

**MECCANISMI SPECIFICI DI FIBROGENESI Ed**  
**ANALISI DI POSSIBILI PREDITTORI ISTOLOGICI/CLINICI**  
**DI EVOLUZIONE DEL DANNO**  
**IN SOGGETTI AFFETTI DA EPATITE ACUTA ALCOLICA (AH)**  
**ED INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA SU CRONICA (ACLF).**

**Dottoranda**

**Tutor**

**Dott.sa Chiara Mazzealli**

**Prof. Antonio Franchitto**

**Prof. Sergio Morini**

## **BACKGROUND**

### **Alcoholic liver disease (ALD) e alcoholic steatohepatitis (sAH)**

**La patologia epatica alcol-correlata (ALD)** costituisce una delle cause più comuni di cirrosi epatica e una delle più frequenti indicazioni al trapianto di fegato in Europa e nel Nord America <sup>1-3</sup>. Al momento non esistono terapie valide ed efficaci per il trattamento dei pazienti con ALD, se non il trapianto di fegato (LT). Negli ultimi anni i criteri di selezione per l'inserimento in lista dei pazienti con epatopatia alcol-correlata sono stati modificati superando la regola dei 6 mesi di astinenza pre-LT precedentemente introdotta nel tentativo di selezionare i pazienti con minor rischio di ricaduta del consumo alcolico post-LT <sup>4</sup>. L'efficacia di tale restrizione è stata da sempre contestata, poiché l'astinenza pre-LT non è un parametro accurato per selezionare e valutare la compliance dei pazienti. Le ultime linee guida di fatto non riportano più la necessità di attendere 6 mesi di astinenza prima dell'inserimento in lista per LT <sup>5 6 7</sup>.

Tra le possibili espressioni di epatopatia alcol correlata (ALD), occorre annoverare l'**epatite acuta alcolica (AH)**, caratterizzata dalla rapida insorgenza di segni di insufficienza epatica acuta (ALF), quali ittero, allungamento PT e/o ascite, ed elevata mortalità a breve termine. Il segno cardinale di AH è l'ittero progressivo, spesso associato a febbre (anche in assenza di infezione), malessere, calo ponderale e malnutrizione. Il profilo di laboratorio dell'AH rivela neutrofilia, iperbilirubinemia (>3 mg/dL), livelli sierici di AST superiori al doppio del limite superiore dell'intervallo normale, AST >50 UI/ml, sebbene raramente superiori a 300 UI/ml, con un AST/ALT ratio > di 1,5-2,0. Nelle forme gravi si osservano frequentemente tempo di protrombina prolungato, ipoalbuminemia e diminuzione della conta piastrinica. La diagnosi di AH si basa sui dati clinici (cioè sulla recente insorgenza di ittero) e sui tipici risultati di laboratorio menzionati in precedenza in un paziente con una storia di forte consumo di alcol negli ultimi 3 mesi. Il test di screening standard per il consumo dannoso di alcol è il test di identificazione dei disturbi da uso di alcol (AUDIT) <sup>8</sup>. La prevalenza dell'insufficienza epatica acuta su cronica (ACLF) nei pazienti con SAH varia dal 65 al 95 % <sup>9</sup>. L'AH è in gran parte una diagnosi clinica. Il National Institute for Alcohol Abuse e Alcolismo raccomandando criteri per una diagnosi di AH "probabile" senza la necessità di una biopsia per conferma della malattia nell'ambito dell'arruolamento in studi clinici (tabella 1), ma che può essere applicato anche alla pratica clinica <sup>10</sup>.

<b>Clinical criteria</b>	
Alcohol	Excessive alcohol consumption for $\geq 6$ months Men: >4 drinks (approx. 50–60 g alcohol)/day Women: >3 drinks (approx. 40 g alcohol)/day
Abstinence	< 60 days before onset of jaundice
Jaundice	< 8 weeks duration
<b>Laboratory criteria</b>	
Bilirubin	>3 mg/dL (50 $\mu$ mol/L)
AST UI/L	>50
AST/ALT ratio	>1,5
AST/ALT UI/L	Both <400
Other causes of liver disease excluded	Viral hepatitis, biliary obstruction, autoimmune liver disease and Wilson disease

Tabella 1. Criteri diagnostici per la diagnosi "probabile" di AH secondo i criteri NIAAA

Nel 2012 le linee guida EASL sul management dell'epatopatia alcolica consigliavano l'esecuzione di una biopsia epatica per la conferma diagnostica di AH; tuttavia, nel 2018 le linee guida aggiornate suggerivano l'esecuzione della biopsia "solo nei casi in cui c'è incertezza diagnostica" <sup>5</sup>. La biopsia epatica (da eseguire per via transgiugulare per ridurre il rischio di sanguinamento) può essere quindi utile per confermare la diagnosi, riducendo il rischio di errore diagnostico che si aggira intorno al 10-20%. <sup>11,12</sup> La biopsia epatica nei soggetti con sAH può essere utile anche per la valutazione della prognosi. Altamirano et al, hanno sviluppato uno score basato su parametri istopatologici predittivo della sopravvivenza a breve termine dei pazienti con AH <sup>13</sup>. I principali fattori analizzati sono stati lo stadio di fibrosi, la presenza di bilirubinostasi e megamitocondri e l'entità dell'infiltrato polimorfonucleato. La presenza di fibrosi avanzata è un fattore predittivo negativo di sopravvivenza. Tale dato non sorprende. Infatti, la fibrosi avanzata suggerisce una malattia epatica sottostante più grave e una scarsa risposta rigenerativa. Inoltre, influenza lo sviluppo di ipertensione portale e delle sue complicanze, quali ascite o sanguinamento. L'ipertensione portale e la conseguente aumentata permeabilità intestinale è associata allo sviluppo di infezioni batteriche e sepsi. Al contrario, l'infiltrazione neutrofila e la presenza di megamitocondri identificano i pazienti che presentano una migliore sopravvivenza. Le principali restrizioni sull'uso della biopsia epatica nella pratica clinica di routine sono l'accesso alla biopsia epatica transgiugulare, i rischi ed i costi della procedura. Pertanto, la decisione di eseguire la biopsia deve tenere conto della disponibilità della procedura e dell'esperienza del centro. La biopsia deve essere eseguita solo nei casi in cui vi sia incertezza diagnostica. In assenza di una biopsia epatica dovrebbero essere applicati criteri clinici e di laboratorio più rigorosi per evitare la diagnosi errata di epatite alcolica, in particolare tra i pazienti con cirrosi. <sup>10</sup>

L'incidenza di AH rimane in gran parte sconosciuta. Uno studio retrospettivo danese basato sui codici diagnostici ha rivelato un'incidenza crescente, da 37 casi/milione nel 1999 a 46 casi/milione nel 2008 negli uomini e 24 casi/milione che salgono a 34 casi/milione nelle donne.<sup>14</sup> Dati provenienti da uno studio scozzese hanno evidenziato che l'AH rappresenta il 12% di tutte i ricoveri ospedalieri per ALD e circa il 15% delle nuove diagnosi di ALD.<sup>15</sup> Sebbene il sesso femminile sia un fattore di rischio indipendente per ALD, l'AH è più frequente negli uomini. L'eccesso di peso è risultato essere fattore di rischio aggiuntivo per il possibile sviluppo di AH.<sup>16</sup> Sebbene non sia stata identificata una soglia chiara per la quantità di consumo di alcol, l'AH generalmente si verifica dopo decenni di consumo intenso di alcol (> 80 g/giorno).<sup>17</sup>

L'epatite acuta alcolica è una condizione con prognosi spesso infausta nei primi 3 mesi dal suo esordio; l'efficacia della terapia medica, soprattutto con corticosteroidi, è molto dibattuta e la mortalità a sei mesi raggiunge il 75% nei pazienti non responsivi a terapia steroidea e/o di supporto.<sup>18,19</sup> La severità e gravità della malattia è valutata tramite lo score di Maddrey. Uno score > 32 è suggestivo di epatite alcolica acuta severa (sAH).<sup>20</sup> Nella tabella 2 sono riportate le principali indicazioni del management clinico dei pazienti con AH.

Alcohol abstinence
Avoid diuretics and other nephrotoxic drugs to reduce the risk of acute kidney injury
Broad-spectrum antibiotics were promptly started in patients with suspected infection and antibiotic changes according to microbiological results were made when appropriate
Nutritional support to provide adequate protein and calories was tailored according to baseline nutritional status and administered preferably by enteral route. All patients received thiamine; other vitamins deficiencies were tested and supplemented when needed.
Treatment of complications of alcohol related cirrhosis including ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatic encephalopathy and variceal bleeding
Corticosteroids should not be administered when active infection or gastrointestinal bleeding, were present or in case of high MELD.

Tabella 2. Misure generali del management clinico dei pazienti con AH.

Storicamente, l'AH è sempre stata considerata come secondaria ad un flare infiammatorio epatitico; da qui, l'indicazione clinica ad utilizzo di farmaci antinfiammatori (steroidi o pentossifillina) che hanno però dimostrato una efficacia estremamente limitata nella pratica clinica.<sup>21</sup> In particolare, la pentossifillina non ha un vantaggio nell'influenzare la sopravvivenza dei pazienti con sAH, mentre il prednisolone è associato ad una lieve riduzione della mortalità a 28 giorni, ma non a quella a lungo termine (90 giorni).<sup>22</sup>

Nei pazienti con sAH trattati con corticosteroidi, il Lille score identifica i responder alla terapia medica che mostrano un rapido miglioramento della funzionalità epatica. È possibile indentificare 3 gruppi di pazienti in base alla risposta a 7 giorni mediante il Lille score: responder completi (punteggio Lille  $\leq 0,16$ ), responder parziali (punteggio Lille  $0,16-0,56$ ) e null responder (punteggio Lille  $\geq 0,56$ ). È raccomandato dai vari studi clinici la sospensione dei corticosteroidi nei pazienti null-responder al settimo giorno di terapia.<sup>23</sup> Questa categoria di pazienti ha un tasso di mortalità estremamente elevato (80% di rischio di morte prematuro).<sup>19</sup> La figura 1 riassume l’algoritmo gestionale dei pazienti con sAH.

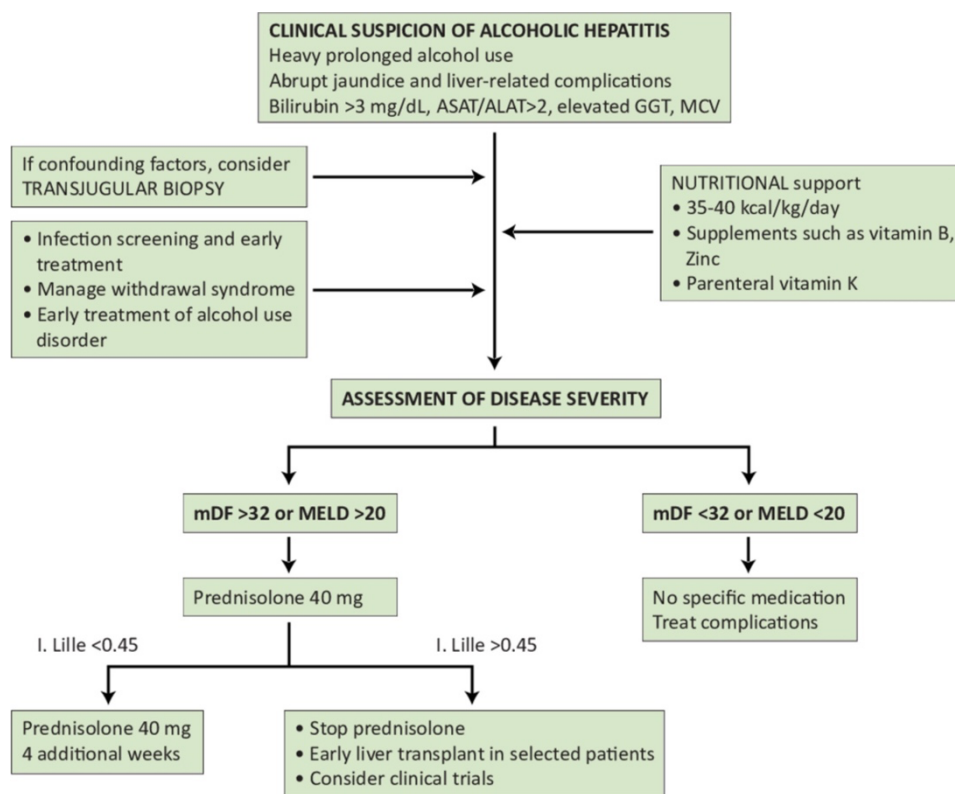


Figura 1. Algoritmo gestionale dell’epatite acuta alcolica (da Avila M. Recent advances in alcohol-related liver disease. Gut 2020; 69:764–780).

### Liver transplantation (LT) come opzione terapeutica dei pazienti con SAH

Una survey condotta nel 2015 ha osservato che solo un terzo dei centri trapianti (12 di 45 centri trapianto) inseriva in lista per LT pazienti con SAH.<sup>24</sup> Per questioni etiche legate al rischio di recidivismo post-trapianto, l'appropriatezza del trapianto di fegato, in pazienti affetti da tale eziologia, rimane tuttora controversa e dibattuta. Infatti, sinora, pochi studi hanno valutato i risultati del LT nella SAH. Il primo studio, pubblicato da Mathurin sul *New England Journal of Medicine* nel 2011, includeva 26 pazienti con SAH come primo evento di scompenso, sottoposti a terapia medica con corticosteroidi senza risposta e con criteri istologici di SAH, arruolati presso 7 centri trapianto in Europa. La selezione per l'inserimento in lista comprendeva 4 successivi livelli di valutazione operati indipendentemente dai curanti. La sopravvivenza a 6 mesi e 2 anni nel gruppo dei pazienti sottoposti a LT era rispettivamente del 77+/- 8% e 71 +/- 9% vs 23+/- 8% nel gruppo controllo proveniente dalla coorte storica di uno dei centri partecipanti. In totale le morti osservate nel gruppo LT furono 6, in 5 casi per infezione post-trapianto. Le recidive di consumo alcolico sono state 3 durante un periodo di follow-up di 2 anni (nessuna recidiva nei primi 3 mesi); tali tassi risultano pressoché sovrapponibili a quelli osservati nella popolazione di pazienti cirrotici trapiantati dopo almeno 6 mesi di astinenza.<sup>25</sup> Uno studio successivo di Lee et al pubblicato nel 2017, ha comparato l'outcome del LT in pazienti con SAH come primo episodio di scompenso vs pazienti cirrotici con almeno 6 mesi di astinenza pre-LT riscontrando a 6 mesi una sopravvivenza del 100% nel primo gruppo e dell'89% nel secondo; i tassi di recidiva del consumo alcolico erano sostanzialmente sovrapponibili nei due gruppi (23,5 vs 29,2%), sebbene più spesso nel gruppo dei soggetti con SAH si configurasse un uso pericoloso post-OLT.<sup>26</sup> Recentemente gli stessi autori hanno riportato i risultati di uno studio retrospettivo che ha coinvolto 12 centri trapianto negli Stati Uniti raccogliendo 47 casi di LT per SAH effettuati dal 2006 al 2017 (26 di essi già riportati in precedenti pubblicazioni). In questa coorte la sopravvivenza dei pazienti trapiantati è risultata rispettivamente del 94% ad 1 anno e dell'84% a 3 anni; la recidiva alcolica post-LT invece ha raggiunto il 10% nel primo anno ed il 17% a 3 anni.<sup>27</sup> Sebbene entrambi gli studi sostengano l'efficacia del LT precoce nella SAH la sopravvivenza ad 1 anno osservata varia significativamente; la differenza è stata spiegata con l'inclusione nel secondo studio esclusivamente di pazienti sottoposti a terapia corticosteroidica; l'elevato numero di morti correlate ad infezione nel post-LT riportate nello studio rafforza i dubbi relativi all'utilità/rischio del trattamento steroideo in questi pazienti.<sup>27</sup> Hanno inoltre descritto un rischio aggiuntivo di mortalità alcol-relata, soprattutto nei pazienti con ripresa di abuso del potus post-LT. Un recente studio italiano multicentrico ha dimostrato che la sopravvivenza (a 6, 12 e 24 mesi) dei pazienti sottoposti a LT per SAH era significativa più alta (100%) rispetto ai soggetti non sottoposti a LT (45%, 45% e 36%). Solo 2/16 (12.5%) dei pazienti hanno presentato recidiva di assunzione alcolica significativa post-LT. La

selezione dei candidati è fondamentale per ridurre il rischio di recidivismo e quindi l'eventuale perdita del graft post-LT. <sup>28</sup>

### Acute on chronic liver failure

**L'acute on Chronic Liver Failure (ACLF)** è una sindrome clinica caratterizzata da acute decompensation (AD), organ failure (OF) ed elevata mortalità a breve termine (fino al 50% dei pazienti). Per elevata mortalità a breve termine si intende un tasso di mortalità a 28 giorni  $\geq 15\%$ . Per AD si intende comparsa di ittero, ascite, encefalopatia epatica (HE), emorragia gastrointestinale e/o infezioni batteriche. L'ACLF si può sviluppare in pazienti con o senza precedenti episodi di AD. La valutazione degli OF (brain, kidney, liver, coagulation, circulatory and respiratory) viene eseguita mediante il CLIF-SOFA score (la scala di valutazione dell'insufficienza d'organo sequenziale adattata per i pazienti con epatopatia cronica) o attraverso la sua versione semplificata, CLIF Organ Failure (Figura 2). <sup>29-31</sup>

L'ACLF rappresenta una complicanza estremamente seria nei pazienti con epatopatia cronica, con una prevalenza nelle popolazioni a rischio tra il 20% e il 35%. Il tasso di mortalità riportato secondo la definizione del EASL-CLIF Consortium varia tra il 30% e il 50% ed è strettamente correlato al numero di OFs. <sup>30</sup> È ormai accertato che la presenza di disfunzione renale (definita da una concentrazione di creatinina sierica di 1,5-1,9 mg/dL) e/o di disfunzione cerebrale (HE di grado 1-2), se associate ad altra OF, influenzano negativamente la prognosi.

Organ/system	Subscore = 1	Subscore = 2	Subscore = 3
Liver	Bilirubin <6 mg/dl	Bilirubin $\geq 6$ mg/dl and <12 mg/dl	Bilirubin $\geq 12$ mg/dl
Kidney	Creatinine <2 mg/dl	Creatinine $\geq 2$ mg/dl and <3.5 mg/dl	Creatinine $\geq 3.5$ mg/dl or renal replacement
Brain (West-Haven grade for HE*)	Grade 0	Grade 1-2	Grade 3-4**
Coagulation	INR <2.0	INR $\geq 2.0$ and <2.5	INR $\geq 2.5$
Circulatory	MAP $\geq 70$ mmHg	MAP <70 mmHg	Use of vasopressors
Respiratory			
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	>300	$\leq 300$ and >200	$\leq 200^{\#}$
or	or	or	or
SpO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	>357	>214 and $\leq 357$	$\leq 214^{\#}$

Figura 2. Clif organ failure score system.

Sulla base della presenza di disfunzione renale e/o cerebrale e del rischio di mortalità a breve termine, in base ai dati dello studio Canonic, sono stati identificati i seguenti gruppi di rischio:

- No ACLF: no OF o un singolo OF (no disfunzione renale e/o disfunzione cerebrale)
- ACLF grado 1 (ACLF-1): singola insufficienza renale e singola OF non renale associata a disfunzione renale e/o disfunzione cerebrale.
- ACLF grado 2 (ACLF-2): due OF di qualsiasi combinazione
- ACLF grado 3 (ACLF-3): tre o più OF di qualsiasi combinazione

Secondo lo studio Canonic, le OFs più frequentemente riscontrate nei pazienti con ACLF sono insufficienza renale (56% dei pazienti), iperbilirubinemia (44%), coagulazione (28%), encefalopatia (24%), disfunzione cardiocircolatoria (17%) ed insufficienza respiratoria (9%). L'insufficienza renale è l'OF più frequente nei pazienti con ACLF-1. Per i pazienti con ACLF-2, l'insufficienza epatica è l'OF maggiormente registrata, seguita da insufficienza renale, cerebrale e coagulazione. Nei pazienti con ACLF-3, la prevalenza di tutti gli OFs è frequente.<sup>32</sup> La maggior parte dei dati epidemiologici sull'ACLF provengono dai dati del Canonic study. Circa il 23% dei pazienti cirrotici, ricoverati in ospedale per un episodio di AD (ascite, ittero o sanguinamento), presentavano ACLF al momento del ricovero. Inoltre, 11% dei pazienti senza ACLF all'ingresso in reparto, manifestava lo sviluppo della sindrome durante il ricovero. In questo modo il tasso di prevalenza totale di ACLF è circa del 31%. Tra i pazienti con ACLF, il 51% presentava un ACLF-1, il 35% un ACLF-2 e il 13% un ACLF-3. I tassi di mortalità medi a 28 e 90 giorni senza trapianto di fegato (LT) erano rispettivamente dell'1,9% e del 10% nei pazienti con AD senza ACLF e del 33% e 51% nei pazienti con ACLF (Tabella 3).

<b>Categoria</b>	<b>Mortalità a 28 giorni w/out LT</b>	<b>Mortalità a 90 giorni w/out LT</b>
<b>No ACLF</b>	1.9%	10%
<b>ACLF (any grade)</b>	33%	51%
<b>ACLF-1</b>	23 %	41%
<b>ACLF-2</b>	31 %	55%
<b>ACLF-3</b>	74 %	78%

Tabella 3. ACLF e rischio di mortalità senza LT

Nella maggior parte dei casi, lo sviluppo di ACLF è associato a un fattore precipitante. Gli eventi precipitanti più comuni sono infezioni batteriche, etilismo attivo e riattivazione dell'HBV, in particolare nei pazienti provenienti dal Sud-Est Asiatico. Nello studio CANONIC, l'abuso di alcol rappresentava circa il 25% delle cause di ACLF. Tuttavia, in circa il 40% dei pazienti, non è possibile identificare alcun fattore



precipitante. Lo studio CANONIC ha dimostrato che la mortalità era indipendente dal tipo di fattore precipitante ed era correlata ad altri fattori come il tipo e il numero di OFs, l'intensità della risposta infiammatoria e il decorso clinico precoce della sindrome.<sup>32</sup> In circa un terzo dei pazienti con ACLF, l'evento scatenante la sindrome è stato un episodio infettivo batterico. Le infezioni nosocomiali e le infezioni da germi multi-resistenti sono associate a un rischio più elevato di ACLF rispetto alle infezioni acquisite in comunità. Le infezioni batteriche tendono a causare ACLF più frequentemente nei pazienti senza una precedente storia di AD rispetto ai pazienti con precedente scompenso. La gravità dell'infezione influenza il rischio di sviluppare ACLF ed è un fattore indipendente di mortalità a 90 giorni nei pazienti con ACLF.<sup>33</sup>

L'ACLF è una sindrome straordinariamente dinamica, potenzialmente reversibile. In circa la metà dei pazienti, l'ACLF si risolve oppure migliora (passando ad una classe inferiore). La frequenza della risoluzione dell'ACLF è maggiore nei pazienti che avevano all'esordio ACLF-1 e bassa in quelli con ACLF-3. Nel complesso, il tasso di mortalità senza trapianto a 28 giorni è trascurabile nei pazienti con risoluzione dell'ACLF (5,8%), moderato in quelli con ACLF-1 finale (18,2%), alto in quelli con ACLF-2 finale (41,7%) e molto alto in quelli con ACLF-3 finale (91,8%), indipendentemente dal fatto che si presentassero con ACLF-1, -2 o -3 alla diagnosi.<sup>34</sup> Inoltre, i pazienti con consumo di alcol attivo presentano maggiormente ACLF di grado 2 e 3 rispetto ad altri pazienti. In una coorte prospettica di pazienti con sAH, l'incidenza cumulativa di morte nei pazienti a 28 giorni senza ACLF o con ACLF gradi 1, 2 o 3 era del 10%, 31%, 58% e 72%, rispettivamente.<sup>35</sup> In una coorte belga di pazienti affetti da sAH, la probabilità di risposta ai corticosteroidi utilizzando il modello di Lille è ridotta nei pazienti con ACLF (77% per i pazienti con sAH e senza ACLF, 52% per ACLF-1, 42 % per ACLF-2 e 8% per ACLF-3).

Attualmente, la strategia accettata per la gestione dell'ACLF consiste nel riconoscimento e nel trattamento precoce dell'evento precipitante e nella terapia di supporto con eventuale monitoraggio intensivo e sostitutivo in caso di OFs.<sup>36,37</sup> Per consentire la stratificazione in termini di gravità dei pazienti al fine di valutare precocemente un eventuale LT di salvataggio o al contrario la futilità di ulteriori cure intensive, i ricercatori CANONIC hanno sviluppato e convalidato due punteggi prognostici: lo score CLIF-C ACLF per pazienti con ACLF e lo score AD CLIF-C per i pazienti con AD.<sup>31,38</sup> Questi due punteggi sono stati progettati perché un singolo punteggio era insufficiente per delineare in modo soddisfacente la prognosi associata ad AD e ACLF. I punteggi CLIF-C ACLF e AD hanno fornito una stima significativamente migliore del rischio di morte rispetto al MELD score (Model for End-Stage Liver Disease), al MELD-Sodium score ed al Child-Pugh score. Per questo motivo, l'utilizzo del solo Meld score per l'eventuale allocazione ed urgenza del trapianto svantaggia gravemente il paziente con ACLF.<sup>31</sup> I punteggi specifici per ACLF sono più accurati nel predire gli outcome a breve termine rispetto al MELD score e dovrebbero essere utilizzati per avvantaggiare l'allocazione degli organi nei soggetti

con ACLF. In caso di presenza di controindicazioni al trapianto, la presenza di  $\geq 4$  OFs o un punteggio CLIF-C ACLF  $>70$  dopo 3-7 giorni dalla diagnosi potrebbe indicare la futilità ed inutilità delle cure<sup>34</sup>

### **Liver transplantation (LT) nel trattamento dei pazienti con ACLF**

LT rappresenta l'unica opzione terapeutica risolutiva e definitiva per i pazienti con ACLF. Sembra oramai esserci un chiaro accordo in letteratura riguardo al vantaggio in termini di sopravvivenza di eventuale LT urgente nei pazienti con ACLF. Tuttavia, è oramai ampiamente dimostrato che alcuni pazienti, in particolare quelli con ACLF3 ed insufficienza respiratoria, hanno risultati meno positivi in termini di sopravvivenza.<sup>39,40</sup>

### **Fisiopatologia del danno nell'epatite acuta alcolica e nell'ACLF**

Visto l'elevata mortalità dei pazienti con epatite acuta alcolica e con ACLF, l'identificazione dei meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo di ALF è assolutamente necessaria per poter procedere poi allo sviluppo di specifiche terapie target. Tuttavia, gli studi clinici che hanno esplorato le basi fisiopatologiche ed i fattori traslazionali coinvolti nello sviluppo delle AH sono estremamente limitati, in parte legati alla difficoltà di ricreare modelli animali con caratteristiche istopatologiche simili a quelle della AH ed in parte legati alla difficoltà di raccogliere campioni biologici da pazienti con AH.<sup>41</sup> La maggior parte degli studi che indagano la patogenesi della malattia epatica alcolica sono stati condotti su modelli animali. Tuttavia, i modelli animali attualmente disponibili inducono solo un lieve danno epatico senza lo sviluppo di insufficienza epatica, che è al contrario un elemento chiave nell'influenzare negativamente la prognosi. Inoltre, i modelli esistenti non imitano i principali determinanti istologici di prognosi sfavorevole nell'AH (cioè, fibrosi grave e bilirubinostasi).<sup>13</sup> Non sorprende quindi che lo sviluppo di target terapeutici sulla base dei pattern molecolari identificati nei modelli animali si sia dimostrato inefficace poi in vivo. Ad esempio, i modelli animali hanno persistentemente evidenziato un ruolo chiave del tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nello sviluppo del danno epatico indotto dall'alcol. Tuttavia, è stato dimostrato che il blocco del TNF- $\alpha$  nei pazienti con sAH determina un aumento della mortalità, secondario ad un incremento del rischio infettivo e ad una inadeguata rigenerazione epatocellulare.<sup>42</sup> Questi risultati negativi suggeriscono la necessità di eseguire studi clinici su campioni umani di pazienti con AH al fine di identificare i principali driver cellulari e molecolari nella patogenesi della malattia. Nel contesto specifico della sAH, gli studi

traslazionali sono ostacolati anche dal fatto che la quantità di tessuto epatico ottenuta mediante biopsia transgiugulare è esigua. Ciò comporta ovviamente una limitazione nel tipo di studi clinici potenzialmente eseguibili, che sono quindi ristretti agli studi di immunistochemica e di espressione genica. La fisiopatologia dell'ALD è estremamente complessa e gli elementi chiave sono legati in primo luogo agli effetti diretti dell'etanolo e dei suoi metaboliti sul fegato e su altri organi e, in secondo luogo, all'attivazione delle cellule immunitarie e all'infiammazione innescata dagli effetti dell'alcol. Metabolizzare alte concentrazioni di alcol si traduce non solo nella produzione di acetaldeide, che ha effetti tossici cellulari diretti, ma anche nella produzione di specie reattive dell'ossigeno che alterano il trasporto di energia mitocondriale e di numerose vie di segnalazione intracellulare.<sup>43</sup> Alterando la normale omeostasi cellulare, l'alcol induce stress del reticolo endoplasmatico (ER) con danno ossidativo a livello mitocondriale e lisosomiale. L'effetto diretto dell'alcol e dei suoi principali metaboliti negli epatociti provocano uno stress ossidativo a livello dell'ER, responsabile poi della fosforilazione e della attivazione dell'Interferon Regulatory Factor 3.<sup>44</sup> Oltre ad essere coinvolto nell'induzione dell'interferone di tipo 1, la fosforilazione dell'IRF3 interagisce con le molecole apoptotiche mitocondriali, portando così al danno degli epatociti e al rilascio di pattern molecolari associati al danno (DAMPs) come acido urico ed ATP.<sup>45,46</sup> È stato inoltre dimostrato che l'attivazione innata del sistema immunitario è un elemento fondamentale nella fisiopatologia dell'ALD e in particolare nella sAH, in quanto l'attivazione dei macrofagi residenti e la produzione di citochine pro-infiammatorie influenzano la gravità della malattia, i sintomi clinici e la prognosi dei pazienti. L'infiltrazione parenchimale di neutrofili e macrofagi è una caratteristica importante dell'ALD ed è probabilmente dovuta all'attivazione dell'immunità innata mediata dall'etanolo e alla successiva induzione di citochine e chemochine proinfiammatorie. Il consumo di alcol sovraregola una varietà di fattori che attivano le cellule di Kupffer, le cellule stellate e gli epatociti, con conseguente produzione di citochine e chemochine. L'esposizione all'alcol diminuisce anche l'attività del proteosoma ed eleva l'espressione di IL-8 negli epatociti. Inoltre, i ROS e i vari antigeni proteici, prodotti dal danno ossidativo a livello epatocellulare, fungono da antigeni nella risposta immunitaria adattativa, con conseguente accumulo di cellule T e B nel fegato. La figura 3 riassume i meccanismi alla base dell'attivazione del processo di infiammazione nei soggetti con ALD.

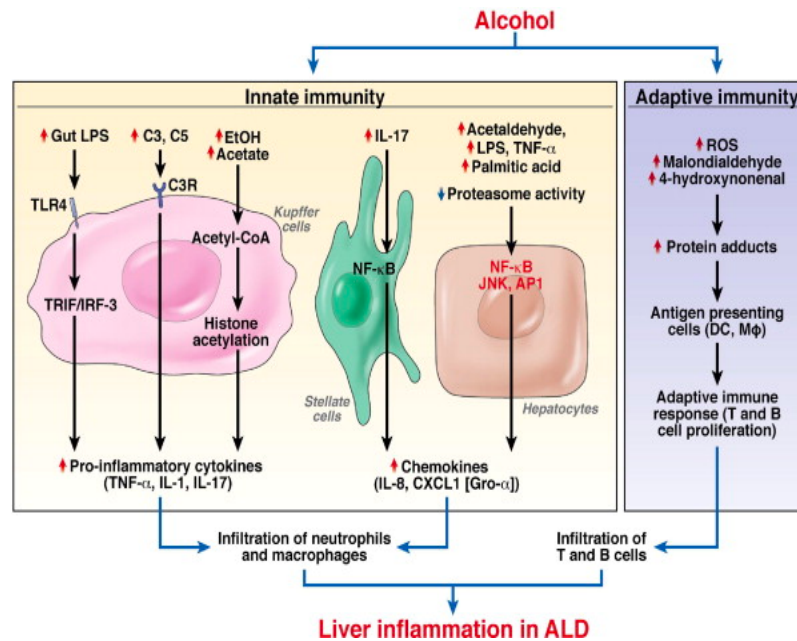


Figura 3. Meccanismi alla base dell'inflammatione nella ALD (da Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. Gastroenterology. 2011 Nov;141(5):1572-85.

L'alcol danneggia anche l'intestino a più livelli. Innanzitutto, l'ALD è responsabile della modifica del microbiota intestinale. L'importanza della disbiosi intestinale per lo sviluppo dell'ALD è stata dimostrata dal trasferimento del microbiota fecale in modelli animali. Topi trapiantati con feci di pazienti con sAH sviluppano una malattia epatica più grave rispetto ai topi trapiantati con feci di pazienti con malattia meno grave.<sup>47</sup> Nelle fasi iniziali di ALD, è presente un "overgrowing" batterico a livello della mucosa e del lume intestinale.<sup>48</sup> I cambiamenti del microbiota dipendono dallo stadio della malattia epatica; infatti, i pazienti con malattia precoce hanno una composizione del microbiota diversa rispetto ai pazienti con ALF o AH.<sup>49</sup> Sebbene sia presente una aumentata permeabilità intestinale in circa il 50% dei pazienti con ALD in stadio iniziale di malattia epatica, la disfunzione delle tight-Junction cellulari è più comune nei pazienti con cirrosi epatica o sAH.<sup>50</sup> L'alcol influisce sulla permeabilità intestinale anche con altri meccanismi, tra cui l'interruzione del ritmo circadiano e un effetto diretto del metabolita acetaldeide sulle tight-Junction.<sup>51</sup> La traslocazione di prodotti microbici, come LPS batterico o  $\beta$ -D-glucano fungino, e/o di batteri vitali sono requisito fondamentale per lo sviluppo della malattia epatica indotta da etanolo in modelli preclinici. La traslocazione microbica contribuisce all'inflammatione epatica, alla lesione degli epatociti e alla fibrosi. Nei pazienti con ALD o sAH, la traslocazione batterica contribuisce all'inflammatione sistemica, allo scompenso epatico ed aumenta la mortalità.<sup>50</sup> La disbiosi intestinale contribuisce all'ALD non solo attraverso la traslocazione microbica. I cambiamenti nel metabolismo microbico interessano anche altri metabolismi intestinali,

come quello degli acidi biliari, degli acidi grassi a catena corta, degli acidi grassi saturi a catena lunga, dei derivati dell'indolo.<sup>52-55</sup>

È stato inoltre dimostrato che in soggetti con ALD, la potenza antibatterica delle cellule T associate alla mucosa (MAIT) è ridotta a causa del contatto con prodotti microbici e della alterazione del microbiota. Quindi, l'aumentata permeabilità intestinale descritta nei pazienti con ALD è responsabile anche della disfunzione delle cellule MAIT, causando così anche un aumento del rischio infettivo.<sup>56</sup> La figura 4 riassume il contributo del microbiota intestinale nella fisiopatologia dell'ALD. L'overgrowing batterico ed i cambiamenti nella composizione del microbiota batterico e fungino dovuti all'uso cronico di alcol insieme all'infiammazione della parete intestinale e alla ridotta espressione di tight-junction a livello delle cellule intestinali determinano una maggiore permeabilità intestinale consentendo ai pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) come LPS e DNA batterico di entrare nel circolo portale e nella circolazione sistemica.<sup>43</sup>

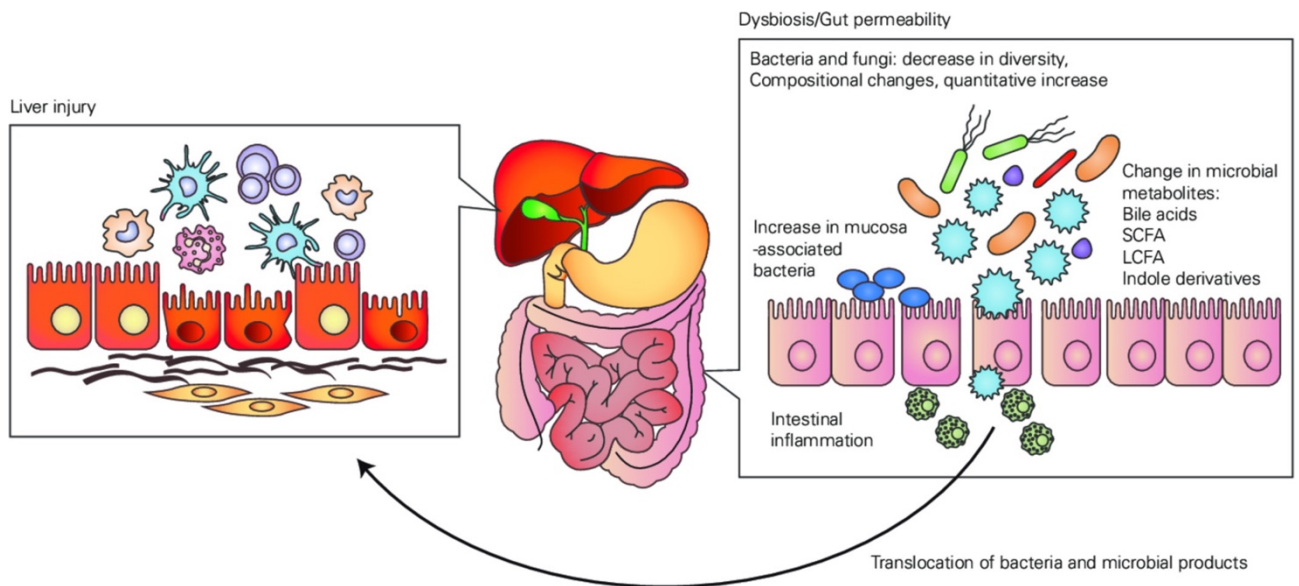


Figura 4. Ruolo del microbiota nella fisiopatologia della ALD (da Avila M. Recent advances in alcohol-related liver disease. Gut 2020; 69:764-780).

I PAMPs sono rilevati da diversi recettori presenti sulle superfici cellulari o intracellulari con conseguente attivazione di pathway intracellulari pro-infiammatori. Diversi recettori Toll-like (TLR) sono coinvolti nel riconoscimento dei PAMPs e dei DAMPs. Ad oggi, 11 TLR sono stati identificati nell'uomo. I TLR riconoscono le molecole derivate da agenti patogeni, come i componenti strutturali

esclusivi di batteri, virus, parassiti e funghi, e attivano la produzione di citochine infiammatorie e di interferone di tipo I (IFN). I TLR sono espressi sulla superficie delle cellule immunitarie, come i macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule epiteliali. Il TLR4 è espresso sulla superficie delle cellule di Kupffer e di vari altri tipi di cellule che trasmettono segnali di endotossine. Il LPS è il ligando di TLR4 e il cluster di differenziazione 14 (CD14), un componente del sistema immunitario innato, lega LPS e successivamente lo presenta a TLR4, portando all'attivazione della via pro-infiammatoria comune del NF- $\kappa$ B ed attivando la produzione di varie citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-6 e pro-IL-1 $\beta$ , le quali sono responsabili del danno epatocitario, dell'attivazione del processo di fibrogenesi e dell'inibizione della rigenerazione cellulare.<sup>57</sup> Queste vie intracellulari sono attivate principalmente nei macrofagi reclutati e nelle cellule di Kupffer residenti, attivate dallo stress ossidativo. I livelli ematici di LPS nei pazienti con AH all'esordio di malattia sono associati alla risposta alla terapia steroidea, alla mortalità ed al rischio di MOF.<sup>58</sup> Studi preclinici indicano che le strategie che interrompono l'attivazione della cascata infiammatoria possono avere benefici in ALD e AH. Ad esempio, l'inibizione della via dell'IL-1 con la somministrazione dell'antagonista del recettore dell'IL-1 anakinra riduce la steatosi indotta dall'alcol, il danno epatico, l'infiammazione e la fibrosi precoce nei topi.<sup>59</sup> Anakinra, l'antagonista del recettore del IL-1 e canakinumab, il monoclonale specifico dell'IL-1 $\beta$ , sono attualmente in fase di sperimentazione per il trattamento dei soggetti con sAH.

I principali meccanismi coinvolti nel processo di fibrogenesi sono riassunti nella figura 5.

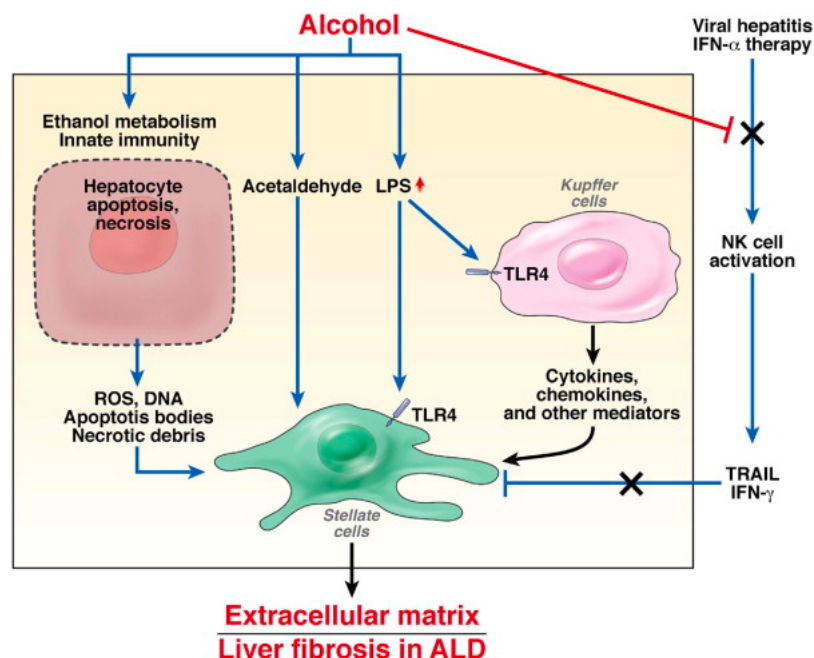


Figura 5. Meccanismi di fibrogenesi in pazienti con ALD (da Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. Gastroenterology. 2011 Nov;141(5):1572-85)

Il consumo cronico di alcol provoca, come già precedentemente illustrato, danno diretto agli epatociti, con conseguente rilascio di una varietà di mediatori e alla successiva attivazione delle cellule stellate di Ito. L'acetaldeide prende di mira direttamente le cellule stellate ed altera l'espressione e la produzione di collagene in queste cellule. L'aumentata permeabilità intestinale e la disregolazione del sistema immunitario a livello intestinale è responsabile dell'aumento delle concentrazioni di LPS a livello epatico. Il LPS stimola direttamente l'attivazione delle cellule stellate tramite l'up-regolazione della segnalazione del TGF- $\beta$  e promuove indirettamente l'attivazione delle cellule stellate tramite la via del LPS/TLR4 espresso sulle cellule del Kupffer per rilasciare citochine e chemochine profibrotiche. Infine, il consumo di alcol sopprime gli effetti anti-fibrotici delle cellule NK e dell'IFN- $\gamma$ , promuovendo così la fibrosi epatica. Le citochine sono molecole mediatrici dell'infiammazione che svolgono un ruolo importante nella patogenesi di molte epatopatie acute e croniche.<sup>60</sup> Un'ampia gamma di citochine è stata valutata in campioni di pazienti con ALD, come il TNF- $\alpha$  e varie interleuchine (IL) come IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 e interferone (IFN)- $\gamma$ . Il TNF- $\alpha$  è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica ed è un membro di una famiglia di citochine che stimola l'infiammazione acuta. Il TNF- $\alpha$  è prodotto principalmente dalle cellule di Kupffer nel fegato ed è stato dimostrato essere un importante mediatore dell'infiammazione, della proliferazione cellulare e dell'apoptosi e nella progressione del danno nei soggetti con ALD.<sup>61,62</sup> Le cellule di Kupffer secernono citochine infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno, che attivano epatociti, HSC e cellule endoteliali.<sup>63,64</sup>

Nei pazienti con AH, le citochine infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-18 inducono danno epatico.<sup>65</sup> Ad esempio, i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-6 possono essere utilizzati per differenziare i pazienti con cirrosi alcolica compensata da quelli con cirrosi scompensata.<sup>66</sup> Inoltre, i livelli di TNF- $\alpha$  sono più elevati nei soggetti con ALD e fibrosi avanzata rispetto ai soggetti con ALD senza cirrosi e sono correlati al rischio di mortalità.<sup>67</sup> Dopo il consumo cronico di alcol, le cellule di Kupffer mostrano una maggiore sensibilità alla produzione di TNF- $\alpha$  stimolata da LPS.<sup>68</sup> In modelli animali, l'uso di farmaci anti-TNF- $\alpha$ , come pentossifillina e infliximab, si è dimostrato efficace nel trattamento con AH. Tuttavia, tale dato non è stato dimostrato in studi randomizzati controllati.<sup>69</sup> I livelli di fattore di crescita trasformante (TGF)- $\beta$  sono estremamente elevati nei pazienti con fibrosi più avanzata, indipendentemente dall'eziologia della malattia epatica.<sup>70</sup> L'IL-6 sembra avere alcuni effetti benefici sul fegato, probabilmente proteggendo dall'apoptosi degli epatociti e partecipando alla riparazione del DNA mitocondriale in seguito a danno epatico alcolico.<sup>71</sup> L'IL-10 è una citochina antinfiammatoria, prodotta dalle cellule di Kupffer e dai linfociti epatici, che controlla la produzione endogena di TNF- $\alpha$  durante l'endotossitemia e riduce la stimolazione dell'LPS quando viene aggiunta per via esogena.<sup>72</sup> IL-10 stimola la produzione di IL-6 e di TNF- $\alpha$  ed esercita anche un effetto epatoprotettivo sulla proliferazione epatica e sulla fibrosi.<sup>73</sup> È stato recentemente dimostrato, che l'IL-10 può avere un duplice ruolo nel processo di fibrogenesi. Da un lato, l'IL-10 inibisce il rilascio di citochine pro-

infiammatorie come LPS, TNF- $\alpha$ , IL-6, riducendo conseguentemente steatosi e danno epatico; dall'altro, l'IL-10 blocca la produzione di IL-6, stimolando il danno epatico. L'effetto finale dell'IL-10 sul danno epatico e sulla steatosi è determinato da un complesso equilibrio tra citochine pro-infiammatorie che promuovono il danno epatico e quelle epatoprotettive che lo prevengono.<sup>74</sup> L'astinenza dalle bevande alcoliche influenza anche i livelli di citochine circolanti. È stato riscontrato che la citochina pro-infiammatoria IL-6 diminuisce progressivamente nei soggetti sottoposti a disintossicazione dall'alcol. Dubuquay et al, hanno dimostrato che i soggetti con sAH presentano livelli di citochine proinfiammatorie come TNF- $\alpha$  e IL-6 simili a quelli dei soggetti cirrotici, in astinenza da alcol da > 6 mesi.<sup>41</sup> Questo dato è estremamente importante in quanto ci permette di evidenziare l'esistenza di difetti nel pathway molecolare della rigenerazione epatica nei soggetti responder e non-responder a trattamento medico. La ridotta espressione di TNF- $\alpha$  e IL-6 nel parenchima epatico di pazienti con sAH può spiegare, almeno in parte, l'impatto deleterio di terapie anti-TNF- $\alpha$  in pazienti di studi randomizzati e controllati con grave AH a differenza di quanto osservato in modelli animali.<sup>68,75</sup> IL-8, una chemochina prodotta da una varietà di cellule tra cui monociti, macrofagi, cellule di Kupffer ed epatociti, ed è un mediatore chiave nel reclutamento e chemotassi dei neutrofili.<sup>76,77</sup> Nei pazienti con ALD si osserva frequentemente neutrofilia periferica e infiltrazione di neutrofili nel fegato.<sup>60</sup> I pazienti con un'elevata IL-8 sierica hanno un tasso di mortalità più elevato rispetto a quelli con livelli più bassi. I livelli sierici di IL-8 si riducono gradualmente con l'astinenza dall'alcol. È stato dimostrato che i soggetti con sAH presentano livelli maggiori di IL-8, rispetto ai soggetti con cirrosi alcol-correlata, conseguentemente ad un processo di danno acuto persistentemente attivo. È assodato che nelle forme severe con progressione verso l'insufficienza epatica della malattia, i mediatori dell'infiammazione sembrano essere meno importanti del previsto. Al contrario, un deficit sostanziale nella capacità degli HPC di differenziarsi in epatociti appare cruciale, così come un deficit nella replicazione degli epatociti stessi.<sup>78</sup>

Nel setting di un danno epatico acuto, il parenchima epatico cerca di ristabilire e recuperare una normale funzione attraverso una risposta rigenerativa. La rigenerazione degli epatociti si verifica normalmente in condizioni di riduzione del fegato (es. epatectomia parziale), al contrario questo meccanismo è compromesso in condizioni come la necrosi cellulare persistente e il danno epatico cronico. In queste ultime condizioni, le cellule progenitrici epatiche (HPC) agiscono come cellule opzionali nel processo di rigenerazione.<sup>79</sup> Una distinta sottopopolazione di epatociti adulti contribuisce alla rigenerazione epatica sia nell'omeostasi che nel danno.<sup>80</sup> Nel fegato adulto, il normale turnover è ottenuto da una combinazione di epatociti adulti diploidi e colangiociti, proliferanti a livello della zona centro-lobulare. Al contrario, in caso di danno acuto severo o in caso di danno cronico, una popolazione pre-esistente di epatociti periportali (i cosiddetti epatociti ibridi) possono subire un'estesa proliferazione, ricostituendo la massa epatica.<sup>81</sup>



Dal punto di vista fisiopatologico, distinte sottopopolazioni di epatociti maturi e compartimenti di cellule staminali/progenitrici vengono attivate in caso di normale omeostasi epatica rispetto a quelle attivate in corso di epatopatie. I progenitori epatici Axin2+ sono attivati normalmente per il normale turnover del fegato.<sup>82</sup> La nicchia HPC si attiva nelle epatopatie croniche ed in quelle patologie che coinvolgono dotti biliari interlobulari a seguito di gravi lesioni epatiche quando si sviluppa la senescenza delle cellule mature.<sup>83</sup> Al contrario, la nicchia delle Biliary Tree Stem Cells (BTSCs) è coinvolta in malattie che colpiscono grandi dotti biliari intraepatici ed extraepatici.<sup>84</sup> Questi aspetti sono stati chiaramente chiariti confrontando le risposte delle cellule staminali/progenitrici in diverse patologie biliari come PBC e PSC.<sup>85</sup> Nelle epatopatie croniche, l'attivazione delle cellule staminali/progenitrici avviene grazie alla modifica del microambiente circostante. Questa nicchia fornisce diversi segnali chiave che guidano l'attività HPC. Nella nicchia delle cellule staminali epatiche [70], le HPC si trovano in associazione con gli angioblasti, con i precursori delle cellule stellate epatiche e delle cellule endoteliali e con i macrofagi. I precursori hanno tratti fenotipici che si sovrappongono a quelli delle cellule stellate mature e dell'endotelio, ma sono anche distinti. Ad esempio, i precursori delle cellule stellate esprimono minimamente i retinoidi, mentre questi si trovano in abbondanza nelle cellule stellate mature; i precursori delle cellule endoteliali non esprimono CD31 (PECAM) che è una caratteristica distintiva dell'endotelio maturo. Questi precursori rilasciano segnali paracrini importanti per il mantenimento dei progenitori in uno stato di quiescenza. Questi segnali paracrini includono fattori della matrice, proteoglicani, laminine e segnali solubili come il fattore inibitorio della leucemia (LIF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita derivato dallo stroma (SDGF) e il fattore di crescita epidermico (EGF).

Nel tessuto malato sono presenti cellule stellate epatiche attivate e miofibroblasti (MF) che producono segnali paracrini distinti (ad es. collagene di tipo I, proteoglicani solfati e livelli elevati di citochine e fattori di crescita) da quelli delle cellule stellate quiescenti (ad es. collageni di rete, proteoglicani minimamente solfati e LIF). HPC, MF e macrofagi producono una varietà di segnali in grado di guidare la risposta delle cellule progenitrici. È interessante notare che i macrofagi possono produrre una varietà di citochine, che hanno un ruolo chiave nell'espansione prominente delle HPC indifferenziate. Nelle malattie croniche del fegato, i macrofagi sono in grado di attivare la via canonica Wnt nelle HPC innescando la loro differenziazione verso gli epatociti. Nelle malattie biliari, le cellule stellate attivate e le MF possono secernere Jagged1 che attiva la segnalazione di Notch nelle vicine HPC e, insieme alla produzione di collagene di tipo I, ne promuove la differenziazione in senso biliare. Pertanto, le vie di segnalazione Notch e Wnt hanno un ruolo chiave nella proliferazione e nel differenziamento delle HPC (Figura 6).<sup>86</sup>

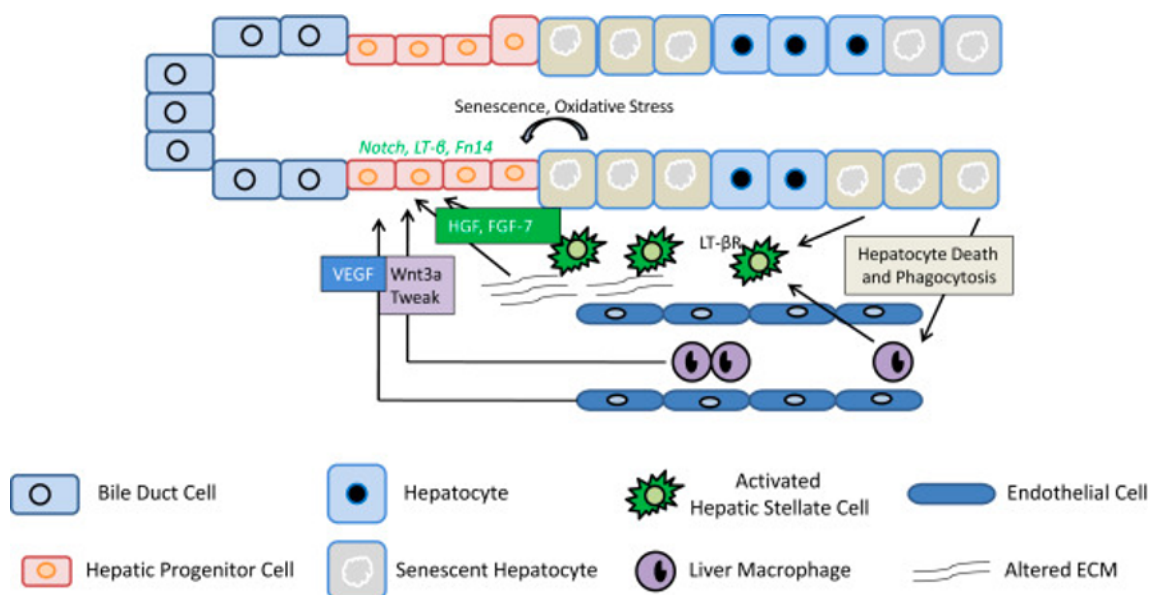


Figura 6. Principali meccanismi coinvolti nel processo di rigenerazione epatica e nella attivazione delle cellule HPC (da Kaur S, Siddiqui H, Bhat MH. Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis? Am J Pathol. 2015 Sep;185(9):2342-50)

L'AH è caratterizzata dalla compromissione della proliferazione cellulare, secondaria a danno epatico diffuso, a cui si associa una estesa risposta infiammatoria. La necrosi e l'infiammazione sono i due fattori chiave responsabili della progressione delle cellule progenitrici. Nei pazienti con sAH, vi è una attivazione ed una maggiore espressione delle HPC nel parenchima epatico rispetto a pazienti con sola cirrosi alcol-correlata, in cui l'attivazione di HPC è presente solo nei setti fibrosi.<sup>87</sup> Tuttavia, tali cellule hanno una ridotta capacità rigenerativa, secondaria infatti ad una maturazione verso il compartimento biliare. Conseguentemente, l'espansione delle HPCs conduce ad una proliferazione duttare e all'incapacità di generare cellule mature epatocitarie e quindi a restaurare la normale funzione epatocitaria. L'AH è quindi caratterizzata da un accumulo massiccio ma inefficiente di HPC con un fenotipo biliare predominante.<sup>41</sup> La severità della proliferazione duttare in pazienti con AH è associata strettamente alla mortalità a breve termine dei pazienti con AH.<sup>87</sup> Oltre a ciò, l'analisi istologica di tessuto epatico di pazienti con AH non-responder a terapia steroidea ha dimostrato la presenza di proliferazione duttare massiva e di una inadeguata funzione epatica, secondaria allo sviluppo di fibrosi lobulare.<sup>58</sup>

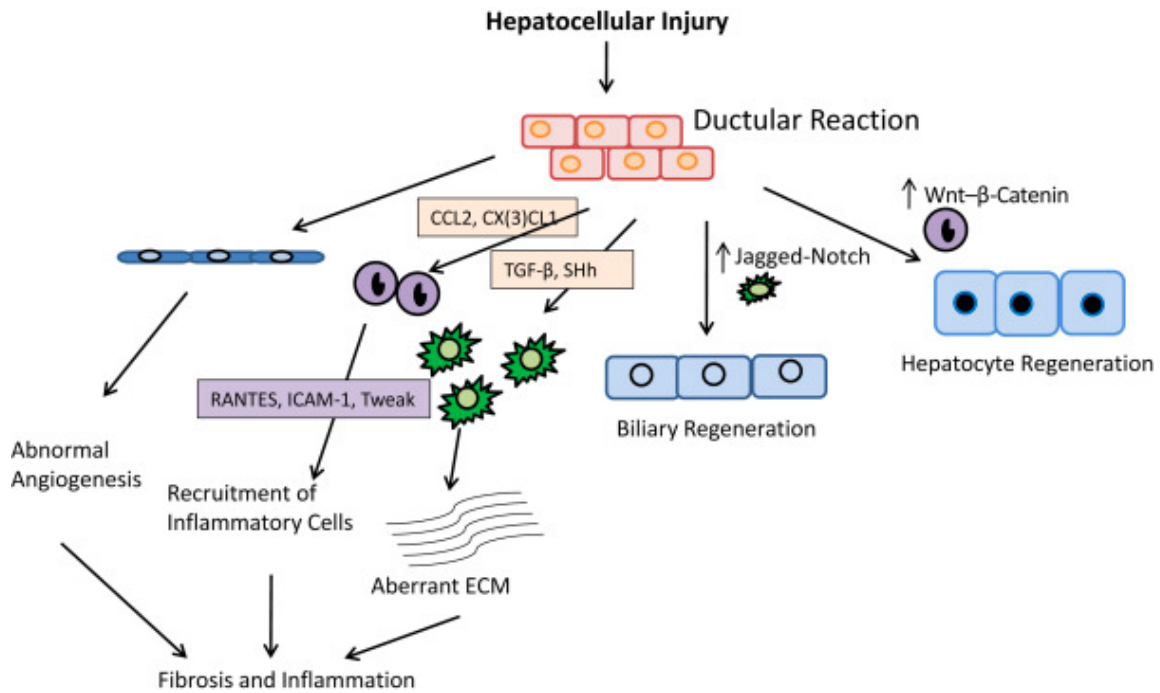


Figura 7. Destino differente delle cellule HPC a seconda del danno epatico (da Kaur S, Siddiqui H, Bhat MH. Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis? Am J Pathol. 2015 Sep;185(9):2342-50).

La matrice extracellulare gioca un ruolo di straordinaria importanza per il mantenimento dell'architettura tissutale e dello stato di differenziamento. Infatti: (a) fornisce una impalcatura strutturale che mantiene le cellule nella posizione adatta allo svolgimento delle loro funzioni specifiche; (b) permette la migrazione di alcuni tipi cellulari in risposta a fattori solubili (chemotassi) o legati a glicoproteine e/o proteoglicani (PG) (aptotassi); (c) filtra e convoglia il liquido interstiziale che media gli scambi metabolici e catabolici fra le cellule; (d) immagazzina e sequestra fattori di crescita e di citochine; (e) mantiene le cellule informate su eventi critici che hanno luogo nel loro microambiente, e che permettono loro di regolare l'espressione di insiemi di geni richiesti per mantenere e/o regolare l'omeostasi. Quest'ultimo punto è estremamente significativo anche in quanto citochine e fattori di crescita attivi intrappolati nella ECM possono essere rilasciati durante il danno ai tessuti. Perciò, le citochine rappresentano la risposta più precoce al danno e giocano un ruolo chiave nell'attivazione delle successive cascate infiammatorie e nei processi di rigenerazione. Inoltre, dato che le diverse componenti della ECM hanno multipli domini la cui attività biologica si manifesta soltanto mediante digestione proteolitica limitata, anche esse contribuiscono alla risposta iniziale al danno rilasciando peptidi con molteplici attività biologiche.<sup>88</sup> Un elemento cruciale per le risposte delle HPC e delle cellule progenitrici biliari è rappresentato dalla composizione della ECM. Macrofagi, MF, HpSC e HB hanno ruoli chiave nel rimodellamento della ECM attraverso la produzione di una varietà di metalloproteinasi della matrice e dei loro inibitori tissutali e nella sintesi di tipi specifici di componenti della matrice.<sup>89</sup> La degradazione della matrice di collagene da parte delle metalloproteinasi, unita alla produzione di una

nicchia ricca di laminina, porta all'espansione di HPC; la laminina mantiene il fenotipo staminale/progenitore biliare e inibisce la differenziazione degli epatociti.<sup>90</sup> Al contrario, la perdita nella ECM di laminina è un passaggio necessario per iniziare la differenziazione in un fenotipo epatocitario. Dubuquy et al, hanno analizzato le diverse componenti delle proteine della ECM note per influenzare il destino degli HPC. I principali fattori della matrice coinvolti nel processo di differenziazione cellulare sono la laminina, che promuove la differenziazione dei colangiociti, e la fibronectina, un cappello proteico che favorisce la differenziazione degli epatociti.<sup>41,77,91</sup> Nella cirrosi alcolica, l'espressione proteica sia della laminina che della fibronectina è significativamente aumentata rispetto a soggetti normali. Al contrario, nei soggetti con sAH è evidente un marcato aumento del contenuto di laminina rispetto sia ai controlli sani che ai soggetti con cirrosi alcolica; al contrario i livelli di fibronectina non sono aumentati. Inoltre, l'espressione della laminina è maggiore intorno alle cellule HPC, suggerendo quindi l'esistenza di una stretta interazione tra questa proteina extracellulare e queste cellule. Il rapporto tra l'espressione proteica della laminina e quella della fibronectina è sbilanciato nei soggetti con AH rispetto a quello dei soggetti con cirrosi alcolica e nei controlli normali, suggerendo il suo ruolo specifico nell'alterata differenziazione degli HPC verso gli epatociti.<sup>41</sup>

### **Fisiopatologia della progressione del danno nell'ambito della ACLF**

L'ACLF si sviluppa in pazienti con cirrosi come conseguenza di eventi precipitanti che portano a scompenso acuto e insufficienza multiorgano.<sup>31</sup> Le caratteristiche fisiopatologiche specifiche dell'ACLF sono l'estrema risposta infiammatoria sistemica ed epatica, che porta a danno tissutale, e la paralisi immunitaria, che predispone i pazienti a complicanze infettive.<sup>30,92</sup> Non è chiaro se l'infiammazione sistemica, espressa da un elevato numero di globuli bianchi e proteina C-reattiva, rappresenti un'alterazione della risposta dell'ospite al danno o se sia dovuta all'impossibilità di risolvere l'infiammazione. I pazienti sopravvissuti alla fase iniziale di ACLF presentano spesso sequele cliniche con persistente disfunzione d'organo/i, e quindi prognosi sfavorevole.<sup>34</sup> Abbiamo già visto come il processo di rigenerazione epatica, ad opera del compartimento staminale, è fondamentale per la ricostituzione del parenchima in seguito ad insulto acuto. Il danno epatico acuto innesca una risposta rigenerativa, tuttavia nei soggetti con ACLF tale risposta è verosimilmente inefficace, con conseguente mortalità a breve termine a causa della limitata riserva epatocitaria residua. Due studi recenti su pazienti con AD e ACLF hanno evidenziato che la proliferazione degli epatociti (Ki67), principale risposta rigenerativa dopo un danno lieve/moderato, è assente nella malattia epatica allo stadio terminale. Tale condizione si associa clinicamente ad un outcome sfavorevole con elevata mortalità a breve termine.<sup>93</sup> In modelli animali, i soggetti con ACLF presentano una ridotta rigenerazione epatica

a causa del passaggio da una via pro-rigenerativa IL-6/STAT3 a una anti-rigenerativa IFN- $\gamma$ /STAT1. L'attivazione alterata di IL-6/STAT3 è dovuta all'incapacità delle cellule di Kupffer di produrre IL-6; mentre l'attivazione di STAT1 è influenzata dalla forte risposta immunitaria innata e alla conseguente produzione di IFN- $\gamma$ . La terapia con IL-22Fc inverte questo spostamento e ha influenzato positivamente la sopravvivenza nei topi ACLF invertendo lo squilibrio del percorso STAT1/STAT3.<sup>94</sup> Un'altra caratteristica ben descritta nei pazienti con ACLF è l'aumento delle citochine circolanti; i cambiamenti nel pattern delle citochine non sono coerenti e dipendono dalla gravità dell'ACLF, dalla causa sottostante della malattia epatica e dall'evento precipitante. Questi cambiamenti nei marcatori circolanti dell'infiammazione sono associati a cambiamenti nelle caratteristiche funzionali delle cellule infiammatorie circolanti. È stato scientificamente dimostrato che i pazienti con ACLF hanno livelli significativamente più elevati di citochine infiammatorie e di renina plasmatica rispetto a quelli senza ACLF; sono stati identificati diversi profili di citochine in base al tipo di evento precipitante scatenante l'ACLF; esiste inoltre una buona correlazione tra il decorso dell'infiammazione sistemica e il decorso clinico dell'ACLF.<sup>92</sup> È anche diventato chiaro che le molecole rilasciate dopo la morte cellulare (DAMPs) hanno proprietà immunogeniche e possono provocare un'infiammazione sistemica. Recentemente, è stato accertato che il meccanismo predominante di morte cellulare nell'ACLF non è quello apoptotico; tale risultato potrebbe spiegare la gravità dell'infiammazione sistemica osservata nei pazienti con ACLF.<sup>95</sup> L'AH deve considerarsi da un punto di vista fisiopatologico come una forma di ACLF, piuttosto che come una epatite acuta vera e propria. Tale dato è supportato anche dal fatto che solo il 60% dei pazienti con diagnosi clinica di AH presentano poi caratteristiche istopatologiche compatibili con AH (Mallory bodies, ballooning, infiltrato neutrofilo, etc – reperti istologici tipici della AH), mentre la rimanente percentuale dei pazienti ha un quadro istologico compatibile con cirrosi epatica scompensata.<sup>27</sup> Quindi, nella maggior parte dei pazienti con AH, altri potenziali fattori precipitanti (per esempio sepsi, infiammazione sistemica, traslocazione batterica, DILI, alterazione emodinamiche secondarie a sanguinamento) sono responsabili del progressivo sviluppo di ALF.

## RAZIONALE DELLO STUDIO

Visto l'elevata mortalità dei pazienti con epatite acuta alcolica, l'identificazione dei meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo di ALF è mandatoria per lo sviluppo di specifiche terapie target. Tuttavia, gli studi clinici che hanno esplorato le basi fisiopatologiche ed i fattori traslazionali coinvolti nello sviluppo delle AH sono estremamente limitati, in parte legati alla difficoltà di ricreare modelli animali con caratteristiche istopatologiche simili a quelle della AH ed in parte legati alla difficoltà di raccogliere campioni biologici da pazienti con AH. Nel setting di un danno epatico acuto, il parenchima epatico cerca di ristabilire e recuperare una normale funzione attraverso una risposta rigenerativa. Il ripristino degli epatociti si verifica in condizioni di riduzione del volume epatico (es. epatectomia), mentre tale meccanismo è inefficace in caso di danno cronico e persistente necrosi cellulare. In quest'ultima condizione, le HPCs, presenti all'interno del canale di Hering, iniziano a proliferare, dando vita a quello che è nota come reazione duttulare (DR). Questa reazione duttale sostituisce gradualmente il parenchima epatico provocando una graduale riduzione nel numero degli epatociti maturi nel lobulo epatico o promuovendo la formazione di noduli rigenerativi. Studi di immunohistochemica eseguiti su tessuto epatico di pazienti con epatopatia cronica, hanno mostrato che la DR è costituita da una eterogena popolazione di cellule proliferanti, comprendenti sia cellule staminali totipotenti che cellule con un fenotipo intermedio (ovvero che esprimono sia marcatori di staminalità che marcatori di cellule mature epatocitarie e colangiocitarie). Come già riportato precedentemente, i pazienti con AH hanno una iperattivazione del compartimento HPCs ma tuttavia tali cellule hanno una ridotta capacità rigenerativa, secondaria ad una differenziazione verso un fenotipo cellulare biliare. Conseguentemente, l'espansione delle cellule HPC causa una intensa DR, con conseguente incapacità di generare cellule mature epatocitarie e quindi a restaurare la normale funzione epatocitaria. La severità della proliferazione duttulare è strettamente associata alla outcome dei pazienti in diverse epatopatie, incluso l'epatite acuta alcolica. La **citokeratina 19 (CK19)** è usata come marcatore di DR nelle epatopatie croniche ed è tipicamente espressa nelle HPCs ma anche nelle cellule intermedie epatobiliari. **L'Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)** è espresso dalle cellule HPC ed è per tale ragione utilizzato come marcatore per identificare le cellule progenitrici. Inoltre, EpCAM è anche espresso dai nuovi epatociti derivanti dalle HPCs nell'ambito della rigenerazione epatica. Le cellule stellate (di ITO) sono cellule mesenchimali epatiche che hanno un ruolo di vitale importanza nella fisiologia epatica e partecipano attivamente alla fibrinogenesi. Le cellule stellate sono localizzate nello spazio di Disse a livello perisinusoidale e mantengono una stretta relazione sia con le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici che con gli epatociti. È ampiamente dimostrato che, le cellule stellate hanno un ruolo rilevante nella differenziazione, proliferazione e

morfogenesi delle altre cellule epatiche durante l'organogenesi epatica ed hanno un ruolo di primaria importanza nel processo di fibrogenesi secondaria a danno epatico cronico. **A-sma** è un marcatore ampiamente utilizzato nella valutazione della attivazione delle cellule stellate ed è un indicatore precoce dello sviluppo di fibrosi.

## **MATERIALI E METODI**

Lo scopo di questo studio retrospettivo monocentrico è:

- valutare l'outcome dei soggetti affetti da sAH, sottoposti precocemente a LT (senza attendere i sei mesi di astinenza) con quello dei pazienti esclusi per LT per controindicazioni cliniche o psichiatriche/sociali e quindi trattati esclusivamente con terapia medica (MT).
- Indagare tipo e grado di fibrosi, arresto del compartimento staminale e reazione dutturale, di biopsie epatiche di soggetti con AH, attraverso analisi immunohistochimica.
- Valutare la possibile correlazione di tali fattori istopatologici sull'outcome clinico dei pazienti con AH
- Confrontare il meccanismo di fibrogenesi osservato nei pazienti con ACLF secondaria ad AH con quello di pazienti con ACLF secondaria ad altre cause (infezione, sanguinamento).

### **Popolazione**

Sono stati valutati tutti i casi di epatite alcolica severa (indipendentemente dal valore del Maddrey score) riferiti consecutivamente al reparto di epatologia e gastroenterologia dell'Ospedale Niguarda di Milano dal Gennaio 2016 a Giugno 2022. I criteri di inclusione utilizzati sono stati:

- Età > 18 anni
- primo episodio di epatite alcolica acuta definita, secondo i criteri del National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) come recente insorgenza di ittero e/o ascite in soggetti con abuso di alcol attivo
- Maddrey score > 32 (diagnosi di AH severa)

Sono stati considerati i pazienti con pregressa diagnosi di epatopatia alcol correlata, ma senza precedenti episodi di AH (es. pazienti con diagnosi accidentale di epatopatia per riscontro occasionale di alterazione degli esami di laboratorio e noto uso di alcol). Rientrano nel gruppo LT tutti i pazienti sottoposti a trapianto prima del raggiungimento dei 6 mesi di astinenza. I criteri di

esclusione comprendevano la presenza di altre cause di danno epatico (es infezione virale attiva e/o eradicata dopo comparsa di cirrosi) e l'infezione da HIV. La popolazione arruolata è costituita prevalentemente da pazienti inizialmente ospedalizzati presso altri centri; il trattamento medico all'esordio è pertanto stato gestito nelle varie strutture in base alle comuni linee guida di gestione della SAH e all'esperienza locale. Una minoranza di pazienti è stata sottoposta a trattamento medico con corticosteroidi; nella maggior parte dei casi il trattamento non è stato effettuato per la presenza di controindicazioni (es. infezioni) o perché il rapporto rischio/beneficio è stato considerato svantaggioso (pazienti con MELD > 30). In considerazione della dibattuta efficacia dei corticosteroidi nella SAH, il mancato trattamento non è stato considerato tra i criteri di esclusione.

### **Raccolta dei dati**

I dati dei pazienti selezionati sono stati raccolti retrospettivamente e riportati in un database appositamente disegnato per lo studio. I campi considerati comprendevano:

- 1) dati demografici (sesso, età, provenienza, BMI);
- 2) dati sociali (situazione familiare, attività lavorativa);
- 3) dati relativi all'uso/abuso di alcol (numero di U/die, tipo di bevande, modalità del consumo, anni di consumo);
- 4) dati laboratoristici al baseline, dopo i primi 7 giorni di trattamento e osservazione, al momento dell'inserimento in lista e al momento del trapianto;
- 5) score per la valutazione baseline e dell'evoluzione della SAH: Maddrey, MELD, Glasgow score, ABIC, Child-Pugh score, CLIF-AD score, CLIF- ACLF score e in caso di trattamento con corticosteroidi il Lille score;
- 6) dati relativi agli eventi post LT nei pazienti trapiantati (complicanze, modalità e tempi della recidiva del consumo alcolico, compliance al follow-up). I dati di sopravvivenza dei pazienti sono stati ricavati dai centri di riferimento o dalle schede demografiche regionali.

### **Selezione dei pazienti candidabili a LT**

La valutazione dei pazienti con AH è stata effettuata in tutti i casi con l'intervento di un team multidisciplinare. I criteri fondamentali per l'inserimento in lista sono stati:

- 1) l'assenza di miglioramento e/o il peggioramento delle condizioni cliniche dopo le prime 48/72 h di osservazione e trattamento,



- 2) l'assenza di controindicazioni al trapianto,
- 3) la valutazione psichiatrica e psicologica.

Prima dell'inserimento in lista per LT tutti i pazienti sono stati valutati da una psichiatra dedicata, specializzata nella valutazione del problema della dipendenza dall'alcol. L'obiettivo principale della valutazione psichiatrica era individuare i fattori di rischio per ricaduta del consumo alcolico dopo il LT. I punti cardine della valutazione psichiatrica sono riportati nella tabella 4.

Evidenza di deterioramento della funzione cognitiva, valutato ai test neurocognitivi
Pregressi tentativi di dissuasione
Condizione di isolamento sociale o assenza di adeguato supporto familiare
Familiarità per abuso alcolico
Dipendenza da altre sostanze di abuso
Identificazione di disturbi psichiatrici sottostanti, potenzialmente curabili (es. Depressione).

Tabella 4. Predittori di relapse dell'abuso alcolico

Nei pazienti ritenuti idonei all'inserimento in lista per LT dopo valutazione collegiale la psichiatra coadiuvata dalla psicologa provvedeva a definire un programma di cura e supporto durante il follow-up per migliorare l'aderenza del paziente all'astinenza. L'eventuale ripresa del consumo di alcol viene indagata esclusivamente tramite colloquio psichiatrico/psicologico con il paziente e/o con il caregiver. In assenza di una definizione e classificazione precisa della recidiva del consumo di alcol abitualmente si definisce la riesposizione casuale a minime quantità (*lapse*), la recidiva di abuso alcolico (*relapse*) e il *binge drinking*.

## **Immunoistochimica**

Dalla coorte iniziale, sono stati poi selezionati i pazienti, di cui era disponibile tessuto epatico in quanto sottoposti a biopsia epatica percutanea o transgiugulare per conferma della diagnosi di AH e/o i soggetti sottoposti a trapianto epatico per sAH e/o ACLF.

I vetrini colorati con ematossilina/eosina e tricomatica di Masson sono stati osservati e analizzati da due patologi esperti al microscopio. Ogni caso è stato rivalutato in base ai criteri istopatologici di AH: danno epatocellulare (presenza of Mallory bodies e ballooning epatocellulare), infiltrato polimorfonucleato, steatosi e fibrosi. I campioni di fegato sono stati fissati in paraformaldeide al 4% e quindi incorporati in paraffina. Ogni caso è stato analizzato mediante immunoistochimica per actina muscolare liscia (a-SMA), citocheratina-19 (CK19) e per molecole di adesione cellulari epiteliali (EpCAM). Sono state eseguite analisi immunoistochimiche di sezioni di tessuto di 3-5  $\mu$ m di spessore ottenute da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Il recupero dell'antigene è stato eseguito con Citrate Buffer (pH 6) (Dako, Glostrup, Danimarca). Per l'identificazione delle cellule progenitrici epatiche, l'anticorpo primario utilizzato era anti- EPCAM (diluizione 1/200; mouse monoclonale, clone OV-TL 12/30, Dako); per identificazione di cellule stellate epatiche attivate e miofibroblasti portale/settale, l'anticorpo primario utilizzato era anti-aSMA (diluizione 1/400; monoclonale di topo, clone 1A4, Dako) e per la rilevazione della reazione dutturale l'anticorpo primario utilizzato era l'anti-CK19 (diluizione 1/100; monoclonale di topo, clone KP1, Biocare LLC, Concord,CA, USA). La procedura immunoistochimica è stata eseguita in un sistema Thermo Autostainer 360-2D (Bio-Optica, Milano, Italia), utilizzando il kit polimeri HRP (Biocare LLC) e Betazoid DAB (Biocare LLC) come cromogeno. Le micrografie al microscopio ottico sono state acquisite da una videocamera (SPOT Insight; Diagnostic Instrument, Inc., Sterling Heights, MI, USA) collegata a un Microscopio ottico Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Giappone) ed elaborati con un sistema di analisi delle immagini (Delta Sistemi, Roma, Italia).

## **Popolazione di controllo**

Sono stati arruolati in questo gruppo pazienti trapiantati presso ASST GOM Niguarda per ACLF (non causata da AH). La più comune causa di epatopatia in tale gruppo era quella autoimmune (colangite biliare primitiva e colangite sclerosante), seguita dalla eziologia metabolica (NAFLD) e virale. Solo 3 pazienti presentavano una epatopatia sclerogena secondaria ad abuso alcolico; tali pazienti presentavano però una lunga storia di astinenza dalle bevande alcoliche (> 2 anni) e per tale motivo sono stati inclusi nel gruppo. In oltre il 90% dei casi, l'evento scatenante (AD) è stato un processo infettivo. Le principali caratteristiche della popolazione controllo sono riportate nella tabella 5.

<b>Tabella 5. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con ACLF – gruppo controllo (n=16)</b>	
<b>Età, mediana (IQR)</b>	59 (49-60)
<b>Sesso maschile, n (%)</b>	12/16 (75)
<b>Eziologia epatopatia, n (%)</b>	
- Virali	4 (25)
- Autoimmune	6 (37.5)
- NAFLD	3 (18.7)
- Alcol	3 (18.7)
<b>Fattore responsabile dell'acute decompensation (AD), n (%)</b>	
- Evento infettivo	15/16 (93.75)
- Sanguinamento gastrointestinale	1/16 (6.25)
<b>Primo episodio di scompenso alla diagnosi, n (%)</b>	5/16 (31.2)
<b>Waiting time from AD to LT (giorni)</b>	21 (3-50)
<b>Bilirubin, media (IQR)</b>	22 (15-46)
<b>INR, media (IQR)</b>	2 (1.5-3)
<b>Globuli bianchi, media (IQR) (<math>\times 10^3/\text{mL}</math>)</b>	6802 (3000-12000)
<b>MELD-NA score, mediana (IQR)</b>	30 (25-40)
<b>Child Pugh score, n (%)</b>	
<b>Classe B</b>	2 (12.5)
<b>Classe C</b>	14 (87.5)
<b>Cirrhosis (Y or N)</b>	16/0

### Analisi statistica

Le variabili continue sono espresse come media, quelle categoriche come frequenza. La comparazione tra i pazienti sottoposti a LT e quelli trattati esclusivamente con terapia medica è stata effettuata con test T-Student, Mann-Withney test o Fischer's test per le variabili continue parametriche e non parametriche. La comparazione delle variabili categoriche è stata effettuata con  $\chi^2$  test. La differenza è considerata statisticamente significativa per valori di  $p < 0.05$ . La sopravvivenza è stata calcolata con il metodo di Kaplan-Meier considerando come periodo di follow-up l'intervallo tra il ricovero e la morte o l'ultimo controllo nei pazienti non deceduti.

## RISULTATI

Dal Gennaio 2016 a Giugno 2022, sono stati ricoverati 90 pazienti rispondenti ai criteri di inclusione indicati nel paragrafo precedente (diagnosi clinica di sAH). Le caratteristiche demografiche della popolazione di studio sono riassunte nella tabella 6.

<b>Tabella 6. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con sAH (n=90)</b>	
<b>Età, median (IQR)</b>	48 (29-77)
<b>Sesso Maschile, (%)</b>	58 (64%)
<b>Alcohol intake, median (IQR)</b>	10 U (4-26)
<b>Uso di corticosteroidi, (%)</b>	17 (18%)
<b>Primo episodio di scompenso alla diagnosi di sAH</b>	58 (64%)
<b>Risposta al trattamento medico, (%)</b>	
<b>Si</b>	23 (25.5%)
<b>No</b>	67 (74.5%)
<b>Trapianto per sAH</b>	15 (16%)
<b>Tempo di attesa, dal listing al trapianto</b>	21 (1-44)
<b>Maddrey score, median (IQR)</b>	193 (32-527)
<b>MELD-NA score, median (IQR)</b>	28 (17-40)
<b>Bilirubina, median (IQR)</b>	17 (3-38)
<b>INR, median (IQR)</b>	2 (1.4-5.5)
<b>Globuli bianchi, median (IQR) (x10<sup>3</sup>/mL)</b>	10545 (2.230-26.000)
<b>Transferrina, media</b>	103 (30-282)
<b>Child Pugh score</b>	
Classe B	8
Classe C	82
<b>ABIC score</b>	
<b>A (&lt;6.71)</b>	8 (9%)
<b>B (6.71-8.99)</b>	45 (50%)
<b>C (&gt;9)</b>	37(41%)
<b>ACLF alla diagnosi, (%)</b>	
<b>Si</b>	40/90 (44%)
<b>No</b>	50/90 (56%)
<b>Grado di ACLF, (%)</b>	
1	4 (10%)
2	23 (57.5%)
3	13 (32.5%)

Il 18 % dei pazienti (17/90) sono stati sottoposti a trattamento medico con corticosteroidi; nella maggior parte dei casi il trattamento non è stato effettuato per la presenza di controindicazioni, come es. infezioni (17/90) o perché il rapporto rischio/beneficio è stato considerato svantaggioso da un punto di vista clinico (28/90) o perché arruolati in trial clinico (24/90). Dei 17 pazienti sottoposti a terapia steroidea, solo 4 pazienti (23%) hanno presentato una risposta completa ad una settimana

dall'inizio del trattamento steroideo, in accordo al Lille score. 19 pazienti (21.5%) della nostra corte, non sottoposti a trattamento steroideo per presenza di infezioni o altre controindicazioni, hanno presentato un miglioramento clinico con sola terapia medica di supporto (complete responder al Lille score). I restanti 67 pazienti (70%), nonostante terapia medica massimale o steroidea proposta, non hanno evidenziato alcun miglioramento clinico. Per tale motivo è stata avviata valutazione multidisciplinare ad inserimento in lista per trapianto. In oltre la metà dei pazienti valutati per trapianto (39/54) sono emerse controindicazioni psichiatriche o anestesilogiche (too sick for LT, infezioni gravi, controindicazioni cardiologiche) all'inserimento in lista. 23 pazienti (23/54, 43%) con diagnosi di sAH non-responder a trattamento medico sono stati sottoposti a trapianto prima del raggiungimento dei 6 mesi di astinenza. 14 pazienti sono stati sottoposti a trapianto entro 3 mesi dalla diagnosi (early LT) e i restanti 9 pazienti oltre i 3 mesi (mediana 189 giorni – IQR 120 -1166).

Nell'ambito del nostro studio, la coorte in oggetto è stata poi distinta in 2 sottogruppi: pazienti responder al MT e pazienti non-responder al MT. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi sono riportate nella tabella 7. Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei due gruppi per quanto riguarda le caratteristiche demografiche (età, sesso, comorbidità generali o psichiatriche) e per quanto riguarda la quantità e la durata del consumo alcolico. I pazienti non-responder al trattamento medico presentavano una malattia epatica più avanzata, con valori superiori di bilirubina, INR, MELD e MELD-sodio rispetto al gruppo dei soggetti responder al MT. Inoltre, i soggetti non-responder presentavano anche caratteristiche cliniche di maggiore infiammazione sistemica ed epatica, espresse da presenza di leucocitosi periferica ed elevati livelli di AST/ALT rispetto ai soggetti responder. Nei pazienti che sviluppano un ACLF (all'ingresso o in corso di ospedalizzazione), l'ACLF-AD score era maggiore nei soggetti non-responder rispetto ai soggetti responsivi a terapia steroidea.

<b>Tabella 7. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con sAH in base alla risposta a MT (90)</b>				
<b>Variabili</b>	<b>Non-Responder (66)</b>	<b>Responder (24)</b>	<b>p-value</b>	
<b>Età, median (IQR)</b>	52 (45-57)	46 (41-55)	0.1	
<b>Sesso Maschile, N (%)</b>	42 (64)	14 (58)	0.3	
<b>Comorbidità psichiatriche, N (%)</b>	30 (45)	15 (62)	0.4	
<b>Primo episodio di scompenso, N (%)</b>	42 (64)	20 (83)	0.1	
<b>Unità alcoliche/die, median (IQR)</b>	12 (10-15)	12 (10-15)	0.5	
<b>Durata consumo alcolici, median (IQR)</b>	20 (17-30)	20 (10-30)	0.1	
<b>Trasferiti da altro centro, N (%)</b>	50 (75)	10 (41)	< 0.001	
<b>Trattati con corticosteroidi, N (%)</b>	18 (27)	2 (8)	0.03	
<b>Globuli Bianchi, median (IQR) (x10<sup>3</sup>/mL)</b>	11.3 (7.5-16.6)	8.3 (5.1-12)	0.1	
<b>INR, median (IQR)</b>	2.2 (1.8-2.9)	1.9 (1.5-2.2)	0.008	
<b>Creatinina, median (IQR)</b>	0.9 (0.7-1.4)	0.6 (0.6-0.8)	0.005	
<b>AST, median (IQR)</b>	140 (100-206)	110 (84-143)	0.05	
<b>ALT, mediana (IQR)</b>	48 (32-73)	40 (25-55)	0.04	
<b>Bilirubina, mediana (IQR)</b>	19 (12-26)	13 (8-19)	0.01	
<b>Maddrey's score, median (IQR)</b>	75 (53-113)	55 (42-73)	0.006	
<b>MELD score, median (IQR)</b>	27 (24-33)	23 (21-26)	< 0.001	
<b>MELD-Na score, median (IQR)</b>	29 (26-34)	26 (23-29)	0.001	
<b>Lille score, median (IQR)</b>	0.68 (0.41-0.9)	0.19 (0.05-0.31)	< 0.001	
<b>AD, N (%)</b>	59 (89)	23 (96)	0.6	
	AD score basale, mediana (IQR)	64 (56-73)	54 (49-60)	< 0.001
	ACLF, N (%)	41 (62)	3 (12.5)	< 0.001
	ACLF score basale, mediana (IQR)	53 (50-59)	43 (41-44)	<0.001

## **Sopravvivenza**

Il follow-up mediano dei pazienti con sAH è stato di 912 giorni (IQR 60-2190). La sopravvivenza ad un anno è risultata del 100% nel gruppo dei pazienti sottoposti a LT e del 91% a 3 anni. In tale gruppo si è registrato 1 solo decesso secondario ad insuff. epatica terminale per recidiva dell'abuso alcolico. Nel gruppo dei pazienti con risposta al MT (terapia steroidea e/o sola terapia medica di supporto) la sopravvivenza è stata ad 1 anno del 87%. In tale gruppo sono stati registrati 4 decessi, secondari ad eventi infettivi (1 paziente per cause cardiologiche, 2 pazienti hanno sviluppato PBS con secondaria ACLF di grado 3 ed altro paziente è deceduto per insuff. respiratoria secondaria a polmonite interstiziale relata ad infezione da SARS-COV-2). L'unico fattore associato alla mortalità in questo gruppo è l'età del paziente ( $p=0.03$ ). La sopravvivenza nel gruppo nei soggetti non-responder a MT standard è stata del 25% ad 1 anno. Fatta eccezione per 3 soggetti, tutti i pazienti del gruppo non-responder e non candidabili a trapianto epatico per controindicazioni sono deceduti per insuff. epatica terminale e/o ACLF (Figura 8). I livelli di MELD, MELD-sodio e l'AD score sono stati identificati come fattori associati alla mortalità nei soggetti non-responder e non-trapiantabili ( $p=0.001$ ). Nell'analisi univariata, l'unico fattore associato alla mortalità tra soggetti responder e non-responder (Candidati o no a LT) è il MELD-NA ( $p=0.03$ ). Sette pazienti del gruppo LT hanno sviluppato complicanze relate al LT. Abbiamo registrato 2 casi di rigetto acuto precoce, 1 caso di vasculite micotica dell'arteria epatica con necessità di re-LT; 4 casi di IRC da inibitori della calcineurina con conseguente introduzione di altri immunosoppressori (inibitori mTOR e/o antimetaboliti). Nell'ambito della nostra coorte, i livelli di transferrina sierica, recentemente dimostrati essere un fattore prognostico nei soggetti con AH, non hanno dimostrato influenzare la prognosi.

## **Consumo di alcol nei pazienti trapiantati**

Il tasso di recidivismo nel gruppo dei soggetti sottoposti a LT è stato di 2/15 (13%), in linea con i dati della letteratura. Un paziente, come sovra-riportato, è deceduto per recidiva sclerosa del graft secondaria a ripresa dell'abuso alcolico (1/15, 6%). In questo paziente il recidivismo è stato registrato a 18 mesi dal trapianto; il secondo paziente riferisce la riesposizione casuale a minime quantità di alcol (lapse) a partire dal 3 anno dopo il trapianto.

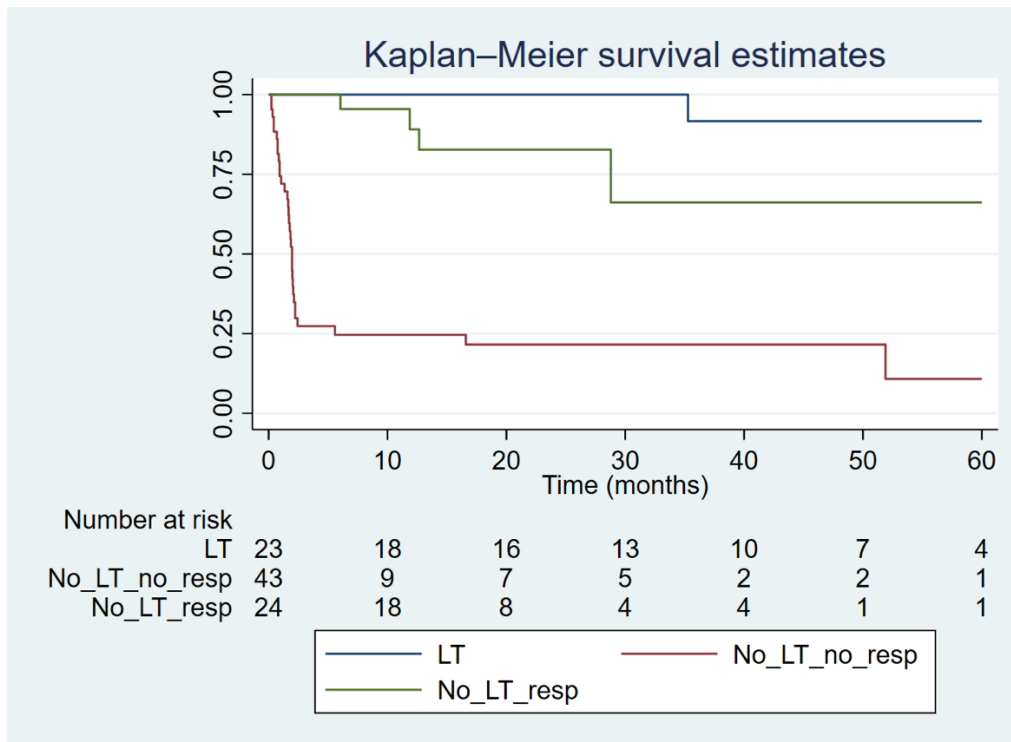


Figura 8. Curva di sopravvivenza Kaplan–Meier dei pazienti con AH (stratificata secondo risposta al MT).

### Analisi istologica

Dalla coorte iniziale di 90 pazienti, sono stati poi selezionati 28 pazienti, di cui avevamo a disposizione biopsia epatica al momento della diagnosi di sAH e/o fegato espantato in quanto sottoposti a LT. L'età mediana era di 51 anni, con prevalenza del sesso maschile (60%). Un numero limitato di pazienti (7/28, 25%) è stato trattato con alte dosi di corticosteroidi (prednisone 40 mg/die), secondo le indicazioni delle linee guida EASL. Nei restanti pazienti, gli steroidi non sono stati utilizzati a causa di controindicazioni cliniche (infezione attiva o punteggio MELD avanzato). Dopo 7 giorni di trattamento, solo 2 pazienti (2/7, 28,5%) sottoposti a trattamento steroideo hanno risposto, in accordo al Lille score; nei restanti 5 pazienti gli steroidi sono stati sospesi. Altri 6 pazienti della nostra popolazione (6/28, 21,5%) hanno mostrato un miglioramento clinico con sola terapia medica di supporto ed astinenza dall'alcol. Nonostante il trattamento medico massimale, il 70% (20/28) dei pazienti non ha mostrato alcun miglioramento clinico. Per questo motivo è stata avviata valutazione multidisciplinare per eventuale LT. Nel 40% della nostra coorte (8/20), è stata evidenziata una controindicazione psichiatrica, cardiologica o anestesologica ("too sick for LT") al percorso trapiantologico. Si segnala inoltre, che oltre il 70% dei pazienti (20/28) presentavano un quadro di fibrosi avanzata (F3 o F4) all'esame istologico. Le principali caratteristiche della coorte in oggetto sono riportate nella tabella 8.



<b>Tabella 8. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con AH e istologia compatibile con AH (n=28)</b>	
<b>Età, median (IQR)</b>	51 (32-68)
<b>Sesso maschile, (%)</b>	17 (60,7%)
<b>Alcohol intake, median (IQR)</b>	10 U (4-26)
<b>Uso di corticosteroidi, (%)</b>	7 (25%)
<b>Primo episodio di scompenso clinico alla diagnosi di sAH, (%)</b>	17 (60.7%)
<b>Risposta al trattamento medico, (%)</b>	
<b>Yes</b>	6 (21.5%)
<b>No</b>	22 (78.5%)
<b>Trapianto per sAH (pazienti not responder al trattamento medico)</b>	12 (42.8%)
<b>Tempo di attesa tra listing e LT</b>	21 (1-44)
<b>Maddrey score, median (IQR)</b>	62 (32-163)
<b>MELD-NA score, median (IQR)</b>	6 (21.5%)
<b>Bilirubina, median (IQR)</b>	19 (3-38)
<b>INR, median (IQR)</b>	2.1 (1.4-3.5)
<b>Leucociti, median (IQR) (x10<sup>3</sup>/mL)</b>	12020 (4.200-32000)
<b>Transferrina, media</b>	103 (30-282)
<b>Child Pugh score</b>	
Classe B	5
Classe C	23
<b>ABIC score</b>	
<b>A (&lt;6.71)</b>	2 (7%)
<b>B (6.71-8.99)</b>	20 (71%)
<b>C (&gt;9)</b>	6 (22%)
<b>Cirrhosis (Y or N)</b>	20/8
<b>Fibrosis</b>	
<b>F1-F2</b>	8
<b>F3-F4</b>	20

In tale coorte dei soggetti, abbiamo eseguito analisi immunohistochemica dei seguenti marcatori di rigenerazioni cellulare EPCAM,  $\alpha$ -SMA e CK-19 ed abbiamo valutato i livelli di espressione totale e a livello rispettivamente dei setti e all'interno dei noduli/lobuli epatici.

Prima di tutto, abbiamo dimostrato una correlazione significativa tra score prognostici clinici come MELD, MELD-sodio e AD-score (ma non il Maddrey score) ed espressione di CK-19 (Figura 9). Non abbiamo osservato alcuna correlazione tra score clinici ed espressione di EPCAM. Tale osservazione suggerisce che il danno acuto promuove una reazione dutturale, che non necessariamente correla con l'espressione di marcatori di progenitori epatici più immaturi (cellule EPCAM +). In letteratura, è riportato che l'espressione di EPCAM/CK-19 è correlata anche al grado di necrosi/infiammazione. Nell'ambito della nostra coorte non abbiamo osservato alcuna correlazione tra questi 2 marcatori e i valori di AST e/o GB, utilizzati come surrogato per valutare necrosi ed infiammazione-

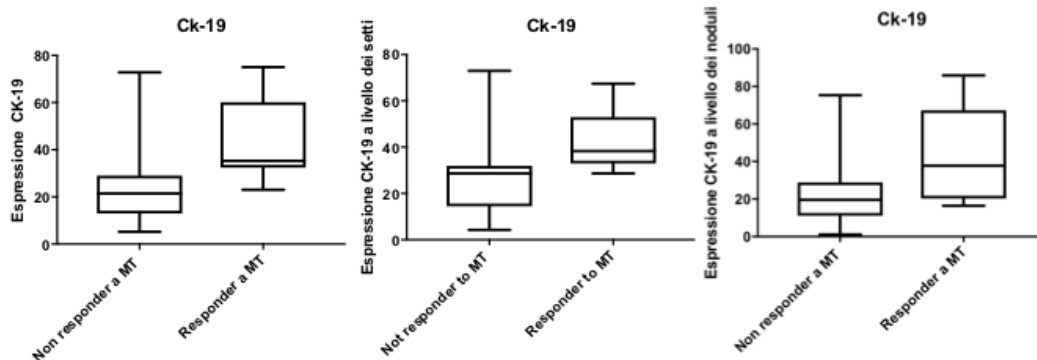


Figura 9. Correlazione tra espressione di CK-19 e MELD ( $p=0.01$ ), MELD-Na ( $p=0.01$ ) e AD-score ( $p=0.02$ ).

Abbiamo poi identificato in tale coorte di pazienti due gruppi: soggetti responder e soggetti non-responder al trattamento medico. Tra il gruppo dei responder e non-responder al MT non vi erano differenze clinicamente significative sia in termini di severità della malattia epatica (valutata tramite i valori di Bilirubina, INR e Meld-Na score) che in termini di severità del processo infiammatorio in atto (valutata tramite i livelli di Leucociti ed AST). Inoltre, non è stata rilevata alcuna differenza tra i 2 gruppi in termini di presenza di fibrosi avanzata all'esame istologico.

<b>Tabella 9. Caratteristiche al baseline tra soggetti responder e non-responder al MT (sottogruppo pazienti con analisi istologica, n=28)</b>			
<b>Variabili</b>	<b>AH-responder (8)</b>	<b>AH-non responder (20)</b>	<b>AH -responder vs non responder (p)</b>
<b>Leucociti</b> , median (IQR) ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	10.350 (3-30)	11,3 (2,4-28)	0.33
<b>INR</b> , median (IQR)	1.7 (1.4-2.3)	2.2 (1.4-5)	0.11
<b>Bilirubina</b> , median (IQR)	20.5 (3.8-28)	20 (4-46)	0.9
<b>AST</b> , median (IQR)	115 (34-300)	130 (38-214)	0.9
<b>MELD-NA</b> , median (IQR)	27 (19-29)	29 (21-40)	0.3
<b>Transferrina</b> , median (IQR)	82 (30-283)	101 (60-149)	0.5
<b>Fibrosi avanzata all'esame istologico (F3-F4), n (%)</b>	5 (62)	15 (75)	0.3

Analizzando i diversi marcatori di rigenerazione/fibrogenesi, abbiamo osservato che per quanto riguarda i livelli totali di  $\alpha$ -sma, non vi è alcuna differenza significativa tra i soggetti responder al MT ed il gruppo dei non-responder ( $p=0.5$ ). Analogo risultato per quanto riguarda, i livelli di cellule  $\alpha$ -sma positive all'interno dei noduli di rigenerazione/lobuli epatici. Al contrario, abbiamo riscontrato una maggiore espressione di cellule  $\alpha$ -sma positive (Figura 10 e 11) a livello dei setti nei soggetti responder rispetto ai soggetti non-responder ( $p=0.0004$ ). Tale dato è suggestivo di un processo di fibrogenesi attivo e valido a livello dello spazio portale nei soggetti responder.

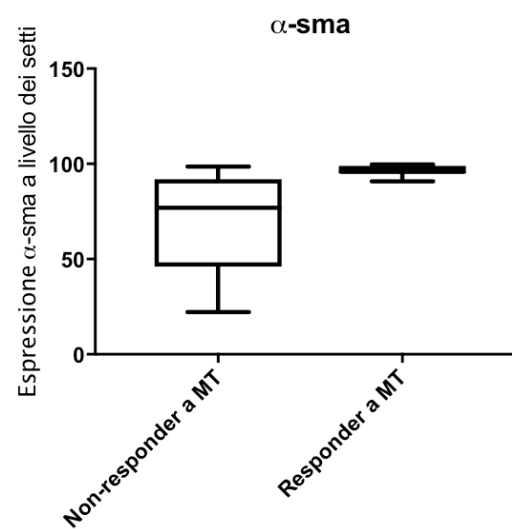


Figura 10. Espressione di  $\alpha$ -sma a livello dei setti nei soggetti responder a MT e soggetti non-responder a MT.

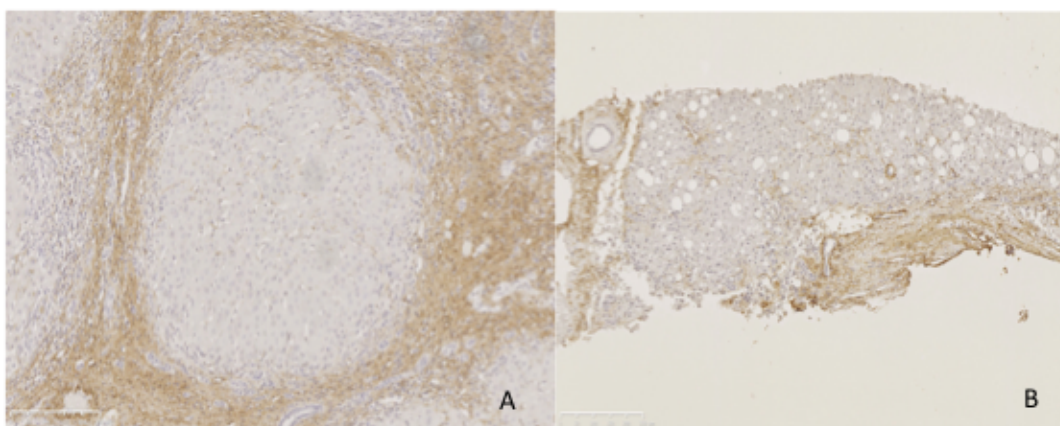


Figura 11. Analisi immunocistochimica dei marcatori di proliferazione cellulare (magnification x10). Espressione di  $\alpha$ -sma nei soggetti responder (Box A) vs non responder (Box B).

Non abbiamo osservato alcuna differenza in termini di attivazione del compartimento delle cellule HPC nei soggetti responder e non responder al trattamento medico. Infatti, non vi è alcuna discrepanza nell'espressione di EPCAM a livello dei setti o noduli/lobuli tra i 2 gruppi analizzati (Figura 12).

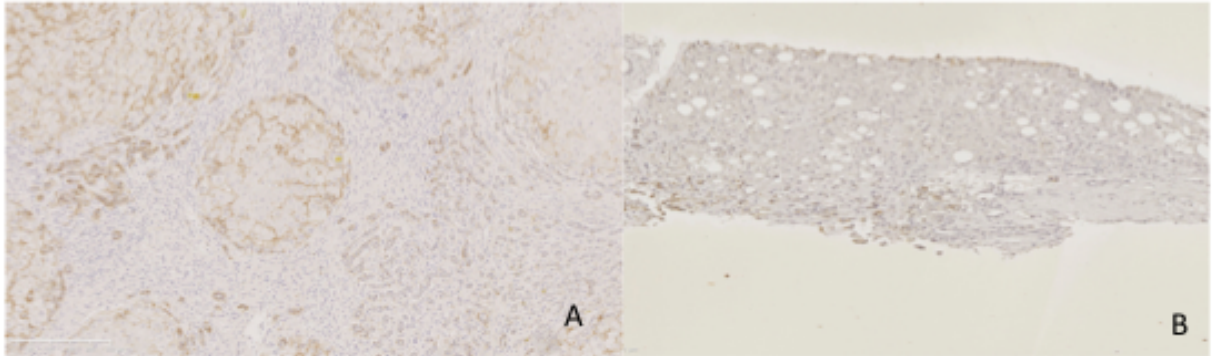


Figura 12. Analisi immunoistochimica dei marcatori di proliferazione cellulare (magnification x10). Espressione di EPCAM nei soggetti responder (Box A) vs non responder (Box B).

Per quanto riguarda l'espressione globale di CK19 (marcatore di DR), nei soggetti responder al MT vi è una maggiore espressione della Ck19 (0.0045). Tale dato è stato riscontrato anche a livello dei setti e a livello dei noduli/lobuli epatici (rispettivamente  $p=0.017$  e  $0.0025$ ) (Figura 13 e Figura 14).

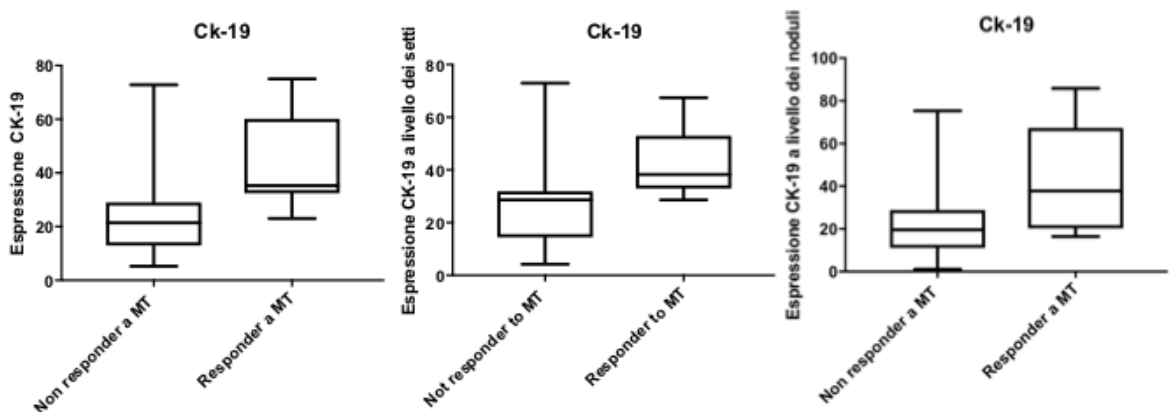


Figura 13. Espressione di Ck-19 nei soggetti responder a MT e soggetti non-responder a MT (espressione totale, espressione nei setti ed espressione nei noduli/lobuli epatici).

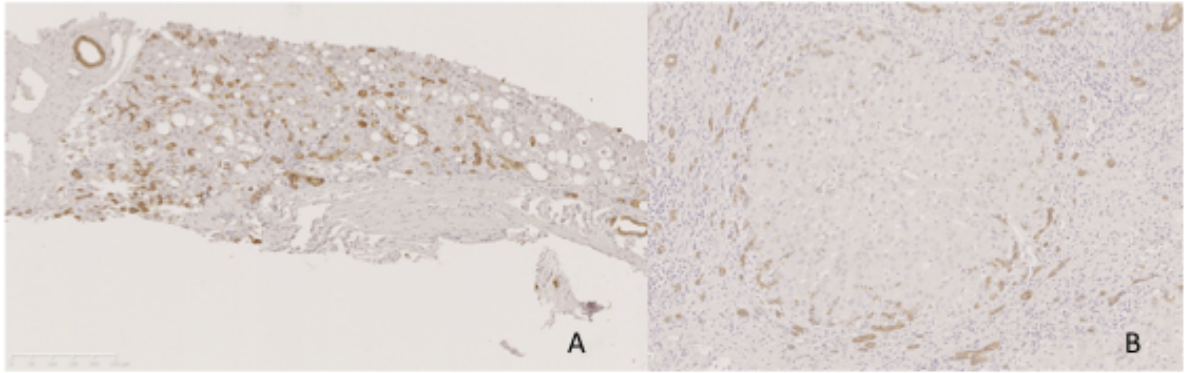


Figura 14. Analisi immunoistochimica dei marcatori di proliferazione cellulare (magnification x10). Espressione di CK-19 nei soggetti responder (Box A) vs non responder (Box B).

Se si escludono dalla analisi i pazienti sottoposti a trapianto epatico (12 pazienti), che potenzialmente potrebbero avere un bias di selezione (pazienti sottoposti ad early LT per ACLF secondaria ad altra causa come ad esempio infezione), i dati precedentemente esposti sono in parte confermati. In particolar modo, non vi è alcuna differenza in termini di espressione di EPCAM tra i 2 gruppi (8 soggetti responder al MT ed 8 soggetti non-responder al MT). Per quanto riguarda l'espressione di  $\alpha$ -SMA, non vi è alcuna differenza statisticamente significativa. Tuttavia, si osserva una tendenza alla significatività ( $p=0.1$ ) per quanto riguarda l'espressione di  $\alpha$ -SMA nei setti nei soggetti responder al MT. Per quanto riguarda l'espressione di CK-19, si conferma una espressione aumentata nei noduli epatici dei pazienti responder al MT ( $p=0.0002$ ); vi è anche una tendenza alla significatività anche per l'espressione globale di CK-19 e per l'espressione a livello dei setti (rispettivamente 0.2 e 0.1) nei soggetti responder al MT.

L'espressione di CK-19,  $\alpha$ -SMA ed EPCAM non si è dimostrata essere associata alla sopravvivenza. Tuttavia, stratificando la sopravvivenza dei nostri pazienti in 2 gruppi sulla base dei livelli mediani di CK-19, abbiamo evidenziato che i soggetti che presentano espressione più elevata di tale marcatore hanno una maggiore mortalità ( $p 0.04$ ) (Figura 15). Stratificando la sopravvivenza per i livelli di Epcam o  $\alpha$ -SMA, non abbiamo invece osservato alcuna differenza ( $p=0.8$ ).

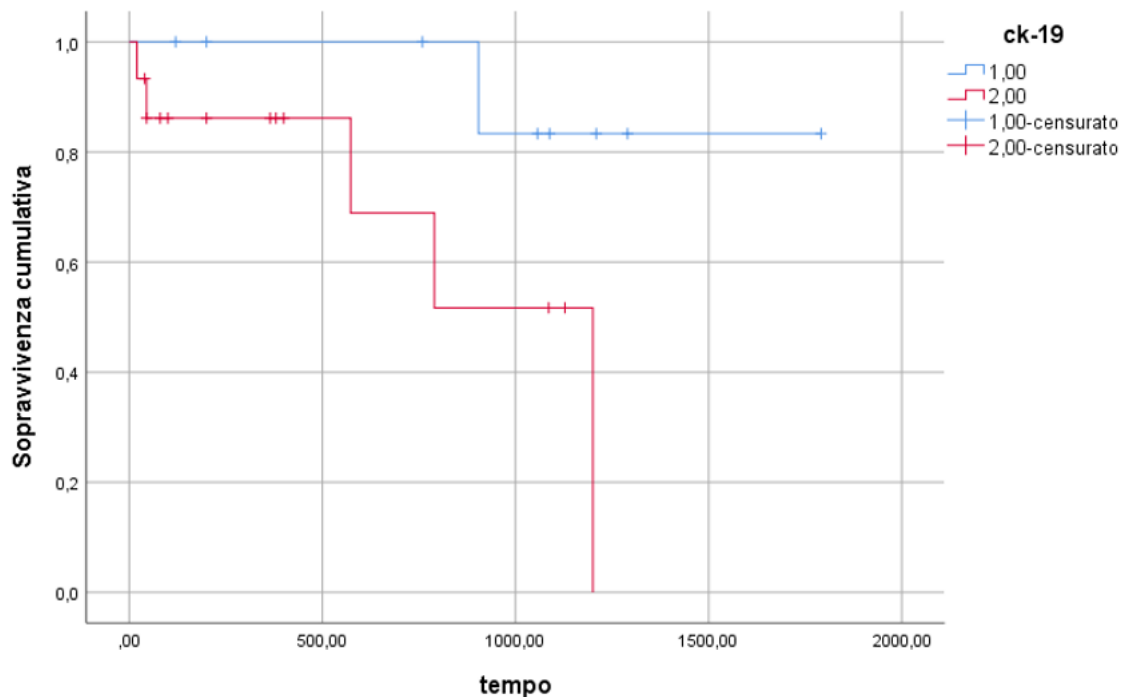


Figura 15. Sopravvivenza dei 2 gruppi responder e non-responder al trattamento MT (stratificata in base ai livelli mediani di CK-19).

Abbiamo poi provveduto ad eseguire la medesima analisi immunohistochimica su una popolazione di controllo rappresentata da soggetti sottoposti a trapianto epatico per ACLF affetti da epatopatia di altra natura (non alcolica) al fine di valutare se i meccanismi di rigenerazioni epatica attivati sono simili a quelli dei soggetti con ACLF secondaria a SAH (solo gruppo dei non-responder al MT).

Dalla nostra analisi, non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa tra i 2 gruppi in termini di espressione di  $\alpha$ -SMA. Per quanto riguarda l'attivazione del compartimento staminale, valutata tramite immunohistochimica di Epcam, non vi è alcuna differenza nei livelli di espressione sia a livello nodulare che a livello settale. Tuttavia, si osserva una differenza significativa confrontando il rapporto tra espressione a livello nodulare e settale. Infatti, i soggetti con ACLF rispetto a quelli con SAH non responder a MT presentano uno sbilanciamento nell'espressione di HPCs nei noduli/lobuli rispetto ai setti ( $p= 0.025$ ) (Figura 16).

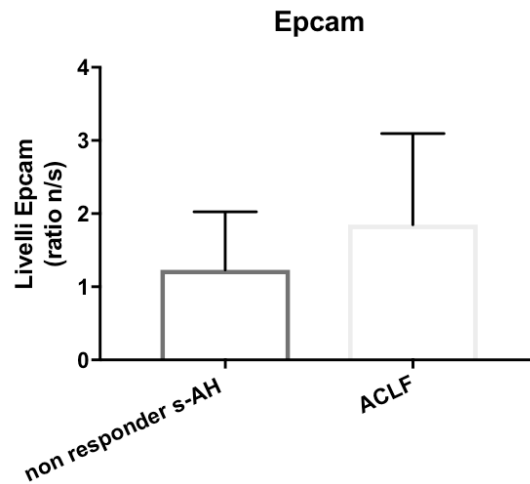


Figura 16. Espressione di Epcam (ratio noduli/setti) nei pazienti sAH non-responder e nei pazienti con ACLF.

Inoltre, abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa nell'espressione di CK-19 ( $p=0.0160$ ) e nell'espressione a livello del setto ( $p=0.0019$ ) nei pazienti con sAH rispetto ai soggetti con ACLF. Analogo risultato emerge dal confronto tra i livelli del rapporto tra espressione di Ck19 a livello del nodulo e del setto (s/n ratio) ( $p=0,0146$ ) (Figura 17).

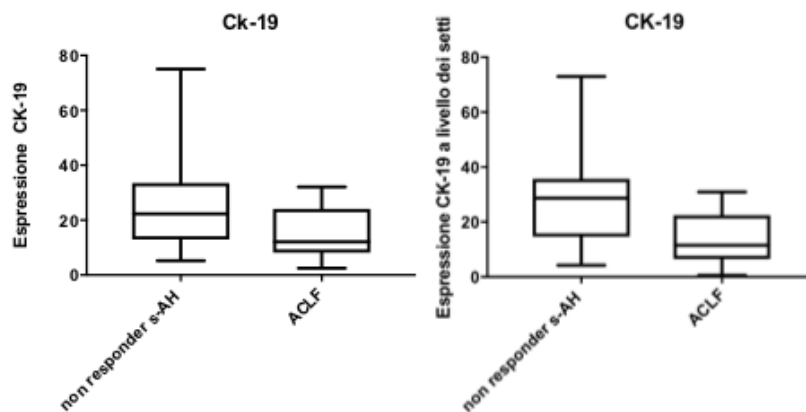


Figura 17. Espressione di Ck-19 nei pazienti con ACLF e nei pazienti con sAH non responder.

Se si effettua un confronto diretto tra soggetti con AH non responder e con diagnosi clinica di ACLF (11 pazienti) e soggetti con ACLF non alcolica (16 pazienti), i precedenti dati sono dimostrati. In particolar modo, non vi è differenza in termine di espressione di  $\alpha$ -SMA. Inoltre, utilizzando questa sottopopolazione, senza possibili bias, non si conferma lo sbilanciamento nell'espressione di Epcam tra noduli e setti. La proliferazione

duttulare si conferma essere più evidente nei soggetti con ACLF da AH che in quella dei soggetti con ACLF da altre cause ( $p=0.004$  espressione totale,  $p=0.004$  espressione a livello dei setti, espressione s/n ratio  $p=0.05$ ).

## **DISCUSSIONE**

La sAH è ancora un evento gravato da un'elevata mortalità a breve termine. La terapia con corticosteroidi, proposta come prima linea di trattamento, non influenza la sopravvivenza a lungo termine ed è gravata da numerosi effetti avversi: pertanto, il suo uso è dibattuto e molto limitato. Nella pratica clinica eventi come le infezioni, il sanguinamento, il danno renale, spesso presenti all'esordio della malattia, limitano ampiamente l'utilizzo dei corticosteroidi. I dati relativi all'efficacia del LT nei soggetti con sAH sono limitati poiché a tutt'ora molti centri rispettano la regola dei 6 mesi di astinenza prima dell'inserimento in lista.

I due principali studi al momento disponibili hanno però fortemente supportato la strategia del trapianto precoce per il trattamento di questi pazienti, nonostante alcune differenze nei criteri di inclusione.<sup>25,27</sup> I risultati del nostro studio confermano il vantaggio in termini di sopravvivenza del LT nei pazienti con SAH. Il trapianto precoce infatti permette di raggiungere una sopravvivenza del 100% ad 1 anno e del 91% a 3 anni, rispetto a soggetti non trapiantati

Analogamente a quanto proposto da Lee et al nel nostro studio sono stati inclusi anche pazienti che non avevano effettuato terapia con corticosteroidi, con infezioni attive e senza biopsia epatica al momento della diagnosi. La nostra popolazione di studio è pertanto costituita da pazienti, in maggioranza cirrotici con consumo attivo di alcol che sviluppano acutamente un quadro clinico caratterizzato da ittero e/o ascite, con o senza encefalopatia epatica con severa iperbilirubinemia, prolungamento del PT, ipoalbuminemia; solo in una minoranza dei casi è stato effettuato un tentativo di terapia con corticosteroidi.<sup>27</sup>

Come abbiamo visto, i gruppi di pazienti non-responder al MT e responder differiscono per valori di Meld, Meld-NA e Maddrey, evidenziando quindi una maggiore severità di malattia nei pazienti non-responder. I dati osservati nel nostro studio supportano l'efficacia del trapianto precoce nei casi di sAH dimostrando che questa strategia migliora la sopravvivenza dei pazienti con prognosi più infausta (sopravvivenza gruppo non-responder escluso per LT 25% ad 1 anno e a 3 anni). Inoltre, la mortalità nel gruppo dei pazienti sottoposti a terapia medica è più bassa rispetto ai valori riportati in letteratura. Tale riduzione è determinata dallo scarso utilizzo di corticosteroidi nella nostra coorte, che come sappiamo, è gravato da un elevato rischio di infezione, in particolar modo funginee.<sup>25,27</sup>



In assenza di controindicazioni cliniche assolute l'inserimento in lista di attesa nella nostra coorte è stato subordinato alla valutazione psichiatrica e psicologica del paziente e all'idoneità del caregiver, indipendentemente dalla durata dell'astinenza. In presenza di una valutazione sfavorevole del rischio di ripresa del consumo di alcol o di assenza di supporto sociale adeguato, dopo discussione collegiale, i pazienti venivano dichiarati non idonei al percorso trapiantologico. La percentuale di pazienti inserita in lista rispetto al totale degli accessi per sAH è stata del 34%. Nello studio di Mathurin, solo il 7,7% dei pazienti riferiti per sAH venivano considerati candidabili a trapianto, mentre Lee riporta percentuali di inserimento in lista variabili dal 13 al 100% in base ai centri (in media 35,9%). Durante i primi sei mesi di follow-up, non abbiamo osservato alcuna recidiva di abuso alcolico. Nel restante periodo, abbiamo registrato 2 casi di ripresa del potus nel gruppo LT: un paziente con ripresa quotidiana di abuso alcolico e successiva recidiva sclerosata del graft (deceduto per end-stage liver disease 36 mesi dopo LT); un paziente ha ripreso assunzione alcolica saltuaria. Il tasso di recidivismo osservato è in linea con quanto riportato in letteratura.

Nello studio di Mathurin, la principale causa di morte nell'immediato post-LT è stata la comparsa di infezioni prevalentemente nel gruppo dei pazienti precedentemente trattati con corticosteroidi (il 54% del totale); invece la principale causa di morte a medio-lungo termine (> 1 anno) è stata la riesposizione ad alcol.<sup>25</sup> La percentuale ridotta di pazienti trattati con terapia steroidea e l'utilizzo della valutazione psichiatrica come criterio vincolante per la candidabilità a LT potrebbero spiegare la migliore sopravvivenza osservata nel nostro studio e la ridotta incidenza di recidive del consumo alcolico dopo il trapianto.

Il beneficio in termini di sopravvivenza ottenuto mediante trapianto precoce nei pazienti con sAH sostiene il ricorso a questo trattamento. Una recente survey ha però dimostrato che negli USA solo il 50% dei centri trapianti prevede l'opzione di early transplantation come trattamento valido per sAH, superando la direttiva dei sei mesi di astinenza. Tale regola fu introdotta arbitrariamente sulla base di un "consensus" tra esperti, sia nell'ottica di prevedere un periodo di osservazione per valutare l'evoluzione clinica nei casi di ALD, sia per cercare di incrementare la compliance all'astinenza dopo il trapianto. Nel caso della sAH tuttavia l'applicabilità di questa regola è limitata dall'elevato rischio di evoluzione infausta in tempi rapidi del quadro clinico. La validità di questo criterio di selezione recentemente è stata ampiamente messa in discussione, osservando che altri fattori (es. il pattern di utilizzo dell'alcol, l'età, la familiarità, la durata del consumo) influenzano il rischio di recidiva in maniera più significativa dell'astinenza pre-LT. L'individuazione di fattori prognostici, sia clinici che eventualmente istologici, è assolutamente necessaria per permettere un percorso "fast" verso LT per quei pazienti a rischio di fallimento del trattamento medico. Inoltre, dalla nostra esperienza clinica, il

riconoscimento di criticità sociali o psichiatriche, si è dimostrato fattore cruciale nella selezione dei candidati, abbattendo significativamente il tasso di recidivismo post-OLTx.

L'analisi immunohistochimica eseguita su tessuto epatico di pazienti non-responder al MT e responder al MT ci ha permesso di identificare una serie di dati estremamente interessanti. Innanzitutto, i soggetti responder al MT hanno un processo di fibrogenesi ancora attivo e florido, come dimostrato dalla maggiore espressione di  $\alpha$ -sma nei setti epatici. Tale osservazione potrebbe avere una importante ripercussione clinica. Infatti, ci permetterebbe di identificare quei pazienti con un processo di fibrogenesi ancora attivo e quindi potenzialmente bloccabile e reversibile con terapia medica (trattamento steroideo, astinenza alcolica, etc).

I pazienti con sAH, indipendentemente dalla risposta al MT, presentano una attivazione delle cellule del compartimento staminale, come dimostrato dall'espressione di marcatori di HPCs. La nostra analisi conferma quanto dimostrato in precedenza da Sanchu-Bru: i soggetti con AH hanno una attivazione diffusa delle cellule progenitrici rispetto ad esempio a soggetti con cirrosi alcol correlata, dove tale attivazione sappiamo essere presente esclusivamente nei setti epatici.<sup>87</sup> Infatti, abbiamo osservato che i soggetti responder presentano una espressione maggiore di CK-19 in tutto il parenchima (setti e lobuli/noduli), rispetto ai non-responder. L'assenza di una significativa espressione di Epcam dimostra come il danno epatocitario e la severità di malattia non necessariamente correli con l'espansione di forme più immature di cellule progenitrici come quelle rappresentate da EPCAM. Questi risultati dimostrano che l'AH è caratterizzata da una importante reazione duttare e che il danno epatico diretto da parte dell'alcol può rappresentare un trigger estremamente rilevante per questo processo. La proliferazione è particolarmente importante nell'ALD, a causa probabilmente di più fattori coinvolti come danno diretto da parte dell'alcol, riduzione della capacità rigenerativa degli epatociti ed attivazione del compartimento staminale. Tale osservazione è ulteriormente rafforzata dal confronto con la nostra popolazione di controllo (pazienti con ACLF non alcoliche). Infatti, i soggetti con ACLF da alcol rispetto a pazienti con ACLF non da alcol presentano una maggiore reazione duttare, espressa da livelli più elevati di Ck-19, confermando l'ipotesi di un meccanismo di danno epatico differente. Il grado di proliferazione duttare correla con gli score clinici di severità di malattia ed in molti studi si associa prognosticamente ad un peggiore outcome.<sup>96</sup> Nella nostra coorte, la mortalità non correla direttamente con i livelli di espressione di CK-19. Tuttavia, stratificando i pazienti in 2 gruppi in base alla mediana dei livelli di CK-19, alti livelli di CK-19 sono associati ad una prognosi peggiore, come precedentemente dimostrato in altre epatopatie.<sup>97</sup>

In maniera inattesa, abbiamo osservato nel nostro studio che soggetti responder al trattamento medico presentano una espressione maggiore di CK-19 rispetto ai soggetti non-responder. Tale dato va contro a quanto precedentemente dimostrato in altri lavori, essendo la reazione duttare associata

ad una prognosi peggiore.<sup>87,93,96</sup> Tuttavia, occorre sottolineare che con il termine di DR identifichiamo non solo le cellule progenitrici ed intermedie epatobiliari ma anche altri elementi come stroma, cellule infiammatorie ed infiltrato linfoplasmacellulare (residente o richiamato dal torrente ematico).<sup>97,98</sup> La composizione dello stroma e dell'infiltrato infiammatorio è fondamentale per valutare il tipo di DR e la sua eventuale prognosi.<sup>98</sup> In letteratura, è stato evidenziato che la reazione duttulare appare in un fase precoce di malattia e correla con l'attività di malattia e il grado di fibrosi, mentre gli epatociti derivati dalle cellule progenitrici appaiono in una fase più tardiva di malattia e la loro presenza correlata con lo stadio di malattia.<sup>99,100</sup> Le cellule epatobiliari EpCAM-positivo derivano dalle cellule progenitrici epatiche dando origine a nuovi epatociti generati indipendentemente dal pool di epatociti maturi esauriti. La presenza di un certo numero di cellule epatobiliari EpCAM-positivo nei pazienti con AH suggerisce la formazione di epatociti di nuova generazione. Tuttavia, la principale popolazione di cellule EpCAM-positivo nei campioni di pazienti con AH è costituita da cellule piccole e immature e solo una piccola frazione di cellule sono cellule epatobiliari intermedie con una morfologia epatocitaria immatura (CK-7/CK-19+)<sup>87</sup>. Nel nostro studio, i soggetti responder al trattamento medico presentano maggiore reazione duttulare, ma anche una maggiore espressione di  $\alpha$ -sma, confermando quindi il dato che la reazione duttulare influenza e stimola il processo di fibrogenesi. L'attività proliferativa degli epatociti correla positivamente con la reazione duttulare, valutata tramite i valori di Ki-67 delle cellule duttali, ed inversamente con lo spessore del setto<sup>101</sup>. La presenza poi di una espressione di  $\alpha$ -sma superiore supporta l'ipotesi che i soggetti responder presentano una malattia "avanzata" in termini di score clinici ma ancora non definitivamente "consolidata" da un punto di vista istologico. La caratterizzazione dell'infiltrato infiammatorio e l'analisi degli epatociti con doppia colorazione per CK19/EPCAM così come la valutazione dell'attività proliferativa di Ki67 potrebbe risultare utile per ulteriormente caratterizzare la composizione della DR.

Due studi recenti hanno evidenziato che la proliferazione degli epatociti (Ki67) è assente nei pazienti con ACLF<sup>102</sup>. Nel nostro studio, abbiamo osservato che i soggetti con ACLF presentano sia una espressione ridotta di CK-19 e sia uno sbilanciamento dell'espressione di EPCAM nel lobulo epatico, anziché nel setto epatico (sede primaria di rigenerazione cellulare). Entrambi i dati supportano l'ipotesi di un inefficace processo rigenerativo nei soggetti con ACLF, espressione di un esaurimento funzionale del processo riparativo secondario alla presenza di una epatopatia in fase terminale.

I principali limiti di questo studio sono la natura retrospettiva ed il numero limitato di soggetti arruolati, in particolar modo nel gruppo sottoposto ad analisi immunoistochimica. Nell'ambito della pratica clinica, la diagnosi di sAH è una diagnosi, come precedentemente descritto, clinica. La biopsia epatica dovrebbe essere limitata, secondo linee guida, solo ai pazienti con diagnosi dubbia. Circa il 70% dei pazienti arruolati in questo studio arriva alla nostra osservazione trasferito da altre strutture

ospedaliere periferiche, in condizioni cliniche spesso decadute e con quadri di insufficienza epatica avanzata. La gravità del quadro clinico è stata in molti casi un fattore limitante all'esecuzione della biopsia epatica transgiugulare al momento del trasferimento presso il nostro centro. Inoltre, la provenienza monocentrica dei casi può da un lato introdurre "bias" legati alla gestione specifica del centro, ma dall'altro garantisce maggiore uniformità nella selezione dei candidati a trapianto soprattutto nell'ambito della valutazione psichiatrica e psicologica.

Il nostro studio supporta il ricorso al trapianto di fegato per il trattamento dell'epatite alcolica acuta severa in pazienti selezionati. La valutazione psichiatrica, psicologica e sociale del paziente e del caregiver è fondamentale prima dell'inserimento in lista. Un regolare supporto psichiatrico e/o psicologico personalizzato è necessario per cercare di ridurre al minimo il rischio di recidiva di esposizione all'alcol e la mortalità dopo il trapianto. Il nostro studio conferma inoltre l'importanza della biopsia epatica nel processo prognostico e terapeutico dei soggetti con epatite acuta alcolica, sottolineando la necessità di implementazione nell'ambito della pratica clinica. Infatti, la reazione duttale è un evento chiave nell'AH e l'attivazione dei meccanismi di rigenerazione tramite le cellule HPCs è parallela alla gravità della malattia in questa condizione acuta su cronica. Inoltre, la correlazione dei marcatori di rigenerazione con la mortalità e quella dei marcatori di fibrogenesi con la risposta al trattamento suggeriscono che la comprensione dei meccanismi che regolano fibrogenesi, proliferazione e differenziazione delle HPC è cruciale, favorendo la progettazione di nuovi approcci terapeutici.

#### **PROPOSTE PER IL FUTURO**

- Creare un modello prognostico incorporando dati clinici/biochimici (MELD-sodio e AD-score) con variabili istologiche ( $\alpha$ -sma e CK-19).
- Caratterizzare ulteriormente la popolazione cellulare, in particolar modo infiltrato linfoplasmacellulare, presente nella reazione duttulare dei soggetti con sAH e nei soggetti con ACLF.

## BIBLIOGRAFIA

1. Roizen, R., Kerr, W. G. & Fillmore, K. M. Cirrhosis mortality and per capita consumption of distilled spirits, United States, 1949-94: Trend analysis. *BMJ* **319**, 666–670 (1999).
2. McMaster, P. Transplantation for alcoholic liver disease in an era of organ shortage. *Lancet* **355**, 424–425 (2000).
3. Burra, P. *et al.* Liver transplantation for alcoholic liver disease in Europe: A study from the ELTR (European liver transplant registry). *Am. J. Transplant.* **10**, 138–148 (2010).
4. Bathgate, A. Recommendations for alcohol-related liver disease. *Lancet* **367**, 2045–2046 (2006).
5. Thursz, M. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J. Hepatol.* **69**, 154–181 (2018).
6. Singal, A. K., Bataller, R., Ahn, J., Kamath, P. & Shah, V. ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **113**, 175–194 (2018).
7. Antonini, T. M. *et al.* Impact of a first study of early transplantation in acute alcoholic hepatitis: Results of a nationwide survey in french liver transplantation programs. *Liver Transplant.* **24**, 841–844 (2018).
8. SAUNDERS, J. B., AASLAND, O. G., BABOR, T. F., DE LA FUENTE, J. R. & GRANT, M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction* **88**, 791–804 (1993).
9. Dominguez, M. *et al.* A new scoring system for prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2747–2756 (2008).
10. Degnim, A. C. *et al.* Standard Definitions and Common Data Elements for Clinical Trials in Patients With Alcoholic Hepatitis: Recommendation From the NIAAA Alcoholic Hepatitis Consortia. *Gastroenterology* **21**, 3240–3248 (2015).
11. DE, J. *et al.* Behavioral counseling after screening for alcohol misuse in primary care: A systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* **157**, 645–654 (2012).
12. Zatloukal, K. *et al.* From Mallory to Mallory-Denk bodies: What, how and why? *Exp. Cell Res.* **313**, 2033–2049 (2007).
13. Altamirano, J. *et al.* A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* **146**, (2014).
14. Sandahl, T. D., Jepsen, P., Thomsen, K. L. & Vilstrup, H. Incidence and mortality of alcoholic hepatitis in Denmark 1999-2008: A nationwide population based cohort study. *J. Hepatol.* **54**, 760–764 (2011).
15. ISD Scotland. Alcohol-Related Hospital Statistics Scotland 2016/17. 3 (2017).

16. Naveau, S. *et al.* Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* **25**, 108–111 (1997).
17. Garcia-Tsao, G., Sanyal, A., Grace, N. & Carey, W. the American Association for the Study of Liver Diseases, the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. (2007).
18. Liangpunsakul, S. & Kleiner, D. E. The alcoholic hepatitis histologic score: Structured prognostic biopsy evaluation comes to alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* **146**, 1156–1158 (2014).
19. Louvet, A. *et al.* The Lille model: A new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology* **45**, 1348–1354 (2007).
20. Maddrey, W. C. *et al.* Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* **75**, 193–199 (1978).
21. Hines, I. N. & Wheeler, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, (2004).
22. Thursz, M. R. Prednisolone or Pentoxifylline for Alcoholic Hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 281–283 (2015).
23. Mathurin P *et al.* Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data. *Gut* **60**, 255–260 (2011).
24. Bangaru, S., Pedersen, M. R., MacConmara, M. P., Singal, A. G. & Mufti, A. R. Survey of Liver Transplantation Practices for Severe Acute Alcoholic Hepatitis. *Liver Transplant.* **24**, 1357–1362 (2018).
25. Mathurin, P., Moreno, C. & Samuel, D. Early liver transplantation for severe alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1795–1800 (2011).
26. Lee, B. P. *et al.* Three-year results of a pilot program in early liver transplantation for severe alcoholic hepatitis. *Ann. Surg.* **265**, 20–29 (2017).
27. Lee, B. P. *et al.* Outcomes of Early Liver Transplantation for Patients With Severe Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* **155**, 422-430.e1 (2018).
28. Germani, G. & Angrisani, D. Liver transplantation for alcoholic hepatitis: a multicenter italian study. *Am j Transpl.* **22**, 1191–1200 (2022).
29. Arroyo, V. *et al.* Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–18 (2016).
30. Moreau, R. *et al.* Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* **144**, (2013).
31. Jalan, R. *et al.* Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *J. Hepatol.* **61**, 1038–1047 (2014).
32. Arroyo, V., Moreau, R., Jalan, R. & Ginès, P. Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome

that will re-classify cirrhosis. *J. Hepatol.* **62**, S131–S143 (2015).

33. Fernández, J. *et al.* Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: Prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut* **67**, 1870–1880 (2017).
34. Gustot, T. *et al.* Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology* **62**, 243–252 (2015).
35. Sersté, T. *et al.* The prognostic value of acute-on-chronic liver failure during the course of severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* **69**, 318–324 (2018).
36. Nadim, M. K. *et al.* Management of the critically ill patient with cirrhosis: A multidisciplinary perspective. *J. Hepatol.* **64**, 717–735 (2016).
37. Meersseman, P. *et al.* The intensive care unit course and outcome in acute-on-chronic liver failure are comparable to other populations. *J. Hepatol.* **69**, 803–809 (2018).
38. Jalan, R. *et al.* The CLIF Consortium Acute Decompensation score (CLIF-C ADs) for prognosis of hospitalised cirrhotic patients without acute-on-chronic liver failure. *J. Hepatol.* **62**, 831–840 (2015).
39. Levesque, E. *et al.* Impact of acute-on-chronic liver failure on 90-day mortality following a first liver transplantation. *Liver Int.* **37**, 684–693 (2017).
40. Artru, F. *et al.* Liver transplantation in the most severely ill cirrhotic patients: A multicenter study in acute-on-chronic liver failure grade 3. *J. Hepatol.* **67**, 708–715 (2017).
41. Dubuquoy, L. *et al.* Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* **64**, 1949–1960 (2015).
42. Wang, X. *et al.* The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11881–11888 (2003).
43. Szabo, G. & Petrasek, J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 387–400 (2015).
44. Petrasek, J. *et al.* STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16544–16549 (2013).
45. Petrasek, J. *et al.* Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 249–256 (2015).
46. Iracheta-Vellve, A. *et al.* Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.* **63**, 1147–1155 (2015).
47. Llopis, M. *et al.* Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* **65**, 830–839 (2016).
48. Bode, J. C., Bode, C., Heidelberg, R., Dürr, H. K. & Martini, G. A. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology.* **31**, 30–34 (1984).

49. Sarin, S. K., Pande, A. & Schnabl, B. Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease. *J. Hepatol.* **70**, 260–272 (2019).
50. Saha, B. *et al.* Biomarkers of Macrophage Activation and Immune Danger Signals Predict Clinical Outcomes in Alcoholic Hepatitis. *Hepatology* **70**, 1134–1149 (2019).
51. Bernd Schnabl & David A. Brenner. Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology* **146**, 1513–1524 (2014).
52. Brandl, K. *et al.* Dysregulation of serum bile acids and FGF19 in alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* **69**, 396–405 (2018).
53. Cresci, G. A. *et al.* Prophylactic tributyrin treatment mitigates chronic-binge ethanol-induced intestinal barrier and liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 1587–1597 (2017).
54. Chen, P. *et al.* Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* **148**, 203–214.e16 (2015).
55. Hendriks, T. *et al.* Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut* **68**, 1504–1515 (2019).
56. Riva, A. *et al.* Mucosa-associated invariant T cells link intestinal immunity with antibacterial immune defects in alcoholic liver disease. *Gut* **67**, 918–930 (2018).
57. Petrasek, J. *et al.* IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 3476–3489 (2012).
58. Odena, G. *et al.* LPS-TLR4 Pathway Mediates Ductular Cell Expansion in Alcoholic Hepatitis. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
59. Iracheta-Vellve, A. *et al.* Interleukin-1 inhibition facilitates recovery from liver injury and promotes regeneration of hepatocytes in alcoholic hepatitis in mice. *Liver Int.* **37**, 968–973 (2017).
60. An, L., Wang, X. & Cederbaum, A. I. Cytokines in alcoholic liver disease. *Arch. Toxicol.* **86**, 1337–1348 (2012).
61. Kitazawa, T. *et al.* The Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  by Macrophages in Rats With Acute Alcohol Loading. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **27**, 72S–75S (2003).
62. Browning, J. & Horton, J. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* **114**, 147–152 (2004).
63. Diehl, A. M. Recent events in alcoholic liver disease: V. Effects of ethanol on liver regeneration. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, (2005).
64. Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* **26**, 1175–1186 (2006).
65. Aldred, A. & Nagy, L. E. Ethanol dissociates hormone-stimulated cAMP production from inhibition of TNF- $\alpha$  production in rat Kupffer cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **276**, (1999).



66. Zuwała-Jagiełło, J., Pazgan-Simon, M., Simon, K. & Warwas, M. Advanced oxidation protein products and inflammatory markers in liver cirrhosis: A comparison between alcohol-related and HCV-related advanced oxidation protein products (AOPPs) related cirrhosis. *Acta Biochim. Pol.* **58**, 59–65 (2011).
67. Sowa, J. P. *et al.* Non-invasive separation of alcoholic and non-alcoholic liver disease with predictive modeling. *PLoS One* **9**, (2014).
68. Kawaratani, H. *et al.* Innate immune reactivity of the liver in rats fed a choline-deficient L-amino-acid-defined diet. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6655–6661 (2008).
69. Jimuro, Y., Gallucci, R. M., Luster, M., Kono, H. & Thurman, R. G. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* **26**, 1530–1537 (1997).
70. Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* **275**, 2247–2250 (2000).
71. Hong, F. *et al.* Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: Involvement of induction of bcl-2 and bcl-xl proteins. *Oncogene* **21**, 32–43 (2002).
72. Mathurin, P. *et al.* Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* **32**, 1008–1017 (2000).
73. Latvala, J. *et al.* Immune responses to ethanol metabolites and cytokine profiles differentiate alcoholics with or without liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 1303–1310 (2005).
74. Lee, M. R., Abshire, K. M., Farokhnia, M., Akhlaghi, F. & Leggio, L. Effect of oral alcohol administration on plasma cytokine concentrations in heavy drinking individuals. *Drug Alcohol Depend.* **225**, (2021).
75. Cressman, D. E. *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science (80-. ).* **274**, 1379–1383 (1996).
76. Affò, S. *et al.* Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis. *Gut* **62**, 452–460 (2013).
77. Español-Suñer, R. *et al.* Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* **143**, (2012).
78. Stutchfield, B. M. *et al.* CSF1 Restores Innate Immunity after Liver Injury in Mice and Serum Levels Indicate Outcomes of Patients with Acute Liver Failure. *Gastroenterology* **149**, 1896–1909.e14 (2015).
79. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 173–179 (2011).
80. Bird, T. G. & Forbes, S. J. Two Fresh Streams to Fill the Liver's Hepatocyte Pool. *Cell Stem Cell* **17**, 377–378 (2015).
81. Font-Burgada, J. *et al.* Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without

- Giving Rise to Cancer. *Cell* **162**, 766–779 (2015).
82. Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C. Y. & Nusse, R. Self-renewing diploid Axin2 + cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* **524**, 180–185 (2015).
  83. Boulter, L., Lu, W. Y. & Forbes, S. J. Differentiation of progenitors in the liver: A matter of local choice. *J. Clin. Invest.* **123**, 1867–1873 (2013).
  84. Carpino, G. *et al.* Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* **63**, 1220–1228 (2015).
  85. Zuñiga-Aguilar, E. & Ramírez-Fernández, O. Fibrosis and hepatic regeneration mechanism. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 1–23 (2022).
  86. Carpino, G. *et al.* Stem/Progenitor Cell Niches Involved in Hepatic and Biliary Regeneration. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
  87. Sancho-Bru, P. *et al.* Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* **55**, 1931–1941 (2012).
  88. Brill, S., Zvibel, I., Halpern, Z. & Oren, R. The role of fetal and adult hepatocyte extracellular matrix in the regulation of tissue-specific gene expression in fetal and adult hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 43–50 (2002).
  89. Wang, Y. *et al.* Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* **53**, 293–305 (2011).
  90. Kallis, Y. N. *et al.* Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut* **60**, 525–533 (2011).
  91. Lorenzini, S. *et al.* Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* **59**, 645–654 (2010).
  92. Clària, J. *et al.* Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* **64**, 1249–1264 (2016).
  93. Shubham, S. *et al.* Cellular and functional loss of liver endothelial cells correlates with poor hepatocyte regeneration in acute-on-chronic liver failure. *Hepatol. Int.* **13**, 777–787 (2019).
  94. Xiang, X. *et al.* Interleukin-22 ameliorates acute-on-chronic liver failure by reprogramming impaired regeneration pathways in mice. *J. Hepatol.* **72**, 736–745 (2020).
  95. Macdonald, S. *et al.* Cell death markers in patients with cirrhosis and acute decompensation. *Hepatology* **67**, 989–1002 (2018).
  96. Van Haele, M., Snoeck, J. & Roskams, T. Human liver regeneration: An etiology dependent process. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  97. Sato, K. *et al.* Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* **69**, 420–430 (2019).
  98. Gouw, A., Clouston, A. & Theise, N. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* **54**, 1853–1863 (2011).

99. Eleazar, J. A. *et al.* Progenitor cell expansion: An important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis. *J. Hepatol.* **41**, 983–991 (2004).
100. Rókusz, A. *et al.* Quantitative morphometric and immunohistochemical analysis and their correlates in cirrhosis-A study on explant livers. *Scand. J. Gastroenterol.* **51**, 86–94 (2016).
101. Rókusz, A. *et al.* Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models. *PLoS One* **12**, (2017).
102. Shubham, S. *et al.* Cellular and functional loss of liver endothelial cells correlates with poor hepatocyte regeneration in acute-on-chronic liver failure. *Hepatol. Int.* **13**, 777–787 (2019).