

## INTRODUZIONE

Le malattie epatiche croniche rappresentano un problema di notevole rilevanza sociale che si ritiene possa interessare fino a 5 milioni di persone in Italia (5-10% della popolazione generale); il decorso può variare da un paziente all'altro, fino ad evolvere, in circa il 30% dei casi, in cirrosi epatica.

La prevalenza di cirrosi è stata stimata intorno allo 0,15% negli Stati Uniti, con dati sostanzialmente simili anche in Europa, con numeri ancora più alti nella maggior parte dei paesi africani e asiatici (dove l'epatite virale cronica B o C è comune).

La mortalità per cirrosi in Italia ha avuto un forte incremento tra il 1960 e la seconda metà degli anni '70, per poi mostrare una tendenza alla riduzione; questa tendenza ha determinato un tasso di mortalità annuo da 14,8 per 100.000/abitanti nel 1961, a circa 40 alla fine degli anni '70 ed infine inferiore a 20 nel 1998.

La mortalità si è dunque dimezzata negli ultimi 30 anni come conseguenza in particolare della riduzione del numero di nuovi infetti con HBV e HCV. Nel corso del tempo, tuttavia, la

cirrosi epatica resta ancora ampiamente diffusa e tutt'ora nel mondo occidentale rappresenta la **quinta causa di morte**.

Oltre le cause infettive, numerose sono le patologie che in tempi più o meno lunghi comportano la trasformazione di un fegato normale in un fegato cirrotico.

Tali epatopatie possono essere così classificabili:

 epatite cronica virale (B, C, D)

 epatite cronica da farmaci

 epatite cronica autoimmune

 epatiti croniche colestatiche

-Cirrosi Biliare Primitiva

-Colangite Sclerosante Primaria

-Sindromi Overlap

 epatite Cronica Alcolica

 epatiti croniche metaboliche (M. di Wilson, emocromatosi, deficit di  $\alpha$ 1 antitripsina)

 steatoepatite non-alcolica

Tutte le malattie descritte determinano una reazione necro-infiammatoria epatica, che innesca, come meccanismo

riparativo, la deposizione di tessuto fibroso nel parenchima epatico. L'incremento progressivo, negli anni, di fibrosi può determinare in alcuni soggetti lo sviluppo della cirrosi.

## **1. LA FIBROSI EPATICA**

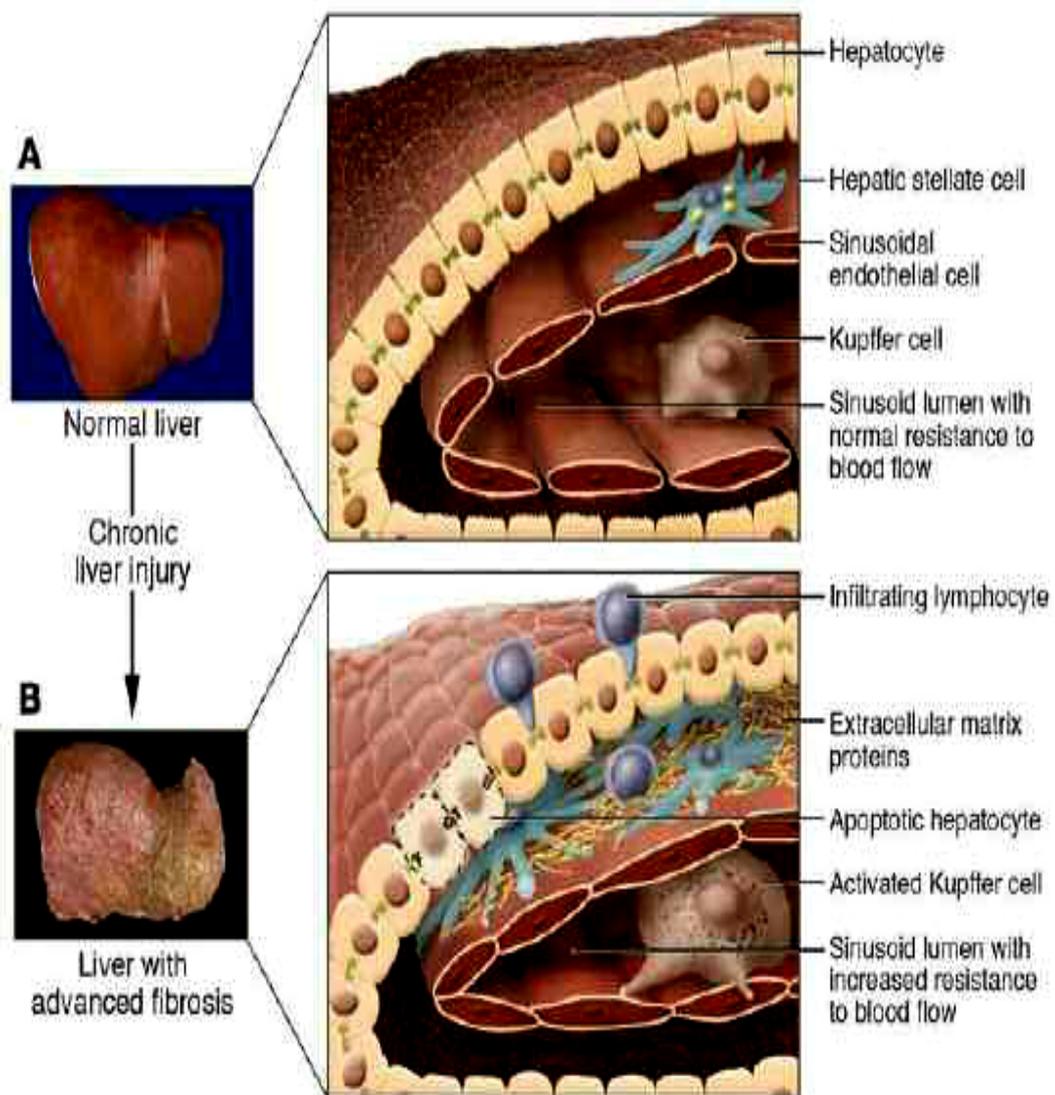
La fibrosi epatica costituisce una alterata risposta riparativa al danno epatico cronico, la cui progressione conduce al completo sovvertimento strutturale del fegato che caratterizza l'evoluzione cirrogena e le sue complicanze.

La fibrosi epatica è un processo dinamico che interessa il parenchima epatico. In passato, si credeva che la fibrosi epatica fosse un processo irreversibile. Tuttavia, le attuali evidenze scientifiche ci permettono di considerare la fibrosi come un processo attivo, potenzialmente reversibile.

Indipendentemente dall'agente eziologico che l'ha causata, la necrosi prolungata, caratteristica delle epatopatie croniche, costituisce il meccanismo di partenza fondamentale del processo fibrogenetico, caratterizzato da una eccessiva ed alterata produzione di componenti della matrice extracellulare (ECM) e in particolare collagene di tipo fibrillare (tipo I e III) nonché proteoglicani e proteine di tipo strutturale quali fibronectina, laminina, tenascina.

In associazione all'aumentata produzione di matrice, la deposizione di tessuto fibroso è inoltre condizionata da una disregolazione dei sistemi deputati alla degradazione delle componenti della matrice stessa, in particolare il sistema delle metalloproteinasi (MMPs) e dei loro inibitori (TIMPs).

La popolazione cellulare epatica principalmente coinvolta nel processo fibrogenetico è costituita dalle cellule stellate epatiche (HSC), denominate anche lipociti o cellule di Ito, le quali rappresentano la sorgente più importante di ECM nel fegato (fig. 1).

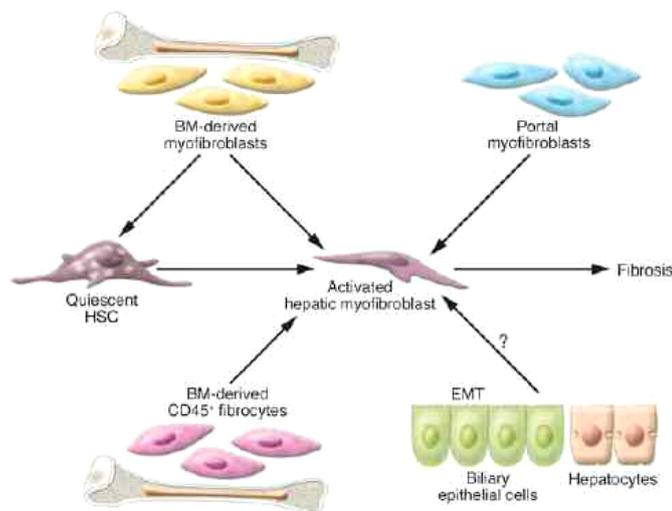


**Figura 1** Cambiamenti dell'architettura epatica associati al progredire della fibrosi (*J Clin Invest* 2005)

## ***1.1 Fibrogenesi***

La produzione di collagene e altre proteine della matrice extracellulare è finemente regolato da citokine e fattori della crescita che vengono a loro volta indotti dal processo di flogosi e di rigenerazione epatocitaria. L'elemento centrale che regola l'insieme delle reazioni di guarigione dalle noxae patogene, è stato identificato nelle cellule stellate o cellule di Ito. Queste cellule non parenchimali sono presenti in tutto il parenchima epatico, localizzate all'interno dello spazio di Disse, a sede perisinusoidale, che in condizioni fisiologiche, oltre al tipico aspetto stellato che consente loro l'interconnessione con gli altri elementi cellulari del microambiente epatico (epatociti, cellule kupffer, cellule endoteliali, biliociti), presentano abbondanti inclusi lipidici ricchi di vitamina A. Oltre alla loro capacità di accumulare esteri del retinolo, le HSC sono implicate nel normale turnover della ECM, nella regolazione del flusso sinusoidale e nella modulazione della omeostasi del microambiente epatico. Durante le condizioni di danno epatocitario si assiste ad un processo di attivazione delle HSC che si caratterizza per il

passaggio dal fenotipo quiescente "fat storing" a quello attivato, in cui le HSC acquisiscono un fenotipo simil-miofibroblastico (fig. 2).



**Figura 2** Rappresentazione schematica delle popolazioni miofibroblastiche coinvolte nella fibrosi epatica .

Tale processo, condizionato da stimoli paracrini rilasciati dagli epatociti danneggiati o prodotti dalle cellule infiammatorie, come fattori di crescita (TGF- $\beta$ 1, PDGF, insulina, IGF) o prodotti dello stress ossidativo (ROS, aldeidi tossiche), coinvolge importanti cambiamenti morfologici e di

espressione genica che si traducono nella graduale perdita del contenuto in retinoidi, aumento di markers miofibroblastici (come l' $\alpha$ -actina del muscolo liscio, aumento dell'indice proliferativo e aumentata sintesi delle proteine della matrice, in particolare di collagene fibrillari).

Il miofibroblasto è in grado di contrarsi e di regolare il calibro dei sinusoidi epatici, modificando le caratteristiche emodinamiche locali. Inoltre secerne collagene, altre proteine della matrice, una molteplicità di fattori della crescita e citokine.

Tra queste ultime, di particolare importanza risultano: l'IL-6 (che è una proteina di fase acuta) e l'IL-10 che ha effetti antinfiammatori e antifibrogenetici nonché proteine di adesione per i leucociti e di attivazione dei mastociti.

Tra i fattori della crescita più importanti sono da ricordare le l'M-CSF e l'SCF (Macrophage-Colony Stimulating Factor e Stem Cell Factor, rispettivamente).

Il reclutamento di cellule infiammatorie e la produzione di proteine della matrice sono i fondamentali passi in grado di

eliminare i tessuti danneggiati e di ricostituire le parti mancanti conducendo a guarigione.

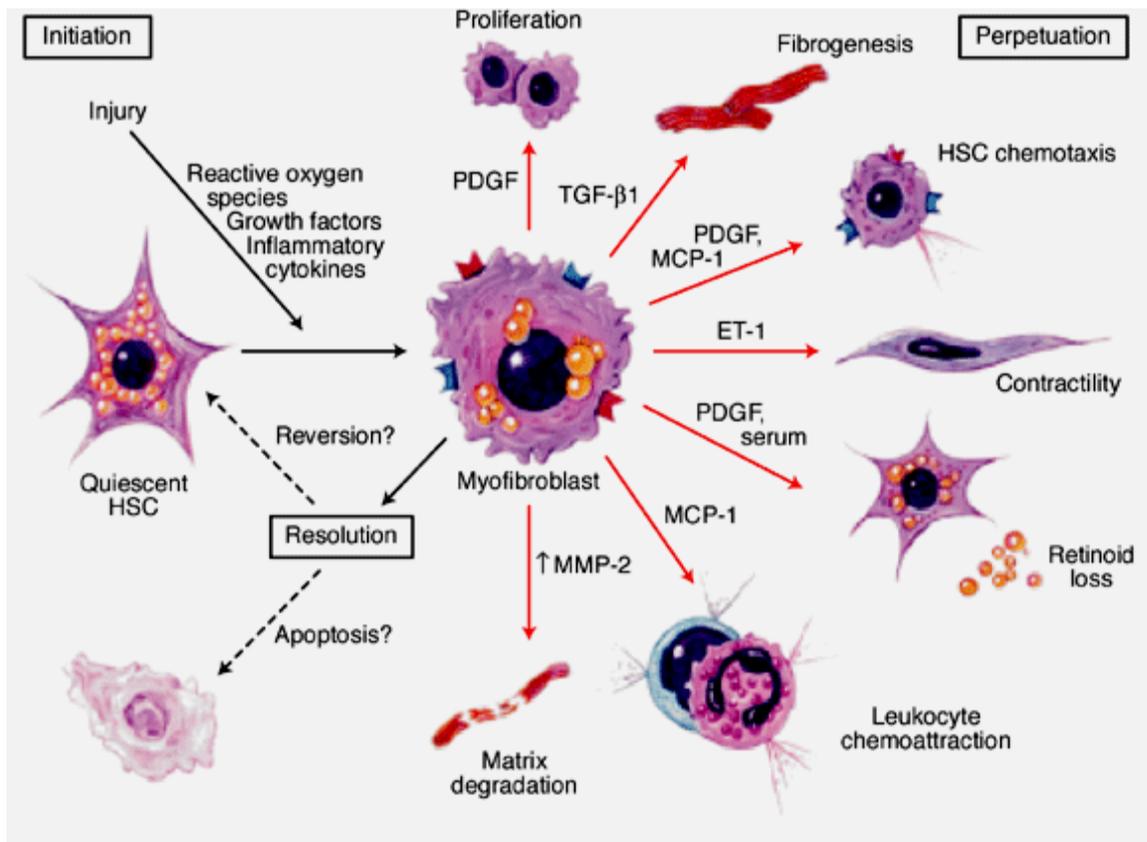
In situazioni “normali”, questa sequenza è ben regolata ed a un insulto acuto fa seguito la rigenerazione sia della matrice che del parenchima con completa restitutio ad integrum dell’organo. Il processo ben coordinato dalle cellule di Ito, comporta anche la rigenerazione dei vasi e dei colangioli.

Quando la noxa persiste cronicamente, la continua stimolazione delle cellule che mediano il processo della rigenerazione e della infiammazione, possono perdere il fine controllo della produzione della matrice, proporzionalmente alla rigenerazione parenchimale, portando, a lungo termine, al sovvertimento della normale architettura epatica. La fibrosi, a sua volta, può andare incontro ad un processo di “maturazione” del collagene (con irrigidimento dei setti ed aumento della pressione sinusoidale e capillare) ed “autoinduzione” con progressivo peggioramento dello stadio della fibrosi anche dopo che la noxa tossica o anche virale ha cessato di agire sul fegato.

Altri elementi cellulari importanti nella genesi della cirrosi sono le cellule di Kupffer che producono TNF- $\alpha$ , l'IL-1 e l'IL-6, citokine proinfiammatorie in risposta ad agenti esogeni ed endotossine di origine intestinale; i fibroblasti e altre cellule non parenchimali che producono TGF- $\beta$ ; gli epatociti stessi che producono EGF con effetto autocrino e paracrino.

Il processo di attivazione delle cellule stellate è strettamente programmato in una sequenza specifica. Il primo evento, definito stadio “pre-infiammatorio” o di “inizializzazione”, comprende la attivazione dei vari geni che rendono le stesse cellule suscettibili all'azione di citokine ed altri stimoli locali. Questa fase è collegata anche alla risposta delle cellule stellate a mediatori con effetti paracrini prodotti dalle cellule infiammatorie, dagli epatociti e dai colangiociti danneggiati o da modifiche della composizione della matrice stessa. La risposta cellulare alla fase pre-infiammatoria è definita “perpetuazione” perché porta alla amplificazione del fenotipo attivato mediante la produzione di altri fattori di crescita e alla accentuazione della risposta agli stimoli con un andamento ciclico auto perpetuantesi. Anche questa fase è un processo

dinamico e variabile che porta, in caso di risoluzione, alla fase definitiva di “disattivazione” delle cellule stellate per apoptosi o per de differenziazione (fig. 3).



**Figura 3** Caratteristiche fenotipiche delle cellule stellate epatiche attivate in corso di danno epatico

Nella fase di inizializzazione intervengono tutte le cellule epatiche: endoteliali sinusoidali, cellule di Kupffer, epatociti, piastrine e leucociti. Le cellule endoteliali intervengono anche nella fase di attivazione, producendo fibronectina e attivando il TGF- $\beta$  a partire dal suo precursore inattivo. Anche le cellule di Kupffer partecipano alla attivazione delle cellule di Ito producendo TGF- $\beta$ , altre citochine e prodotti di lipoperossidazione che inducono la produzione di componenti della matrice da parte delle cellule stellate, anche attraverso la secrezione di metalloproteinasi come la MMP-9 (o gelatinasi B). Questa attiva il TGF- $\beta$  latente il quale induce le cellule stellate a produrre collagene, tale fenomeno verrà descritto nei dettagli durante la trattazione. Probabilmente le cellule di Kupffer producono anche radicali liberi e ossido nitrico che hanno invece effetti opposti sulle cellule stellate e sulla induzione di fibrosi. Effetti analoghi alle cellule di Kupffer sono prodotti dall'infiltrazione leucocitaria, in particolare neutrofila.

Gli agenti enzimatici coinvolti nella degradazione della matrice sono molteplici e abitualmente agiscono in sinergia

potendo avere effetti diversi a seconda del rapporto relativo tra i vari componenti. Si tratta delle metalloproteinasi di matrice, enzimi che in presenza di calcio agiscono su substrati specifici: colleagenasi interstiziali (MMP-1, -8, -13), Gelatinasi (MMP-2 e -9), stromalisine di membrana (MMP-3, -7, -10, -11) (MMP-14, 15, -16, -17, -24, -25) ed una metalloelastasi (MMP-12). L'attivazione delle MMP avviene per clivaggio proteolitico e la loro inibizione per legame con inibitori specifici, le TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases), le quali si legano secondo rapporti molecolari ben definiti. L'azione degradativa può essere patologica quando degrada la matrice subendoteliale nelle fasi precoci di infiammazione o degenerazione, determinando il collasso della struttura di sostegno degli epatociti. Al contrario, la mancata degradazione della matrice accumulata conduce, alla lunga, alla fibrosi e alla cirrosi. La progressione della fibrosi in corso di cirrosi sembra, in effetti, essere piuttosto secondaria alla eccessiva produzione di inibitori delle metalloproteinasi come TIMP-1 e TIMP-2, che sono prodotte dalle cellule stellate e sicuramente orientano il bilancio verso l'accumulo di matrice.

Segnali di regolazione della apoptosi (sopravvivenza) delle cellule stellate attivate, sembrano derivare proprio da complesse interazioni tra MMPs e TIMPs; si segnala in particolare l'effetto antiapoptotico della TIMP-1. Altri segnali di sopravvivenza derivano dalle interazioni dirette tra cellule stellate e componenti della matrice stessa come il collagene di tipo 1.

Poco chiari sono i meccanismi di controllo del processo fibrogenico e di attivazione delle HSC in corso di patologie croniche dell'albero biliare. Le colangiopatie, indipendentemente dalla loro eziologia, sono accumulate da uno sbilanciamento tra la proliferazione e la morte dell'epitelio biliare che si associa ad una progressiva fibrosi fino alla cirrosi. Alcuni meccanismi molecolari coinvolti parallelamente nella proliferazione/morte dei colangiociti e l'attivazione delle cellule stellate coinvolgono per esempio la risposta agli acidi biliari che si accumulano nel fegato durante le malattie colestatiche e che da un lato inducono l'apoptosi dei colangiociti e degli epatociti e dall'altro lato stimolano la proliferazione delle HSC via l'attivazione della cascata

segnalica indotta dall'attivazione del recettore EGF. Nell'ottica della comprensione dei meccanismi che controllano le interazioni tra sistema biliare e HSC, è interessante notare che sia i colangiociti come le cellule stellate possono presentare caratteristiche neuroendocrine e che il sistema nervoso autonomo di tipo sia colinergico che adrenergico, controlla direttamente o indirettamente risposte di tipo proliferativo e funzionale in corso di danno epatico cronico colestatico o parenchimale. Il sistema recettoriale degli oppioidi endogeni potrebbe costituire un importante sistema di cross-talk tra sistema biliare e cellule stellate. Infatti gli oppioidi endogeni svolgono un importante ruolo regolatorio della crescita non solo a livello del sistema nervoso ma anche in cellule non neuronali. Gli oppioidi endogeni svolgono la loro azione legandosi a tre specifici recettori ( $\delta$ OR,  $\mu$ OR,  $\kappa$ OR), che appartengono alla famiglia delle G-protein. È interessante notare che, in corso di colestasi cronica, i livelli di oppioidi plasmatici ed epatici sono marcatamente elevati. Inoltre i livelli plasmatici degli oppioidi sono aumentati in corso di epatopatie acute e croniche, con livelli proporzionali all'entità del danno epatico. Da notare che in corso di colestasi

sperimentale ed in pazienti con cirrosi biliare primitiva (la più comune delle colangiopatie degli adulti), i colangiociti esprimono RNA messaggero per gli oppioidi, facendo ipotizzare che gli oppioidi possano esercitare un' azione autocrina e paracrina sia sui colangiociti che sulle HSC.

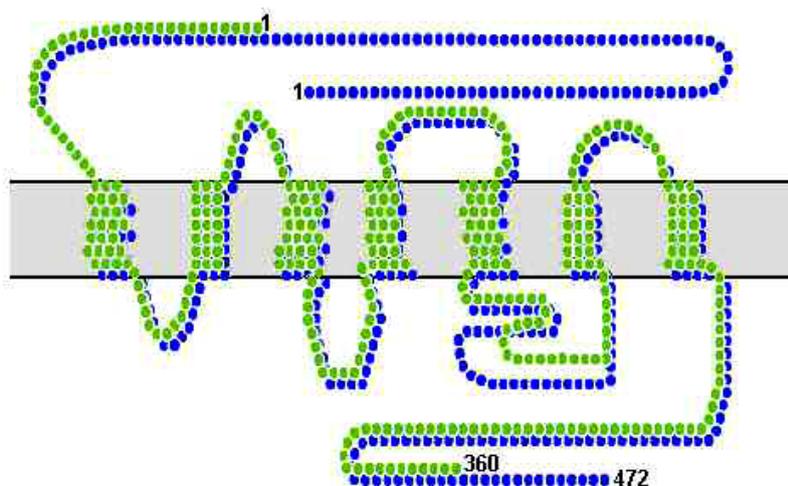
La riduzione della fibrosi può essere ottenuta da una ridotta attività miofibroblastica del fegato, derivante dalla inibizione della sintesi dei componenti della ECM, o dalla maggiore degradazione di ECM. I dati clinici hanno dimostrato che anche la fibrosi epatica avanzata può essere inibita e invertita. Tuttavia, i composti con attività antifibrotici, potenzialmente utili nella pratica clinica, sono ancora sotto inchiesta.

## **2. IL SISTEMA DEI CANNABINOIDI E DEGLI ENDOCANNABINOIDI**

### ***2.1 Fisiologia e Patologia***

Il cannabinoide scoperto, nel 1964, fu il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC), il componente psicoattivo della *Cannabis sativa*. A seguito di questa constatazione è stata la scoperta e la determinazione dei recettori dei cannabinoidi nel tessuto nervoso. I primi risultati sono stati ottenuti da Matsuda et al (*Nature* 1990).

Gli studi sul possibile meccanismo d'azione dei derivati della *Cannabis* e, di conseguenza, sulle potenziali applicazioni terapeutiche di questi ultimi, hanno subito un'improvvisa accelerazione con la scoperta di specifici recettori per il THC nonché di ligandi endogeni per tali proteine. Sono stati caratterizzati finora due tipi di recettori per il THC e i suoi derivati sintetici: il recettore CB1, prevalentemente espresso nel sistema nervoso ed in alcuni tessuti periferici, scoperto nel 1990, e il recettore CB2, identificato finora solo in cellule del sistema immunitario dei mammiferi, individuato per la prima volta solo nel 1993 (fig. 4).

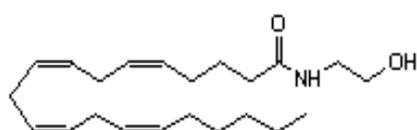


**Figura. 4** Struttura molecolare dei recettori CB1( ) e CB2( )

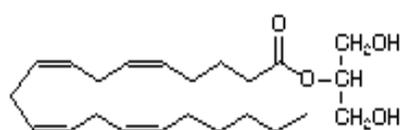
I recettori CB1 sono presenti anche nel fegato e sembrano essere coinvolti, almeno nel topo, nei processi di lipogenesi e nello sviluppo della steatosi epatica.

Alla scoperta del recettore CB1 ha fatto immediato seguito, nel 1992, l'isolamento, dal cervello di maiale, del primo metabolita endogeno in grado di legarsi selettivamente a tale proteina. Si trattava dell'amide tra l'acido arachidonico e l'etanolamina, due componenti ubiquitari delle membrane cellulari animali, chiamata **anandamide**, dalla parola ananda

(stato di grazia). Successivamente furono isolati, ancora dal cervello di maiale, altri due analoghi strutturali dell'anandamide, mentre un'altro tipo di molecola, appartenente alla classe dei metaboliti intermedi noti come monoacilgliceroli, fu identificata in tessuti periferici e proposta come ligando del recettore CB2: il **2-arachidonoilglicerolo (2-AG)**. In seguito venne osservato che mentre l'anandamide e i suoi analoghi attivavano preferenzialmente il recettore CB1, il 2-AG, che è presente anche nel cervello dei mammiferi, poteva attivare indifferentemente entrambi i tipi di recettori per il THC.



ANANDAMIDE  
(CB<sub>1</sub>)



2-ARACHIDONOYL-  
GLYCEROL (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>)

I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi sono una famiglia numerosa di molecole di piccole dimensioni e con proprietà lipofile, accomunate dal punto di vista strutturale, dal fatto di essere delle amidi di acidi grassi. Essi vengono sintetizzati

“a richiesta” per l’azione di specifiche vie enzimatiche che utilizzano, come substrato di partenza, dei fosfolipidi abbondantemente presenti nella struttura della membrana plasmatica.

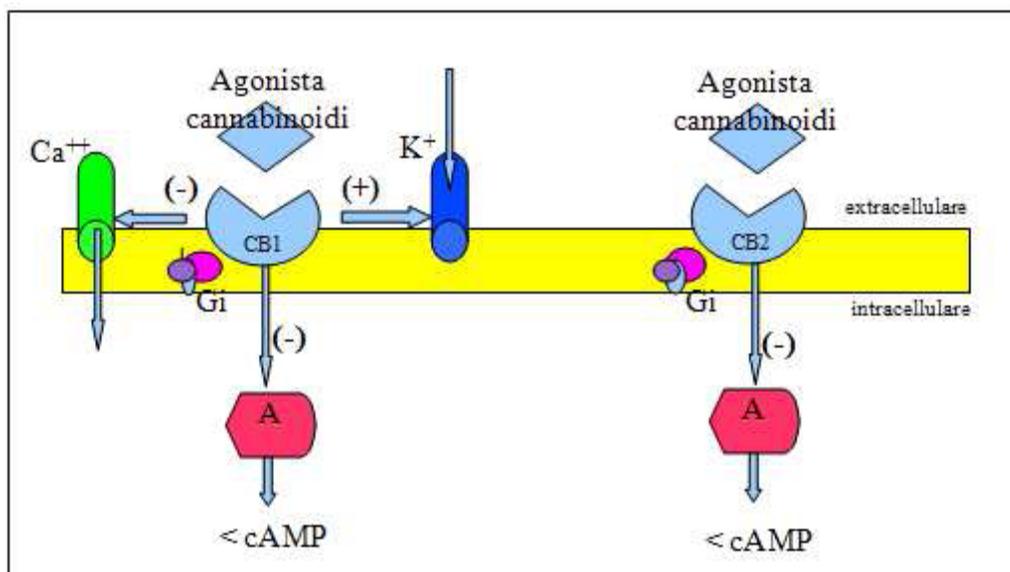
I recettori dei cannabinoidi sono accoppiati alla proteina G. La stimolazione di tali recettori inibisce l'enzima adenil-ciclastasi endocitoplasmatica e quindi la produzione di AMP ciclico, effetto contrario a quello della adrenalina.

I loro ligandi sono i cannabinoidi: endocannabinoidi, cannabinoidi naturali e cannabinoidi di sintesi.

Il sistema endocannabinoide è un sistema fisiologico presente sia nel cervello che nei tessuti periferici (compresi gli adipociti), che esplica effetti sul bilancio energetico, sul metabolismo del glucosio e dei lipidi e sul peso corporeo, mentre nei neuroni del sistema mesolimbico modula l'assunzione di alimenti dolci o grassi di sapore altamente gradevole. Il CB1, è localizzato prevalentemente nel sistema nervoso centrale e periferico (nei gangli della base, nel cervelletto, strati 1 e 6 della corteccia, ippocampo, ipotalamo, nuclei talamici, tronco encefalico) ma anche in periferia (vescica, occhio, intestino, fegato, muscolo e tessuto adiposo).

E' stato dimostrato che il segnale mediato dai recettori CB1 regola l'assunzione di alimenti ad alto contenuto calorico e alcol, l'omeostasi energetica e la lipogenesi epatica. Il secondo, CB2, è collocato a livello del sistema immunitario periferico (timo, tonsille, midollo osseo, milza, pancreas, terminazioni nervose periferiche, cellule delle microciglia). Inoltre, la loro presenza a livelli bassi, è stata confermata in diversi altri tessuti e cellule, come miofibroblasti epatici.

Come già precedentemente accennato, entrambi i recettori dei cannabinoidi sono accoppiati ad una proteina G. Molte molecole di segnale, idrosolubili (e quindi incapaci di attraversare la membrana cellulare), agiscono attraverso un "secondo messaggero" intracellulare: la molecola agonista si lega alla faccia esterna di una proteina transmembrana, il legame attiva una "proteina G" localizzata all'interno della membrana cellulare, che a sua volta modifica l'attività di un effettore, un enzima oppure un canale ionico. Quest'ultimo provoca il rilascio all'interno della cellula del "secondo messaggero" che porta il proprio segnale al destinatario finale producendo l'effetto biologico voluto (fig. 5) .



**Figura. 5** Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi.

La stimolazione dei recettori CB1 rende conto degli effetti euforizzanti dei cannabinoidi ma anche della loro azione antiemetica, antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria, analgesica, antispastica e stimolante dell'appetito. La stimolazione dei recettori CB2 sembra essere responsabile principalmente dell'azione infiammatoria e immunomodulatrice dei cannabinoidi.

## ***2.2 Cannabinoidi nella fibrosi epatica***

L'espressione dei recettori dei cannabinoidi nel fegato normale è molto bassa. Tuttavia, molti studi hanno dimostrato l'up-regolazione dell'espressione dei recettori CB1 e CB2 in miofibroblasti epatici e nelle cellule endoteliali, così come una maggiore concentrazione degli endocannabinoidi, soprattutto AEA, nel fegato, nel corso di malattie croniche epatiche in progressione. Teixeira-Clerc et al (*Nat Med.* 2006) hanno fornito la prova del coinvolgimento dei recettori CB1 nella regolazione della fibrosi epatica e l'effetto profibrogenico di CB1. L'aumentata espressione dei recettori CB1 è stata osservata in campioni di fegato cirrotico umano, soprattutto nelle cellule di Ito durante la loro trasformazione in miofibroblasti in corso di danno epatico cronico. Inoltre, l'inattivazione di CB1 è stata dimostrata in tre modelli sperimentali di danno epatico indotto da CCl<sub>4</sub>, tioacetammide o colestasi biliare. I risultati favorevoli antifibrogenici sono stati ottenuti mediante l'inattivazione farmacologica con Rimonabant (SR141716), un antagonista selettivo del recettore CB1, e attraverso l'inattivazione genetica in omozigosi di topi

CB1-carenti. La ridotta progressione della fibrosi si è associata a ridotta espressione epatica TGF- $\beta$ , inibizione della crescita e ad un aumento dell'apoptosi dei miofibroblasti. Questi effetti sembrano derivare dalla riduzione della fosforilazione della proteina chinasi B (PKB / Akt) ed extracellulare signal-regulated chinasi (ERK), influenzando così le vie responsabili della proliferazione cellulare e della loro sopravvivenza.

Anche se il recettore CB1 è noto per avere effetti profibrogenici, gli studi sul recettore CB2 hanno dimostrato la sua attività antifibrogenica nel fegato. Topi knockout CB2 hanno sviluppato un'accelerazione nella progressione verso la cirrosi quando questo viene esposto a CCl<sub>4</sub>, rispetto al wild type. È stato dimostrato, nel fegato di uomini affetti da cirrosi epatica, che l'espressione del recettore CB2 è limitato principalmente alle cellule muscolari situate all'interno dei setti fibrosi, per il corretto funzionamento  $\alpha$ -actina, tuttavia, si riscontra anche in cellule non-parenchimali, cellule infiammatorie, del dotto biliare e nelle cellule epiteliali adiacenti a setti fibrosi. Queste evidenze si sono ottenute da colture su miofibroblasti epatici umani e CSE ratto attivati, che hanno mostrato di esprimere il recettore CB2. L'effetto finale

della stimolazione del recettore CB2 con THC o agonista selettivo JWH-015 si è dimostrato dose-dipendente ed espresso come inibizione della crescita o dell'apoptosi. È interessante notare come questi due eventi siano il risultato di due percorsi distinti. L'induzione della cicloossigenasi-2 (COX-2) inibisce l'apoptosi mediante una inibizione della crescita e dello stress ossidativo intracellulare, indotte da inibitori selettivi della COX-2, e da due potenti antiossidanti. Inoltre, a parte i meccanismi recettore-dipendente delle azioni degli endocannabinoidi sulla CSE, il meccanismo diretto esercitato dalla AEA, che porta alla morte delle cellule, è stato osservato nella ricerca di Siegmund et al (*Hepatology* 2005). La stimolazione di colture di HSC umane con AEA induce la morte delle cellule nel percorso necrotico. Questo evento è preceduto dalla comparsa di specie reattive dell'ossigeno (ROS), formazione e aumento di  $Ca^{2+}$  intracellulare in CSE. L'inattivazione farmacologica di CB1, CB2 e vanilloide recettore-1 (VR1) non impedisce la morte cellulare AEA-triggered, che sembra essere mediato dal colesterolo di membrana. Inoltre, vi sarebbe una differenza in contenuto di colesterolo fra membrana cellulare di cellule staminali ed

epatociti, ciò produrrebbe una eliminazione selettiva di cellule staminali, più ricche in colesterolo. La conclusione della loro analisi è stata che AEA esercita un effetto potenziale antifibrogenico attraverso l'inibizione della proliferazione delle HSC e l' induzione di morte necrotica. Gli elevati livelli di AEA circolanti in pazienti cirrotici potrebbe riflettere la risposta normativa antifibrotica alla progressione della fibrosi. Tuttavia, a causa di effetti negativi , come l'innescare una risposta infiammatoria locale con danno e necrosi dei tessuti, così come l'induzione di vasodilatazione sistemica, l'utilità di AEA nel trattamento della fibrosi epatica è limitata.

### ***2.3 Cannabinoidi nella steatosi epatica***

La sindrome metabolica, con conseguente steatosi epatica, si è dimostrata una causa importante e frequente di danno epatico cronico, che va dalla semplice steatosi sino ad arrivare alla steatoepatite, che è accompagnata da reazione infiammatoria e progressiva fibrosi del tessuto epatico. Il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella patogenesi della malattia del

fegato grasso è stato dimostrato di recente. Dal momento che gli endocannabinoidi sono essenziali nella regolazione del bilancio energetico, l'assunzione di cibo e la lipogenesi, il deterioramento di questa omeostasi risultata in vari disturbi metabolici. Oltre all'azione centrale di controllo dell'omeostasi energetica attraverso recettori CB1 localizzati nel cervello, gli endocannabinoidi sembrano esercitare, attraverso recettori CB1-dipendente, anche effetti periferici sul metabolismo dei lipidi negli adipociti, fegato e muscolo scheletrico. Questo potrebbe essere parzialmente spiegato dalla aumentata espressione dei fattori di trascrizione lipogenici e l'attivazione di enzimi a valle, che si traducono in aumento della sintesi di acidi grassi. Inoltre, una dieta ricca di grassi ha dimostrato di contribuire a una maggiore espressione epatica dei recettori CB1 nel tessuto epatico e aumento locale dei livelli di endocannabinoidi, con conseguente incremento dello squilibrio metabolico.

#### ***2.4 Ruolo del sistema endocannabinoide nello stadio terminale di malattia epatica***

Il ruolo del sistema endocannabinoide nelle malattie del fegato è complesso. Tale ruolo è stato esaminato soprattutto nel fegato in stadio terminale di malattia ed è stato dimostrato come questo sistema contribuisca anche all'instaurarsi di encefalopatia epatica e agli effetti vascolari come l'ipertensione portale, vasodilatazione splancnica, ipotensione periferica relativa e, probabilmente, alla cardiomiopatia cirrotica.

Vi sono pochi dati ma attendibili sul ruolo neuroprotettivo del sistema endocannabinoide nell'encefalopatia epatica. È stato dimostrato in un modello murino che in corso di insufficienza epatica fulminante, i livelli di 2-AG nel cervello sono elevati, probabilmente in risposta al danno epatico. La somministrazione di CB2 ligando endogeno 2-AG, un antagonista del recettore CB1, SR141716A, o un agonista del recettore CB2, HU308, ha prodotto un notevole miglioramento nel punteggio neurologico. Ciò dimostra come l'utilizzo di cannabinoidi esogeni specifici per il recettore CB1 e CB2

potrebbero avere un benefico effetto terapeutico sulla disfunzione neurologica delle malattie epatiche in fase di scompenso. Ulteriori ricerche hanno indicato l'impatto di segnali CB2 mediati sull'attività cerebrale di protein chinasi AMP-attivata (AMPK) in condizioni di insufficienza epatica. E' stato dimostrato nei topi wild type che la somministrazione di THC porta ad una maggiore attività di AMPK con un miglioramento della sintomatologia neurologica, possibilmente attraverso la stimolazione dei recettori CB2, visto che tale effetto sarebbe assente in CB2 topi knock-out .

Numerosi effetti emodinamici contribuiscono alla prognosi infausta dei pazienti con epatopatia scompensata in stadio terminale. La ricostruzione di ciò che avviene nel fegato cirrotico si può schematizzare con un aumento delle resistenze nel circolo portale con conseguente aumento della pressione portale. Inoltre, la vasodilatazione arteriosa a livello del sistema splancnico e sistemica contribuisce all'istaurarsi della sindrome iperdinamica, ipotensione arteriosa e all'aumentato afflusso di sangue a livello delle arterie mesenteriche con il conseguente aggravarsi dell'ipertensione portale.

Gli effetti vascolari esercitati dagli endocannabinoidi sono diversi e complessi. Si ipotizza che gli endocannabinoidi possano contribuire al potenziamento dei disordini in corso di cirrosi, come è stato osservato in modelli animali.

Ci sono molte relazioni che collegano questi effetti vascolari con l'attività impropria del sistema endocannabinoide, in particolare con la stimolazione, da parte degli endocannabinoidi endogeni, del recettore CB1 delle cellule endoteliali. Lo stato del cirrotico è spesso accompagnato dalla endotossemia causata dal rilascio di lipopolisaccaride batterico (LPS) nella circolazione sistemica, sintetizzato dalla flora batterica intestinale, mentre la sua eliminazione epatica è insufficiente. Gli effetti del LPS sulla circolazione sistemica corrispondono alle variazioni emodinamiche osservate nella cirrosi. Batkai et al (*Nat Med* 2001) hanno dimostrato l'associazione tra il sistema endocannabinoide e la sua influenza sui cambiamenti della circolazione del paziente con cirrosi. E' stato dimostrato, in un modello animale di cirrosi complicata da alterazioni emodinamiche, che il trattamento con antagonista del recettore CB1 (SR141716A) ha comportato un netto miglioramento dello stato emodinamico di

questi soggetti, ciò si è tradotto in un aumento della pressione arteriosa, riduzione del flusso ematico mesenterico e riduzione della pressione portale. E' stato dimostrato che l'iniezione endovenosa della frazione di monociti isolati dal sangue di ratti cirrotici in un paziente con cirrosi, è stata in grado di indurre ipotensione. Questo effetto era reversibile mediante trattamento con SR141716A, mentre dopo l'iniezione di monociti provenienti da controlli non si assisteva a tale evento. Inoltre, l'esame di monociti di pazienti cirrotici e di controlli sani ha dimostrato un aumento dei livelli di AEA nei monociti dei soggetti cirrotici, ciò potrebbe essere il riflesso della stimolazione alla sintesi degli endocannabinoidi indotta dal LPS batterico, già documentato in altri studi. L'aumento dei recettori CB1, evidenziato nelle cellule endoteliali delle arterie isolate da fegato cirrotico, è stato confermato; ciò indica una sua maggiore sensibilità a stimoli vasodilatatori degli endocannabinoidi secreti dai monociti e dalle piastrine che aderiscono all'endotelio.

Un'altra importante osservazione si ha da studi che hanno dimostrato come l'inibizione del recettore CB1, mediata da SR141716A, in ratti con cirrosi epatica in fase preascitica,

fosse in grado di attenuare la ritenzione idrosalina e ritardare l'insorgenza di ascite.

Domenicali et al (*Gut*. 2005) hanno dimostrato che la risposta allo stesso farmaco era massima a livello dei vasi splancnici, mentre l'effetto vasodilatatore e l'alterata risposta ad alcuni vasocostrittori erano irrilevanti nell'arteria femorale. In questa ottica, è lecito aspettarsi che l'inibizione del recettore CB1 possa influire sul quadro emodinamico e sulla funzionalità renale. Verosimilmente lo SR141716A agirebbe in prima istanza sulle resistenze periferiche, soprattutto a livello splancnico; la normalizzazione del flusso pre-epatico promuoverebbe un riassetto della perfusione dell'organo. Questi cambiamenti si tradurrebbero in una diminuzione del sequestro di liquidi nel distretto splancnico e, in definitiva, in un miglioramento della funzionalità glomerulare.

La corretta localizzazione del recettore a livello epatico e peritoneale potrebbe permettere di approfondire i meccanismi attraverso i quali esso agisce sulla pressione portale. Infatti il farmaco, interferendo sulla vasodilatazione mesenterica, promuoverebbe due benefici; da un lato ridurrebbe la quota di

ipertensione portale sostenuta dall'iperafflusso splancnico, dall'altro potrebbe anche influire sulle resistenze intraepatiche.

Da un punto di vista non strettamente emodinamico, un possibile effetto diretto sul nefrone dovrebbe essere ricercato a livello del tubulo prossimale. Il decremento della produzione di NO che conseguirebbe l'inibizione del CB1 potrebbe mediare una riduzione della sintesi di prostanglandine, con conseguente diminuzione della secrezione di Renina.

Altri studi hanno segnalato un ruolo degli endocannabinoidi nello sviluppo della cardiomiopatia in corso di cirrosi epatica. Tale condizione è caratterizzata da una diminuita reattività  $\beta$ -adrenergica, compromissione della conduzione cardiaca e insufficiente contrazione del muscolo cardiaco conseguente a stimoli di eccitazione, mentre la gittata cardiaca rimane aumentata rispetto al basale. Gaskari et al (*Br J Pharmacol* 2005) hanno confermato, in un modello animale, il ruolo della segnalazione CB1 mediata nella patogenesi della cardiomiopatia cirrotica. E' stato dimostrato che, quando le unità contrattili del muscolo cardiaco di ratti cirrotici sono pre-incubati con l'antagonista CB1, AM251, la loro contrattilità è simile ai controlli sani. Il significato del segnale CB1 mediato

è stato dimostrato in vivo nei ratti cirrotici che presentavano sintomi conclamati di diminuita contrattilità cardiaca, ipotensione e tachicardia. Questi sintomi sono migliorati nei ratti cirrotici, mediante l'iniezione in bolo di AM251, mentre la sua somministrazione nei controlli non ha avuto alcun effetto. Quindi, gli autori hanno concluso che i suddetti effetti cardiaci potrebbero essere causati da un aumento della concentrazione di AEA nel tessuto cardiaco in corso di cirrosi epatica. Tale osservazione sembrerebbe essere stata confermata dall'evidenza che l'espressione dei recettori CB1 cardiaco era simile sia nei ratti cirrotici che in quelli non cirrotici. Queste osservazioni sono coerenti con lo studio di Bonz et al (*J Cardiovasc Pharmacol* 2003) che ha valutato l'influenza delle AEA sulla contrattilità del muscolo cardiaco umano atriale dopo stimolazione elettrica. L'effetto inotropo negativo esercitato da AEA e da altri agonisti CB1 esaminati è stato prevedibilmente abolito da pre-incubazione con antagonista CB1. Quindi, bloccando la segnalazione CB1 si potrebbero avere effetti terapeutici vantaggiosi su vari aspetti clinici della cardiomiopatia cirrotica e altre condizioni correlate.

### 3. ASPETTI CLINICI

Ci sono limitati dati clinici sugli effetti dei cannabinoidi nelle malattie croniche del fegato. Secondo una ricerca clinica di Hezode et al (*Hepatology* 2005), l'uso quotidiano di cannabis sembrerebbe essere un fattore indipendente di progressione della fibrosi nell'epatite cronica HCV correlata. Questo studio è stato effettuato su un gruppo di 270 pazienti con epatite cronica da virus C, suddivisi in utenti non-cannabis (52,2%), occasionali consumatori di cannabis (14,8%) e consumatori abituali di cannabis (33%). I dati raccolti sugli aspetti epidemiologici, demografici, metabolici e virologici, e la storia di uso di cannabis, abuso di alcool e tabacco, ha permesso loro di specificare i fattori di progressione della fibrosi. Questo studio ha confermato i ben noti fattori predittivi indipendenti di fibrosi come l'attività necro-infiammatoria  $\geq$  A2 (punteggio METAVIR), età  $>$  40 anni al tempo di esposizione, steatosi e abuso di alcool, ma ha anche valutato l'uso quotidiano di cannabis come fattore distinto che ha influenzato solo la progressione della fibrosi epatica. Ciò potrebbe derivare da un'attività profibrogenica di segnali CB1 mediati, implicando

così il potenziale beneficio terapeutico di antagonisti CB1. Inoltre, è stato dimostrato che il regolare uso quotidiano di cannabis ha un impatto significativo sulla gravità della steatosi, che può eventualmente contribuire alla progressione della fibrosi in corso di HCV.

E' stato dimostrato anche che un elevato introito di grassi con l'alimentazione aumenta i livelli epatici di AEA, espressione del recettore CB1 e aumenta la sintesi degli acidi grassi, contribuendo così ad uno stato di obesità e altre malattie metaboliche predisponenti la formazione di steatosi epatica. I meccanismi con cui gli endocannabinoidi porterebbero alla steatosi epatica associata all'obesità, o anche alla steatoepatite, sono meccanismi recettori CB1-dipendenti che comportano l'aumento dell'assorbimento degli acidi grassi, l'induzione della lipolisi negli adipociti, la stimolazione della lipogenesi epatica e una down-regulation di adiponectina nel tessuto adiposo. È interessante notare che, topi CB1 knockout sono resistenti all'obesità indotta dall'assunzione di alimenti ad alto contenuto calorico. Allo stesso modo, l'inattivazione farmacologica di recettori CB1 con Rimonabant (SR141716) si traduce in riduzione di obesità e di steatosi epatica nei roditori.

Numerosi sono gli studi sugli endocannabinoide come obiettivo terapeutico in varie condizioni patologiche. L'effetto benefico sulla regolamentazione del legame recettore per endocannabinoide e gli stessi e del conseguente segnale trasmesso che ne deriva è postulato nella gestione di varie condizioni patologiche, tra cui obesità e sindrome metabolica; dipendenza da alcool, tabacco e oppiacei; morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, la schizofrenia, perdita di memoria, dolore cronico, fibrosi epatica, e numerose malattie infiammatorie e allergiche. Grazie alla loro funzione di regolamentazione nelle malattie croniche epatiche, in particolare nella fibrosi, agendo su questi recettori si dimostrerebbe un target terapeutico vantaggioso. Sembra che il trattamento con antagonista CB1, CB2 o entrambi, possano offrire benefici clinici, causando almeno un rallentamento della progressione della malattia. E' stato anche dimostrato che bloccando il segnale CB1 mediato si hanno effetti benefici per il corretto mantenimento della pressione sistemica in ratti cirrotici ipotesi. Inoltre, in alcuni studi, Rimonabant ha esercitato ulteriori azioni benefiche influenzando il profilo dei lipidi nel sangue e il controllo della glicemia nell'obesità,

sindrome metabolica e diabete mellito tipo 2. Ha inoltre avuto un impatto significativo sulla modificazione dello stile di vita, per esempio, i tassi di cessazione al tabagismo sono risultati significativamente più elevati durante il trattamento con Rimonabant. È interessante notare che, Wang et al (*Proc Natl Acad Sci USA* 2003) hanno suggerito un possibile collegamento tra segnale CB1 mediato e la preferenza di etanolo in topi immaturi, e tale effetto è diminuito dopo la somministrazione di Rimonabant. Questa osservazione potrebbe essere particolarmente utile nei pazienti con malattia epatica alcolica che si ostinano a bere.

## CONCLUSIONI

Il ruolo del sistema endocannabinoide nella fisiopatologia epatica è stato studiato di recente. Senza dubbio, influenzando i segnali indotti da endocannabinoidi si può avere un effetto benefico nel ritardare o addirittura invertire la fibrosi epatica. A ciò si aggiunge un possibile ruolo terapeutico sulle complicanze della cirrosi. Ciò è di particolare importanza considerando che ancora oggi vi è mancanza di farmaci antifibrotici dai profili di attività vantaggiosi, nonostante anni di indagini su questo argomento. Quindi, ulteriori ricerche possono fornire il prezioso strumento di gestione sulla fibrosi epatica in futuro.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anderson NL, Esquer-Blasco R, Richardson F, Foxworthy P,Eacho P (1996) The effects of peroxisome proliferators on proteinabundances in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 137:75–89.
2. Avraham Y, Zolotarev O, Grigoriadis NC, Poutahidis T, Magen I, Vorobiav L, Zimmer A, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM (2008) Cannabinoids and capsaicin improve liver function following thioacetamide-induced acute injury in mice. *Am J Gastroenterol* 103:3047–3056.
3. Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev O, Silberman I, Ganzburg V, Dagon Y, Magen I, Vorobia L, Pappo O, Mechoulam R, Ilan Y, Berry EM. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 237-245.
4. Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, et al. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necro-inflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver*. 1999; 19:212-9.

5. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2):209-218.
6. Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N Jr, Sanyal AJ, Kunos G. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001; 7: 827-832.
7. Batkai S, Mukhopadhyay P, Harvey-White J, Kechrid R, Pacher P, Kunos G. Endocannabinoids acting at CB1 receptors mediate the cardiac contractile dysfunction in vivo in cirrhotic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1689-H1695.
8. Batkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, et al. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Faseb J* 2007; 21: 1788-800.
9. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.

10. Bennett RG, Dalton SR, Mahan KJ, et al. Relaxin receptors in hepatic stellate cells and cirrhotic liver. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:1033-1040.
11. Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 657-664.
12. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312:637–641.
13. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 1993; 214: 173-180.
14. Calabrese C, Berman SH, Babish JG, Ma X, Shinto L, Dorr M, Wells K, Wenner CA, Standish LJ (2000) A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother Res* 14:333–338.

15. Cales P, Oberti F, Michalak S et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005; 42: 1373-1381.
16. Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis.* 2005; 37:349-356.
17. Cisneros L, Londoño MC, Blasco C, et al. Hepatic stellate cell activation in liver transplant patients with hepatitis C recurrence and in non-transplanted patients with chronic hepatitis C. *Liver Transpl.* 2007;1 3:1017-1027.
18. Coco B, Oliveri F, Maina AM et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral hepatitis* 2007; 14: 360-369.
19. Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112: 423-431.

20. Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1393-1395.
21. Croquet V, Vuillemin E, Ternisien C et al. Prothrombin index is an indirect marker of severe liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 253-257.
22. Dagon Y, Avraham Y, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM. Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 2007; 21: 2431-2441.
23. Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA (2001) Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinase through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* 77:957-960.
24. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949.
25. Domenicali M, Ros J, Fernandez-Varo G, Cejudo-Martin P, Crespo M, Morales-Ruiz M, Briones AM, Campistol JM, et al.

- Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut*. 2005;54:522-7.
26. Deveaux V, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, et al. CB2 receptor antagonism reduces diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis. *Hepatology* 2007; 46: 308A.
27. Fernandez-Rodriguez CM, Romero J, Petros TJ, Bradshaw H, Gasalla JM, Gutierrez ML, Lledo JL, Santander C, Fernandez TP, Tomas E, Cacho G, Walker JM. Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 477-483.
28. Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1--possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1369-1372.
29. Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* 2000; 12: 677-681.

30. Fontana RJ, Lok AS. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S57-64.
31. Fountoulakis M, de Vera MC, Cramer F, Boess F, Gasser R, Albertini S, Suter L (2002) Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 183:71–80.
32. Gabbay E, Avraham Y, Ilan Y, Israeli E, Berry EM (2005) Endocannabinoids and liver disease. *Liver Int* 25:921–926.
33. Gabrielian ES, Shukarian AK, Goukasova GI, Chandanian GL, Panossian AG, Wikman G, Wagner H (2002) A double blind, placebo-controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in the treatment of acute upper respiratory tract infections including sinusitis. *Phytomedicine* 9:589–597.
34. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86: 1646-1647.
35. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrie P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM,

- Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007; 46: 122-129.
36. Gaskari SA, Liu H, Moezi L, Li Y, Baik SK, Lee SS. Role of endocannabinoids in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 315-323.
37. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335..
38. Ghasemi M, Sadeghipour H, Shafaroodi H, Nezami BG, Gholipour T, Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Nobakht M, Moore KP, Mani AR, Dehpour AR. Role of the nitric oxide pathway and the endocannabinoid system in neurogenic relaxation of corpus cavernosum from biliary cirrhotic rats. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 591-601.
39. Girometti R, Furlan A, Mazzocchi M et al. Diffusion-weighted MRI in evaluating liver fibrosis: a feasibility study in cirrhotic patients. *Radiol Med* 2007; 112: 394-408.
40. Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M et al. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-

- derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321:856-865.
41. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99.
42. Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int.* 2007;27:434-439.
43. Halfon P, Bacq Y, De Muret A, et al. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; 46:395-402.
44. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, et al. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:547-555.
45. Han YP, Yan C, Zhou L, et al. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2007; 282:12928-12939.

46. Hasanein P, Shahidi S, Komaki A, Mirazi N (2008) Effects of URB597 as an inhibitor of fatty acid amide hydrolase on modulation of nociception in a rat model of cholestasis. *Eur J Pharmacol* 591:132–135.
47. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46:955-975.
48. Hezode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlostky JM, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134: 432-439.
49. Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 63-71.
50. Hui AY. *Exp Rev Mol Med* 2003; 5: 1-23.

51. Imbert-Bismut F, Messons D, Thibaut V et al. Intralaboratory analytical variability of biochemical markers of fibrosis (Fibrotest) and activity (Actitest) and references ranges in healthy blood donors. *Chim Chem Lab Med* 2004; 42: 323-333.
52. Iredale JP. *J Clin Invest* 2007; 117:539-548.
53. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005; 128: 742-55.
54. Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 2008; 7: 227-35
55. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol.* 1997;26:574-583.
56. Kershenobich D, Uribe M, Suarez GI, Mata JM, Perez-Tamayo R, Rojkind M. Treatment of cirrhosis with colchicine.

- A double-blind randomized trial. *Gastroenterology* 1979; 77: 532-536.
57. Lee TY, Chang HH, Kuo JJ, Shen JJ (2009) Changes of in bile duct ligated rats with hepatic fibrosis following treatment with Yin-Chen-Hao-Tang. *Int J Mol Med* 23:477–484.
58. Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99:271.
59. Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibro-proliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;34:239-247.
60. Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 835-840.

61. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, et al. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 605-28.
62. Lotersztajn S, Mallat A The Endocannabinoid system as a therapeutic target for liver diseases *CMR Journal* 2008 1: 336-40.
63. Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F, Julien B, et al. CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 286-9
64. Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 232-236.
65. Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM (2009) Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. *J Hepatol* 51:528– 534.
66. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Lotersztajn S (2007) Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing

- strategies during chronic liver diseases. *Exp Opin Ther Targets* 11:403–409.
67. Mallat A and Lotersztajn S. Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J Endocrinol Invest* 2006; 29:58-65.
68. Mallat A and Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G9-G12.
69. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564.
70. Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2004;115-116:143-150.
71. McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2002) Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 100:627–634.

72. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83-90.
73. Miele L, Fargione A, Gasbarrini G et al. Noninvasive assessment of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Translational Research* 2007; 149: 114-125.
74. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65.
75. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V et al. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 222-230.
76. Oberti F, Valsesia E, Pilette C et al. Non invasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1609-1616.
77. Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, et al. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase

- (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 20:1102-1108.
78. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-1305.
79. Pacher P, Gao B Endocannabinoids and liver disease. III. Endocannabinoid effects on immune cells: implications for inflammatory liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G850–G854.
80. Parfieniuk A, Flisiak R Role of cannabinoids in chronic liver diseases *World J Gastroenterol* 2008 October 28; 14(40): 6109-6114.
81. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997 Mar 22;349:825-832.
82. Poynard T, Halfon P, Castera L et al. Fibro Paca Group. Variability of the area under the receiver operating

- characteristic curves in the diagnostic evaluation of liver fibrosis markers: impact of biopsy length and fragmentation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25:733-739.
83. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F et al. LIDO Study Group; CYTOL study group. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcohol steato-hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2006; 10;6:34.
84. Poynard T, Zoulin F, Ratziu V et al. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1970-1980.
85. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 2003; 38: 481-492.
86. Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R (2003) Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol* 3:147–158.

87. Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Ba'tkai S, Osei-Hyiaman D, Hasko' G, Liaudet L, Gao B, Pacher P (2007) Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol* 82:1382–1389.
88. Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, et al. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver*. 2000; 20:387-396.
89. Ratziu V, Giral P, Munteanu M, et al. Screening for liver disease using non-invasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest and NashTest) in patients with hyperlipidaemia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 15; 25:207-218.
90. Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells. A key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: 808-826.
91. Ros J, Claria J, To-Figueras J, Planaguma A, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Martin-Ruiz R, Arroyo V, Rivera F, Rodes J, Jimenez W. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in

- experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 85-93.
92. Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M (2000) The CB(1)cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-JunN-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58:814–820.
93. Saito H, Tada S, Nakamoto N et al. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatology Research* 2004; 29:97-103.
94. Sa´nchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramo´n y Cajal S, Guzma´n M (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *CancerRes* 61:5784–5789.
95. Shaheen AAM, Wan AF, Myers RP et al. Fibrotest and Fibroscan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systemic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1-12.
96. Shen YC, Chen CF, Chiou WF (2002) Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br J Pharmacol* 135:399–406.

97. Shin CY, Lee WJ, Choi JW, et al. Role of p38 MAPK on the down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in rat astrocytes. *Arch Pharm Res.* 2007;30:624-633.
98. Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1085-1095.
99. Singha PK, Roy S, Dey S (2007) Protective activity of andrographolide and arabinogalactan proteins from *Andrographis paniculata* Nees, against ethanol-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol* 111:13–21.
100. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 173-192.
101. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 405-446..
102. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006; 12: 671-6.

103. Tilg H and Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-76.
104. Trepka MJ, Zhang G, Leguen F, et al. Benefits and adverse effects of hepatitis C screening: early results of a screening program. *J Public Health Manag Pract.* 2007; 13:263-269.
105. Trocme C, Leroy V, Sturm N, et al. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2006; 13:643-651.
106. Tsukamoto T, Yamamoto T, Ikabe T et al. Serum markers of liver fibrosis and histologic severity of fibrosis in resected liver. *Hepato-Gastroenterology* 2004; 51: 777-780.
107. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P et al. Tumor Necrosis Factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-280.
108. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in

- endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12: 1035-1044
109. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45:1290-1297.
110. Walsh KM, Timms P, Campbell S, et al Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as non invasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci*. 1999;44:624-630.
111. Wang L, Liu J, Harvey-White J, Zimmer A, Kunos G. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1393-1398.
112. Zhang XL, Liu JM, Yang CC, et al. Dynamic expression of extracellular signal-regulated kinase in rat liver tissue during hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6376-6381.

113. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement: a prospective multicentre study in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:48-54.