal hypertension and gastrointestinal bleeding. *Semin Liver Dis* 2008;28:3- 25.

361. Report 04-5491. Executive Summary. Action Plan for Liver Disease Research. U.S. Department of Health and Human Services: NIH. 2004. p 1-6.
362. Burroughs AK, Groszmann R, Bosch J, Grace N, Garcia-Tsao G, Patch D, et al. Assessment of therapeutic benefit of antiviral therapy in chronic hepatitis C: is hepatic venous pressure gradient a better end point? *Gut* 2002;50:425-427.
363. Groszmann RJ, Bosch J, Grace N, Conn HO, Garcia-Tsao G, Navasa M, et al. Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol vs placebo in the prevention of the first variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1990;99:1401-1407
364. Armonis A, Patch D, Burroughs A. Hepatic venous pressure measurement: an old test as a new prognostic marker in cirrhosis? *HEPATOLOGY* 1997;25:245-248.
365. Garcia-Pagan JC, Morillas R, Ban~ares R, Albillos A, Villanueva C, Vila C, et al., Spanish Variceal Bleeding Study Group. Propranolol plus placebo versus propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the prevention of a first variceal bleed: a double-blind RCT. *HEPATOLOGY* 2003; 37:1260-1266.
366. Schepke M, Raab P, Hoppe A, Schiedermaier P, Brensing KA, Sauerbruch T. Comparison of portal vein velocity and the hepatic venous pressure gradient in assessing the acute portal hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2905-2909.

367. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Francés R, Abraldes JG, Navasa M, Pérez-Mateo M, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2010;52:2044-2052.
368. Chung R, Podolsky D. Cirrhosis and its complications. In: Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill. 2005. p 1754-1767.
369. Francés R, Rodríguez E, Muñoz C, Zapater P, De la ML, Ndongo M, et al. Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:45-51.
370. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Cano R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *HEPATOLOGY* 2008;47: 978-985.
371. Chojkier M. Regulation of collagen gene expression. In: Strain A, Diehl A, editors. Liver growth and repair. London: Chapman & Hall. 1998. p 430-450.
372. Picchiotti R, Mingazzini PL, Scucchi L, Bressan M, Di Stefano D, Donnetti M, et al. Correlations between sinusoidal pressure and liver morphology in cirrhosis. *J Hepatol* 1994;20:364-369.