



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Dottorato di ricerca Biomedicina Traslazionale XXX ciclo
Coordinatore: Prof. Lorenzo Malatino

DOTT.SSA GRAZIELLA PRIVITERA

STUDIO DEI MECCANISMI PATOGENETICI
DELL'INSUFFICIENZA SURRENALICA
NELLA CIRROSI EPATICA

—————
Tesi di Dottorato
—————

Relatore:
Chiar.mo Prof. F. Purrello

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

INTRODUZIONE	3
LA CIRROSI EPATICA E LE SUE COMPLICANZE	4
IL SURRENE NELLA CIRROSI EPATICA: LA SINDROME EPATO- SURRENALE	7
LA PATOGENESI DELLA SINDROME EPATO- SURRENALE	10
Apolipoprotein AI and HDL are reduced in stable cirrhotic patients with adrenal insufficiency: a possible role in glucocorticoid deficiency (Spadaro L, Noto D, Privitera G, et al. Scand J Gastroenterol 2015- Allegato 1).....	12
Obiettivo dello studio.....	12
Pazienti e metodi.....	12
Risultati.....	14
Conclusioni	17
Hypothalamus-pituitary dysfunction is common in patients with stable cirrhosis and abnormal low dose short synacthen test (Fede G, Spadaro L, Privitera G, et al. Dig Liver Dis 2015- Allegato 2).....	19
Obiettivo dello studio.....	19
Pazienti e metodi.....	20
Risultati.....	21
Conclusioni	21
Emerging hepatic syndromes: pathophysiology, diagnosis and treatment (Bertino G*, Privitera G*, et al. Intern Emerg Med 2016- Allegato 3).....	23
STUDIO MORFOLOGICO DELLE GHIANDOLE SURRENALI NELLA CIRROSI EPATICA- Background	26
Obiettivo dello studio.....	28
Pazienti e Metodi	28
Risultati.....	30
Discussione	33
STUDIO DELLA RESISTENZA TISSUTALE AI GLUCOCORTICOIDI NELLA CIRROSI EPATICA STABILE- Background	35
Obiettivo dello studio.....	36
Pazienti e Metodi	37
Risultati preliminari	39
STUDIO DELLA RESISTENZA TISSUTALE AI GLUCOCORTICOIDI NEI PAZIENTI AFFETTI DA INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA SU CRONICA: RILEVANZA CLINICA ...	41
Ipotesi sperimentale	43
Obiettivo dello studio.....	43
Disegno sperimentale.....	44
Pazienti e Metodi	44

Risultati preliminari	52
BIBLIOGRAFIA	56
ALLEGATI.....	62

INTRODUZIONE

Il progetto di ricerca svolto durante il periodo di dottorato è stato incentrato sullo studio dei principali meccanismi patogenetici sottostanti la disfunzione surrenalica nel paziente cirrotico stabile e nel soggetto con Acute on-Chronic Liver Failure (ACLF). Ad oggi è ampiamente nota la prevalenza e la rilevanza clinica dell'insufficienza surrenalica nel paziente cirrotico, rimangono tuttavia da chiarire i meccanismi patogenetici responsabili dell'insorgenza della sindrome. Numerose teorie patogenetiche sono state avanzate per spiegare l'insorgenza dell'insufficienza surrenalica nel paziente epatopatico tra le quali la carenza di substrati per la steroidogenesi, la disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi surrene, il danno strutturale della ghiandola e la resistenza tissutale ai glucocorticoidi. Durante il mio percorso di formazione specialistica dapprima e nel corso del dottorato di ricerca poi, sono stati progettati e realizzati diversi studi sperimentali con l'obiettivo di testare le diverse ipotesi patogenetiche proposte in una casistica di pazienti cirrotici stabili e in un gruppo di pazienti con ACLF.

Durante questi anni, il nostro gruppo di ricerca ha collaborato attivamente dapprima con il Prof. Andrew Burroughs del Royal Free Hospital- Sheila Sherlock Centre di Londra e successivamente con il Prof. Rajiv Jalan del Liver Failure Group- Royal Free Hospital di Londra, dove gran parte del dottorato è stato svolto nel contesto della vincita della Sheila Sherlock Fellowship della European Association for the Study of the Liver (EASL) per il progetto dal titolo: Assessment of glucocorticoid resistance in ACLF- clinical relevance.

Nella sezione allegati si riportano gli articoli pubblicati durante il dottorato di ricerca.

LA CIRROSI EPATICA E LE SUE COMPLICANZE

La cirrosi epatica rappresenta l'esito finale di malattie epatiche croniche a diversa eziologia, caratterizzata sul piano istologico dalla presenza di necroinfiammazione, fibrosi e noduli di rigenerazione, che determinano un sovvertimento strutturale del parenchima epatico. Tali alterazioni anatomopatologiche conducono a loro volta ad una graduale riduzione della capacità funzionale del fegato, al sovvertimento dell'architettura vascolare epatica e ad un aumento delle resistenze al flusso ematico portale sino all'instaurarsi di ipertensione portale. Ne conseguiranno alterazioni emodinamiche sistemiche, caratterizzate dall'apertura di shunts artero- venosi e circoli collaterali.

Dal punto di vista epidemiologico la cirrosi epatica costituisce una malattia ad elevato impatto sociale, rappresentando la 14° causa di morte al mondo, la 4° causa in Europa centrale, con un tasso di mortalità annuo pari a 1,03 milioni di decessi al mondo di cui 170.000 in Europa. In Italia la cirrosi epatica figura tra le dieci principali cause di morte, si rileva che la mortalità per cirrosi epatica incida nel nostro paese in maniera preponderante nella fascia di età giovanile-adulta (35-54 anni) [1].

La reale prevalenza della malattia è difficile da definire, e risulta generalmente sottostimata poiché gli stadi iniziali sono clinicamente asintomatici, e sfuggono alla diagnosi. Dal punto di vista eziologico l'abuso alcolico, l'infezione da virus dell'epatite C e recentemente la steatoepatite non alcolica (NAFLD) rappresentano le principali cause di cirrosi nei paesi sviluppati, contrariamente ai paesi in via di sviluppo nei quali l'infezione da virus dell'epatite B costituisce l'eziologia primaria [2]. L'ipertensione portale rappresenta l'elemento patogenetico sottostante lo sviluppo delle complicanze della cirrosi e della relativa aumentata mortalità. Il sistema portale è un sistema venoso ad alta portata (il flusso portale è dell'ordine di 1000- 1200 ml/min) e bassa resistenza che drena il sangue dagli organi addominali per convogliarlo al fegato da cui, attraverso i sinusoidi e il sistema delle vene sovraepatiche raggiunge la vena cava inferiore e la circolazione sistemica. Si parla di ipertensione portale quando la pressione portale supera i fisiologici 6-10 mmHg e il gradiente porta- sovraepatiche oltrepassa il valore normale di 2-4 mmHg; l'ipertensione è

clinicamente significativa con sviluppo di circoli collaterali porto- sistemici quando il gradiente pressorio è superiore a 10- 12 mmHg. Nella pratica clinica è di comune uso l'Hepatic Venous Pressure Gradient (HVPG) che rappresenta un marker surrogato di ipertensione portale, dotato di un elevato valore prognostico. E' stato dimostrato che valori < 10 mmHg correlano con una probabilità del 90% di non sviluppare episodi di scompenso clinico ad un follow up di 4 anni [3]. I meccanismi patogenetici chiave attraverso i quali la cirrosi epatica determina ipertensione portale sono fondamentalmente due: l'aumento della resistenza al flusso ematico all'interno del parenchima epatico e il quadro di iperafflusso portale (Figura 1).

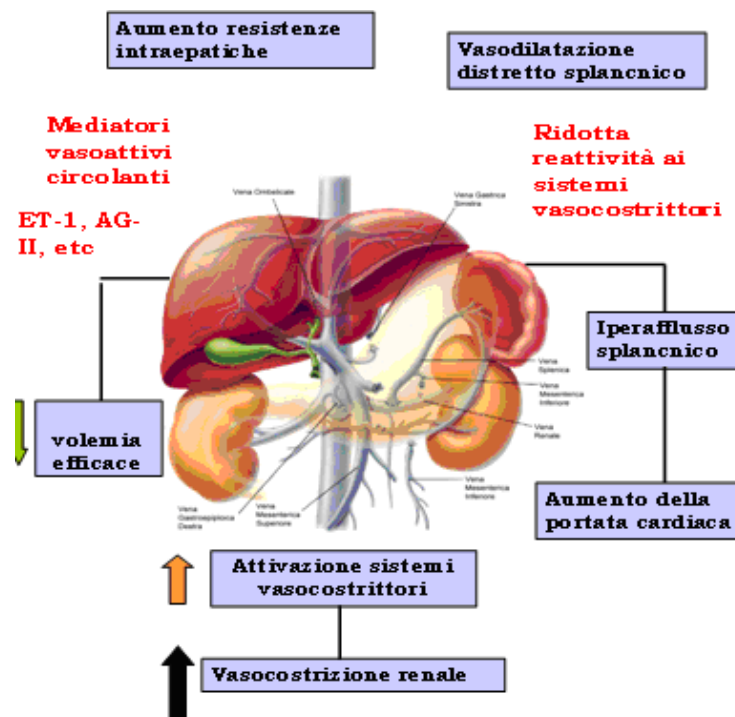


Figura 1. Fattori eziopatogenetici determinanti ipertensione portale

L'aumento delle resistenze intraepatiche, come suggerito dalla *backward-flow theory*, è causato da fattori meccanico strutturali a carico della microcircolazione epatica secondari alla fibrosi e alla rigenerazione nodulare: la deposizione di collagene nello spazio di Disse provoca il restringimento del lume dei sinusoidi e il loro allontanamento dagli epatociti con conseguente ostacolo agli scambi metabolici. La riduzione dell'area trasversale dei sinusoidi si traduce in un aumento delle resistenze al flusso portale, il cui mantenimento avviene al prezzo di un aumento della pressione portale.

Studi recenti hanno dimostrato che nell'ipertensione portale l'aumento delle resistenze intraepatiche consegue anche ad una componente vasoattiva. Nell'ambito della cirrosi epatica si osservano infatti molteplici disordini a carico del metabolismo dell'NO che unitamente all'iperproduzione di agenti vasocostrittori tra cui l'endotelina-1, conducono all'aumento delle resistenze intraepatiche osservato [4-5].

L'iperafflusso portale (elemento cardine della *forward flow theory*) è il secondo fattore rilevante nella genesi dell'ipertensione portale del cirrotico. L'aumento del flusso splancnico è conseguenza della diminuzione delle resistenze arteriolari sia spleniche che mesenteriche indotta da sostanze vasodilatatrici come l'ossido nitrico, la prostaciclina, l'istamina, il VIP ecc. La vasodilatazione splancnica è parte di un'alterazione emodinamica più generalizzata propria della cirrosi epatica che va sotto il nome di sindrome circolatoria iperdinamica, caratterizzata da riduzione delle resistenze vascolari periferiche, aumentato ritorno venoso cardiaco e incremento della gittata cardiaca. Nella patogenesi della sindrome giocano un ruolo importante i circoli collaterali porto- sistemici che agiscono sia direttamente, diminuendo le resistenze periferiche, sia indirettamente, permettendo a sostanze vasoattive intestinali di raggiungere il circolo sistemico corto- circuitando il fegato. La massiva vasodilatazione e la conseguente ipovolemia relativa comportano l'attivazione dei sistemi vasocostrittori e sodioritentivi: tutto ciò favorisce una secondaria ipervolemia che facilita l'iperafflusso portale aggravando l'ipertensione portale stessa e determinando l'instaurarsi di un circolo vizioso. In seguito allo sviluppo di ipertensione portale, la cirrosi epatica diventa una patologia sistemica e multiorgano con lo sviluppo di molteplici complicanze: le varici esofagee, l'ascite, l'encefalopatia epatica, la sindrome epato- renale, la sindrome epato- polmonare, la miocardiopatia.

Negli ultimi 10 anni numerose evidenze hanno suggerito che anche la "*Relative Adrenal Insufficiency*" (RAI) rappresenti una complicanza peculiare della cirrosi epatica includendo il surrene tra i bersagli della malattia. Pertanto, è stato introdotto il termine "sindrome epato- surrenale" per descrivere la presenza di insufficienza surrenalica in corso di epatopatie acute e croniche [6].

IL SURRENE NELLA CIRROSI EPATICA: LA SINDROME EPATO- SURRENALE

Si definisce insufficienza surrenalica (IS) una ridotta produzione o funzione degli ormoni glucocorticoidi secondaria ad un danno strutturale ghiandolare surrenalico ("*Primary adrenal failure*") oppure ad un'alterazione a livello dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene ("*Secondary adrenal failure*"). La disfunzione surrenalica è stata descritta principalmente in termini di insufficienza surrenalica relativa (RAI) ovvero di mancata capacità del surrene di rispondere a stimoli esterni, quali eventi stressogeni (malattie gravi, traumi, interventi chirurgici, sepsi) o stimoli farmacologici. Tale termine è stato poi sostituito con "*Critical Illness-Related Corticosteroid-Insufficiency*" (CIRCI) per descrivere la ridotta produzione o la "resistenza" tissutale all'azione dei glucocorticoidi in corso di infiammazione sistemica [7]. Secondo alcuni autori la presenza della malattia epatica potrebbe condurre, con meccanismi ancora non del tutto chiari, ad una progressiva disfunzione o "esaurimento" della funzione surrenale ed esitare in una franca insufficienza surrenalica in occasione di eventi acuti come infezioni o shock [8]. La prevalenza della sindrome epato- surrenale varia in base alla tipologia dei pazienti epatopatici studiati e al test diagnostico adottato. Nei pazienti cirrotici in corso di sepsi la sindrome epato- surrenale è stata descritta in un'alta percentuale pari al 52% dei casi e associata a prognosi scadente [9]. Lo shock settico rappresenta spesso l'evento finale della storia naturale della cirrosi epatica [10]. I pazienti cirrotici mostrano infatti un'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche [11]. La coesistenza di alterazioni emodinamiche (una riduzione delle resistenze vascolari periferiche, un aumentato output cardiaco, aumentati livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie) correlate alla cirrosi e al sovrapposto sviluppo della sepsi, rendono conto dell'aumentata incidenza di insufficienza surrenalica in questa categoria di pazienti. In una casistica di pazienti ricoverati presso la terapia intensiva di un centro trapianti di fegato, la presenza di insufficienza surrenalica è stata riscontrata nel 33% dei pazienti con epatite acuta fulminante, nel 66% dei pazienti con epatopatia cronica, nel 61% dei pazienti con pregresso trapianto di fegato e nel 92% dei pazienti nell'immediato post-trapianto epatico [12]. Una elevata prevalenza di insufficienza surrenalica (62%) è stata documentata anche in pazienti con insufficienza epatica acuta senza storia precedente di malattia

epatica ed è risultata associata ad un incremento della mortalità paragonata a quella dei pazienti con normale funzione surrenalica [13].

La presenza di insufficienza surrenalica è stata riscontrata anche in pazienti con cirrosi stabile, in assenza di eventi acuti o di instabilità emodinamica (Tabella A). Recentemente abbiamo condotto uno studio su 101 pazienti cirrotici in assenza di infezioni ed instabilità emodinamica, utilizzando il “*Low Dose Short Synacthen Test*” (LD-SST), quale test di funzionalità surrenalica. Anche in questa categoria di pazienti abbiamo individuato un’elevata prevalenza di insufficienza surrenalica (38%) che risultava correlata alla gravità della malattia epatica. Inoltre, i bassi livelli di cortisolo basale risultavano fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di tale complicanza [14].

A supporto della rilevanza clinica che la sindrome epato-surrenalica sembra svolgere in corso di cirrosi epatica, in un recente lavoro di Acevedo et al. [15] la funzione surrenalica veniva valutata in 143 cirrotici decompensati acutamente per ascite, encefalopatia portosistemica o infezioni batteriche, utilizzando il test da stimolo con “*Standard Dose Short Synacthen test*” (SD-SST). Di questi pazienti, 1/4 (26%) risultava affetto da RAI confermando ulteriormente la significativa prevalenza della sindrome. Un dato significativo emerso dal follow-up a tre mesi è rappresentato dall’outcome peggiore riscontrato nei pazienti cirrotici con RAI rispetto ai cirrotici senza RAI, con una maggiore incidenza di infezioni (41% vs 21%, $p=0.008$), sepsi severa (27% vs 3%, $p=0.003$), sindrome epato- renale di tipo 1 (16% vs 3%, $p=0.002$) e morte (22% vs 7%, $p=0.01$).

Tabella A. Prevalenza dell'insufficienza surrenalica nei pazienti con cirrosi stabile.

Table 1 Prevalence of adrenal insufficiency in critically ill patients with liver cirrhosis			
Ref.	No. of patients (type of cirrhosis)	Diagnosis and definition of AI	Prevalence of AI
Harry <i>et al</i> ^[14]	20 (ALF/CLD)	SD-SST: Peak cortisol < 500 nmol/L ¹	69%
Marik <i>et al</i> ^[12]	340 (ALF: 24) (CLD: 146) (recent LT: 119) (remote LT: 51)	LD-SST: Peak cortisol < 552 nmol/L or random cortisol level < 414 nmol/L in non-stressed patients or random cortisol level < 552 nmol/L in stressed patients	72% 33% 66% 92% 61%
Tsai <i>et al</i> ^[8]	101 (cirrhosis+ severe sepsis)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L or delta cortisol < 250 nmol/L if baseline cortisol between 414 and 938 nmol/L	51%
Fernandez <i>et al</i> ^[13]	25 (cirrhosis + septic shock)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L or delta cortisol < 250 nmol/L if baseline cortisol between 414 and 966 nmol/L	68%
Thierry <i>et al</i> ^[64]	14 (cirrhosis + septic shock)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L; delta cortisol < 250 nmol/L	77%
du Cheyron <i>et al</i> ^[65]	50 (critically ill cirrhosis)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L; delta cortisol < 250 nmol/L if baseline cortisol between 414 and 938 nmol/L	82%
Vasu <i>et al</i> ^[86]	24 (critically ill cirrhotics)	SD-SST: Definition of AI was not reported	62%
Arabi <i>et al</i> ^[29]	75 (cirrhosis + septic shock)	SD-SST: Delta cortisol < 250 nmol/L	76%
Mohamed <i>et al</i> ^[85]	15 (cirrhosis+septic shock)	SD-SST: Definition of AI was not reported	87%
Thevenot <i>et al</i> ^[74]	30 (cirrhosis + sepsis)	SD-SST: Peak serum total cortisol < 510 nmol/L	10%
Acevedo <i>et al</i> ^[88]	166 (decompensated cirrhosis)	SD-SST: Delta cortisol < 250 nmol/L	26%
Graupera <i>et al</i> ^[20]	37 (severe acute bleeding)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L and/or delta cortisol < 250 nmol/L	38%
Triantos <i>et al</i> ^[16]	20 (cirrhosis with variceal bleeding)	SD-SST: Baseline cortisol < 276 nmol/L or delta cortisol < 250 nmol/L LD-SST: Peak serum cortisol < 690 nmol/L or a delta cortisol < 250 nmol/L	30% 60%
El Damarawy <i>et al</i> ^[66]	45 (cirrhosis with septic shock or HRS, cirrhosis without septic shock or HRS)	SD-SST: Baseline cortisol < 414 nmol/L or delta cortisol < 250 nmol/L in patients with baseline cortisol < 966 nmol/L	73%

Una recente metanalisi è stata condotta esaminando i dati provenienti da 16 studi selezionati in letteratura. La prevalenza della RAI nel totale dei pazienti cirrotici arruolati è del 49,4%. Nei pazienti in fase di scompenso e nei pazienti critici, la prevalenza aumenta rispettivamente al 53,6% e 68,7%. Nei pazienti in fase di compenso la prevalenza è invece del 41,8%. Inoltre, la prevalenza della RAI è risultata essere maggiore nei pazienti con più alto score di Child-Pugh e MELD e dunque strettamente correlata alla gravità di malattia.

Per quanto riguarda la mortalità, la stessa metanalisi ha dimostrato un aumento della mortalità nei pazienti con RAI con un più alto tasso di complicanze in termini di sepsi, shock settico, sindrome epato-renale, ipotensione e sanguinamenti.

Un altro aspetto fondamentale della metanalisi sopracitata è stato quello di valutare l'impatto prognostico della terapia sostitutiva con basse dosi di idrocortisone nei pazienti affetti da RAI. I dati della metanalisi suggeriscono che il tasso di sopravvivenza nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto il trattamento sostitutivo è risultato essere superiore rispetto al gruppo di pazienti non trattati [16].

LA PATOGENESI DELLA SINDROME EPATO- SURRENALE

La relazione esistente tra fegato e surrene è complessa e tutt'oggi non del tutto chiarita. Diversi meccanismi patogenetici sono stati chiamati in causa per spiegare lo sviluppo della sindrome epato-surrenale.

- Carenza di substrati per la sintesi del cortisolo: è noto che il paziente cirrotico presenta un alterato assetto lipoproteico con riduzione del colesterolo totale (CT), colesterolo LDL ed HDL e che tali alterazioni siano correlate alla gravità di malattia e ad una peggiore prognosi [17]. Tale riduzione può determinare una progressiva carenza dei substrati per la steroidogenesi sino all'esaurimento della riserva surrenalica ("*Adrenal-exhaustion syndrome*") [8].
- Disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene: è stato inoltre dimostrato che pazienti con malattia epatica acuta o cronica presentano elevati livelli di citochine circolanti ed endotossine che potrebbero alterare la funzione dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene [18]. In particolare è stato dimostrato che il TNF- α inibisce in maniera diretta la secrezione di ACTH da parte dell' ipofisi [19]. Il ruolo delle citochine pro-infiammatorie non sembra tuttavia essere limitato all'azione sull'asse, ma sembra interessare anche la steroidogenesi. Gli aumentati livelli di endotossine circolanti e di TNF- α sembrano inibire la sintesi del cortisolo interferendo con il rilascio del colesterolo HDL alla ghiandola surrenalica. In aggiunta, gli alti livelli di TNF- α , IL-1 e IL-6, riducono la sintesi epatica di apolipoproteina A1, il principale componente proteico delle HDL, fondamentale per l'ingresso del colesterolo all'interno della cellula surrenalica.
- Resistenza periferica all'azione dei glucocorticoidi: gli alti livelli di citochine pro-infiammatorie sembrerebbero ridurre l'espressione del recettore dei glucocorticoidi, in particolare dell'isoforma funzionalmente attiva (GR- α) riducendone l'attività a livello tissutale.
- Danno strutturale a carico delle ghiandole surrenali: infine, l'ipoperfusione ghiandolare secondaria alle alterazioni del circolo ematico [7], e i disordini coagulativi di frequente

riscontro nel paziente cirrotico, potrebbero determinare un danno strutturale in termini di emorragia o infarto (Figura 2).

L'ipotesi tuttavia, attualmente più accreditata è che la patogenesi della sindrome sia multifattoriale con il coinvolgimento di molteplici meccanismi.

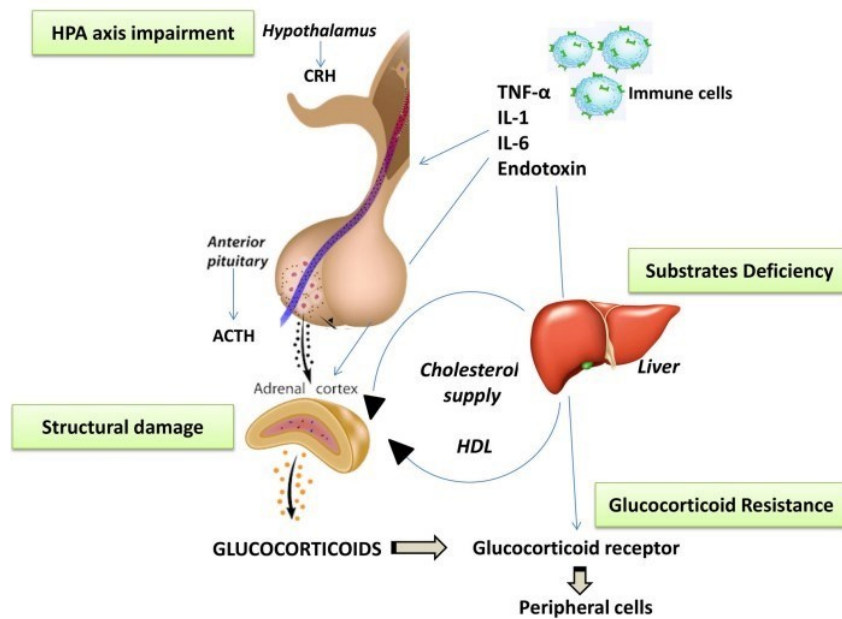


Figura 2. Attuali ipotesi patogenetiche della sindrome epato- surrenalica

Apolipoprotein AI and HDL are reduced in stable cirrhotic patients with adrenal insufficiency: a possible role in glucocorticoid deficiency (Spadaro L, Noto D, Privitera G, et al. Scand J Gastroenterol 2015- Allegato 1)

A seguito degli studi precedentemente condotti nel paziente cirrotico stabile, che mostravano un'alta prevalenza della sindrome epato-surrenalica [14], ci siamo interrogati sui potenziali meccanismi patogenetici della sindrome e abbiamo condotto questo primo studio con l'obiettivo di indagare il ruolo svolto dalla carenza di substrati per la steroidogenesi nell'insorgenza della sindrome.

Obiettivo dello studio

Scopo dello studio è stato quello di approfondire l'ipotesi che la sindrome epato-surrenale possa essere causata dalla carenza di substrati per la steroidogenesi. Abbiamo dunque valutato le apoproteine e le lipoproteine plasmatiche incluse le sottofrazioni del colesterolo HDL in un gruppo di pazienti con cirrosi stabile e confrontato con un gruppo di controllo.

Pazienti e metodi

Sono stati arruolati consecutivamente 81 pazienti cirrotici con diversa eziologia di malattia nelle varie classi di Child e 30 volontari sani, bilanciati per sesso ed età, con anamnesi negativa per malattie epatiche, endocrine o autoimmuni.

La diagnosi di cirrosi è stata posta sulla base di criteri istologici o dati clinici, laboratoristici ed ecografici. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con segni di infezioni o sepsi, peritonite batterica spontanea, segni di instabilità emodinamica, definita come pressione arteriosa media (MAP) ≤ 60 mmHg o necessità di utilizzo di vasopressori, terapia farmacologica con statine o fibrati. Sono stati inoltre esclusi i pazienti con precedente diagnosi di disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi- surrene ed i pazienti che avevano assunto terapia corticosteroidica negli ultimi sei mesi. La gravità della malattia epatica è stata valutata utilizzando due diversi score di gravità: il Child-Pugh ed il MELD score (Model for End-Stage Liver Disease) [20].

La riserva surrenalica nel gruppo di pazienti cirrotici è stata valutata utilizzando il Low Dose Short Synacthen Test (LDSST), il test di stimolo rapido con 1 µg di corticotropina (Synacthen, Norvartis Pharma AG, Basle, Switzerland). Il Low-dose Synacthen è stato preparato aggiungendo 250 µg di

Synacthen in 250 ml di soluzione salina; 1 ml di tale soluzione contenente 1 µg di Synacthen, è stata poi somministrato al paziente. Tutti i pazienti sono stati studiati entro 24 ore dal ricovero, a digiuno, ed i prelievi ematici sono stati effettuati tra le otto e le nove del mattino. In questi pazienti è stata posizionata un'agocannula nella vena dell'avambraccio almeno 15 minuti prima del test. Al tempo zero è stato eseguito un prelievo ematico per il dosaggio del cortisolo basale, immediatamente dopo è stato somministrato 1 µg di ACTH (Synacthen, Novartis Pharma AG, Basle, Switzerland). Dopo 20 e 30 minuti dal bolo di ACTH sono stati nuovamente eseguiti i prelievi ematici per il dosaggio del cortisolo. Inoltre lo stesso giorno del test sono stati effettuati esami ematochimici di routine, inclusi esame emocromocitometrico, profilo coagulativo, indici di funzionalità epatica, indici di funzionalità renale, elettroliti, profilo lipidico. L'insufficienza surrenale è stata definita da un cortisolo basale inferiore a 3 µg/dl (83 nmol/L) o inferiore a 18 µg/dl (497 nmol/L) dopo 20 o 30 minuti dall'infusione endovenosa di corticotropina [21].

Frazioni lipoproteiche

La tecnica di analisi "Western Blot" è stata utilizzata per quantificare le sottofrazioni del colesterolo HDL, mentre la tecnica immunonefelometrica per l'Apolipoproteina A1 (ApoA1) utilizzando il kit "Roche Diagnostic" su nefelometro automatico (RADIM, Rome, Italy). Dopo trasferimento su membrana polivinilidene difluoride (PVDF), le membrane sono state esposte ad anticorpi monoclonali antiApoA1 e successivamente ad anticorpo secondario chemiluminescente il cui segnale è stato ottenuto mediante software dedicato (Clarity image- Genomix corporation xxx,xx).

Per la quantificazione delle sottofrazioni del colesterolo HDL, HDL2 e HDL3, sono state utilizzate proteine markers (Amersham,xxx,xxx) fluorescenti ad alto peso molecolare e la loro quantità è stata espressa come percentuale di ApoA1 totale luminescente (range di diametro tra 17.0 e 7.0 nm) [22].

IL colesterolo non HDL (Non High Density Lipoprotein Cholesterol- NHDLC) è stato ottenuto mediante la differenza tra il colesterolo totale ed il colesterolo HDL.

Definizioni

Si definisce cortisolo basale il cortisolo misurato al mattino tra le 8:00 e le 9:00 prima della somministrazione di tetracosactrin. Per Peak cortisol si intende la concentrazione maggiore di cortisolo al ventesimo o al trentesimo minuto, mentre il delta cortisol rappresenta la differenza tra il valore di peak cortisol e cortisolo basale. La risposta adeguata al test da stimolo è definita dalla concentrazione di peak cortisol di almeno 18 µg/dl (497 nmol/l). Per il dosaggio di "Cortisol Binding Globulin (CBG)" è stata utilizzata metodica RIA- radio immuno assay (kits Biosource Europe. S.A. Nivelles, Belgium).

Calcolo del Free Cortisol

Come markers surrogati del free cortisol sono stati misurati il Free cortisol index (FCI) ed il free cortisol calcolato (cFC). Il valore di FCI è ottenuto dal rapporto tra il cortisolo totale (nmol/L) e CBG (mg/L) [23]. Il cFC si ottiene utilizzando la formula di Coolen: $U2K(1+N) + U[1 + N + K(T-C)] - C = 0$, dove U è la concentrazione molare del cortisolo non legato, C la concentrazione molare del cortisolo totale, T la concentrazione di transcortina, K l'affinità della CBG per il cortisolo a 37 °C, N il rapporto dell'albumina legata al free cortisol e 1,74 è una costante [24].

Analisi Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il programma "Stat View 6.0". Tutti i dati nel testo e nelle tabelle sono presentati come media e $\pm$ D.S. La normalità di distribuzione delle variabili è stata valutata mediante test di Kolmogorov- Smirnov. E' stato utilizzato il test "t di student" per dati non appaiati per confrontare i parametri nei due gruppi, l'ANOVA test per le variabili continue, il test del χ^2 per le variabili nominali. Le correlazioni sono state valutate utilizzando il test di Pearson. Allo scopo di individuare tutte le variabili indipendentemente associate ad una anomala risposta al LDSST, è stata effettuata una regressione logistica. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Caratteristiche cliniche

Sono stati arruolati consecutivamente 111 pazienti, 81 cirrotici e 30 controlli sani, di cui 63 uomini (56.7%) e 48 donne (43.3%) con un'età media di 67 ± 11 anni. La cirrosi epatica è risultata post epatite B in 9 pazienti, post epatite C in 48, alcool correlata in 11, post NASH in 2 e criptogenetica in 8 pazienti. I pazienti appartenenti alla Classe A, B e C di Child-Pugh sono risultati 20, 39, e 22, con un valore medio di Child-Score pari a 8 (range 5-12). Nel gruppo di pazienti cirrotici 14 (17%) avevano storia di encefalopatia, in 38 (46%) era presente ascite, 23 (28%) presentavano epatocarcinoma (HCC). Non vi erano differenze per sesso, età e BMI tra i pazienti ed il gruppo di controllo ($p = ns$).

Aspetto delle apo- e lipoproteine nei cirrotici e nel gruppo di controllo

In accordo ai dati di letteratura il colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi erano significativamente ridotti nei cirrotici rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.01$) con una progressiva riduzione progressiva in relazione alla gravità di malattia secondo le classi di Child. Analogamente, anche l'apoAI è risultata significativamente più bassa nel gruppo di pazienti cirrotici rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.001$).

L'analisi statistica ha, inoltre, messo in evidenza una differenza significativa in base al sesso per quanto riguarda il colesterolo HDL sia nei cirrotici che nei controlli: nel primo gruppo il colesterolo HDL era significativamente maggiore negli uomini rispetto alle donne (27.43 ± 13.18 vs 19.51 ± 13.54 , $p < 0.01$), nel gruppo di controllo risultava invece significativamente inferiore negli uomini rispetto alle donne (37.56 ± 7.5 vs 52.00 ± 16.38 , $p < 0.01$). Come marker surrogato della concentrazione di Apo B è stato calcolato il colesterolo non HDL (NHDLC = TC – HDL). Inoltre, abbiamo valutato il rapporto HDL/ApoAI, che rappresenta un marcatore delle dimensioni del colesterolo HDL, e le sottofrazioni di HDL. Nel gruppo di cirrotici sia NHDLC che il rapporto HDL/Apo-AI sono risultati significativamente ridotti rispetto ai controlli ($p < 0.0001$ per entrambi). Per quanto riguarda le sottofrazioni di HDL, i pazienti cirrotici mostravano un aumento di HDL-2 ed una riduzione di HDL-3 rispetto al gruppo di controllo.

L' ApoA1 è risultata strettamente correlata al colesterolo HDL in entrambi i gruppi ($r = 0.84$; $p < 0.0001$ nei cirrotici; $r = 0.82$, $p < 0.001$ nel gruppo di controllo), a conferma che l'apoA1 è il

maggior componente del colesterolo HDL. Nel gruppo di controllo non vi è una forte correlazione tra l'ApoA1 e le sottofrazioni (HDL-2: $r = 0.32$, $p = 0.05$; HDL-3: $r = -0.34$; $p = 0.05$) e non è stata trovata alcuna correlazione nei pazienti cirrotici, suggerendo una differente composizione delle sottofrazioni nella cirrosi epatica.

Come già noto dalla letteratura, i livelli di ApoA1 si riducono nei cirrotici e tale riduzione è correlata alla gravità di malattia secondo lo score di Child-Pugh ($r = -0.70$; $p < 0.0001$). Inoltre, l' ApoA1 mostra una correlazione significativa con i livelli di albumina ($r = 0.54$; $p < 0.0001$), INR ($r = -0.59$; $p < 0.0001$), e bilirubina totale ($r = -0.40$; $p < 0.001$). Tra le lipoproteine, i trigliceridi correlano con l'albumina ($r = 0.27$, $p < 0.05$), bilirubina totale ($r = -0.28$, $p < 0.01$), INR ($r = -0.49$; $p < 0.001$) e con la gravità di malattia in accordo allo score di Child ($r = -0.47$, $p < 0.001$). Nei pazienti cirrotici, ma non nel gruppo di controllo, è stata trovata una significativa correlazione tra i trigliceridi e ApoA1 ($r = 0.27$; $p < 0.05$).

Caratteristiche dei pazienti cirrotici con Insufficienza surrenalica (IS) e normale funzione surrenalica (NFS).

Tutti i pazienti cirrotici inclusi nello studio sono stati sottoposti a LDSST per lo studio della funzione surrenalica. 26 pazienti (32%) risultavano affetti da IS. Nessuna differenza significativa è stata osservata per età, sesso, eziologia, tra il gruppo con insufficienza surrenalica e con normale funzione surrenalica. Come già noto dai dati in letteratura, i pazienti con insufficienza surrenalica presentavano una malattia più grave con uno score di Child e MELD maggiore rispetto a coloro con normale funzione. Inoltre, i due gruppi differivano significativamente per presenza di ascite (NFS 40% vs IS 63%; $p < 0.01$), albumina, CBG e concentrazione di sodio. Per quanto riguarda il cortisolo basale e post stimolo, i due gruppi differivano significativamente per cortisolo basale, (NFS 488.29 ± 214.22 vs IS 265.41 ± 12.68 nmol/L; $p < 0.0001$), peak cortisol (NFS 713.10 ± 162.27 vs IS 387.89 ± 96.80 nmol/L, $p < 0.0001$) e delta cortisol (NFS 232.69 ± 149.16 vs IS 128.91 ± 86.45 nmol/L, $p < 0.01$). Nessuna differenza significativa è stata rilevata per la concentrazione di ACTH nei due gruppi (NFS 25 ± 13 vs IS $22,4 \pm 13$, $p = 0,5$).

I pazienti cirrotici con insufficienza surrenalica presentavano Free Cortisol calcolato (NFS 2.85 ± 2.36 vs IS 1.55 ± 0.78 , $p < 0.05$), peak free cortisol (NFS 5.49 ± 2.58 vs IS 2.58 vs 2.82 ± 0.88 , $p < 0.001$) e delta free cortisol (NFS 2.62 ± 1.39 vs IS 1.36 ± 0.64 , $p < 0.01$) significativamente inferiore rispetto al gruppo con normale funzione surrenalica.

Assetto delle apo- e lipoproteine nei pazienti cirrotici con insufficienza surrenalica (IS) e normale funzione surrenalica (NFS).

Il gruppo con IS mostrava colesterolo totale ($p < 0.04$), trigliceridi ($p < 0.0001$), ApoA1 ($p = 0.004$), HDL ($p < 0.05$) e rapporto HDL/ApoAI ($p < 0.01$) inferiore rispetto ai valori presentati dal gruppo NFS. Al contrario il colesterolo LDL e le sottofrazioni HDL2-HDL3 non differivano significativamente. All'analisi di correlazione, una correlazione significativa veniva osservata tra i trigliceridi e il cortisolo basale ($r = 0.32$, $p < 0.001$), il peak cortisol ($r = 0.45$, $p < 0.0001$) e con il delta cortisol ($r = 0.22$, $p = 0.05$). Il colesterolo totale correlava con il delta cortisol ($r = 0.30$, $p < 0.01$), mentre nessuna correlazione è stata osservata con cortisolo basale o peak cortisol. L'ApoAI è risultata debolmente correlata al peak cortisol ($r = 0.22$, $p = 0.05$), ed, invece, strettamente correlata al delta cortisol ($r = 0.37$, $p < 0.001$). Per quanto riguarda il colesterolo non HDL (NHDLC), esso è risultato correlato con il delta cortisol ($r = 0.27$, $p < 0.01$), mentre il rapporto HDL/ApoAI è risultato inversamente correlato al peak cortisol ($r = 0.24$, $p < 0.05$).

Per studiare la relazione tra le lipoproteine e la funzione surrenalica in base alla risposta al LDSST, abbiamo utilizzato il modello di regressione logistica prendendo in considerazione il colesterolo totale, i trigliceridi, l'ApoA1 e HDL/ApoAI ratio, tutte variabili risultate correlate alla regressione semplice alla funzione surrenalica. Da questa valutazione solo l'ApoAI ($p < 0.01$) e i trigliceridi ($p < 0.05$) risultavano correlate con l'insufficienza surrenalica. All'analisi multivariata con lo score di Child per valutare se i bassi livelli di ApoA1 e trigliceridi potessero essere fattori di rischio indipendente di severità di malattia, sia l'ApoAI ($p < 0.01$) che i trigliceridi ($p < 0.005$) sono risultati fattori di rischio indipendente per IS.

Conclusioni

I meccanismi attraverso cui la malattia epatica potrebbe condurre alla riduzione della riserva funzionale surrenalica sono diversi e a tal proposito sono state avanzate alcune ipotesi

patogenetiche, tra queste la carenza di substrati per la steroidogenesi rappresenta un potenziale meccanismo causale. La sintesi degli ormoni glucocorticoidi ha come substrato il colesterolo e la sua conversione in pregnenolone a livello mitocondriale è la tappa limitante dell'intero processo di steroidogenesi. Sia in condizioni normali che in condizioni di elevata stimolazione surrenalica circa l'80% del colesterolo utilizzato per la sintesi degli ormoni steroidei deriva dal circolo ematico, e solo il 20% è sintetizzato ex novo a livello surrenalico a partire dall'acetato e da altri precursori [25]. Il colesterolo presente in circolo è legato a diverse lipoproteine. Studi sperimentali suggeriscono che la quota di colesterolo legata al colesterolo HDL rappresenti il substrato più importante per la steroidogenesi [26]. Un ruolo cruciale per la sintesi degli ormoni steroidei a partire dal colesterolo HDL sembra inoltre essere svolto dall'apoA1. L'ApoA1 insieme all' Apo II e Apo E, costituiscono la frazione proteica del colesterolo HDL. L'Apo A1 rappresenta inoltre il ligando del recettore SR-BI presente sulla superficie delle cellule surrenaliche, a seguito di tale legame il colesterolo verrà internalizzato all'interno della cellula e avviato alla steroidogenesi [27-28].

Il nostro studio dimostra che nella cirrosi epatica stabile complicata da insufficienza surrenalica è presente una riduzione dei substrati per la steroidogenesi in termini di colesterolo totale, trigliceridi, Apo A1, HDL ma non di colesterolo LDL, e sottofrazioni HDL2-HDL3.

Tali evidenze potrebbero suggerire che nella cirrosi stabile non solo il colesterolo HDL ma anche l'Apolipoproteina A1 possano rappresentare i determinanti principali della steroidogenesi. Questa ipotesi patogenetica risulta interessante e può in parte spiegare la patogenesi della ridotta riserva funzionale nella cirrosi epatica; tuttavia ulteriori studi sono necessari per verificare altri meccanismi patogenetici che potrebbero essere coinvolti e che potrebbero configurare una patogenesi multifattoriale della sindrome epato- surrenale.

Hypothalamus-pituitary dysfunction is common in patients with stable cirrhosis and abnormal low dose short synacthen test (Fede G, Spadaro L, Privitera G, et al. Dig Liver Dis 2015- Allegato 2).

Background

Come precedentemente descritto, il meccanismo che conduce alla disfunzione surrenalica nella cirrosi epatica non è noto. Non è chiaro se nei pazienti cirrotici vi sia un'alterazione strutturale della ghiandola (IS primitiva) o un'alterata funzione dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene (IS secondaria). Il test all'ACTH, utilizzato per la diagnosi di insufficienza surrenalica, non è in grado di discriminare la forma primitiva dalla secondaria. I livelli plasmatici di ACTH sono di ausilio nella diagnosi di IS primitiva, condizione nella quale si riscontrano alti valori di ACTH superiori a 200 pg/mL (44 pmol/L), non sono tuttavia conclusivi nella diagnosi di IS secondaria e in particolar modo nei pazienti cirrotici con sindrome epato-surrenalica che presentano valori non differenti rispetto alla popolazione con normale funzione del surrene [29]. In questo secondo studio abbiamo dunque affrontato questo problema utilizzando un approccio multistep per la diagnosi dell'IS nella cirrosi, in cui il primo test è stato il tradizionale LDSST. Il secondo test, somministrato ai pazienti risultati positivi al primo test, è stato il Long Synacthen test (LST) con 1 mg di Synacthen depot. Il LST è un test di semplice esecuzione utilizzato per la diagnosi di IS primitiva. Il dosaggio del cortisolo viene effettuato in basale e dopo 1, 4, 8 e 24 ore dalla somministrazione del synacthen depot. I soggetti sani mostrano un rapido incremento dei valori di cortisolo nel corso della prima ora, con ulteriore lieve incremento a 24 ore. Nei soggetti con deficit di ACTH l'incremento iniziale è estremamente basso con aumento dei valori di cortisolo tardivo a 24 ore. Nei pazienti con IS primitiva non si osserva alcun incremento poiché i livelli di ACTH sono già elevati [30].

Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la risposta surrenalica ad uno stimolo prolungato con ACTH e verificare se una stimolazione prolungata nel tempo sia in grado di ripristinare l'alterata funzione ghiandolare con lo scopo di fornire indicazioni utili sulla patogenesi della sindrome epato-surrenalica.

Pazienti e metodi

Per questo studio prospettico osservazionale, sono stati arruolati consecutivamente pazienti cirrotici ammessi presso il nostro dipartimento di medicina interna dell'ospedale Garibaldi Nesima e il Royal Free Hospital- Sheila Sherlock Centre di Londra. I criteri di esclusione dello studio sono stati: infezione o sepsi, peritonite batterica spontanea, segni di instabilità emodinamica (definita come $MAP \leq 60 \text{ mmHg}$ o necessità di utilizzo di vasopressori), pregressa diagnosi di disturbi dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene, terapia steroidea nei precedenti 6 mesi. La riserva surrenalica è stata studiata entro 24 dal ricovero utilizzando il LDSST e il dosaggio basale di ACTH e CBG. I pazienti con diagnosi di disfunzione surrenalica ai test di base sono stati poi sottoposti al LST.

Low Dose Short Synacthen Test: è stato praticato tra le 8 e le 9 del mattino a digiuno. I prelievi per il dosaggio del cortisolo sono stati effettuati in basale e dopo 20 e 30 minuti dall'infusione ev di 1 μg di Synacthen. L'insufficienza surrenalica è stata definita da un cortisolo dopo stimolo inferiore a 494 nmol/L. Inoltre, in un sottogruppo di pazienti, è stato dosato il cortisolo libero. Valori di cortisolo libero dopo stimolo inferiori a 33 nmol/L sono stati definiti anormali.

Long Synacthen Test: il test è stato somministrato a distanza di almeno 24 ore dal LDSST. I prelievi per il dosaggio del cortisolo sono stati effettuati in condizioni basali (tra le 8 e le 9 del mattino a digiuno) e a 30 minuti, 60 minuti, 4 ore, 8 ore e 24 ore dalla somministrazione intramuscolare di 1 mg di Synacthen depot. Nei soggetti normali il cortisolo raggiunge un valore superiore a 900 nmol/L nelle prime 4 ore dopo la somministrazione di ACTH depot, con successivi modesti incrementi. Nei pazienti con insufficienza surrenalica secondaria o centrale, in cui vi è un deficit di ACTH endogeno, si registra una risposta surrenalica ritardata, con picco del cortisolo ritardato alle successive 24 ore dopo il test. Nei soggetti con insufficienza surrenalica primaria, in cui vi è un'alterazione strutturale del surrene, non si ha una risposta adeguata in termini di cortisolemia, con valori costantemente inferiori a 900 nmol/L [31].

Analisi Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il programma SPSS 13.0 per Windows. Tutti i dati nel testo e nelle tabelle sono presentati come media $\pm$ E.S. o come mediana con range interquartile ove appropriato. E' stato utilizzato il test "t di student" o il Mann-Whitney U test per

le variabili continue, il test del χ^2 per le variabili nominali. L'analisi di correlazione è stata effettuata mediante il coefficiente di Spearman. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Sono stati arruolati 121 pazienti cirrotici di cui 74 uomini, l'età mediana è stata di 60 (26-89) e l'eziologia della cirrosi è stata virale nel 34% dei soggetti, alcolica nel 40%, nel 26% altre eziologie.

Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti al LDSST: la prevalenza dell'IS è stata del 38% (46 pazienti su 121).

Long Synacthen Test: dei 46 pazienti nei quali il LDSST era risultato anormale, il LST è stato praticato su 29 pazienti. Tra questi pazienti, 12/29 (41%) hanno evidenziato una normale risposta (cortisolo > 900 nmol/L entro 4 ore, Gruppo 1), 16/29 (55%) hanno mostrato una risposta surrenalica ritardata (cortisolo < 900 nmol/L a 4 ore ma superiore a 900 nmol/L entro 24 ore, Gruppo 2) e solo un paziente ha mostrato una risposta anormale (cortisolo < 900 nmol/L entro 24 ore). Solo il cortisolo basale risultava statisticamente differente tra i 2 gruppi. I valori di ACTH non differivano tra i 2 gruppi, e nessuno dei pazienti mostrava valori di ACTH > 200 pg/mL, che è indicativo di IS primaria. La curva ROC ha permesso di identificare un cut-off di cortisolo basale < 254 nmol/L in grado di discriminare i pazienti con risposta surrenalica ritardata al LST (AUC 0.78, $p=0.001$) con buona accuratezza diagnostica (Sensibilità 67%, Specificità 81%).

Dosaggio del cortisolo libero (FC): il cortisolo libero è stato dosato in 12 pazienti: 7 pazienti (58%) hanno evidenziato una risposta anormale al LDSST (FC dopo stimolo < 33 nmol/L): questi ultimi hanno mostrato anche una ridotta risposta al LST dopo 24 ore (1326 vs 1750 nmol/L, $p=0.04$). Inoltre il FC dopo stimolo è risultato direttamente correlato alla risposta surrenalica dopo 24 ore dal LST ($r=0.70$, $p=0.01$).

Conclusioni

Nel nostro studio la funzione surrenalica del paziente cirrotico è stata valutata mediante un approccio multistep, il LDSST seguito dal LST allo scopo di identificare il livello del deficit di

produzione di cortisolo. La quasi totalità dei pazienti con sospetta disfunzione surrenalica al LDSST (96%) mostrava una ritardata risposta al LST, escludendo una IS primaria. In caso di IS primaria infatti, le ghiandole surrenaliche totalmente o parzialmente distrutte non sono in grado di rispondere ad uno stimolo prolungato. Inoltre, come è noto, l'IS primaria è caratterizzata da elevati valori di ACTH . Nessuno dei pazienti studiati ha evidenziato valori di ACTH >200 pg/mL. Questi dati suggeriscono che una stimolazione prolungata e sovralfisiologica con il synacthen depot sia in grado di ripristinare la capacità della cellula surrenalica di produrre cortisolo supportando dunque un difetto a carico dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene che potrebbe essere la causa prevalente dell'insufficienza surrenalica in questi pazienti. In corso di epatopatie acute o croniche, sono numerosi i fattori che possono rendersi responsabili del danno a carico dell'HPA. Dati in letteratura supportano il ruolo svolto dagli aumentati livelli circolanti di endotossine e citochine pro-infiammatorie sulla funzione dell'asse HPA [19]. Anche l'accumulo di acidi biliari a livello centrale sembra essere responsabile dell'alterata funzione dell'asse HPA [32]. Nei pazienti cirrotici con insufficienza surrenalica una ridotta funzione dell'asse in combinazione ad un'alterata secrezione di cortisolo a livello cellulare potrebbero spiegare la patogenesi della sindrome epato-surrenalica. Ulteriori studi sono necessari per approfondire e confermare i nostri dati.

Emerging hepatic syndromes: pathophysiology, diagnosis and treatment (Bertino G*, Privitera G*, et al. Intern Emerg Med 2016- Allegato 3).

Nel corso dei nostri studi sulla patogenesi della sindrome epato-surrenalica, abbiamo pubblicato una review concepita per riassumere i principali meccanismi patogenetici, la diagnosi e le opzioni terapeutiche ad oggi disponibili circa le emergenti complicanze della cirrosi epatica quali la sindrome epato-renale, la sindrome epato-polmonare e la sindrome epato-surrenale. La sezione di nostra competenza era quella relativa alla sindrome epato-surrenalica. Abbiamo riassunto la sindrome partendo dalla definizione della stessa, trattando le principali teorie patogenetiche ad oggi note, a seguire abbiamo elencato e discusso i principali test e criteri diagnostici di corrente uso per la diagnosi della sindrome nel paziente cirrotico. Dal punto di vista metodologico la diagnosi risulta di difficile esecuzione poiché diversi fattori confondenti la rendono complessa e talvolta non conclusiva. Un primo aspetto da affrontare in questa categoria di pazienti, è rappresentato dal dosaggio del cortisolo sierico totale. E' noto infatti che il cortisolo sierico risulta per il 90% legato alla cortisol-binding-globulin (CBG) e all'albumina, e solo per il restante 10% è presente in forma libera nel siero costituendone la parte biologicamente attiva. La CBG e l'albumina sono di sintesi epatica, risultano dunque ridotte nel paziente cirrotico. Conseguentemente, in caso di cirrosi, la diagnosi di iposurrenalismo, utilizzando il dosaggio del cortisolo totale, sovrastima la percentuale della sindrome. Da tali presupposti nasce la necessità di dosare il cortisolo libero, gravato da alti costi e dalla difficoltà di reperibilità della metodica nella pratica quotidiana. Sono stati dunque introdotti degli indici surrogati, quali il cortisolo libero calcolato mediante la formula di Coolens (cFC) e il free cortisol index. Il valore del free cortisol index (FCI) è ottenuto dal rapporto tra il cortisolo totale (nmol/L) e la CBG (mg/L) [33]. Il cFC si ottiene utilizzando la formula di Coolens:

$$U^2K(1+N) + U[1 + N + K(T-C)] - C = 0$$

dove U è la concentrazione molare del cortisolo non legato, C la concentrazione molare del cortisolo totale, T la concentrazione di transcortina, K l'affinità della CBG per il cortisolo a 37 °C, N il rapporto dell'albumina legata al free cortisolo e 1,74 è una costante [34]. Un'alternativa sembra essere rappresentata dal dosaggio del cortisolo salivare che sembra essere un buon marker

surrogato del cortisolo free. Nel paziente cirrotico tuttavia alcune complicanze come le candidosi orali, i sanguinamenti gengivali e le parotiti, soprattutto nei pazienti etilisti, rendono il dosaggio del cortisolo salivare non abbastanza affidabile e sicuro. Alcuni studi in letteratura supportano il valore diagnostico del cortisolo salivare nel paziente cirrotico. Galbois et al. analizzano la prevalenza della sindrome epato-surrenalica confrontando il dosaggio del cortisolo sierico, salivare e libero. Gli autori concludono che vi è una stretta associazione tra il cortisolo salivare e il free e che il cortisolo salivare ha un valore diagnostico di gran lunga superiore al cortisolo sierico totale [35]. Analogamente Thevenot et al. supportano l'uso del cortisolo salivare quale marker surrogato del free cortisol nel paziente cirrotico [36].

Un altro problema affrontato nella presente review è rappresentato dal test diagnostico usato per la definizione dell'insufficienza surrenalica. Disponiamo di differenti test diagnostici, ma al momento non esiste nel paziente cirrotico una consensus generale circa il test da utilizzare e i cut-off di riferimento da adottare. Nei differenti studi condotti in letteratura figurano diversi cut-off che spiegano in parte la diversa prevalenza della sindrome riscontrata nelle varie casistiche: Triantos et al. definiscono insufficienti livelli di peak cortisol (ossia il valore più elevato di cortisolo riscontrato dopo stimolazione) < 690 nmol/l [37]; Marik et al. utilizzano invece un cut-off di 552 nmol/l [12]; 500 nmol/l sembra invece essere il valore numerico più frequentemente usato per fare diagnosi di insufficienza surrenalica, figura infatti in numerosi lavori scientifici [6]; infine in una nostra casistica abbiamo recentemente utilizzato quale valore di riferimento < 442nmol/l [14].

Standard Dose Short Synacthen Test (SD-SST)

Lo SD-SST si basa sulla somministrazione di 250 µg di Synacthen per via endovenosa e sul dosaggio del cortisolo sierico al tempo 0 quindi dopo 30 e 60 minuti dalla somministrazione. La dose utilizzata durante il test è considerata sovrafisiologica, si tratta dunque di un test che, benché largamente utilizzato, potrebbe sottostimare la prevalenza dell'insufficienza surrenalica specie se lieve [7].

Low Dose Short Synacthen Test (LD-SST)

Il LD-SST contrariamente al test descritto in precedenza, utilizza una dose di stimolo estremamente più bassa e pari a 1 µg di Synacthen. Il dosaggio del cortisolo verrà in tal caso effettuato al tempo 0

e dopo 20 e 30 minuti dallo stimolo. Il test riproduce un stimolo fisiologico, e sembra essere dotato di una maggiore sensibilità. Tale test è stato più frequentemente utilizzato e ritenuto di più appropriata esecuzione nei pazienti cirrotici emodinamicamente stabili, non critici [6].

Terapia sostitutiva con steroidi

E' stato infine affrontato un aspetto estremamente controverso della sindrome epato-surrenalica, rappresentato dalla terapia sostitutiva. Gli studi ad oggi pubblicati sulla supplementazione di steroidi nei pazienti cirrotici critici sono pochi e con risultati contrastanti. Harry et al. hanno valutato l'outcome e gli effetti collaterali associati alla terapia con idrocortisone in pazienti con insufficienza epatica in trattamento con vasopressori. Gli autori concludono che gli steroidi sembrano ridurre la dose di vasopressori richiesti ma non migliorano la sopravvivenza [13]. Un secondo trial non randomizzato, includeva 340 pazienti con malattie epatiche, dei 245 affetti da insufficienza surrenalica, 156 venivano sottoposti a terapia steroidea. La mortalità dei pazienti trattati era del 26% rispetto al 46% dei non trattati [8]. Arabi et al. effettuava un trial randomizzato a doppio cieco per analizzare gli effetti della terapia steroidea a basse dosi nei pazienti cirrotici con shock settico. La terapia sembrava associarsi ad un miglioramento emodinamico precoce, che non risultava poi accompagnarsi da una riduzione della mortalità a 28 giorni ed anzi sembrava associarsi ad un maggior tasso di complicanze come sanguinamento gastrointestinale [38].

Altri pochi studi sono da annoverare [9] che a conferma di quelli sinora commentati mostrano risultati contrastanti, tuttavia un grande trial randomizzato è in corso quindi a breve avremo dei nuovi dati che tenderanno di fare chiarezza su questo aspetto controverso della sindrome.

Studio morfologico delle ghiandole surrenali nella cirrosi epatica.

Background

Tra le diverse teorie patogenetiche della sindrome epato-surrenale bisogna annoverare il danno strutturale a carico delle ghiandole surrenali. Le alterazioni del sistema coagulativo sono di frequente riscontro nei pazienti cirrotici. Queste turbe della coagulazione potrebbero causare un danno emorragico/ischemico a livello surrenalico, con conseguente insufficienza ghiandolare.

Ad oggi, non esistono studi in letteratura che abbiano analizzato la morfologia dei surreni nei pazienti con cirrosi, elemento che potrebbe fornire informazioni utili per meglio comprendere la fisiopatologia della sindrome epato-surrenalica. La metodica di riferimento per lo studio morfologico dei surreni è la tomografia computerizzata (TC). Questa metodica rappresenta il gold standard per l'approfondimento diagnostico della stragrande maggioranza delle patologie surrenaliche, avendo la capacità di evidenziare lesioni surrenaliche di dimensioni anche inferiori a 3 mm [39].

All'esame TC, l'aspetto radiologico dei surreni varia notevolmente per forma e dimensioni a seconda dell'età, del sesso, del BMI (Body Mass Index), della superficie corporea (BSA: Body Surface Area) e delle condizioni fisiopatologiche associate (malattie endocrine, shock settico, traumi, terapia cronica con glucocorticoidi, obesità).

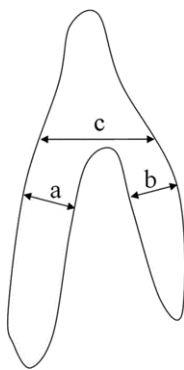
Alla TC basale, i surreni appaiono come strutture iperdense rispetto al tessuto adiposo circostante. Nelle scansioni tomografiche assiali, sono visualizzabili come strutture di forma a virgola, a V o a Y invertita, in base al livello della sezione considerata lungo l'asse longitudinale del corpo, a causa della loro complessa disposizione spaziale (Fig 3).

Figura 3. Ghiandole surrenaliche normali



In ciascun surrene distinguiamo un corpo, un braccio laterale e un braccio mediale. Le dimensioni delle ghiandole surrenali possono essere valutate con parametri lineari, misurando il diametro trasversale dei due bracci e del corpo rispetto all'asse longitudinale della porzione considerata (Fig. 4), o con parametri volumetrici, ricostruendo il volume della ghiandola con particolari software impiegati in ambito radiologico.

Figura 4. *schema esemplificativo per la misurazione dei diametri surrenalici: braccio laterale (a), braccio mediale (b) e corpo (c).*



In un recente studio retrospettivo [40] è stata analizzata la morfologia delle ghiandole surrenali in una popolazione di soggetti sottoposti ad indagine TC per indicazioni diverse dalla patologia surrenalica (tumori, infezioni, dolore addominale etc). La popolazione in questione è stata definita “normale” in termini di morfologia surrenalica, dopo aver escluso la presenza di masse o calcificazioni, e tutte quelle condizioni cliniche che si associano a modifiche della morfologia ghiandolare. Questo studio ha fornito dati di riferimento circa le dimensioni volumetriche e lineari dei surreni nella popolazione normale. Per quanto riguarda le misurazioni lineari, ciascuno dei tre diametri considerati nel surrene sinistro è risultato essere maggiore del corrispondente diametro controlaterale. Nel sesso femminile, sia il corpo che i bracci sono risultati ridotti rispetto al sesso maschile. Anche in questo caso è stata riscontrata una correlazione significativa tra lo spessore totale, il peso corporeo e l'età. Infine, per quanto riguarda la densità, è stato descritto che la ghiandola surrenale destra ha una densità media di 34 ± 19 HU, mentre la ghiandola surrenale sinistra ha una densità media di 32 ± 21 HU, con valori mediamente più bassi nella popolazione

maschile. È stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa anche tra densità, peso, BMI e BSA: all'aumentare del peso, BMI e BSA, la densità si riduce. La densità inoltre risultava inversamente proporzionale al volume della ghiandola.

Obiettivo dello studio

Sulla base di tali presupposti, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, attraverso metodica TC, la morfologia delle ghiandole surrenali in un gruppo di pazienti cirrotici stabili e confrontarla con un gruppo di soggetti sani. Obiettivo secondario è stato quello di ricercare un'eventuale correlazione tra la morfologia dei surreni e la funzione surrenalica, allo scopo di investigare i meccanismi patogenetici sottostanti la sindrome epato-surrenalica.

Pazienti e Metodi

Abbiamo calcolato la numerosità campionaria tenendo conto di un errore $\alpha = 0,01$, una potenza dello studio del 90% e una allocation di 2:1. I controlli sono stati appaiati per età e sesso.

La diagnosi di cirrosi è stata posta sulla base di criteri istologici o dati clinici, laboratoristici ed ecografici. I pazienti con segni di infezioni o sepsi, peritonite batterica spontanea o segni di instabilità emodinamica, definita come pressione arteriosa media ≤ 60 mmHg o necessità di utilizzo di vasopressori, sono stati esclusi dallo studio. Sono stati inoltre esclusi i pazienti con precedente diagnosi di disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e i pazienti che avevano assunto terapia corticosteroidica negli ultimi sei mesi. La gravità della malattia epatica è stata valutata con il Child-Pugh ed il MELD score (Model for End-Stage Liver Disease). La riserva surrenalica è stata studiata utilizzando il test di stimolo con 250 μ g di corticotropina (Synacthen, Norvartis Pharma AG, Basle, Switzerland).

Tutti i pazienti sono stati studiati a digiuno, e i prelievi ematici sono stati effettuati tra le otto e le nove del mattino. In questi pazienti è stata posizionata un' agocannula nella vena dell'avambraccio almeno 15 minuti del test. Al tempo zero è stato eseguito un prelievo ematico per il dosaggio del cortisolo basale, immediatamente dopo sono stati somministrati 250 μ g di ACTH (Synacthen,

Norvartis Pharma AG, Basle, Switzerland). Dopo 60 minuti dal bolo di ACTH sono stati nuovamente eseguiti i prelievi ematici per il dosaggio del cortisolo. L'insufficienza surrenalica è stata definita da un cortisolo basale inferiore a 3µg/dl (83nmol/L) o inferiore a 18µg/dl (497 nmol/L) dopo 60 minuti dall'infusione endovenosa di corticotropina.

Lo stesso giorno del test, sono stati registrati i parametri antropometrici peso, altezza, BMI e BSA, e sono stati effettuati esami ematochimici di routine, inclusi esame emocromocitometrico, profilo coagulativo, indici di funzionalità epatica, indici di funzionalità renale, assetto lipidico ed elettroliti. Il BMI è stato calcolato dividendo il peso per il quadrato dell'altezza espressa in metri. La BSA è stata determinata con la formula di Dubois:

$$BSA (m^2) = 0,20247 \times altezza (m)^{0,725} \times peso (kg)^{0,425}$$

In tutti i soggetti dello studio sono stati dosati i valori di ACTH plasmatico con metodica immunoradiometrica (v.n. 10-60pg/ml).

I soggetti appartenenti al gruppo di controllo sono stati arruolati presso il Dipartimento di Medicina Interna e presso il Dipartimento di Radiologia dell'Ospedale "Garibaldi" di Catania. Le principali indicazioni all'esecuzione dell'esame TC per i soggetti di controllo erano rappresentate da: dolore addominale, colica renale, follow up di noduli polmonari. Tale popolazione, bilanciata per età e sesso, è stata selezionata tenendo conto dei seguenti criteri di esclusione: cirrosi epatica, età < 18 o > 75 anni, BMI ≥ 35, pregressa diagnosi di patologie surrenali e/o di disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, HbA1c ≥ 8%, terapia corticosteroidica nei sei mesi precedenti, sepsi e shock settico, malattia neoplastica metastatica, depressione in trattamento farmacologico.

Il sottogruppo di pazienti arruolati presso il Dipartimento di Medicina Interna è stato sottoposto ad esami ematochimici tra cui: esame emocromocitometrico, profilo coagulativo, indici di funzionalità epatica e renale, assetto lipidico, elettroliti, cortisolo basale ed ACTH.

Valutazione TC del surrene

Per il presente studio sono state analizzate le immagini radiologiche in basale ottenute mediante l'utilizzo di un apparecchio GE Lightspeed 16 strati (spessore di risoluzione 5 mm, kV 120, mA

variabile) e un apparecchio Siemens SOMATOM Definition AS (spessore di risoluzione 2 mm, kV 120, mA variabile).

La valutazione TC delle ghiandole surrenali è stata eseguita da un medico radiologo esperto in imaging addominale.

Per ciascun surrene sono stati valutati:

- Spessore;
- Densità;
- Eventuali alterazioni strutturali o masse.

Per la misurazione dello spessore è stato seguito il protocollo di Vincent [41], ovvero è stato misurato lo spessore del corpo, del braccio laterale e del braccio mediale di ciascuna ghiandola, ortogonalmente all'asse longitudinale di ciascun segmento surrenalico, nel punto di maggiore larghezza. Lo spessore totale è stato calcolato come somma delle singole misurazioni.

La densità di ciascun surrene è stata calcolata come la media delle densità ottenute da tre ROI di circa 1 cm².

Analisi Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il programma "Stat View 6.0". Tutti i dati nel testo e nelle tabelle sono presentati come media e $\pm$ D.S. E' stato utilizzato il test "t di student" per dati non appaiati per confrontare i parametri nei due gruppi, l'ANOVA test per le variabili continue, il test del χ^2 per le variabili nominali. Le correlazioni sono state valutate utilizzando il test di Pearson. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Caratteristiche generali della popolazione studiata

Ad oggi sono stati reclutati 99 pazienti di cui 66 cirrotici e 33 controlli, tra questi 65 uomini, e 34 donne. L'età media della popolazione totale è pari a 64 ± 1 anni. Per quanto riguarda le

caratteristiche antropometriche della popolazione in studio il BMI medio risultava pari a 27 ± 5 kg/m² e BSA di 1.81 ± 0.2 m².

Dei 66 cirrotici inclusi nello studio, i pazienti di sesso maschile sono 45 (68%), mentre le pazienti 21 (32%). L'età media della popolazione cirrotica è di 64 ± 12 anni, il BMI di 27 ± 5 kg/m² e BSA di 1.81 ± 0.2 m². L'eziologia era virale in 29 pazienti (44%), rispettivamente in 21 da HCV e in 8 da HBV, alcool correlata in 17 pazienti (26%), post-NASH in 7 pazienti (11%), autoimmune in 2 pazienti (3%) e criptogenetica in 11 pazienti (16%). I pazienti appartenenti alla Classe A, B e C di Child-Pugh sono rispettivamente 11/26/27 con un Child-Score di 8.5 ± 2 . Per quanto riguarda il MELD, lo score medio era 13.6 ± 4.5 . Inoltre, 14 pazienti (22%) erano affetti da encefalopatia epatica, in 36 (55%) era presente ascite, in 8 (12%) era stata precedentemente posta diagnosi epatocarcinoma e in 27 (41%) erano presenti varici esofagee.

La popolazione di soggetti di controllo bilanciata per età e sesso presentava un'età media di 62 ± 8 anni. 20 soggetti erano di sesso maschile e 13 di sesso femminile. Il BMI medio risultava pari a 27 ± 4 kg/m² e BSA di 1.86 ± 0.2 m².

Caratteristiche radiologiche dei surreni nella popolazione generale

A conferma di dati presenti in letteratura, nella popolazione oggetto del nostro studio il surrene di sinistra mostrava dimensioni maggiori rispetto al surrene di destra (20.9 ± 5.5 mm vs 17.8 ± 4.6 mm), inoltre come precedentemente anticipato, lo spessore medio dei surreni risultava positivamente correlato all'età e al peso. Il surrene di destra mostrava invece una densità maggiore del surrene controlaterale (22.5 ± 10.6 HU vs 21.9 ± 8.6 HU).

Confronto tra popolazione cirrotica e gruppo di controllo

I pazienti cirrotici presentavano uno spessore totale del surrene di sinistra di 21.8 ± 5.4 mm e del surrene di destra 18.7 ± 4.3 mm. Nel gruppo di controllo, lo spessore totale del surrene di sinistra è pari a 18.6 ± 4.9 mm e del surrene destro di 15.7 ± 4.7 mm. Lo spessore totale di entrambi i surreni della popolazione cirrotica risultava dunque significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo ($p = 0,01$ a sinistra; $p = 0,005$ a destra). In particolare, lo spessore totale del surrene

sinistro è risultato più grande del 17,2% rispetto al controllo omolaterale, mentre lo spessore totale del surrene destro è risultato maggiore del 19,1%.

Le dimensioni di entrambi i surreni risultavano inoltre significativamente correlate con la gravità della malattia epatica. Con l'avanzare della classe di Child-Pugh, infatti, in entrambi i surreni, lo spessore totale aumentava progressivamente; a carico del surrene di destra, questo aumento è risultato statisticamente significativo ($p = 0.01$). Suddividendo la popolazione cirrotica sulla base del MELD score, i pazienti con MELD score superiore a 12 presentavano uno spessore del surrene di destra significativamente aumentato rispetto ai pazienti con MELD score inferiore a 12 ($p = 0.07$). Per quanto riguarda la densità, nella popolazione cirrotica è stata riscontrata una densità di 22.4 ± 8.8 HU nel surrene di sinistra e di 24.2 ± 10.5 HU nel surrene di destra. Nel gruppo di controllo, invece, è stata riscontrata una densità di 19.8 ± 7.4 HU nel surrene di sinistra e di 16.9 ± 9.4 HU nel surrene di destra.

Entrambi i surreni dei pazienti cirrotici presentano dunque una densità maggiore rispetto al gruppo di controllo, tuttavia tale differenza è risultata statisticamente significativa solo per il surrene di destra ($p = 0.01$).

Stratificazione per funzione surrenalica

Ad oggi, dei 66 pazienti cirrotici arruolati, 60 sono stati sottoposti allo Standard Dose Short Synacthen Test (SD-SST). In 21 pazienti (35%) veniva posta diagnosi di insufficienza surrenalica (IS). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata individuata tra i pazienti normosurrenalici (NFS) e i pazienti IS in termini di spessore dei surreni. La densità risultava tendenzialmente più alta nel gruppo di pazienti con IS, anche se il dato non ha raggiunto la significatività statistica (IS surrene destro 26.9 ± 11.2 HU; surrene sinistro 24.4 ± 7.7 HU vs NFS surrene destro 22.5 ± 9.5 HU; surrene sinistro 20.6 ± 9.6 HU).

Il dosaggio dell'ACTH è stato effettuato in tutti i pazienti, nessuna differenza significativa veniva riscontrata tra i pazienti NFS e i pazienti con IS (27.8 ± 17.9 pg/ml vs 28.3 ± 18.4 pg/ml).

DISCUSSIONE

L'obiettivo primario del nostro studio è stato quello di valutare, mediante metodica TC, la morfologia delle ghiandole surrenali in un gruppo di pazienti cirrotici stabili, e confrontarla con un gruppo di controllo. Nei pazienti cirrotici lo spessore totale dei surreni risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo e positivamente correlato con la gravità della malattia. E' stata inoltre riscontrata una densità maggiore nei pazienti cirrotici rispetto al gruppo di controllo.

Diverse ipotesi patogenetiche possono essere avanzate per spiegare i nostri risultati. Le modifiche emodinamiche e coagulative, caratteristiche della cirrosi epatica, potrebbero in parte contribuire a tali alterazioni. L'aumento delle dimensioni dei surreni potrebbe essere dovuto alla congestione venosa conseguente all'ipertensione portale, mentre le alterazioni del sistema coagulativo, anch'esse tipiche della cirrosi, potrebbero condurre a fenomeni micro-emorragici, con conseguente aumento della densità ghiandolare.

L'aumento delle dimensioni dei surreni potrebbe essere secondario allo stato infiammatorio cronico sistemico caratterizzato dagli aumentati livelli di endotossine e citochine pro-infiammatorie circolanti, che potrebbe a livello tissutale determinare resistenza periferica all'azione degli ormoni steroidei con conseguente iperplasia e ipertrofia compensatoria dei surreni, e rappresentare inoltre uno stimolo mitogeno diretto sulle cellule ghiandolari. Lo stato infiammatorio cronico potrebbe causare inoltre l'involutione fibrotica del parenchima ghiandolare, apprezzabile radiologicamente come un aumento della densità. A supporto di tale ipotesi, Nougaret et al. misuravano il volume surrenalico con metodica TC in un gruppo di pazienti con shock settico e lo confrontavano con un gruppo di soggetti di controllo. Il volume della ghiandola surrenalica risultava statisticamente superiore al gruppo di controllo. Inoltre, i pazienti che in corso di shock settico non mostravano volumi aumentati dei surreni, presentavano una prognosi peggiore [42].

L'obiettivo secondario del nostro studio è stato quello di valutare la relazione intercorrente tra la morfologia surrenalica e la funzione ghiandolare. Non è stata individuata alcuna differenza, in termini di spessore, tra i pazienti cirrotici con normale riserva surrenalica e pazienti con IS. Tuttavia, la densità dei surreni nei pazienti con IS è risultata tendenzialmente più elevata. Questo

dato potrebbe essere correlato, come anticipato sopra, a fenomeni micro-emorragici o ad una regressione in senso fibrotico a carico delle ghiandole surrenaliche. Questi fattori, a lungo termine, potrebbero condurre al declino della funzione ghiandolare, sino all'insorgenza di un deficit della funzione surrenalica.

Studio della resistenza tissutale ai glucocorticoidi nella cirrosi epatica stabile.

Background

Tra le ipotesi patogenetiche della sindrome epato-surrenale bisogna annoverare la resistenza tissutale ai glucocorticoidi (GR).

La GR è una condizione caratterizzata dalla mancata capacità dei corticosteroidi di down-regolare la trascrizione di numerose citochine infiammatorie in presenza di adeguati o addirittura elevati livelli sierici di cortisolo. La resistenza ai glucocorticoidi sembra essere correlata agli aumentati livelli circolanti di citochine, il risultante quadro sistemico o locale di GR risulta di difficile identificazione con i comuni test di stimolo all'ACTH, tuttavia in tale circostanza, la normale risposta surrenalica alla flogosi risulta insufficiente a controllare l'infiammazione e la terapia steroidea può risultare di grande ausilio [43]. Il fenomeno della resistenza ai glucocorticoidi è stato recentemente studiato nei pazienti affetti da sepsi. E' noto che in corso di sepsi severa e shock settico è di comune riscontro un'alterata funzione surrenalica il cui meccanismo patogenetico sottostante potrebbe essere rappresentato dalla resistenza tissutale ai GC [44].

Cenni di Fisiologia dei Glucocorticoidi

I glucocorticoidi sono degli ormoni altamente lipofili in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare. All'interno del citoplasma interagiscono con il recettore dei glucocorticoidi in grado di mediare la maggior parte delle azioni svolte dall'ormone. Il recettore appartiene alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari ed è dotato di tre principali domini funzionali. Studi recenti hanno dimostrato che come risultato dello splicing alternativo del trascritto del recettore vengono prodotte molteplici isoforme dello stesso. Le differenti isoforme sembrano modulare in maniera significativa la sensibilità cellulare ai GC. GR- α rappresenta la forma attiva del recettore, lo splicing alternativo dell'esone 9 produce la β isoforma inattiva; un'aumentata espressione della suddetta isoforma o una ridotta espressione dell'isoforma attiva potrebbero rendersi responsabili della resistenza tissutale [45].

Studi in vitro hanno dimostrato che le citochine infiammatorie IL-1 e TNF- α sarebbero in grado di aumentare l'espressione dell'isoforma inattiva del recettore (GR β) in linee cellulari linfocitarie inducendo GR [46]. Un recente studio prospettico ha valutato la presenza di GR su cellule mononucleate periferiche di pazienti affetti da sepsi. Gli autori mostrano chiaramente una transitoria aumentata espressione dell'isoforma inattiva β nelle cellule mononucleate dei pazienti settici con progressiva riduzione dei livelli dell'isoforma recettoriale al momento della dimissione per la risoluzione del quadro clinico [47]. Analogamente, Ledderose et al. hanno studiato i livelli delle isoforme recettoriali dei glucocorticoidi a livello delle cellule T di pazienti affetti da sepsi e soggetti sani di controllo. L'espressione dell'isoforma inattiva risulta notevolmente aumentata nei pazienti settici rispetto ai soggetti di controllo, i livelli dell'isoforma α risultavano invece solo lievemente ridotti in corso di sepsi [48].

I pazienti affetti da cirrosi mostrano un aumentato rischio di sviluppare sepsi, insufficienza multiorgano e shock settico. D'altra parte la cirrosi acutamente decompensata e la sepsi presentano numerose similitudini. Entrambe le condizioni si caratterizzano per la presenza di un circolazione iperdinamica, di ridotte resistenze vascolari periferiche e di un aumentato output cardiaco. Gli alti livelli di citochine circolanti come IL-6 e il TNF- α sono di comune riscontro in entrambe le condizioni [11]. Riassumendo, la resistenza tissutale ai GC costituisce una condizione di frequente riscontro nel paziente critico e affetto da sepsi, il paziente cirrotico mostra una serie di anomalie emodinamiche, immunologiche ed ematochimiche che configurano un quadro di sepsi latente. In questo contesto lo studio della resistenza tissutale ai glucocorticoidi potrebbe rappresentare un importante meccanismo patogenetico sottostante l'insufficienza surrenalica del paziente cirrotico.

Obiettivo dello studio

- Valutare l'espressione dell'isoforma α , attiva, del recettore dei glucocorticoidi e dell'isoforma β , inattiva, quale principale meccanismo molecolare sottostante la resistenza ai glucocorticoidi nel paziente cirrotico stabile;

- Individuare il ruolo svolto dalle citochine infiammatorie nella modulazione dell'espressione delle isoforme recettoriali dei glucocorticoidi;
- Ricercare l'eventuale relazione causale tra l'alterata funzione surrenalica e la presenza di resistenza ai GC nella cirrosi epatica.

Pazienti e Metodi

Ad oggi sono stati arruolati consecutivamente 22 pazienti cirrotici stabili ammessi in ospedale o seguiti presso il nostro ambulatorio per rivalutazione della malattia epatica.

Criteri di esclusione: segni di instabilità emodinamica, definita come pressione arteriosa media (MAP) ≤ 60 mmHg o necessità di utilizzo di agenti vasopressori; patologie note a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, pazienti in terapia corticosteroidica negli ultimi sei mesi.

Sono stati inoltre reclutati 10 soggetti sani di controllo bilanciati per età e sesso al gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica previa raccolta del consenso informato e dopo aver verificato l'assenza dei criteri di esclusione ed aver escluso che risultino affetti da patologia epatica, infiammatoria cronica, o autoimmune. Prima dell'esecuzione dei test, sono stati effettuati esami ematochimici di routine, inclusi esame emocromocitometrico, profilo coagulativo, indici di funzionalità epatica, indici di funzionalità renale, elettroliti, profilo lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico per la misurazione dei livelli plasmatici di ACTH con metodica immunoradiometrica (valori normali 10-60 pg/ml).

Valutazione della funzione surrenalica

La funzione surrenalica è stata studiata mediante l'esecuzione dello Standard Short Synacthen Test (SD-SST). Lo SD-SST è stato eseguito somministrando al paziente una fiala di Synacthen 250 µg ev, quindi sono stati prelevati i relativi campioni ematici per il dosaggio del cortisolo al tempo 0 e dopo 30 e 60 minuti dallo stimolo con ACTH.

Definizioni

Si definisce cortisolo basale il cortisolo misurato al mattino tra le 8:00 e le 9:00 prima della somministrazione di 250 µg tetracosactrin. Per Peak cortisol si intende la concentrazione maggiore di cortisolo al 60 minuto. Ad oggi non ci sono dei valori di riferimento per la diagnosi di insufficienza surrenalica nella cirrosi. Per lo scopo dello studio, è stata definita una risposta adeguata al test da stimolo una concentrazione di peak cortisol di almeno 18 µg/dl (497 nmol/l).

Isolamento delle cellule mononucleate periferiche

All'inclusione nello studio, 10-12 ml di sangue venoso sono stati ottenuti dai pazienti arruolati e dai soggetti sani di controllo. Il sangue raccolto è stato accuratamente posto su lympholyte medium. I campioni sono stati centrifugati, l'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia plasma/Lymphoprep è stato prelevato e successivamente sottoposto a lavaggio con 0.9% NaCl.

Valutazione delle isoforme recettoriali α e β del recettore dei glucocorticoidi

L'espressione delle isoforme recettoriali α e β a livello dei PBMCs circolanti è stata effettuata mediante western blot analisi. I PBMCs raccolti sono stati lisati in 100 µL di RIPA buffer, quindi centrifugati a 10,000 x g a 4°C per 10 minuti. Il contenuto totale proteico dei PBMCs presente nel supernatante è stato dunque raccolto e utilizzato per effettuare il WB. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il BCA assay (Thermo Scientific Pierce). 80 µg di proteine totali sono state risospese in 10% di SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state bloccate con non-fat milk 10% e incubate con gli anticorpi di interesse. L'espressione del GR- α è stata studiata mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale specifico anti GR- α (Abcam cat.no 3580), l'espressione dell'isoforma β è stata invece studiata mediante anticorpo policlonale anti GR- β (Abcam cat.no 3581). E' stato quindi usato un anticorpo secondario anti-rabbit IgG. L'immunoreattività è stata indagata in chemiluminescenza ed effettuata l'analisi densitometrica delle bande.

Dosaggio dei livelli plasmatici di IL-6 e TNF- α

La misurazione dei valori plasmatici delle citochine IL-6 e TNF- α è stata effettuata con metodica ELISA, mediante l'utilizzo rispettivamente dei kit Human IL-6 Quantikine (R&D Systems cat. No. D6050) e Human TNF- α Quantikine (R&D Systems cat. No. DTA00C).

Risultati preliminari

Sono stati arruolati 22 pazienti cirrotici suddivisi per gravità di malattia come segue: 8 pazienti di classe Child A, 9 soggetti di classe B e 5 pazienti di classe C. Di questi, 7 (32%) pazienti presentavano ascite, 12 (54%) varici esofagee, 1 (4%) paziente risultava affetto da HCC e 2 (9%) da encefalopatia epatica. Dopo l'esecuzione del test all'ACTH, 5 (23%) pazienti mostravano un'insufficiente risposta allo stimolo con ACTH.

La valutazione dell'espressione proteica delle isoforme recettoriali su PBMCs circolanti mediante WB mostrava risultati promettenti. Come mostrato nella figura 5, l'isoforma α , ossia l'isoforma attiva del recettore dei glucocorticoidi risultava significativamente più elevata nei pazienti cirrotici rispetto ai soggetti sani di controllo (11.5 ± 4.7 vs 7.9 ± 1.9 ; $p=0.029$);

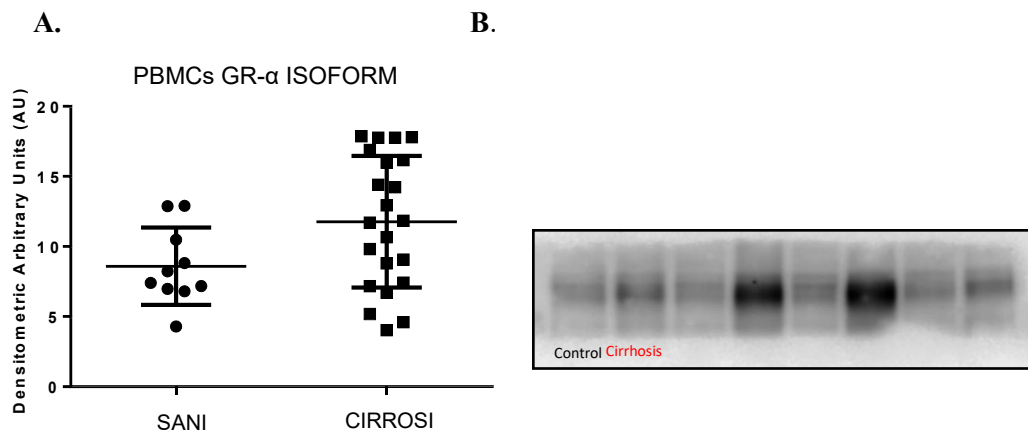


Figura 5. A. Livello di espressione del GR- α su PBMCs circolanti di pazienti con cirrosi stabile confrontato con un gruppo di soggetti sani. B. Banda di espressione su membrana del GR- α a confronto tra cirrotici e controlli.

All'analisi WB dell'isoforma β non è stato possibile identificare alcuna banda leggibile in corrispondenza dell'attesa banda di peso molecolare di 65 KD. Diversi studi in letteratura condotti su PBMCs hanno ottenuto dei risultati analoghi, probabilmente in relazione alle basse concentrazioni dell'isoforma β non identificabile all'analisi western. Eseguiamo a breve il dosaggio ELISA del GR- β su lisato proteico allo scopo di completare l'analisi delle isoforme recettoriali nei pazienti con cirrosi stabile.

Abbiamo poi stratificato i pazienti cirrotici per funzione del surrene, e come mostrato nella figura 6 i soggetti iposurrenali presentavano valori significativamente più bassi rispetto ai cirrotici con normale funzione del surrene ($p=0.04$).

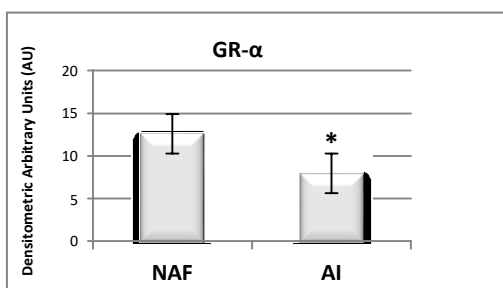


Figura 6. GR- α a confronto tra i soggetti con normale funzione del surrene (NAF) e i pazienti con insufficienza surrenalica (AI).

Venivano inoltre dosati i livelli sierici di due importanti citochine pro-infiammatorie, IL-6 e TNF- α . A conferma di dati presenti in letteratura, i soggetti sani mostravano valori di IL-6 significativamente più bassi rispetto ai pazienti cirrotici (2.7 ± 0.3 vs 23 ± 6 ; $p=0.019$); analogamente i livelli di TNF- α erano nettamente superiori nei pazienti cirrotici (5.4 ± 0.9 vs 1.6 ± 0.4 ; $p=0.007$). Inoltre, i pazienti iposurrenali presentavano aumentati valori di IL-6 rispetto ai normosurrenali ($p=0.009$), nessuna differenza significativa veniva invece registrata tra i due gruppi in termini di TNF- α . Nei pazienti cirrotici si registrava inoltre una correlazione significativa tra i valori dell'isoforma α e i livelli di IL-6 ($r=0.48$; $p=0.03$).

Studio della resistenza tissutale ai glucocorticoidi nei pazienti affetti da insufficienza epatica acuta su cronica: rilevanza clinica.

Background

L'insufficienza epatica acuta su cronica (ACLF) è una sindrome di recente definizione caratterizzata dalla contemporanea presenza di cirrosi acutamente decompensata ed insufficienza a carico di vari organi e apparati (fegato, rene, encefalo, coagulazione, circolo, apparato respiratorio). Tale condizione si associa ad una ridotta sopravvivenza, con una mortalità a breve termine che oscilla tra il 46% e l'89% [49-51]. Dal punto di vista fisiopatologico diversi aspetti della sindrome rimangono da chiarire, tuttavia ad oggi sono tre i meccanismi patogenetici chiamati in causa: la disfunzione immunitaria, la translocazione batterica intestinale e la disfunzione circolatoria.

Patogenesi della disfunzione immunitaria in ACLF

Nei pazienti affetti da ACLF si osserva un'iniziale risposta infiammatoria sistemica (SIRS) caratterizzata dall'elevata produzione di citochine pro-infiammatorie. Tale fase è accompagnata e/o seguita da una seconda fase denominata di immuno-paralisi, caratterizzata da un'inappropriata risposta immunitaria, strettamente correlata con la gravità d'organo, con l'aumentata mortalità e il rischio di sepsi. La disfunzione immunitaria è un processo dinamico che coinvolge sia la componente cellulare del sistema immunitario che quella umorale [52]. Tra le componenti cellulari coinvolte, l'immunità innata gioca un ruolo essenziale, nello specifico la risposta mediata dal sistema monocito-macrofagico e dai neutrofili. La disfunzione monocito-macrofagica è stata descritta sia nei pazienti cirrotici che nei pazienti affetti da ACLF in termini di una ridotta risposta pro-infiammatoria per ridotta capacità di processazione e presentazione dell'antigene [53].

Similitudini tra ACLF e la sepsi

Diversi aspetti fisiopatologici accomunano ACLF e la sepsi, nello specifico, gli aumentati livelli circolanti di endotossine, la massiva risposta sistemica pro-infiammatoria, l'immuno-paralisi e i ridotti livelli di HDL [54].

Entrambe le condizioni si caratterizzano inoltre per la presenza di un'iperdinamica circolatoria, di ridotte resistenze vascolari periferiche e di un aumentato output cardiaco. Gli alti livelli di citochine circolanti come IL-6 e il TNF- α sono di comune riscontro in entrambe le condizioni [55]. Inoltre, è noto che i pazienti affetti da cirrosi mostrano un aumentato rischio di sviluppare sepsi, insufficienza multiorgano e shock settico. Il processo di infiammazione sistemica caratteristico della SIRS si associa ad un rilascio massivo di sostanze ad azione vasoattiva, e all'attivazione neuro-ormonale con aumentata produzione di ormoni tra cui gli steroidi che esercitano un'azione modulatrice sul sistema immunitario. Nello specifico, la risposta allo stress acuto è mediata dall'asse ipotalamo- ipofisi- surrene, e dal sistema nervoso simpatico. L'attivazione dell'asse determina un aumentato rilascio di corticotropin- releasing hormone (CRH) e vasopressina. Il CRH stimola poi la produzione di ACTH dall'ipofisi anteriore che a sua volta stimola la zona fascicolata della corteccia surrenalica ad aumentare la sintesi di cortisolo. Nelle fasi precoci della sepsi, la concentrazione sierica di cortisolo aumenta dunque progressivamente, e il tasso di incremento si associa in maniera inversa al tasso di sopravvivenza. Di recente definizione è la CIRCI, critical illness related corticosteroid insufficiency, definita come una condizione di insufficienza surrenalica relativa nel contesto della sepsi o di condizioni di stress acuto. La produzione di cortisolo seppur aumentata, risulta insufficiente nel contesto delle aumentate richieste tissutali. Tale condizione è stata recentemente descritta anche nel paziente cirrotico critico. Il paziente critico, emodinamicamente instabile e affetto da sepsi presenta inoltre una condizione denominata resistenza tissutale ai glucocorticoidi. Il fenomeno della resistenza ai glucocorticoidi è stato recentemente studiato nel paziente affetto da sepsi. E' noto che in corso di sepsi severa e shock settico è di comune riscontro un'alterata funzione surrenalica il cui meccanismo patogenetico sottostante potrebbe essere rappresentato dalla resistenza tissutale ai GC [56]. La definizione della GR e i principali meccanismi sottostanti sono stati precedentemente elencati e descritti. Non vi sono ad oggi evidenze circa la presenza di glucocorticoido- resistenza nei pazienti affetti da ACLF.

Overview del ruolo svolto dai GCs nel sistema immunitario

L'asse ipotalamo- ipofisi surrene e il sistema immunitario sono intimamente associati e regolati attraverso un complesso sistema di feedback positivi e negativi. I GCs esercitano la loro funzione di immunomodulatrice pressoché su tutte le cellule del sistema immunitario grazie alla distribuzione ubiquitaria del recettore dei glucocorticoidi. I GCs influenzano in maniera sostanziale il fenotipo, la sopravvivenza e la funzione dei monociti e dei macrofagi. Nello specifico, aumentano il potenziale fagocitario di queste cellule stimolando la clearance degli antigeni esterni, dei patogeni, delle cellule infiammatorie, detriti cellulari e di ogni eventuale noxa patogena. Inoltre esercitano un'azione immunosoppressiva, bloccando la produzione di citochine pro-infiammatorie attraverso meccanismi genomici e non genomici. Favoriscono infine la produzione di mediatori anti-infiammatori come IL-10 and TGF- β [57].

IPOTESI SPERIMENTALE

Considerate le evidenti similitudini tra ACLF e la sepsi e il ruolo svolto dalla glucocorticoido resistenza nel paziente affetto da sepsi, ci proponiamo di ricercare l'eventuale presenza della steroido resistenza nei pazienti con ACLF. Obiettivo secondario è quello di valutare l'impatto prognostico della GR in termini di ridotta sopravvivenza e morbidità. Inoltre, considerata la stretta correlazione tra i glucocorticoidi e il sistema immunitario, il nostro obiettivo è anche quello di studiare il ruolo della GR nell'immuno paralisi osservata nel paziente con ACLF. Nello specifico ci proponiamo di indagare l'impatto che la disfunzione del GCs pathway esercita nella funzione e sopravvivenza dei monociti circolanti.

Obiettivo dello studio

- Studiare la sensibilità ai glucocorticoidi su monociti circolanti isolati da pazienti affetti da ACLF;
- Valutare l'andamento temporale della sensibilità ai GCs durante la degenza;
- Ricercare i sottostanti meccanismi molecolari correlati alla resistenza ai GCs nei pazienti affetti da ACLF;

- Ricercare eventuali mediatori umorali (citochine infiammatorie, LPS, ecc.) responsabili della ridotta sensibilità ai GCs.

Disegno sperimentale

Il presente studio prospettico ha lo scopo di valutare la steroideo- resistenza in un gruppo di pazienti ammessi in ospedale per il trattamento di ACLF. I pazienti verranno seguiti per 3 mesi e la valutazione intraospedaliera della GR verrà effettuata ogni 72 ore sino alla dimissione. Considerata l'elevata variabilità interindividuale dell'espressione del recettore dei glucocorticoidi la valutazione verrà effettuata e confrontata nello stesso individuo nelle differenti fasi della patologia.

Pazienti e Metodi

Selezione dei pazienti e dei controlli

Criteri di inclusione:

- Età compresa tra i 18-70 anni;
- Cirrosi epatica diagnosticata su esame istologico, clinico, radiologico e laboratoristico;
- Pazienti ammessi in ospedale per il trattamento di un episodio di decompenso acuto della cirrosi epatica (ascite, encefalopatia epatica, infezioni, sanguinamento gastrointestinale, sindrome epato-renale).

Criteri di esclusione:

- Terapia steroidea nei precedenti 6 mesi dall'ammissione in ospedale;
- Patologie dell'asse ipotalamo- ipofisi- surrene;
- HIV o malattia neoplastica avanzata;
- Gravidanza.

Soggetti sani di controllo senza alcuna patologia epatica, autoimmune o infiammatoria sistemica nota, bilanciati per età e sesso sono stati inclusi nello studio dopo aver ottenuto il consenso informato. I criteri di esclusione sono stati gli stessi della popolazione oggetto dello studio.

Tutti i pazienti ammessi in ospedale sono stati gestiti clinicamente per gli episodi di scompenso secondo protocolli standard. I pazienti sono stati sottoposti a follow-up durante il ricovero e ogni mese sino a 3 mesi dalla dimissione. La mortalità ed ogni nuova complicanza sono stati registrati.

Materiali e Metodi

La valutazione clinica è stata effettuata il giorno dell'arruolamento e comprendeva l'anamnesi, l'esame obiettivo e gli esami ematochimici di routine. La frequenza cardiaca, respiratoria, la temperatura corporea e la pressione arteriosa media sono state registrate. La principale causa di ammissione in ospedale è stata identificata e la gravità della malattia epatica stadiata secondo il Child-Pugh e il MELD score. La presenza di insufficienza d'organo è stata valutata utilizzando il CLIF-SOFA score [58]. Sulla base del punteggio ottenuto i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: Acute decompensated (AD) e ACLF.

Esami ematochimici

Gli esami ematochimici di routine sono stati effettuati all'ammissione e ripetuti ogni 72 ore. Campioni di sangue sono stati raccolti anche per il dosaggio di citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, TNF- α) e LPS.

Isolamento e stimolazione in vitro dei monociti circolanti

Isolamento delle cellule periferiche mononucleate (PBMCs)

I PBMCs sono stati isolati a partire da 10 mL di sangue fresco raccolto su provette contenenti eparina quale anticoagulante. Il Polymorphprep (Alere Technologies AS, Oslo, Norway) è stato utilizzato per la separazione dei PBMCs. Polymorphprep è una soluzione contenente sodio diatrizzato e polisaccaride. Quest'ultimo sequestra gli eritrociti che sedimentano rapidamente attraverso il mezzo permettendo ai leucociti di accumularsi in alto sotto forma di anelli, nello specifico si formerà un anello superiore contenente i PBMCs e un anello inferiore contenente i neutrofili. Dopo aver isolato i PBMCs la lisi degli eritrociti è stata ottenuta usando la soluzione di lisi per globuli rossi (10x). Il buffer usato contiene ammonium chloride, in grado di lisare per

effetto osmotico i globuli rossi senza interferire sui leucociti isolati. Il pellet di PBMCs è stato risospeso in buffer 1x per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state dunque centrifugate e risospese nel mezzo di coltura. Veniva dunque effettuata la conta cellulare usando un emocitometro, e veniva usato anche il trypan blue allo scopo di evidenziare le cellule morte. Brevemente, a 10 μ L di sospensione cellulare veniva aggiunto un egual volume di trypan blue ed eseguita la conta cellulare al microscopio. La conta veniva effettuata in tutti i 4 sets dei 16 riquadri e considerato il valore medio di ciascuna conta. Il calcolo finale veniva ottenuto moltiplicando per 10^4 e per il fattore di diluizione usato.

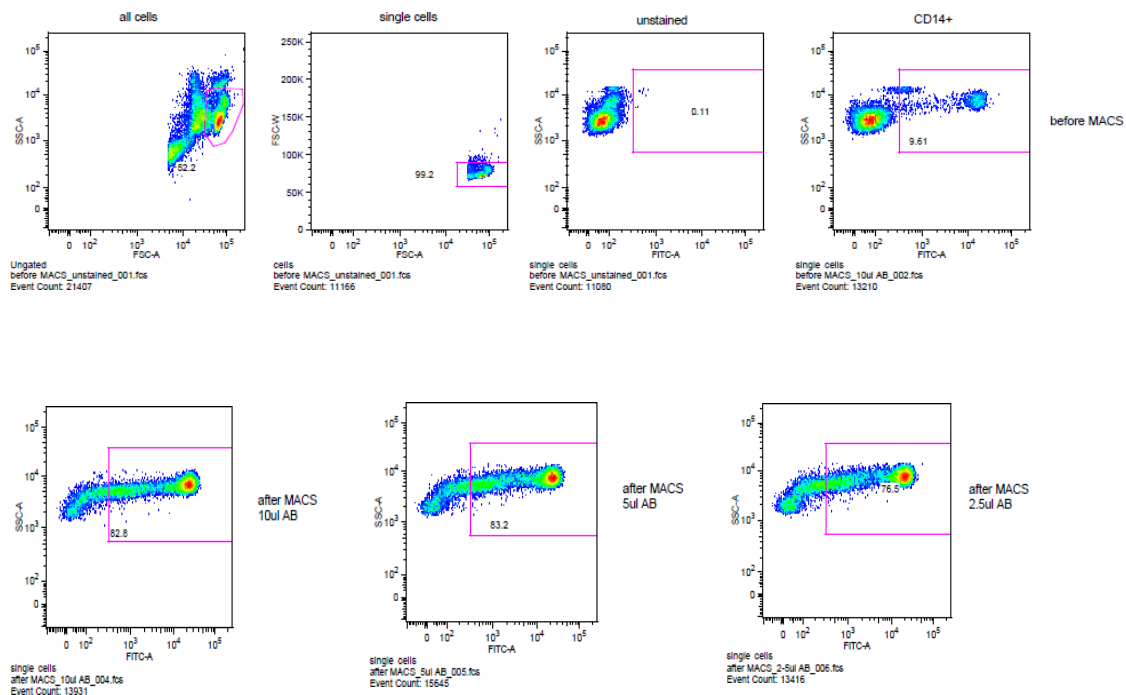
Isolamento dei Monociti

I PBMCs rappresentano una popolazione eterogenea, costituita per il 70-80% da linfociti T e B, per il 10% da monociti e la restante percentuale da basofili ed eosinofili. Il nostro obiettivo era quello di studiare i meccanismi di steroide-resistenza in una popolazione cellulare pura, ed abbiamo scelto di studiare specificamente i monociti poiché numerose evidenze suggeriscono un'alterazione del sistema monocito-macrofagico nel paziente cirrotico che sembra esercitare un ruolo prognostico rilevante. I monociti sono stati isolati dai PBMCs usando una combinazione di microbeads magnetiche, colonne e un separatore magnetico (Pan monocyte Isolation kit, Miltenyi). Microbeads sono delle piccole particelle magnetiche coniugate ad anticorpi altamente specifici per un particolare antigene di superficie. Le colonne contengono una matrice di sfere magnetiche le quali fungono da amplificatori del campo magnetico quando vengono poste all'interno del separatore creando un alto gradiente all'interno delle colonne. Le colonne e i separatori magnetici differiscono notevolmente per le dimensioni e per la capacità massima di cellule da isolare. Sulla base del numero di PBMCs isolati in media da 10 mL di sangue (circa $5-10 \times 10^7$) abbiamo scelto le colonne MS che possiedono una capacità massima di 2×10^8 cellule. Il metodo di separazione adottato si basa su un sistema di marcatura magnetica indiretta. Le cellule non target, rappresentate da linfociti T, B, cellule Natural killer, cellule dendritiche e basofili sono stati progressivamente marcati utilizzando un cocktail di anticorpi e microbeads. Durante la separazione, le cellule non marcate, rappresentate dalla popolazione oggetto del nostro studio, ossia i monociti, vengono

raccolti all'interno della frazione cellulare che fuoriesce dalla colonna. Le cellule marcate vengono invece ritenute all'interno della colonna. A fine procedura monociti non marcati altamente puri verranno collezionati.

Valutazione della purezza dei monociti isolati

I PBMCs e i monociti isolati sono stati incubati con anticorpi anti CD14- FITC coniugati (Miltenyi) e la fluorescenza è stata misurata mediante esame citometrico a flusso. E' stato scelto di analizzare il CD14 poiché rappresenta uno dei più importanti ed abbondantemente espressi marcatori di superficie dei monociti. Sono state testate 3 differenti concentrazioni dell'anticorpo usato (10-5 e 2.5 μ L) e i dati sono stati analizzati mediante il software Flow Jo. Come mostrato nella figura a seguire i monociti isolati presentano un alto grado di purezza (82-84%).



Coltura e stimolazione con DEXA dei Monociti

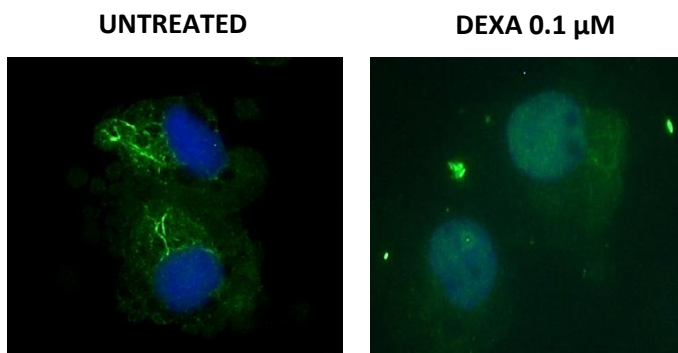
I monociti isolati sono stati risospesi in IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's medium, contenente 4 mM L-Glutamine e 25 mM HEPES. Il mezzo di coltura è stato supplementato con 5% di charcoal-stripped heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 50 U/mL penicillina, 50 μ g/mL

streptomicina. I monociti sono stati posti in 2 T25 fiasche ad una concentrazione pari a 5×10^5 /mL. Il desametasone (DEXA) $0.1 \mu\text{M}$ è stato aggiunto in 1 fiasca e incubato per 1 ora. Dopo l'incubazione i monociti sono stati centrifugati ed è stato effettuato il cytospin e quindi iniziato il processo di frazionamento cellulare.

Cytospin e Immunofluorescenza

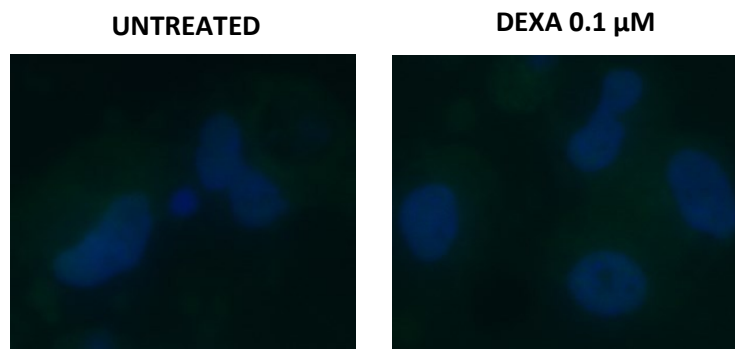
Il cytospin è una tecnica comunemente usata per fissare le sospensioni cellulari su vetrino. Le cellule così immobilizzate potranno essere usate per effettuare analisi immunocitochimica o immunofluorescenza. Dopo esser stati posti in coltura e stimolati con DEXA, i monociti sono stati raccolti in falcon da 15 mL, centrifugati e risospesi in PBS ad una concentrazione finale di 10^5 . 200 μL della sospensione cellulare in basale e dopo stimolo con DEXA, sono stati caricati all'interno delle camere da cytospin, centrifugate a $800 \times g$ per 4 min utilizzando una specifica centrifuga cytospin. Le cellule sono state in seguito fissate usando come agente fissante la formaldeide al 4% allo scopo di immobilizzare gli antigeni e preservare l'integrità dell'architettura cellulare. Il fissativo in seguito è stato rimosso, effettuato un lavaggio e iniziato il processo di immunofluorescenza. La metodica è stata effettuata con lo scopo di visualizzare l'espressione in basale del recettore dei glucocorticoidi, la sua distribuzione cellulare, e la translocazione nucleare del recettore dopo stimolo con DEXA. In monociti provenienti da soggetti sani in basale è stata osservata una distribuzione del recettore prevalentemente citoplasmatica. Come atteso, dopo stimolazione con DEXA, è stato invece osservato uno spostamento pressoché totale della fluorescenza all'interno del nucleo.

Healthy Subject



La valutazione con immunofluorescenza dell'espressione del recettore dei glucocorticoidi e della translocazione nucleare dopo stimolo con DEXA, è stata effettuata anche in pazienti con ACLF. Nella figura è mostrato il pattern di fluorescenza in basale e dopo stimolo con DEXA. In condizioni basali il segnale sembra essere notevolmente ridotto rispetto ai soggetti sani di controllo. Inoltre dopo la stimolazione non si osserva il passaggio della fluorescenza all'interno del nucleo.

ACLF Patient



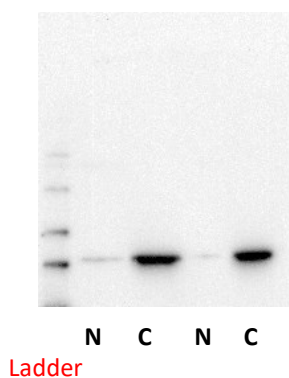
Tali esperimenti sono stati effettuati in via preliminare per verificare l'affidabilità del sistema studiato e l'accuratezza delle metodiche ottimizzate.

Frazionamento cellulare- separazione della componente citoplasmatica e nucleare dei monociti

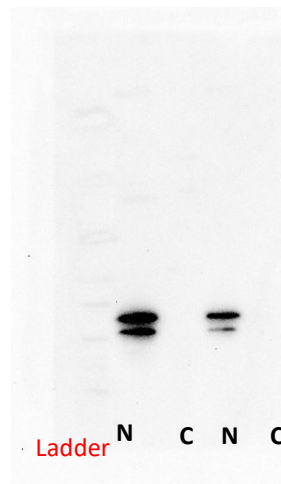
Il frazionamento cellulare è stato effettuato mediante l'utilizzo del kit Thermo-Scientific NE/PER. Dopo centrifugazione, il pellet di monociti è stato lavato e risospeso in PBS. In quantità proporzionali alla conta cellulare, i due reagenti (CER-I e II) sono stati aggiunti al pellet con l'obiettivo di distruggere la membrane cellulare e rilasciare il contenuto citoplasmatico che veniva raccolto e conservato per gli usi successivi. Veniva poi aggiunto il terzo reagente (NER) per estrarre il contenuto proteico nucleare. Allo scopo di verificare la purezza degli estratti nucleare e citoplasmatico ed escludere un'eventuale contaminazione tra le due componenti, sono stati eseguiti dei western blots per valutare l'espressione di proteine ad esclusiva espressione citoplasmatica e

nucleare. I campioni di proteine monocitarie venivano normalizzati per la concentrazione proteica valutata mediante microBCA Protein Assay. 5 µg degli estratti citoplasmatici e di quelli nucleari sono stati caricati su gel (NuPAGE) e l'espressione della laminina (proteina nucleare) e della tubulina (proteina citoplasmatica) è stata valutata mediante anticorpi specifici anti Laminina e anti Tubulina ad una diluizione 1:1000. Le membrane venivano poi incubate con anticorpi secondari IgG anti-mouse ad una diluizione 1:10.000 ed infine incubate con Supersignal West Dura Chemiluminescent Substrate per la lettura. Come evidenziato nei WB mostrati, il tasso di contaminazione delle due componenti risultava estremamente basso e quindi accettabile ai fini dello studio.

Mouse Anti- human TUBULIN IgG (50 kDa)



Mouse Anti-human LAMIN A/C IgG (69/62 kDa)



Valutazione dello stato di attivazione del recettore dei Glucocorticoidi

Lo studio dell'attivazione del recettore dei glucocorticoidi può essere effettuato con diverse metodiche. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) è una prima metodica, molto sensibile, ma di difficile esecuzione e di lunga durata. Un secondo metodo si basa sui geni reporter in particolare le luciferasi. Questa tecnica prevede però la transfezione. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay è un'ottima metodica utile che permette di individuare l'interazione GR-DNA nel contesto della cromatina dei monociti isolati. Abbiamo dapprima ottimizzato la ChIP con lo scopo di valutare lo stato di attivazione del GR, ma il numero di cellule richieste per immunoprecipitazione si aggirava intorno ai 4×10^6 , del tutto incompatibile con il numero di monociti che siamo in grado

di isolare che è pari ai 3×10^6 . Abbiamo dunque deciso di utilizzare un'altra metodica molto sensibile e compatibile con il basso numero di cellule a nostra disposizione ossia il TransAM GR ELISA (Activemotif). Su una piastra ELISA da 96-wells, è stato immobilizzato un oligonucleotide che contiene il GR consensus binding site (5'-GGTACAnnnTGTTCT-3'). Il GR contenuto negli estratti proteici nucleari sarà in grado di legarsi in maniera specifica a tale oligonucleotide. Verrà poi aggiunto un anticorpo primario anti-GR che riconosce un epitopo accessibile della proteina nel contesto del suo legame al DNA. Quindi un anticorpo secondario HRP- conjugated si renderà responsabile di una reazione colorimetrica facilmente quantificabile mediante spectrophotometry. Rispetto alle altre metodiche, la presente mostra diversi vantaggi. E' altamente specifica, 5 volte più sensibile dell'EMSA e 20 volte più rapida. Inoltre, come anticipato, permette di identificare l'attivazione del GR utilizzando sino ad un minimo di 0.6 µg di proteine nucleari che rappresenta un punto cruciale per il nostro studio e la popolazione cellulare di nostro interesse.

Quantificazione delle isoforme GR-α e β

Le isoforme recettoriali sono state quantizzate mediante 2 kit ELISA. Human Glucocorticoid receptor-alpha ELISA kit (SINCERE cat. No. E13650786) è stato usato per quantificare il GR-α sulle frazioni proteiche nucleari e citoplasmatiche in basale e dopo stimolo con DEXA. In ciascun pozzetto della piastra ELISA è immobilizzato un anticorpo monoclonale anti GR-α, la proteina presente in ciascuna delle frazioni cellulari monocitarie era dunque in grado di legarsi all'anticorpo. L'aggiunta poi di un biotinylated anticorpo, del complesso avidin-biotin-peroxidase e in ultimo della TMB substrate solution permetteva la lettura dell'avvenuto legame attraverso una reazione colorimetrica. L'intensità del colore sviluppato era proporzionale alla quantità di GR-α presente nel campione. Analogamente un secondo kit ELISA (Human GR-β ELISA kit, elabscience cat. No E-EL-H-1999) veniva usato per il dosaggio del GR-β, ma considerata l'esclusiva espressione nucleare dell'isoforma inattiva, tale misurazione è stata effettuata solo sulla frazione proteica nucleare.

Risultati preliminari

Ad oggi sono stati arruolati 20 pazienti, 11 uomini e 9 donne con un'età media di 51 anni. Sulla base del CLIF-SOFA score, 12 pazienti risultavano affetti da ACLF e 8 da AD. Il giorno dell'arruolamento, 10 mL di sangue venivano raccolti e i monociti circolanti isolati. L'attività trascrizionale del GR, l'espressione delle isoforme α e β venivano quantificati in basale e dopo stimolazione con DEXA 0.1 μ M. Nella figura 7 viene mostrato il livello di attivazione del GR prima e dopo stimolo con DEXA nei monociti dei pazienti reclutati. Non si osserva alcun incremento significativo dell'attività del GR dopo stimolo con DEXA, suggerendo una ridotta o del tutto assente sensibilità agli steroidi.

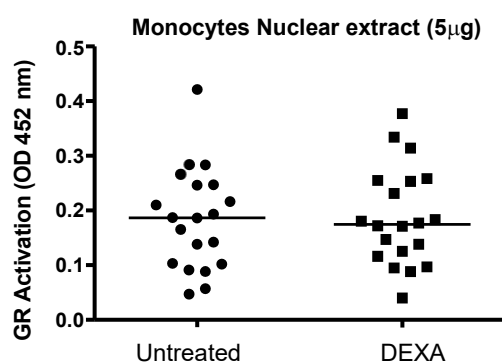


Figura 7. GR activation valutata su 5 μ g di proteine nucleari da monociti circolanti prima e dopo stimolo con desametasone.

Nella figura 8 i pazienti venivano poi stratificati secondo il CLIF-SOFA e suddivisi in AD e ACLF. Nonostante la ridotta dimensione del campione ad oggi analizzato, i pazienti con AD sembrano conservare una seppur minima sensibilità agli steroidi, mostrando un lieve incremento dopo stimolo con DEXA. I pazienti con ACLF sembrano addirittura esibire una riduzione dell'attivazione del GR dopo stimolo.

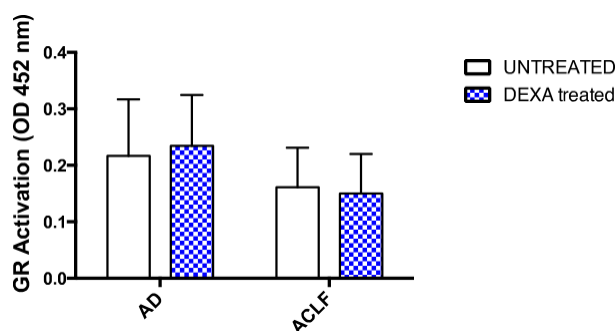


Figura 8. GR activation valutata su 5 µg di proteine nucleari da monociti circolanti prima e dopo stimolo con desametasone in pazienti con AD e ACLF a confronto.

E' stata poi effettuata la misurazione delle due isoforme del GR. Come precedentemente descritto, l'isoforma attiva (GR-α) è presente nel citoplasma all'interno di un complesso multiproteico. Dopo il legame col cortisolo, l'isoforma viene attivata, si dissocia dal complesso e transloca all'interno del nucleo. Abbiamo dunque valutato l'espressione della proteina in entrambe le frazioni cellulari (citoplasma e nucleo) in basale e dopo stimolo per ricercare l'eventuale translocazione del recettore (Fig. 9).

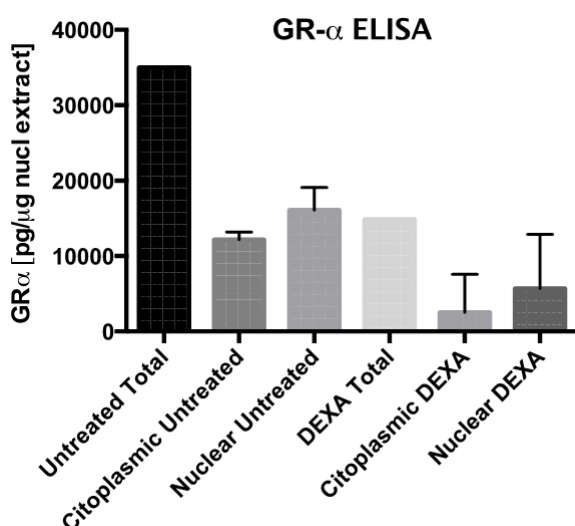


Figura 9

In accordo ai dati precedentemente mostrati che evidenziavano una mancata risposta al desametasone in termini di attivazione del recettore, abbiamo osservato una ridotta espressione del

recettore α in entrambe le frazioni cellulari dopo stimolo con DEXA. Non è stato inoltre osservato l'incremento atteso della frazione attiva all'interno del nucleo dopo stimolo, a testimonianza della mancata translocazione del recettore all'interno del nucleo.

L'analisi dell'isoforma inattiva (GR- β) è stata invece effettuata solo a livello nucleare a causa della sua esclusiva espressione nucleare. In condizioni fisiologiche la proteina è espressa in quantità estremamente basse, talvolta non quantificabili. I pazienti arruolati presentavano invece valori mediamente alti del GR- β che non si modificavano dopo stimolazione con DEXA (Fig.10). Stratificando la popolazione in ACLF e AD, I pazienti con ACLF mostrano dei livelli simili e solo tendenzialmente più alti di GR- β rispetto ai pazienti con AD (Fig.11).

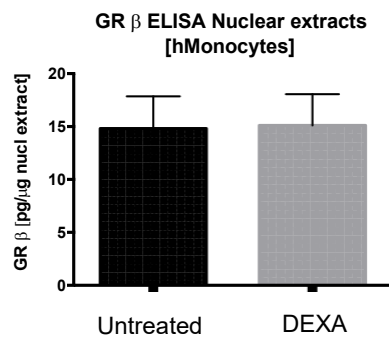


Figura 10

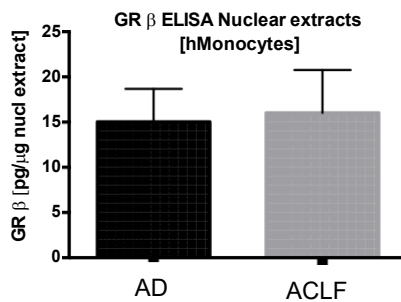


Figura 11

FUTURE PLANS

Lo studio è ad oggi in pieno svolgimento. L'obiettivo primario è quello di aumentare la casistica arruolata allo scopo di confermare i dati preliminari descritti. Al raggiungimento di tale scopo, ci proponiamo di implementare le informazioni raccolte come segue:

- Valutare l'andamento temporale della steroide-resistenza con l'obiettivo di individuare una finestra temporale per un potenziale trattamento sostitutivo;
- Valutare l'impatto prognostico della GR a 3 mesi in termini di mortalità e incidenza di complicanze;
- Indagare i mediatori sottostanti il difetto osservato, nello specifico testare l'ipotesi che il difetto del recettore dei glucocorticoidi sia mediato da un fattore umorale e dunque trasferibile ad una popolazione di monociti isolati da soggetti sani. Per rispondere al suddetto quesito ci proponiamo di incubare monociti sani con plasma di pazienti ACLF e di rivalutare il sistema e la risposta al DEXA dopo incubazione;
- Valutare la funzione dei monociti in termini di phagocytosis e phago-burst e il ruolo svolto dalla steroidoresistenza nell'alterata funzione dei monociti dei pazienti con ACLF.

BIBLIOGRAFIA

1. AISF- Associazione Italiana per lo studio del fegato. Epidemiologia delle epatopatie acute e croniche in Italia (2007).
2. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver Cirrhosis. *Lancet* 2014; 383:1749-61.
3. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, et al. And the Portal Hypertension Collaborative Group. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2007; 133:481-88.
4. Shah V, Toruner M, Haddad F, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associates with enhanced caveolin binding in experimental liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1999; 117: 1222- 1228.
5. Perri RE, Langer DA, Chatterjee S, et al. Defects in cGMP- PKG pathway contribute to impaired NO dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G535- G542.
6. Trifan A, Chiriac S, Stanciu C. Update on adrenal insufficiency in patients with liver cirrhosis. *WJG* 2013 Jan 28; 19(4):445-456.
7. Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Germani G, Tsochatzis E, Thomas M, Bouloux PM, Burroughs AK, Purrello F. Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review. *Hepatology* 2012; 55:1282-1291.
8. Marik PE. Adrenal-exhaustion syndrome in patients with liver disease. *Intensive Care Med* 2006; 32: 275–280.
9. Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, Felipe V, Navasa M, Mas A, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: Effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006;44:1288–1295.
10. Tsai MH, Peng YS, Chen YC, et al. Adrenal insufficiency in patients with liver cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006; 43:673-681.

11. Gustot T, Durand F, Lebrech D, et al. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology* 2009; 50:2022-2033.
12. Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005;33:1254–1259.
13. Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002; 36:395-402.
14. Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Piro S, Rabuazzo MA, Sigalas A, Xrouchakis E, O' Beirne J, Garcovich M, Tsochatzis E, Purrello F, Burroughs AK. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2011 Feb;54(2):243-50.
15. Acevedo J, Fernandez J, Prado V, Silva A, Castro M, Pavesi M, Roca D, Jimenez W, Gines P, Arroyo V. Relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis: relationship to short-term risk of severe sepsis, hepatorenal syndrome, and death. *Hepatology* 2011;58:1757-1765.
16. Kim G, Huh JH, Lee KJ, et al. Relative adrenal insufficiency in patients with cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2017; 62(4):1067-1079.
17. Cicognani C, Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch Intern Med* 1997 Apr 14;157(7):792-796.
18. Bornstein SR Predisposing factors for adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 2009;360:2328-2339.
19. Gaillard RC Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 1990;127:101-106.
20. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001 Feb;33(2):464-70.
21. Amir H. Hamrahian, M.D., Tawakalitu S. Oseni, M.D., Baha M. Arafah, M.D. Measurements of Serum Free Cortisol in Critically Ill Patients. *N Engl J Med* 2004;350: 1629-1638.

22. Verdery RB, Benham DF, Baldwin HF, Goldberg AP, Nichols AV. Measurement of normative HDL subfraction cholesterol levels by Gaussian summation analysis of gradient gels. *J Lipid Res* 1989 Jul 30(7): 1085-95.
23. Vincent RP, Etogo-Asse FE, Dew T, Bernal W, Alaghband- Zadeh J, Le Roux CW. Serum total cortisol and free cortisol index give different information regarding the hypothalamus–pituitary–adrenal axis reserve in patients with liver impairment. *Ann Clin Biochem* 2009;46:505–507.
24. Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197–202.
25. Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, et al: Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: Quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Invest* 1967; 46: 797–811.
26. Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, et al: Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sci* 1998; 62:1387–1395.
27. Hoekstra M, Korporaal SJ, Li Z, Zhao Y, Van Eck M, Van Berkel TJ. Plasma lipoprotein are required for both basal and stress-induced adrenal glucocorticoid synthesis and protection against endotoxemia in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sept 2010.
28. Carr BR, Parker CR, Milewich L, Porter JC, MacDonald PC, Simpson ER, 1980. The role of low density, high density, and very low density lipoproteins in steroidogenesis by the human fetal adrenal gland. *Endocrinology* 106, 1854–1860.
29. Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, et al. Assessing adrenal function in cirrhotic patients: is there a reliable test? *Gastroenterol Clin Biol* 2009 Jun;33(6-7):584-588.
30. Galvao-Teles A, Burke CW, Fraser TR. Adrenal function tested with tetracosactrin depot. *Lancet* 1971 Mar 20; 1(7699):557-560.
31. Jenkins RC, Ross RJM. Protocols for common endocrine tests. In: Grossman A, editor. *Clinical Endocrinology*, 2nd ed. Oxford:1998 p.1117-1134.

32. McNeilly AD, Macfarlane DP, O'Flaherty E, et al. Bile acids modulate glucocorticoid metabolism and the hypothalamus- pituitary- adrenal axis in obstructive jaundice. *Journal of Hepatology* 2010; 52:705-11.
33. Vincent RP, Etogo-Asse FE, Dew T, et al. Serum total cortisol and free cortisol index give different information regarding the hypothalamus–pituitary–adrenal axis reserve in patients with liver impairment. *Ann Clin Biochem* 2009;46:505–507.
34. Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197–202.
35. Galbois A, Rudler M, Massard J, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010; 52:839-845.
36. Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver Int* 2011; 31:425-433.
37. Triantos CK, Marzigie M, Fede G, et al. Critical illness-related corticosteroid insufficiency in patients with cirrhosis and variceal bleeding. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 595-601.
38. Arabi YM, Aljumah A, Dabbagh O, et al. Low-dose hydrocortisone in patients with cirrhosis and septic shock: a randomized controlled trial. *CMAJ* 2010; 182: 1971-1977.
39. McCarthy CJ, McDermott S, Blake MA. Adrenal Imaging: Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography. 2016;45:55-69.
40. Schneller J, Reiser M, Beuschlein F, et al. Linear and volumetric evaluation of the adrenal gland-MDCT-based measurements of the adrenals. *Acad Radiol*. 2014;21(11):1465-1474.
41. Vincent JM, Morrison ID, Armstrong P, Reznick RH. The size of normal adrenal glands on computed tomography. *Clin Radiol*. 1994 Jul; 49(7):453-5.
42. Nougaret S, Jung B, Aufort S, et al. Adrenal gland volume measurement in septic shock and control patients: a pilot study. *Eur Radiol* (2010) 20:2348-2357.

43. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009; 373:1905-17.
44. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003; 348:727-34.
45. Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70 (2005): 407-417.
46. Yang N, Ray DW, Matthews LC. Current concepts in glucocorticoid resistance. *Steroids* 77 (2012): 1041-1049.
47. Guerrero J, Gatica HA, Rodriguez M, Estay R, Goecke IA. Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression of glucocorticoid isoform receptors: a prospective cohort study and in vitro experimental assay. *Critical Care* 2013, 17:R107.
48. Ledderose C, Möhnle P, Limbeck E, Schütz S, Weis F, Rink J, Briegel J, Kreth S. Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124 induced downregulation of glucocorticoid receptor-[alpha]. *Crit Care Med* 2012, 40:2745-2753.
49. Arroyo V, Moreau R, Jalan R, et al. Acute-on-chronic liver failure: a new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol* 2015 (62):S131-S143.
50. Bernal W, Jalan R, Quaglia A, et al. Acute-on-chronic liver failure. *Lancet* 2015 Sep 24. Pii:s0140-6736(15)00309-8.
51. Gustat T, Fernandez J, Garcia E, et al. Clinical course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*. 2015 Jul; 62(1):243-52.
52. Bernsmeier C, Singanayagam A, Patel VC, et al. Immunotherapy in the treatment and prevention of infection in acute-on-chronic liver failure. *Immunotherapy*. 2015; 7(6):641-54.
53. Ramirez MJ, Titos E, Clària J, et al. Increased apoptosis dependent on caspase-3 activity in polymorphonuclear leukocytes from patients with cirrhosis and ascites. *J Hepatol*. 41(1), 44-48 (2004).
54. Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*. 34(3), 129-136 (2013).

55. Lin S, Huang Z, Wang M, Weng Z, Zeng D, Zhang Y, Zhu Y, Jiang J. Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis. *Journal of Critical Care* 30 (2015): 732-738.
56. Marik PE. Critical Illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest* 2009 Jan 135 (1): 181-93.
57. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun; 1024:124-37.
58. Moreau R, Jalan R, Gines P, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; 144:1426-37.

ORIGINAL ARTICLE

Apolipoprotein AI and HDL are reduced in stable cirrhotic patients with adrenal insufficiency: a possible role in glucocorticoid deficiency

LUISA SPADARO^{*1}, DAVIDE NOTO^{*2}, GRAZIELLA PRIVITERA¹, TANIA TOMASELLI¹, GIUSEPPE FEDE¹, ROBERTO SCICALI¹, SALVATORE PIRO¹, FRANCESCA FAYER², IDA ALTIERI², MAURIZIO AVERNA² & FRANCESCO PURRELLO¹

¹Department of Clinical and Molecular Biomedicine, Garibaldi Hospital, University of Catania, Catania, Italy, and

²Department of Internal Medicine and Medical Specialties-Di.Bi.Mi.S, University of Palermo, Palermo, Italy

Abstract

Backgrounds and aims: Adrenal insufficiency (AI) has been reported in patients with stable cirrhosis. A lack of substrates has been suggested as a possible contributing pathogenic mechanism leading to glucocorticoid deficiency in these subjects. To better explore this hypothesis, we studied lipoproteins in cirrhotics with and without AI. **Methods.** A total of 81 cirrhotic patients and 30 normal volunteers were enrolled. The severity of liver disease was graded by Child-Pugh score. Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG), and apolipoprotein AI (Apo-AI) levels were evaluated. HDL subfractions were measured by gradient gel electrophoresis. Adrenal function was assessed by the Low-Dose Short Synacthen Test. **Results.** Cirrhotic patients showed a significant reduction of TC, HDL, LDL, TG, and Apo-AI levels compared with controls. HDL3 was significantly lower, while HDL2 was higher, in cirrhotics compared with the controls. AI was observed in 26 patients. TC, TG, HDL, and Apo-AI were significantly reduced in cirrhotics with AI compared with those with normal adrenal function. HDL2 and HDL3 did not differ between these two groups. Delta cortisol was related to TC ($r = 0.30$, $p < 0.01$), TG ($r = 0.22$, $p = 0.05$), and Apo-AI ($r = 0.37$, $p < 0.001$). Multivariate analysis revealed that Apo-AI and HDL were independently associated with AI. **Conclusion.** Our study shows that TC, TG, HDL, and Apo-AI are reduced in cirrhotics with AI. In particular, because both HDL and Apo-AI play a primary role in providing substrates for steroidogenesis to adrenal cells, this deficiency may contribute to the pathogenesis of AI in these patients.

Key Words: adrenal insufficiency, apolipoprotein AI, cirrhosis, HDL cholesterol

Introduction

Adrenal insufficiency (AI) has been reported in cirrhotic patients, both during stable clinical phases and during critical illness [1,2]. Consequently, the term “hepato-adrenal syndrome” has been proposed [3]. Several aspects of this condition remain unclear, such as its pathogenesis, the correct and standardized diagnostic procedures to detect, and its real clinical relevance [4,5].

The mechanisms by which liver disease leads to adrenal dysfunction are still under evaluation.

Among the proposed mechanisms are an impairment of hypothalamic pituitary axis, a lack of substrates for adrenal steroidogenesis, and a structural damage of the adrenal glands due to infarction or hemorrhage [1].

Cholesterol is an essential precursor for steroid biosynthesis in adrenal glands, and the cholesterol bound to high-density lipoprotein (HDL), but not to low-density lipoprotein (LDL), appears to be the

Correspondence: Luisa Spadaro, MD, Department of Clinical and Molecular Biomedicine, Garibaldi Hospital, Via Palermo, 636, 95122 Catania, Italy.

Tel: +39 0957598401. Fax: +39 0957598421. E-mail: luspa70@hotmail.com

*These authors contributed equally to this work.

(Received 29 September 2014; revised 28 October 2014; accepted 1 November 2014)

ISSN 0036-5521 print/ISSN 1502-7708 online © 2015 Informa Healthcare

DOI: 10.3109/00365521.2014.985707

most important substrate for adrenal steroidogenesis [6,7]. In particular, HDL provides cholesterol to adrenal cells via a selective uptake pathway in which HDL cholesterol esters (CEs) and free cholesterol (FC) are taken into the cell [8–10]. Apolipoprotein AI (Apo-AI) is essential for the selective uptake of HDL-cholesteryl esters [8,11]. In adrenal cells, this pathway accounts for up to 90% of the cholesterol involved in steroid production.

Apo-AI, the major protein component of HDL, is primarily synthesized by the liver and plays a major role in HDL intracellular uptake as well as in the assembly of HDL particles and in the determination of their content [12,13]. Previous studies have shown that serum levels of Apo-AI are inversely correlated with liver reserves and disease severity in cirrhotic patients and are associated with a marked impairment of effective arterial volume, multiple organ dysfunction, and a poor prognosis at 3 months [14].

HDLs are typically separated into two major subfractions, HDL2 and HDL3 differing for charge, density, size, composition, shape, and physiological functions [15]. The binding of Apo-AI molecules to HDL particles differs between different HDL subclasses and small HDL3 is a major plasma carrier of Apo-AI [16].

To our knowledge, no data are available on HDL subclasses in liver cirrhosis, and published data on Apo-AI in hepato-adrenal syndrome are limited.

To investigate these points, the present study aimed to measure several features of lipid profile in cirrhotic patients with and without adrenal dysfunction, as well as in a control group. In particular, we decided to investigate the role of Apo-AI and HDL in the pathogenesis of AI reported in patients with stable cirrhosis. Moreover, we also measured the major HDL subfractions, HDL2 and HDL3. Our hypothesis was that Apo-AI and HDL subclass concentrations may possibly play a role in the pathogenesis of AI in cirrhotic patients.

Materials and methods

This study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from all participants. The diagnosis of cirrhosis was based on histology or clinical, laboratory, and ultrasonographic data. The severity of liver disease was graded by the Child-Pugh score and by the Model of End-Stage Liver Disease (MELD). Exclusion criteria included acutely decompensated liver disease, active bacterial infection, corticosteroid therapy within the preceding 6 months, treatment by drugs known to influence serum lipoproteins (e.g., statins, fibrates), pregnancy, age <18 years, smoking, and known

endocrine disease (except for diabetes). Patients with biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis were also excluded. Healthy controls were recruited from groups of nursing, administrative, and medical staff who had normal liver function and no documented history of liver, endocrine, or autoimmune disease. The controls were matched for gender and age with the cirrhotic patients.

Lipid fractions

HDL subfractions were evaluated in whole plasma by gradient gel electrophoresis, followed by Western blotting. Serum Apo-AI levels were assayed by immune-nephelometry using a commercial kit (Roche Diagnostic, Besel, Switzerland) in an automated nephelometer (RADIM, Rome, Italy). An amount of serum containing 190 ng of Apo-AI was loaded on a 4–25% acrylamide gel. Protein bands were electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, USA), and Apo-AI was revealed by a polyclonal anti-Apo-AI antibody (kindly supplied by G. Schonfeld) followed by a chemiluminescent HRP-linked anti-rabbit secondary antibody (Pierce, USA). Chemiluminescent bands were quantified by Clarity image software (LSC, Lighting Systems, Australia). The relative positions of HDL2 and HDL3 were evaluated against fluorescently labeled high-molecular-weight protein markers (Amersham GE Healthcare). The amounts of HDL2 and HDL3 were expressed as the percent of the total Apo-AI luminescence in the HDL dimension range (between 17.0 and 7.0 nm in diameter) [17].

Total and calculated plasma free cortisol

In all patients the Low-Dose Short Synacthen Test (LDSST) was performed in the morning by two authors (TT and GP). Basal cortisol was defined as the morning cortisol concentration (between 8:00 and 9:00 AM) before tetracortin injection. Peak cortisol was defined as the highest cortisol concentration at 20 or 30 min after tetracortin injection. Delta cortisol was defined as the difference between the peak and basal cortisol. Low-dose Synacthen was prepared by adding 250 mg of Synacthen in 250 ml saline in a plastic bottle; 1 ml of this solution (containing 1 mg of Synacthen) was injected directly in venous, as previously described [18], without the use of any catheter or tube to avoid the loss of ACTH due to adherence to plastic [19]. For the purpose of this study, a normal response to LDSST was defined as a peak total serum cortisol concentration of at least 18 mg/dl (494 nmol/l) [20]. Measurements of serum cortisol were performed with the use of a standard radioimmunoassay (RIA).

Cortisol-binding globulin (CBG) concentrations were measured by RIA (reference range 22–55 mg/ml) using kits purchased from Biosource Europe, S.A. (Nivelles, Belgium). Plasma ACTH was measured by an immunoradiometric assay (reference range 10–60 pg/ml).

The calculated free cortisol (cFC) was estimated as surrogate marker for free cortisol. cFC was derived using Coolen's equation: $U2K(1 + N) + U[1 + N + K(T - C)] - C = 0$, where U represents the molar concentration of unbound cortisol, C is the molar concentration of total cortisol, T is the concentration of transcortin, and K is the affinity of CBG for cortisol at 37 °C. N is the ratio of albumin bound to free cortisol, which has a conventional value of 1.74 [21].

Statistical analysis

Statistical comparisons of clinical and biochemical parameters were performed using Stat View version 6.0 for Windows. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. All variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analyses included an unpaired t-test, analysis of variance for continuous variables, and the chi-square (χ^2) test for noncontinuous variables. Correlations were determined using a Pearson test.

Multivariate analysis was conducted by applying a multiple logistic stepwise regression procedure to obtain independent factors associated with the presence of an abnormal LDSST response. All statistical tests were two-tailed, and the significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

Demographic data

The study included 111 participants, 81 consecutive patients with liver cirrhosis, and 30 healthy subjects. The population included 63 men (56.7%) and 48 women (43.3%) with a mean age of 67 ± 11 years. The etiology of liver cirrhosis was hepatitis B virus in 9 patients, hepatitis C virus in 48, alcohol in 11, a combination of alcohol and viral infection in 3, non-alcoholic fatty liver disease in 2, and cryptogenic origin in 8 patients. The median Child-Pugh score was 8 (range 5–12), with 20, 39, and 22 patients classified as Child A, B, and C, respectively. Fourteen patients (17%) had a history of overt hepatic encephalopathy, 38 (46%) had ascites, and 23 (28%) had a history of hepatocellular carcinoma. The patient and control groups were not different with respect to gender, age, or body mass index (all $p = \text{n.s.}$). The clinical characteristics of all study subjects are shown in Table I.

Table I. Clinical characteristics of study cohort.

	Controls (n = 30)	Cirrhotics (n = 81)	p-Value
Age (years)	65.8 $\pm$ 11.9	67.6 $\pm$ 10.8	ns
Gender (male/female)	16/14	47/34	ns
Body mass index (kg/m ²)	28.6 $\pm$ 5.2	27.0 $\pm$ 5.1	ns
MAP (mmHg)	84.3 $\pm$ 15.7	84.5 $\pm$ 9.6	ns
Urea (mg/dl)	37.0 $\pm$ 9.9	49.2 $\pm$ 25.3	0.03
Creatinine (mmol/l)	61.6 $\pm$ 7.9	90.6 $\pm$ 35.2	0.005
Total protein (g/dl)	6.5 $\pm$ 0.6	6.4 $\pm$ 0.8	ns
Bilirubin total (mmol/l)	10 $\pm$ 3	50 $\pm$ 87	< 0.001
INR	0.90 $\pm$ 0.08	1.20 $\pm$ 0.20	0.0003
Basal cortisol (nmol/l)	369.7 $\pm$ 129.6	416.6 $\pm$ 215.2	ns

Lipoprotein parameters in patients and controls

Total cholesterol (TC), LDL cholesterol, HDL, and triglyceride (TG) levels were significantly reduced in cirrhotic patients compared with controls ($p < 0.01$ for all) and progressively decreased with worsening severity of liver disease according to the Child-Pugh score (Table II).

Similarly, Apo-AI levels were significantly lower in the cirrhotic group ($p < 0.0001$) compared with the control group. As expected, HDL-C showed differences between genders in healthy subjects, with lower levels in males compared with females (37.56 ± 7.5 vs. 52.00 ± 16.38 , $p < 0.01$). Interestingly, we found a difference in the distribution of genders in cirrhotic patients, with higher levels of HDL in males compared with females (27.43 ± 13.18 vs. 19.51 ± 13.54 , $p < 0.01$). We also evaluated the non-HDL cholesterol (NHDLC) (TC–HDL), as a surrogate marker of the serum ApoB concentration, HDL/Apo-AI ratio, and HDL subfractions. The NHDLC and HDL/Apo-AI ratios were lower in cirrhotic patients compared with controls ($p < 0.0001$ for both).

Regarding HDL subfractions, cirrhotic patients showed a significantly different distribution compared with control subjects, with higher levels of HDL2 but significantly decreased levels of HDL3.

Apo-AI showed a significant correlation with HDL in both groups ($r = 0.84$; $p < 0.0001$ in cirrhotics; $r = 0.82$, $p < 0.001$ in controls), confirming that Apo-AI is a major HDL constituent (Figure 1). In the control group, Apo-AI showed a weak correlation with HDL2 ($r = 0.32$, $p = 0.05$) and HDL3 ($r = -0.34$; $p = 0.05$). In contrast, no correlation was found between Apo-AI and HDL subfractions in cirrhotic patients, suggesting a different composition of HDL2 and HDL3 in cases of liver cirrhosis.

In agreement with previous reports, Apo-AI decreased with the severity of cirrhosis, as ranked by the

Table II. Lipoprotein parameters in controls and cirrhotics.

	Controls (n = 30)	All cirrhotics (n = 81)	Child A	Child B	Child C
Total cholesterol (mg/dl)	187.3 ± 37.4	120.6 ± 35.5*	136.9 ± 26.8 ^{o*}	121.5 ± 37.9 ^{o*}	95.5 ± 21.7 ^{o*}
HDL-cholesterol (mg/dl)	43.1 ± 13.5	24 ± 13.7*	31.4 ± 14.9 ^{o*}	25.6 ± 12.6 ^{o*}	15.2 ± 9.4 ^{o*}
Low-density lipoprotein -cholesterol (mg/dl)	122.2 ± 29.9	78.6 ± 27.9*	87.6 ± 24.4 ^o	78.9 ± 32.2	67.5 ± 18.1 ^o
Triglycerides (mg/dl)	114.4 ± 53.3	86.4 ± 31.3**	91.3 ± 21.9 ^{o*}	84.8 ± 21.0 ^{o*}	65.0 ± 13.8 ^{o*}
Non-HDL cholesterol	141.0 ± 35.1	96.1 ± 29.9*	105.5 ± 24.6 ^o	95.8 ± 33.1	80.2 ± 17.7 ^o
Apo-AI (mg/dl)	105.6 ± 32.9	75.5 ± 32.9*	101.9 ± 24.6*	77.2 ± 25.1*	44.7 ± 21.6*
HDL/Apo-AI	0.41 ± 0.07	0.31 ± 0.09*	0.29 ± 0.07	0.32 ± 0.07	0.30 ± 0.14
HDL2	0.53 ± 0.1	0.80 ± 0.1*	0.84 ± 0.13	0.79 ± 0.16	0.80 ± 0.11
HDL3	0.47 ± 0.2	0.19 ± 0.1*	0.16 ± 0.13	0.20 ± 0.17	0.19 ± 0.11

Unpaired t-test between healthy subjects and cirrhotics, * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

Analysis of variance test with Fisher's exact test between the three groups of cirrhotics: ^{o*} $p < 0.001$ between A and C, B and C; ^o $p < 0.001$ between A and C; * $p < 0.001$ between three groups.

Abbreviations: AI = Adrenal insufficiency; HDL = High-density lipoprotein.

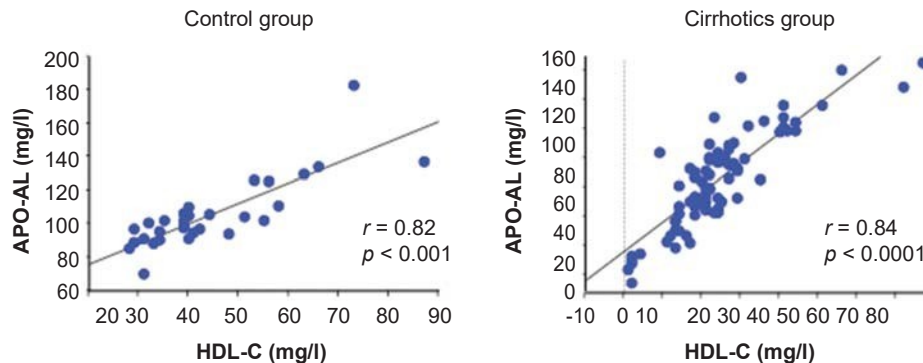


Figure 1. Correlation between Apo-AI and HDL-C in control group and in cirrhotic groups.

Child-Pugh class. Apo-AI had the strongest negative correlation with the Child-Pugh score ($r = -0.70$; $p < 0.0001$). Moreover, Apo-AI had a significant correlation with albumin levels ($r = 0.54$; $p < 0.0001$), INR ($r = 0.59$; $p < 0.0001$), and total bilirubin ($r = -0.40$; $p < 0.001$). In addition, TG showed a similar correlation with albumin levels ($r = 0.27$, $p < 0.05$), total bilirubin ($r = -0.28$, $p < 0.01$), and INR ($r = -0.49$; $p < 0.001$), as well as with the severity of cirrhosis as evaluated by the Child-Pugh score ($r = -0.47$, $p < 0.001$). Moreover, in cirrhotics, TG levels were significantly related to Apo-AI levels ($r = 0.27$; $p < 0.05$), while no correlation was found with Apo-AI levels in the control group.

Comparison between cirrhotic patients with and without AI according to the LDSST

The clinical characteristics of cirrhotic subgroups stratified by adrenal function and evaluated by the LDSST are shown in Table III.

Between patients with AI (AI group) and with normal adrenal function (NAF group), no significant

difference was observed with respect to age, gender, and disease etiology. Compared with the NAF group, the AI group had greater disease severity, as evidenced by higher Child-Pugh and MELD scores. In addition, the two groups were significantly different regarding the presence of ascites (NAF 40% vs. AI 63%; $p < 0.01$), serum albumin, CBG levels, and serum sodium concentration. Regarding basal and post-ACTH hormone profiles, there was a significant difference in basal cortisol (488.29 ± 214.22 vs. 265.41 ± 12.68 nmol/l; $p < 0.0001$), peak cortisol (713.10 ± 162.27 vs. 387.89 ± 96.80 nmol/l, $p < 0.0001$), and delta cortisol (232.69 ± 149.16 vs. 128.91 ± 86.45 nmol/l, $p < 0.01$) between the NAF and AI groups. Similarly, the AI cohort had a lower cFC level, a surrogate marker for free cortisol (2.85 ± 2.36 vs. 1.55 ± 0.78 , $p < 0.05$); a lower calculated peak free cortisol (5.49 ± 2.58 vs. 2.82 ± 0.88 , $p < 0.001$); and calculated delta free cortisol (2.62 ± 1.39 vs. 1.36 ± 0.64 , $p < 0.01$) compared with the NAF group. In addition, free cortisol index (FCI) was lower in AI patients compared to NAF group (17.7 ± 8.1 vs. 24.6 ± 14.4 , $p = 0.07$) although

Table III. Patients' demographic data, clinical characteristics, and lipoprotein parameters grouped according to adrenal function.

	Normal adrenal function (<i>n</i> = 55)	Adrenal insufficiency (<i>n</i> = 26)	<i>p</i> -Value
Age (years)	68 ± 9	65 ± 12	ns
Gender (male/female)	30/25	17/9	ns
Model of end-stage liver disease score	11 ± 5.1	14.5 ± 4.1	0.008
Etiology of cirrhosis			
Viral (%)	37 (67%)	19 (73%)	ns
Alcoholic (%) / Act.dr* (<i>n</i>)	9 (16%) / 4	5 (19%) / 2	ns
Other (%)	9 (16%)	2 (8%)	ns
Child Class (A/B/C)	18/29/8	2/11/13	0.01
Child score	7.5 ± 1.8	9.2 ± 1.8	0.002
MAP (mmHg)	85 ± 10.3	83 ± 8.1	ns
Creatinine (mmol/l)	94.2 ± 44	85.4 ± 17.6	ns
Sodium (mEq/l)	136 ± 3.75	134.6 ± 4.0	0.03
Potassium (mEq/l)	3.9 ± 0.5	3.8 ± 0.5	ns
Albumin (g/dl)	3.1 ± 0.6	2.8 ± 0.4	0.01
Cortisol-binding globulin (mg/ml)	23.5 ± 12.6	15.5 ± 4.4	0.001
Cholesterol total (mg/dl)	125.7 ± 39.9	108.5 ± 29.7	0.04
Cholesterol HDL (mg/dl)	26.01 ± 14.2	20.8 ± 8.3	0.05
Cholesterol low-density lipoprotein (mg/dl)	81.3 ± 29.8	72.1 ± 23.3	ns
Non-HDL cholesterol	101.65 ± 31.50	85.72 ± 24.32	0.05
Triglycerides (mg/dl)	88.02 ± 20.65	67.6 ± 17.7	<0.0001
Apo-AI (mg/dl)	82.49 ± 33.59	61.02 ± 26.62	0.004
HDL/Apo-AI	0.29 ± 0.08	0.35 ± 0.10	0.01
HDL2	0.80 ± 0.12	0.82 ± 0.15	ns
HDL3	0.19 ± 0.15	0.17 ± 0.12	ns

* Number of patients with alcohol-related cirrhosis active drinking at Low-Dose Short Synacthen Test date.

Abbreviations: AI = Adrenal insufficiency; HDL = High-density lipoprotein.

the difference does not reach statistical significance. Moreover, we found a strict correlation between FCI and calculated basal free cortisol ($r = 0.96$, $p < 0.001$), FCI, and calculated peak free cortisol ($r = 0.81$, $p < 0.004$). In contrast, no difference was observed between NAF and AI groups in terms of plasmatic ACTH levels (25 ± 13 pg/ml vs 22.4 ± 13 pg/ml, $p = 0.5$).

Lipoprotein parameters in cirrhotic patients according to the LDSST

As shown in Table III, the AI group had lower TC ($p = 0.04$), TG ($p < 0.0001$), HDL ($p = 0.05$), and Apo-AI ($p = 0.004$) levels, as well as a lower HDL/Apo-AI ratio ($p = 0.01$), compared with those in the NAF group. In contrast, no difference was observed regarding LDL cholesterol, and HDL2–HDL3 subfractions. TG levels were significantly correlated with basal cortisol ($r = 0.32$, $p < 0.01$) and peak cortisol ($r = 0.45$, $p < 0.0001$) and weakly correlated with delta cortisol ($r = 0.22$, $p = 0.05$). Moreover, TC was correlated with delta cortisol ($r = 0.30$, $p < 0.01$), whereas no correlation was observed with basal or peak cortisol. The Apo-AI level was weakly correlated with peak cortisol ($r = 0.22$, $p = 0.05$) and more significantly correlated with delta cortisol ($r = 0.37$,

$p < 0.001$) (Figure 2). In addition, NHDLC showed a correlation with delta cortisol ($r = 0.27$, $p < 0.01$), whereas the HDL/Apo-AI ratio was inversely correlated with peak cortisol ($r = 0.24$, $p < 0.05$). No correlation was found between cFC and lipoprotein parameters.

Finally, using a model of logistic regression that included significant factors in the univariate analysis (MELD score, albumin levels, serum sodium), between lipoprotein parameters, Apo-AI ($p = 0.02$, OR 5.2, CI 95% 1.00–1.11) and HDL ($p = 0.03$, OR 4.3, CI 95% 1.03–1.23), resulted in independent factors associated with adrenal deficiency.

Discussion

The aim of this study was to measure lipid profile in cirrhotic patients with and without adrenal dysfunction, as well as in a control group.

We found that cirrhotic patients with AI exhibited a more pronounced hypolipidemia compared to cirrhotics with NAF. Multivariate analysis showed that Apo-AI and HDL levels were associated with adrenal failure independently to disease severity.

In contrast, although HDL subfractions differed between cirrhotic patients and controls, no significant difference was observed in cirrhotics stratified by

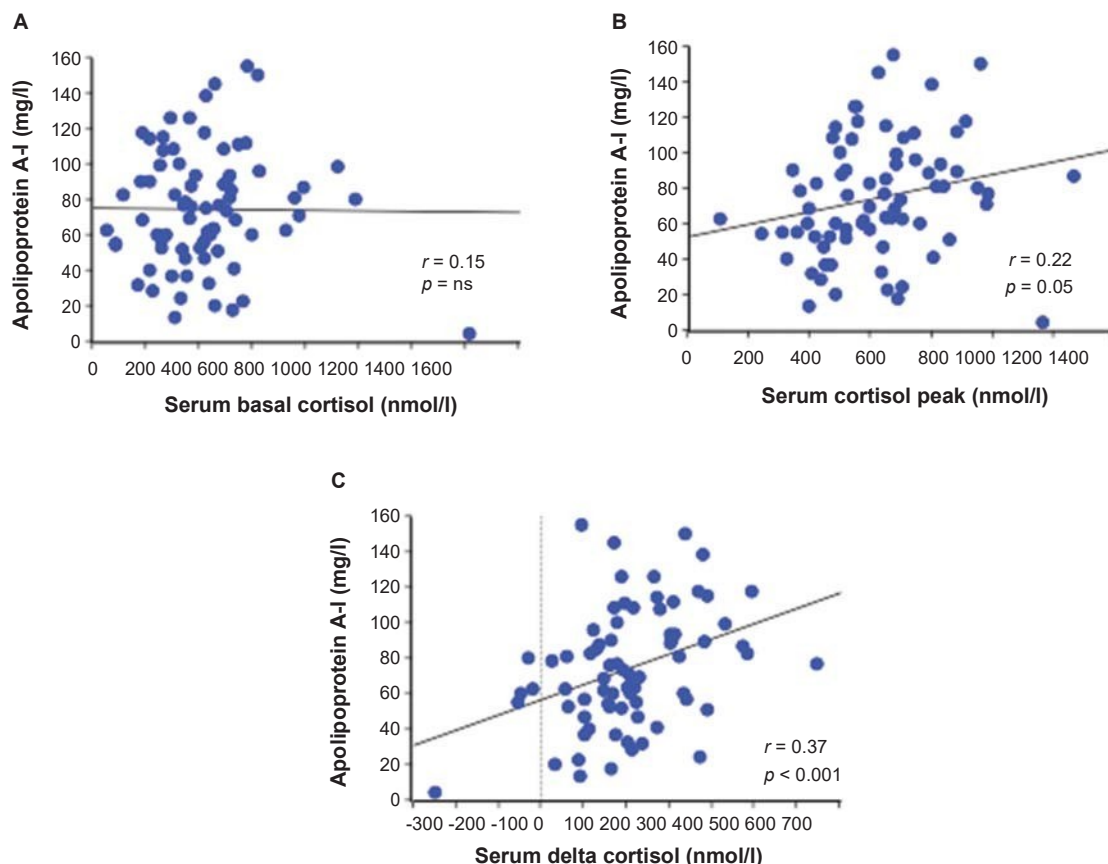


Figure 2. Correlation between serum basal cortisol (A), cortisol peak (B) and delta cortisol (C), and apolipoprotein AI values in cirrhotic patients.

adrenal function. Based on these results, we suggest that HDL and Apo-AI deficiency might play a significant role in the pathogenesis of AI in patients with stable cirrhosis.

Apo-AI is one of the three major proteins (together with Apo-AII and ApoE) that constitute HDL particles. HDL provides cholesterol to adrenal cells via a selective uptake pathway in which HDL CE and FC are taken into the cell [8–10]. In steroidogenic cells, this pathway accounts for up to 90% of the cholesterol involved in steroid production. Several studies in animal models support our hypothesis. In a study using Apo-AI-, Apo-AII-, and Apo E-deficient mice, Apo-AI deficiency resulted in a decrease in the $V_{\max}$ associated with CE transfer from HDL particles to adrenal cells [22]. These results indicate that the absence of ApoA-I results in HDL particles with a reduced capacity for SR-BI-mediated selective CE uptake. In a similar study [23], Apo-AI deficiency was associated with a major defect of adrenal gland physiology, causing reduced basal cortisol production and a dampened adrenal response to stress.

Previous data on lipid profile are conflicting. Marik et al. showed that HDL levels predict AI in

patients in intensive care units [24]. Moreover, a study in critically ill patients with acute and acute-on-chronic liver failure suggested that HDL levels are not critical for basal cortisol production but essential for on-demand cortisol production [25]. In contrast, no significant differences in lipid profiles were observed between a cohort of patients with severe liver disease with and without AI [26]. Also recently, in decompensated cirrhosis with AI, no difference in lipid profile was observed, but Apo-AI levels were not measured [5]. In our study, no relationship was observed between basal cortisol and lipids, Apo-AI, or lipoproteins in healthy subjects, while in cirrhotic group, basal cortisol was related to Apo-AI and TG. Also, the dynamic adrenal response evaluated by delta cortisol was related to TG, TC, and more strictly with Apo-AI, suggesting that in cirrhosis, lipoprotein levels influence adrenal response to ACTH administration.

When we used Coolens formula to evaluate a surrogate marker of free cortisol, we found that in AI group, cFC was lower than NAF patients at all time points. However, no correlation between lipoprotein parameters and cFC was observed. Coolens

formula takes into consideration different parameters such as CBG and albumin that could contribute to explain the lack of relationship between lipid profile and free cortisol.

In logistic regression analysis entering lipoprotein parameters, prognostic score, and clinical-biochemical factors, we found Apo-AI and HDL levels to be independently correlated with adrenal failure. According to

our data, therefore, lipoprotein impairment could explain, at least in part, adrenal failure in our patients. However, other possible mechanisms not examined in the present study, such as an impairment of hypothalamic pituitary axis, could also play a role. On the other hand, in this study, ACTH levels resulted similar in our patients stratified by adrenal function, supporting that

the lack of substrates could be a major contributor causing adrenal dysfunction. Nevertheless, alternative mechanisms could be responsible of adrenal impairment such as a reduced clearance of cortisol as a consequence of a suppressed activity of the main cortisol-metabolizing enzymes in liver and kidney [27].

Another novel finding of this study is that we report for the first time, to the best of our knowledge, changes in HDL subclass size and composition in cirrhotic patients. We observed a significantly different distribution compared with that in control subjects, with higher levels of HDL2 and a significant decrease in HDL3. The HDL2/HDL3 ratio can be shifted by both physiological (exercise, menopause, and gender) [28,29] and pathological (familial hypercholesterolemia, obesity, alcohol consumption, smoking, and substance abuse) [30,31] conditions. Our results can be explained by a progressive loss of Apo-AI content and a deficit of hepatic lipase that may contribute to the reduction in HDL3 observed in our patients. However, the modification of the HDL2/HDL3 ratio was not correlated with liver function tests or disease severity, which is suggestive of multifactorial causes.

In conclusion, our study shows that Apo-AI and HDL cholesterol are reduced in cirrhotic patients with AI. Because both play a primary role in providing substrates for steroidogenesis to adrenal cells, this deficiency may contribute, at least in part, to the pathogenesis of AI. Moreover, our data show that cirrhotic patients exhibit changes in the size and composition of HDL subclasses, with a low proportion of small HDL and a high proportion of large HDL particles.

Declaration of interest: The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding from industries or conflict of interest with respect to the manuscript.

References

- [1] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Germani G, Tsochatzis E, et al. Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review. *Hepatology* 2012;55:1282–91.
- [2] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Piro S, Rabuazzo AM, et al. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2011;54:243–50.
- [3] Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005;33:1254–9.
- [4] Tomaselli T, Privitera G, Fede G, Spadaro L, Scicali R, Di Vita R, et al. Corticosteroid replacement therapy in hepatoadrenal syndrome: case report with a review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:1344–7.
- [5] Acevedo J, Fernández J, Prado V, Silva A, Castro M, Pavesi M, et al. Relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis: Relationship to short-term risk of severe sepsis, hepatorenal syndrome, and death. *Hepatology* 2013;58:1757–65.
- [6] Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, Omura M, Sasano H, Nishikawa T. Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sci* 1998;62:1387–95.
- [7] Bochem AE, Holleboom AG, Romijn JA, Hoekstra M, Dallinga-Thie GM, Motazacher MM, et al. High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. *J Lipid Res* 2013;54:1698–704.
- [8] Plump AS, Erickson SK, Weng W, Partin JS, Breslow JL, Williams DL. Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. *J Clin Invest* 1996;97:2660–71.
- [9] Leitersdorf E, Israeli A, Stein O, Eisenberg S, Stein Y. The role of apolipoproteins of HDL in the selective uptake of cholesteryl linoleyl ether by cultured rat and bovine adrenal cells. *Biochim Biophys Acta* 1986;878:320–9.
- [10] Pittman RC, Glass CK, Atkinson D, Small DM. Synthetic high density lipoprotein particles. Application to studies of the apoprotein specificity for selective uptake of cholesterol esters. *J Biol Chem* 1987;262:2435–42.
- [11] Vergeer M, Korpelaar SJ, Franssen R, Meurs I, Out R, Hovingh GK, et al. Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N Engl J Med* 2011;364:136–45.
- [12] Tian L, Fu M. The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations. *Lipids Health Dis* 2010;9:118.
- [13] Temel RE, Walzem RL, Banka CL, Williams DL. Apolipoprotein A-I is necessary for the in vivo formation of high density lipoprotein competent for scavenger receptor BI-mediated cholesteryl ester-selective uptake. *J Biol Chem* 2002;277:26565–72.
- [14] Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Lien JM, Tian YC, Fang JT, et al. Low serum concentration of apolipoprotein A-I is an indicator of poor prognosis in cirrhotic patients with severe sepsis. *J Hepatol* 2009;50:906–15.
- [15] Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:404–16.
- [16] Connelly MA, Williams DL. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:467–71.
- [17] Verdery RB, Benham DF, Baldwin HL, Goldberg AP, Nichols AV. Measurement of normative HDL subfraction

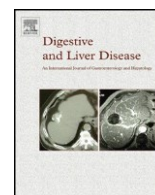
- cholesterol levels by Gaussian summation analysis of gradient gels. *J Lipid Res* 1989;30:1085–95.
- [18] Gonc EN, Kandemir N, Kinik ST. Significance of low-dose and standard-dose ACTH tests compared to overnight metyrapone test in the diagnosis of adrenal insufficiency in childhood. *Horm Res* 2003;60:191–7.
- [19] Wade M, Baid S, Calis K, Raff H, Sinaii N, Nieman L. Technical details influence the diagnostic accuracy of the 1 mg ACTH stimulation test. *Eur J Endocrinol* 2010;162:109–13.
- [20] Wiest R, Moleda L, Zietz B, Hellerbrand C, Scholmerich J, Straub R. Uncoupling of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1901–8.
- [21] Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197–202.
- [22] Temel RE, Parks JS, Williams DL. Enhancement of scavenger receptor class B type I-mediated selective cholesteryl ester uptake from apoA-I(-/-) high density lipoprotein (HDL) by apolipoprotein A-I requires HDL reorganization by lecithin cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 2003;278:4792–9.
- [23] Hoekstra M, Korporaal SJ, Li Z, Zhao Y, Van Eck M, Van Berkel TJ. Plasma lipoproteins are required for both basal and stress-induced adrenal glucocorticoid synthesis and protection against endotoxemia in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E1038–43.
- [24] Marik PE. Adrenal-exhaustion syndrome in patients with liver disease. *Intensive Care Med* 2006;32:275–80.
- [25] Etogo-Asse FE, Vincent RP, Hughes SA, Auzinger G, Le Roux CW, Wendon J, et al. High density lipoprotein in patients with liver failure; relation to sepsis, adrenal function and outcome of illness. *Liver Int* 2012;32:128–36.
- [26] Tan T, Chang L, Woodward A, McWhinney B, Galligan J, MacDonald GA, et al. Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *J Hepatol* 2010;53:841–8.
- [27] Boonen E, Vervenne H, Meersseman P, Andrew R, Mortier L, Declercq PE, et al. Reduced cortisol metabolism during critical illness. *N Engl J Med* 2013;368:1477–88.
- [28] Lemieux S, Despres JP, Moorjani S, Nadeau A, Thériault G, Prud'Homme D, et al. Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia* 1994;37:757–64.
- [29] Ushiroyama T, Sakuma K, Ikeda A, Ueki M. The HDL2/HDL3 ratio in menopause. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;88:303–8.
- [30] Schafer C, Parlesak A, Eckoldt J, Bode C, Bode JC, Marz W, et al. Beyond HDL-cholesterol increase: phospholipid enrichment and shift from HDL3 to HDL2 in alcohol consumers. *J Lipid Res* 2007;48:1550–8.
- [31] Tilly-Kiesi M, Tikkanen MJ. Effects of lovastatin and gemfibrozil on high-density lipoprotein subfraction density and composition in patients with familial hypercholesterolemia. *J Lab Clin Med* 1992;120:103–10.



Contents lists available at ScienceDirect

Digestive and Liver Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dld



Liver, Pancreas and Biliary Tract

Hypothalamus-pituitary dysfunction is common in patients with stable cirrhosis and abnormal low dose synacthen test

Giuseppe Fede^{a,b,*}, Luisa Spadaro^b, Graziella Privitera^b, Tania Tomaselli^b,
Pierre-Marc Bouloux^c, Francesco Purrello^b, Andrew Kenneth Burroughs^a

^a The Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre and Institute of Liver and Digestive Health, University College London and Royal Free Hospital, London, UK

^b Department of Clinical and Molecular Biomedicine, University of Catania, Garibaldi Hospital, Catania, Italy

^c Academic Department of Endocrinology, Royal Free Hospital, London, UK

article info

Article history:

Received 22 January 2015

Accepted 11 August 2015

Available online xxx

Keywords:

Adrenal insufficiency

Cirrhosis

Long synacthen test

Low dose short synacthen test

abstract

Background: Adrenal insufficiency is often present in cirrhosis. We hypothesize that a prolonged adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulus can restore cellular capacity of adrenal glands to secrete cortisol. Aim of our study was to assess adrenal responsiveness to prolonged ACTH stimulation in cirrhotics.

Methods: Prospective observational study in 121 consecutively admitted cirrhotic patients undergoing a low dose short synacthen test and plasma ACTH measurement using a chemiluminescence immunoassay. Long synacthen test was performed if the low dose was abnormal.

Results: 46 patients had abnormal low dose short test (38%), and 29 underwent the long test: 41% showed normal response (Group 1), 55% showed delayed response (Group 2) and 1 had abnormal response (4%). Baseline ACTH levels did not significantly differ between the two groups. Median basal cortisol was higher in Group 1 (296 vs. 198 nmol/L; $p = 0.02$). Using ROC curve basal cortisol < 254 nmol/L was associated with a delayed long synacthen test response (AUC 0.78, $p = 0.001$) with good accuracy (sensitivity 67%, specificity 81%).

Conclusion: A delayed cortisol response after a prolonged ACTH stimulation is found in over fifty percent of cirrhotics with abnormal low dose short synacthen test, confirming that the mechanism of hypoadrenalism in these patients could be related both to adrenal cellular dysfunction and hypothalamus-pituitary adrenal axis impairment.

© 2015 Published by Elsevier Ltd on behalf of Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l.

1. Introduction

Adrenal insufficiency (AI) is defined by a deficient production or action of glucocorticoids. It can be due to a primary disorder of the adrenal glands resulting in deficiency of cortisol production (primary AI), or to a hypothalamo-pituitary disorder resulting in deficiency of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) or corticotropin-releasing hormone (CRH) secretion (secondary AI) [1]. Adrenal dysfunction, the so-called “hepato-adrenal syndrome” [2], has been described in patients with liver disease [3], with variable prevalence, according to the particular study population: critically ill patients (33–92%) [2,4–7], stable cirrhosis (31–60%) [8–14] or decompensated cirrhosis [15], such as variceal bleeding

(30–48%, according to the 250 or 1 µg synacthen test) [16] and ascites (39%) [17].

The standard diagnostic test for suspected AI has been the rapid ACTH stimulation test, based on the administration of synthetic ACTH 1–24 [18]. The short synacthen test (SST), using 250 µg of cosyntropin (Synacthen®), is currently recommended in critically ill patients [19], whereas the low dose short synacthen test (LDSST), using a more physiological dose of 1 µg of cosyntropin, has been proposed as a more sensitive marker of sub-optimal adrenal function in non-critically ill patients [20]. However, there are no clear recommendations for assessing adrenal function in patients with liver disease [3].

The mechanism leading to adrenal dysfunction in liver disease has not been established, and it is unclear at what level of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis the damage is located (i.e. primary or secondary AI). The rapid ACTH stimulation test (using 1 µg or 250 µg of cosyntropin), which is the test used in previous studies to assess adrenal dysfunction in patients with cirrhosis [2,4–10,12,16,21,22], is not able to differentiate primary

* Corresponding author at: Department of Clinical and Molecular Biomedicine, University of Catania, Garibaldi Hospital, Via Palermo 636, 95122 Catania, Italy. Tel.: +39 095 7598401; fax: +39 095 7598401.

E-mail address: g.fede@tiscali.it (G. Fede).

from secondary AI. Basal plasma ACTH levels are useful for differentiating primary and secondary forms. In patients with primary AI, plasma ACTH levels are high and usually exceed 200 pg/mL (44 pmol/L). However, the basal ACTH levels must always be interpreted with caution, considering the episodic nature of ACTH secretion and its short plasma half-life [1]. Normal plasma corticotropin values rule out a primary AI, but not a mild secondary AI [23]. Moreover in patients with liver disease ACTH values did not differ between patients with and without adrenal dysfunction [9,12].

The long synacthen test (LST), using 1 mg depot tetracosactrin, is another simple and reproducible test used to diagnose primary AI. Cortisol concentration is measured before, 4, 8 and 24 h after intramuscular injection of 1 mg depot tetracosactrin. In healthy subjects, plasma cortisol levels rise rapidly within the first hours and the value at 24 h shows little further increase. In ACTH-deficient patients with atrophic adrenals, a smaller initial response occurs, with a progressive rise at 24 h. By contrast, in primary hypoadrenalism, there is no response at all because endogenous ACTH levels are already raised [24,25].

The aim of our study was to assess the adrenal responsiveness to prolonged ACTH stimulation in patients with stable cirrhosis, to investigate whether the prolonged stimulation with ACTH is able to restore the capacity of adrenal glands to secrete cortisol. We used a multistep diagnostic approach: the LDSST and basal ACTH measurement were initially performed, and the LST was subsequently carried out to study the adrenal response to prolonged ACTH stimulation.

2. Patients and methods

This was a prospective observational study performed at the Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre (London, UK) and at the Garibaldi Hospital's Internal Medicine Department (Catania, IT) between July 2010 and October 2012.

This study was designed and conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee, and a written informed consent was obtained from each participant.

2.1. Inclusion criteria

We consecutively enrolled patients with a diagnosis of cirrhosis based on the combination of clinical features, radiological imaging, presence of portal hypertension, compatible biochemical parameters, and/or confirmatory liver biopsy. Patients admitted with decompensated cirrhosis (ascites, variceal bleeding, jaundice, encephalopathy) were enrolled in the study protocol at least 6 weeks after the resolution of the acute episode of decompensation.

Adrenal function was studied in all patients performing the LDSST (First Test), ACTH and CBG measurement. Patients who failed to pass the first test underwent the LST (second test), at least 24 h after the first test.

The primary outcome measures of our study included ACTH values and cortisol levels before, 4, 8 and 24 h after the administration of 1 mg depot tetracosactrin.

2.2. Exclusion criteria

We excluded patients with sepsis or haemodynamic instability (mean arterial pressure <60 mmHg or vasopressor dependency), previous history of HPA axis disease, current or recent (within the previous 3 months) history of corticosteroid therapy or other drugs that could impair the HPA axis, younger than 18 years, and pregnancy.

2.3. Low dose synacthen test

The test was performed between 8.00 and 9.00 AM, following an overnight fast. Blood samples were obtained immediately before, 20 min and 30 min after an intravenous injection of 1 µg of synacthen. Low-dose synacthen was prepared by adding 250 µg of synacthen (1 mL) to 249 mL saline in a plastic bottle; 1 mL of this solution (containing 1 µg of synacthen) was injected immediately, as previously described [26]. For the purpose of this study, AI was defined by a peak total cortisol below 494 nmol/L at 20 or 30 min after stimulation [27]. Moreover in a subset of 25 patients the serum free cortisol was also measured, and a peak free cortisol <33 nmol/L after stimulation defined an impaired free cortisol response [28].

2.4. Long synacthen test

Blood samples were obtained to measure cortisol levels before, 4, 8 and 24 h after intramuscular injection of 1 mg depot tetracosactrin; this generates a supraphysiological ACTH concentration (supramaximal stimulation) for over 24 h. The stimulation of the adrenal over this period tests its mass response, including its ability to synthesize and release cortisol. In health, plasma cortisol will rise to 900 nmol/L or more by 4–8 h and shows little further increase at 24 h. By contrast, in ACTH-deficient patients with sluggish adrenals, a smaller but progressively incremental response occurs often peaking at 24 h. In primary hypoadrenalism the adrenal glands are partially or completely destroyed and endogenous ACTH levels are already raised, thus plasma cortisol levels will not respond to additional ACTH stimulation and cortisol levels fail to rise, remaining subnormal (below 900 nmol/L) throughout the test [24,25].

2.5. Laboratory measurements

Total cortisol concentrations were measured using an electrochemiluminescence immunoassay on a Roche modular E170 analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); intra-assay CVs <1.8% (assessed at 129 nmol/L, 352 nmol/L and 717 nmol/L); inter-assay CVs <4.0% (assessed at 68 nmol/L, 516 nmol/L and 832 nmol/L). Plasma ACTH concentrations were measured using a chemiluminescence immunoassay on an Immulite 2500 analyser (Siemens Medical Solutions Diagnostics Limited, Llanberis, UK) (intra-assay CVs <4.7%; inter-assay CVs <6.4%). Free Cortisol, assessed in a subset of 25 consecutive patients, was measured at the University Hospital of South Manchester as previously described [29]. Briefly, 0.5 mL samples of serum were centrifuged in Ultrafiltration devices (Amicon Ultra-4 10 kDa; Millipore, Bedford, MA), and free cortisol was measured in the ultrafiltrate by LC-MS/MS.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as means with standard error (SE), frequency (percentage) or medians with interquartile range (IQR) as appropriate. Comparisons between patients with and without adrenal dysfunction were performed using χ^2 test (for categorical variables), Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test (for continuous variables, as appropriate). Correlation analysis was performed using the Spearman correlation coefficient. All statistical tests were two-tailed, and the significance level was set at $p = 0.05$ or less. All statistical analyses were done using the SPSS 13.0 software for Windows.

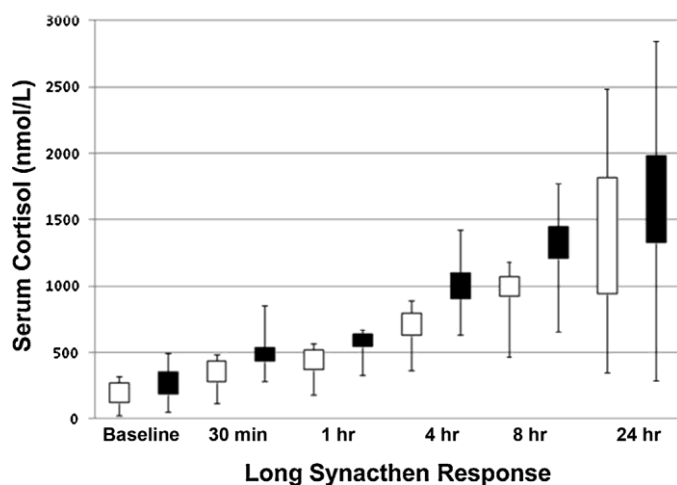


Fig. 1. Box-plots for long synacthen test response in Group 1 (black boxes) and Group 2 (white boxes).

3. Results

3.1. Patient characteristics

There were 121 patients with cirrhosis: 74 males, median age 60 (26–89) years, the aetiology was viral in 34%, alcoholic in 40%, and other aetiologies in 26%, the median Child–Pugh and MELD score were 9 (5–12) and 14 (6–25) respectively, ascites was present in 26% (Supplementary Table S1).

3.2. LDSST

A total of 121 patients with cirrhosis consecutively admitted underwent the LDSST: 46 (38%) patients had subnormal adrenal function defined by a peak cortisol <494 nmol/L. Clinical characteristics of patients with and without AI diagnosed according to LDSST are reported in the Supplementary Table S1.

3.3. LST

Among the 46 patients with abnormal LDSST, 17 were excluded from the study: 12 patients refused to continue the study, and

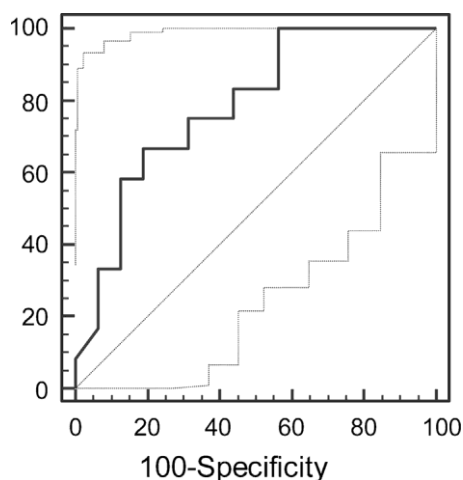


Fig. 2. Receiver–operating characteristic curves for basal cortisol and long synacthen test response. A basal cortisol value <254 nmol/L is associated with a delayed long synacthen test response (area under curve: 0.78, $p = 0.001$; sensitivity 67%, specificity 81%).

Table 1

Baseline characteristics of patients undergoing long synacthen test.

	Group 1 (<i>n</i> : 13)	Group 2 (<i>n</i> : 16)	<i>p</i> value
Age (years)	56 [42–76]	65 [26–72]	0.95
Male gender	6 (46%)	7 (44%)	0.9
Aetiology			
Viral	7 (54%)	6 (37.5%)	0.5
Alcohol (<i>n</i>)/active drinkers ^a (%)	2/(8%)	7/(19%)	0.1
Other	4 (31%)	3 (19%)	0.4
Ascites	11 (85%)	9 (56%)	0.5
Encephalopathy	4 (31%)	3 (19%)	0.8
Systolic BP (mmHg)	120 [95–146]	120 [90–141]	0.6
Diastolic BP (mmHg)	67 [60–90]	63 [50–80]	0.2
MAP (mmHg)	86 [72–100]	82 [63–99]	0.2
Creatinine (μmol/L)	73 [53–123]	72 [36–183]	0.6
Total bilirubin (μmol/L)	43 [14–198]	50 [12–142]	0.3
Albumin (g/L)	28 [22–43]	26 [20–41]	0.9
INR	1.5 [1.1–2]	1.4 [1–3.9]	0.6
Child–Pugh score	11 [8–12]	10 [8–12]	0.7
ACTH (pmol/L)	17 [4–45]	16 [5–40]	0.9
Basal total cortisol (nmol/L)	296 [146–453]	198 [10–420]	0.02
Basal free cortisol (nmol/L) ^b	16.7 [13–24]	15.5 [0.5–55]	0.9

Normal response (Group 1) is defined by 4 h cortisol ≥ 900 nmol/L, delayed response (Group 2) is defined by 4 h cortisol ≤ 900 nmol/L and 24 h cortisol ≥ 900 nmol/L. BP, blood pressure.

^a Number of patients with alcohol related cirrhosis active drinking at LDSST date.

^b Free cortisol was measured in 12 patients.

5 patients were discharged before finishing the study protocol (Supplementary Table S2).

The LST was performed in 29 consecutive patients diagnosed with AI on initial test, and they made up the group of interest. Among these patients, 12 (41%) showed a normal response (cortisol > 900 nmol/L at 240 min; Group 1), 16 (55%) showed a delayed response (cortisol < 900 nmol/L at 240 min and cortisol > 900 nmol/L within 24 h; Group 2), and only 1 (4%) patient had an abnormal response (cortisol < 900 nmol/L within 24 h; Fig. 1). Only basal cortisol was different between the two groups of patients (Table 1). Baseline plasma ACTH (median value: 17 (4–45) pmol/L) was not significantly different between Group 1 and 2 (median: 17 vs. 16 pmol/L, $p = 0.9$), and no patient had an ACTH value >200 pg/mL (44 pmol/L), which is the threshold suggesting primary AI. In the 29 patients who performed LST, using ROC curve, a basal cortisol value <254 nmol/L was associated with a delayed LST response (AUC 0.78, $p = 0.001$) with good accuracy (sensitivity 67%, specificity 81%; Fig. 2).

3.4. Free cortisol measurement

Free cortisol was measured in 12 of the 46 patients with abnormal LDSST: 7 (58%) patients showed an impaired free cortisol response after LDSST (stimulated free cortisol <33 nmol/L). Patients with impaired free cortisol response showed also a lower LST response after 24 h (1326 vs 1750 nmol/L, $p = 0.04$; Table 2). Moreover, stimulated free cortisol was directly related to LST response after 24 h ($R: 0.70$, $p = 0.01$; Fig. 3).

Table 2

Long synacthen response in patients with normal (Group 1) and abnormal free cortisol response (Group 2) after low dose short synacthen test.

	Group 1 Peak FC ≥ 33 nmol/L (<i>n</i> : 5/12)	Group 2 Peak FC <33 nmol/L (<i>n</i> : 7/12)	<i>p</i> value
LST 0	200 (157–259)	281 (46–400)	0.7
LST 4H	945 (712–1080)	688 (613–1029)	0.4
LST 8H	1315 (979–1471)	1049 (811–1218)	0.2
LST 24H	1750 (1496–2292)	1326 (1164–1522)	0.04

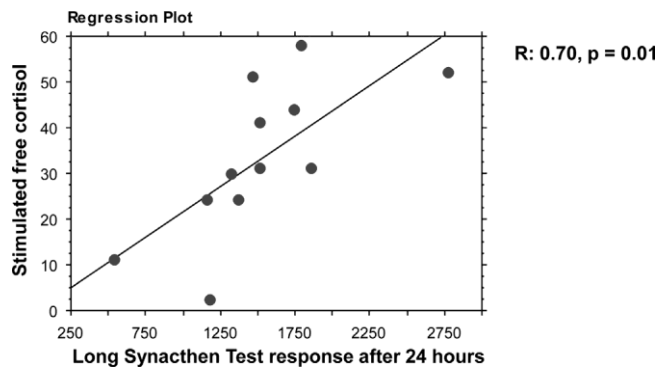


Fig. 3. Correlation between stimulated free cortisol and long synacthen test response after 24 h ($R: 0.70$, $p = 0.01$).

4. Discussion

In this study, for the first time adrenal function in patients with cirrhosis was assessed using a multistep approach: the first test was the LDSST followed by the LST. Interestingly 96% of patients with suspected adrenal dysfunction diagnosed with LDSST, responded to prolonged stimulation with exogenous ACTH (1 mg depot tetracosactrin). These results rule out a primary damage of the adrenal glands (primary AI), because in this case the adrenal glands are partially or completely destroyed, and cannot respond to additional ACTH stimulation [24,25].

Over half of our patients (55%) showed a delayed response after prolonged stimulation with exogenous ACTH, whereas 41% showed a normal response. This new finding adds “a new piece to the puzzle” of the possible mechanism causing AI in patients with liver disease. Our data suggest that a prolonged and supra-physiologic stimulus (ACTH depot) can restore a normal cellular capacity of adrenal glands to synthesize and secrete cortisol. Basal ACTH measurements confirmed these data, because no patient had basal ACTH values higher than 200 pg/mL (44 pmol/L).

These results can be interpreted invoking an alteration at the hypothalamic-pituitary level that leads to inadequate stimulation combined with an impairment of the adrenal cellular ability to secrete cortisol. In this condition, a prolonged stimulation with exogenous ACTH gives a smaller but progressive adrenal response [24]. During acute and chronic liver disease there are increased levels of circulating endotoxin (e.g. lipopolysaccharide) and pro-inflammatory cytokines (such as TNF- α , IL-1, and IL-6), that could impair the HPA axis [30]. In particular TNF- α has been shown to reduce ACTH secretion from the pituitary gland [31]. McDonald et al. [11] assessed HPA axis function in 38 patients with end-stage non-alcoholic liver disease and 40 healthy controls, using both insulin-induced hypoglycaemia test (IIT) and the SST. Compared with healthy controls, patients with liver disease had a 64% reduction in maximal increments of plasma cortisol to indirect adrenal stimulation via insulin-induced hypoglycaemia and a 39% reduction to direct adrenal stimulation by SST. The authors concluded that the greater impairment of adrenocortical response to central (IIT) rather than peripheral (SST) HPA axis stimulation suggested that the functional defect was most probably located in the central (hypothalamic-pituitary) regulation of HPA axis function, rather than intrinsic to the adrenal gland itself.

Bile acid accumulation may affect HPA function in patients with cirrhosis. This has been demonstrated in rats following dietary manipulation or bile duct ligation [32]: this study showed that bile acids (particularly the chenodeoxycholic acid) inhibits hepatic

glucocorticoid metabolism (mainly blocking the 5 β -reductase), leading to a down-regulation of the HPA axis, with reduced total daily production of glucocorticoid and reduction in adrenal weight. Similarly, Swain et al. [33] showed a diminished plasma ACTH and corticosterone response to stress in rats with acute cholestasis caused by bile duct resection. This effect appeared to be caused by decreased corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and secretion from the hypothalamus. Moreover, in animal models chronic hyperammonaemia reduces corticosterone content and ACTH-induced corticosterone release in adrenals with impaired circadian rhythms of corticosteroid hormones [34,35]. Additionally, changes in the 24-h plasma cortisol rhythm have been shown in patients with cirrhosis, with considerable delay in the onset of the cortisol rhythm and abnormalities in the duration of the peak, in parallel with the degree of hepatic dysfunction [36]. This suggested sympathetic-parasympathetic imbalance causing dysfunction of the pineal/suprachiasmatic nucleus and ‘clock’ genes, which could affect the patients’ ability to modulate cortisol responses to external stimuli. Moreover, increased levels of circulating endotoxin (e.g., lipopolysaccharide) and pro-inflammatory cytokines could cause haemodynamic impairment of the adrenal glands and HPA axis dysfunction [30,31]. The aetiopathogenesis of AI in cirrhosis is complex and may involve multifactorial mechanisms, and further studies are needed in this field.

In our patients with suspected adrenal dysfunction according to the LDSST, a low basal cortisol value (<254 nmol/L) was strongly associated with a delayed LST response using ROC curve evaluation, confirming the importance of basal cortisol in the diagnosis of adrenal function shown in previous studies [8,20]. Thus a simple measurement of basal cortisol could become a routine test for patients with liver disease suspected to have AI. Further and more specific tests could be reserved (LST, free cortisol measurement) for patients with an initial low basal cortisol.

During stress conditions such as surgical procedures, trauma, burns and infections, a normal adrenal response is demonstrated by plasma cortisol concentrations as high as 1270–1360 nmol/L or more [37]. Thus, in highly stressed cirrhotic patients a delayed adrenal response could lead to serious clinical consequences.

In a recent study [21] assessing 143 non-critically ill patients with cirrhosis, low total delta cortisol values were associated with higher incidence of severe sepsis, type I hepatorenal syndrome, and higher short-term mortality. Further studies are needed to assess the association between adrenal function and prognosis in patients with cirrhosis, and they should include an evaluation of a delayed adrenal response using LST.

This study has some limitations. The main limitation of the study is that not all the patients with suspected AI according to LDSST received the LDT. Similarly, free serum cortisol was assessed only in a subset of patients. However, patients with impaired free cortisol response also showed a lower LST response after 24 h, and stimulated free cortisol was directly related to LST response after 24 h. In addition, free cortisol dosage is a complex and expensive technique and the diagnostic cut off values have not been clearly defined. Our study should be considered a pilot study, and future investigations should clarify these points.

Despite these limitations, this study shows that more than 50% of patients with cirrhosis with an abnormal LDSST, had a delayed response after prolonged stimulation with exogenous ACTH (1 mg depot tetracosactrin). A defect in the HPA axis combined with a defective cortisol secretion at cellular level may contribute to the adrenal dysfunction in cirrhosis, however this needs to be clarified in further studies.

Conflict of interest

None declared.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.006>.

References

- [1] Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Gardner DG, Shoback D, editors. Greenspan's: basic & clinical endocrinology. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2007. p. 356–63.
- [2] Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Critical Care Medicine* 2005;33:1254–9.
- [3] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, et al. Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review. *Hepatology* 2012;55:1282–91.
- [4] Arabi YM, Aljumah A, Dabbagh O, et al. Low-dose hydrocortisone in patients with cirrhosis and septic shock: a randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal* 2010;182:1971–7.
- [5] Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006;44:1288–95.
- [6] Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002;36:395–402.
- [7] Tsai MH, Peng YS, Chen YC, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006;43:673–81.
- [8] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, et al. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2011;54:243–50.
- [9] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, et al. Comparison of total cortisol, free cortisol, and surrogate markers of free cortisol in diagnosis of adrenal insufficiency in patients with stable cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013.
- [10] Galbois A, Rudler M, Massard J, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *Journal of Hepatology* 2010;52:839–45.
- [11] McDonald JA, Handelsman DJ, Dilworth P, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1993;8:247–53.
- [12] Tan T, Chang L, Woodward A, et al. Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *Journal of Hepatology* 2010;53:841–8.
- [13] Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver International* 2011;31:425–33.
- [14] Zietz B, Lock G, Plach B, et al. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-glandular axes and relation to Child-Pugh classification in male patients with alcoholic and virus-related cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003;15:495–501.
- [15] Acevedo J, Fernandez J, Castro M, et al. Prognostic value of relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2010;52:559–182.
- [16] Triantos C, Marzigue M, Fede G, et al. Critical illness related corticosteroid insufficiency (CIRCI) in patients with cirrhosis and variceal bleeding. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2011;9:595–601.
- [17] Risso A, Alessandria C, Elia C, et al. Adrenal dysfunction in nonseptic cirrhotic patients with ascites: impact on survival [Abstract]. *Digestive and Liver Disease* 2011;43(Suppl. 2):S74.
- [18] Parker KL, Kovacs WJ. Addison's disease (adrenal insufficiency). In: Wass JAH, Shalet SM, editors. *Oxford textbook of endocrinology and diabetes*. 1st ed. Oxford; 2002. p. 837–44.
- [19] Marik PE, Pastores SM, Annane D, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Critical Care Medicine* 2008;36:1937–49.
- [20] Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: a meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008;93:4245–53.
- [21] Acevedo J, Fernandez J, Prado V, et al. Relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis. Relationship to short-term risk of severe sepsis, hepatorenal syndrome and death. *Hepatology* 2013.
- [22] Thevenot T, Dorin R, Monnet E, et al. High serum levels of free cortisol indicate severity of cirrhosis in hemodynamically stable patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2012;27:1596–601.
- [23] Oelkers W. Adrenal insufficiency. *New England Journal of Medicine* 1996;335:1206–12.
- [24] Galvao-Teles A, Burke CW, Fraser TR. Adrenal function tested with tetracosactrin depot. *Lancet* 1971;1:557–60.
- [25] Jenkins RC, Ross RJM. Protocols for common endocrine tests. In: Grossman A, editor. *Clinical endocrinology*. 2nd ed. Oxford; 1998. p. 1117–34.
- [26] Gonc EN, Kandemir N, Kinik ST. Significance of low-dose and standard-dose ACTH tests compared to overnight metyrapone test in the diagnosis of adrenal insufficiency in childhood. *Hormone Research* 2003;60:191–7.
- [27] Wiest R, Moleda L, Zietz B, et al. Uncoupling of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008;23:1901–8.
- [28] Vogeser M, Briegel J, Zachoval R. Dialyzable free cortisol after stimulation with synacthen. *Clinical Biochemistry* 2002;35:539–43.
- [29] Limor R, Tordjman K, Marcus Y, et al. Serum free cortisol as an ancillary tool in the interpretation of the low-dose 1-mug ACTH test. *Clinical Endocrinology* 2011;75:294–300.
- [30] Bornstein SR. Predisposing factors for adrenal insufficiency. *New England Journal of Medicine* 2009;360:2328–39.
- [31] Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 1990;127:101–6.
- [32] McNeilly AD, Macfarlane DP, O'Flaherty E, et al. Bile acids modulate glucocorticoid metabolism and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obstructive jaundice. *Journal of Hepatology* 2010;52:705–11.
- [33] Swain MG, Patchev V, Vergalla J, et al. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to stress in a rat model of acute cholestasis. *Journal of Clinical Investigation* 1993;91:1903–8.
- [34] Ahabrach H, Piedrafitia B, Ayad A, et al. Chronic hyperammonemia alters the circadian rhythms of corticosteroid hormone levels and of motor activity in rats. *Journal of Neuroscience Research* 2010;88:1605–14.
- [35] Llansola M, Ahabrach H, Errami M, et al. Impaired release of corticosterone from adrenals contributes to impairment of circadian rhythms of activity in hyperammonemic rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2013;536:164–70.
- [36] Montagnese S, Middleton B, Mani AR, et al. Changes in the 24-h plasma cortisol rhythm in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2011;54:588–90.
- [37] Chernow B, Alexander HR, Smallridge RC, et al. Hormonal responses to graded surgical stress. *Archives of Internal Medicine* 1987;147:1273–8.

Emerging hepatic syndromes: pathophysiology, diagnosis and treatment

Gaetano Bertino¹ · Graziella Privitera² · Francesco Purrello² · Shirin Demma¹ · Emanuele Crisafulli¹ · Luisa Spadaro² · Nikolaos Koukias³ · Emmanuel A. Tsochatzis³

Received: 29 January 2016 / Accepted: 25 May 2016
© SIMI 2016

Abstract Liver cirrhosis is a major cause of morbidity and mortality worldwide, mainly due to complications of portal hypertension. In this article, we review the current understanding on the pathophysiology, the diagnostic criteria and the available therapeutic options for patients with emerging hepatic syndromes in cirrhosis, namely the hepatorenal, hepato-adrenal and hepatopulmonary syndrome. The hepatorenal syndrome is a well-recognized complication of advanced cirrhosis and is usually associated with an accelerated course to death unless liver transplantation is performed. The hepatopulmonary syndrome is often missed in the evaluation of patients with cirrhosis; however, early recognition is essential for the efficient management of individual patients. The hepato-adrenal syndrome, although not fully characterized, offers an exciting field for research and potential therapeutic interventions.

Keywords Hepatorenal · Hepato-adrenal · Hepatopulmonary · Cirrhosis

Introduction

Liver cirrhosis is a major cause of morbidity and mortality worldwide, being the fourth cause of death in Central Europe and the twelfth cause of death in the US [1]. Most patients with cirrhosis do not succumb to hepatocellular failure per se but to consequences of portal hypertension and pathophysiological changes induced by the progressive liver dysfunction [2]. The cross talk of the cirrhotic liver with other vital organs and systems is increasingly recognized in the form of various hepatic syndromes, which deserve increased awareness from the internist so they are recognized and treated promptly [3]. In the current review, we focus on the pathophysiology, diagnosis and treatment of three of these hepatic syndromes, namely the hepatorenal, hepato-adrenal and hepatopulmonary syndrome.

Hepatorenal syndrome

The hepatorenal syndrome (HRS) is one of the most important potential causes of acute kidney injury in patients with established cirrhosis. It is a severe complication of cirrhosis, and affects patients that have advanced liver disease with portal hypertension and ascites [4–6]. The HRS represents the end stage of a sequence of reductions in renal perfusion induced by increasingly severe hepatic injury.

Definition and diagnosis

The hepatorenal syndrome is defined as the appearance of a deterioration of renal function and, therefore, kidney injury and renal failure, in patients with advanced liver

G. Bertino and G. Privitera contributed equally to this manuscript and are joint first authors.

✉ Emmanuel A. Tsochatzis
e.tsochatzis@ucl.ac.uk

¹ Hepatology Unit, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catania, Policlinico “G. Rodolico”, Catania, Italy

² Internal Medicine, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catania, Ospedale Garibaldi-Nesima, Catania, Italy

³ UCL Institute for Liver and Digestive Health and Sheila Sherlock Liver Unit, Royal Free Hospital and UCL, London, UK

disease, without another clearly recognizable cause of kidney failure [4–6]. HRS is a diagnosis of exclusion, and other potential causes of kidney injury should be considered before a diagnosis is made. The International Ascites Club recently published revised criteria for the diagnosis of HRS that do not include threshold values for serum creatinine [5]. These criteria are outlined below:

- established diagnosis of cirrhosis/end-stage liver disease and ascites;
- diagnosis of AKI according to ICA-AKI criteria;
- no response after the diuretic withdrawal or a plasma volume expansion with albumin 1 g/kg of body weight for at least 2 consecutive days;
- absence of shock and exclusion of current or previous use of nephrotoxic drugs;
- no macroscopic signs of structural kidney injury defined as absence of proteinuria, absence of microhaematuria and normal findings on renal ultrasonography.

However, not all patients with HRS, particularly in the early phase of syndrome, have oliguria; thus, a progressive rise in serum creatinine is more common. Urine volumes may be higher than previously appreciated. Existing data confirm that it is possible to observe a volume of urine greater than 400 ml/day with the appearance of a more marked contraction of diuresis only a few days before death [7–10]. Furthermore, the serum creatinine may show an increase by 0.1 mg/dL/day (9 μ mol/L/day), with several periods of stabilization or minimal improvement.

The diagnosis of HRS is based upon clinical criteria. To this date, a specific test that can conclusively establish this diagnosis does not exist. However, there are certain blood chemistry indices, which can help, even if they have not been validated for this condition and do not appear as the game changer. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) generally seems to be higher in acute tubular necrosis (ATN) if compared with HRS and pre-renal azotemia, even if a possible overlap between these mentioned diseases deserves attention.

Other apparent etiologies for AKI/ARF must be excluded, including any type of shock, cardiovascular events and active or recent treatment with nephrotoxic drugs. In addition, ultra-sonographic evidence of renal disease and of high or low urinary tract obstruction must be searched and excluded.

Often AKI may represent a complication of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). SBP, which may appear with or without ATN, seems to be a trigger factor of the HRS.

In addition, HRS can also occur in patients with pre-existing chronic kidney disease.

Epidemiology

About 40 % of patients with cirrhosis and ascites develop HRS during the natural history of their disease. [4–6]. Hyponatremia and a high plasma renin activity, when present, seem to identify patients at higher risk. These signs could be associated with a neuro-humoral response probably resulting from a decline in effective renal perfusion that could be explained by hemodynamic aberrations occurring in cirrhosis [1, 6].

Classification

Based upon the rapidity of the decline in kidney function, HRS can be divided into types I and II:

- Type I HRS is characterized by a rapid and progressive impairment of renal function with stage II or III AKI, or by progression of the initial stage despite general therapeutic measures during a period of less than 2 weeks. The overall survival time is less than 2 weeks.
- Type II HRS is defined as renal impairment characterized by a subtler course that is less severe if compared with type I disease. One of the most important features in these patients is diuretic-resistant ascites. Finally, subjects with type II HRS have a longer estimated survival time, with an average value of about 6 months.

Precipitants

The onset of HRS is commonly insidious. Nevertheless, clinically important precipitating factors exist, such as bacterial infection or gastrointestinal bleeding. For example, as previously stated, SBP may appear coupled with HRS, but also pneumonia or urosepsis can trigger HRS, even if this latter most often takes place in patients who already suffer from some kind of renal failure/kidney injury or metabolic disease [8, 11]. Other possible precipitant factor is the intensive use of diuretics, even if these latter do not usually have a proven direct causal role. Furthermore, diuretic-induced hyper-azotemia improves after the withdrawal of therapy and also with fluid repletion/challenge.

Problems with estimating kidney function

The serum creatinine may underestimate the kidney dysfunction in patients with liver disease and then in HRS. Urea cycle undergoes aberration in this kind of patient; the liver disease, the decreased muscle mass, and a reduced food intake of protein contribute to a reduction in urea and creatinine production. For these reasons, a normal value of serum creatinine may mask a reduction in the glomerular

filtration, which occurs in a patient with reduced basal production of nitrogen compounds. In addition, blood urea nitrogen (BUN) is not a reliable variable in these patients. If protein intake is not sufficient, low production of nitrogen compounds/urea may result in a low BUN and hence in a low BUN to creatinine ratio. Otherwise, with normal nutrition, the enhancement of tubular reabsorption typical of this population leads to higher urea absorption and then higher BUN and BUN to creatinine ratio.

Pathophysiology

The arterial vasodilatation theory is the most widely accepted explanation for the circulatory dysfunction in cirrhosis that could ultimately result in the hepatorenal syndrome. One of the accused mechanisms is the increased production of vasodilators or the enhancement of its activities, mainly in the splanchnic circulation. In this case, one of the most significant compounds seems to be nitric oxide. When liver disease becomes more severe, many hemodynamic changes occur. There is an increase in renal and femoral vascular resistance probably caused by hyperaldosteronism. Thus, there is a reduction in total systemic vascular pressure resulting in part by splanchnic dilatation that is often coupled with volume sequestration in the splanchnic circulation because of portal hypertension. In addition, the bacterial translocation (BT) from the intestinal lumen initially to the

mesenteric lymph nodes, and subsequently to the bloodstream, may play an important role in this process, participating in the systemic vasodilatation [4–6]. Indeed, advanced cirrhosis is regarded as a systemic inflammatory state, even in the absence of infection, with increased levels of pro-inflammatory cytokines that aggravate the hyperdynamic circulation. The pro-inflammatory state is thought to provide the milieu for acute decompensation, acute-on-chronic liver failure, and HRS. Furthermore, adrenal insufficiency (discussed in detail later) may further contribute to the circulatory dysfunction of these patients.

The progressive reduction of renal perfusion in this setting is often associated with GFR decrease, electrolyte alteration and fluid dispersion (often linked to ascites and edema) resulting in arterial hypotension, despite the intense renal vasoconstriction. All these features have a net detrimental effect on renal perfusion, which feeds this vicious cycle. The importance of splanchnic vasodilatation might be indirectly demonstrated *ex juvantibus* by the response to terlipressin or other analogues of vasopressin, which is a preferential splanchnic vasoconstrictor. In patients with advanced cirrhosis, vasopressin analogues seem to be able to partially correct systemic and renal hemodynamic abnormalities that are present [12]. The good response to creation of porto-systemic shunts also supports the importance of splanchnic hemodynamics in the pathogenesis of the HRS [13]. The pathophysiology of HRS is summarized in Fig. 1.

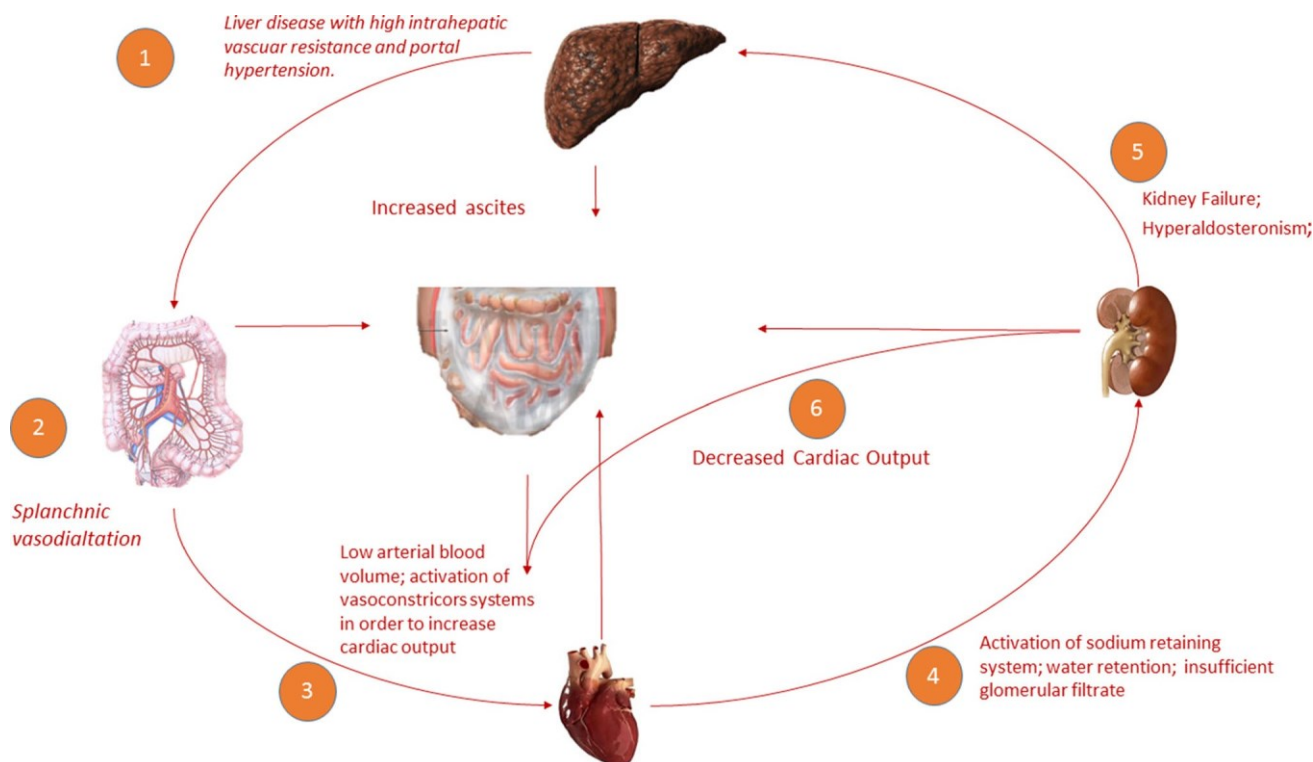


Fig. 1 Pathophysiology of the hepatorenal syndrome

Treatment

All the current available treatments aim to correct the pathophysiological mechanisms underlying the HRS by expanding central blood volume, simultaneously increasing the total plasma volume, and reducing the intense peripheral vasodilatation.

Albumin

Albumin may play a role in the volume expansion caused by the relative reduction of the effective arterial blood volume. The International Ascites Club recommends using albumin, in combination with vasoconstrictors, at an initial dose of 1 g/kg of body weight on the first day, and continuing at a dose of 20–40 g/day.

There is some evidence that albumin may even potentially bind vasodilators, improving the circulatory function. Nevertheless, albumin alone does not seem to be as effective as in combination with vasoconstrictors to treat HRS [14].

The rationale of the use of vasoconstrictors is to reduce the extent of the systemic vasodilatation. Many compounds have been studied, especially on patients with type 1 HRS, with the intent of causing an improvement of the renal perfusion pressure and glomerular filtration through a rise in the systemic arterial blood pressure.

Vasopressin and its analogues have been widely used to improve the renal blood flow.

Vasopressin

Vasopressin could potentially be an alternative treatment for HRS where vasopressin analogues are not available, but its use in HRS is not widespread due to concerns about ischemic side effects. However, its effect has been evaluated only in a retrospective study [15]. Large prospective controlled studies are needed to test whether this therapeutic approach improves survival in patients with HRS.

Terlipressin

Terlipressin has a similar action as vasopressin, but with longer activity and less ischemic side effects. Unlike vasopressin, terlipressin has been widely used in the treatment of HRS, and many randomized controlled trials and meta-analyses are available.

In a pilot study of nine patients, terlipressin was used in combination with albumin to assess its efficacy and its safety profile in patients with type-1 or type-2 HRS [16]. At the end of the study, 7/9 patients reverted HR with a low incidence of side effects. In a randomized controlled trial

of terlipressin or placebo and albumin in 112 patients with type I HRS, terlipressin was superior to placebo for HRS reversal (34 vs. 13 %) [17]. A Cochrane meta-analysis including 376 patients concludes that terlipressin plus albumin may prolong short-term survival in patients with type I HRS [18].

It has been demonstrated that early treatment with terlipressin in combination with albumin is very effective in improving survival in patients with type-1 HRS associated with sepsis [19]. Recently, Cavallin et al. show that terlipressin plus albumin is very effective in improving renal function and survival in patients with HRS, compared with other vasoconstrictors, and this combination should be considered the first option for the management of HRS [20].

Terlipressin should be used at an initial dose of 0.5–2 mg every 4–6 h intravenously up to 15 days with at least 40 g of human albumin per day.

Terlipressin has also been used in the management of patients with type II HRS, significantly improving renal function [21].

Midodrine and octreotide

Midodrine improves systemic blood pressure acting on α -adrenergic receptors. It has been shown to be effective in non-azotemic cirrhotic patients with ascites, ameliorating systemic hemodynamics [22]. The use of midodrine in combination with octreotide, a long-acting analogue of somatostatin, and albumin is associated with an improvement in renal function in patients with type-1 HRS [23, 24]. The dosage of midodrine can be titrated to reach a mean arterial blood pressure of at least 90 mmHg.

Although terlipressin and albumin are better than midodrine/octreotide/albumin, the latter could be a valid alternative treatment where terlipressin is not available [20].

Norepinephrine

Norepinephrine represents a valid alternative to terlipressin. In a randomized study, it appears to be as effective as terlipressin but at a fraction of the cost [25].

Many studies have shown that noradrenaline is effective in improving renal function, and is widely available and not expensive [26]. It also appears to be effective in the management of type-2 HRS [27].

In conclusion, the results of the use of noradrenaline in the management of HRS are very encouraging, also considering that it has less ischemic side effect compared with other vasoconstrictors.

Transjugular intrahepatic porto-systemic shunt (TIPS)

TIPS is very effective in reducing portal hypertension, and is also effective in type II HRS, but its applicability is low (as it is not suitable for all patients), and it increases the risk of encephalopathy. Good results have been obtained in association with vasoconstrictors and albumin but its applicability remains restricted to a small number of patients [21, 24].

Liver transplantation

Liver transplantation is considered the definitive treatment for HRS; however, not all patients are eligible, and the window of opportunity may be narrow particularly in patients with type I HRS. Moreover, the return to a normal renal function post-transplant is not guaranteed for all patients, especially those with alcoholic cirrhosis [28]. Even if transplantation is not available in all the patients with HRS, it confers a major survival benefit compared to medical management [29]. It might be very useful to identify early on those patients who will not recover a normal renal function after liver transplantation and consider them for combined kidney–liver transplants [30].

Hepato-adrenal syndrome

The hepato-adrenal syndrome is a newly defined complication characterized by an inadequate cellular corticosteroid activity for the severity of patient's illness. To date, adrenal dysfunction has been described in critically ill cirrhotic patients, in stable cirrhosis, and in liver transplant recipients suggesting that adrenal insufficiency is a feature of liver cirrhosis per se. Cirrhosis represents a predisposing condition to adrenal insufficiency, and the coexistence of the two conditions seems to be associated with a poor prognosis. Therefore, there is an urgent need to define a gold standard diagnostic method and to explore the potential benefits of corticosteroid replacement in this setting.

Pathophysiology

The pathogenesis of hepato-adrenal syndrome has not been clarified, but some hypotheses have been suggested (Fig. 2).

Substrates deficiency: adrenal exhaustion syndrome

Cholesterol is the principal precursor for steroid biosynthesis. At rest and during stress, about 80 % of circulating

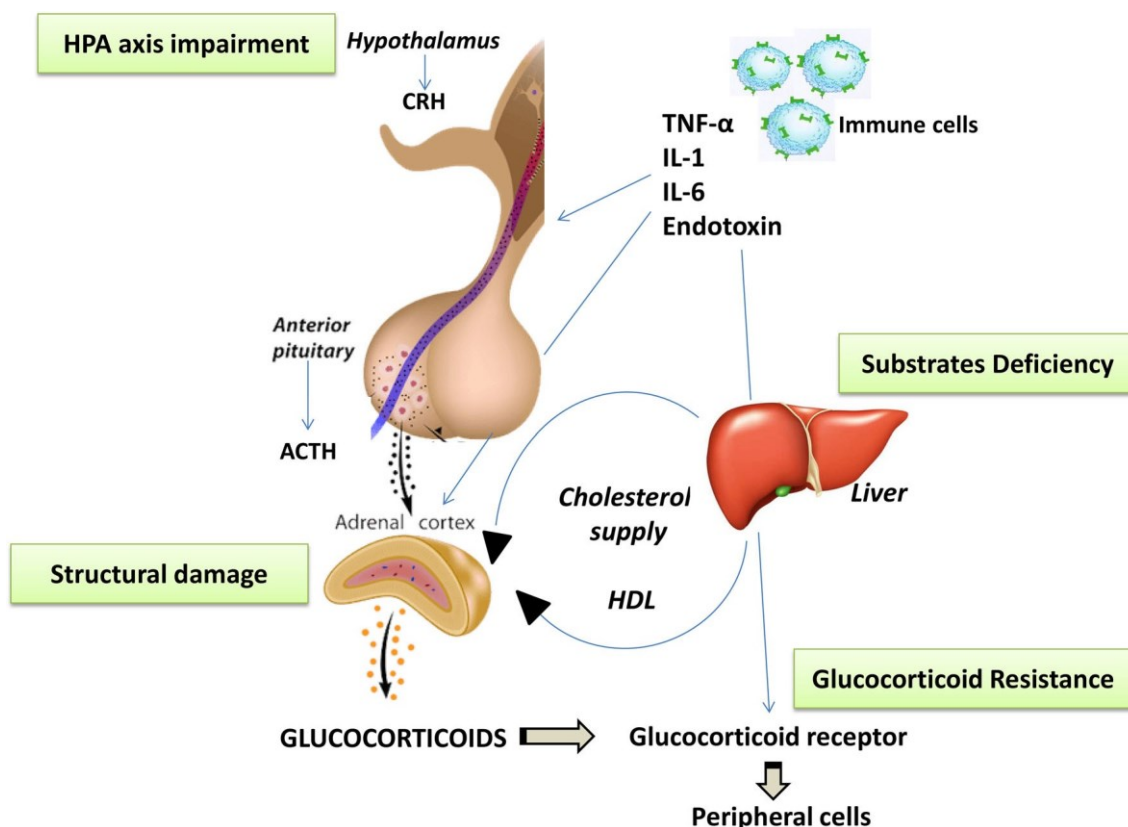


Fig. 2 Current understanding of the pathophysiology of the hepato-adrenal syndrome

cortisol is derived from plasma cholesterol, while the remaining 20 % is synthesized in situ from acetate and other precursors. The synthesis of cortisol after ACTH stimulation is, therefore, directly dependent on cholesterol availability [31]. The vast majority of lipoprotein-derived cholesterol utilized is obtained via SR-BI-mediated “selective” uptake of cholesteryl esters [32]. Experimental studies suggest that HDL is the preferred cholesterol source of steroidogenic substrate in the adrenal gland [33].

Low levels of plasma cholesterol and lipoproteins are usual in cirrhosis. Cicognani et al. show that cholesterol and its fractions progressively decrease with increasing severity of the disease [34]. Previous data of the lipoprotein role in adrenal function are conflicting. Marik et al. suggest that low levels of HDL in critically ill patients with liver disease may be pathogenically linked to adrenal failure [35]. A study evaluating critically ill patients with acute and acute-on chronic liver failure suggests that HDL levels are essential for on-demand cortisol secretion [36]. In contrast, no significant differences in lipid profiles are observed between patients with severe liver disease with and without adrenal insufficiency (AI) [37]. Recently, Acevedo et al. evaluated adrenal function in decompensated cirrhotic patients, and observe no difference in lipid profile between subjects with and without AI [38].

We have recently evaluated the role of lipid profile in adrenal function of a group of stable cirrhotic patients compared to healthy subjects, and show that basal cortisol is related to Apo-AI and triglycerides. Similarly, the dynamic adrenal response is related to triglycerides, TC, and more strictly to Apo-AI, suggesting that in cirrhosis lipoprotein levels influence adrenal response to ACTH administration [39].

HPA axis impairment

Patients with both acute and chronic liver disease have increased levels of circulating endotoxin and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6) that are related to the severity of liver disease. It is postulated that intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation together with reduced Kupffer cell activity and porto-systemic shunting result in systemic endotoxaemia with increased transcription of pro-inflammatory mediators [40]. The systemic inflammatory response leading to the excessive and harmful inflammatory reactions is a hallmark of acute-on-chronic liver failure. In this context, the augmented levels of pro-inflammatory cytokines can induce liver and other organ failures, such as adrenocortical insufficiency [41].

TNF- α has been shown to reduce the secretion of ACTH from the pituitary gland [42]. In addition, LPS as well as TNF- α may directly inhibit cortisol synthesis in a dose-dependent manner [43]. Endotoxin has been shown to bind

with high affinity to the HDL receptor with subsequent internalization of the receptor [44]. LPS may, therefore, limit the delivery of HDL cholesterol to the adrenal gland [45]. Furthermore, TNF- α as well as IL-1 β and IL-6 has been demonstrated to decrease hepatocyte synthesis and secretion of Apo-AI [46].

Acevedo et al. compared cytokine levels of decompensated cirrhotic patients according to adrenal function. No significant difference is observed between the two groups in terms of cytokine values [38].

Other mechanisms

Resistance to glucocorticoid action has been proposed as a potential mechanism of adrenal dysfunction in cirrhotic patients. The activity of glucocorticoids is mediated by the glucocorticoid receptor (GR). Two isoforms of the GR have been isolated, namely GR- α and GR- β . GR- α represents the active isoform, the GR- β is the negative isoform. Excessive inflammatory cytokine production leads to decreased numbers and binding affinity of glucocorticoid receptors [47]. The role of glucocorticoid resistance has been investigated in critically ill patients. No data have been reported in cirrhotic patients with adrenal dysfunction.

Coagulopathy, which is common in patients with cirrhosis, may cause adrenal haemorrhage and infarction leading to structural damage of the adrenal gland, resulting in AI. In the study of Harry et al., adrenal function was evaluated in patients with acute hepatic dysfunction. The authors provided postmortem data to identify the cause of adrenal dysfunction in this setting. The postmortem analysis does not suggest that haemorrhage in the adrenal glands is the cause of adrenal dysfunction [48].

Diagnostic approach

The diagnosis of adrenal insufficiency in cirrhosis constitutes a crucial point. Published studies have used a variety of biochemical criteria to define abnormalities in adrenal function during liver cirrhosis. Common methods used in the general population to assess AI may be invalid in cirrhotic patients because there are a number of confounding factors that make interpretation difficult.

Serum total vs. free cortisol concentrations

Over 90 % of circulating cortisol in serum is bound to proteins, namely corticosteroid-binding globulin (CBG) and albumin. Normally, 70 % of circulating cortisol is bound to CBG, 20 % is bound to albumin, and 10 % exists as free cortisol. CBG is significantly decreased in cirrhotics compared to healthy controls. In this setting, the total cortisol is reduced while free cortisol, responsible for glucocorticoid

activity on peripheral organs, remains unchanged. The common methods for assessing adrenal function, based on total cortisol, may lead to overestimation of AI in patients with cirrhosis. The optimal method might be the direct evaluation of free cortisol, but its measurement is difficult in daily clinical practice. Indirect free cortisol can be calculated by the Coolens equation based on total cortisol and CBG. The free cortisol index (FCI) ratio between total cortisol and CBG concentration is used as the surrogate marker for free cortisol and $\sqrt{12}$ is used as the cutoff. Salivary cortisol has been used as a surrogate marker of free cortisol, but presents limitations in cirrhosis including the high incidence of oral candidiasis, bleeding gums, and parotitis especially in the alcoholic patient [49]. In the study of Galbois et al., the authors assessed the prevalence of adrenal insufficiency using salivary and serum assays and investigated the correlation between salivary, serum total and free cortisol. The authors conclude that salivary cortisol correlates strictly with free cortisol, and thus better reflects adrenal function in cirrhotic patients [50]. Similarly, Thevenot et al. compared salivary cortisol concentrations with serum total cortisol in a large group of cirrhotic patients. Salivary cortisol is closely correlated with serum-free cortisol concentrations suggesting the potential use of salivary cortisol as a surrogate marker of free cortisol [51]. Although these are promising results, salivary cortisol assay needs to be standardized to determine the method-specific reference ranges.

Short synacthen test (SST) vs. low-dose SST

As previously mentioned, several approaches to evaluate adrenal function in liver disease have been adopted. AI is generally diagnosed by the ACTH stimulation test, which is safe and reliable. Other tests assessing the integrity of the entire HPA axis have been used. Such tests include the insulin-induced hypoglycaemia, metyrapone testing and CRH test. All of these tests are unsafe and impractical, and the data are difficult to interpret in the setting of liver disease.

The corticotropin test entails stimulation of the adrenal glands by pharmacological doses of exogenous ACTH. In the SST, plasma cortisol is measured at 0, 30 and 60 min after intravenous or intramuscular injection of 250 μ g corticotrophin. Different thresholds have been used to diagnose adrenal dysfunction in liver cirrhosis, the most common cutoff used is 550 nmol/L. SST uses a supra-physiological dose of corticotrophin and is preferentially utilized in critically ill patients. In the LDSST, plasma cortisol is measured at 0, 20 and 30 min after stimulation with 1 μ g intravenous corticotrophin. If peak cortisol exceeds 500 nmol/L, adrenal function is normal. This test seems to be more sensitive than SST, and better evaluates the stable cirrhotic patient [52].

Most of the data in the literature have used the SST, and the available data on the LDSST are limited and not sufficient to make a sound recommendation.

Corticosteroid replacement: current evidences

The published data on corticosteroid supplementation in critically cirrhotic patients are few and controversial. In a retrospective study, Harry et al. evaluated the outcome and the side effect profile of supraphysiological doses of hydrocortisone in 20 patients with liver failure and norepinephrine dependency. Compared with a control group not treated with steroids, the authors find that supraphysiological doses of corticosteroids reduce vasopressor requirements but do not improve survival [53]. Marik et al. performed a non-randomized trial in 340 patients with liver disease. The study cohort was heterogeneous including chronic liver failure, fulminant hepatic failure, immediate post-liver transplantation and remote history of liver transplantation. Between 245 patients enrolled with adrenal failure, 156 were treated with steroids. The mortality rate of treated patients was 26 % compared with 46 % in those who were not treated [35]. Fernández et al. evaluated the clinical course and hospital mortality of 25 cirrhotic patients with septic shock treated with low doses of intravenous hydrocortisone compared to 50 septic and cirrhotic patients who did not receive steroids. Although the number of patients enrolled was small, the authors clearly demonstrate a marked increase in shock reversal and hospital survival in patients treated with hydrocortisone [54].

Arabi et al. performed a randomized double-blind trial to examine the effect of low-dose hydrocortisone therapy in cirrhotic patients with septic shock. The trial was stopped after 75 patients were enrolled. The study confirms the high incidence of relative adrenal insufficiency in patients with cirrhosis presenting septic shock. Hydrocortisone therapy is associated with an early haemodynamic improvement; however, at 28 days the treatment does not reduce mortality, and is associated with an increase in shock relapse and gastrointestinal bleeding [55].

Etogo-Asse et al. enrolled 164 critically ill patients with acute and acute-on chronic liver failure. The aim of the study was the assessment of the relationship between HDL levels and survival, predisposition to sepsis and adrenocortical function. In this setting, the authors also evaluated the potential benefit of hydrocortisone therapy on mortality. The analysis was performed in 51 patients requiring vasopressors on admission, of whom 31 received intravenous hydrocortisone at a median dose of 200 mg daily. No significant difference is found in terms of mortality between the patients who receive steroids and those who do not. Although there is a lack of benefit on survival, the authors emphasize that the severity of multiple organ

failure is clearly greater in the former group and the predicted mortality higher. Therefore, a beneficial effect of steroid therapy cannot be excluded [36]. Similarly, the use of supplemental corticosteroids in ACLF seems to play an important role in shock recovery and vasopressor requirement, but no survival benefit has been shown. A large randomized clinical trial of corticosteroid supplementation in ACLF is underway (Chronic Liver Failure Consortium. <http://www.clifresearch.com/scotch/Home.aspx>).

Conclusions

Adrenal insufficiency is common in patients with liver disease, and its incidence is related to the severity of the liver cirrhosis. Our understanding of the hepato-adrenal syndrome has been improved in recent years, but different aspects need to be clarified. Further studies should be conducted to define the most accurate diagnostic method of the hepato-adrenal syndrome and the impact on survival. Similarly, the potential benefits of cortisol administration should be elucidated.

Hepatopulmonary syndrome

The hepatopulmonary syndrome (HPS) is a disorder of arterial oxygenation that occurs in patients with chronic liver disease [1, 56]. Although HPS is most commonly associated with cirrhosis, it has also been diagnosed in patients with pre-sinusoidal portal hypertension [57]. HPS has been attributed to alterations in pulmonary circulation that impair normal gas exchange [57]. HPS should not be confused with portopulmonary hypertension, which is pulmonary arterial hypertension associated with portal hypertension. In recent studies, the prevalence of HPS ranges from 4 to 34 % [58, 59]. At present, the only definite therapy for HPS is liver transplantation [60].

Pathophysiology

The hallmark of HPS is abnormal pulmonary vascular dilatation, resulting in anatomical shunting and hypoxemia due to the subsequent diffusion-perfusion abnormality.

Although the pathogenesis of HPS is not fully understood, pulmonary capillary and pre-capillary dilatation, arterio-venous shunting and neo-angiogenesis are considered as the basic underlying disorders [60].

Small vessel dilatation and shunting are caused by an imbalance between vasodilating and vasoconstrictive substances [56]. Although nitric oxide (NO) overproduction in intrapulmonary circulation has traditionally been considered as the main cause of pulmonary vasodilatation,

studies indicate a more complex mechanism. In cirrhotic patients, increased intrapulmonary endothelin levels of hepatic origin may contribute to NO-mediated pulmonary vasodilation [61]. Similar to NO, increased carbon monoxide level has also been found in patients with HPS [62].

Consequently, in patients with HPS, the increase in small vessel diameter may cause poor blood oxygenation and right-to-left shunting. Increased vessel diameter inhibits normal blood oxygenation whereas poorly oxygenated venous blood passes through the shunts either rapidly or directly into pulmonary veins thereby causing hypoxemia and dyspnoea [60].

In addition, studies have shown an increased density of intrapulmonary capillaries in patients with HPS. Therefore, angiogenesis has been implicated in the pathogenesis of this syndrome [56]. Furthermore, it has been suggested that pulmonary macrophages may become activated due to intestinal bacterial translocation. Subsequently, macrophages may adhere to the pulmonary vessels and induce the production of vasodilating and angiogenic factors such as NO and vascular endothelial growth factor (VEGF-A), respectively, and thus play a critical role in HPS (Fig. 3) [63, 64].

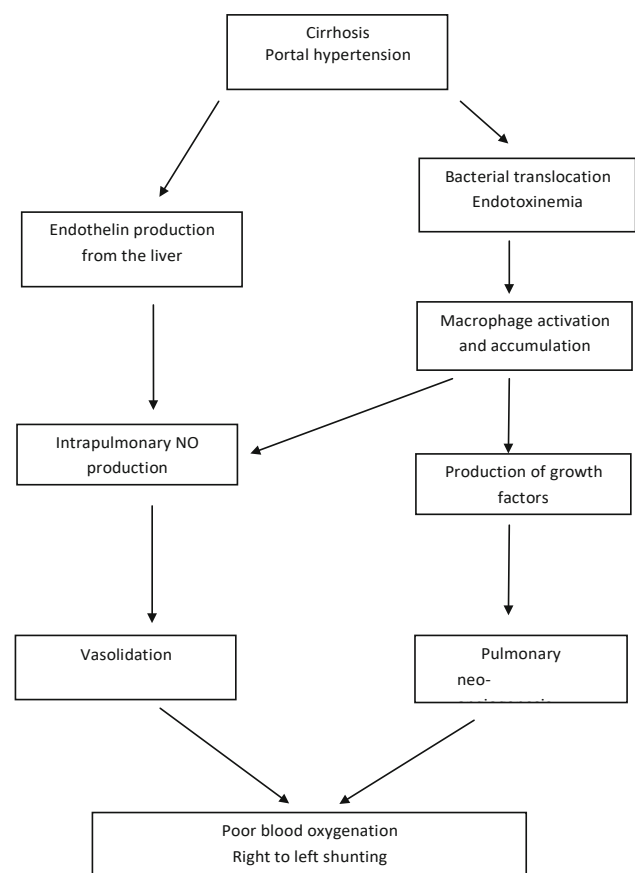


Fig. 3 Pathophysiology of the hepatopulmonary syndrome

Diagnosis

The typical although not pathognomonic symptoms of HPS are dyspnoea and platypnoea, i.e. dyspnoea that becomes paradoxically more intense in the upright position, in the setting of chronic liver disease. Platypnoea and the underlying orthodeoxia (decrease in PaO_2 in the upright compared to supine position) have been attributed to the redistribution of pulmonary blood flow that occurs in the upright position. In this context, blood is directed towards the pathologically dilated pulmonary vessels [65, 66].

HPS is defined as an arterial oxygenation defect that is associated with intrapulmonary vascular dilatations (IPVD) in patients with chronic liver disease. Therefore, the diagnosis of HPS includes (i) the recognition of a defect in oxygenation and (ii) evidence of intrapulmonary vascular dilatations in such patients [56, 66].

1. *Defect in oxygenation* Finger pulse oximetry in the supine and recumbent position is a simple, sensitive and reproducible screening test in the diagnosis of hypoxemia in HPS. It has been suggested that a threshold value of $\geq 96\%$ at pulse oximetry has a sensitivity of up to 100% in the diagnosis of HPS [67]. However, arterial blood gases measurement is necessary. Due to tachypnoea, arterial carbon dioxide tension (PaCO_2) can be decreased even when normal arterial oxygen tension (PaO_2) values are present. Hence, the alveolar–arterial oxygen tension difference, $\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ is considered as one of the most sensitive tests in HPS since it can increase prior to PaO_2 drop. At sea level and while breathing room air, a resting $\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ of ≥ 15 mmHg is considered abnormal (normal range 4–8 mmHg). For patients aged over 64 years, a $\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ cutoff of ≥ 20 mmHg is recommended [66]. PaO_2 measurement is also helpful for determining the severity of HPS as shown in Table 1 [66].
2. *Assessment of intrapulmonary vascular dilatations (IPVD)* The gold standard for the diagnosis of IPVD

and intrapulmonary shunts is contrast echocardiography (CE) with saline shaken to produce microbubbles [56]. In CE, normal saline is agitated and subsequently injected intravenously. The microbubbles in normal subjects are being trapped in small pulmonary capillaries and absorbed by the alveoli. In patients with HPS syndrome, however, microbubbles pass through the intrapulmonary shunts and enter the left atrium, usually after three to six cardiac cycles [68]. Differential diagnosis from cardiac shunting is easy as in the latter bubbles are detected in the right circulation within 1–2 cardiac cycles [68]. Transoesophageal echocardiogram is considered to be more sensitive than transthoracic echocardiogram [69]. Echocardiographic studies are also useful for the differential diagnosis from portopulmonary hypertension [56].

In addition, scintigraphic perfusion scanning (SPS) can be used for the documentation of IPVD and intrapulmonary shunts. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ albumin macro-aggregates, which are infused intravenously, are normally trapped in the pulmonary circulation. In patients with IPVD, macro-aggregates pass through the pulmonary and into the systematic circulation, and are trapped in other organs such as the brain, spleen or kidneys. Most studies that compare SPS with CE in adults show that CE has greater sensitivity [68, 70]. In contrast to CE, SPS permits the quantification of the degree of intrapulmonary shunting. Nevertheless, SPS cannot discriminate between intra-cardiac and intrapulmonary shunting [71]. Pulmonary angiography and high-resolution CT scanning can also be useful additional diagnostic tests in selected cases [69].

Screening for HPS is necessary in patients with chronic liver disease and shortness of breath as well as in patients assessed for liver transplantation [66]. Differential diagnosis of HPS includes intrinsic lung diseases such as infection and chronic obstructive pulmonary disease, pleural effusions and portopulmonary hypertension [60]. Therefore, chest imaging and exclusion of other causes of hypoxemia and dyspnoea are mandatory. In patients with HPS, in the absence of other comorbid pulmonary disorders, spirometer tests are within normal limits [66].

Table 1 Grading of severity of the hepatopulmonary syndrome

Stage	$\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ (mmHg)	Pa,O_2 (mmHg)
Mild	≥ 15	≥ 80
Moderate	≥ 15	$\geq 60 - \geq 80$
Severe	≥ 15	$\geq 50 - \geq 60$
Very severe	≥ 15	≥ 50 (≥ 300 on O_2 100%)

PaO_2 normal range: 80–100 mmHg breathing room air at rest and at sea level. For patients aged ≥ 64 years, a cutoff value for $\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ of ≥ 20 mmHg and Pa,O_2 of ≥ 70 mmHg is recommended

$\text{PA} - \text{a},\text{O}_2$ alveolar–arterial oxygen tension difference; Pa,O_2 arterial oxygen tension

Treatment

Liver transplantation (LT) is the only definite therapy for HPS [60]. Administration of oxygen can partially correct hypoxaemia and should be used in symptomatic patients; however, it becomes less effective in the presence of right-to-left shunting. Patients who are listed for liver transplantation and suffer from HPS have worse survival than matched controls [72]. However, although HPS is associated with worse survival, in most patients the cause of

death is associated with the underlying liver disease complications rather than by HPS per se [56]. Severe HPS is an indication rather than a contraindication for LT, and indeed patients with a PaO₂ <60 mmHg should be worked up for an LT [71]. There has been an ongoing disagreement among studies as to whether the presence or the severity of HPS might influence the survival of patients who undergo liver transplantation. Whereas older studies as well as a recent large retrospective study suggest a worse prognosis after liver transplantation in patients with HPS, and additionally in patients with severe HPS, other studies show that the mortality is not affected by the presence or by the severity of the syndrome [72–75].

Despite the basic role of NO and CO in the pathogenesis of HPS, studies targeting the NO and CO pathway have shown disappointing results [56]. Numerous products have been used for HPS; however, available data do not support the routine use of medical therapy [56, 71]. Pentoxifylline, methylene blue and garlic have shown some promising results. However, only small, pilot studies are available with methylene blue and pentoxifylline [76, 77] whereas two small pilot studies have shown that garlic may be of benefit [78, 79]. Studies with somatostatin, indomethacin and mycophenolate mofetil have also shown contradictory results [56].

A recent review indicates that transjugular intrahepatic porto-systemic shunt (TIPS) might be helpful for patients with HPS [80]. However, the data are conflicting and randomized trials are lacking. Therefore, TIPS placement after the sole indication of the HPS is not currently recommended [71]. In addition, should large arterio-venous shunts be suspected on imaging or should the oxygen deficiency be severe and poorly responsive to therapy, diagnostic and therapeutic angiography is indicated. In such rare cases, embolization of large shunts might be beneficial [60].

In conclusion, screening for HPS is necessary in patients with cirrhosis and shortness of breath as well as in all patients listed for liver transplantation. Pulse oximetry and blood gases measurement should be used as screening tools whereas CE with microbubbles confirms the diagnosis. Liver transplantation remains the only successful long-term treatment.

Conclusions

We reviewed the current understanding of the pathophysiology, the diagnostic criteria and the available therapeutic options for patients with cirrhosis and the hepatorenal, hepato-adrenal and hepatopulmonary syndrome. The hepatorenal and hepatopulmonary syndrome usually occurs in patients with advanced cirrhosis, and should prompt a comprehensive evaluation for eligibility for liver

transplantation. For most patients with type I HRS, the window of opportunity will be absent or very narrow, highlighting the need for earlier interventions to prevent progression. The hepato-adrenal syndrome is not fully characterized; however, it offers an exciting field of research and potential therapeutic interventions.

Acknowledgments Dr Nikolaos Koukias received an educational scholarship from the Hellenic Association for the Study of the Liver.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Statement of human and animal rights This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent No informed consent.

References

1. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. *Lancet* 383:1749–1761
2. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2012) New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis. *Hepatology* 56:1983–1992
3. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Future treatments of cirrhosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 8:571–581
4. EASL (2010) EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 53:397–417
5. Angeli P, Gines P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, Moreau R et al (2015) Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *J Hepatol* 62:968–974
6. Angeli P, Gines P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, Moreau R et al (2015) Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *Gut* 64:531–537
7. Arroyo V, Fernandez J (2011) Management of hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis. *Nat Rev Nephrol* 7:517–526
8. Arroyo V, Garcia-Martinez R, Salvatella X (2014) Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol* 61:396–407
9. Baraldi O, Valentini C, Donati G, Comai G, Cuna V, Capelli I, Angelini ML et al (2015) Hepatorenal syndrome: update on diagnosis and treatment. *World J Nephrol* 4:511–520
10. Nadim MK, Durand F, Kellum JA, Levitsky J, O’Leary JG, Karvellas CJ, Bajaj JS et al (2015) Management of the critically ill patient with cirrhosis: a multidisciplinary perspective. *J Hepatol*
11. Martin-Llahi M, Guevara M, Torre A, Fagundes C, Restuccia T, Gilibert R, Sola E et al (2011) Prognostic importance of the cause of renal failure in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 140(488–496):e484
12. Neri S, Pulvirenti D, Malaguarnera M, Cosimo BM, Bertino G, Ignaccolo L, Siringo S et al (2008) Terlipressin and albumin in patients with cirrhosis and type I hepatorenal syndrome. *Dig Dis Sci* 53:830–835
13. Rossle M, Gerbes AL (2010) TIPS for the treatment of refractory ascites, hepatorenal syndrome and hepatic hydrothorax: a critical update. *Gut* 59:988–1000

14. Moreau R, Durand F, Poynard T, Duhamel C, Cervoni JP, Ichai P, Abergel A et al (2002) Terlipressin in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome: a retrospective multicenter study. *Gastroenterology* 122:923–930
15. Kiser TH, Fish DN, Obritsch MD, Jung R, MacLaren R, Parikh CR (2005) Vasopressin, not octreotide, may be beneficial in the treatment of hepatorenal syndrome: a retrospective study. *Nephrol Dial Transpl* 20:1813–1820
16. Uriz J, Gines P, Cardenas A, Sort P, Jimenez W, Salmeron JM, Bataller R et al (2000) Terlipressin plus albumin infusion: an effective and safe therapy of hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 33:43–48
17. Sanyal AJ, Boyer T, Garcia-Tsao G, Regenstein F, Rossaro L, Appenrodt B, Blei A et al (2008) A randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of terlipressin for type 1 hepatorenal syndrome. *Gastroenterology* 134:1360–1368
18. Gluud LL, Christensen K, Christensen E, Krag A (2010) Systematic review of randomized trials on vasoconstrictor drugs for hepatorenal syndrome. *Hepatology* 51:576–584
19. Rodriguez E, Elia C, Sola E, Barreto R, Graupera I, Andrealli A, Pereira G et al (2014) Terlipressin and albumin for type-1 hepatorenal syndrome associated with sepsis. *J Hepatol* 60:955–961
20. Cavallin M, Piano S, Romano A, Fasolato S, Chiara Frigo A, Benetti G, Gola E et al (2015) Terlipressin given by continuous i.v. infusion versus i.v. boluses in the treatment of hepatorenal syndrome: a randomized controlled study. *Hepatology*
21. Alessandria C, Venon WD, Marzano A, Barletti C, Fadda M, Rizzetto M (2002) Renal failure in cirrhotic patients: role of terlipressin in clinical approach to hepatorenal syndrome type 2. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14:1363–1368
22. Angeli P, Volpin R, Piovano D, Bortoluzzi A, Craighero R, Bottaro S, Finucci GF et al (1998) Acute effects of the oral administration of midodrine, an alpha-adrenergic agonist, on renal hemodynamics and renal function in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology* 28:937–943
23. Angeli P, Volpin R, Gerunda G, Craighero R, Roner P, Merenda R, Amodio P et al (1999) Reversal of type 1 hepatorenal syndrome with the administration of midodrine and octreotide. *Hepatology* 29:1690–1697
24. Wong F, Pantea L, Sniderman K (2004) Midodrine, octreotide, albumin, and TIPS in selected patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome. *Hepatology* 40:55–64
25. Singh V, Ghosh S, Singh B, Kumar P, Sharma N, Bhalla A, Sharma AK et al (2012) Noradrenaline vs. terlipressin in the treatment of hepatorenal syndrome: a randomized study. *J Hepatol* 56:1293–1298
26. Alessandria C, Ottobrelli A, Debernardi-Venon W, Todros L, Cerenzia MT, Martini S, Balzola F et al (2007) Noradrenalin vs terlipressin in patients with hepatorenal syndrome: a prospective, randomized, unblinded, pilot study. *J Hepatol* 47:499–505
27. Ghosh S, Choudhary NS, Sharma AK, Singh B, Kumar P, Agarwal R, Sharma N et al (2013) Noradrenaline vs terlipressin in the treatment of type 2 hepatorenal syndrome: a randomized pilot study. *Liver Int* 33:1187–1193
28. Marik PE, Wood K, Starzl TE (2006) The course of type 1 hepatorenal syndrome post liver transplantation. *Nephrol Dial Transpl* 21:478–482
29. Boyer TD, Sanyal AJ, Garcia-Tsao G, Regenstein F, Rossaro L, Appenrodt B, Gulberg V et al (2011) Impact of liver transplantation on the survival of patients treated for hepatorenal syndrome type 1. *Liver Transpl* 17:1328–1332
30. Davis CL, Feng S, Sung R, Wong F, Goodrich NP, Melton LB, Reddy KR et al (2007) Simultaneous liver-kidney transplantation: evaluation to decision making. *Am J Transpl* 7:1702–1709
31. Kraemer FB (2007) Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol* 265–266:42–45
32. Connelly MA, Williams DL (2003) SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol Metab* 14:467–472
33. Bochem AE, Holleboom AG, Romijn JA, Hoekstra M, Dallinger-Thie GM, Motazacker MM, Hovingh GK et al (2013) High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. *J Lipid Res* 54:1698–1704
34. Cicognani C, Malavolti M, Morselli-Labate AM, Zamboni L, Sama C, Barbara L (1997) Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch Intern Med* 157:792–796
35. Marik PE (2006) Adrenal-exhaustion syndrome in patients with liver disease. *Intensive Care Med* 32:275–280
36. Etogo-Asse FE, Vincent RP, Hughes SA, Auzinger G, Le Roux CW, Wendon J, Bernal W (2012) High density lipoprotein in patients with liver failure; relation to sepsis, adrenal function and outcome of illness. *Liver Int* 32:128–136
37. Tan T, Chang L, Woodward A, McWhinney B, Galligan J, Macdonald GA, Cohen J et al (2010) Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *J Hepatol* 53:841–848
38. Acevedo J, Fernandez J, Prado V, Silva A, Castro M, Pavesi M, Roca D et al (2013) Relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis: relationship to short-term risk of severe sepsis, hepatorenal syndrome, and death. *Hepatology* 58:1757–1765
39. Spadaro L, Noto D, Privitera G, Tomaselli T, Fede G, Scicali R, Piro S et al (2015) Apolipoprotein AI and HDL are reduced in stable cirrhotic patients with adrenal insufficiency: a possible role in glucocorticoid deficiency. *Scand J Gastroenterol* 50:347–354
40. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges SJ, Williams R, Jalan R (2003) Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 52:1182–1187
41. Bernal W, Jalan R, Quaglia A, Simpson K, Wendon J, Burroughs A (2015) Acute-on-chronic liver failure. *Lancet* 386:1576–1587
42. Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF (1990) Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 127:101–106
43. Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E (1991) Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 128:623–629
44. Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL et al (2003) Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem* 278:22771–22780
45. Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, Chen Z, Remaley AT, Stonik J, Eggerman TL et al (2002) Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect Immun* 70:2995–3003
46. Ettinger WH, Varma VK, Sorci-Thomas M, Parks JS, Sigmon RC, Smith TK, Verdery RB (1994) Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. *Arterioscler Thromb* 14:8–13
47. Cooper MS, Stewart PM (2003) Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 348:727–734
48. Harry R, Auzinger G, Wendon J (2002) The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 36:395–402
49. Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Germani G, Tsochatzis E, Thomas M et al (2012) Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review. *Hepatology* 55:1282–1291
50. Galbois A, Rudler M, Massard J, Fulla Y, Bennani A, Bonnefont-Rousselot D, Thibault V et al (2010) Assessment of adrenal

- function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 52:839–845
51. Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, Vanlemmens C et al (2011) Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver Int* 31:425–433
 52. Trifan A, Chiriac S, Stanciu C (2013) Update on adrenal insufficiency in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 19:445–456
 53. Harry R, Auzinger G, Wendon J (2003) The effects of supra-physiological doses of corticosteroids in hypotensive liver failure. *Liver Int* 23:71–77
 54. Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, Felipe V, Navasa M, Mas A, Lacy AM et al (2006) Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 44:1288–1295
 55. Arabi YM, Aljumah A, Dabbagh O, Tamim HM, Rishu AH, Al-Abdulkareem A, Knawy BA et al (2010) Low-dose hydrocortisone in patients with cirrhosis and septic shock: a randomized controlled trial. *CMAJ* 182:1971–1977
 56. Raevens S, Geerts A, Van Steenkiste C, Verhelst X, Van Vlierberghe H, Colle I (2015) Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: recent knowledge in pathogenesis and overview of clinical assessment. *Liver Int* 35:1646–1660
 57. Hoepfer MM, Krowka MJ, Strassburg CP (2004) Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome. *Lancet* 363:1461–1468
 58. Voiosu AM, Daha IC, Voiosu TA, Mateescu BR, Dan GA, Baicus CR, Voiosu MR et al (2015) Prevalence and impact on survival of hepatopulmonary syndrome and cirrhotic cardiomyopathy in a cohort of cirrhotic patients. *Liver Int*
 59. El Makarem MA, Elakad A, Ali A, Abd-Elkader M, Sayed AF, Taha A, Abd-Elrhman T (2011) Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictors in Egyptian cirrhotic patients. *Trop Gastroenterol* 32:25–30
 60. Rodriguez-Roisin R, Krowka MJ (2008) Hepatopulmonary syndrome—a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* 358:2378–2387
 61. Zhang M, Luo B, Chen SJ, Abrams GA, Fallon MB (1999) Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 277:G944–G952
 62. Arguedas MR, Drake BB, Kapoor A, Fallon MB (2005) Carboxyhemoglobin levels in cirrhotic patients with and without hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 128:328–333
 63. Zhang J, Luo B, Tang L, Wang Y, Stockard CR, Kadish I, Van Groen T et al (2009) Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 136:1070–1080
 64. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Zhang HJ, Kajimoto H et al (2011) A central role for CD68(?) macrophages in hepatopulmonary syndrome. Reversal by macrophage depletion. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1080–1091
 65. Gomez FP, Martinez-Palli G, Barbera JA, Roca J, Navasa M, Rodriguez-Roisin R (2004) Gas exchange mechanism of orthodeoxia in hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* 40:660–666
 66. Rodriguez-Roisin R, Krowka MJ, Herve P, Fallon MB (2004) Pulmonary-hepatic vascular disorders (PHD). *Eur Respir J* 24:861–880
 67. Arguedas MR, Singh H, Faulk DK, Fallon MB (2007) Utility of pulse oximetry screening for hepatopulmonary syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:749–754
 68. Abrams GA, Jaffe CC, Hoffer PB, Binder HJ, Fallon MB (1995) Diagnostic utility of contrast echocardiography and lung perfusion scan in patients with hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 109:1283–1288
 69. Lv Y, Fan D (2015) Hepatopulmonary syndrome. *Dig Dis Sci* 60:1914–1923
 70. Mimidis KP, Vassilakos PI, Mastorakou AN, Spiropoulos KV, Lambropoulou-Karatza CA, Thomopoulos KC, Tepetes KN et al (1998) Evaluation of contrast echocardiography and lung perfusion scan in detecting intrapulmonary vascular dilatation in normoxic patients with early liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 45:2303–2307
 71. Lv Y, Fan D (2015) Hepatopulmonary syndrome. *Dig Dis Sci* 60:1914–1923
 72. Swanson KL, Wiesner RH, Krowka MJ (2005) Natural history of hepatopulmonary syndrome: impact of liver transplantation. *Hepatology* 41:1122–1129
 73. Saigal S, Choudhary N, Saraf N, Kotecha H, Kakodkar R, Mohanka R, Rastogi A et al (2013) Excellent outcome of living donor liver transplantation in patients with hepatopulmonary syndrome: a single centre experience. *Clin Transpl* 27:530–534
 74. Pascasio JM, Grilo I, Lopez-Pardo FJ, Ortega-Ruiz F, Tirado JL, Sousa JM, Rodriguez-Puras MJ et al (2014) Prevalence and severity of hepatopulmonary syndrome and its influence on survival in cirrhotic patients evaluated for liver transplantation. *Am J Transpl* 14:1391–1399
 75. Goldberg DS, Krok K, Batra S, Trotter JF, Kawut SM, Fallon MB (2014) Impact of the hepatopulmonary syndrome MELD exception policy on outcomes of patients after liver transplantation: an analysis of the UNOS database. *Gastroenterology* 146(1256–1265):e1251
 76. Schenk P, Madl C, Rezaie-Majd S, Lehr S, Muller C (2000) Methylene blue improves the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 133:701–706
 77. Kianifar HR, Khalesi M, Mahmoodi E, Afzal Aghaei M (2012) Pentoxifylline in hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 18:4912–4916
 78. De BK, Dutta D, Pal SK, Gangopadhyay S, Das Bakshi S, Pani A (2010) The role of garlic in hepatopulmonary syndrome: a randomized controlled trial. *Can J Gastroenterol* 24:183–188
 79. Abrams GA, Fallon MB (1998) Treatment of hepatopulmonary syndrome with *Allium sativum* L. (garlic): a pilot trial. *J Clin Gastroenterol* 27:232–235
 80. Tsauo J, Weng N, Ma H, Jiang M, Zhao H, Li X (2015) Role of transjugular intrahepatic portosystemic shunts in the management of hepatopulmonary syndrome: a systemic literature review. *J Vasc Interv Radiol* 26:1266–1271