



Università degli studi di Napoli Federico II
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in
Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale
Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI

**CALCIFICAZIONI VALVOLARI CARDIACHE ED EPATOPATIA CRONICA
HCV CORRELATA. CORRELAZIONE DEL DANNO VALVOLARE CON I
LIVELLI DI OSSIDO NITRICO ESPIRATO
FORMULAZIONE DI NUOVE IPOTESI PATOGENETICHE**

Relatore
Ch.mo Prof. Felice Mazza

Candidato
Dott. Alberto Ruggiero

Anno accademico 2007-2008

INDICE

Introduzione	pag. 4
L'Epatite Cronica	pag. 6
La Cirrosi Epatica	pag. 11
Anomalie Cardiovascolari nel paziente cirrotico	pag. 19
Emodinamica Circolatoria e sindrome ipercinetica	pag. 22
L'Ossido Nitrico	pag. 28
Metodi di Misurazione dell'Ossido Nitrico	pag. 31
Ossido Nitrico e Fegato	pag. 32
Agenti infettivi ed Aterosclerosi	pag. 35
Virus Epatitici ed Aterosclerosi	pag. 38
Calcificazioni Vascolari	pag. 38
Parte Sperimentale	pag. 41
Premessa	pag. “ “
Fasi dello studio	pag. 43
Prima fase	pag. 43
Metodi	pag. “ “
Risultati (prima fase)	pag. 44

Seconda Fase	pag. 46
Premessa	pag. “ “
Scopi	pag. 47
Metodi	pag. 48
1) Arruolamento dei casi	pag. 48
2) Test diagnostici	pag. 49
- Esame ecocardiografico transtoracico	pag. “ “
- Misurazione dei livelli di Ossido Nitrico Espirato	pag. 50
Risultati	pag. 52
Discussione	pag. 53
- Dati Ecocardiografici	pag. “ “
- Le calcificazioni valvolari cardiache nei pazienti epatopatici : <i>“Patogenesi Infiammatoria”</i> ?	pag. 57
- L’ Ossido Nitrico nei pazienti Epatopatici : <i>“Marcatore di danno Vascolare”</i> ?	pag. 59
Conclusioni	pag. 61
Tabelle	pag. 63
Bibliografia	pag. 70

Introduzione

La compromissione dell'apparato cardiocircolatorio rappresenta un'evenienza frequente nelle fasi avanzate di epatopatia.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi che hanno identificato tutta una serie di alterazioni cardiovascolari sia strutturali che emodinamiche.

Altri studi hanno dimostrato aumentati livelli di ossido nitrico (NO), sia nell'aria espirata (NO_e) che nei liquidi biologici (NO₂/NO₃) di questi pazienti.

La maggior parte di questi studi, tuttavia, ha analizzato generalmente come campione oggetto dello studio un gruppo di pazienti cirrotici con ipertensione portale, cioè pazienti in stadi avanzati di malattia.

In questi pazienti, peraltro, si verificano frequentemente condizioni di alterata emodinamica circolatoria come : 1) La sindrome Circolatoria-iperinetica-iperdinamica; 2) la sindrome epato-polmonare; 3) la sindrome epato-renale.

Tali anomalie, interessano generalmente tutto il sistema cardiocircolatorio e possono dunque sovrapporsi verosimilmente ad altre anomalie funzionali e strutturali cardiache che probabilmente sono presenti già nelle fasi molto precoci dell'epatopatia.

Verosimilmente, infatti, la compromissione dell'apparato cardiovascolare potrebbe essere già presente nelle fasi iniziali della malattia epatica, ma in forma sub-clinica, tanto da venire misconosciuta e sottovalutata.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di voler dimostrare che nel paziente epatopatico ad etiologia virale, alcune alterazioni cardiovascolari, sono presenti non solo nella malattia cirrotica avanzata ma anche negli stadi di epatopatia lieve. In particolare, secondo la nostra opinione, tali alterazioni sarebbero attribuibili non solo alle alterazioni emodinamiche indotte dalla cirrosi, ma bensì ad un danno diretto dei virus epatitici che inizia molto tempo prima.

Abbiamo così diviso lo studio in due fasi.

Nella prima fase abbiamo studiato un gruppo di pazienti cirrotici a diversa etiologia virale ed a diverso stadio Child. In questa fase preliminare abbiamo evidenziato un dato molto interessante non descritto ancora in letteratura e cioè che i pazienti affetti da cirrosi epatica presentano anomalie valvolari cardiache consistenti in evidenti calcificazioni valvolari con lievi deficit funzionali.

Partendo da questi presupposti, abbiamo voluto ricercare, attraverso uno studio mirato, analitico, prospettico (seconda fase), se tali calcificazioni valvolari sono presenti anche nei pazienti affetti da lieve epatopatia (Epatite cronica e Cirrosi epatica in Stadio Child A). Inoltre, in questa seconda fase abbiamo sottoposto tutti i pazienti alla misurazione dell'ossido nitrico nell'aria espirata (NOe).

Da i dati ottenuti da questo studio e dai dati forniti dalla letteratura abbiamo quindi formulato alcune ipotesi sulla patogenesi di questi disordini.

Epatiti Croniche virali

L'epatite cronica può essere definita una malattia necrotico-infiammatoria del fegato caratterizzata dalla persistenza nel tempo di necrosi epatocitaria e di infiammazione, dimostrabili istologicamente e presenti in vario grado. Numerosi sono gli agenti, infettivi e non infettivi che possono causare tale malattia: tra le condizioni dovute a processi non infettivi, vanno ricordate le forme autoimmuni e le epatopatie da farmaci.

Anche per l'epatite cronica virale l'etiologia è molteplice: è infatti noto che le infezioni da virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV) e dell'epatite D (HDV) possono cronicizzare e provocare questo stato patologico. L'epatite da infezione virale da HAV ed HEV possono dare epatiti acute che però non cronicizzano. Esistono poi epatiti croniche da virus epatitici minori, quali: Epstein Barr Virus, Citomegalovirus, Coxsackie-virus, Herpes Virus, Adenovirus.

Esistono quindi tipi di epatite cronica diversi dal punto di vista etiologico, con caratteristiche cliniche, biochimiche distinte. Le lesioni istopatologiche fondamentali sono invece simili. Le epatiti croniche vengono infatti classicamente inquadrare dal punto di vista nosografico proprio sulla base del quadro istopatologico.

Esistono tre quadri istopatologici differenti: Epatite cronica persistente (ECP), a prognosi decisamente favorevole: si ha infiltrazioni degli spazi portali da parte di cellule mononucleate, senza estensione dell'infiammazione nel lobulo. Epatite cronica lobulare: Si ha infiltrazione degli spazi portali e dei lobuli con necrosi portale focale. Epatite cronica attiva (ECA), che non infrequentemente evolve verso la cirrosi: Si ha infiltrazione degli spazi portali con cellule mononucleate e con plasmacellule, estensione dell'infiltrato infiammatorio alla limitante esterna (piece meal necrosis) od al lobulo con setti attivi completi o incompleti, capaci di evolvere in setti completi porto-portali o porto-centrali di connettivo fibroso con vari gradi di nodularità. La persistenza

della necrosi e dell'infiammazione induce la fibrosi e, in alcuni casi la formazione di setti connettivale che, associandosi alla rigenerazioni parenchimale, causano una progressiva alterazione della struttura lobulare fino, eventualmente, alla cirrosi epatica. Tutte le forme di epatite cronica possono guarire, ma anche, soprattutto l'ECA, evolvere verso la cirrosi epatica.

Una volta raggiunto lo stadio della cirrosi, l'attività della malattia può persistere ed accelerare nel suo decorso sfavorevole, oppure lentamente regredire, esitando comunque in un quadro di cirrosi inattiva.

La maggior parte dei pazienti con epatite cronica virale non ricorda nella propria anamnesi un episodio di epatite acuta ne alcun disturbo che segnali l'esordio della malattia. L'infezione può cronicizzare senza che il virus danneggi il fegato (Portatore di virus dell'epatite con transaminasi normali -"portatore sano del virus").

In tal caso il periodo ottimale di osservazione per la definizione di "portatore sano" non deve essere inferiore a 18 mesi.

L'infezione può invece cronicizzare accompagnandosi a danno epatico persistente. In tal caso sviluppa un epatite cronica.

Nella fase precirrotica, della durata di vari anni, il fegato rimane funzionalmente normale ed il paziente non lamenta alcun disturbo.. L'unico sintomo di frequente riscontro è l'astenia.

Poiché l'epatite cronica virale è una malattia asintomatica, il suo riconoscimento è invece possibile solo con indagini biochimiche , tra cui la più frequente è la misura delle aminotrasferasi. (AST,ALT).

L'aumento persistente delle transaminasi associato o meno alla presenza di marcatori di virus epatitici rappresenta il quadro clinico di più frequente riscontro nei pazienti in cui sarà successivamente diagnosticata un epatite cronica .

Negli ultimi anni il tasso di epatiti croniche da HBV e HDV è consistentemente diminuito grazie al calo dell'endemia dell'HBV indotta dal miglioramento delle condizioni socio-igienico, dall'introduzione della

vaccinazione dell'epatite B e dall'indotto delle misure sanitarie contro l'AIDS.

Il Virus dell'epatite C (HCV) infetta approssimativamente 170 milioni di persone nel mondo e rappresenta un problema attivo enorme per la sanità pubblica.

Il virus dell'epatite HCV è un RNA-virus ad elica singola di circa 9400 nucleotidi che presenta varie omologie strutturali con alcuni virus appartenenti alla famiglia dei Flaviviridae. La struttura genetica dell'HCV è organizzata come un unico open reading frame che codifica per una poliproteina di circa 3000 aminoacidi da cui vengono poi scisse per via enzimatica le singole componenti virali.

È probabile che la replicazione virale avvenga nel citoplasma delle cellule infettate attraverso la formazione di una catena di HCV –RNA antigenomica che funge da RNA messaggero. Esistono almeno 6 genotipi di HCV e circa 50 sottotipi, distribuiti in modo diverso nelle varie aree geografiche.

L'HCV RNA si misura dopo amplificazione genomica con la tecnica della PCR.

La presenza dell'HCV-RNA nel siero indica infezione di HCV in atto. Esiste un'elevata correlazione tra HCV RNA e anti-HCV (95%) Nel 5% dei casi tuttavia, la presenza del genoma non è accompagnata alla presenza da Anti-HCV (periodo finestra). La ricerca del genotipo dell'HCV ha assunto importanza nel predire l'efficacia del trattamento con interferone in quanto alcuni genotipi rispondono meglio di altri alla terapia.

Alcuni studi italiani hanno evidenziato una maggiore prevalenza del genotipo 2 nei "portatori sani" ed una maggiore prevalenza del Genotipo 1b nei pazienti con transaminasi elevate. Al contrario studi effettuati in Giappone e negli USA hanno dimostrato una prevalenza più elevata del genotipo 1b nei "portatori sani". Non sono documentate correlazioni certe tra genotipo e caratteristiche del danno istologico. Infatti numerosi lavori

non hanno rilevato alcuna relazione tra genotipo e severità delle lesioni istologiche ; in pochi altri è stata riscontrata un associazione tra severità delle lesioni istologiche e presenza di virus 1b. Anche per la Viremia non vi sono studi che presentano risultati univoci circa la correlazione tra viremia e danno istologico. Il Virus dell'epatite C è in grado di indurre infezione cronica nel 60-85% dei casi.

L'epatite C rappresenta oggi un problema clinico rilevante , essa è infatti la causa più frequente di epatiti croniche, di cirrosi epatica e di tumori primitivi del fegato.

Anche l'epatite cronica C decorre generalmente per anni, in modo del tutto asintomatico o paucisintomatico. L'unico disturbo che alcuni pazienti periodicamente riferiscono è l'astenia per lo più modesta. Ciò non significa che la prognosi sia sempre buona. Al contrario, in circa il 20% dei casi l'evoluzione è verso la cirrosi epatica. L'intervallo tra l'esposizione del virus e lo sviluppo di cirrosi conclamata è stimato in 15-20 anni.

La diagnosi di infezione da virus di epatite C si basa sulla ricerca degli anticorpi specifici. Tali anticorpi, però, come abbiamo già detto, possono non essere determinabili in alcuni periodi della malattia come all'esordio. La ricerca dell'infezione dell'HCV-RNA nel siero, attraverso metodiche di PCR, costituisce un metodo sicuro per la diagnosi .

I meccanismi attraverso i quali avviene la lisi epatocitaria nell'infezione da HCV non sono ben chiariti. La persistenza di infiltrati linfomonocitari, suggerisce una patogenesi immuno-mediata. D'altro canto all'esame istopatologico si dimostra spesso la presenza di steatosi microvescicolare , un quadro che suggerirebbe un possibile attività citopatica diretta del Virus.

L'HBV appartiene alla piccola famiglia Hepadnaviridae, virus epatotropi con genoma a DNA. L'HBV è una particella sferica , del diametro di 42 nm, costituita da un involucro esterno (HbsAg)che avvolge un nucleo

centrale (core) del diametro di 27 nm. Il genoma dell'HBV è costituita da una molecola di DNA circolare, parzialmente a doppia elica.

La storia naturale dell'infezione da virus B è caratterizzata dalla persistenza per un periodo di tempo molto variabile di attiva replicazione dell'HBV cui fa seguito l'integrazione di una parte almeno del DNA virale nel genoma della cellula ospite. L'attiva replicazione virale si associa generalmente a segni clinici e biochimici e d istologici di malattia cronica del fegato, mentre la presenza del genoma in forma integrata nella cellula ospite sembra essere tipica del portatore cronico asintomatico di HBsAg, che spesso non mostra alcun segno istologico di epatite cronica. La fase di attiva replicazione virale viene generalmente identificata dal riscontro di HbeAg nel siero. Mentre la presenza di anticorpi anti-Hbe viene considerata un indice di cessata attività virale. La siero conversione dall' HbeAg all'anti-Hbe si accompagna alla clearance dell'HBV-DNA.

I soggetti con infezione acuta o cronica da Virus B possono presentare reperti sierologici di una concomitante infezione da HDV. Il quadro sierologico dei markers HDV (HD igM e IgG) correlati si sovrappone invariabilmente a quello dell'infezione cronica da HBV (HbsAg).

Benchè la patogenesi dell'epatite B non sia completamente chiarita, numerosi dati suggeriscono che il danno epatocitario conseguia alla risposta immunitaria dell'ospite all'infezione. (Immunitaria e cellulo mediata).^{1,2,3,4,5}

La Cirrosi Epatica

La cirrosi epatica è una malattia cronica del fegato a molteplice eziologia, caratterizzata da fenomeni degenerativo-necrotici parenchimali associati a fibrosi e rigenerazione nodulare, con conseguente disorganizzazione dell'architettura lobulare e vascolare.

Tutte le noxae patogene in grado di arrecare un danno cronico al fegato possono condurre, in tempi variabili, alla cirrosi epatica.

la prevalenza di cirrosi epatica è maggiore nel sesso maschile che nel sesso femminile.

Nel nord Italia e in particolar modo nelle regioni del nord-est esiste una maggiore prevalenza della cirrosi alcolica, mentre al sud e al centro esiste una maggiore diffusione delle forme ad eziologia virale.

Negli ultimi anni la mortalità per cirrosi è diminuita, pur essendo tale diminuzione compensata da un aumento della mortalità per tumore primitivo del fegato (quest'ultimo è in aumento sia perché con le moderne tecniche diagnostiche viene più facilmente riconosciuto, sia perché, essendo aumentata la vita media dei cirrotici, è aumentata la probabilità di una sua insorgenza).

Attualmente la diagnosi di cirrosi viene raggiunta molto più precoce che in passato, quando invece essa veniva riconosciuta solo per il verificarsi di una complicanza legata all'ipertensione portale e/o all'insufficienza epatica: emorragie digestive alte, encefalopatia porto- sistemica, ittero marcato, sindrome epato-renale etc. Ciò ha comportato un grande cambiamento della prognosi di questa patologia. Oggi, in più della metà dei casi, la diagnosi di cirrosi scaturisce dall'approfondimento di occasionali reperti laboratoristici o strumentali in soggetti sostanzialmente asintomatici o con sintomi del tutto aspecifici come astenia o sintomi dispeptici. In tale situazione si può parlare di cirrosi compensata, condizione che può restare a lungo come tale soprattutto

nelle forme inattive e in quei casi in cui si è riusciti ad eliminare l'esposizione all'agente eziologico (ad es. se il pz con cirrosi etilica smette di bere completamente alcolici). Il passaggio dalla fase di compenso a quella di scompenso (in cui, cioè abbiamo la presentazione delle complicanze della malattia) potrà verificarsi improvvisamente per il sovrapporsi di fattori sistemici scatenanti come malattie infettive ricorrenti, interventi chirurgici, farmaci incongrui etc. oppure per un lento e progressivo decadimento della funzionalità epatica e/o dell'ipertensione portale⁶.

Eziologia:

1) VIRUS: HCV, HBV, HDV

2) SOSTANZE TOSSICHE O FARMACI: alcool, methotrexate, isoniazide, metildopa, IMAO, alotano, micotossine, veleni vegetali...

3) ALTERATA IMMUNITA': autoimmunità

4) ERRORI METABOLICI CONGENITI:

- emocromatosi (anche forma acquisita)
- m. di Wilson (o degenerazione epatolenticolare)
- deficit di α_1 -antitripsina o di fibrinogeno
- glicogenosi tipo IV
- galattosemia
- tirosinosi congenita
- intolleranza ereditaria al fruttosio

5) COLESTASI PROTRATTA INTRA E/O EXTRA EPATICA: cirrosi biliare primitiva e secondaria

6) OSTACOLO AL DEFLUSSO VENOSO DAL FEGATO:

- malattia veno occlusiva
- S. di Budd-Chiari
- Pericardite costrittiva

- 7) BY-PASS INTESTINALE
- 8) CIRROSI INFANTILE INDIANA
- 9) CIRROSI CRIPTOGENETICA

Patogenesi: La fibrogenesi riveste un ruolo importantissimo nella patogenesi della cirrosi epatica. La composizione del tessuto fibro-cicatriziale nella c. è simile in tutte le forme indipendentemente dalla eziologia e consiste di collagene di tipo I e III (fibrillare), proteoglicani solfatati e glicoproteine. L'accumulo di tali sostanze è dovuto sia a neo-apposizione che a collasso post-necrotico della trama preesistente. La sede in cui principalmente avviene deposizione della neomatrice è sottoendoteliale, nello spazio di Disse. La produzione del collagene e delle altre proteine della matrice extracellulare è regolato da citochine e fattori di crescita che vengono a loro volta indotti dal processo di infiammazione e rigenerazione epatocitaria. L'elemento centrale che regola l'insieme delle reazioni di fibrosi e rigenerazione è identificato nelle *cellule stellate* o *cellule di Ito*. Esse sono presenti in tutto il parenchima, localizzate all'interno dello spazio di Disse e riconoscibili in quanto in stato di quiescenza accumulano lipidi e vitamine liposolubili (soprattutto vitamina A). In risposta a stimoli tossici o infiammatori il fenotipo della cellula di Ito cambia assumendo l'aspetto di miofibroblasto. Il miofibroblasto è in grado di contrarsi e di regolare il calibro dei sinusoidi epatici modificando le caratteristiche emodinamiche locali; inoltre secerne collagene, altre proteine della matrice e una molteplicità di fattori di crescita e citochine. Il reclutamento di cellule infiammatorie e la produzione di proteine della matrice sono i passi fondamentali in grado di eliminare i tessuti danneggiati e di ricostruire le parti mancanti conducendo a guarigione.

In condizioni di normalità questo processo è ben regolato e dopo un insulto acuto segue la rigenerazione del tessuto epatico con completa

restituito ad integrum. L'attività delle cellule di Ito comporta anche la rigenerazione dei vasi e dei colangioli.

Quando l'insulto sul parenchima epatico, invece che essere acuto risulta cronico, per la continua stimolazione delle cellule che mediano il processo della rigenerazione e dell'infiammazione possono perdere il controllo sulla produzione di matrice proporzionatamente alla rigenerazione parenchimale portando a lungo termine al sovvertimento della normale architettura epatica. La fibrosi a sua volta può subire un processo di irrigidimento dei setti con aumento della pressione sinusoidale e capillare (maturazione) e di 'autoinduzione' con progressivo avanzamento del processo fibrotico anche una volta che l'agente tossico o virale ha cessato di agire sul fegato.

Oltre alle cellule di Ito altre cellule contribuiscono alla genesi della cirrosi: 1) le c. di Kupffer che producono IL-1, IL-6 e TNF- α ; 2) fibroblasti che rilasciano TGF- α ; 3) gli stessi epatociti che producono EGF con effetto autocrino e paracrino.

Il processo di attivazione delle cellule stellate si realizza attraverso una sequenza precisa di cui il primo evento viene definito stadio "preinfiammatorio" o di "inizializzazione" in cui queste cellule rispondono a mediatori prodotti dalle cellule infiammatorie, dagli epatociti o dai colangiociti danneggiati. La fase successiva a questa è definita "perpetuazione" perché porta alla amplificazione del fenotipo attivato mediante la produzione di altri fattori di crescita e all'accentuazione della risposta agli stimoli. Durante questa fase, se l'agente patogeno venisse allontanato, si passerebbe ad una fase di disattivazione delle cellule stellate per apoptosi o sdifferenziazione . Nelle fasi di inizializzazione intervengono tutte le cellule epatiche: endoteliali sinusoidali, cellule de Kupffer (che intervengono anche nella fase di attivazione), epatociti, piastrine e leucociti (soprattutto neutrofili). La funzione dei linfociti è fondamentale per l'attivazione delle cellule stellate. Queste ultime possiedono il recettore per il CD40 , per cui quando entrano in contatto

con linfociti che esprimono CD40 la loro interazione porta all'attivazione delle cellule stellate. Tra i mitogeni per le cellule stellate sono da considerare in modo particolare il PDGF, l'ENDOTELINA-1, la TROMBINA, l'FGF, il VEGF e l'IGF-1. L'endotelina è molto importante nel determinare il tono contrattile delle cellule stellate e quindi nell'induzione di ipertensione portale. Alcuni di questi fattori oltre ad avere funzione fitogena hanno anche attività chemiotattica: PDGF (il più potente), IGF-1, TGF- α , β FGF, HGF ed ENDOTELINA.

In ultima analisi, il sovvertimento dell'architettura epatica con l'apposizione di matrice nello spazio di Disse, fisiologicamente deputato agli scambi tra epatocita e plasma, conduce da una parte alla ridotta produzione di proteine di esportazione (in particolare albumina e fattori della coagulazione) e dall'altra alla limitata funzione escrettrice (bilirubina e sali biliari) e di detossificazione (farmaci o sostanze derivate dall'assorbimento intestinale). Altre funzioni sintetiche di rilievo che risultano coinvolte nel processo di infiammazione cronica che porta alla cirrosi riguardano il metabolismo di substrati come gli amminoacidi, il colesterolo e il glucosio. Queste alterazioni assumono però rilevanza clinica nelle fasi avanzate della cirrosi, mentre nelle fasi precoci di malattia il paziente può essere completamente asintomatico e le alterazioni biochimiche sono molto sfumate e totalmente compatibili con quelle di una epatite cronica.

Clinica: Il quadro clinico della cirrosi epatica presenta un'evoluzione bifasica nel senso che fino a che non si instaura una franca ipertensione portale con tutte le sue sequele (ascite, sindrome epato-renale, encefalopatia etc..) il pz può godere di un relativo stato di benessere. Quindi la prima fase viene definita di compenso e ha una durata variabile. Un paziente affetto da cirrosi compensata può presentarsi spesso senza sintomi clinicamente evidenti. Talvolta, nelle forme virali è presente una lieve affaticabilità, o nelle forme di origine autoimmune può

essere presente una febricola, mentre il prurito può essere l'unico segno nelle forme colestatiche. Questa fase asintomatica o paucisintomatica può durare molti anni e la diagnosi in questo caso può scaturire da eventi casuali, in seguito all'esecuzione di esami ematochimici o durante le indagini che precedono un intervento chirurgico. Quando la malattia si trova in questa fase di compenso, i reperti possono essere comunque sovrapponibili a quelli di un'epatite cronica (epatomegalia all'E.O. o riscontrata da un esame ecografico, modesta alterazione dei test di citonecrosi). In questo caso, la difficoltà di distinguere chiaramente tra la presenza di un'epatite cronica e la cirrosi epatica (potendo ovviamente esistere anche forme di passaggio tra l'una e l'altra) può rendere necessaria, per raggiungere la certezza diagnostica, l'esecuzione di una biopsia epatica, in cui gli elementi caratteristici di cirrosi sono il riscontro di fibrosi e la presenza di noduli di rigenerazione. Quando la massa epatica funzionante si è ridotta notevolmente o quando si è instaurata un'importante ipertensione portale compaiono invece segni clinici più evidenti.

Quadro clinico della cirrosi scompensata: si giunge al quadro di cirrosi scompensata quando ormai la quota di parenchima epatico funzionante è troppo ridotta e aumenta l'ipertensione portale e con essa gli shunts porto-sistemici con la comparsa di complicanze. Per un quinto circa dei pz è solo questo il momento in cui viene fatta diagnosi di cirrosi. Quindi, possiamo parlare di cirrosi scompensata quando compaiono complicanze, sia isolate sia associate tra loro, come l'ittero, l'encefalopatia porto-sistemica, l'ascite, le varici esofagee, la sindrome epatorenale, la sindrome epato-polmonare, la sindrome cardiocircolatoria ipercinetica.

Iipertensione portale: è l'aumento del gradiente pressorio tra il territorio portale e quello cavale. La pressione normalmente esistente nella vena porta è di 7-12 mmHg mentre quella nelle vene sovraepatiche è di 2-6 mmHg. Quando il normale gradiente presso rio, che si aggira intorno a 4

mmHg, supera questo valore si parla di ipertensione portale che, quando il gradiente pressorio supera i 10-12 mmHg, vengono attivati i meccanismi di compenso rappresentati dal transito del sangue attraverso i sistemi venosi epato-fugali nel tentativo di scaricare il sangue dal sistema portale nella circolazione sistemica.

frequente, è un aumento delle resistenze al deflusso del sangue nel circolo portale in presenza o meno di un flusso normale; il secondo fattore è rappresentato da un aumentato afflusso di sangue nel circolo portale.

L'aumento delle resistenze può avere origine in sede pre o post-sinusoidale.

Ascite: la comparsa di ascite è strettamente legata all'alterazione dell'equilibrio delle forze di Starling nel microcircolo epatico. Il più importante fattore patogenetico nell'instaurarsi dell'ascite è dunque l'ipertensione portale: nell'uomo, si sono identificati livelli di pressione portale al di sopra dei quali (25mmHg) l'a. è pressochè invariabilmente presente e sotto i quali (15mmHg) è sempre assente. L'evento sistemico che si associa, anzi, precede la comparsa di ascite è rappresentato dalla ritenzione renale di sodio e acqua. Un altro fattore molto importante è il ridotto gradiente colloidale-osmotico, dovuto a una ridotta sintesi di albumina da parte del fegato.

La sindrome epato-renale

si sviluppa, quando l'attivazione dei sistemi vasocostrittori prende il sopravvento su quella dei vasodilatatori renali, con ipoperfusione e riduzione del tasso di filtrazione glomerulare renale; a questa fase finale di scompenso il paziente spesso arriva in seguito a un evento precipitante, di solito un evento in grado di ridurre ulteriormente il volume circolante effettivo (emorragia intestinale, ascite ingravescente). Inoltre, questa sindrome può essere precipitata dall'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei che hanno effetto deleterio su questi pz perché inibiscono la produzione di prostaglandine. Nelle fasi terminali

della cirrosi, infatti, il flusso renale è mantenuto prevalentemente grazie al sistema prostaglandinico. Alla luce di queste informazioni si può affermare che la sindrome epato-renale deve essere considerata una patologia funzionale che non origina da un'alterazione iniziale della normale anatomia renale. Dal punto di vista clinico l'insufficienza renale acuta si sviluppa in pochi giorni o, più raramente, nell'arco di qualche settimana con iperazotemia, ipercreatininemia, squilibrio idroelettrolitico (soprattutto iponatriemia), oliguria-anuria, urine iperosmolari, con iposodiuria (< 10 mEq/L) e sedimento privo di reperti patologici. Il paziente diviene astenico e anoressico, tende a ritenere liquidi e infine sviluppa nausea, vomito e obnubilamento, con un quadro clinico sovrapponibile a quello dell'encefalopatia epatica. Se non trattato, il paziente decede in pochi giorni o, al massimo, poche settimane.

Anomalie cardiovascolari nel paziente Cirrotico

La compromissione dell'apparato cardiocircolatorio in corso di cirrosi epatica rappresenta un'evenienza frequente, che spesso è presente in forma subclinica nello stadio iniziale (pre-ascitico) della malattia. Negli ultimi anni è stata attribuita un'importanza sempre maggiore a questa condizione sia per il ruolo fondamentale che gioca nel determinare le complicanze più temibili della cirrosi epatica che per la capacità di influenzare sensibilmente la prognosi dei pazienti che ne presentano i segni. La presenza di alterazioni istologiche a carico del miocardio dei pazienti cirrotici sono note da più di 50 anni, così come l'associazione tra cirrosi epatica e "SINDROME CIRCOLATORIA IPERCINETICA" è stata descritta per la prima volta da Kowalsky e Abelman⁷ nel 1953; da allora sono stati condotti moltissimi studi sia sull'animale da esperimento che sull'uomo che hanno in larga parte chiarito i meccanismi ed identificato i determinanti fondamentali della "cardiomiopatia del cirrotico" e della "sindrome circolatoria ipercinetica", la cui patogenesi appare però ancora molto complessa.

Una significativa percentuale di pazienti cirrotici mostra all'autopsia un cuore con peso francamente superiore alla norma (> di 400 g.), inoltre presenta una notevole dilatazione delle camere cardiache e una minore consistenza del miocardio rispetto ai pazienti con cardiopatia nota⁸. Numerosi sono gli studi volti a chiarire la patogenesi di queste alterazioni. In modo particolare, sembra essere determinante il ruolo svolto dalle anomalie funzionali del β_1 -recettore: uno studio del 1996⁹ ha dimostrato l'importanza di tale fattore in un modello sperimentale di cirrosi epatica ottenuto mediante legatura di un dotto biliare nei ratti. A questi animali veniva asportato il cuore, isolato un muscolo papillare del ventricolo sinistro e valutata la contrattilità in risposta all'isoproterenolo. La risposta contrattile del cuore proveniente dai ratti cirrotici risultava significativamente inferiore se confrontata con quella dei ratti sani di

controllo. Nello stesso studio gli autori dimostravano, inoltre: a) la riduzione dei livelli di cAMP generato da membrane cellulari cardiache provenienti da ratti cirrotici, sia in condizioni basali che dopo stimolazione con isoproterenolo; b) la riduzione significativa dell'espressione della subunità α della proteina G rispetto ai controlli, sottolineando così le anomalie della funzione del β -recettore. Inoltre, è stata dimostrata una riduzione significativa dei β -recettori in linfociti di pazienti affetti da cirrosi in fase di scompenso ascitico¹⁰. Dato che la densità del recettore β sulla membrana linfocitaria è correlata positivamente alla densità del recettore stesso sulla superficie dei miocardiociti ed alla loro funzione contrattile, è stato ipotizzato che tale dato possa rispecchiare una down-regulation dei β -adrenorecettori, verosimilmente indotta dagli elevati livelli plasmatici di norepinefrina^{11,12}. Altrettanto importante appare il ruolo di composti potenzialmente tossici quali endotossine e citochine riversate in circolo attraverso gli shunts portosistemici o inadeguatamente inattivati dal fegato¹³. Queste sostanze sono in grado di svolgere un'azione inibitoria diretta sulla contrattilità miocardica e di influenzare, direttamente o indirettamente, il tono vascolare. Infine, esistono delle evidenze che pongono l'accento sul ruolo della ridotta fluidità delle membrane cellulari in corso di cirrosi epatica. E' stato dimostrato, infatti, che la ridotta funzione del β -recettore è legata a modificazioni del microambiente in cui si trova incorporato, e che questa alterazione è in grado di comportare una riduzione fino al 40% della produzione di cAMP indotta dall'isoproterenolo; a conferma di ciò sta il fatto che incubando le cellule con analoghi di acidi grassi in grado di restituire fluidità alle membrane questo fenomeno regredisce completamente¹⁴.

Gli eventi finora descritti possono in parte spiegare le alterazioni della performance cardiaca e le anomalie sia strutturali che funzionali rinvenibili nel cuore cirrotico. E' stato dimostrato che la cirrosi epatica in stadio avanzato è associata ad una significativa disfunzione diastolica del ventricolo sinistro e ad un incremento dello spessore della parete

miocardica posteriore e del setto interventricolare^{15,16}. Tali affermazioni sono testimoniate da rilievi ecocardiografici che hanno messo in evidenza un incremento statisticamente significativo dei diametri dell'atrio sinistro e un alterato rilasciamento diastolico in questi soggetti. Bernardi et al.¹⁷ hanno valutato la risposta cardiovascolare all'attivazione simpato-adrenergica ottenuta mediante esercizio muscolare isometrico in un gruppo di pazienti con cirrosi e in un gruppo di controllo, utilizzando il calcolo degli intervalli sistolici. Il rapporto tra il periodo di pre-eiezione e il tempo di eiezione ventricolare si riduce in condizioni normali, come conseguenza della riduzione del valore del periodo di pre-eiezione; nel paziente cirrotico, invece, il rapporto tra questi due valori è prolungato significativamente rispetto ai controlli, suggerendo che le anomalie della contrattilità miocardica in risposta a stimoli simpato-adrenergici sono dovute ad un alterato accoppiamento elettromeccanico e inoltre questa alterazione è visibile anche all'ECG dove è stata rilevata una relazione tra il prolungamento dell'intervallo Q-T¹⁸ e la severità della disfunzione epatica e circolatoria sistemica.

I risultati di questi dati suggeriscono che buona parte dei pazienti con cirrosi epatica (>50%), in assenza di sintomi e segni di compromissione cardiaca a riposo, può essere affetta da una cardiomiopatia preclinica o latente che si rende manifesta, almeno all'inizio, solo durante stress fisici e che si estrinseca come disfunzione miocardica sisto-diastolica e con alterazioni dell'accoppiamento elettromeccanico della contrazione¹⁹.

Emodinamica circolatoria sindrome ipercinetica

Valore prognostico

da quanto finora esposto appare chiaro che la comparsa di questa sindrome in corso di cirrosi epatica assume un significato prognostico decisamente sfavorevole, determinando un aumento della morbilità e della mortalità nei pazienti che la sviluppano.

Il dato che risulta più importante e che fa assumere a questa sindrome valore prognostico negativo è legato al fatto che essa rappresenta il substrato patogenetico delle complicanze più temibili dell'insufficienza epatica quali la sindrome epato- renale, epato-polmonare e l'encefalopatia epatica. Tra l'altro, tale sindrome pare determini un'aumentata suscettibilità dei pazienti allo shock ed un maggiore rischio operatorio per i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico di derivazione portosistemica.

La sindrome circolatoria ipercinetica nelle fasi precoci della cirrosi

Dal punto di vista clinico le manifestazioni della sindrome circolatoria ipercinetica sono rappresentate da ipotensione arteriosa, aumento della pressione differenziale, vasodilatazione periferica, tachicardia, aumento della gittata cardiaca a riposo, estremità calde²⁰; ovviamente si tratta di elementi che possono essere oggettivati con diversa entità a seconda che il paziente si trovi o meno in uno stato di compenso epatico visto che la gravità di questa sindrome viaggia di pari passo con il deficit epato-funzionale.

Negli ultimi anni sono emerse numerose evidenze sperimentali che hanno fatto luce sul fatto che fattori diversi entrino in gioco nelle fasi precoci e tardive della cirrosi.

Nella fattispecie, sembra che uno dei meccanismi fondamentali della S.C.I. negli stadi precoci della cirrosi sia rappresentato dall'ipertensione portale, che provocherebbe una ritenzione idrosalina inizialmente subclinica, ma poi di entità tale da provocare espansione del volume extracellulare. Sembra infatti che lo stato circolatorio ipercinetico abbia primitivamente origine dal letto venoso splancnico come conseguenza dell'ipertensione portale sviluppatasi in seguito alla distorsione dell'architettura epatica e alla formazione o all'apertura di shunts artero-venosi o veno-venosi²¹. Ciò e ciò è testimoniato dal fatto che una normale funzione epatica, in presenza di ipertensione portale (come ad esempio nella trombosi delle vene sovraepatiche) non previene l'insorgenza di questo particolare stato circolatorio^{22,23}. Lewis et al.²⁴ nel 1992 hanno dimostrato che la gittata cardiaca può essere aumentata ancora prima che si renda manifesta la riduzione delle resistenze vascolari e che tale aumento è direttamente correlato ad un incremento del precarico cardiaco dovuto ad una ritenzione idrosalina determinante un'espansione del volume ematico totale.

Questi dati suggeriscono che l'espansione del volume extracellulare sia responsabile, attraverso un aumentato riempimento ventricolare diastolico, dell'incremento della gittata cardiaca a riposo osservata in caso di cirrosi. In uno studio del 1999²⁵ sono stati valutati, in pazienti con cirrosi epatica compensata sia in condizioni basali che dopo deplezione acuta di volume ematico, le resistenze vascolari periferiche e i livelli circolanti di catecolamine. Ai rilievi basali, gran parte dei pazienti mostravano i segni di un chiaro stato circolatorio ipercinetico; dopo la rimozione del 15% del volume ematico ottenuta mediante venipuntura, invece, si osservava una riduzione della gittata cardiaca e delle pressioni cardiache destre e un aumento delle resistenze vascolari periferiche fino a valori pressoché normali. Tutti i parametri misurati ritornavano poi ai valori basali dopo infusione di sostanze colloido-osmotiche in grado di

ripristinare il volume ematico circolante, sottolineando, in questo modo, che una significativa riduzione della volemia è in grado di far regredire lo stato circolatorio ipercinetico nei pazienti cirrotici in fase di compenso. Inoltre, un'ulteriore conferma a questi risultati ci viene dall'evidenza che molti pazienti con cirrosi epatica in stadio precoce e in assenza di segni e sintomi di alterazioni emodinamiche, sviluppano tale sindrome solo quando assumono la posizione supina^{26,27}, cioè quando il ritorno venoso al cuore è potenziato dalla traslocazione di una determinata quota di volume ematico dal distretto splancnico, dove si trova sequestrato a causa dell'ipertensione portale. Tale fenomeno è stato evidenziato in uno studio che prendeva la caratterizzazione dell'assetto emodinamico in un gruppo di pazienti con cirrosi compensata e in un gruppo di controllo sia in posizione eretta che dopo 60-120 minuti dalla manovra di tilting, dimostrando chiaramente l'incremento della gittata sistolica, della frequenza cardiaca, dell'output cardiaco e dell'indice cardiaco e la diminuzione delle resistenze vascolari periferiche in risposta alla variazione di postura^{27,28}

Quindi, in definitiva, sembra che l'ipertensione portale giochi un ruolo chiave nella genesi della sindrome circolatoria ipercinetica nelle fasi iniziali della cirrosi. L'aumento del volume ematico centrale (slatentizzato, almeno inizialmente, solo con l'assunzione della posizione supina) provocherebbe l'aumento della gittata cardiaca tramite un incremento sia della gittata sistolica che della frequenza cardiaca. In questo contesto, l'instaurarsi della vasodilatazione periferica può essere considerata un fenomeno secondario come espressione di un adattamento passivo del letto vascolare all'aumentata gittata conseguente all'aumento del volume ematico circolante.

La sindrome circolatoria ipercinetica nelle fasi avanzate della cirrosi

I meccanismi patogenetici che fino ad ora sono stati descritti avvengono anche nei pazienti con cirrosi in stadio avanzato²⁹, nei quali, però, si

verificano ulteriori alterazioni che portano la sindrome circolatoria ipercinetica alla sua piena espressione clinica; è infatti importante sottolineare ulteriormente che esiste una correlazione diretta tra la gravità della cirrosi e l'entità delle alterazioni emodinamiche rinvenibili in questi pazienti³⁰.

Una delle caratteristiche più importanti della compromissione cardiocircolatoria in questo stadio della malattia è rappresentata dalla significativa caduta delle resistenze vascolari periferiche e dalla riduzione della reattività cardiovascolare agli stimoli vasocostrittori. E' da tenere ben presente però che le alterazioni emodinamiche non coinvolgono uniformemente tutti i distretti vascolari e quindi la vasodilatazione periferica non è generalizzata, ma confinata solo ad alcune zone preferenziali. Infatti, la vasodilatazione coinvolge principalmente la circolazione splancnica³¹ e in minor misura quella polmonare³² mentre i distretti muscolare, cerebrale e soprattutto renale sono caratterizzati da vasocostrizione³³. Le cause di questa anomalia sono molteplici e verosimilmente riconducibili alla presenza di molte sostanze ad attività vasodilatatrice e alla presenza di difetti intrinseci della parete vasale dovuti, probabilmente, ad anomalie post-recettoriali³⁴. Gli studi condotti in tal senso sono numerosi e sono stati fatti sia su animali da laboratorio che sull'uomo e hanno mostrato chiaramente che gli effetti ipertensivanti dell'adrenalina, dell'angiotensina II, dell'endotelina-1 e di molte altre sostanze^{35,36} non avevano effetto sui soggetti affetti da cirrosi ormai scompensata.

D'altra parte, numerose sostanze vasodilatatrici, non adeguatamente inattivate dal fegato malfunzionante o riversate in circolo attraverso gli shunts porto-sistemici sono state via via incriminate, come ad esempio prostaglandine, acido gamma-ammino-butirrico, fattore di attivazione piastrinica, peptide vasoattivo, sostanza P, istamina, adenosina, fattore natriuretico atriale, TNF- α ecc..^{37,38} Tra tutte queste sostanze, l'ossido

nitrico è quello maggiormente chiamato in causa: uno studio del 2001 svolto negli USA ha dimostrato che esiste un forte squilibrio tra valori delle endoteline e valori di NO risultando le prime significativamente diminuite rispetto al secondo³⁹. Un altro studio del 1999 metteva a confronto pazienti cirrotici scompensati, pazienti con insufficienza renale, pz in terapia con nitroderivati e casi controllo: il risultato era che i pz con cirrosi e quelli che assumevano nitroderivati presentavano valori dei metaboliti del NO quasi sovrapponibili tra loro e comunque significativamente maggiori rispetto alle altre classi di pazienti studiate. L'ossido nitrico viene prodotto attraverso due diverse vie da due diversi enzimi: la NO-sintetasi inducibile e la NO-sintetasi costitutiva. Inizialmente si pensava che entrambi gli enzimi fossero coinvolti nella genesi della sindrome circolatoria ipercinetica; studi più recenti però hanno negato il ruolo dell'enzima inducibile^{40,41}. I pz cirrotici mostrano un importante aumento del rapporto nitriti/nitrati sierici (indice della generazione di NO) direttamente correlato alla gravità della cirrosi e soprattutto, correlato in modo diretto e lineare con i livelli plasmatici di endotossine⁴². Vale la pena citare due studi fatti sui ratti che confermano ulteriormente il ruolo del NO nella patogenesi della S.C.I. : la somministrazione di N-monometil-L-arginina, un potente inibitore della biosintesi del NO, su ratti resi cirrotici mediante tetracloruro di carbonio produceva un significativo incremento delle resistenze vascolari periferiche e della pressione arteriosa media, contemporaneamente a una diminuzione della gittata cardiaca⁴³. Analogamente la somministrazione di L-nitroargininametilestere a ratti cirrotici con ascite e sindrome circolatoria ipercinetica otteneva la normalizzazione dei livelli di cGMP (secondo messaggero del NO) e la normalizzazione dell'assetto emodinamico⁴⁴.

Concludendo, appare chiaro come la patogenesi della sindrome circolatoria ipercinetica in corso di cirrosi epatica sia complessa,

influenzata da molti fattori e ancora ricca di interrogativi irrisolti. Il meccanismo patogenetico di tale sindrome negli stadi avanzati della cirrosi si fonda sulle alterazioni emodinamiche primitivamente indotte dall'ipertensione portale che caratterizzano gli stadi precoci della malattia epatica, ma si arricchisce poi di nuovi elementi quali la disregolazione del tono vascolare, l'eccessiva produzione di NO e la neuropatia autonimica, che portano, così, la circolazione ipercinetica alla sua piena espressione clinica.

Ossido Nitrico

La biosintesi dell'Ossido Nitrico (NO) nelle cellule endoteliali ed in altri distretti dell'organismo avviene principalmente attraverso la trasformazione dell'aminoacido L-Arginina in Citrullina.

Fonti alternative di produzione non possono a tutt'oggi essere escluse. Analoghi della L-Arginina come la NG-monometil-L –Arginina (L-NMMA), agiscono da falsi substrati e sono inibitori selettivi della produzione di NO. Tali inibitori della NO-sintasi inducono un'importante riduzione della produzione sia di NO che di Citrullina. L'azione della L-NMMA può essere antagonizzata dalla L-Arginina ma non dalla D-Arginina.

La biosintesi di NO avviene per passaggi successivi. Il primo consiste nella trasformazione della L-arginina in idrossi-Arginina da parte della Nitrossido-sintasi. La idrossiarginina interagisce quindi con il perossido di idrogeno. A tale reazione segue la formazione di un ulteriore substrato intermedio che infine viene convertito in Citrullina liberando NO. Ne deriva che la sintesi di NO è caratterizzata da un complesso di attività enzimatiche, intimamente connesse tra loro⁴⁵.

La NO sintasi è stata purificata da diversi tessuti di mammifero. La forma endoteliale dell'enzima è detta costitutiva ed è una proteina di 1429 aminoacidi con una massa molecolare di ca 160 kDa. L'attività enzimatica può essere misurata sia nel citosol che a livello di membrana. Anche la forma neuronale della NO sintasi è costitutiva ma differisce da quella endoteliale in quanto è esclusivamente citosolica. Il termine costitutivo è stato introdotto per differenziare l'attività enzimatica presente nelle cellule endoteliali e nervose da quella inducibile che compare nei macrofagi (ed in altri tipi cellulari dotati di attività immunocompetente) a seguito di stimolazione costante quali endotossine e citochine (interferoni, interleuchine, TNF- alfa ecc.). La forma inducibile ha la caratteristica di non essere modulata nella sua attività dalla concentrazione intracellulare di calcio o dal complesso calcio-calmodulina. L'effetto quindi delle

citochine e delle endotossine è quello di regolare l'espressione genica dell'enzima, inducendone la sintesi⁴⁵.

L'NO è un radicale libero gassoso dell'azoto; una volta prodotto il NO presenta una emivita molto breve di circa 6 secondi ; esso è in uno stato intermedio di ossidazione per cui è in grado sia di ossidare che di ridurre i composti chimici con cui viene a contatto.

L'NO può interagire con l'ossigeno; con l'anione superossido; con l'ozono; con l'ossiemoglobina ed altre emoproteine; con composti solforati; con amine.

In presenza di Ossiemoglobina (HbO_3+O_2) l'NO reagisce con essa formando metaemoglobina. E nitrato (NO_3^-). Inoltre l'NO reagisce con il Ferro dell'eme e produce un nitrosil-eme.

Di particolare rilievo nell'ambito delle interazioni biochimiche è la reazione dell'NO con la guanilato ciclasi solubile che rappresenta il vero recettore per il NO.

L'interazione con il ferro dell'eme contenuto nella guanilato ciclasi solubile, produce una modificazione conformazionale dell'enzima che, nella forma nitrosilata, è attivo e catalizza a sua volta la sintesi e quindi l'aumento della concentrazione intracellulare di GMP ciclico a partire dal GTP. L'NO non è invece capace di attivare la Guanilato ciclasi di membrana.

La muscolatura liscia rappresenta uno dei bersagli principali dell'azione biologica del NO. Prodotto nelle cellule endoteliali il NO penetra per diffusione nelle cellule muscolari lisce dove attiva la Guanilato Ciclasi solubile: l'aumento dei livelli intracellulari di cGMP ha effetti inibitori sulla contrazione delle cellule muscolari lisce ed è quindi responsabile del rilasciamento della muscolatura della parete vasale. Il cGMP pertanto rappresenta il vero mediatore della vasodilatazione. Il cGMP è rapidamente metabolizzato da una fosfodiesterasi (PDE) che lo trasforma nella sua forma inattiva GMP. Si conoscono 6 tipi di PDE e diversi isoenzimi per ogni tipo. Per esempio la fosfodiesterasi che catabolizza l'

AMPc , responsabile nell'attiva contrazione delle cellule cardiache ,PDE3 è diversa da quella che catabolizza il GMPc, la PDE5. Recentemente , la prospettiva di inibire una Fosfodiesterasi anziché un'altra , ha fatto nascere nuovi campi di ricerca con applicazioni in clinica molto interessanti come la cura della disfunzione erettile ad opera proprio dei composti che inibiscono la PDE5.

Composti capaci di rilasciare direttamente od indirettamente NO, quali i nitroderivati (nitroglicerina, nitro prussiato di sodio, ecc..) sono potenti vasodilatatori da tempo usati in alcune patologie cardiovascolari. Vi sono poi sostanze capaci di inibire la nitrossido sintasi come la L-NMMA o la N-nitro-L-arginina ed il blue di metilene⁴⁵.

Una ridotta biodisponibilità di NO determina non solo un impairment nella vasodilatazione endotelio-dipendente, bensì anche una attivazione flogistica dell'endotelio.

Per contro, lo stesso NO (assimilabile ad una specie reattiva dell'azoto), può trasformarsi da protettore a patogeno legando l'anione superossido e, quindi , trasformandosi prima in perossinitrito e successivamente in acido perossinitroso. In sintesi l'NO induce una serie di azioni protettive come la vasodilatazione e l'inibizione endoteliale. In patologia invece, durante stimolo infiammatorio cronico e soprattutto in presenza di agenti ossidanti come l'anione superossido, la stessa NO sintetasi contribuisce in modo fondamentale alla continua formazione di perossinitrito e di acido perossinitroso, con conseguenze deleterie sulla modulazione della vasomotilità ed accensione dell'aterogenesi^{46,47}.

Metodi di Misurazione dell'Ossido Nitrico

L'ossido nitrico (NO) è un gas ubiquitario oltre che un radicale libero. Può fungere anche da secondo messaggero e per questo presenta numerose funzioni regolatrici in differenti tessuti⁴⁸. L'NO quando rilasciato dall'endotelio vascolare polmonare, contribuisce alla riduzione delle resistenze vascolari. L'NO, quando inalato in concentrazione di 40 ppb (part per billion) determina una importante vasodilatazione polmonare. Si pensa che l'NO gassoso possa essere scambiato tra lo spazio delle vie aeree e le cellule muscolari lisce delle arterie di resistenza polmonari che si trovano in prossimità con le membrane delle vie aeree^{49,50}.

La misurazione diretta del NO nei tessuti biologici risulta molto difficile. Infatti il NO in quanto gas presenta un'emivita di pochissimi secondi ed infatti reagisce nel sangue rapidamente con l'emoglobina o con altre proteine contenenti Ferro²⁺ producendo nitriti (NO₂⁻) e nitrati (NO₃⁺)^{51,52}.

Vi sono metodi in vivo, per la misurazione indiretta dell'NO. Uno di questi è rappresentato dal dosaggio della citrullina, il co-prodotto della sintesi enzimatica del NO attraverso la NO-sintetasi^{51,52}. Un altro metodo è rappresentato dal dosaggio dei nitrati/nitriti nel sangue e/o nelle urine, che sono prodotti stabili del metabolismo del NO. Mentre il NO nei tessuti viene rapidamente distrutto, nell'aria esso risulta relativamente stabile a basse concentrazioni⁵². Pertanto il NO escreto nelle vie aeree può essere rilevato nell'aria espirata. La tecnica maggiormente utilizzata per misurare il nitrossido nell'aria espirata è rappresentata dalla metodica a chemiluminescenza: Il nitrossido reagisce con ozono (O³) producendo NO₂ che presenta un elettrone in uno stato eccitato (NO₂^{*}). IL NO₂^{*} ritornando allo stato stabile NO₂ emette radiazioni elettromagnetiche con un range che va da 600-3.000 nm in lunghezza d'onda. La chemiluminescenza viene analizzata da un tubo fotomoltiplicatore che proporzionalmente converte la luminescenza in segnale elettrico che viene poi quantificato ed espresso su un display. Il metodo a

chemiluminescenza presenta un elevatissima sensibilità potendo detectare concentrazioni di NO espirato anche di 1 ppb (part per billion). Questa tecnica è molto semplice da effettuare. Altre tecniche che sono state utilizzate per misurare la presenza del NO nell'aria espirata sono: la spettrometria di massa e la spettrometria con gas cromatografia di massa (GC-MS)⁵².

Esiste a tutt'oggi un enorme confusione in letteratura sull'origine della produzione del NO che poi viene riscontrato nell'aria espirata. Alcuni autori hanno suggerito il NO espirato è prodotto esclusivamente nel polmone. Altri autori hanno ipotizzato che il NO fosse prodotto nella regione terminale dell'albero bronchiale. Altri ancora hanno dimostrato che il NO espirato viene prodotto prevalentemente nelle alte vie respiratorie. Infatti in tutti i soggetti studiati sono state riscontrate concentrazioni di NO maggiori nell' espirato nasale rispetto all'espriato orale.^{53,54,55}

Ossido Nitrico e fegato

Nel fegato in condizioni fisiologiche sono presenti tutte e tre forme di NO sintasi, inducibile costitutiva e neuronale^{56,57}. La eNOS è stata identificata e caratterizzata nelle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici. Essa può contribuire alla distribuzione locale della perfusione e della pressione portale^{58,59}. La iNOS può essere indotta in molte cellule epatiche come: Macrofagi, cellule endoteliali, epatociti e cellule stellate epatiche, colangiociti^{60,61}. La iNOS è virtualmente assente nel fegato normale, tuttavia essa aumenta in modo marcato in risposta a stimoli infiammatori ed a stress ossidativo. Questo porta ad ipotizzare che la iNOS e non la eNOS contribuisce a mantenere la perfusione sinusoidale in risposta a vari stress ossidativi⁶². Inoltre è stato identificato per il nitrossido un ruolo oltre che come fattore protettivo capace di indurre

vasodilatazione anche come mediatore di danno cellulare. In particolare attraverso l'induzione della iNOS a livello degli epatociti e delle cellule del Kupffer esso agirebbe attraverso la formazione di perossinitrito con aumento della permeabilità mitocondriale, danno al DNA, nitrosilazione delle tirosine⁶³.

Numerosi studi sono stati effettuati allo scopo di misurare i livelli di nitrossido nei pazienti epatopatici e prevalentemente in quelli cirrotici in fase scompensata. In questi pazienti si verificano infatti complicanze emodinamiche che sono poi alla base di alterazioni respiratorie e cardiovascolari^{64,65,66}.

I pazienti con cirrosi epatica scompensata possono presentare di frequente la sindrome epato-polmonare. Tale sindrome è caratterizzata da una triade: disfunzione epatica, dilatazione vascolare polmonare e ridotta ossigenazione arteriosa che si manifesta con ipossiemia. L'ipossiemia può peggiorare o rendersi più evidente nel passaggio dalla posizione supina a quella ortostatica (ortodioxia)^{67,68}.

Tale sindrome è generata dalla presenza di shunt artero-venosi a livello polmonare e/o da vasodilatazione dei capillari arteriosi polmonari. Questo determina un mismatch tra la perfusione e ventilazione. Il fattore attualmente ritenuto più importante nella genesi delle alterazioni polmonare in questi pazienti è l'Ossido nitrico. L'NO è un importante vasodilatatore di origine endoteliale, che contribuisce in fisiologia a mantenere un normale tono vascolare anche a livello polmonare⁶⁹.

Inoltre, è stato attribuito al Nitrossido un ruolo fondamentale anche nello sviluppo della sindrome ipercinetica iperdinamica, caratterizzata da aumento della gittata cardiaca, basse resistenze sistemiche ed ipotensione arteriosa, presente di frequente negli stadi avanzati dei pazienti cirrotici.

Pertanto numerosi studi sono stati effettuati in questi pazienti allo scopo di misurare i livelli di NO. In tali studi sono stati riscontrati elevati livelli di ossido nitrico sia direttamente nell'aria espirata che indirettamente

come elevati livelli di nitrati e nitriti nel siero e/o nelle urine, nei pazienti cirrotici specialmente nei pazienti scompensati⁶⁹. Si è ipotizzato pertanto che i pazienti con cirrosi epatica possano avere una continua stimolazione della nitrossido sintasi endoteliale dalle endotossine circolanti e/o dalle citochine circolanti come il TNF-alfa⁷⁰. Alcuni esperimenti hanno dimostrato infatti che i monociti circolanti dei pazienti con cirrosi epatica presentano un aumento in vitro della produzione di TNF alfa⁷¹. Inoltre anche le cellule del Kupffer producono NO in vitro quando stimolate con lipopolisaccaridi e con citochine. Nel sistema respiratorio vi sono numerose linee cellulari che presentano un'attività NO-sintetizzante come le cellule epiteliali e le cellule muscolari lisce dell'albero bronchiale; è stato dimostrato che in vitro queste cellule quando stimolate da citochine, producono grosse quantità di NO. A queste linee cellulari alcuni autori attribuiscono la produzione di NO riscontrato nell'aria espirata dei pazienti con cirrosi epatica⁶⁹. La somministrazione di blu di metilene un potente inibitore della guanilato ciclasi e della iNOS ripristina l'ipossiemia nei pazienti con sindrome epatopolmonare.

Altri studi hanno differenziato il sito di origine della produzione di NO espirato dei pazienti cirrotici rispetto a quelli asmatici. Hanno infatti stabilito che nei pazienti asmatici il NO veniva prodotto a livello bronchiale mentre nei pazienti cirrotici a livello alveolare⁷².

A proposito di queste ultime considerazioni risulta utile ed esaustivo ricordare il ruolo dell'Ossido Nitrico in alcune malattie dell'apparato Respiratorio:

Numerosi studi sono stati effettuati recentemente sulle variazioni della concentrazione del NO espirato nei pazienti affetti da malattie delle vie respiratorie come l'asma, la fibrosi cistica e la pertosse⁷³. Sono stati riscontrati infatti elevati livelli di NO espirato nei pazienti con Asma e ridotti livelli nella fibrosi cistica⁷⁴. Nella pertosse si pensa che il NO possa essere implicato nella patogenesi di questa malattia. Infatti inibitori della

NO sintasi riducono drasticamente gli effetti del danno epiteliale delle citochine rilasciate dalla bordetella pertossis⁷³. In questo caso si pensa al possibile ruolo pro infiammatorio del peossinitrito e dell'acido perossinitroso capaci di attivare la cascata infiammatoria per mezzo dell'attivazione della ciclossigenasi e metallo proteinasi^{75,76}. Inoltre, è stato ormai appurato che i livelli di NO espirato possono guidare il clinico sulla diagnosi e sul monitoraggio di alcune di queste malattie e guidare il clinico sul differente dosaggio di alcuni farmaci come i glucocorticoidi. I glucocorticoidi infatti inibiscono l'espressione della nitrossido sintetasi⁷⁷.

Agenti infettivi ed aterosclerosi

Negli ultimi anni si è verificata una rivoluzione nel modo di porsi verso la malattia aterosclerotica coronarica. La certezza, ormai radicalizzata, che la malattia fosse definita in tutti i suoi aspetti, in particolare quelli eziopatogenetici, è venuta a mancare. Sono stati infatti accantonati alcuni classici denominatori e definitori della malattia; parametri considerati oramai come unici fattori di rischio, i soli collegati all'incidenza della malattia: dislipidemia, ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, poi ancora diabete, obesità, inattività fisica, nonché familiarità, età e sesso maschile. Sono stati oggi infatti individuati nuovi fattori di rischio e quindi nuovi meccanismi patogenetici correlati ad essi. Verso questi fattori l'attenzione è oramai globale ed è finalizzata alla ricerca di nuove frontiere di prevenzione controllo e diagnosi. In particolare si sta tendendo sempre più verso una terapia rivoluzionaria e razionale della cardiopatia ischemica.

I nuovi fattori di rischio sono oggi considerati: Infezioni, malattie infiammatorie croniche, alterazioni immunitarie, alterazioni biochimiche dei meccanismi infiammatori, iperomocistinemia.

In particolare, numerose pubblicazioni hanno evidenziato che la patogenesi infettiva può giocare un ruolo importante nel processo aterosclerotico. Le infezioni potrebbero aggredire l'endotelio vascolare o direttamente o indirettamente attraverso meccanismi di risposta immunitaria⁷⁸.

Alcuni agenti infettivi sono reputati i più probabili attivatori dei meccanismi infiammatori e riconosciuti pertanto come nuovi fattori di rischio cardiovascolare. Alcuni studi hanno dimostrato infatti una correlazione tra l'incidenza di aterosclerosi e la presenza di alcuni microrganismi: 1) Batterici ,come la *Chlamydia pneumoniae* e l'*Helicobacter pylori* 2) Virali, come l'Herpes simplex ,il Citomegalovirus, l'Epstein Barr ed il coxsackie B Virus⁷⁸. Tali microrganismi sono stati identificati nelle lesioni ateromatose delle arterie coronarie e in altri organi in alcune casistiche autoptiche ; l'incremento del titolo anticorpale contro tali microrganismi è stato utilizzato come fattore predittivo per le malattie cardiovascolari. Tali microrganismi agirebbero come agenti stressanti per l'endotelio, responsabili perciò di quelle alterazioni biochimiche e risposte cellulari altamente specifiche che possono essere descritte come una malattia infiammatoria^{79,80}. Ultimamente anche l'HIV è stato chiamato in causa nel determinismo di lesioni aterosclerotiche riscontrate in pazienti che ne erano affetti in assenza di fattori di rischio cardiovascolare^{80,81}.

Secondo la teoria così detta della "risposta al danno" , un danno della parete endoteliale sarebbe il momento iniziale dello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche .

Il concetto di danno ha assunto un significato più ampio della semplice alterazione anatomo-patologica, si è esteso infatti anche alla compromissione funzionale, con cellule endoteliali anche se strutturalmente integre ma con perdita della loro antitrombogenicità e/o con possibile innesco dei meccanismi trombogenici normalmente non operanti.

Infatti, l'endotelio normalmente produce sostanze dotate di intensa attività antiaggregante piastrinica e nel contempo vasodilatante come la prostaciclina e l'EDRF o nitrossido che è anche capace di inibire l'adesione piastrinica . L'endotelio, è la sede dove operano i meccanismi fisiologici di inibizione della coagulazione per la presenza dei cofattori specifici come L'antitrombina III , il sistema proteina C, proteina S e il cofattore eparinico II. E' la sede ove si produce l'attivatore tissutale del plasminogeno .

Le alterazioni funzionali dell'endotelio e quindi il danno, provocano la sintesi e l'espressione da parte dell'endotelio stesso di molecole di adesione (tra cui le selettine) per monociti, linfociti e piastrine ,da cui si innescherà il processo aterosclerotico ⁸²

Numerose osservazioni fisiopatologiche, nell'uomo e nell'animale, hanno portato alla formulazione dell'ipotesi "response to injury" cioè le lesioni aterosclerotiche rappresentano una serie di risposte cellulari e molecolari altamente specifiche che possono essere descritte come una malattia infiammatoria . Qualora la risposta infiammatoria iniziale non neutralizzi efficacemente o non rimuova l'agente insultante, essa può continuare indefinitivamente , ed aversi così: 1) stimolazione della migrazione e della proliferazione delle cellule; 2) liberazione di molecole vasoattive come citochine e fattori di crescita; 3)accumulo delle cellule mononucleate e lipidi ossidati; 4) migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce, fino alla formazione di una lesione aterosclerotica .

Virus Epaititici ed Aterosclerosi

Il possibile ruolo di alcuni agenti infettivi come (Citomegalovirus, Epstein Barr Virus; Chlamydia Pneumoniae e Helicobacter Pylori) nello sviluppo dell'aterosclerosi è stato già descritto da numerosi studi.

Recentemente, alcuni studi hanno inoltre dimostrato una correlazione significativa tra infezione da HCV ed HBV e la presenza di placche aterosclerotiche alle carotidi nella popolazione generale ⁸³.

L'HCV RNA è stato localizzato all'interno di lesioni aterosclerotiche carotidiche di pazienti HCV+ (che si sottoponevano a rivascolarizzazione carotidea⁸⁴).

Inoltre, un recentissimo studio ha evidenziato che l'infezione da HCV rappresenta un fattore di rischio indipendente nello sviluppo di severe lesioni aterosclerotiche coronariche ⁸⁵.

Tali risultati hanno destato inizialmente stupore perché si era ritenuto da tempo che i pazienti epatopatici cronici soprattutto i cirrotici avevano una protezione cardiovascolare generata indirettamente da alcune anomalie metaboliche come una riduzione dei livelli di colesterolo, del numero di piastrine ed una maggiore propensione per uno stato di coagulazione.

Calcificazioni Vascolari

Fisiologicamente l'invecchiamento porta con sé la progressiva deposizione di minerali di calcio nelle grandi arterie. Ciò che ne consegue è una riduzione dell'elasticità aortica ed arteriosa, che compromette l'emodinamica cardiovascolare e induce morbilità e mortalità sotto forme diverse (Ipertensione arteriosa, stenosi aortica, ipertrofia cardiaca, ischemia cardiaca o muscolare periferica, scompenso ecc..)

Se fino a qualche anno fa la calcificazione vascolare era vista come

qualcosa di degenerativo e passivo, oggi è considerato un processo patobiologico che molto condivide con la formazione dell'osso in fase embrionale ed attira su di se l'attenzione della comunità scientifica internazionale.

Stimoli aterogenici come citochine infiammatorie, lipidi ossidati e produzione di monociti macrofagi promuovono l'osteogenesi e la calcificazione della matrice in cellule di coltura^{85,86} Le basi cellulari delle calcificazioni valvolari e quindi della ossificazione eterotopica sono state chiarite da Mohler et al⁸⁷ che ha dimostrato, attraverso lo studio anatomopatologico di valvole cardiache calcifiche, la presenza di vari gradi di ossificazione e di infiltrati infiammatori: Mohler infatti, ha riscontrato: Calcificazioni distrofiche, lamelle ossee mature, rimodellamento osseo attivo, formazione di osso endocondrale (fenomeno comunemente riscontrato nella riparazione delle fratture ed anche nella fibrodisplasia ossificante progressiva FOP). Inoltre ha dimostrato la presenza della BMP2/4, (proteina morfogenetica dell'osso); della osteopontina, osteocalcina ed osteonectina. Inoltre, nelle aree di ossificazione e di calcificazione distrofica ha riscontrato macrofagi ed aggregati linfocitari nonché mastcellule. Queste ultime poi sono state chiamate in causa da alcuni autori proprio come le responsabili della liberazione di potenti mediatori dell'infiammazione: metallo proteinasi, serin-proteasi, chinasi, catepsina, istamina, TNF- α , PGD2 e leucotrieni⁸⁸. In sintesi l'attivazione di queste linee cellulari porterebbe al rilascio di tutta una serie di citochine, chemiochine, fattori di crescita ed enzimi idrolitici, capaci di contribuire all'angiogenesi, all'aterosclerosi, alla calcificazioni e quindi all'ossificazione delle valvole. In conclusione i risultati di questi studi hanno definito che la patogenesi delle calcificazioni valvolari cardiache (ossificazioni e della differenziazione endocondrale delle valvole) può essere definite come il risultato di processo infiammatorio cronico e non come un semplice processo passivo degenerativo. Molto importante inoltre è stata il significato prognostico

attribuito da alcuni studi alle calcificazioni valvolari cardiache. Questi studi hanno evidenziato che i pazienti che presentano calcificazioni valvolari, hanno una maggiore prevalenza di patologie coronariche e possono costituire pertanto dei predittori di coronaropatia e di mortalità cardiovascolare.⁸⁹

PARTE SPERIMENTALE

Premessa

I dati della letteratura riportati nel capitolo precedente costituiscono la premessa da cui parte questo approccio sperimentale.

In Sintesi:

La compromissione dell'apparato cardiocircolatorio rappresenta un'evenienza frequente in corso di cirrosi epatica.

Sono state infatti identificate in questi pazienti tutta una serie di alterazioni istopatologiche del miocardio capaci di alterare l'equilibrio del miocita oltre che delle cellule deputate alla conduzione elettrica intrinseca del cuore, con possibili complicanze cardiache acute gravi, temibili per la vita del paziente. Inoltre, nelle fasi più avanzate della malattia, risulta di frequente riscontro La Sindrome Cardio-Circolatoria Ipercinetica (SCI) che quando presente rappresenta un fattore prognostico sfavorevole tale da determinare un aumento significativo della morbilità e mortalità .

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi scientifici che hanno dimostrato aumentati livelli di ossido nitrico (NO), sia nell'aria espirata (NO_e) che nel siero e nelle urine (NO₂/NO₃) dei pazienti con cirrosi epatica.

La maggior parte di questi studi ha analizzato generalmente come campione oggetto dello studio un gruppo di pazienti cirrotici con ipertensione portale, cioè pazienti in stadi avanzati di epatopatia.

In questi pazienti, peraltro, si verificano quasi sempre condizioni di alterata emodinamica circolatoria come : 1) La sindrome Circolatoria-iperinetica-iperdinamica; 2) la sindrome epato-polmonare; 3) la sindrome epato-renale. Tali anomalie, interessano generalmente tutto il sistema cardiocircolatorio e possono dunque sovrapporsi verosimilmente ad altre anomalie funzionali e strutturali cardiache che probabilmente sono presenti già nelle fasi molto precoci dell'epatopatia.

Verosimilmente, infatti, la compromissione dell'apparato cardiovascolare in questi pazienti, potrebbe essere già presente nelle fasi iniziali della malattia epatica, ma in forma sub-clinica, tanto da venire misconosciuta e sottovalutata. Lo scopo del nostro studio è stato quello di dimostrare che nel paziente epatopatico ad etiologia virale, alcune alterazioni cardiovascolari, sono presenti non solo nella malattia cirrotica avanzata ma anche negli stadi di epatopatia lieve. In particolare, secondo la nostra opinione, tali alterazioni sarebbero attribuibili non solo alle alterazioni emodinamiche indotte dalla cirrosi, ma bensì ad un danno diretto dei virus epatitici che inizia molto tempo prima.

Fasi dello Studio

Il lavoro è stato suddiviso in due fasi fondamentali.

Nella prima fase di questo studio, abbiamo analizzato la frequenza di alcune anomalie cardiovascolari in una popolazione di pazienti con cirrosi epatica in diverso stadio di scompenso (Child A; Child B; Child C) ed a diversa etiologia virale (HCV; HBV ;HBV+HCV);

Nella seconda fase, più articolata, abbiamo poi voluto verificare, in un gruppo più selezionato di pazienti, la reale incidenza di queste alterazioni e formulare ipotesi circa la patogenesi di questi disordini.

Prima Fase

Metodi

La prima fase di questo lavoro è stata caratterizzata da uno studio ecocardiografico osservazionale, analitico, retrospettivo.

Sono stati infatti analizzati esami ecocardiografici (VHS o supporto digitale ed i rispettivi referti) di 42 pazienti con cirrosi epatica a differente etiologia virale, di cui 23 M e 19 F.

La diagnosi di cirrosi era stata posta sulla base dei dati clinici, laboratoristici e strumentali ed in 38/42 anche sul dato bioptico.

Questi pazienti presentavano diversa etiologia virale e diverso stadio di scompenso clinico.

Abbiamo pertanto suddiviso i pazienti in tre sottogruppi in base al tipo di infezione virale (HCV; HBV; HCV+HBV) e successivamente in tre classi secondo il punteggio Child-Pugh (Classe A: 5-6; Classe B: 7-9; Classe C: 10-15) che esprime il scompenso clinico.

Abbiamo poi considerato i pazienti cirrotici in stadio Child B e C , come un unico gruppo di pazienti scompensati rispetto ai pazienti in stadio Child A in fase di scompenso.

Le caratteristiche generali dei due gruppi di pazienti studiati erano sostanzialmente sovrapponibili .

Per ogni gruppo, alcuni di questi pazienti, presentavano fattori di rischio cardiovascolare : Diabete Mellito tipo 2; Ipertensione Arteriosa; Fumo.

Abbiamo utilizzato come gruppo di controllo, un gruppo di 56 soggetti sani in assenza di fattori di rischio cardiovascolare.

In tutti i pazienti sottoposti ad esame ecocardiografico era stata valutata:

1) La funzione diastolica ventricolare, attraverso la misurazione del flusso transmitralico, effettuato con PW doppler con analisi del tempo di rilasciamento isovolumetrico (IVRT) e del rapporto E/A; 2) Il diametro dell'atrio sinistro valutato in sezione 4 camere apicale; 3) Lo spessore della parete del ventricolo sinistro in modalità monodimensionale; 4) La frazione di eiezione (FE %) attraverso la formula di Simpson e la gittata cardiaca (GC); 5) La prevalenza di calcificazioni valvolari ed il grado di disfunzione delle valvole.

Risultati

(Prima fase)

I dati ottenuti sono riportati nelle tabelle 1, 2, 3 e 4; dal loro esame è possibile rilevare che:

I pazienti con cirrosi epatica presentavano una graduale inversione del rapporto E/A (onde di flusso trans-mitralico, evidenziate con il doppler pulsato), un aumento della Gittata cardiaca oltre che della Frazione d'Eiezione e della Frequenza Cardiaca (FC) (tabella 2).

Abbiamo poi riscontrato un elevata frequenza di calcificazioni valvolari, (prevalentemente mitraliche e aortiche) (Cirr.83% vs 25%) (tabella 3).

Questo dato ha destato molta curiosità soprattutto legato al fatto che, in seguito ad una accurata ricerca bibliografica, non abbiamo rilevato nessuno studio che parlasse di calcificazioni valvolari in un cuore

cirrotico.

Non abbiamo riscontrato correlazioni significative tra la frequenza di calcificazioni e il tipo di etiologia virale (tabella 4).

I pazienti con cirrosi scompensata (stadio Child B + C) presentavano una frequenza maggiore di calcificazioni valvolari rispetto ai pazienti con Cirrosi compensata (stadio Child A). Peraltro, nel caso specifico, il gruppo di pazienti con cirrosi Child B+C presentava una maggiore prevalenza di fattori di rischio cardiovascolari rispetto ai pazienti cirrotici Child A ed erano in media 4 anni più anziani. Pertanto, non risultava possibile stabilire una correlazione tra lo stadio di gravità della malattia e la frequenza delle calcificazioni.

Inoltre, in un sostanziale numero di soggetti cirrotici è stata evidenziata la presenza di insufficienza valvolare (mitralica e aortica) (71% vs 33%) di lieve entità.

In definitiva, da tale studio è emerso un dato molto interessante, non presente in letteratura e cioè che i pazienti con cirrosi epatica ad etiologia virale presentavano anomalie valvolari cardiache consistenti in evidenti calcificazioni valvolari con lievi deficit funzionali.

Ci siamo pertanto interrogati su quale fosse il possibile meccanismo fisiopatologico sotteso alle calcificazioni. Da tali presupposti scientifici, infatti, nasce l'ipotesi che ha dato origine alla seconda fase del nostro studio.

Seconda Fase

(Studio osservazionale, analitico, prospettico)

Premessa alla seconda fase

Abbiamo visto che la compromissione dell'apparato cardiocircolatorio rappresenta un'evenienza frequente in corso di cirrosi epatica. Inoltre, risulta già appurato in letteratura che nel paziente cirrotico esistono aumentati livelli di nitrossido (NO), riscontrati oltre che nel circolo ematico (NO₂/NO₃) anche nell'aria espirata (NOe).

Nella prima fase di questo nostro studio abbiamo evidenziato che i pazienti affetti da cirrosi epatica presentano anomalie valvolari cardiache consistenti in evidenti calcificazioni valvolari con lievi deficit funzionali.

Partendo da questi presupposti, abbiamo voluto ricercare, attraverso uno studio mirato, analitico, prospettico, se le calcificazioni valvolari sono presenti anche nei pazienti affetti da lieve epatopatia, (segni istologici di epatite cronica - non cirrosi;) e se i livelli di nitrossido espirato (NOe) sono aumentati anche in questi pazienti. Abbiamo inoltre studiato un nuovo gruppo di pazienti cirrotici ma in fase di compenso (Child A) in assenza di fattori di rischio CV.

Abbiamo infatti ipotizzato che il meccanismo fisiopatologico sotteso alle calcificazioni valvolari nei pazienti con cirrosi epatica sia da attribuire non solo alle complicanze emodinamiche e/o metaboliche indotte dalla cirrosi stessa ma verosimilmente ad un danno diretto (citolitico) o indiretto (immunomediato) da parte dei virus epatitici. Tali calcificazioni sarebbero infatti comunque presenti anche moltissimi anni prima che si verifichi la patologia cirrotica, purché vi sia una esposizione cronica e prolungata ai virus (come avviene nell'epatite cronica).

Inoltre, abbiamo ipotizzato che i livelli di NO possano risultare aumentati molto tempo prima della comparsa della cirrosi e che questo possa rappresentare l'espressione biochimica (marker) del danno arrecato dai virus epatitici all'endotelio vascolare e quindi valvolare.

Scopi

Gli scopi del nostro studio sono stati:

1) Ricercare con ecocardiografia le calcificazioni valvolari nei pazienti con epatite cronica HCV+ e nei pazienti con cirrosi epatica HCV+ in stadio Child A (cirrosi non scompensata); *in assenza di fattori di rischio cardiovascolare e di malattie del connettivo .*

2) Ricercare in questi pazienti i livelli di nitrossido espirato.

Naturalmente sono stati esclusi tutti i pazienti con malattie dell'albero respiratorio acute e/o croniche e con storia di atopia per eliminare le possibili interferenze al test diagnostico del Nitrossido espirato.

3) Definire una nuova ipotesi patogenetica e cioè che i virus epatitici possano essere responsabili, di un danno cardiaco strutturale che nel caso specifico si esprimerebbe come calcificazioni delle valvole cardiache.

4) Ipotizzare, un possibile ruolo per il Nitrossido (NO) quale marker di danno endoteliale nei pazienti epatopatici esposti cronicamente ai virus epatitici.

METODI

1) Arruolamento dei casi.

Criteri fondamentali di inclusione :

- Tutti i pazienti affetti da epatite cronica (EC)HCV +, indipendentemente dalla presenza di ipertransaminasemia e dall'eventuale trattamento antivirale effettuato, purché vi sia stata un'esposizione cronica al virus per un lungo periodo (stimato dai 7 agli 11 anni).

- Pazienti affetti da cirrosi epatica HCV + in stadio Child A

La diagnosi di epatite cronica e di cirrosi era stata posta sulla base del dato biotico oltre che sull'insieme dei dati clinici, laboratoristici e strumentali.

Criteri di esclusione :

- Epatopatia ad etiologia virale diversa da quella HCV + **

- Epatopatia ad etiologia non virale (Alcolica, autoimmune, infiltrativa, criptogenetica ecc..)

- Anamnesi o segni clinici attivi di malattia reumatica e/o altre malattie del connettivo quali : LES, artrite reumatoide, spondilite anchilosante ecc..;

- Presenza di fattori di rischio cardiovascolari, quali: Diabete Mellito tipo 1 o tipo 2, ipertensione arteriosa, dislipidemia, fumo.

- Malattie acute e croniche delle alte e basse vie respiratorie : Poliposi nasale, rinite allergica, asma, BPCO;

- Storia di atopia .

Questi ultimi criteri, peraltro, molto restrittivi, se da un lato hanno reso il campione omogeneo, dall'altro ne hanno condizionato il numero.

In totale, in questa seconda fase dello studio, sono stati selezionati 34 pazienti epatopatici HCV+, in assenza di fattori di rischio cardiovascolare, malattie del connettivo, malattie dell'apparato respiratorio e storia di

atopia di cui 18 con Epatite Cronica e 16 con Cirrosi epatica (compensata) e sono stati confrontati con un gruppo di 26 controlli sani.

** Sono stati inclusi nello studio solo i pazienti epatopatici HCV+ per i seguenti motivi:

- 1) La diagnosi di sieropositività per questi pazienti (a differenza dell'epatite HBV+) viene effettuata sempre oltre che con la dimostrazione degli anticorpi anche attraverso l'analisi del genotipo Virale e della Viremia. Questo ci ha permesso di avere a disposizione altre variabili qualitative e quantitative da confrontare poi nell'analisi definitiva.
- 2) Esiste a tutt'oggi una maggiore attenzione da parte della comunità scientifica internazionale verso il virus dell'epatite C (HCV) ; per tale virus infatti non esiste a tutt'oggi disponibilità di un vaccino.

2) Test diagnostici:

- Esame ecocardiografico transtoracico bidimensionale, color-doppler:

E' stata valutata la funzione diastolica ventricolare, attraverso la misurazione del flusso transmitralico, effettuato con PW doppler con analisi del tempo di rilasciamento isovolumetrico (IVRT), del rapporto E/A e del tempo di decelerazione (DT), il volume dell'atrio sinistro valutato in 4 camere apicale calcolato con la formula dell'Area-length, le dimensioni e lo spessore della parete del ventricolo sinistro in modalità monodimensionale, la frazione di eiezione (FE %) con la formula di Simpson e la gittata cardiaca (GC). La GC è stata valutata attraverso la formula: Stroke volume x Frequenza Cardiaca. Lo stroke volume è stato valutato attraverso ecocardiografia M-mode⁹⁰ E' stata ricercata la presenza di calcificazioni valvolari intese ecograficamente come aree o noduli ecorifrangenti singoli e/o diffusi visibili in M e/o in B-mode. Sono stati valutati altresì il grado di disfunzione delle valvole.

- Misurazione dei livelli di ossido nitrico espirato:

Il test è stato condotto utilizzando un analizzatore stazionario a chemiluminescenza con una sensibilità di analisi da un minimo di 1 ad un massimo di 100 ppb (part per billion). La misurazione è stata condotta in accordo alle raccomandazioni ATS/European Respiratory Society per gli adulti⁹¹. La misurazione è stata effettuata ad almeno tre ore dal pasto ed a riposo, in posizione seduta. L'analizzatore è stato sottoposto a calibrazione giornaliera.

Tutti i soggetti sono stati invitati ad effettuare una profonda inspirazione (previo posizionamento di una clip nasale) e ad espirare lentamente contro una pressione costante di 20cm di H₂O ad un flusso costante di 50 mL/s. La media di tre misurazioni successive è stata utilizzata quale valore definitivo. **Esame spirometrico** : Prima di effettuare il test del NO espirato, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame spirometrico per escludere eventuali patologie respiratorie.

- Compilazione di una scheda anagrafica

Sono stati annotati i dati personali, i dati clinici fondamentali e quelli strumentali, compresa viremia e genotipo virale; è stata calcolata la durata media della malattia. Tuttavia, non è stato possibile, ricavare dall'anamnesi la data certa del primo contagio virale; infatti molti pazienti del tutto asintomatici hanno riscontrato in modo occasionale la sieropositività al virus HCV in un dato periodo della loro vita. Questo peraltro rappresenta la storia naturale di questi pazienti.

- Statistica

Infine, sono stati effettuati confronti statistici tra i casi ed i controlli:

I dati riportati sono stati espressi come medie \pm deviazione standard (DS). Le differenze statistiche sono state valutate per le variabili quantitative mediante test t di Student. I dati espressi in frequenze sono

stati comparati attraverso il test χ^2 , quando indicata, correlazione semplice ed analisi multivariata. Il valore più basso di significatività statistica è stato fissato per $p < 0,01$. Le valutazioni statistiche sono state effettuate mediante software SPSS/PC plus (Norousis Inc.III) .

Risultati

I dati ecocardiografici e livelli di NOe dei due gruppi di pazienti epatopatici sono riportati nella tabella 5

Dal suo esame si può rilevare che:

In tutti i pazienti, sia quelli con epatopatia Cronica (EC), sia quelli con Cirrosi (Cirr), abbiamo riscontrato:

Un aumento dei valori della Gittata Cardiaca (GC) e della frazione d'eiezione (FE) del ventricolo sinistro rispetto ai controlli, rispettivamente EC: $4,5 \pm 0,3$; Cirr.: $5,4 \pm 0,3$ vs $3,3 \pm 0,4$; $p < 0,01$; EC: 69 ± 4 ; Cirrotici: $68,2 \pm 5$ vs 59 ± 4 , $p < 0,01$. Un aumento del volume dell'atrio sinistro (by biplane area-length), ECA: $52,1 \pm 20$; Cirr.: $67,4 \pm 10$ vs $36,4 \pm 13$, $p < 0,01$. Abbiamo riscontrato altresì una disfunzione diastolica del ventricolo sinistro ($E/A < 1$) , EC: $0,9 \pm 0,2$; Cirr.: $0,6 \pm 0,2$ vs $1,23 \pm 0,2$. Quest'ultimo valore non ha raggiunto una significatività statistica nel gruppo degli EC, risultando invece significativamente alterato nel gruppo dei pazienti cirrotici.

Inoltre tutti i pazienti avevano un elevata frequenza di calcificazioni valvolari con lieve disfunzione rispetto i controlli, rispettivamente ECA 73,8%, Cirr.: 75% vs 34%, $p < 0,01$; EC: 61,1%, Cirr.: 68,7% vs 27%, $p < 0,01$ (Figura 1); con maggiore prevalenza per le calcificazioni aortiche rispetto a quelle mitraliche ECA: 69,2% vs 38,4%; Cirr.: 83,3% vs 41,6% e con maggior prevalenza di rigurgiti valvolari rispetto alle stenosi, EC : 90,9% vs 9% ; Cirr. 83% vs 16,6%. Inoltre, in tutti i pazienti abbiamo riscontrato elevati valori di NO espirato rispetto i controlli (EC $24,3 \pm 4,7$ ppb; Cirr.: $26,2 \pm 5,1$ ppb vs $13,1 \pm 2,3$ ppb $p < 0,01$) (Figura 2).

Tutti i pazienti hanno presentato indici spirometrici sovrapponibili ai controlli

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per età sesso e BMI tra i gruppi presi in esame.

Discussione

Dati Ecocardiografici:

Il pattern di alterato rilasciamento del ventricolo sinistro .

Con il doppler pulsato, posizionando il volume campione a livello dell'anulus mitralico, è possibile evidenziare un'onda E di apertura protodiastolica, sincrona con il riempimento rapido del ventricolo sinistro e un'onda A di apertura telediastolica legata alla contrazione atriale e sincrona con il riempimento presistolico del VS. In un soggetto con un ventricolo sinistro che presenta un normale rilasciamento diastolico, l'onda E è più ampia dell'onda A con un rapporto $E/A > 1$. Nel soggetto epatopatico invece, esiste una graduale inversione di questo rapporto causato verosimilmente da alterazioni proprie della parete ventricolare e dall'aumento del precarico. Questo conduce a una più lenta caduta della pressione nel VS, si riduce la differenza di pressione tra atrio e ventricolo e di conseguenza la velocità E è ridotta portando così il rapporto E/A ad un valore < 1 (disfunzione diastolica di GRADO 1).

Aumento del volume dell'atrio sinistro

A seguito di un aumento delle resistenze del ventricolo in diastole, dell'aumento del precarico e verosimilmente, quando presente, dell'insufficienza valvolare mitralica, anche l'atrio sinistro subisce delle modificazioni e si dilata aumentando il suo volume (Foto 1). In questo caso l'aumento del volume viaggia di pari passo con il grado di compromissione epatica. Infatti, rispetto alle altre variabili ecocardiografiche abbiamo riscontrato un netto aumento del volume dell'atrio sinistro nei pazienti cirrotici rispetto ai pazienti con epatopatia cronica. In un recente studio condotto su pazienti cirrotici in attesa di trapianto è stata documentata un evidente correlazione tra l'aumento del diametro atriale sinistro (anche quando corretto per il BSA e per il BMI) e la presenza di shunt artero-venosi destro-sinistri intrapolmonari,

definendo l'aumento delle dimensioni dell'atrio sinistro un predittore di shunt intrapolmonari dx-sx nei pazienti cirrotici ⁹².



Foto n°1 E' possibile notare la dilatazione atriale sinistra e l'aumento del volume.

Aumento della frazione d'eiezione (FE) e della gittata cardiaca (GC) del ventricolo sinistro:

Nei pazienti con epatite cronica e con cirrosi epatica abbiamo riscontrato un aumento della FE (foto 2) e della GC rispetto ai controlli. La gittata cardiaca rappresenta in sostanza, il volume di sangue pompato da ciascun ventricolo in un minuto. L'aumento della gittata nella cirrosi epatica è conseguenza dell'aumento del precarico dovuto alla ritenzione idrosalina oltre che ad una riduzione delle resistenze periferiche presenti in questi pazienti.

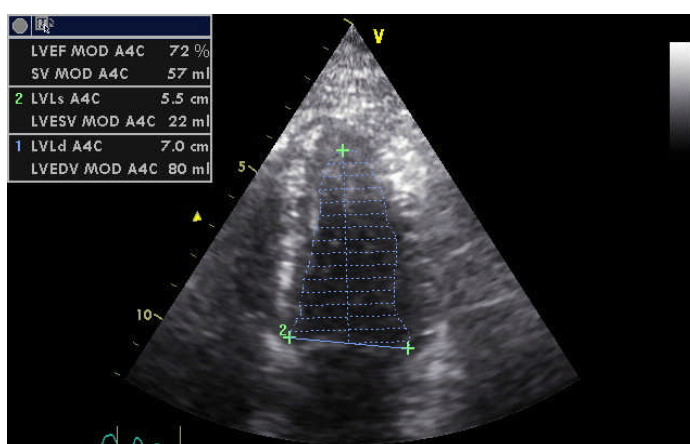


Foto n°2: Frazione di eiezione del 72 % misurata in un paziente di 69 anni affetto da epatite cronica HCV +.

Disfunzione valvolare

In un sostanziale numero di soggetti cirrotici da noi studiati è stata evidenziata la presenza di insufficienza valvolare, soprattutto a carico della valvola mitrale. E' stato notato che il rigurgito di sangue in atrio in genere non presenta caratteri particolarmente gravi potendo parlare di insufficienza mitralica lieve ed emodinamicamente poco significativa nella maggior parte dei soggetti in esame. Appare evidente che questo dato, anche menzionato nella letteratura, non riveste in sé un importante significato prognostico.

Calcificazioni valvolari

L'ultimo dato che vogliamo considerare è il seguente: la presenza di calcificazioni delle strutture valvolari cardiache con maggiore prevalenza per la valvola aorta (cuspidi valvolari e radice aortica) rispetto alla valvola mitrale (anulus e lembi valvolari).

Abbiamo inoltre riscontrato calcificazioni di entità tale da provocare gradienti transvalvolari significativi realizzanti stenosi valvolare di lieve entità soltanto per la valvola aortica e nella misura del (8,8%; 3/34).

Il riscontro delle calcificazioni valvolari ha destato molta curiosità soprattutto legato al fatto che, in seguito ad un'accurata ricerca bibliografica, non abbiamo rilevato nessuno studio che parlasse di calcificazioni valvolari del cuore dei pazienti epatopatici. Abbiamo riscontrato calcificazioni valvolari prevalentemente nelle regioni anatomiche dell'apparato valvolare aortico e mitralico; la visione qualitativa che abbiamo avuto è stata la seguente:

Mitrale: Aree diffuse di ecorifrangenza confinate ai margini dei lembi (foto 3); Ecorifrangenza confinata all'anulus di grado lieve ; Aree diffuse di ecorifrangenza confinate ai margini dei lembi ed ecorifrangenza estesa all'anulus

Foto 3

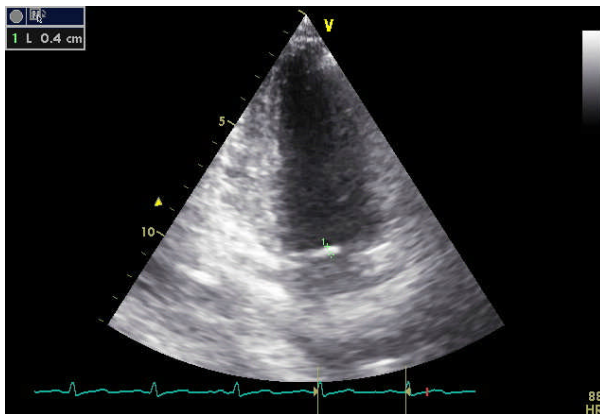


Foto 3: Area di calcificazione confinata al lembo anteriore della valvola mitrale

Aorta : Aree diffuse di ecorifrangenza confinate alle cuspidi; Singoli noduli ecorifrangenza a livello delle cuspidi (foto 4) o della radice (foto 5) presenti o sul versante ventricolare o su quello aortico (lume aorta ascendente)

Foto 4

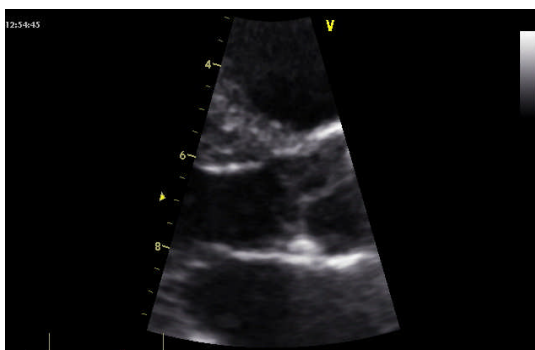


Foto n°3 : Noduli calcifici a livello della radice aortica

Foto 5

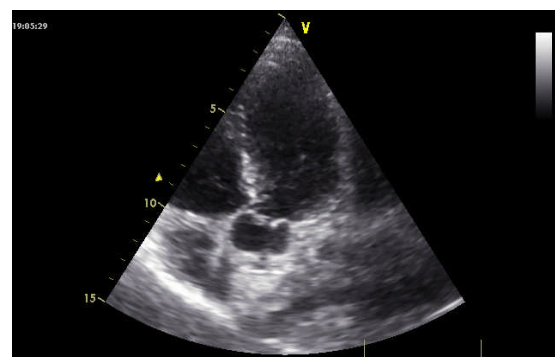


Foto n°4: Calcificazione ed ispessimento delle cuspidi valvolari aortiche con piccoli noduli calcifici alle estremità

Le calcificazioni valvolari cardiache nei pazienti epatopatici :

“Patogenesi infiammatoria?”

Se fino a qualche anno fa la calcificazione vascolare era vista come qualcosa di degenerativo e passivo, oggi è considerato un processo patobiologico che molto condivide con la formazione dell'osso in fase embrionale ed attira su di se l'attenzione della comunità scientifica internazionale.

Le basi cellulari delle calcificazioni valvolari e quindi della ossificazione eterotopica sono state chiarite da Mohler et al⁽⁸⁷⁾ e confermate poi da numerosi altri studi successivamente. Mohler ha dimostrato, attraverso lo studio anatomopatologico di valvole cardiache calcifiche, la presenza di vari gradi di ossificazione e di infiltrati infiammatori: Calcificazioni distrofiche, lamelle ossee mature, rimodellamento osseo attivo ,formazione di osso endocondrale (fenomeno comunemente riscontrato nella riparazione delle fratture ed anche nella fibrodisplasia ossificante progressiva FOP) ; la presenza della BMP2/4, (proteina morfogenetica dell'osso), della osteopontina , osteocalcina ed osteonectina.

Nelle aree di ossificazione e di calcificazione distrofica Mohler ha inoltre riscontrato la presenza di macrofagi ed aggregati linfocitari nonché mastcellule. Queste ultime poi sono state chiamate in causa da alcuni autori proprio come le responsabili della liberazione di potenti mediatori dell'infiammazione: metallo proteinasi , serin-proteasi, chinasi, catepsina , istamina , TNF- α , PGD2 e leucotrieni ⁸⁸.

In sintesi l'attivazione di queste linee cellulari porterebbe al rilascio di tutta una serie di citochine, chemiochine, fattori di crescita ed enzimi idrolitici, capaci di contribuire all'angiogenesi, all'aterosclerosi, alla calcificazioni e quindi all'ossificazione delle valvole ⁸⁷.

In conclusione i risultati di questi studi hanno definito che la patogenesi delle calcificazioni valvolari cardiache (ossificazioni e della differenziazione endocondrale delle valvole) può essere definite come il

risultato di un processo infiammatorio cronico ⁸⁹ e non come un semplice processo passivo degenerativo.

Risulta pertanto verosimile ipotizzare che la patogenesi delle calcificazioni valvolari da Noi riscontrate nei pazienti con epatopatia cronica post virale (in assenza di fattori di rischio cardiovascolare) sia anche in questo caso secondaria ad un processo infiammatorio e che i Virus dell'epatite giuochino un ruolo essenziale nel mantenere ed amplificare la risposta infiammatoria cronica.

A conferma della nostra ipotesi, alcuni studi hanno inoltre dimostrato una correlazione significativa tra infezione da HCV e la presenza di placche calcifiche nelle arterie carotidee della popolazione generale ⁸³. Ed altri, hanno dimostrato, attraverso analisi di PCR la presenza dell'HCV RNA all'interno di lesioni aterosclerotiche carotidee di pazienti epatopatici HCV+ che si sottoponevano a rivascolarizzazione carotidea ⁸⁴. D'altra parte, ad amplificare ulteriormente il fenomeno infiammatorio entrerebbero in causa numerose sostanze vasodilatatrici, non adeguatamente inattivate dal fegato malfunzionante o riversate in circolo attraverso gli shunts porto-sistemici. I mediatori infiammatori che incriminate sono: prostaglandine, acido gamma-ammino-butirrico, fattore di attivazione piastrinica, peptide vasoattivo, sostanza P, istamina, adenosina, fattore natriuretico atriale, TNF- α ecc. ^{37,38} Tuttavia quest'ultimo fenomeno entrerebbe in gioco soprattutto nelle fasi più avanza della malattia.

Risulta pertanto ipotizzabile, alla luce dei dati ottenuti, che l'esposizione cronica ai virus epatitici (e non la malattia cirrotica in se) potrebbe essere ritenuta responsabile di un danno valvolare cardiaco che nel caso specifico si esprime come calcificazioni valvolari.

L'Ossido Nitrico nei pazienti epatopatici:

“ Marcatore di danno vascolare?”

Nel fegato in condizioni fisiologiche sono presenti tutte le forme di NO sintasi, inducibile costitutiva e neuronale^{56,57}

La nitrossido sintasi inducibile (iNOS) può essere indotta in molte cellule epatiche come: Macrofagi, cellule endoteliali, epatociti, cellule stellate epatiche e colangiociti^{60,61}. La iNOS è virtualmente assente nel fegato normale, tuttavia essa aumenta in modo marcato in risposta a stimoli infiammatori ed a stress ossidativo.

Pertanto la iNOS e solo in parte la nitrossido sintasi costitutiva (eNOS) contribuiscono a mantenere la perfusione sinusoidale in risposta a vari stress ossidativi⁶¹.

Numerosi studi sono stati effettuati allo scopo di misurare i livelli di nitrossido nei pazienti epatopatici e prevalentemente in quelli cirrotici in fase scompensata. Infatti, è stato attribuito al NO un ruolo fondamentale anche nel determinismo e nel mantenimento delle complicanze emodinamiche che si sviluppano in questi pazienti, come la sindrome epato-polmonare e la sindrome cardiocircolatoria ipercinetica.

In tali studi sono stati riscontrati elevati livelli di ossido nitrico sia nell'aria espirata (NO_e), che nei liquidi biologici (NO₂/NO₃)^{66,68,69,73}.

Si è ipotizzato pertanto che i pazienti con cirrosi epatica possano avere una continua stimolazione della nitrossido sintasi endoteliale dalle endotossine circolanti e/o dalle citochine circolanti come il TNF-alfa.⁷⁰

Abbiamo dimostrato la presenza di elevati valori di NO espirato nei pazienti con epatite cronica e cirrosi ad etiologia post virale.

Sebbene non abbiamo identificato il sito di origine dell'aumentata sintesi del Nitrossido, risulta comunque possibile, alla luce dei dati ottenuti e della letteratura, formulare alcune ipotesi.

I pazienti con cirrosi epatica possano avere una continua stimolazione della nitrossido sintasi endoteliale dalle endotossine circolanti e/o dalle citochine circolanti come il TNF-alfa.⁷⁰

Nel sistema respiratorio vi sono numerose linee cellulari che presentano un'attività NO-sintetasi, come le cellule epiteliali e le cellule muscolari lisce dell'albero bronchiale; è stato dimostrato che in vitro queste cellule quando stimolate da citochine, producono grosse quantità di NO. A queste linee cellulari alcuni autori attribuiscono la produzione di NO riscontrato nell'aria espirata dei pazienti con cirrosi epatica⁶⁹.

Detto questo, risulta ipotizzabile che nei pazienti con epatopatia cronica, gli epatociti, il tessuto endoteliale e quello bronchiale producano elevate quantità di ossido nitrico come risultato di un continuo stimolo sulla iNO da parte dei virus e quindi delle citochine circolanti.

Il nitrosido oltre ad essere un radicale libero è anche un gas diffusibile. L'Ossido Nitrico, ha un'emivita breve di circa 6 sec, è altamente instabile nel circolo ematico e viene rapidamente metabolizzato in nitriti e nitrati;

Il nitrossido nel sangue reagisce velocemente con l'Hb proprio come l'ossigeno e l'anidride carbonica. Si potrebbe pertanto ipotizzare un sistema di trasporto e quindi di scambio a livello della barriera alveolo-capillare anche per questa molecola gassosa?

Non abbiamo misurato i livelli dei metaboliti del nitrossido nel sangue e/o nelle urine di questi pazienti, tuttavia, numerosi studi lo hanno già dimostrato.

Dalla revisione della letteratura e dai dati ottenuti dal nostro studio possiamo pertanto ipotizzare che l'aumento del NO nell'aria espirata dei pazienti con Epatopatia post virale, possa verosimilmente rappresentare l'espressione di un danno funzionale esercitato dal virus sull'endotelio vascolare ma anche su quello valvolare cardiaco e che possa al tempo stesso rappresentare un marcatore di danno.

Conclusioni

Alla fine dell'intero studio possiamo distinguere due fasi:

La prima fase, nella quale abbiamo studiato attraverso ecocardiografia 42 pazienti con cirrosi epatica a differente etiologia virale (B , C , B+C) ed in differente stadio Child. Il 38% dei pazienti presentava fattori di rischio cardiovascolare.

Questa prima fase ci ha premesso di identificare e descrivere un nuovo dato molto interessante e cioè che i pazienti con cirrosi epatica post virale presentano un elevato tasso di calcificazioni valvolari aortiche e mitraliche e lievi deficit funzionali.

Nella seconda fase abbiamo quindi studiato un totale di 34 pazienti epatopatici HCV+ in assenza di fattori di rischio cardiovascolare e di malattie dell'apparato respiratorio di cui 18 con Epatite Cronica e 16 con cirrosi epatica (Stadio Child A) e 26 controlli sani.

Le alterazioni cardiovascolari nei due gruppi di pazienti epatopatici si caratterizzano per un aumento della gittata cardiaca (GC), della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FE), un incremento del volume atriale sinistro ed una disfunzione diastolica del ventricolo sinistro.

Abbiamo poi evidenziato un nuovo dato non descritto in letteratura e cioè che questi pazienti presentano una elevata frequenza di calcificazioni valvolari aortiche e mitraliche con lieve disfunzione rispetto i controlli (figura 1).

Inoltre, in entrambi i gruppi di pazienti abbiamo riscontrato elevati livelli di NOe rispetto i controlli (figura2).

Il gruppo dei pazienti cirrotici presentava peraltro una maggiore prevalenza di calcificazioni valvolari rispetto al gruppo dei pazienti con epatite cronica e presentava altresì livelli di NOe di poco più elevati. Tuttavia il confronto tra i due gruppi non ha evidenziato differenze statisticamente significative.

Abbiamo successivamente suddiviso i due gruppi di pazienti in ulteriori

sottogruppi in base al genotipo virale (1 ; 1b; 2) ed alla Viremia ($< 10^6$ copie/ml ; $>10^6$ copie/ml) (Vedi Tabella 6) per ricercare eventuali correlazioni rispetto queste due variabili. Come si evince dalla tabella, la percentuale di calcificazioni valvolari ed i livelli di nitrossido espirato (NOe) non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i diversi sottogruppi di pazienti epatopatici. Non abbiamo pertanto riscontrato correlazioni tra genotipo e viremia dell'HCV versus % di calcificazioni valvolari e livelli di NOe

Alla luce dei dati ottenuti e della revisione della letteratura abbiamo poi formulato due ipotesi fisiopatologiche:

1) I virus epatitici possono verosimilmente essere ritenuti responsabile di un danno valvolare cardiaco che nel caso specifico si esprime come calcificazioni valvolari. La patogenesi di tali calcificazioni sarebbe di tipo infiammatorio.

2) L'aumento del NO nell'aria espirata dei pazienti con Epatopatia post virale, può verosimilmente rappresentare l'espressione di un danno funzionale esercitato dal virus sull'endotelio valvolare cardiaco oltre che vascolare e che possa quindi al tempo stesso rappresentare un marcatore di danno.

Tabella 1

Classe Child- Pough	Pazienti (n.)	Eta' (anni) $M \pm DS$	Sesso (M/F)	BMI (Kg/m²) $M \pm DS$	Durata <i>Malattia</i> (anni) ($M \pm DS$)
Classe A (punteggio 5- 6)	18	65 \pm 4	8/10	27,5 \pm 1,8	10 \pm 3
Classe B (punteggio 7- 9)	15	64 \pm 9	10/5	25,4 \pm 1,6	8 \pm 4
Classe C (punteggio 10- 15)	9	67 \pm 6	5/4	26,1 \pm 1,5	9 \pm 4

Suddivisione dei pazienti cirrotici in base al grado di efficienza epato-funzionale, secondo la classificazione di *Child- Pugh*

Tabella 2

	CIRROSI (CHILD A) 18 PAZIENTI	CIRROSI (CHILD B- C) 24 PAZIENTI	CONTROLLI 56 PAZIENTI	P value
ETA' DEL PAZIENTE	65 ± 4	67 ± 6	62 ± 10	N.S
DURATA DELLA MALATTIA (anni)	7 ± 2	9 ± 2	_____	N.S
RAPPORTO E/A < 1 N° sogg e (%)	12/18 (66)	17/24 (70)	21/56 (37,5)	<0,01
AUMENTATO DIAMETRO DELL'ATRIO SINISTRO ; n°sogg e (%)	11//18 (61,6)	18/24 (75)	16/56 (28,5)	<0,01
SPESSORE DI PARETE DEL VENTRICOLO SINISTRO (mm)	9,6 ± 1,1	9,7 ± 1,0	9,0 ± 0,9	>0,01
FRAZIONE DI EIEZIONE (%)	69 ± 4	69 ± 6	61 ± 4	<0,01
GITTATA CARDIACA (L/ min)	5,3± 0,28	5,40 ± 0,36	3,45 ± 0,4	<0,01
FREQUENZA CARDIACA (Bpm)	79± 11	80 ± 12	68 ± 6	<0,01

Inquadramento ecocardiografico generale dei soggetti studiati suddivisi per lo stadio Child, considerando lo stadio Child B +C come un unico gruppo (cirrosi scompensata)

Tabella 3

	Cirrotici 42	Child A 18	Child B+C 24	Controlli 56	p value *
ETA' DEL PAZIENTE	64 ± 9	65 ± 4	67 ± 6	62 ± 10	<0,01
DURATA DELLA PATOLOGIA (anni)	9±4	10±3	9±2	_____	ns
CALCIFICAZIONI: n° ; (%)	35/42 (83,3)	14/18 (77,5)	21/24 (86,5)	14/56 (25)	< 0,01
DISFUNZIONE VALVOLARE: n° ; (%)	30/42 (71)	12/18 (66,5)	19/24 (79,1)	19/56 (33,9)	< 0,01
FATTORI DI RISCHIO CV (%)	16/42 (38)	4/18 (9)	12/24(50)	_____	_____

Tabella 4

	HCV 26	HBV 10	HCV/HBV 8	CONTROLLI 56PAZIENTI	p value*
ETA' DEL PAZIENTE	63 ± 8	65 ± 4	67 ± 9	62 ± 10	Ns
CALCIFICAZIONI n°sogg. e (%)	19/26 (73,1)	7/10 (70)	5/8 (62,5)	14/56 (25)	< 0,01
INSUFFICIENZA valvolare (%)	18/26 (69,2)	6/10 (60)	4/8 (50)	19/56 (33,9)	< 0,01

Tabelle 3 e 4: Calcificazioni valvolari e disfunzioni valvolari cardiache (%) dei pazienti cirrotici suddivisi rispettivamente per lo stadio Child e per il tipo di etiologia virale rispettivamente. * Dati di significatività rispetto ai controlli. ** dati di significatività del gruppo Child B+C rispetto ai controlli.

Tabella 5

	Controlli (n °= 26)	Ep.Cronica (n°=18)	Cirrosi (N°=16)	p
Età	59±9	60,4±10	62,5±8	NS*
Sesso : M/F (%)	15/11 (58)	8/10 (44)	9/7 (56)	NS
BMI (Kg/m2)	28,5±2,4	27,7 ±1,2	26,9±1,6	NS
Durata della malattia (N° anni)	-	9 ± 2	12 ± 3	NS
Volume atrio sx (ml)	36,4±13	52,1±20;	67,4±10	NS
FE V _{sx} %	59±4	69±4;	68,2±5	<0,01
GC (L/min)	3,3± 0,4	4,5±0,3	5,4±0,3	<0,01
E/A <1	1,23±0,2	0,9±0,2**	0,6±0,2	<0,01
Calcificazioni valvolari (%)	34 (9/26)	73,8 (13/18)	75 (12/16)	<0,001
Calcificazioni mitraliche (%)	44,5(4/9)	38,4 (5/13)	41,6 (5/12)	} <0,01
Calcificazioni Aortiche (%)	66,5(6/9)	69,2 (9/13)	83,3 (10/12)	
Disfunzione valvolare (%)	27 (7/26)	61,1 (11/18)	68,7(11/16)	<0,001
Insufficienza Valvolare (%)	100 (7/7)	90,9 (10/11)	83 (10/12)	} <0,01
Stenosi Valvolare (%)	0 (0/7)	9 (1/11)	16,6 (2/12)	
NO espirato (ppb)	13,1± 2,3	24,3±4,7	26,2±5,1	<0,01

* NS = non significativo ; ** : NS rispetto al gruppo dei controlli

Tabella 5: Principali caratteristiche cliniche ed ecocardiografiche , valori di NO espirato e significatività statistica (p value) dei soggetti epatopatici e dei controlli (M ± DS)

Tabella 6

	%	Calcificazioni Valvolari	Nitrossido Espirato	<i>p</i> **
EPATITE CRONICA *				
Genotipo				
1	25	85%	27,4±1,7	}
1b	31	80%	30,2±2,4	
2	44	71%	24,8±5,2	
<i>p</i>	0,01	<i>NS</i> [°]	<i>NS</i>	
Viremia				
< 10 ⁶ c/ml (%)	57	76%	22,4±7,3	}
> 10 ⁶ c/ml (%)	53	85%	21,6±6,2	
<i>p</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	
CIRROSI *				
Genotipo				
1	32	82%	25,3±4,9	}
1b	44	83%	27,1±2,5	
2	24	87%	26,7±3,4	
<i>p</i>		<i>NS</i>	<i>NS</i>	
Viremia				
< 10 ⁶	59	85%	24,3±4,8	}
> 10 ⁶	51	86%	23,7±5,2	
<i>p</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	

NS[°]

NS[°]

*HCV + ; ** Confronto dei valori medi del NOe tra i gruppi dei pz epatopatici suddivisi per Genotipo e Viremia; [°] *NS* : non significativo

Tabella 6: Valori medi del NO espirato ($M \pm DS$) dei gruppi di pazienti epatopatici suddivisi per differente genotipo e viremia

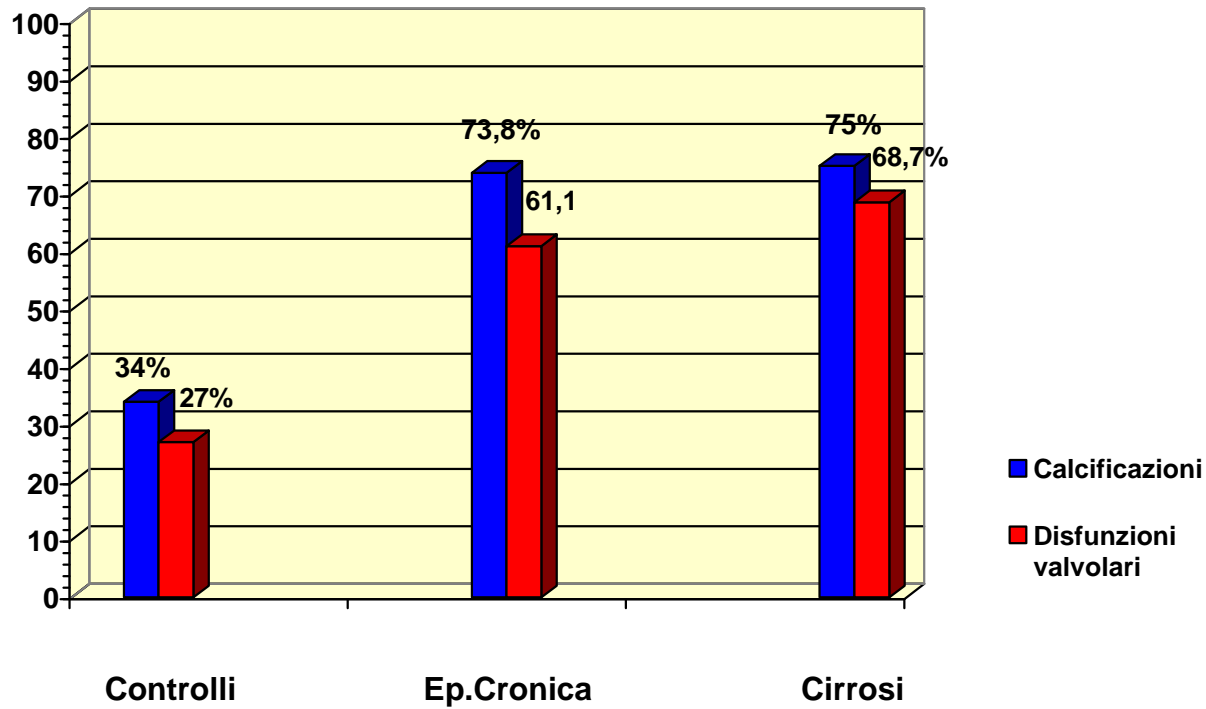


Figura 1

Calcificazioni valvolari (%) e Disfunzione valvolare (%) nei due gruppi di pazienti epatopatici HCV+ , rispetto ai controlli

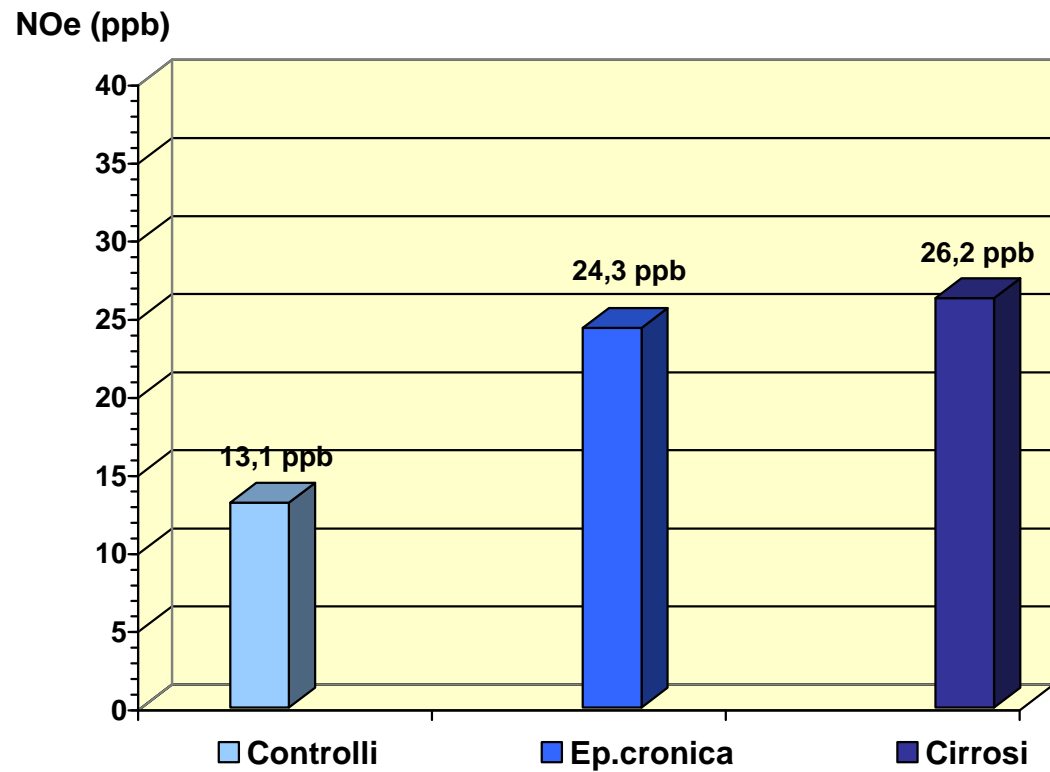


Figura 2
Livelli di NO espirato (ppb) nei due gruppi di pazienti epatopatici rispetto ai controlli

Bibliografia

1. Pul S, Marcellin P. Management of chronic hepatitis in 2008
Gastroenterol Clin Biol 2008 Mar;32(3); S 71-3
2. Oh S.B, et al Management of chronic hepatitis C in Veterans : the potential integrated care models
Am J Gastroenterol 2008 Jul; 103(7) :1810-23
3. Seff L.B., Hoonfnagle J.H.: Appendix: The National Institute of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C
Clin.Liver Dis. 7(1): 261-87, 2003.
4. Unigastro – Manuale di Gastroenterologia. E.: Pacini 2007
5. Epidemiologia delle epatiti acute e croniche Linee Guida 2001
Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF)
6. Fontaine H. et al Guidelines for the diagnosis of uncomplicated liver cirrhosis
Gastroenterol Clin Biol. 2007 May;31 (5) 504-9
7. Kowalski HJ, Abelman WH. The cardiac output at rest in Laennec cirrhosis. J Clin Invest 1953; 32: 1025-33.
8. Lunseth JH, Olmstead EG, Forks G. A study of heart disease in 180 hospitalized patients dying with portal cirrhosis.
Arch Intern Med 1958; 102: 405-13.
9. Ma Z, Miyamoto A, Lee S. Role of altered β -adrenoceptor signal transduction in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in rats. Gastroenterology 1996; 110: 1191-8.
10. Gerbes AL, Remien J, Jungst D, Sauerbruch T, Paumgartner B. Evidence for down-regulation of beta-2-adrenoceptors in cirrhotic patients with severe ascites. Lancet 1986; 1: 1409-10.
11. Ma Z, Lee S. Cirrhotic cardiomyopathy: getting to the heart of the matter. Hepatology 1996; 2: 451-9.
12. Dudley FJ, Murray DE. The sympathetic nervous system in cirrhosis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier W, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Oxford: Blackwell Science, 1999: 198-219.

13. Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Hepatic mechanism for clearance and detoxification of bacterial endotoxins. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 620-7.
14. Ma Z, Meddings JB, Lee S. Membrane physical properties determine cardiac beta-adrenergic receptors function in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1994; 267 (Part 1): G87-G93.
15. Mireia Torregosa et al Cardiac alteration in Cirrhosis : reversibility after liver transplantation *Journal of Hepatology* 42 (2005) 68-74
16. Pozzi M, Carugo S, Boari G, et al. Evidence of functional and structural cardiac abnormalities in cirrhotic patients with and without ascites. *Hepatology* 1997; 26: 1131-7.
17. Bernardi M, Rubbioli A, Trevisani F, et al. Reduced cardiovascular responsiveness to exercise-induced sympathoadrenergic stimulation in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1991; 12: 207-16.
18. Henriksen JH, Fuglsang S, Bendtsen F, Christensen E, Moller S. Dyssynchronous electrical and mechanical systole in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 513-20.
19. Kelbaek H, Eriksen J, Brynjolf I, et al. Cardiac performance in patients with asymptomatic alcoholic cirrhosis of the liver. *Am J Cardiol* 1984; 54: 852-5.
20. Murray FJ, Dawson AM, Sherlock S. Circulatory changes in chronic liver disease. *Am J Med* 1958; 24: 358-67.
21. Benoit JN, Granger DN. Splanchnic hemodynamics in chronic portal hypertension. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 287- 98.
22. Lebrec D, Bataille C, Bercoff E, Valla D. Hemodynamic changes in patients with portal venous obstruction. *Hepatology* 1983; 3: 550-3.
23. Blendis LM, Banks DC, Ramboer C, Williams R. Splenic blood flow and splanchnic haemodynamics in blood dyscrasia and other splenomegalies. *Clin Sci* 1970; 70: 73-84.
24. Lewis FW, Adair O, Rector WG Jr. Arterial vasodilatation is not the cause of increased cardiac output in cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1024-9.

25. Vlavianos P, Mac Mathuna P, Williams R, Westaby D. Splanchnic and systemic haemodynamic response to volume changes in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Clin Sci* 1999; 96: 475-81.
26. Laffi G, Barletta G, La Villa G, et al. Altered cardiovascular responsiveness to active tilting in non alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 891-8.
27. Bernardi M, Fornalè L, Di Marco C, et al. Hyperdynamic circulation of advanced cirrhosis: a re-appraisal based on posture-induced changes in hemodynamics. *J Hepatol* 1995; 22: 309-18.
28. Bernardi M, Di Marco C, Trevisani F, et al. The hemodynamic status of preascitic cirrhosis: an evaluation under steady-state condition and after postural change. *Hepatology* 1992; 16: 341-6.
29. Fernandez-Seara J, Prieto J, Qhiroga J, et al. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without renal failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 1304-12.
30. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984; 87: 1120-6.
31. Rodriguez-Roisin R, Agusti AG, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax* 1992; 47: 897-902.
32. Sacerdoti D, Bolognesi M, Merkel C, Angeli P, Gatta A. Renal vasoconstriction in cirrhosis evaluated by duplex Doppler ultrasonography. *Hepatology* 1993; 17: 219-24.
33. Laragh JH, Cannon PJ, Bentzel CJ, et al. Angiotensin II, norepinephrine and renal transport of electrolytes and water in normal man and in cirrhosis with ascites. *J Clin Invest* 1963; 42: 1179-86.
34. Murray BM, Paller MS. Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats. Evidence for a post-receptor defect in angiotensin action. *Circ Res* 1985; 57: 424-31.

35. Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin-1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1085-93.
36. Helmy A, Jalan R, Newby DE, Johnston NR, Hayes PC, Webb DJ. Altered peripheral vascular responses to exogenous and endogenous endothelin-1 in patients with wellcompensated cirrhosis. *Hepatology* 2001; 33: 826-31.
37. Bruix J, Bosch J, Kravetz D, et al. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1985; 88: 430-5.
38. Lòpez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in pre-hepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 761-7.
39. Garcia_ Estan J, Ortiz MC, Lee SS. Nitric oxyde and renal and cardiac dysfnction in cirrhosis. *Clin Sci (London)*, 2002, Feb.
40. Battista S, Bar F, Mengozzi G, Zanon E, Grosso M, Molino G. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J Hepatol* 1997; 26: 75-80.
41. Guarner C, Soriano G, Tomas A, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-44.
42. Martin PY, Xu DL, Niederberger M, et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996; 270 ;F494-F499.
43. Pizcueta P, Piquè JM, Fernàndez M, et al. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103: 1909-15.
44. Niederberger M, Martin PY, Ginès P, et al. Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilatation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 1624-30.

45. Giuseppe Nisticò, Giacinto Bagetta e Vincenzo Mollace: Farmacologia del Nitrossido da: Fumagalli ; Farmacologia Generale e Molecolare Ed.: UTET 2004
46. Zimmer JM, Hare JM. Nitroso-Redox interaction in the vascular system *Circulation* 2006, 114:1531-1544
47. Claudio Ferri, Davide Grassi, Luisa Petrazzi et al Disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare-*Vascular Health Trends* N°2 Marzo 2002; 9-20 Review
48. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs et al Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42
49. Pulmonary Microstructure.
In Williams PL, Warwick R eds *Gray's Anatomy*. Edynburgh, London, Melbourne and New York Churchill Livingstone 1980:1260
50. Colin Borland, Yolanda Cox, Tim Higenbottam. Measurement of exhaled nitric oxide in man . *Thorax* 1993; 48; 1160-1162
51. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological model *FASEB J* 1993;7:349-360
52. J.O.N. Lundberg, E. Weitzberg, K.M. Lundberg et al Nitric Oxide in Exhale air *Eur Respir Journ* 1996, 9, 2671-80
53. Persson MG, Wiklund NP, Gustavsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1210–1214.
54. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amounts of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368–1370.
55. Lundberg JON, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylentierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994; 7: 1501–1504.
56. Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 1990;270:833-836.

57. Esteban FJ, Pedrosa JA, Jimenez A, Fernandez AP, Bentura ML, Martinez-Murillo R, Rodrigo J, et al. Distribution of neuronal nitric oxide synthase in the rat liver. *Neurosci Lett* 1997;226:99-102.
58. Clemens MG. Does altered regulation of eNOS in sinusoidal endothelial cells determine increased intrahepatic resistance leading to portal hypertension? *HEPATOLOGY* 1998;27:1745-1747.
59. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-351.
60. Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Am J Physiol* 1996;271:G260-G267.
61. Rockey DC, Chung JJ, McKee CM, Noble PW. Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. *HEPATOLOGY* 1998;27:86-92.
62. Laffi G, Foschi M, Masini E, et al. Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1995; 22: 1666-73.
63. Mark G. Clements. Nitric Oxide in Liver Injury *Hepatology* –July 1999 Review
64. Matsumoto A, Ogura K, Hirata Y, et al. Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 110-3.
65. Arkenau HT, Stichtenoth DO, Frolich JC, Manns MP, Boker KH. Elevated nitric oxide levels in patients with chronic liver disease and cirrhosis correlate with disease stage and parameters of hyperdynamic circulation. *Gastroenterol.* 2002 Nov;40(11):907-13.
66. Sogni P, Garnier P, Gadano A, Moreau R, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT, Lebrec D. Endogenous pulmonary nitric oxide production measured from exhaled air is increased in patients with severe cirrhosis. *J Hepatol.* 1995 Oct;23(4):471-3.
67. Taiji Nagata et al. Oxygenation Abnormalities in Normoxemic Patients with mild liver Cirrhosis, *Internal Medicine* Vol41, No6 (June 2002)
68. G. Cremona et al. Elevated Exhaled nitric Oxide in patient with hepatopulmonary syndrome *Eur. Respir J* 1995 8 1883-85

69. Giovanni Rola, Luisa Brussino, Paola Colagrande et al
Exhaled nitric oxide and Oxygenation abnormalities in Hepatic Cirrosis
Hepatology Vol.26, no 4, 1997
70. Khorui S A, Stahnke L, McClain CJ et al Circulating TNF –alfa , IL-1
and IL-6 circulation in chronic alcoholic patients *Hepatology* 1991 ;13:
267-276
71. McClain CJ et al Increased TNF alfa1 production by monocities in
alcoholic hepatitis *Hepatology* 1989; 9 349-351
- 72.Christophe Delclaux et al Increased Nitric Oxide Output from
Alveolar Origin during Liver Cirrhosis versus Bronhial Source during
Asthma *Am. J. Crit. Care Med* Vol 165 -332-337 2002
- 73.Heiss LN, Lancaster JR Jr, Corbetti JA, Goldman WE. Epithelial
autotoxicity of nitric oxide: role in respiratory cytopathology of pertussis.
Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 267–270.
74. Robroex et al Biomarkers in exhaled breath condensate indicate
presence and severity of cystic fibrosis in children
Pediatr Allergy Immunol 2008 Nov; 19(7): 652-9
75. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie
MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclo-oxygenase
enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:
7240–7244.
76. Murell GAC, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates
metalloprotease enzymes in articular cartilage.
Biochem Biophys Res Commun 1995; 206: 15–21.
77. Andrew D. et al Use of Exhaled nitric oxide Measurements to guide
treatment in chronic asthma. *NEJM* May 26, 2006 Vol 352 2162-2173
- 78.S.A. Morrè et al Microorganism in the aetiology of atherosclerosis
J.Clin.Pathol 2000;53;647-654
- 79.Mayr M, Kiechl S, Willeit J,Wick G Xu Q.
Infection immunity, and atherosclerosis: association of antibodies to
Chlamidia Pneumonie, Helicobacter Pylori, and Cytomegalovirus with
immune reaction to heat-shock protein 60 and carotid or femoral
atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Aug22;102(8):833-9.

80. Danesh J, Wong Y, Ward M, Muir J. Chronic infection with Helicobacter Pylori , Chlamydia Pneumoniae , or Cytomegalovirus : population based study of coronary heart disease. *Heart*. 1999 Mar;81(3):245-7
81. Constans et al Asymptomatic atherosclerosis in HIV- patient a case control ultrasound study . *Ann Med* 1995;27:683-5
82. Rossi R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20.
83. Yuko Ishizaka et al. Association Between Hepatitis C Virus Core Protein and Carotid Atherosclerosis- *Circulation Journal* Vol 67, January 2003
84. Maria Boddi, Rosanna Abbate et al HCV infection facilitates asymptomatic carotid atherosclerosis: preliminary report of HCV RNA localization of HCV RNA localization in human carotid plaque *Digestive and liver disease* Vol 39 2007 S55-S60
85. Omer Alyan, Fehmi Kacmaz, Ozcan Ozdemir et al Hepatitis C Infection is Associated With Increased Coronary Artery Atherosclerosis Defined by Modified Reardon Severity Score System *circulation* 2008
86. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation: a possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 680–685
87. Emile R. Mohler et al Bone formation and inflammation in Cardiac Valve *Circulation* March 20 2001 ,103;1522-1528
88. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*. 1999;13:1382–1397.
89. Willens HJ, Chirinos JA, Schob A, Veerani A, Perez AJ, Chakko S. The relation between mitral annular calcification and mortality in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *Echocardiography*. 2006; 23: 717–722
90. De Simone G et al Estimation of left ventricular chamber and stroke volume by limited echocardiography and validation by two dimensional and Doppler echocardiography *Am J Cardiol* 1996;78:801-7

91. ATS/ERS. Recommendations for standardized procedures for online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit

92. Mahmood Zamirian et al Prediction of Intrapulmonary right to left shunt with left atrial size in patient with liver cirrhosis European J Echocardiography 2008 ,Vol 9 N°1 (pg 1-4)