

Università degli Studi di Milano

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE PER
LA SALUTE ANIMALE E LA SICUREZZA ALIMENTARE

Dottorato di ricerca in Scienze Cliniche Veterinarie

**VALUTAZIONE DI MARKERS NON
INVASIVI DI FIBROSI EPATICA NEL
CANE**

Tutor: Prof. Stefano Faverzani

Dott. Silvia Pagetti

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

1 INTRODUZIONE

2 SINTESI BIBLIOGRAFICA

2.1 CENNI DI FISIOLOGIA EPATICA

2.2 ANATOMIA ISTOLOGICA DEL FEGATO

2.3 FIBROSI E CIRROSI EPATICA

2.4 EZIOPATOGENESI NEL CANE

2.5 DIAGNOSI DI FIBROSI/CIRROSI EPATICA NEL CANE

2.6 TERAPIA DELLA FIBROSI/CIRROSI EPATICA NEL CANE

2.7 FIBROSI/ CIRROSI EPATICA NELL'UOMO

2.8 ACIDO IALURONICO IN MEDICINA UMANA

2.9 ACIDO IALURONICO IN MEDICINA VETERINARIA

3 MATERIALI E METODI

4 RISULTATI

4.1 1°STUDIO

4.2 2° STUDO

5 DISCUSSIONE

5.1 AST/ALT RATIO E APRI INDEX

5.2 ACIDO IALURONICO

6 CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, anche la medicina veterinaria ha rivolto un interesse sempre maggiore all'individuazione di parametri biochimici e di nuove proteine quali marcatori diagnostici e prognostici di malattia, al fine di garantire diagnosi precoci e monitoraggio delle patologie minimizzando l'invasività delle metodiche applicate. Alcune patologie in particolare risultano difficilmente gestibili nel lungo periodo senza uno stretto monitoraggio clinico che spesso consiste in una serie di esami, a volte invasivi, non sempre ben tollerati né dal paziente né dal proprietario; fra queste ha sicuramente una notevole rilevanza l'epatopatia cronica nel cane, la cui gestione implica una continua valutazione dell'evoluzione del grado di fibrosi per la quale la biopsia epatica risulta essere attualmente indispensabile. In medicina umana sono stati studiati e in parte già utilizzati numerosi markers di fibrosi epatica (Fibro-Test, Acti-test, indice Shasta, indice APRI, indice di Forns, AST/ALT ratio, collagene tipo IV, procollagene tipo III, acido ialuronico) che hanno permesso di diagnosticare, studiare e monitorare varie patologie quando, per vari motivi, non fosse utilizzabile la biopsia epatica considerata il "gold standard" per questo tipo di diagnosi. L'attuale buona conoscenza dei fenomeni patogenetici della fibrosi epatica ha permesso di effettuare un elevato numero di studi al fine di identificare dei markers sierici che potessero sostituire la biopsia nella diagnosi di questa patologia. La variabilità interoperatore e l'elevato rischio di errore di campionamento della biopsia tissutale hanno ulteriormente spinto verso la ricerca di test non invasivi per la diagnosi e il monitoraggio della fibrosi e cirrosi epatica. Data l'elevata prevalenza nel cane di patologie aventi quale esito la fibrosi, obiettivo della nostra ricerca è lo studio dei markers di fibrosi epatica, in uso in medicina umana, allo scopo di valutare una loro possibile validazione nel cane, limitando così l'utilizzo della biopsia epatica ai soli casi di prima diagnosi e in animali non a rischio per questa procedura. Questa comparazione è risultata possibile in quanto abbiamo riscontrato che le risposte dei markers sierici di funzionalità e danno epatico e i processi fibrogenetici, nell'uomo e nel cane, sono pressoché sovrapponibili. Come vedremo, in medicina umana la varietà e quantità di dati riguardo i markers non invasivi di fibrosi epatica è davvero molto vasta e non sarebbe possibile trattare in modo esauriente un argomento così ampio, per questo motivo abbiamo scelto di comprendere nel nostro studio solo alcuni markers di fibrosi epatica basandoci sulla ripetibilità e facilità di ottenimento del dato, sulla maggior corrispondenza possibile fra comportamento del markers valutato nel cane e nell'uomo e sull'attendibilità verificata del markers stesso. Sono stati scelti i seguenti markers: AST/ALT ratio, HA (Acido Ialuronico) e APRI index. Nella sintesi bibliografica seguente approfondiremo quindi solo quei valori che hanno

per il nostro studio un certo interesse tralasciando quelli atti ad ottenere markers
difficilmente applicabili nella nostra pratica clinica.

2 SINTESI BIBLIOGRAFICA

2.1 CENNI DI FISIOLOGIA EPATICA

Il fegato è una ghiandola dotata di molteplici funzioni tra cui quella di riserva e di stoccaggio. Una delle sue caratteristiche principali è la grande capacità rigenerativa che segue alla perdita di epatociti, funzione che, insieme allo sviluppo del fegato, è regolata da fattori di crescita tra i quali il *fattore di crescita epatico (HGF)* e l'insulina. Ai fini della rigenerazione è inoltre importante che il fegato abbia un adeguato apporto vascolare. Il fegato gioca un ruolo chiave in molti processi metabolici e omeostatici. La concentrazione di glucosio e di molte proteine nel plasma è regolata da quest'organo e potrebbe essere alterata in caso di disfunzione epatica, anche i trigliceridi che provengono dal tessuto adiposo e i chilomicroni intestinali sono convertiti in lipoproteine nel fegato. Altre funzioni metaboliche del fegato sono la biotrasformazione di sostanze tossiche esogene quali i farmaci e di precursori endogeni in ormoni steroidei; è capace di produrre cellule del sangue attraverso la sua funzione ematopoietica extramidollare; ha un ruolo importante nei processi di coagulazione essendo direttamente responsabile della formazione di alcuni fattori della coagulazione. Le funzioni metaboliche di quest'organo sono regolate da ormoni quali l'insulina, il glucagone e i glucocorticoidi, ma anche gli ormoni tiroidei, l'ormone della crescita e le catecolamine ne controllano l'attività. Il fegato ha infine la capacità di stoccare molte molecole come il glicogeno, i metalli e le vitamine e metterle a disposizione dell'organismo a seconda delle necessità. In caso di processi patologici a carico del fegato tutte queste funzioni potrebbero essere compromesse.^(1,2)

2.2 ANATOMIA ISTOLOGICA DEL FEGATO

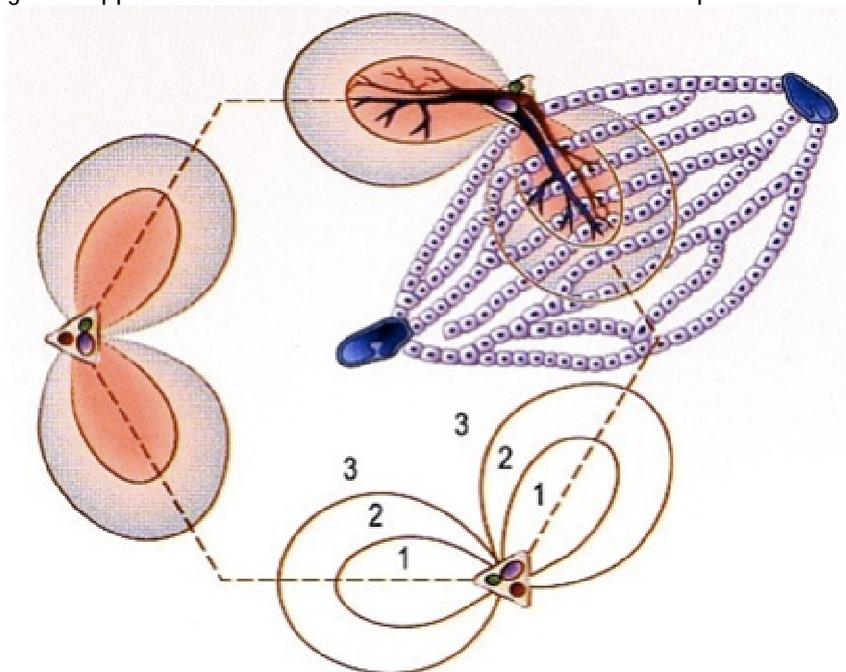
I lobuli epatici sono l'unità morfofunzionale del fegato, presentano forma esagonale e sono costituiti da lamine di epatociti intrecciati a una fitta rete di sinusoidi, distribuiti all'interno di una matrice composta da collagene (maggiormente di tipo I, III e IV), da proteine non collagene, incluse le glicoproteine (ad esempio, la fibronectina e la laminina) e da diversi proteoglicani (ad esempio, condroitin-solfato, ialuronato). I fibroblasti, sono localizzati a livello portale e possono produrre collagene, glicoproteine e proteoglicani.

Anche le altre cellule come gli epatociti, le cellule endoteliali, le cellule stellate e le cellule del Kupffer, possono produrre le diverse componenti della matrice. I sinusoidi formano una trama vascolare, ampiamente anastomizzata, che separa fra loro le lamine di epatociti, in modo che tutti gli epatociti abbiano almeno un versante a contatto con un sinusoido. L'ampio lume dei sinusoidi è rivestito da due tipi distinti di cellule: le cellule endoteliali e le cellule del Kupffer che sono disposte in genere sopra le cellule endoteliali, ma possono occupare parzialmente il lume del sinusoido o formarne parte della parete. I sinusoidi sono separati dagli epatociti da uno spazio perisinusoidale, definito spazio di Disse e occupato da fibre reticolari e microvilli degli epatociti¹. In tale spazio si rinvencono le cellule di Ito o cellule stellate che, in condizioni di normalità, producono le proteine della matrice extracellulare ma, quando attivate, giocano un ruolo fondamentale nella genesi della fibrosi epatica.

L'unità vascolare del fegato è definita come "acino epatico". I rami dell'arteria epatica e della vena porta si irradiano dall'area portale e si estendono fra i lobuli epatici; poiché l'asse dell'acino è perpendicolare all'asse dell'area portale, l'acino è formato dai sinusoidi e dal parenchima di due lobuli adiacenti e dai vasi interlobulari. All'interno di un singolo acino si definiscono tre zone:

- zona acinare 1 o periportale o periferica (area adiacente all'arteria epatica e alla vena porta).
- zona acinare 3 o perivenosa o centrolobulare (area adiacente alla vena centrolobulare).
- zona acinare 2 o intermedi (area compresa tra le precedenti). ^(3,4)

Fig. 1 Rappresentazione schematica di un lobulo e un acino epatico.



Jan Rothuizen et al. in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

2.3 FIBROSI E CIRROSI

La fibrosi e la rigenerazione nodulare, sotto forma di cirrosi, sono il risultato di diverse forme di epatite cronica di cui. rappresentano gli stadi evolutivi più avanzati e la cui eziopatogenesi è assai svariata nel cane come nell'uomo. Si tratta di forme indubbiamente differenziabili tra di loro, che tuttavia presentano, accanto ad una propria dinamica evolutiva, anche delle sovrapposizioni.⁽⁵⁾

La fibrosi è una risposta non specifica a un danno epatico che implica cambiamenti qualitativi e quantitativi della matrice extracellulare (ECM). Le cellule infiammatorie provocano una necrosi epatocellulare: proteasi lisosomiali e radicali liberi rilasciati distruggono la matrice e le membrane cellulari, determinando il rilascio di sostanze come il TGF- β (fattore di crescita trasformante- β) che attraggono cellule produttrici di collagene.⁽²⁾ La matrice normalmente è costituita da un gruppo di macromolecole che include collagene, glicoproteine, fattori di crescita, glicosamminoglicani, proteoglicani e proteine di matrice. L'acido ialuronico (HA) è un altro essenziale componente dell'ECM virtualmente presente in tutti i tessuti del corpo: si tratta di un polimero disaccaridico prodotto da diverse cellule quali cheratinociti, fibroblasti e cellule stellate nel fegato; questa complessa molecola viene qui degradata dalle cellule endoteliali dei sinusoidi.

In seguito a fibrosi la quantità complessiva di collagene e HA all'interno del fegato aumenta e comporta una serie di cambiamenti qualitativi come l'aumento di collagene produttore di fibrille (tipo I, III, IV), l'aumento di collagene non produttore di fibrille (tipo IV, VI), di glicoproteine (fibronectina, osteonectina) e infine un aumento di proteoglicani e glicosamminoglicani. Il risultato è la sostituzione di una matrice interstiziale a bassa densità con una ad alta densità che altera le funzioni metaboliche e di sintesi degli epatociti. L'attivazione delle cellule stellate è l'evento principale che porta allo sviluppo di fibrosi ed implica l'inizio detto (fase preinfiammatoria) e la progressione nel tempo di eventi proliferativi, chemiotattici e fibrogenetici. La presenza di specifiche citochine, chemochine e altri mediatori biologici attivi è necessaria in entrambi i passaggi.

L'ECM è un tessuto attivo, che implica non solo sintesi di matrice, ma anche la sua degradazione in un processo dinamico che porta ad un suo continuo rimodellamento. Pertanto, sebbene la fibrosi epatica possa essere un processo progressivo che esita nella cirrosi, è anche un processo potenzialmente reversibile, in particolare nelle fasi iniziali. Lo studio di patologie epatiche che portano a fibrosi dunque ha il fine non solo di aiutarci nella loro diagnosi e

prognosi ma anche lo scopo di monitorare l'evoluzione della fibrosi ed effettuare un eventuale trattamento.⁽⁶⁾

La cirrosi, viene invece definita, come una alterazione, irreversibile, della normale architettura della struttura epatica, da parte di noduli di rigenerazione, che sono circondati da tessuto fibroso.

Ciò che contraddistingue essenzialmente le epatopatie cirrotiche rispetto alle fibrotiche è la prevalenza nelle prime di fenomeni regressivi e distruttivi epatocitari ai quali consegue:

- 1) un'intensa proliferazione intralobulare e disordinata di tessuto connettivo, derivante dall'attivazione di cellule di Ito (cellule stellate);
- 2) una mobilitazione in senso centripeto del mesenchima interlobulare;
- 3) una proliferazione anomala di epatociti, che esita nella formazione di noduli o nodi epiteliali (pseudolobuli) a partire da elementi epatocitari, sopravvissuti al danno iniziale;
- 4) una proliferazione di epitelio di tipo biliare.

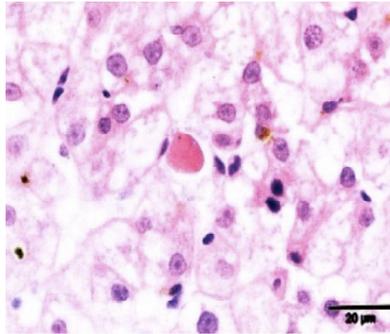
Sembra che alla base dei punti 3 e 4 vi sia una importante partecipazione di una popolazione di cellule epatiche pluripotenti analoghe alle cellule ovali di ratto.^(4,5)

La cirrosi rappresenta quindi lo stadio finale irreversibile del danno epatico cronico causato da molteplici cause. Il denominatore comune a tali cause e che dà avvio al processo di fibrogenesi è la morte dell'epatocita, che conduce alla riparazione per fibrosi e rigenerazione nodulare. Questo processo danneggia ulteriormente gli epatociti adiacenti normali, il flusso ematico intraepatico e quello biliare; la cirrosi raggiunge dunque un punto oltre il quale diventa autoperpetuante.⁽⁷⁾

Patterns morfologici di apoptosi e necrosi

Corpi apoptodici: gli epatociti apoptotici sono cellule ristrette intensamente eosinofile con nuclei condensati e sono circondate da un alone vuoto (Fig 1).

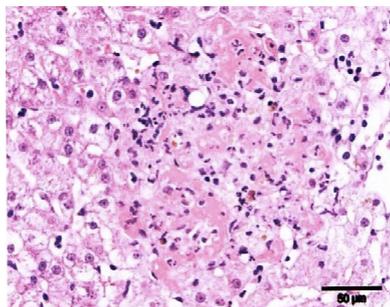
Fig. 1 Corpi apoptotici (acidofili).



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Necrosi focale e multifocale: questi termini fanno riferimento a una necrosi coagulativa o liquefattiva di piccoli aggregati di epatociti, che principalmente partecipa ed è riconosciuta nelle reazioni infiammatorie secondarie a proliferazione di cellule del Kupffer e infiltrazione di mononucleati e/o polimorfonucleati. (Fig 2)

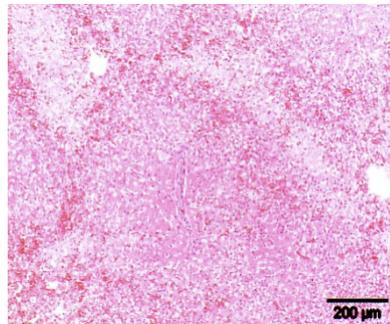
Fig. 2 Necrosi focale con proliferazione di cellule del Kupffer reattive e infiltrazione di mononucleati e/o polimorfonucleati. HE.



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Necrosi confluyente: può essere coagulativa o liquefattiva e comprende ampie aree di epatociti con distribuzione casuale o zonale. La necrosi confluyente che unisce strutture vascolari è chiamata "necrosi a ponte". Quella che connette la periferia degli acini epatici con le vene epatiche terminali è chiamata ponte centrale-centrale (Fig 3). Quella che unisce le vene epatiche terminali e i tratti portalì è chiamata ponte centrale-portale, mentre quella con distribuzione periportale è chiamata ponte portale-portale. Quando la necrosi confluyente è molto estesa e coinvolge interi acini e lobuli, il processo è chiamato necrosi panacinososa o panlobulare.⁽⁴⁾

Fig.3 Necrosi a ponte centrale-centrale. HE.



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Necrosi massiva: questa forma di necrosi è particolarmente grave e si verifica quando il fegato mostra fenomeni necrotici coagulativi e/o liquefattivi panlobulari e multilobulari diffusi ed estesi (Fig 4). Le conseguenze sono il collasso della rete di reticolina cosicchè le aree portalì e le vene epatiche si avvicinano per perdita del tessuto interposto. Il tessuto connettivo conseguentemente condensa e si ha cicatrizzazione post-necrotica.⁽⁴⁾

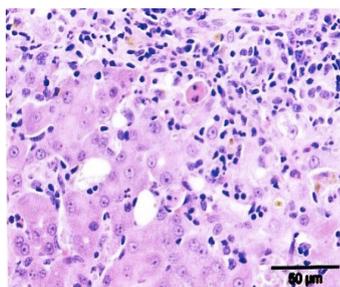
Fig. 4 Cane: Necrosi massiva con aree nero-rosse collassate (epatite fulminante).



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Necrosi dell'interfaccia (piecemeal): è stata recentemente così definita perché è caratterizzata dalla distruzione della lamina limitante di epatociti periportale ad opera delle cellule infiammatorie mononucleate. Molti di questi processi frequentemente evolvono in apoptosi per cui è facile il riscontro, in tali quadri, di occasionali corpi apoptotici.⁽⁴⁾

Fig. 5 Necrosi dell'interfaccia con infiltrazione e distruzione della placca limitante e alcuni corpi apoptotici. HE.



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Quando la fibrosi è grave, o già evoluta a cirrosi, l'imponente richiamo di cellule che producono collagene porta a una diminuzione della capacità dei vasi e dei sinusoidi epatici di distendersi, aumentando così la resistenza del flusso sanguigno. Il collagene intorno agli epatociti compromette la perfusione ematica dei sinusoidi con conseguente diminuita funzionalità delle cellule epatiche e ipertensione portale.⁽²⁾

Esiste un'intricata relazione fra l'infiammazione del parenchima epatico e apoptosi /necrosi epatocellulare, quest'ultima può essere infatti l'inizio dell'infiammazione. Comunque esistono cause infettive di necrosi epatocellulare, riferibili a epatiti ma anche estese necrosi epatiche con minima o assente infiammazione nella fase acuta. Minore confusione esiste nell'ambito delle epatiti croniche che indipendentemente dalla causa sono caratterizzate dalla presenza di fibrosi, infiammazione e apoptosi/necrosi epatocellulare.⁽⁴⁾ La predominanza di linfociti e cellule del plasma come i neutrofili negli infiltrati infiammatori che accompagnano le epatiti croniche (CCH) è attribuibile secondo Bishop, 1979, e Weiss, 1995, allo sviluppo di processi immunologici. Analogamente nell'uomo meccanismi autoimmuni giocano un ruolo importante nello sviluppo di patologie come epatiti croniche attive e cirrosi biliare primaria. In entrambe sia la risposta umorale che cellulo-mediata intervengono verso antigeni della membrana degli epatociti.

Sulla base di queste preliminari osservazioni un altro studio⁽⁸⁾ è stato condotto da Poitout al fine di valutare se la risposta cellulo-mediata verso LMP (anti-liver membrane protein) si realizzasse effettivamente nel corso di epatiti croniche e per stabilire se esse realmente potessero costituire un vero e proprio sottoinsieme di casi. Lo studio effettivamente documenta una proliferazione di cellule mononucleate del sangue verso gli antigeni di membrana in cani con epatiti croniche e supporta l'ipotesi che intervengano processi immuno-mediati. Tuttavia gli autori non sono stati in grado di stabilire se tali processi siano primari o secondari alla distruzione epatocitaria.

Un' ulteriore conferma dell'attività necro-infiammatoria che caratterizza le CCH è stata fornita anche in seguito da uno studio⁽⁹⁾ del 2001 dell'Università di Montréal. L'infiltrato infiammatorio in ciascuna sezione epatica è stato valutato con metodiche immunoistochimiche che hanno evidenziato CD3, proteine transmembrana espresse dai linfociti, lisozima (enzima delle cellule del Kupffer dotato di attività battericida che si lega alla superficie e ne facilita la fagocitosi), catene leggere di anticorpi (λ e κ), actina isoforma α espressa in cellule muscolari lisce e nelle cellule dello stroma con caratteristiche funzioni di tipo contrattile (miofibroblasti).

L'attività necroinfiammatoria aumenta progressivamente e tende invece a scemare quando l'epatite progredisce a cirrosi. Le CD3 sono molto numerose nelle cellule linfoidi di cani con CCH. Epatociti degenerati ne sono occasionalmente circondati. La presenza di miofibroblasti nelle triadi portalì e nei setti fibrosi è correlato allo stadio della fibrosi stessa, mentre non sembra esserci correlazione con il lisozima. Questi risultati supportano quindi l'idea che processi immuno-mediati siano coinvolti nelle epatiti croniche e che i miofibroblasti giochino un ruolo importante nella genesi della fibrosi canina.

2.4 EZIOPATOGENESI NEL CANE

Con il termine di epatite cronica si fa riferimento a una malattia epatica cronica (≥ 6 mesi) in cui si ha sviluppo di necrosi associata a un'inflammatione principalmente linfoplasmocitaria che progredisce fino a fibrosi e cirrosi. In alcuni casi la causa è nota, in caso contrario l'epatopatia viene detta idiopatica. Aggettivi come lieve moderata e grave descrivono l'entità del processo patologico.

Le epatiti nel cane hanno un'eziopatogenesi assai ampia nell'ambito della quale si distinguono cause virali, batteriche, parassitarie, epatiti croniche da accumulo di rame, dermatite necrolitica superficiale, epatite lobulare dissecante, epatiti reattive non specifiche, epatiti eosinofile.⁽⁴⁾

2.4.1 Cause infettive

Tra le cause virali:

Epatite canina da *Adenovirus 1*: causa una malattia multisistemica che coinvolge il fegato, i reni, il cervello e altri organi. Nel fegato provoca una severa infezione centrolobulare, con necrosi a ponte, con o senza infiammazione. Corpi intranucleari basofili sono di comune riscontro negli epatociti ed eventualmente nelle cellule endoteliali ed epiteliali dei dotti biliari;

Herpes Virus canino: anche questo agente eziologico provoca una patologia multisistemica che coinvolge diversi organi. Nel fegato provoca aree di necrosi multifocale con o senza infiammazione e spesso si estende nel tessuto portale e nel connettivo perivenulare. Si possono riscontrare pochi corpi intranucleari eosinofili all'interno degli epatociti.⁽⁴⁾

Tra le cause batteriche:

Epatite da *Clostridi* (Tizzer's disease): i reperti di necrosi sono sovrapponibili a quelli dell'Herpes Virus, inoltre bacilli di forma allungata sono reperibili all'interno degli epatociti ai margini dei focolai necrotici e visibili attraverso colorazioni come HE (ematossilina-eosina), Giemsa o colorazione argentea;

Leptosirosi: diversi sierotipi provocano una malattia acuta multisistemica. Nel fegato la necrosi epatocellulare è minima o assente, è invece caratteristica la

separazione delle lamine di epatociti e la presenza di cellule con figure mitotiche o epatociti binucleati;

Helicobacter Canis: descritta nei cani giovani e responsabile di necrosi epatica multifocale. I microrganismi sono presenti alla periferia delle lesioni e quando sono presenti nei canalicoli biliari sono suggestivi di un'infezione ascendente lungo i dotti biliari.

Malattie setticemiche batteriche possono essere responsabili di epatiti reattive non specifiche; si avrà necrosi focale e confluyente con infiltrazione o proliferazione secondaria di cellule del Kupffer/macrofagi, leucociti neutrofili, linfociti e plasmacellule. Molti batteri possono provocare epatite nel cane come *H. Coli*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella* e *Brucella*. Per la loro identificazione è sicuramente utili la colorazione di Gram.⁽⁴⁾

Tra le cause parassitarie:

Toxoplasma Gondii: è un protozoo che causa una patologia multisistemica che evolve nel fegato, polmoni, cervello. Si distinguono aree di necrosi focale o confluyente, nei casi più gravi con quadri panlobulari. Si accompagna a un'inflammazione con infiltrazione di neutrofili e macrofagi. Aree di necrosi adiacenti al parenchima spesso contengono tachizoiti o cisti con bradizoiti.

epatiti tossiche: l'intossicazione può essere provocata dall'ingestione accidentale di funghi come *spp. Amanita* o alghe verdi e blu (*Anabaena*, *Aphanizomenon*) o da farmaci come Acetaminofene (paracetamolo) e Trimethoprim, Sulfonamide, Carprofene (reazioni idiosincrasiche). Il paracetamolo ha un effetto tossico diretto dose-dipendente e potrebbe provocare necrosi centrolobulare, a ponte e panlobulare.

Epatiti sono state riportate anche in cani trattati con anticonvulsivanti come primidone o fenobarbitale.⁽⁴⁾

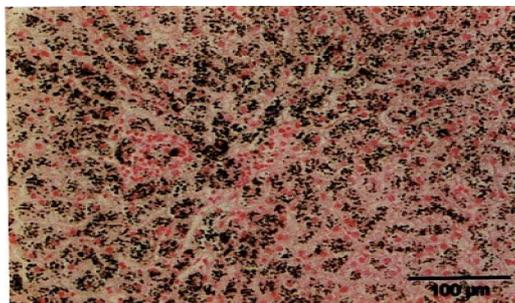
2.4.2 Epatite cronica associata all'accumulo di rame

Nel Bedlington terrier

I Bedlington terrier presentano una incapacità ereditaria (legata ad una mutazione genetica di una protina di trasporto per il rame) di escrezione del rame con la bile. Essa è legata ad un gene autosomico recessivo. Quando l'accumulo nei lisosomi raggiunge valori di 2000 µg/g di peso secco (ppm) si verifica un danno mitocondriale ossidativo, con conseguente danno epatico progressivo, necrosi, epatite cronica e infine cirrosi. I Bedlington terrier accumulano rame per tutta la vita talvolta fino al raggiungimento di 12000 ppm. La prima anomalia istologica che si riscontra è l'accumulo di rame nei granuli dei lisosomi ma con il progredire della patologia si rendono sempre più evidenti aree di necrosi a ponte e fibrosi; infine si ha la cirrosi.^(2,4,7) E' stata descritta una certa analogia con la malattia di Wilson nell'uomo, patologia ereditaria poco frequente del metabolismo del rame. Anche qui viene proposta come eziologia la mutazione di un gene che codifica per un trasportatore del rame, la ceruloplasmina; gli esiti dell'accumulo di rame sono epatite cronica e cirrosi.⁽¹⁰⁾

Nel cane i campioni istologici di fegato, colorati con ematossilina-eosina, non presentano modificazioni istologiche patognomoniche e variano da necrosi multicentriche associate a reazioni infiammatorie più gravi tra cui la rigenerazione nodulare, la fibrosi dei dotti o cirrosi macronodulare o micronodulare. Per evidenziare l'accumulo di rame si rende quindi necessario l'impiego di particolari colorazioni, quali solfuro d'argento di Timm, acido rubeanico, orceina o rodamina (Fig.2). L'acido rubeanico permette di evidenziare la presenza di granuli citoplasmatici rifrangenti e di colore verde scuro che rappresentano i precipitati di rame.⁽¹¹⁾

Fig.2 Bedlington terrier. Marcato accumulo di rame negli epatociti e infiltrato infiammatorio. Colorazione per il rame: Acido rubeanico.



Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.

Nel WHWT

I West Highland White Terrier hanno una tendenza genetica a presentare concentrazioni di rame più elevate delle altre razze. Tuttavia non tutti quelli con epatite cronica presentano chiaramente una epatopatia associata ad accumulo di rame e di contro, non tutti quelli con accumulo di rame sviluppano epatite cronica. A differenza del Bedlington terrier i WHWT non accumulano rame per tutta la vita. I picchi si manifestano generalmente entro i sei mesi e possono diminuire dopo l'anno di età. I livelli epatici di rame normalmente non superano valori di 3500 ppm.

All'esame istopatologico si notano granuli di rame (inizialmente centrolobulari poi distribuiti in modo diffuso), epatite centrolobulare e cirrosi.^(2,7)

Nello Skye terrier

Nello Skye terrier è stata descritta una forma di epatite cronica e cirrosi associata all'accumulo di rame. Negli stadi iniziali manca però l'accumulo di rame, che viene così definito secondario all'epatopatia e che sembra invece conseguire ad un disordine di escrezione biliare.

Sono stati riferiti livelli di rame fino a circa 2257 ppm.

2.4.3 Epatite cronica nel Dobermann Pinscher

Le femmine di età media (1.5-11 anni) sembrano le più a rischio di grave epatite cronica con conseguente cirrosi. Il meccanismo patogenetico sembra essere sconosciuto. L'alta frequenza della patologia sembra suggerire una base genetica. Tuttavia, non si manifesta necessariamente in tutti i cani di questa razza. E' comune la presenza di elevati livelli di rame ed è stato ipotizzato che nel Dobermann Pinscher questi siano più elevati che in alcune razze; in genere però non si raggiungono le concentrazioni raggiunte nel Bedlington terrier.^(2,7)

2.4.4 Epatite da cellule acidofile

L'epatite a cellule acidofile è stata descritta in Gran Bretagna ed è causata da un agente non ancora identificato probabilmente ad eziologia virale. È caratterizzata da epatite acuta e cronica che evolve poi a cirrosi.

Le cellule acidofile, distribuite in tutto il parenchima, rappresentano gli epatociti morenti.^(2,7)

2.4.5 Epatite granulomatosa

L'epatite granulomatosa viene segnalata come un'epatopatia rara, che si differenzia dalle epatiti croniche per la predominanza di macrofagi. Si evidenziano lesioni multifocali e i principali agenti segnalati comprendono batteri (per esempio, *Nocardia*, *Mycobacterium*), miceti (per esempio istoplasma).⁽²⁾

2.4.6 Colangioepatite

La colangioepatite rappresenta un'infiammazione dei dotti biliari e secondariamente degli epatociti; viene diagnosticata in base all'identificazione di infiltrato infiammatorio nell'area periportale (zona 1) e con sua estensione, anche attraverso e nei dotti biliari.^(2,7) Pur essendo una patologia più nel gatto che nel cane l'eziopatogenesi è simile e può variare da forme batteriche (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*) derivanti dalla risalita di microrganismi dall'intestino a forma infiammatorie secondarie a pancreatici o ostruzione totale o parziale dei dotti biliari principali.

2.4.7 Epatite lobulare dissecante

L'epatite lobulare dissecante è una forma di cirrosi che si vede in cani prematuri o giovani, come anche in cucciolate ed è caratterizzata da un rapido decorso. l'eziologia non appare ancora ben chiara e la forma comunemente riscontrata sembra essere quella idiomatica. Il fegato in genere è di forma normale con una capsula omogenea e talvolta piccoli noduli di rigenerazione. Microscopicamente, bande di fibroblasti e sottili fili di matrice si notano tra i piccoli gruppi di epatociti con sovvertimento dell'architettura lobulare.⁽⁴⁾

2.4.8 Dermatite necrolitica superficiale (sindrome epatocutanea).

La sindrome epatocutanea è una malattia cutanea del cane associata a disordini epatici cronici. Provoca cirrosi macronodulare con epatociti rigonfi simili a quelli che si riscontrano nelle epatopatie indotte da steroidi.⁽⁴⁾

2.4.9 Epatite reattiva non specifica.

Entità morfologica che diffonde all'interno del fegato. Rappresenta una risposta non specifica a una varietà di processi extraepatici soprattutto malattie febbrili o

infiammatorie o può rappresentare l'esito di malattie infiammatorie intraepatiche. Oltre alla necrosi epatocellulare ci sono infiltrati di cellule infiammatorie in corrispondenza delle aree portalì.⁽⁴⁾

2.4.10 Epatite eosinofilica.

Gli eosinofili appaiono per lo più come elementi dispersi in infiltrati portalì e perivenosi e meno frequentemente all'interno dei sinusoidi. Può essere considerata una forma particolare di epatite reattiva non specifica associata a condizioni allergiche. Marcate infiammazioni eosinofiliche del fegato nel cane possono essere invece associate a infezioni parassitaria (migrazioni di larve di nematodi, schistosomiasi).⁽⁴⁾

2.5 DIAGNOSI DI FIBROSI E CIRROSI NEL CANE

Poiché il fegato in corso di epatopatia può subire dal punto di vista fisiologico e anatomico, uno svariato numero di alterazioni non esiste un unico test singolo che permetta di identificare in modo accurato il tipo di epatopatia presente o la sua causa. Pertanto, per valutare il sistema epatobiliare, è necessario eseguire una serie di esami in aggiunta alle indagini cliniche che comprendono esami di laboratorio e indagini di diagnostica per immagini. I risultati dei test possono suggerire la presenza di una patologia epatobiliare che può essere confermata tramite mezzi diagnostici dotati di maggiore specificità. Fra i test di screening consigliati nelle patologie epatobiliari, il profilo biochimico del siero conferisce informazioni relative a distribuzione, attività e stato del disordine epatobiliare (es. iperbilirubinemia e attività enzimatiche) oltre ad una valutazione del grado di disfunzione (es. sintesi proteica inadeguata, alterata escrezione dei farmaci). Date l'elevata capacità di riserva del fegato, non è possibile rilevare uno stato di insufficienza con metodi convenzionali fino a quando non venga compromesso almeno il 55% del parenchima funzionante.⁽¹²⁾

2.5.1 Aspetti clinici

Nel cane i segni clinici, in caso di patologia epatobiliare, sono estremamente variabili, potendo comprendere fra essi anoressia con perdita di peso e versamento addominale, ittero e coma epatico. Fra questi, nessuno è patognomonico di affezione epatobiliare, ed è inoltre necessario distinguerli da altre manifestazioni identiche provocate da patologie a carico di altri apparati.

Nel caso specifico di epatite cronica, i segni clinici variano con lo stadio in cui la malattia viene diagnosticata; le sue manifestazioni non sono generalmente evidenti fino a quando la malattia non ha raggiunto uno stadio avanzato. I cani che vengono portati alla visita per una grave insufficienza epatica (per esempio, con cirrosi) possono apparire letargici, depressi, anoressici, con vomito, poliuria, polidipsia e/o versamento addominale. L'ittero è relativamente poco frequente e le crisi convulsive (encefalopatia epatica), il sanguinamento e la febbre tendono ad essere rari. Il vomito suggerisce spesso la presenza di ulcerazione gastroduodenale, complicanza riconosciuta di patologia epatobiliare. La diarrea è meno frequente del vomito ed è tipica del piccolo intestino. L'anoressia è un sintomo comune ma non specifico. Il dimagrimento non è considerato specifico, ma indica una patologia a carattere cronico.

Poliuria e polidipsia (PU/PD) possono essere segni importanti nel cane con patologia epatica. La causa principale descritta sembra essere la ritardata escrezione di aldosterone, funzione normalmente svolta dal fegato, che induce la ritenzione di sodio, e l'aumento di assunzione di acqua con poliuria compensatoria. Si ritiene inoltre che la disfunzione degli osmocettori della vena porta, che stimolano la sete in condizioni di assenza di iperosmolarità, siano coinvolti nella polidipsia.⁽¹²⁾

Bilirubinuria e ittero della mucosa orale, sclera e cute possono essere descritti. L'ittero rappresenta una colorazione giallastra del siero o dei tessuti dovuta alla presenza di una quantità eccessiva di pigmento biliare o bilirubina, questo viene rilevato clinicamente quando la bilirubinemia è ≥ 2 mg/dl.

Coagulopatie: poiché il fegato svolge un ruolo esclusivo nel processo dell'emocoagulazione nei cani, con malattia epatobiliare grave, la tendenza alle emorragie può essere uno dei segni clinici. Oltre ad alterazione dei fattori della coagulazione si può avere anche la comparsa di coagulazione intravasale disseminata (DIC): sindrome caratterizzata dalla incontrollata formazione di trombi diffusi. Nel caso della DIC l'eccessiva formazione di trombi porta al consumo dei fattori della coagulazione (per esempio antitrombina III) determinando una coagulopatia da consumo caratterizzata dalla scarsa tendenza del sangue a coagulare e dal conseguente sviluppo di emorragie paradosse. C'è poi fragilità vascolare e congestione indotta dall'ipertensione portale. Le sedi più colpite da sanguinamento eccessivo sono stomaco e duodeno, pertanto ematemesi e melena possono essere sintomi per i quali il paziente viene portato alla visita clinica. Nell'uomo sono invece più frequenti fragili varici esofagee che si possono rompere con grave emorragia.^(7,12)

Il termine **ascite** viene riservato all'accumulo di liquidi a basso contenuto proteico e cellulare e di solito è in relazione a disordini di origine epatica o cardiovascolare. La presenza di versamento si sospetta alla palpazione addominale poiché i visceri tendono a scivolare tra le dita e viene confermato con percussione e ballottamento. Indipendentemente dall'entità del versamento i meccanismi patogenetici che portano all'accumulo di liquidi sono eccessiva formazione per aumento della pressione idrostatica intravascolare, diminuzione della pressione oncotica o alterazioni della permeabilità vascolare ed insufficiente riassorbimento; queste alterazioni possono presentarsi da sole o combinate. Poiché nell'ascite il contenuto sia cellulare che proteico è basso si parla di trasudato.⁽¹²⁾

L'ipertensione portale intraepatica è il meccanismo all'origine dell'ascite che viene rilevato con maggiore frequenza negli animali da compagnia affetti da malattia epatobiliare. In caso di fibrosi la resistenza prolungata al flusso portale intraepatico, sia a livello di triade portale che dei capillari sinusoidi, favorisce la

trasudazione di liquido dai vasi linfatici più prossimali, cioè quelli intestinali, verso la cavità addominale. Nei cani con insufficienza epatica, il passaggio di liquido nello spazio peritoneale può essere favorito da fattori concomitanti come l'ipoalbuminemia (1.5 g/dl), alterazione della velocità di riassorbimento peritoneale o ritenzione di sodio e acqua. Il liquido ascitico può essere di colore arancione, giallo o verde e contiene neutrofili. L'ipertensione portale con conseguente ascite rappresenta quindi una sindrome clinica comune nelle patologie epatiche che evolvono a cirrosi indipendentemente dall'eziologia nel cane come nell'uomo.

Altro sintomo clinico di epatopatia è sicuramente l'**ittero** che per definizione è una colorazione giallastra del siero o dei tessuti dovuta a una presenza eccessiva di pigmento biliare o di bilirubina. Compare in genere quando si ha una grave compromissione dei meccanismi di produzione o escrezione biliare (iperbilirubinemia o colestasi) con valori maggiori di 2 mg/dl. Feci acoliche si osservano secondariamente a grave colestasi, in genere per ostruzione del dotto biliare comune.

L'**encefalopatia epatica** (HE) invece è un'alterazione metabolica che porta ad anomalie comportamentali e disfunzioni neurologiche conseguenti all'esposizione della corteccia cerebrale a tossine riassorbite a livello intestinale che non sono state rimosse dal fegato. Tra queste ricordiamo l'ammoniaca, i mercaptani, acidi grassi a corta catena, amminoacidi aromatici. Può essere presente una notevole riduzione della massa epatica funzionale oppure una deviazione del flusso ematico portale, conseguente allo sviluppo di anastomosi venose portosistemiche, che impedisce la neutralizzazione delle sostanze tossiche di origine gastrointestinale. La patogenesi di questa anomalia reversibile del metabolismo cerebrale non è stata ancora completamente chiarita. La gravità dei segni clinici non è correlata all'intensità dell'ammoniemia, pertanto si ritiene che altre tossine, quali mercaptani e gli acidi grassi a catena corta, agiscano in sinergismo con l'ammoniaca per alterare i processi fisiologici dei neurotrasmettitori e delle membrane cerebrali. La diminuita degradazione di amminoacidi aromatici porta a un loro aumento che favorisce la formazione di vari neurotrasmettitori falsi e inibitori a livello cerebrale. Non è stato però ancora chiarito se tali neurotrasmettitori assumano un ruolo importante nella genesi dell'encefalopatia epatica. Sintomi comuni sono depressione, ipersalivazione, disturbi motori (atassia, tremori) fino a convulsioni e coma.⁽¹²⁾

2.5.2 Esami di laboratorio

Enzimi marker: l'aumento dell'attività sierica degli enzimi che, in condizioni normali, risiedono in concentrazioni elevate all'interno degli epatociti, riflette un danno strutturale o funzionale a carico delle membrane cellulari che ne consente la fuoriuscita o il passaggio nel sangue. Nel cane i principali enzimi che dimostrano maggiore utilità diagnostica nei confronti dell'epatopatie sono l'AST (aspartato aminotransferasi) e l'ALT (alanina aminotransferasi). In gran parte delle epatopatie croniche si assiste a un aumento persistente e di gravità media o elevata di ALT, AST e ALP (fosfatasi alcalina).^(13, 14, 15) Tuttavia nello stadio terminale di una epatopatia cronica, come nella cirrosi, ci può essere una grave alterazione della funzionalità epatica ma gli enzimi rilasciati nel siero sono pochi dato che la massa epatica si riduce al punto tale da ridurre la produzione di enzimi. Questi test sono quindi danno poche indicazioni sul tipo di malattia presente e sullo stato funzionale del fegato.⁽¹³⁾ Le attività enzimatiche possono quindi risultare fluttuanti nel tempo ed è necessario non considerare indicativo di remissione il riscontro di un abbassamento delle attività enzimatiche, se non quando lo si rilevi costantemente in esami ripetuti. Gli enzimi epatici presentano un'alta sensibilità (misura della capacità del test di identificare animali con patologie epatobiliari) quindi hanno una elevata capacità di identificare quasi tutti i soggetti malati con pochi falsi negativi. Tuttavia essi presentano una bassa specificità (misura della capacità del test di escludere animali senza patologia epatobiliare) e quindi parecchi animali sani potrebbero presentare elevati valori di enzimi epatici (molti falsi positivi). Pertanto, qualora si riscontri un innalzamento dei parametri enzimatici, per poter formulare una diagnosi certa, è necessario impiegare test dotati di una maggiore specificità come l'esame istopatologico.⁽¹⁶⁾

Le aminotransferasi sono enzimi definiti anche transaminasi che danno avvio al processo di deaminazione degli aminoacidi.

L'**ALT** è un enzima citosolico presente in concentrazioni 10000 volte superiori nell'epatocita rispetto al siero. Una maggior concentrazione di ALT è stata riscontrata a livello dell'area periportale.⁽¹⁷⁾ Un'alterazione di permeabilità della membrana epatocellulare causata da danno, attività ripartitiva, o rigenerativa provoca il rilascio di ALT nel circolo sanguigno. La valutazione del suo rilascio nel siero è considerata, quindi, test di screening di scelta per valutare la presenza di danni epatocellulari. Nel cane l'ALT è considerata molto epatospecifica, in quanto gli altri tessuti che contengono ALT (cuore, rene e muscolo) contribuiscono in modo non significativo all'attività enzimatica circolante perché producono isoenzimi ALT in bassa quantità o dotati di emivita molto ridotta. L'emivita sierica nel cane è variabile tra 3 ore e 4 giorni. L'aumento dell'ALT si

verifica soprattutto secondariamente ad un danno di tipo acuto come l'epatite infettiva o le epatiti tossiche che possono causare un aumento fino a circa 100 volte l'attività basale. Gli aumenti non sono così marcati nelle epatiti croniche, nelle quali però si registrano valori persistentemente elevati.⁽¹⁸⁾ Nelle forme terminali delle patologie croniche, le lesioni epatocellulari sono minime e non si ha una fuoriuscita significativa dell'enzima nel siero, tanto che l'ALT stessa può addirittura risultare all'interno del range di riferimento. Infine è da ricordare che è molto più probabile che le forme acute regrediscano completamente, mentre ciò accade di rado nelle forme croniche, e in queste ultime l'aumento persistente dell'ALT può avere significato diagnostico e prognostico.^(7, 13, 17)

L'**AST** a differenza dell'ALT è presente in elevate concentrazioni nel muscolo scheletrico e cardiaco oltre che nel fegato. Nelle malattie epatiche l'attività dell'AST aumenta in parallelo con quella dell'ALT e di conseguenza un aumento di AST e CK (creatinina chinasi) ma non di ALT può indicare più probabilmente un danno muscolare. L'AST, come enzima epatocellulare, non sembra offrire vantaggi diagnostici rispetto alla ALT, per lo meno in termini di specificità.^(18, 19) Dato, però, che parte della AST epatocitaria è mitocondriale e non libera nel citoplasma, alcuni clinici ritengono che il suo aumento si verifichi solo in caso un danno cellulare di una certa entità (per esempio, necrosi epatocellulare) ma non in caso di semplice permeabilizzazione cellulare. Questo si verifica invece per la ALT. Inoltre poiché l'emivita dell'AST è più breve, la sua presenza indica una lesione più profonda e persistente di quella che induce aumenti dell'attività sierica della ALT. L'AST potrebbe quindi essere un marker più specifico e significativo di danno cellulare di quanto non lo sia la ALT. L'emivita dell'AST è di 5-12 ore nel cane.⁽¹³⁾

L'**ALP** è localizzata principalmente nel fegato, nei tubuli renali, nell'intestino e nelle ossa. E' un enzima associato alla membrana cellulare. L'attività della frazione epatica aumenta a livello ematico in corso di alterazione del flusso biliare(colestasi) e in presenza di induzioni farmacologiche. Nel cane è presente anche un isoenzima corticosteroideo indotto (CIALP) che compare in seguito all'aumento della concentrazione dei glucocorticoidi circolanti. L'aumento dei livelli circolanti di ALP può derivare dalla ritenzione dei costituenti biliari e rilascio dell'enzima per aumentata permeabilità della membrana epatocitaria, causata dall'effetto detergente degli acidi biliari, che sono idrofobici. Nel cane l'ALP comincia ad aumentare 8 ore dopo l'ostruzione biliare e nel giro di 2/4 giorni raggiunge livelli 15 volte superiori a quelli normali. Il picco di attività è raggiunto in 15 giorni.^(13, 17)

La γ **glutammil transferasi (GGT)** è un peptide localizzato a livello della membrana cellulare di diversi tessuti come fegato, rene, pancreas, intestino, cuore, polmoni, muscolo ed eritrociti. Un suo aumento è associato a patologie

colestatiche o ad un aumento della quantità di glucocorticoidi circolanti. Nel cane una terapia con anticonvulsivanti provoca solo un minimo aumento dei valori di GGT, al contrario nell'uomo la GGT può essere considerata un marker di epatite cronica causata dalla somministrazione cronica di tali farmaci.⁽¹⁹⁾

Rilievi ematologici

Per la serie eritrocitaria un riscontro frequente nelle epatopatie croniche consiste nella presenza di eritrociti di forma diversa tra loro (poichilocitosi). Per la serie leucocitaria si può riscontrare un leucogramma da stress in forme infiammatorie croniche gravi. Infine per la serie piastrinica si assiste ad una modica riduzione del numero di piastrine nelle malattie epatiche gravi per sequestro delle stesse da parte del fegato e della milza.⁽¹³⁾

Parametri biochimici : ^(12, 13, 17)

Albumine: l'ipoalbuminemia può essere una manifestazione dell'incapacità epatica di sintetizzare tale proteina; tuttavia vanno prima escluse cause da aumentata perdita come patologie renali e intestinali.

Globuline: l'iperglobulinemia è un riscontro comune nelle malattie epatiche acquisite. L'elettroforesi delle sieroproteine può essere utile al monitoraggio a lungo termine e nel determinare la prognosi delle epatopatie.

Ammoniaca, urea, acido urico: il livello di ammoniaca nel circolo è determinato dalla deaminazione degli aminoacidi da parte del fegato o per effetto del metabolismo dei batteri intestinali. L'ammoniaca così prodotta viene metabolizzata a urea negli epatociti mediante il ciclo dell'urea di Krebs. L'iperammoniemia è associata a encefalopatia epatica.

Glucosio: il fegato modula la quantità di glucosio presente a livello ematico mediante gluconeogenesi e glicogenolisi. L'ipoglicemia si sviluppa facilmente in corso di necrosi epatocellulare acuta.

Colesterolo e lipoproteine: l'utilità della misurazione del colesterolo sierico, come marker di danno epatico, è relativamente bassa, in quanto in corso di patologie epatiche la concentrazione di colesterolo può risultare diminuita, invariata o aumentata, in funzione del tipo di patologia e della quantità di colesterolo esogeno introdotto con la dieta.

Bilirubina: l'iperbilirubinemia, che si manifesta con l'ittero può essere indicativa di patologia epatica ma può essere causata anche da altre patologie.

Tra i **test di funzionalità epatica** quello elettivo è quello in cui si misura la concentrazione degli acidi biliari (FSBA) dopo 12 ore di digiuno. Essa tende ad aumentare in tutte le forme di epatite cronica, dove si ha un'interferenza con i meccanismi di captazione e secrezione epatica degli acidi biliari. Altri test sono la determinazione della concentrazione degli acidi biliari sierici pre e postprandiali (PPSBA), più sensibile del precedente test soprattutto in caso di shunt porto-sistemico, e la determinazione della concentrazione ematica di ammoniaca (BA) indicata primariamente per segnalare la presenza di encefalopatia epatica.

Si può eseguire anche il test di tolleranza all'ammoniaca (ATT), controindicato però quando i suoi livelli sono elevati e poco utilizzato per le attenzioni di esecuzione tecnica che richiede. Può inoltre esacerbare un' HE.⁽⁷⁾

Non vanno poi dimenticate le **prove di coagulazione**: la tendenza al sanguinamento eccessivo che si associa a epatite può derivare da incapacità primaria del fegato di sintetizzare i fattori della coagulazione, CID, malassorbimento della vitamina K. Normalmente si valutano il tempo di protrombina (PT), il tempo parziale di tromboplastina attivata (APTT) e il tempo di coagulazione attivato (ACT). La trombocitopenia può verificarsi secondariamente al sequestro splenico di piastrine associato ad ipertensione portale o consumo di piastrine nella CID. Le prove di coagulazione sono infine uno screening essenziale prima di procedere ad un'eventuale biopsia epatica per cercare di prevenire gravi emorragie post-prelievo e comunque una volta eseguita occorre sempre monitorare il sanguinamento dal sito bioptico.⁽⁷⁾

Test di ritenzione della bromosulfoftaleina (BSP)

Il ruolo centrale del fegato nella biotrasformazione dei farmaci si può sondare somministrando per via endovenosa dei marcatori che necessitano di vascolarizzazione epatica appropriata, captazione epatocellulare, metabolismo intracellulare ed escrezione biliare. Una di queste sostanze è la BSP che per molti anni è stata utilizzata in veterinaria come test di screening nelle epatopatie ma è stata poi ritirata dal commercio per i gravi effetti collaterali che può provocare nei pazienti umani. Nel cane le reazioni indesiderate sono limitate al vomito dopo inoculazione rapida e cellulite in seguito a travaso del colorante nei tessuti. E' possibile acquistarla sottoforma di reagente e diluirla in soluzione sterile al 5% per uso clinico.

In alternativa si può effettuare l'**ICG** o **test di clearance dell' indocianina verde** che valuta la capacità del fegato di eliminare questo colorante anionico.⁽¹²⁾

2.5.3 Diagnostica per immagini

Nell'ambito delle epatiti croniche purtroppo la diagnostica per immagini ci fornisce scarse e aspecifiche informazioni circa il processo patologico che sta interessando il fegato.

La **radiologia convenzionale** permette di valutare le dimensioni dell'organo; un suo aumento (epatomegalia) o diminuzione (microepatia): quest'ultima è di solito associata a processi fibrotici e cirrotici. Tuttavia si è visto che spesso questi stati patologici sono accompagnati da un versamento che radiograficamente appare con un aumento di radiopacità diffusa e perdita di dettaglio che fundamentalmente rende gli organi addominali e quindi il fegato non valutabili. In tali condizioni può essere quindi di maggiore aiuto l'**ultrasonografia addominale** anche se la valutazione delle dimensioni del fegato con l'ecografia, tendenzialmente è soggettiva, anche se esistono riferimenti standard che aiutano l'operatore in questa valutazione.^(20, 21, 22) Le epatiti croniche sono solitamente associate a fibrosi che induce un aumento dell'ecogenicità del parenchima. La presenza d'inflammatione cronica attiva, che consiste in una mescolanza di cellule infiammatorie, edema, fibrosi, necrosi come anche noduli rigenerativi (iperplasia) può rendere il fegato eterogeneo.^(20, 21) Attraverso l'ecografia si può valutare l'aumento delle dimensioni con margini arrotondati ed estensione dei limiti del fegato, molto caudalmente all'arco costale, che sono indicativi di spostamento caudale dell'organo e quindi, verosimilmente, di un suo aumento di volume;⁽²²⁾ un fegato di piccole dimensioni con fibrosi avanzata o cirrosi può essere invece difficile da visualizzare. Oltre alle ridotte dimensioni si può osservare l'ecogenicità di solito aumentata, contorni irregolari, la presenza di noduli rigenerativi e ascite; si può inoltre eseguire una paracentesi eco-guidata, per analizzare il liquido addominale e cercare di identificare la causa eziologica dell'epatopatia o una biopsia epatica, sempre eco-guidata, per poter formulare una diagnosi definitiva.^(20,21,22)

Nello studio realizzato da Guillot *et al.* nel 2009, viene descritto come, a differenza di patologie neoplastiche nelle quali si definiscono caratteristici reperti ecografici, nelle epatopatie croniche essi non siano identificabili. La presenza di lesioni multifocali può essere diversamente interpretata come un reperto di lesioni nodulari ma anche come un parenchima eterogeneo, in base all'interpretazione soggettiva dell'ecografista. L'ultrasonografia, secondo gli autori, può essere solo un utile guida per il clinico per indirizzare la scelta di successivi test diagnostici più specifici.⁽²³⁾

In conclusione né gli esami di laboratorio né quelli ultrasonografici si possono considerare validi da soli come strumenti per valutare le diverse forme di epatite

ad eccezione delle forme cirrotiche che determinano una completa alterazione strutturale visibile in ecografia.⁽²⁴⁾

2.5.4 Biopsia epatica

In caso di epatite cronica o di altre patologie croniche del parenchima epatico nel cane, i metodi convenzionali di diagnosi fino ad ora descritti, come gli enzimi epatici e l'ultrasonografia addominale, sono sicuramente utili al fine di emettere una diagnosi di sospetto di epatopatia poiché forniscono alcune informazioni, ma tuttavia non sempre riflettono la gravità del processo patologico stesso.⁽²⁵⁾

La biopsia epatica è in genere necessaria per la caratterizzazione definitiva della natura e della gravità della patologia.⁽⁷⁾

Esistono diversi metodi di prelievo:

Aspirazione con ago sottile: è di grande utilità per la diagnosi citologica epatica se il processo patologico è diffuso e se le correlazioni architettiche, valutabili solo con l'esame istopatologico, non sono essenziali per la diagnosi. Un esempio sono le patologie epatiche infettive.⁽⁷⁾ Infatti mentre l'istologia consente di arrivare ad una diagnosi e di effettuare una stadiazione delle epatiti attraverso il riconoscimento di un infiltrato linfocitario e/o plasmocitario, della sclerosi tissutale e della disarchitettura dell'organo, la citologia è solo in grado di evidenziare gli elementi linfoplasmocitari. La scarsa concordanza con l'istologia deriva dalla difficoltà di apprezzare la sclerosi organica con la citologia, e di giudicare quindi in modo adeguato la cronicità del processo. Inoltre nelle epatiti croniche l'infiltrato è spesso frammisto a connettivo sclerotico, cosicché le cellule infiammatorie (in prevalenza linfociti) vengono aspirate in scarsa quantità. Esiste inoltre il rischio di ottenere false positività citologiche legate ad una elevata concentrazione di linfociti circolanti. Questi limiti sono stati identificati anche da Center e da Stockhaus e Teske, secondo cui la diagnosi citologica di epatite non è facile e non può essere emessa con sufficiente certezza, e da Meyer e French che dubitano della adeguata sensibilità e specificità della diagnosi citologica per le epatiti, tanto più che in condizioni di epatite cronica attiva assumono significato diagnostico e prognostico di rilievo soprattutto il grado di fibrosi e l'entità dei processi rigenerativi che, per ovvi motivi, non possono essere valutati con l'esame citologico.⁽¹¹⁾

Ago-biopsia epatica percutanea alla cieca: hanno maggiore successo quando il fegato è ingrossato e le alterazioni patologiche sono diffuse. Sono preferibili gli approcci transaddominali utilizzando aghi bioptici Tru-Cut o Menghini. Il vantaggio di queste tecniche è che richiedono una sedazione minima e sono di

breve durata. Gli svantaggi sono i potenziali traumi agli organi adiacenti quali la colecisti con conseguente coleperitoneo, lo stomaco e il polmone con pneumotorace⁽²⁶⁾ o la raccolta di campioni tissutali non adeguati.

Ago-biopsia eco-guidata: di gran lunga preferita alla precedente, costituisce la tecnica elettiva purché si abbiano a disposizione gli strumenti necessari e una buona esperienza del clinico. In aggiunta alla tecnica percutanea consente di prelevare campioni da lesioni focali, di evitare strutture adiacenti al fegato e di monitorare il sanguinamento post-bioptico. Può però risultare difficile se il fegato è di piccole dimensioni, come in caso di fibrosi grave e cirrosi.⁽⁷⁾

Biopsia minilaparotomica: si esegue in anestesia generale, come per le biopsie percutanee. Si effettua una breve incisione, in cui si inserisce un dito con guanto sterile con cui si localizza il lobo su cui si deve eseguire la biopsia e che guida l'ago nella direzione appropriata.⁽⁷⁾

Laparoscopia: consente la visualizzazione diretta del fegato e delle strutture adiacenti come il pancreas e il tratto biliare extraepatico. Inoltre permette l'esecuzione della biopsia sotto visualizzazione diretta. È un utile metodo alternativo alla biopsia eco-guidata nel caso in cui il fegato sia di piccole dimensioni. È preferibile alle tecniche percutanee quando si prevede un sanguinamento eccessivo o alla laparotomia quando si sospettano problemi di ritardata cicatrizzazione in caso d'ipoalbuminemia. Questa tecnica richiede la sedazione profonda o l'anestesia generale.⁽⁷⁾

Laparotomia: è indicata solo quando si sospettano patologie correggibili chirurgicamente, come ostruzioni del tratto biliare extraepatico, masse o shunt portosistemico. Consente di ottenere campioni di grosse dimensioni e di monitorare il sanguinamento post-bioptico. C'è però un rischio relativamente elevato di complicanze.⁽⁷⁾

Analisi della biopsia

I campioni dell'ago-biopsia vanno rimossi delicatamente dall'ago, riposti su carta per biopsia e quindi posti direttamente in formalina. Per preparare il tessuto bioptico per l'esame istopatologico si deve riporre il campione in formalina tamponata al 10% e consentire la fissazione per almeno 24 ore.

Si esegue la microscopia ottica routinaria sul campione epatico colorato con ematossilia-eosina (EE). Possono essere utili colorazioni aggiuntive: tricromo o reticolina per il tessuto connettivo fibroso, periodic-acid-Schiff per il glicogeno, rodanina o acido rubeanico per il rame, blu di Prussia per il ferro, rosso Congo

per l'amiloide, olio rosso O per il grasso, argento e colorazioni acidoresistenti per gli agenti infettivi (*Leptospira*).⁽⁴⁾

Si può anche sottoporre il tessuto epatico fresco ad esami colturali batterici e fungini. L'esame quantitativo del rame può essere eseguito su tessuto fresco o fissato in formalina. Si può congelare il campione in glutaraldeide tamponata 2.5% per la microscopia elettronica.

Comunque, nella pratica clinica, ottenere adeguati campioni bioptici dai pazienti con patologie epatiche è talvolta difficile a causa dei rischi correlati all'anestesia e alle eventuali emorragie, o a causa delle preferenze del proprietario. Inoltre, è necessario ripetere diverse biopsie epatiche per valutare la progressione della malattia e l'efficacia di un eventuale trattamento per la fibrosi. Al contrario, la cirrosi epatica, che rappresenta lo stadio finale di diverse malattie del fegato, può essere qualche volta sospettata sulla base dei sintomi o del profilo biochimico (albumine e acidi biliari sierici), e può essere diagnosticata tramite metodiche non invasive come l'ecografia addominale^(20,21,22) e confermata dalla biopsia: tuttavia ipoalbuminemia e ascite, frequentemente osservate in cani con cirrosi, possono complicare la sua esecuzione.⁽⁷⁾

In letteratura è stata dimostrata una significativa discordanza tra le diagnosi morfologiche ottenute quando le biopsie, prelevate dallo stesso animale mediante ago o a cuneo, venivano valutate dal medesimo istopatologo. Tale discordanza con tutta probabilità riflette errori di campionamento che frequentemente si possono commettere. I singoli istopatologi non concordano sulla diagnosi morfologica nel 44% e nel 65% dei casi in cui è stata effettuata la valutazione delle stesse biopsie prelevate, rispettivamente con il metodo a cuneo o mediante ago aspirato. Ciò implica un flusso costante d'informazioni tra clinico e patologo non sempre così facile da garantire.⁽²⁾

Non ci si deve sempre aspettare che la biopsia fornisca la diagnosi eziologica ma è sicuramente molto utile: le colorazioni speciali possono indirizzare verso l'uno o l'altro agente eziologico e servono a identificare patologie da accumulo, per esempio di rame.

Nella classificazione eziologia abbiamo visto come la distribuzione della fibrosi in funzione dell'eziologia sia variabile e interessa in particolare alcuni distretti piuttosto che altri, caratteristica che lo studio bioptico può mettere in evidenza. Ad esempio le epatiti tossiche da paracetamolo, sono prevalentemente centrolobulari, mentre le infezioni da Toxoplasmosi provocano lesioni focali o multifocali.

Le lesioni infiammatorie croniche sono quelle più difficili da valutare, poiché il fegato risponde a molti insulti cronici (indipendentemente dal fatto che siano causati da tossine, microrganismi o stimolazioni immunitarie) con lo stesso tipo

di reazione. Nella valutazione della biopsia è quindi importante prestare attenzione a elementi infiammatori presenti quali neutrofili ed eosinofili, valutare se l'infiammazione si estende oltre la placca limitante, in tal caso la malattia sarà più grave, e notare l'estensione della fibrosi (limitata alle aree portali o necrosi a ponte). Quest'ultima è compatibile con una malattia cronica e grave ed è quindi un fattore prognostico negativo.^(2,6)

Alla luce di tutto questo è indiscutibile l'utilità dell'istopatologia nella diagnosi della fibrosi epatica e cirrosi, ma altrettanto indiscutibili sono le sue numerose limitazioni che hanno spinto ricercatori e Università a investire nella ricerca di metodi diagnostici non invasivi per valutare la gravità di malattie croniche del parenchima epatico. In questo senso sono sorprendenti i risultati ottenuti da Kanemoto *et al.* nel 2009 con uno studio che ha dimostrato come l'acido ialuronico (HA) sia, analogamente all'uomo, un marker sierico non invasivo di cirrosi nel cane.⁽²⁵⁾

Rischi della biopsia

anestesia: un paziente con patologia epatica può incorrere in un rischio anestesilogico elevato, soprattutto quando la biopsia viene effettuata con la tecnica laparotomica.

emorragia: tra i rischi post-biopsia è segnalata l'emorragia sebbene sia piuttosto rara. Gli animali con danno epatocellulare, completa ostruzione del dotto biliare extraepatico e CID (coagulazione intravasale disseminata) sono quelli esposti a maggiore rischio. Prima di effettuare l'esame bioptico è infatti raccomandata l'esecuzione di un profilo coagulativo (tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale, degradazione dei prodotti della fibrina, fibrinogeno e conta piastrinica). Nel caso in cui non sia disponibile, potrebbero essere comunque effettuate la conta piastrinica, il tempo di coagulazione attivato (ACT) e il tempo di sanguinamento della mucosa buccale (BMBT). Si dovrebbe comunque ricordare che l'emorragia è più spesso un problema legato alla tecnica con cui viene eseguita la biopsia o a un movimento improvviso dell'animale durante la sua esecuzione, piuttosto che un preesistente disturbo della coagulazione. Sono inoltre disponibili per un maggiore controllo del sanguinamento strumenti in grado di coagulare contemporaneamente all'esecuzione del prelievo bioptico (LCS: Laparoscopic coagulative shears). E' inoltre possibile l'applicazione di gelatina spugnosa, fibrina sigillante prelevata da altri cani e pressione digitale anche se non ci sono dati in letteratura che confermino l'efficacia di queste tecniche, anzi, sembrerebbe che LCS causi danni collaterali maggiori rispetto alla biopsia realizzata con Tru-Cut o mediante ago-

biopsia. Per quanto riguarda la pressione manuale sembra essere inefficace quando viene applicata nel sito biotico per dieci minuti, mentre risulta differenza di sanguinamento statisticamente significativa tra una biopsia eseguita a livello centrale o periferico del fegato.⁽²⁸⁾

Compromessa guarigione della ferita: il fegato è l'unica fonte di albumine dell'organismo. Animali con grave disfunzione epatica presentano una ridotta sintesi di albumine e conseguentemente ipoprotidemia. Essa rappresenta un evidente rischio per la chirurgia, in particolare per la laparotomia e per la guarigione della ferita. Soggetti con ipoprotidemia devono essere trattati preventivamente con una trasfusione di plasma prima della biopsia, e le tecniche percutanea e laparoscopica sono da preferire a quella laparotomica. Comunque alcuni autori ritengono che le complicanze associate a compromessa guarigione della ferita possano essere evitate attraverso l'impiego di un filo monofilamento non riassorbibile.^(27,29)

2.6 TERAPIA DELLA FIBROSI/CIRROSI EPATICA NEL CANE

I fattori prognostici che riducono il tempo di sopravvivenza nel cane, in corso di epatopatia possono essere i più svariati, lo studio di Poldervaart *et al*, del 2009, considera alcune associazioni di fattori e il loro valore prognostico.

- ipoglicemia e prolungato tempo di protrombina (PT) portano a morte il paziente nell'arco di una settimana;
- ipoalbuminemia e presenza di fibrosi a ponte determinano accorciamento del tempo di sopravvivenza ma generalmente la morte sopraggiunge nell'arco di una settimana;
- anoressia e prolungato PT e APTT (tempo di tromboplastina parziale attivata) e trombocitopenia riducono il tempo di sopravvivenza al di sotto dei due mesi;

Tuttavia la prognosi per le epatiti croniche nel cane è abbastanza variabile. Cani con ipoalbuminemia, ipoglicemia, prolungato PT e fibrosi a ponte presentano una prognosi infausta. La media di dei tempi di sopravvivenza è stimata tra 21,1 e 36,4 mesi.⁽²⁴⁾ I risultati ottenuti da questo studio, come dai lavori precedenti, suggeriscono che più è precoce la diagnosi, migliore sarà l'approccio terapeutico e di conseguenza anche la prognosi, soprattutto per patologie quali l'epatite da accumulo di rame per la quale è quindi disponibile un trattamento adeguato. Gli autori auspicano, con studi successivi, di riuscire a identificare con precisione gli agenti eziologici delle epatiti in modo da poter impostare una terapia preventiva per allungare i tempi di sopravvivenza dei pazienti.⁽³⁰⁾

Il trattamento delle epatiti croniche può essere suddiviso in tre categorie:

trattamento delle epatopatie ad eziologia nota;

terapia di supporto per la remissione della patologia epatica;

terapia sintomatica delle complicanze del danno epatico.^(2, 24)

2.6.1 Trattamento delle epatopatie ad eziologia nota

Le epatiti croniche ad eziologia nota possono essere identificate e trattate. La *Leptospirosi*, ad esempio, può essere trattata con terapia antibiotica associata ad adeguata terapia sintomatica in base alla situazione clinica del soggetto; la somministrazione di farmaci epatotossici come il carprofene e il fenobarbitale

dovrebbe essere sospesa e sostituita possibilmente da farmaci non tossici per il fegato come ad esempio il bromuro potassio.

I cani con epatite da accumulo di rame possono essere trattati con zinco e chelanti del rame. La dose di zinco da somministrare è calcolata in funzione della percentuale che è presente nei diversi sali: esso è infatti disponibile in commercio sotto forma di acetato di zinco, solfato di zinco, zinco metionina e gluconato di zinco. L'acetato di zinco è generalmente preferito poiché vanta meno effetti collaterali gastrointestinali. Nel tratto intestinale lo zinco determina l'induzione della metallotioneina negli enterociti. Questa proteina lega il rame e il complesso viene sequestrato e poi eliminato insieme all'enterocita senescente nel lume intestinale. I sali di zinco andrebbero somministrati 1 ora prima di ciascun pasto, in modo che al momento dell'assorbimento del rame alimentare l'induzione della metallotioneina abbia già avuto luogo. Lo zinco va utilizzato quindi come farmaco preventivo. La dose di zinco per via orale inizialmente raccomandata è di 5-10 mg/kg, due volte al giorno per i primi 3-6 mesi, poi la dose viene ridotta del 50%. Le combinazioni di chelanti e sali di zinco sono da evitare, perché, quando il chelante lega lo zinco, la rimozione del rame diventa meno efficace.

I chelanti del rame vanno utilizzati di routine per circa 3 mesi per ottenere una remissione completa dell'epatite. Tra i principali chelanti ricordiamo la D-penicillamina e il Trientene, il cui impiego è raccomandato per livelli di rame maggiori di 2000 µg/g. Il dosaggio consigliato per entrambi è di 10-15mg/kg 2 volte al giorno.⁽³¹⁾

Il trattamento per l'epatite da accumulo di rame dello Skye terrier include acido ursodeossicolico, colchicina e zinco per via orale.⁽³¹⁾

2.6.2 Terapia di supporto per la remissione della patologia epatica

L'infiammazione che normalmente accompagna le patologie epatiche può essere trattata con diversi farmaci antinfiammatori e immunomodulatori come prednisone, azatioprina, acido ursodeossicolico, SAMe e metronidazolo.

L'esperienza generale dei veterinari epatologi è che i glucocorticoidi sono spesso efficaci per il trattamento dell'epatite cronica nel cane. Il prednisone deve essere metabolizzato in prednisolone dal fegato. Di conseguenza, è logico utilizzare il prednisolone nei casi di epatopatia. Questo farmaco può essere considerato come il trattamento di prima scelta per l'epatite cronica idiopatica. La dose iniziale è di 1-2 mg/Kg al giorno, poi viene ridotta del 50% nell'arco di 3-4 settimane. Tuttavia i glucocorticoidi possono determinare effetti collaterali

inaccettabili, in tal caso l'azatioprina rappresenta un farmaco alternativo. Uno svantaggio però di quest'ultima è la soppressione midollare. Viene utilizzata alla dose di 0,5-2 mg/Kg per via orale ogni 24 ore per 1-2 settimane ed è comunemente utilizzata nell'uomo per l'epatite autoimmune, pertanto sembra ragionevole un suo utilizzo nelle forme di epatite immunomediata nel cane.⁽²⁴⁾

L'acido ursodeossicolico (UDCA) è uno degli acidi biliari naturali del circolo enteroepatico con proprietà antinfiammatoria, immunomodulatrice e coleretica. Viene sintetizzato e commercializzato sotto forma di compresse e capsule utilizzate in medicina veterinaria. L'UDCA svolge quattro azioni positive: impedisce alle cellule di entrare nella via dell'apoptosi e previene il danno mitocondriale; rimuove gli acidi biliari tossici dal pool biliare mediante l'induzione di un aumento del flusso di bile; modula il sistema immunitario con riduzione della sua risposta e infine aumenta la produzione di glutatione e metallothioneina negli epatociti che potrebbe servire a prevenire il danno ossidativo.

SAMe o S-adenosilmetionina è un nutraceutico ultimamente utilizzato in cani con patologie epatiche. Ha effetti antinfiammatori e antiossidanti, e gioca un importante ruolo nella sintesi e nella replicazione delle proteine. E' stata utilizzata nel trattamento di avvelenamenti con acetaminofene, ma non sono disponibili studi controllati circa il suo impiego nell'epatite cronica del cane. Si usa alla dose di 20 mg/kg al giorno ed è meglio assorbita se animale è a digiuno.^(2, 12, 24)

Infine il metronidazolo, oltre ad essere utile come antibiotico per agenti infettivi anaerobi e per l'encefalopatia epatica in quanto riduce la carico intestinale di batteri uresi produttori, può anche avere effetti immunosoppressivi in cani con epatite cronica. E' utilizzata alla dose di 7,5 mg/Kg per via orale ogni 12 ore.

Alcuni dei farmaci sopraelencati (prednisone, azatioprina, zinco, D-penicillamina e acido ursodeossicolico) hanno oltre ad un effetto antinfiammatorio anche un effetto antifibrotico anche se il farmaco antifibrotico per eccellenza rimane la colchicina. La colchicina è l'unico agente utilizzato in modo specifico per arrestare e ridurre la fibrosi. Si ritiene che agisca attraverso la stimolazione dell'attività collagenasica. Lo svantaggio è che sono stati descritti effetti collaterali come vomito, diarrea e soppressione midollare. La letteratura riferisce l'efficacia del farmaco in un solo cane. Viene raccomandata la dose di 0,03 mg/Kg per via orale ogni 24 ore.

L'ultima categoria di farmaci che può partecipare nella remissione della patologia epatica sono gli antiossidanti. Oltre allo zinco, ricordiamo la vitamina E, e nuovamente la SAMe e l'acido ursodeossicolico.

La vitamina E è raccomandata alla dose di 50-600 IU al giorno. Nel Bedlington terrier con epatopatia da accumulo di rame sono stati riportati danni ossidativi a carico delle membrane mitocondriali degli epatociti. I risultati ottenuti in vitro suggeriscono che la vitamina E potrebbe essere utile per proteggere i mitocondri dai danni ossidativi provocati dal rame o dagli acidi biliari idrofobici. Poiché l'assorbimento delle vitamine solubili nei lipidi potrebbe ridursi in presenza di malattie del sistema epato-biliare sono preferibili formule commerciali solubili in acqua.

La silimarina (o silibinina) è il componente attivo estratto dal frutto di *Silybum marianum*, il cardo mariano. La silimarina è stata utilizzata per secoli in medicina umana per il trattamento delle epatopatie. Sembra essere un forte eliminatore di radicali liberi. Alcuni studi ne hanno dimostrato l'efficacia nel cane con diminuzione degli enzimi epatici e riduzione del prolungamento del tempo di protrombina. Sebbene sia stato dimostrato il suo utile impiego in caso di avvelenamento con funghi *Amanita* sia nel cane che nell'uomo, non ci sono studi controllati che ne dimostrino l'efficacia nel trattamento di epatiti croniche. ^(24, 31)

Un corretto regime alimentare è inoltre molto importante nei soggetti affetti da epatopatia. E' una comune ma errata convinzione quella che stabilisce che cani con patologie del fegato debbano assumere diete povere di proteine; questo potrebbe essere vero solo in caso di encefalopatia epatica. I cani con epatite cronica dovrebbero alimentarsi con un alimento altamente digeribile, con proteine di elevato valore biologico, con basso contenuto di aminoacidi aromatici, metionina e alti valori di arginina. Grassi e carboidrati devono essere contenuti. La fibra potrebbe essere utile per legare gli acidi biliari e ridurre l'encefalopatia. ^(24,31)

2.6.3 Terapia sintomatica delle complicanze del danno epatico

La terapia sintomatica può includere il controllo dell'encefalopatia epatica, coagulopatie, ascite, ulcere gastroenteriche, infezioni e/o endotossiemia.

L'origine delle sostanze tossiche note per causare le alterazioni dei neurotrasmettitori cerebrali, caratteristiche dell'encefalopatia epatica, è la digestione delle proteine nel tratto intestinale. I due principali fattori sono l'ammoniaca e gli aminoacidi aromatici. Entrambi richiedono una circolazione collaterale portosistemica, dovuta a ipertensione portale cronica, per raggiungere la circolazione sistemica e la barriera ematoencefalica. L'encefalopatia portosistemica, che è di gran lunga la forma più comune, va trattata con una dieta appropriata a ridotto contenuto proteico e con una specifica diminuzione

delle fonti di aminoacidi aromatici. Un altro importante fattore è che il lattulosio e la fibra solubile nella dieta contribuiscono a ridurre la captazione di ammoniaca dell'intestino crasso. Lattulosio e fibre solubili esercitano molti effetti sul metabolismo dell'ammoniaca; quello più importante è la metabolizzazione da parte della flora batterica del colon per produrre acidi che riducono il pH del contenuto di questo tratto intestinale. L'ammoniaca è quindi presente nella forma ionica, che non viene assorbita e pertanto va perduta con le feci. Se la dieta da sola non sufficiente è possibile somministrare lattulosio per via orale. Esso è stato in origine sviluppato per trattare la costipazione, perché la molecola disaccaridica viene metabolizzata nel colon in molteplici molecole più piccole, che aumentano il contenuto osmotico del viscere e attirano acqua nelle feci. Il lattulosio viene somministrato due volte al giorno. L'associazione di dieta e lattulosio è spesso sufficiente a trattare l'encefalopatia epatica cronica. Tuttavia il suo peggioramento può essere dovuto a diversi eventi rappresentati da disidratazione, ipercatabolismo, alcalosi, ipokaliemia e formazione di ascite. Anche l'improvvisa produzione di elevati livelli di ammoniaca può causare un aggravamento dell'encefalopatia epatica. Ciò può essere dovuto a un sanguinamento intestinale da ulcere gastroduodenali, che può essere associato a malattia epatica croniche. Il sangue è la componente proteica maggiormente ammoniogenica. Infine esistono misure aggiuntive che possono risultare utili come l'impiego di antibiotici come amoxicillina (22 mg/Kg ogni 12 ore per via orale), neomicina (22 mg/Kg ogni 12 ore per via orale), metronidazolo (7,5 mg/Kg ogni 12 ore per via orale).(2, 24) Le coagulopatie possono derivare da una diminuzione della sintesi dei fattori della coagulazione, minore assorbimento di vitamina K, e coagulazione intravasale disseminata (CID). La somministrazione di vitamina K per via parenterale (0,5-2 mg/Kg per via sottocutanea ogni 12 ore) può aiutare a correggere le coagulopatie. Se tale terapia risulta inefficace, si deve ricorrere a una trasfusione di sangue intero o di plasma. L'ascite è un segno tardivo di scompenso epatico nelle epatopatie croniche e nella cirrosi. In tutte le malattie epatiche associate all'ascite, l'elevata pressione portale può anche condurre alla formazioni di vasi collaterali portosistemici (shunt acquisiti). L'ascite può essere trattata con furosemide e/o spironolattone. La furosemide è considerata più potente ma può causare ipokaliemia e alcalosi metabolica, che sono fattori complicanti attraverso i quali l'encefalopatia epatica può indurre il coma ed essere letale, infatti l'ammoniaca è molto più tossica in condizioni di alcalosi. In caso di ipokaliemia, i livelli plasmatici di potassio vengono bilanciati dallo spostamento del potassio proveniente dalla cellule, che viene scambiato con sodio e ioni idrogeno. Lo spostamento di ioni idrogeno che ne deriva causa un alcalosi nel fluido extracellulare e un acidosi intracellulare, per cui l'ammoniaca può facilmente penetrare all'interno di queste ultime. A livello intracellulare, viene ionizzata e in questa forma non può più lasciare le cellule.

Da ciò ne deriva che l'ammoniaca ematica, usata per il monitoraggio dell'encefalopatia epatica, può quindi essere bassa, dato che l'ammoniaca è intrappolata all'interno delle cellule, per questo l'uso della furosemide deve essere attentamente monitorato. E' quindi preferibile l'impiego dello spironolattone che agisce come risparmiatore di potassio e inibisce l'aldosterone, il quale porta a una perdita di potassio, ritenzione di sodio e acqua, con conseguente riduzione dell'ascite. La dose raccomandata per lo spironolattone è 1-2 mg/Kg per via orale ogni 12 ore. Se è inefficace si può aggiungere la furosemide a 1-2 mg/Kg per via orale ogni 12 ore. Le ulcere gastroenteriche possono essere trattate con anti H2, sucralfato o omeprazolo. Tra gli anti H2 è generalmente preferita la famotidina (0,5-1 mg/Kg per via orale ogni 12-24 ore). Tra gli inibitori della pompa protonica, l'omeprazolo può essere utilizzato alla dose di 0,7-2 mg/Kg per via orale una volta al giorno. Il sucralfato è utilizzato alla dose di 0,5-1 g/capo per via orale ogni 8-12 ore. Anche gli antibiotici possono essere di aiuto nei cani con epatite. Tra questi ricordiamo amoxicillina, amoxicillina e acido clavulanico, fluorchilononi e metronidazolo.^(2, 24)

2.6.4 Monitoraggio

Il monitoraggio di pazienti con epatite cronica include:

rivalutazione dei parametri di laboratorio;

emogasanalisi

valutazione dell'efficacia dei farmaci;

dosaggio dei livelli sierici del farmaco quando possibile.

Il monitoraggio dei parametri di laboratorio può essere ingannevole. Infatti farmaci come i glucocorticoidi possono aumentare le concentrazioni degli enzimi epatici, soprattutto della fosfatasi alcalina. Tuttavia l'iperbilirubinemia e l'ipoalbuminemia possono essere significativi. I tempi di coagulazione possono essere rivalutati dopo somministrazione di vitamina K o trasfusione di sangue per confermare o meno una loro normalizzazione. A causa delle difficoltà interpretative dei valori sierici degli enzimi epatici, l'efficacia della terapia potrebbe essere meglio documentata attraverso il monitoraggio della remissione o diminuzione della progressione della malattia; infatti 3-6 mesi dopo l'inizio del protocollo terapeutico dovrebbe essere riefettuata una nuova biopsia allo scopo di indagare sulla remissione dell'infiammazione, risoluzione della fibrosi e diminuzione delle concentrazioni epatiche di rame. Un miglioramento dei segni clinici, così come una diminuzione dell'ascite o una risoluzione dell'encefalopatia

epatica, possono essere utilizzate per documentare l'efficacia della terapia. Oltre al monitoraggio dell'efficacia della terapia, per il clinico è importante valutare gli effetti del trattamento farmacologico a livello locale. L'azatioprina e raramente la colchicina sono responsabili di mielosoppressione. Inizialmente ogni 1 o 2 settimane e a seguire ogni 1 o 2 mesi è consigliata la valutazione dell'esame emocromocitometrico. L'azatioprina è stata anche associata a pancreatiti ed epatopatie acute, cosicchè dovrebbe essere effettuata anche una valutazione dell'esame biochimico. La somministrazione di colchicina, azatioprina, D-penicillamina o zinco si associa alla presenza di effetti collaterali gastroenterici quali anoressia, vomito e diarrea; sono invece rari con l'impiego dell'acido ursodesossicolico, vitamina E, L-metionina e silimarina. Le tossicità di tali farmaci si potrebbero controllare attraverso un dosaggio delle loro concentrazioni sieriche; oggi solo pochi farmaci come lo zinco possono essere valutati. I livelli di zinco dovrebbero essere monitorati ogni 2 o 3 mesi e le concentrazioni terapeutiche efficaci sono comprese tra 200-400 µg/dL.⁽²⁴⁾

2.7 LA FIBROSI/CIRROSI NELL'UOMO

2.7.1 Eziopatogenesi

Analogamente a quanto descritto nel cane anche nell'uomo le cause di epatite sono assai numerose e confrontabili nell'origine eziologica ad eccezione ovviamente di quelle provocate dall'abuso di alcool e droghe.

Nell'ambito delle epatiti acute⁽³²⁾ le cause più frequenti sono l'origine virale (soprattutto A, B,C), l'abuso di sostanze tossiche come droghe e alcool e le colangiti.

Le cause più frequenti di epatite cronica, invece, in ordine di frequenza sono: epatite cronica C, malattia epatica da alcool, la steatoepatite non alcolica, l'epatite cronica B, l'epatite autoimmune, la colangite sclerosante, la cirrosi biliare primitiva, l'emocromatosi e la malattia di Wilson. Le epatiti croniche rappresentano quindi una serie di patologie epatiche caratterizzate da diversa eziologia e gravità nelle quali l'infiammazione e la necrosi durano da almeno 6 mesi, come nel cane. Le forme più lievi non sono progressive o lo sono solo lentamente, mentre le forme più gravi possono dar luogo a cicatrizzazione e sovvertimento della normale architettura fino alla cirrosi.

La malattia di Wilson è una malattia ereditaria poco frequente del metabolismo del rame paragonabili alle forme di epatite da accumulo già descritte nel cane e caratteristiche di alcune razze come il Beglinton Terrier e West Highland White Terrier; anche nell'uomo si tratta di una malattia da accumulo di metalli su base genetica. Questa malattia si manifesta clinicamente nei giovani adulti o negli adolescenti nei quali è dimostrabile un'eccessiva quantità di rame nel fegato e negli altri tessuti. L'accumulo di rame è dovuto a un'alterata escrezione dell'elemento causata da una mutazione del gene che codifica un trasportatore del rame, l'ATPasi di tipo P. Clinicamente i pazienti possono presentare nell'adolescenza o nei primi anni dell'età adulta epatite cronica, cirrosi e le relative complicanze. In pochi pazienti può essere fulminante. La biopsia epatica può evidenziare quadri istologici diversi e la presenza di eccessivi livelli di rame.⁽³²⁾

2.7.2 Aspetti clinici nell'uomo

Le analogie tra il cane e l'uomo riguardano non solo l'eziologia ma anche i segni clinici che accompagnano le epatiti. La maggior parte dei segni di malattia epatica non è specifica per la diagnosi; in molti pazienti malati l'esame obiettivo può essere nella norma, a meno che la patologia non sia acuta o avanzata. Tuttavia è semeiologicamente importante eseguire un'attenta visita clinica per dimostrare i primi segni d'insufficienza epatica, ipertensione portale e scompenso epatico.⁽³²⁾

I tipici segni riscontrati nei pazienti con malattia epatica sono ittero, epatomegalia, dolenza epatica, splenomegalia, angiomi a stella, eritema palmare ed escoriazioni. Negli stadi avanzati si può riscontrare cachessia, edema, ascite, confusione mentale, stato stuporoso e coma. L'ittero si valuta osservando il colore della sclera e della carnagione, anziché valutare le mucose come nel cane; l'epatomegalia non è un segno affidabile di malattia epatica a causa della variabilità delle dimensioni e della forma del fegato e della difficoltà di valutare le dimensioni dell'organo con palpazione e percussione. La percussione è utile anche per valutare la presenza di ascite, ma in casi dubbi si può comunque ricorrere all'ecografia che conferma l'eventuale presenza di falde di versamento in cavità addominale. In fase di malattia epatica avanzata, all'ascite si possono accompagnare edemi periferici causati da ipoalbuminemia e insufficienza venosa.

Per insufficienza epatica si intende la comparsa di segni e sintomi di encefalopatia epatica che, analogamente al cane, è caratterizzata da sintomatologia neurologica e consegue a forme di epatite grave, acuta o cronica.⁽³²⁾Una ripercussione inevitabile delle patologie epatiche è anche nell'uomo l'ipertensione portale che è importante sempre valutare. Come riportato in uno studio⁽³³⁾del 2009 la caratteristica principale dell'ipertensione portale è il patologico aumento del gradiente di pressione venosa epatico (HVPG: hepatic venous pressure gradient) che può essere un parametro predittivo negativo per varici, emorragie, scompenso e morte. Pareri internazionali recenti sono concordi nel considerarlo un buon marker di ipertensione portale, ma con lo svantaggio che è costoso da valutare, che richiede procedure invasive ed operatori esperti. L'elastografia viene perciò oggi considerata il migliore e più accurato metodo diagnostico dato che anche il modello proposto nello studio del 2009 è risultato predittivo di ipertensione solo nei pazienti con malattia epatica compensata, non in quelli scompensati per differenze fisiopatologiche. Il modello proposto includeva parametri non invasivi come conta piastrinica, conta dei bianchi, bilirubina, AST/ALT ratio e AST/plt ratio. L'elastografia sfrutta invece un apparecchio che è costituito da una sonda ad ultrasuoni montata su un sistema vibrante, a prima vista simile a quella dei comuni ecografi.

La sonda del FibroScan viene applicata alla pelle del costato: l'impulso che genera la propagazione di un'onda elastica attraverso il fegato, la cui velocità, misurata per mezzo degli ultrasuoni, è direttamente correlata alla sua rigidità (a sua volta dipendente dalla quantità di fibrosi). In questo modo, è possibile sapere quanto la malattia epatica di cui il malato è affetto è più o meno prossima ad esitare in cirrosi; fino ad ora questa informazione era ottenibile solo con metodi invasivi come la biopsia epatica.⁽³⁴⁾

2.7.3 Biopsia epatica

In molti casi gli aspetti clinici e di laboratorio non permettono l'assegnazione dell'epatite cronica ad una delle tre categorie in cui normalmente vengono classificate: croniche virali, da farmaci, autoimmuni, in questo caso le si classifica come idiopatiche. In realtà si ritiene che anche queste epatiti "idiopatiche" rappresentino una forma di epatite cronica autoimmune. Gli aspetti clinici e di laboratorio delle epatiti croniche si riscontrano occasionalmente anche in pazienti con forme ereditarie/metaboliche come la malattia di Wilson o in soggetti con malattia da abuso di alcool.

La diagnosi precoce è essenziale, poiché la cirrosi spesso viene messa in evidenza da gravi complicazioni che a differenza di altre patologie croniche compaiono velocemente, come, ad esempio, la rottura di varici esofagee.

o il Tru-Cut.⁽³⁶⁾

Stadiazione istologica ^(37, 38, 39, 40, 41)

Per tutti i tipi di epatiti croniche è stata fatta una distinzione istopatologica basata sulla localizzazione e sull'estensione del danno epatico. Questi aspetti variano dalle forme più lievi, come l'epatite cronica persistente e l'epatite cronica lobulare, alle forme più gravi, come l'epatite cronica attiva. Questa classificazione è stata utilizzata per più di 30 anni, ma di recente è stata rivista date le migliori conoscenze riguardanti l'eziologia, la patogenesi e le caratteristiche istologiche delle epatiti croniche. Una nuova classificazione delle epatiti croniche è stata proposta da Scheuer nel 1991 e non si basa più esclusivamente sulle caratteristiche istopatologiche, ma combina informazioni cliniche, sierologiche e istologiche. Essa prende in considerazione tre aspetti:

1. eziologia; 2. attività istologica o grado; 3. grado di progressione o stadio.

Il grado (grading) è una valutazione istologica dell'attività necroinfiammatoria basata sull'osservazione della biopsia epatica. Le caratteristiche istologiche importanti che devono essere valutate sono:

- 1) l'entità della necrosi periportale e della distruzione della lamina limitante di epatociti periportale indotte dalle cellule infiammatorie (la cosiddetta necrosi dell'interfaccia);
- 2) entità della necrosi a ponte che forma ponti tra diversi spazi portali o ancora più importante tra spazi portali e vena centrolobulare;
- 3) necrosi focali all'interno del lobulo epatico;
- 4) entità dell'infiammazione portale.

Lo stadio (*staging*) dell'epatite cronica riflette il livello di progressione della patologia ed è basato sull'entità della fibrosi.

Quando la fibrosi è così estesa che i setti fibrosi circondano i noduli di parenchima e modificano la normale architettura del lobulo epatico, si parla di cirrosi.

Le classificazioni in stadi si basano sull'estensione della fibrosi:

0=assenza fibrosi

1=fibrosi lieve

2=fibrosi moderata

3=fibrosi grave compresa la fibrosi a ponte

4=cirrosi

La biopsia epatica rappresenta il metodo migliore per definire il grading e lo staging del danno epatico, per stabilire la prognosi e per monitorare la risposta alla terapia. Il grado rappresenta quindi la gravità o attività della malattia epatica, che può essere acuta o cronica, lieve, moderata o grave. La determinazione dei livelli sierici di transaminasi sieriche è un mezzo conveniente e non invasivo per monitorare l'attività della malattia ma non sempre riflette la sua gravità.

Lo stadio della malattia invece può essere definito come precoce, avanzato, precirrotico o cirrotico.

Sono stati proposti numerosi sistemi di punteggio che tengono in considerazione queste caratteristiche istologiche; il più conosciuto è l'*indice numerico di attività istologica* (numerical histologic activity index, HAI) basato sul lavoro di Knodell e Ishak. L'HAI è soprattutto una misura del *grado*, ma include anche una valutazione della fibrosi, che è attualmente utilizzata per definire lo *stadio* della malattia.

Il sistema proposto da Knodell nel 1981 è stato il primo ad essere proposto e coinvolge 4 caratteristiche istologiche principali (TABELLA 1).

Per ciascuna categoria viene dato un punteggio che viene sommato a gli altri e si ottiene l'indice di attività istologica con un range 0 - 22. Le principali critiche fatte a tale sistema sono:

Nello studio originale non è stata valutata la riproducibilità del sistema.

È stata utilizzata una scala discontinua (0,1,3,4) per ciascuna caratteristica istologica valutata.

Il punteggio dell'attività istologica è unito con quello della fibrosi. Sarebbe invece più logico suddividere l'attività infiammatoria (grado), dalla fibrosi (stadio). Combinando i punteggi per questi due aspetti si ottiene un risultato fuorviante come illustrato in TABELLA 2.

Infatti valutando due pazienti dove il primo presenta cirrosi con media attività infiammatoria, il secondo mostra un'epatite cronica con moderata attività infiammatoria ma senza fibrosi, si può comunque osservare come i due pazienti presentino lo stesso punteggio finale, ottenendo in questo modo un'indicazione prognostica e terapeutica analoga; esse dovrebbero invece essere differenziate nei due casi.

Inoltre il punteggio per l'infiammazione portale coinvolge una proporzione tra la densità delle cellule infiammatorie all'interno di un tratto portale rispetto al totale dei tratti portali coinvolti; pertanto una biopsia nella quale ci sono meno di tre tratti portali la classificazione risulta difficoltosa. La prima categoria di Knodell considera la necrosi dell'interfaccia con la necrosi a ponte. Le ragioni del suo successo risiedono nell'impiego della lingua inglese, facilmente accessibile, la sua applicazione alle epatiti croniche, la valutazione di lesioni istologiche in associazione a gli aspetti prognostici. Un altro sistema venne proposto da Scheuer nel 1991. Questo sistema considera separatamente le due componenti rappresentate dall'attività necroinfiammatoria e dalla fibrosi. Ad entrambe può essere assegnato un punteggio compreso tra 0 e 4. I vantaggi rispetto al sistema proposto da Knodell sono l'impiego di una scala continua 0-4, la distinta valutazione dell'attività infiammatoria della fibrosi e infine la considerazione della necrosi a ponte nell'ambito dell'attività lobulare, anziché nella categoria della necrosi dell'interfaccia. Le principali critiche rivolte a Scheuer riguardano l'impiego di un punteggio finale più ristretto (0-8) rispetto a Knodell e la mancata definizione di specifici criteri usati per definire diversi gradi dell'attività necroinfiammatoria. Questo potrebbe portare a problemi di mancata riproducibilità del sistema. (TABELLA 3 e 4). E' stato poi proposto nel 1995 da Ishak *et al.* un sistema che viene considerato come un ampliamento dell'originale sistema proposto da Knodell; esso utilizza una scala continua di punteggio per ciascuna caratteristica valutata; l'attività necroinfiammatoria e la fibrosi vengono considerate come categorie separate; la necrosi confluyente è separata dall'epatite periportale ed è inclusa all'interno dell'attività necroinfiammatoria. Combinando il punteggio per ciascuna delle quattro categorie considerate per la necrosi infiammatoria si ottiene un grado istologico tra 0 e 18 mentre per la fibrosi si ottiene uno stadio con un punteggio finale tra 0 e 6. Il sistema proposto da Ishak *et al.* include aspetti relativi alla patogenesi del danno epatico nelle epatiti croniche e oggi è considerato uno dei metodi con maggiore diffusione.³⁴ (TABELLA 5 e 6). Rimane infine da definire il sistema proposto da Metavir che

a differenza di Knodell valuta separatamente l'attività necroinfiammatoria dalla fibrosi. Il punteggio è composto da un sistema formato da due lettere e numeri:

A=attività istologica (A0=nessuna attività, A1=media attività, A2=moderata attività, A3=intensa attività);

F=fibrosi (F0=assenza di fibrosi, F1=fibrosi portale senza setti, F2=fibrosi portale con rari setti, F3=numerosi setti senza cirrosi, F4=cirrosi).⁽³⁵⁾

Anche la cirrosi può essere classificata istologicamente con il sistema di Child-Pugh, in cui si assegna un punteggio da 5 a 15 ottenuto calcolato sommando i singoli punteggi delle cinque variabili: il punteggio di 5 o 6 corrisponde alla classe A di Child-Pugh (cirrosi compensata), un punteggio da 7 a 9 corrisponde alla classe B e un punteggio da 10 a 15 alla classe C (TABELLA 7). Tale sistema viene attualmente impiegato a scopo prognostico nei pazienti cirrotici e permette di ottenere affidabili indicazioni sulla sopravvivenza dei pazienti in molte patologie epatiche e sulla probabilità che insorgano complicanze della cirrosi, quali varici esofagee.

A dispetto del notevole sviluppo dei test diagnostici per la fibrosi, la biopsia rimane uno strumento essenziale per la diagnosi delle patologie epatiche e per la stadiazione della fibrosi epatica; essa rappresenta tuttora il gold standard in quanto permette di stabilire *grade* e *stage*, permette di decidere il miglior trattamento terapeutico e di valutarne l'efficacia. Tuttavia, nella pratica clinica, l'utilizzo della biopsia epatica ha alcune limitazioni che includono: complicazioni che comprendono il decesso del paziente, errori con un 24% di falsi negativi, alto costo, variabilità soggettiva delle osservazioni. Maggiore è la dimensione della biopsia prelevata, maggiore è l'accuratezza. Molti studi hanno suggerito che una biopsia adeguata dovrebbe essere almeno di 15mm di lunghezza e contenere almeno cinque tratti portalì. In uno studio Abdi *et al.* riportano che la precisione diagnostica aumenta dall'80% con ogni singola biopsia, al 100% quando i frammenti analizzati erano tre. Anche il tipo di ago bioptico utilizzato per eseguire la biopsia è importante; ad esempio, Colombo ha dimostrato che la diagnosi di cirrosi aumenta del 65% usando un ago di Menghini, dell'89% usando il Tru-Cut. L'ago biopsia è stato utilizzato come un gold standard per la valutazione della fibrosi. Con la rivalutazione dei dati pregressi è emerso che il maggiore problema legato alla biopsia è rappresentato da errore interpretativi

TABELLA 1

Indice di attività istologica (HAI), **Knodell et al.** 1981

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Necrosi periportale + necrosi a ponte	
0	assente
1	necrosi dell'interfaccia lieve
3	necrosi dell'interfaccia moderata (< 50% della circonferenza di molti tratti)
4	necrosi dell'interfaccia moderata (> 50% della circonferenza di molti tratti)
5	necrosi dell'interfaccia e necrosi a ponte moderata
6	necrosi dell'interfaccia e necrosi a ponte marcata
10	necrosi multilobulare
Degenerazione intralobulare e necrosi focale	
0	assente
1	lieve (corpi acidofili, degenerazione con rigonfiamento o e/o foci di necrosi dispersi in <1/3 lobuli o noduli)
3	moderata (sviluppo in 1/3-2/3 lobuli o noduli)
4	marcata (sviluppo in >2/3 lobuli o noduli)
Infiammazione portale	
0	assente
1	lieve (poche cellule infiammatorie in <1/3 tratti)
3	moderata (aumento delle cellule infiammatorie in 1/3-2/3 tratti)
4	marcata (numerose cellule infiammatorie in >2/3 tratti)
Fibrosi	
0	fibrosi assente
1	fibrosi espansa nelle aree portali
3	fibrosi a ponte (portale e portale o portale e centrolobulare)
4	cirrosi

TABELLA 2

Un esempio di come due ipotetici pazienti con differenti quadri istologici possano avere lo stesso punteggio utilizzando il sistema di **Knodell**.

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Paziente	Necrosi periportale e necrosi a ponte	Degenerazione Intralobulare e necrosi	Infiammazione portale	Fibrosi	Totale
1	1	1	2	4	8
2	3	1	4	0	8

TABELLA 3

Sistema semplificato per il punteggio dell'attività necro-infiammatoria nelle epatiti croniche (**Scheuer** 1991)

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Grado	Attività portale/periportale
0	assente o minima
1	infiammazione portale (IPH)
2	lieve necrosi dell'interfaccia (lieve CAH)
3	moderata necrosi dell'interfaccia (moderata CAH)
4	grave necrosi dell'interfaccia (grave CAH)
Grado	Attività globularesi
0	assente
1	infiammazione ma senza necrosi
2	necrosi focale o corpi acidofili
3	grave danno focale
4	danno con necrosi a ponte

TABELLA 4

Sistema di punteggio per fibrosi e cirrosi (**Scheuer 1991**)

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Grado	Fibrosi
0	assente
1	fibrosi estesa, tratti portali fibrotici
2	setti periportali o portali-portali ma architettura intatta
3	fibrosi con architettura distorta senza visibili noduli
4	probabile o definitiva cirrosi

TABELLA 5

Grading Indice HAI modificato: punteggi di attività necro-infiammatoria (**Ishak et al. 1995**)

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

A. Epatite dell'interfaccia periportale o perisetale (necrosi dell'interfaccia)	
Assente	0
Lieve (focale, poche aree portali)	1
Lieve/moderata (focale, molte aree portali)	2
Moderata (continua intorno a <50% dei tratti o setti)	3
Grave (continua intorno a >50% dei tratti o setti)	4
B. Necrosi confluent e	
Assente	0
Necrosi confluent e focale	1
Necrosi della zona 3 in alcune aree	2
Necrosi della zona 3 in molte aree	3
Necrosi della zona 3 più necrosi portale-centrale occasionale	4
Necrosi della zona 3 più necrosi portale-centrale multipla	5
Necrosi panacinoso o multiacinoso	6
C. Necrosi focale litica (a spot), apoptosi e infiammazione focale	
Assente	0
Una lesione o meno per obiettivo 10x	1
Da due a quattro lesioni per obiettivo 10x	2
Da cinque a dieci lesioni per obiettivo 10x	3
Più di dieci lesioni per obiettivo 10x	4
D. Infiammazione portale	
Assente	0
Lieve, alcune aree portali	1
Moderata, alcune o tutte aree portali	2
Moderata/marcata, tutte le aree portali	3
Marcata, tutte le aree portali	4
Massimo punteggio possibile	18

TABELLA 6

Staging modificato: cambiamenti dell'architettura, fibrosi e cirrosi (Ishak *et al.*, 1995)

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Cambiamenti	
0	Assenza di fibrosi
1	Fibrosi estesa in alcune aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
2	Fibrosi estesa in molte aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
3	Fibrosi di estesa in molte aree portali con necrosi portale-portale occasionale
4	Fibrosi estesa nella aree portali con marcata necrosi portale-portale e portale-centrale
5	Marcata necrosi portale-portale e portale-centrale con noduli occasionali (cirrosi incompleta)
6	Cirrosi, probabile o definitiva
6	Punteggio massimo possibile

TABELLA 7

Classificazione di **Child-Pugh**

(S.G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. Journal of Hepatology 29: 1015-1022, 1998)

Fattore	1	2	3
Bilirubina sierica μmol/L (mg/dl)	<34 (<2)	34-51 (2-3)	>51 (>3)
Albumina sierica g/l (g/dl)	>35 (>3.5)	30-35 (3-3.5)	<30 (<3)
Ascite	Assente	Facilmente controllata	Scarsamente controllata
Disturbi neurologici	Assente	Minimi	Coma avanzato
Tempo di protrombina (allungamento in secondi)	0-4 (<1.7)	4-6 (1.7-3)	>6 (>2.3)

2.7.4 Studi Immunoistochimici

Oltre alla biopsia sono stati effettuati studi **immunoistochimici** per la valutazione della fibrosi; l'attivazione delle cellule stellate, a seguito della loro trasformazione in miofibroblasti, è associata alla perdita di gocce lipidiche e all'espressione di filamenti di proteine del citoscheletro. Esse includono un'isoforma α dell'actina, la vimentina, la desmina, la nestina e altre proteine. Le colorazioni immunoistochimiche per tali proteine, sono state utilizzate per definire l'attivazione di cellule stellate e per monitorare la risposta alla terapia, tuttavia tali tecniche sono ancora in via sperimentale.⁽³⁶⁾ Le analisi immunoistochimiche delle ECM provvedono a garantire informazioni nel monitoraggio dello stadio della fibrosi: la deposizione di tenascina è un marker di attiva fibrogenesi e indica un'evento recente, mentre la vitronectina è un marker di una fibrosi avanzata che ha ridotte possibilità di regressione. La tenascina e la vitronectina rappresentano proteine costituenti la matrice extracellulare con funzione adesiva tra cellula-cellula e tra cellula-ECM.^(6, 36)

2.7.5 Markers Sierici Non Invasivi Diretti/Indiretti

La mancanza di valori di laboratorio standard, metodi di diagnostica per immagini e metodi virologici che possano distinguere pazienti a rischio di fibrosi, ha portato alla ricerca di markers di fibrosi epatica che siano utili non solo per la diagnosi ma anche per valutare la progressione della patologia. Tale approccio potrebbe avere un reale contributo per almeno quattro aspetti:

- un differente stadio di fibrosi influenza l'approccio terapeutico e conseguentemente anche la prognosi;
- la valutazione non invasiva dello stadio di fibrosi può essere utile per scegliere se iniziare o meno un protocollo terapeutico con farmaci antivirali;
- prendendo in considerazione i fattori che influenzano la progressione della fibrosi, il clinico può predire il tempo necessario per l'evoluzione a cirrosi;
- attraverso l'impiego di markers non invasivi e poco costosi, si potrebbe intraprendere un iter di monitoraggio del paziente fibrotico per valutare la progressione o la regressione della patologia.⁽⁶⁾

La necessità dei clinici di disporre di tali markers non invasivi è messa in evidenza dall'elevato numero di pubblicazioni negli ultimi anni relative a tale

aspetto. Ne è emerso che un marker ideale deve avere alcune caratteristiche peculiari:

elevata specificità nei confronti del danno epatico;

scarsa invasività;

facilità di esecuzione;

semplicità e ripetibilità delle misurazioni;

capacità di valutare lo "stage" della fibrosi, l'attività di deposizione della matrice, l'attività di degradazione della matrice;

possibilità di monitorare la progressione o regressione della fibrosi, sia come evoluzione naturale, sia come risposta ad un eventuale trattamento.

L'accuratezza di un test è data dall'area sottesa sotto la curva (AUC) definita dalla curva ROC (Receiver Operating Characteristic) che viene considerata un sistema idoneo per definire un test ideale confrontando la sensibilità e la specificità per diversi valori soglia. I due assi cartesiani sono quindi rappresentati da $Y = \text{sensibilità}$, $X = 1 - \text{specificità}$. Un marker ideale dovrebbe avere un $AUC = 1$ (secondo una scala proposta da Swets nel 1998 dove $AUC = 0,5 = \text{test non informativo}$, $AUC = 1 = \text{test perfetto}$) e quindi una sensibilità e specificità = 100%; per ora sono stati ottenuti markers con AUC tra 0,80 e 0,85 e non hanno valore per lo stadio della fibrosi ma solo per differenziare gradi insignificanti (F0/F1) e significanti (F2/F3 di Metavir) di fibrosi.

I markers sierici vengono ad oggi suddivisi in due grandi categorie:

INDIRETTI e DIRETTI.

La prima categoria comprende parametri che riflettono le alterazioni della funzionalità epatica ma non direttamente il metabolismo dell'ECM. Gli studi relativi a tali markers erano focalizzati in passato sulla diagnosi di cirrosi, ma più recentemente è stata sottolineata la loro capacità di identificare pazienti con un grado moderato di fibrosi e quindi possono essere utili per indirizzare il clinico a intraprendere le scelte terapeutiche più appropriate. Con la seconda categoria ci si riferisce invece a un gruppo di markers che riflettono il turnover dell'ECM; questi ultimi vengono prevalentemente impiegati per monitorare l'attività di fibrogenesi e di degradazione della matrice extracellulare. ^(6, 36)

2.7.5.1 I Markers Indiretti

Hanno un evidente vantaggio rispetto a quelli diretti, che risiede nella semplicità di esecuzione. Sono infatti parametri ottenuti con test di laboratorio di routine o semplicemente combinando tra loro diversi test.

Marker sierici indiretti individuali

Livelli sierici di ALT

Sebbene i livelli sierici di ALT riflettano generalmente un danno epatico, la correlazione tra tali livelli, attività necroinfiammatoria e fibrosi è minima, soprattutto nell'epatite C. Tuttavia uno studio realizzato da Pradat *et al.*⁽⁴²⁾ ha stabilito che i livelli sierici di ALT siano dotati di una buona sensibilità e specificità per predire il punteggio istologico.

AST/ALT ratio

Con l'osservazione che le concentrazioni di AST tendono comunque ad aumentare rispetto a quelle dell'ALT in relazione alla progressione della fibrosi, sono stati proposti molti studi relativi all'AST/ALT ratio nelle patologie epatiche virali.⁽³⁵⁾

Conta piastrinica(PLT)

La trombocitopenia è un marker di patologia epatica avanzata, ma potrebbe anche essere correlato a molti meccanismi patogenetici come ipersplenismo, con conseguente splenomegalia e sequestro delle piastrine circolanti fino ad un 90%, mielosoppressione indotta dal virus dell'epatite C, diminuzione della produzione di trombopoietina e processi autoimmuni. Queste importanti indicazioni riferite alla trombocitopenia emergono da lavoro condotto da Peck-Radosavljevic *et al.*⁽⁴³⁾ che attraverso studi relativi a fattori di crescita ematopoietici, sono giunti a maggiori dettagli relativamente alla fisiopatologia della distruzione delle cellule ematiche in corso di patologia epatica. Combinando la valutazione di AST/ALT ratio e la conta piastrinica, aumenta il valore diagnostico per la cirrosi.

Indice di protrombina

La protrombina è una proteina coinvolta nel processo di coagulazione del sangue. Questo test è un metodo sensibile per evidenziare una ridotta funzione di sintesi del fegato. Il tempo di protrombina (PT) valuta la produzione di trombina (meccanismo estrinseco della coagulazione) e riflette l'attività di fibrinogeno, protrombina (fattore II), fattore V, VI e X. Il prolungamento del PT indica un'anomalia della via estrinseca della coagulazione per difetto del fattore VII, X, V, II o per alterata sintesi epatica o per un deficit di vitamina K.

Il PT è quindi considerato un indice in grado di riflettere una perdita della capacità biosintetica del fegato che è una delle prime caratteristiche della cirrosi.

PGA index

Tale indice combina insieme l'indice di protrombina, GGT, e apolipoproteina A1.

PGAA index

Da una modifica del PGA index è stato proposto questo nuovo indice che vede l'aggiunta della α 2-macroglobulina. L'accuratezza dell'indice di protrombina sembra comunque essere maggiore (86%) rispetto a quella del PGA index (78,5%) e del PGAA index (80%). Nell'uomo è stata dimostrata anche una differente accuratezza del test in funzione dell'eziologia: è stata infatti valutata una maggiore accuratezza dell'AST/ALT ratio nelle epatiti virali rispetto a quelle su base alcolica. Viceversa, per il PGA index e per PGAA index dove l'accuratezza del test è maggiore per le epatiti alcoliche rispetto alle virali. Rimane invece costante l'indice di protrombina. L'analisi di tali markers indiretti ha permesso di concludere che il PGA index è un indice di fibrosi epatica progressiva e che può essere usato per identificare soggetti con fibrosi significativa. Infatti, si ritiene che tali parametri riflettano un disturbo della funzionalità o della struttura degli epatociti e non la deposizione o il rimaneggiamento della matrice extracellulare.

APRI index

Tale indice si basa sul rapporto tra AST e conta piastrinica ed è stato proposto per la prima volta da Wai *et al.*⁽⁴⁴⁾ Gli autori hanno dimostrato come tale indice, basato su misurazioni di laboratorio di routine, fosse il metodo più semplice ma allo stesso tempo più accurato per la valutazione di gradi significativi di fibrosi e cirrosi.

Test indiretti di fibrosi

Allo scopo di aumentare il valore diagnostico di diversi marker sono state realizzate delle loro combinazioni realizzando così dei test indiretti.

Nel 2006 Ratziu *et al.*⁽⁴⁵⁾ hanno realizzato due pannelli di markers biochimici chiamati **Fibrotest** e **Actitest**. Il primo, indice di fibrosi, comprende α 2-macroglobulina (A2M), apolipoproteina A1, aptoglobina, bilirubina totale e γ -glutamyl transferasi (GGT) mentre il secondo, indice di attività necroinfiammatoria, comprende gli stessi cinque parametri con l'aggiunta dell'ALT. Questi pannelli dimostrano un elevato valore predittivo per lesioni significative in pazienti affetti da epatite C, epatite B ed epatite da alcool.

Nello studio realizzato da Bismut, viene inoltre evidenziato come nei pazienti affetti da epatite C ed epatite da alcol, il Fibrotest abbia una maggiore sensibilità rispetto all'acido ialuronico, soprattutto per la diagnosi di gradi moderati di fibrosi. Fibrotest può quindi essere utilizzato per pazienti con epatite virale,

alcolica o metabolica per la valutazione del danno epatico. Permette di classificare i pazienti per stadio ed è in grado di distinguere i diversi stadi di fibrosi. L' α 2-macroglobulina (A2M) è invece il più potente inibitore delle proteasi che può inibire il catabolismo delle proteine della matrice. Questa proteina di fase acuta è associata con la crescita di molti fattori come i fibroblasti, endotelio vascolare, epidermide, PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine che è uno dei principali stimoli per la proliferazione della cellule stellate). L' A2M è quindi coinvolta nella fibrogenesi. L'aptoglobina è invece una proteina di trasporto, sintetizzata a livello epatico, che lega in modo irreversibile l'emoglobina libera. Il complesso emoglobina-aptoglobina viene eliminato dai macrofagi presenti nel fegato e della milza che provvedono al recupero degli amminoacidi della globina e del ferro dell'eme. L'aptoglobina è negativamente associata alla fibrosi. Infatti da uno studio condotto da Bacq. *et al.*⁽⁴⁶⁾ è stato osservato che i livelli sierici di aptoglobina erano inversamente correlati con l'attività necroinfiammatoria e con il grado di fibrosi. La γ -glutamyl transferasi (GGT) è associata con la fibrosi e un aumento dei fattori di crescita (molecole stimolanti la proliferazione e la differenziazione cellulare) possono causare un aumento dei livelli di GGT parallelamente allo stadio della fibrosi. L'apolipoproteina A1 è presente nella matrice extracellulare e diminuisce nel fegato fibrotico. Il Fibrotest è stato utilizzato in molti paesi come gli USA ed è stato definito FIBROSURE. E' stato dimostrato, come la variabilità dei markers utilizzati per valutare il grado di fibrosi e di attività necroinfiammatoria, tra differenti laboratori di analisi, abbia dei limiti accettabili e privi di conseguenze cliniche.

I valori di questi test variano da zero a 1 (indice di lesioni significative) e corrispondono a al sistema di punteggio utilizzato da Metavir o anche da Knodell e Ishak. (TABELLA 8)

TABELLA 8

Correlazione tra Fibrotest e stadio di fibrosi.

Mircea Grigorescu. Noninvasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis.
J Gastrointestin Liver Dis, Vol. 15 No. 2: 149-159, 2006

FIBROTEST	METAVIR	KNODELL	ISHAK
0.75-1.0	F4	F4	F6
0.73-0.74	F3-F4	F3-F4	F5
0.59-0.72	F3	F3	F4
0.49-0.58	F2	F1-F3	F3
0.32-0.48	F1-F2	F1-F3	F3
0.28-0.31	F1	F1	F2
0.22-0.27	F0-F1	F0-F1	F1
0.00-0.21	F0	F0	F0

Il **Fibrotest** ha una elevata capacità di discriminare una fibrosi *non significativa* (F0 a F1 della scala di METAVIR) da una *significativa* (F2 a F4 della scala di METAVIR). Nello studio di Grigorescu⁽⁶⁾ vengono classificate 3 categorie di pazienti successivamente all'effettuazione del FIBROTEST: un gruppo con fibrosi non significativa, uno con fibrosi significativa e un terzo gruppo di pazienti che non possono essere inclusi in nessun gruppo precedente e nei quali dovrebbe invece essere effettuata la biopsia. In questo modo gli autori concludono che questo test può ridurre il numero delle biopsie fino a un 46%.⁽⁶⁾ Sfortunatamente un altro gruppo di ricerca, utilizzando gli stessi valori di cut-off, non è stato in grado di riprodurre gli stessi risultati. La ragione di tale discrepanza rimane tuttora poco chiara.

L'**Actitest** è uguale al Fibrotest, con l'aggiunta della valutazione dell'ALT e riflette sia l'attività necroinfiammatoria sia la fibrosi. L'Actitest mostra un maggiore valore diagnostico per identificare soggetti con fibrosi avanzata e con un maggiore grado di attività istologica, e può essere quindi di aiuto come guida per la scelta della terapia. L'accuratezza dell'Actitest aumenta con la valutazione di campioni bioptici di dimensioni maggiori di 15 mm o che contengono sei o più tratti portalari che riflettano il reale aspetto istologico del fegato. Più recentemente Forns *et al.*⁽³⁶⁾ hanno proposto un indice di fibrosi definito **Forns index**, basato su quattro variabili cliniche: età, conta piastrinica, GGT e

colesterolemia. Questo indice è stato poi confrontato con il Fibrotest ed è stata osservata una sua minore validità rispetto a quest'ultimo.

Le principali critiche rivolte all'indice di Forns riguardano l'elevata influenza che hanno le componenti lipidiche e le alterazioni del colesterolo.

In uno studio proposto da Oberti *et al.*⁽³⁵⁾ viene confrontata l'accuratezza diagnostica tra markers diretti e indiretti. I principali marker di cirrosi sono l'acido ialuronico e l'indice di protrombina. L'acido ialuronico presenta la maggiore accuratezza diagnostica tra 63 variabili considerate, mentre l'indice di protrombina è quasi paragonabile a quest'ultimo. È stato recentemente dimostrato che i recettori per la trombina sono presenti sulla superficie delle cellule stellate, la cui proliferazione può essere stimolata dalla trombina stessa. L'indice di protrombina presenta diversi vantaggi rispetto l'acido ialuronico essendo un marker indiretto: disponibilità, basso costo e, a differenza dell'acido ialuronico, non è influenzato da diverse condizioni come la presenza di patologie non epatiche come l'infiammazione del tessuto connettivo. Tuttavia alla fine gli autori suggeriscono l'impiego dell'acido ialuronico in quanto la sua accuratezza è indipendente dalla gravità della patologia e dell'eziologia.

AST/ALT ratio

Circa 40 anni fa è stata introdotta la valutazione di enzimi epatici, quali AST e ALT, come parametri di routine, utilizzati per diagnosticare e monitorare le patologie epatiche.⁽⁴⁷⁾

Le patologie epatiche, sia acute che croniche, possono determinare un aumento delle concentrazioni sieriche delle aminotransferasi. AST e ALT, nell'uomo, sono enzimi in grado di catalizzare il trasferimento di gruppi aminici α dall'aspartato e dall'alanina, ad un α chetoacido per generare rispettivamente ossalacetato e piruvato, entrambe fonti del ciclo di Krebs. Entrambi gli enzimi nell'uomo, così come nel cane, sono localizzati in elevate concentrazioni nel fegato. L'AST è diffusamente rappresentata in organi quali cuore, muscolo scheletrico, reni, encefalo, mentre l'ALT ha una minima concentrazione nel muscolo scheletrico e nei reni; un aumento dei livelli sierici di ALT è quindi, anche in medicina umana, un indice più specifico di danno epatico rispetto all'AST. A livello epatico l'ALT è localizzata a livello citoplasmatico, mentre l'AST è presente sia a livello di citoplasma (20 %) che a livello di mitocondri (80 %). L'emivita sierica della ALT è di circa 47 ore, per l'AST totale è 17 ore, mentre per la sola frazione mitocondriale è di 87 ore.

Quando si determina un danno acuto, come nel caso di epatite virale acuta, le concentrazioni sieriche dell'ALT sono maggiori di quelle della AST. Questo può

essere attribuito al simultaneo rilascio di entrambi gli enzimi dal compartimento citoplasmatico che ha una maggior concentrazione della ALT. E' stato quindi stabilito che quando la concentrazione dell'AST supera quella dell'ALT, questo dipende da un danno decisamente più grave a carico dell'epatocita con liberazione dal compartimento mitocondriale della AST. Rimane però da sottolineare come nell'uomo sia stata definita una maggior concentrazione di AST a carico della zona acinare 3, ovvero quella periportale; di conseguenza un danno acuto in tale sede, come ad esempio un'ischemia o un danno su base tossica, potrebbe esitare in un livello sierico più elevato di AST rispetto a quello della ALT, a differenza di quanto accade nelle altre zone del lobulo epatico.⁽⁴⁸⁾ In seguito ad un'epatite di cronica, come in caso di epatite C, le concentrazioni sieriche delle aminotransferasi sono più vicine ai valori superiori di riferimento; come nel cane, anche nell'uomo si verifica un aumento persistente e modico di ALT accompagnato da valori di AST pressoché nella norma.

Numerosi lavori sono stati effettuati in merito all'AST/ALT ratio, allo scopo di correlarlo all'eziologia e al reperto istologico. Mentre i singoli valori di AST e di ALT in pazienti con epatite C non sono correlabili con il reperto istologico in funzione della gravità della malattia, il rapporto tra i due enzimi può essere rappresentativo di tali alterazioni epatiche. Un recente studio dimostra che un AST/ALT ratio ≥ 1 ha una specificità del 100% e un elevato valore predittivo positivo nel distinguere pazienti cirrotici da quelli non cirrotici. Il ratio è direttamente proporzionale allo stadio di fibrosi, ma non con il grado di attività necroinfiammatoria. Questa indicazione è stata supportata anche dallo studio realizzato da Sheth *et al.* nel quale viene dimostrata l'affidabilità dell'AST/ALT ratio come parametro indicativo dello stadio di fibrosi e cirrosi nei pazienti con epatite C.^(47,51) Dal lavoro proposto da Sheth emerge come tale rapporto possa essere utilizzato anche come unico strumento per identificare la presenza di cirrosi. Lo studio realizzato da Giannini *et al.*⁽⁵⁰⁾ e quello realizzato da Sheth *et al.*⁽⁵¹⁾ sono concordi nell'affermare anche la riproducibilità dell'AST/ALT ratio. Tale rapporto permette di discriminare pazienti con cirrosi compensata e pazienti con cirrosi non compensata e permette di valutare lo stadio di fibrosi. Infine viene evidenziata la correlazione tra progressiva perdita di funzionalità epatica e aumento dell'AST/ALT ratio. La causa che induce un aumento di tale rapporto non è ancora del tutto nota.⁽⁴⁷⁾ Mentre i valori dell'ALT rimangono pressoché costanti, quelli dell'AST aumentano nettamente nei pazienti cirrotici rispetto a quelli non cirrotici.

I livelli sierici di tali enzimi sono determinati principalmente dal loro rilascio da parte degli epatociti e dalla clearance nel plasma.

Inoltre altri studi suggeriscono che la clearance plasmatica dell'AST sia realizzata dalle cellule dei sinusoidi epatici.⁽⁴⁹⁾ E' infatti concepibile che da un lato la

funzione delle cellule dei sinusoidi venga compromessa con la progressione della fibrosi in cirrosi, e dall'altro che le alterazioni del flusso ematico, portino ad un incremento dei livelli sierici dell'AST.

Nello studio proposto da Giannini *et al.*⁽⁴⁹⁾ vengono correlati i valori di AST/ALT ratio con i reperti istologici. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: quelli con grado medio di fibrosi (fibrosi 0-2), quelli con grado avanzato di fibrosi o con cirrosi iniziale (fibrosi 3-4 o cirrosi classe A secondo Child - Pugh), quelli con grado avanzato di cirrosi (cirrosi classe B-C secondo Child-Pugh). Il gruppo con grado medio di fibrosi presenta un AST/ALT ratio < 1 , mentre quelli con grado avanzato di fibrosi o cirrosi iniziale presentavano un valore di AST/ALT ≥ 1 ; l'ultimo gruppo di pazienti con cirrosi avanzata presenta una grave compromissione della funzionalità epatica e un AST/ALT ratio ancora più elevato. Lo stesso risultato è stato ottenuto in un altro studio realizzato da Polh *et al.*⁽⁵²⁾ dove con eccezione di pazienti affetti da epatite da abuso di alcol, negli altri è stata osservata una relazione significativa tra AST/ALT ratio e stadio della fibrosi/cirrosi. L'AST/ALT ratio era ≥ 1 nei pazienti con grado avanzato di fibrosi o cirrosi (stadio 3-4) e < 1 in quelli con assenza di fibrosi, con grado medio o moderato (0-2). Sempre negli stessi studi^(50, 52) è stata valutata anche la correlazione con la conta piastrinica, al fine di aumentare l'accuratezza diagnostica di un parametro non invasivo quale l'AST/ALT ratio. Viene valutata la sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN), che indicano rispettivamente la probabilità che un animale positivo/negativo al test sia realmente sano/malato, di AST/ALT ratio come tale e poi associato alla conta piastrinica. Ne emerge che l'AST/ALT ratio da solo ha un VPP = 43,2% e una specificità = 81,6%. Aggiungendo la conta piastrinica, VPP e la specificità aumentano in modo significativo. L'AST/ALT ratio ≥ 1 in associazione con un valore di cut-off di conta piastrinica $\leq 150000/\text{mm}^3$ può identificare meglio i pazienti con fibrosi di grado avanzato (3-4) con un alto VPP = 93,1% e specificità = 99,1%. Tuttavia valutando gli stessi parametri per soggetti senza o con grado medio di fibrosi (0-1) non si evidenzia un aumento della validità diagnostica dell'AST/ALT ratio; esso risulta valido solo per gradi avanzati di fibrosi. Gli autori concludono che per i pazienti che presentano tali valori di laboratorio, la biopsia può essere evitata. Tuttavia data la bassa sensibilità di tali test, nei pazienti con conta piastrinica $> 150000/\text{mm}^3$ o AST/ALT ratio < 1 , è necessario l'impiego dell'esame della biopsia.

La principale critica rivolta all'AST/ALT ratio è la mancanza di un'utilità prognostica.⁽⁵⁰⁾

Gli autori sono concordi nell'affermare che la biopsia epatica possa essere considerata il gold standard per la valutazione della gravità della patologia,

tuttavia suggeriscono l'impiego dell'AST/ALT ratio nelle situazioni cliniche ben definite data la sua relazione con lo stadio della fibrosi e con la funzionalità epatica. Infatti non tutti i pazienti possono o vogliono sottoporsi a biopsia epatica per valutare lo stadio della malattia e nella pratica clinica non è possibile sottoporre i pazienti che non possono essere trattati o che non hanno risposto al trattamento virale a una seconda biopsia per monitorare l'evoluzione della patologia.

APRI index

La conoscenza dello stadio di fibrosi epatica è essenziale per la prognosi e per decidere se proporre al paziente un eventuale trattamento antivirale. Con l'esclusione della biopsia, che rimane il gold standard, gli approcci non invasivi che includono segni clinici, test di laboratorio, markers sierici di fibrosi e infiammazione, diagnostica per immagini, al momento non sono in grado di uguagliare l'accuratezza del reperto istologico.

Con lo scopo di sviluppare un nuovo marker facilmente disponibile e riproducibile nei vari pazienti e che fosse in grado di predire gradi significativi di fibrosi e cirrosi, Wai *et al.* nel 2003 realizzano il primo studio sull' APRI index.⁽⁴⁴⁾

E' stata analizzata la relazione tra due parametri, *concentrazione sierica della AST e conta piastrinica*, che sono i due principali parametri in grado di predire fibrosi significativa e cirrosi.

Tali parametri sono quindi stati confrontati nei diversi stadi di fibrosi.

Ne emerge come esista una correlazione significativa tra la gravità della fibrosi, incremento dei valori sierici dell'AST e la diminuzione della conta piastrinica.

Per amplificare la differenza dei valori di AST e PLT nei pazienti con diversi gradi di fibrosi, gli autori hanno sviluppato un nuovo indice definito appunto **APRI index e determinato dal rapporto tra AST e PLT:**

$$APRI = \frac{AST(IU/L) /ULN}{PLT (10^9/L)} \times 100$$

APRI mostra una maggiore correlazione con lo stadio della fibrosi rispetto all'AST o alle PLT come tali. E ' stata realizzata una curva ROC dell'APRI e sono state ottenute le AUC per fibrosi e cirrosi, rispettivamente di 0,80 e 0,89. Sono stati ottenuti due valori di cut-off per confermare l'assenza (APRI ≤ 0,50) o la presenza (APRI >1,50) di fibrosi significativa.

Utilizzando quindi il valore più basso di cut-off (0,50) e quello più alto (1,50) è possibile distinguere pazienti con o senza fibrosi significativa.

Allo stesso modo sono poi stati ottenuti valori di cut-off per predire l'assenza ($APRI \leq 1$) e presenza di cirrosi ($APRI > 2$).

L'incremento del valore dell'AST come già citato, è dovuto ad un danno mitocondriale con rilascio dell'enzima in circolo, ma anche ad una diminuita clearance della AST con aumento delle concentrazioni sieriche. La conta piastrinica tende invece a diminuire in quanto, con l'incremento della fibrosi e con il peggioramento dell'ipertensione portale, si verifica un sequestro e una distruzione delle piastrine a livello splenico.

In uno studio realizzato da Shin *et al.* nel 2007⁽⁵³⁾ vengono analizzati e confrontati differenti markers quali APRI index e AST/ALT ratio, non solo in pazienti con epatite C ma anche in soggetti con epatite B e con steatosi epatica non alcolica (NAFLD- nonalcoholic fatty liver disease). Da ciò emerge come APRI possa essere un parametro semplice e non invasivo, utile per predire una fibrosi significativa dovuta a differenti cause eziologiche. Sempre nel 2007 Abdo *et al.*⁽⁵⁴⁾ cercano di convalidare l'impiego di tre semplici indici di fibrosi epatica in Arabia Saudita prendendo spunto dal lavoro proposto da Wai *et al.* Essi infatti considerano AST/ALT ratio, APRI index e conta piastrinica per predire un grado avanzato (3-4) di fibrosi e cirrosi in pazienti con epatite C. E' stata realizzata una curva ROC per tutti e tre i markers e sono stati così ottenuti i valori di AUC: 0,812 per APRI index, 0,716 per AST/ALT ratio e 0,783 per la conta piastrinica.

Per l'APRI index sono stati identificati, come nello studio di Wai *et al.*, due valori di cut-off ovvero $> 1,5$ e $< 0,5$. Se APRI index $> 1,5$ allora esso è associato a una sensibilità del 30% e a una specificità superiore al 90 % nel predire un stadio avanzato di fibrosi; se APRI index $< 0,5$ invece la sensibilità è 90 % e la specificità di circa 60 % nel predire l'assenza di fibrosi avanzata.

Tali risultati sono quindi esattamente equiparabili ai risultati riportati da Wai dove i valori dell'AUC della fibrosi significativa e di cirrosi erano rispettivamente di 0,80 e 0,89.

Nel 2008 Lin *et al.*⁽⁵⁵⁾ realizzano uno studio retrospettivo, dove vengono analizzati AST/ALT ratio e APRI index, allo scopo di valutare se possa esistere una relazione tra questi due markers sierici e il grado istologico della fibrosi e cirrosi. Anche in tale studio gli autori utilizzano come punto di partenza i lavori realizzati da Wai *et al.* e da Giannini *et al.*⁽⁴⁹⁾ rispettivamente per l'APRI index e per l'AST/ALT ratio.

Dallo studio emerge che l'APRI index possiede un'accuratezza superiore agli altri markers, tra i quali appunto AST/ALT ratio, nel predire stadi avanzati di fibrosi

e cirrosi. Per l'APRI index è valutata sia l'AUC per la capacità di predire la fibrosi avanzata, che è risultata pari a 0,87, sia quella per la cirrosi che è risultata pari a 0,84. Recentemente è stato riportato che l'APRI index è in grado di predire il risultato a lungo termine relativamente all'evoluzione a carcinoma epatocellulare o meno in pazienti affetti da epatite C e sottoposti a terapia antivirale a base di interferone. Da ciò è scaturita l'osservazione che un indice come l'APRI, che fosse effettivamente in grado di predire stati avanzati di fibrosi e cirrosi, potesse anche essere utilizzato come marker per monitorare la fibrosi, valutare la presenza di cirrosi e la loro potenziale evoluzione a carcinoma. I livelli sierici di AST aumentano in modo significativo in pazienti cirrotici (F4) rispetto a quelli fibrotici con stadio F3, ma l'AST/ALT ratio non mostra avere capacità predittive per quanto riguarda la progressione della fibrosi e cirrosi a differenza dell' APRI index. Gli autori concludono affermando che l' APRI index è un parametro semplice, non invasivo, per la valutazione della fibrosi epatica soprattutto nei pazienti con epatite C, ma non può ancora rappresentare un sostituto della biopsia in pazienti con epatiti di differente eziologia.

Altri due lavori proposti in letteratura nel 2008^(56, 57) mostrano la reciproca relazione tra diminuzione della conta piastrinica e incremento dei valori di AST in associazione alla progressione della fibrosi. I valori di cut-off per l'APRI index sia per gradi significativi di fibrosi sia per la cirrosi, sono sovrapponibili a quelli descritti da Wai *et al.*

Nello studio proposto da R. Gomes da Silva Junior *et al.*⁽⁵⁷⁾ emergono tuttavia alcuni limiti dell' APRI index; infatti sebbene tale indice possa essere utile del differenziare soggetti con grado significativo (F3- F4) da soggetti privi o con grado lieve (F0-F2), non è comunque in grado di definire con esattezza lo stadio esatto alla quale appartiene il paziente, cosicchè molti soggetti non sono classificabili. Inoltre non esiste un valore standard per l'ULN (normal upper limit) ovvero per il limite superiore nel range di normalità dell'AST, ma questo dato è fornito dai differenti laboratori di analisi e pertanto è variabile.

Questi problemi possono giustificare il limitato utilizzo che fino ad oggi si è fatto dell'APRI index.

Uno studio effettuato da Zhang *et al.*⁽⁵⁸⁾ partendo proprio dalla considerazione che l'APRI sia in grado di predire solo gradi avanzati di fibrosi, cerca di correlare tale marker con diversi valori di cut-off per l'acido ialuronico, marker diretto di fibrosi epatica, allo scopo di ottenere un parametro ancora più preciso. La stadiazione dei reperti istologici è stata realizzata con il sistema di punteggio proposto da Metavir, secondo i quattro stadi: assenza di fibrosi (0), medio (1), moderato (2), grave (3) e cirrosi (4). I pazienti sono poi stati divisi in quelli con grado 0 e 1 e quelli con grado 2,3 e 4. Come previsto dagli autori, i valori di APRI index e quelli dell'HA aumentavano con il progredire dello stadio di

fibrosi. Nei pazienti con stadio 0 e 1 il valore di APRI index risultava $<1,5$, mentre in quelli con grado 2, 3 e 4 era $\geq 1,5$. Se si confronta il valore predittivo positivo e la specificità dell'APRI index da solo e poi con l'aggiunta dell'HA si può valutare come in quest'ultimo caso essi tendano ad aumentare in modo significativo. Si ottiene in conclusione che un APRI index $\geq 1,5$, in combinazione con un cut-off per l'HA >300 ng/mL, identifica pazienti con grado moderato e grave di fibrosi e cirrosi (2-4). Non si può affermare invece lo stesso risultato per valori di APRI index $<1,5$ in associazione con valori di cut-off dell'HA per determinare uno stadio medio di fibrosi dato che specificità, sensibilità e valori predittivi risultavano bassi. Ne consegue che il grado medio (stadio 1) di fibrosi non possa essere valutato con tali markers ma solo con l'impiego della biopsia.

Nello studio realizzato da Shaheen *et al.*⁽⁵⁹⁾ viene infatti sottolineato che l'APRI index mostra un'utilità diagnostica moderata; il suo ruolo principale sembra l'esclusione di una fibrosi significativa e cirrosi nei pazienti analizzati.

Un recente studio del dicembre 2010 realizzato da Mummadi *et al.*⁽⁶⁰⁾ valuta il valore prognostico dell'APRI index. Viene pertanto riconosciuto l'impiego di tale marker per stabilire la prognosi. Dopo 6 mesi di terapia a base di interferone, un valore di APRI $> 1,5$ ha mostrato essere associato con una mortalità a breve termine e ad una elevata probabilità di sviluppare un carcinoma epatocellulare nei pazienti affetti da epatite C. Questo permette ai clinici di orientare l'approccio terapeutico nel miglior modo più possibile.

2.7.5.2 I Markers Diretti

E' stato supposto che tali markers siano direttamente coinvolti nella deposizione e nella rimozione dell'ECM, e quindi nei meccanismi di fibrogenesi e fibrolisi. Questa categoria include markers del metabolismo della matrice come anche citochine.⁽⁶⁾ La classificazione di questi markers avviene in base alla loro composizione molecolare.

COLLAGENE

Procollagene di tipo I con peptide carbossilico terminale (PICP)

Procollagene di tipo III con peptide N terminale (PIIINP)

Collagene di tipo IV e suoi frammenti (NC1 e PIVNP)

GLICOPROTEINE e POLISACCARIDI

Acido ialuronico (HA)

Laminina

Tenascina

YKL-40

COLLAGENASI e LORO INIBITORI

Metalloproteasi (MMPs)

Inibitori tissutali delle Metalloproteasi (TIMPs)

CITOCCHINE

TGF- β 1

PDGF

E' molto difficile stabilire una chiara delimitazione tra i markers di deposizione e di degradazione dell'ECM. I livelli sierici dei markers diretti infatti riflettono simultaneamente entrambi i processi e gli aspetti di globale rimodellamento a cui la matrice extracellulare viene sottoposta in corso di fibrosi.

Questa ipotesi è supportata da tre considerazioni:

- i livelli di questi parametri sono spesso aumentati in situazioni di rapida progressione della fibrosi, come per esempio gravi epatiti da abuso di alcool o epatiti attive;
- i loro valori tendono a scendere in risposta al trattamento;
- nelle epatiti croniche, l'aumento di parecchi, ma non di tutti questi markers, è correlato con lo stadio della fibrosi e con le caratteristiche biochimiche o istologiche di infiammazione⁽⁶⁾.

Markers associati alla deposizione di matrice

Nella sintesi di collagene intervengono enzimi di scissione del legame carbossilico e amminico terminale come la procollagene-C-proteinasi e la procollagene-N-proteinasi. I peptidi poi rilasciati nel siero possono essere utilizzati come indice della deposizione di matrice.

Procollagene di tipo I con peptide carbossilico terminale (PICP):

ha scarso valore nella diagnosi di epatite cronica ma elevato per la cirrosi, quantificando la gravità della malattia e indicando un'eziologia alcolica.

Procollagene di tipo III con peptide amino-terminale (PICP):

i suoi livelli sierici sono stati ampiamente studiati da soli o in combinazione con altri markers e i risultati hanno evidenziato una correlazione tra i loro livelli e lo stadio istologico di fibrosi epatica nelle patologie epatiche alcoliche, virali o nella cirrosi biliare primaria.

Collagene di tipo IV:

è un importante componente dell'ECM. A differenza del collagene di tipo I e III, che vengono processati da meccanismi proteolitici, il tipo IV è depositato intatto nella matrice e le sue componenti sieriche ne riflettono la degradazione. La valutazione di frammenti del collagene di tipo IV (NC1 e PIVNP) viene frequentemente utilizzata, con una positiva correlazione tra i livelli sierici del collagene di tipo IV e il grado di fibrosi epatica in pazienti con epatite cronica alcolica, virale. È inoltre un sensibile indicatore della presenza di cirrosi nell'emocromatosi. Con fibrosi F2 è stato identificato un valore di cut-off pari a 110 ng/ml e di 130 ng/ml con F3.

Laminina: è una delle principali glicoproteine diverse dal collagene sintetizzate dalle cellule stellate epatiche (HSC), è depositata a livello di membrana basale e in corso di fibrosi aumenta intorno ai vasi, negli spazi perisinusoidali (epatiti virali o da abuso di alcool) e nei tratti portalì. I livelli sierici della laminina e dei

suoi frammenti (P1) sono elevati in corso di epatite cronica indipendentemente dall'eziologia.

Alcuni studi suggeriscono che la laminina sia correlata con la gravità della fibrosi e dell'infiammazione nel corso di epatite cronica C, e che sia in grado di riflettere il danno epatico più accuratamente di enzimi epatici come ALT, soprattutto per la cirrosi. Altri studi ancora evidenziano una buona correlazione tra la laminina sierica e la scala di Child-Pugh e con il gradiente di pressione portale e delle vene epatiche⁽⁶⁾.

Acido ialuronico (HA): è un glicosamminoglicano, componente dell'ECM e sintetizzato dalle cellule stellate epatiche. In normali circostanze le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici sono il sito di re-uptake e degradazione dell'HA. Aumenti dei suoi livelli possono dipendere sia da diminuito re-uptake epatico sia da aumentata produzione. Questi aumenti vengono riscontrati in pazienti con patologie epatiche a diversa eziologia e in particolare in quelli con cirrosi. I livelli sierici elevati sono correlati non solo con i diversi stadi di fibrosi ma anche con i gradi di attività necro-infiammatoria. Quando i valori sono inferiori ai 60 mg/l si può escludere la presenza di significativa fibrosi/cirrosi con un valore predittivo positivo (PPV) del 93% e del 99% rispettivamente. L'acido ialuronico è un parametro utile nella diagnosi precoce di fibrosi, riducendo così la necessità di ricorrere all'invasiva biopsia epatica. A differenza, per esempio, del procollagene di tipo III, l'HA è un marker che può essere considerato diagnostico da solo e non in combinazione necessariamente con altri parametri.

YKL-40: fa parte della famiglia delle chinasi (18-glicosilidrossilasi). E' prodotto da una grande varietà di cellule e in particolare da quelle coinvolte nel rimodellamento/degradazione della matrice extracellulare. La sua risorsa epatica è verosimilmente prodotta dalle cellule stellate. La sua funzione fisiologica è sconosciuta ma contribuisce al rimodellamento plastico dei tessuti, agisce come un fattore di crescita dei fibroblasti, compie la sua attività in sinergia con fattori di crescita insulino-simili, ha attività chemiotattica per le cellule dell'endotelio con un ruolo anche nell'angiogenesi. I livelli sierici di YKL-40 sono strettamente correlati con il livello di fibrosi, e alti valori sono stati riscontrati in corso di cirrosi. A differenza di PIIINP e HA, i suoi valori aumentano significativamente in pazienti con cirrosi alcolica ed è il migliore tra questi markers diretti per discriminare tra pazienti con fibrosi lieve e moderata^(6,35).

Markers associati alla degradazione della matrice:

I prodotti della degradazione della matrice sono il risultato dell'attività di una famiglia di enzimi chiamati Metalloproteinasi (MMPs). Vengono sintetizzati a livello intracellulare e secreti come pro-enzimi; le MMPs sono attivate per scissione proteolitica dalla metalloproteinasi 1 della membrana (MT1-MMP) o plasmina e inibite dal legame con specifici inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs).

Considerando i loro substrati specifici si distinguono cinque categorie di MMPs:

- collagenasi interstiziali (MMP-1,-8,-13)
- gelatinasi (MMP-2,-9 e la proteina attivante i fibroblasti)
- stromelisina (MMP-3,-7,-10,-11)
- membranali (MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25) e
- metalloelastasi (MMP-12).

Le metalloproteinasi e i loro inibitori sono coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare. Nelle epatiti croniche, l'attenzione degli studi è stata principalmente rivolta a MMP-2 (gelatinasi o 72 Kda collagene di tipo IV), alla metalloproteinasi 1 o 2 della membrana che attiva la latente MMP-2 e infine agli inibitori TIMP-1 e -2. Un'eccessiva produzione di questi ultimi potrebbe essere un importante fattore nella progressione della fibrosi epatica. Le cellule stellate (HSC) sono la principale fonte di MMP2 nel fegato dell'uomo e la loro attivazione richiede l'interazione degli epatociti. TIMP-1 è prodotto da HSC ed epatociti. Circa il loro valore diagnostico, uno studio riporta che livelli elevati MMP-2 sono associabili solo a cirrosi, mentre TIMP-1 è utile nella determinazione di fasi precoci di fibrosi. Inoltre questo studio rivela che TIMP-1 ha una forte correlazione con i punteggi infiammatori e che MMP-2 non è invece correlabile con lo stadio di fibrosi in fegati non cirrotici. Altri studi hanno stabilito che i livelli elevati di MMP-1 non compaiono fino a quando non c'è uno stadio oramai avanzato di fibrosi. TIMP-1 è stato comparato con altri markers diretti quali PIIINP, collagene di tipo IV, laminina P1 e con gli aspetti istologici, suggerendo che i suoi livelli sierici potrebbero essere utili per stimare la fibrogenesi epatica associata all'attività infiammatoria. Il rapporto TMP-1/MMP-1 potrebbe essere impiegato nella diagnosi di fibrosi epatica^(6, 35).

Citochine e Chemochine associate a fibrosi epatica:

TGF- β 1: il fattore di crescita trasformante è un polipeptide che viene secreto in forma inattiva. Ha effetti pleiotropi attraverso recettori di membrana su un'ampia varietà di cellule. Nelle patologie epatiche, TGF- β 1 è il più importante stimolo per la produzione di ECM da parte delle cellule stellate ed è anche un inibitore della crescita e proliferazione degli epatociti. La valutazione dei livelli sierici di TGF- β 1 ha alcune limitazioni relative alla contaminazione dei campioni con piastrine, che interferiscono con l'attività della plasmina che nel plasma aumenta i livelli di TGF- β 1, sia attraverso la creazione di complessi LAP-TGF- β 1, sia tramite il suo legame ai siti danneggiati della matrice e dell'endotelio vascolare e il suo sequestro da parte di proteine solubili. Questi fattori spiegano perché i livelli plasmatici di questo parametro sono probabilmente poco diagnostici. Comunque esiste una buona correlazione tra i valori sierici di TGF- β 1 e i punteggi della scala di Knodell e quindi con la progressione della fibrosi.

PDGF: fattore di crescita derivato dalle piastrine è anch'esso uno dei principali stimoli per la proliferazione delle cellule stellate ed è regolato dalla progressione del danno epatico. PDGF-BB è una sub-unità che gioca un ruolo importante nell'invio di segnali alle cellule stellate, ha pertanto un elevato valore diagnostico nella valutazione della fibrosi quando viene comparato agli altri otto markers.

In definitiva possiamo concludere che i markers diretti con maggiore valore prognostico per la fibrosi sono il PIIINP, la laminina, l'HA e YKL-40 che forniscono anche ottime indicazioni sull'attività infiammatoria.^(6, 35)

Combinazione di markers diretti

La combinazione di più markers può essere utilizzata per generare un algoritmo utile per valutare se c'è fibrosi o il suo stadio come approccio alternativo.

Oberti *et al.*⁽³⁵⁾ ha studiato in particolare quattro di questi markers che sono HA, PIIINP, la laminina e TGF- β insieme ad alcuni markers non specifici come l'indice di protrombina, GGT, l'apolipoproteina-A1 e α 2-macroglobulina. La migliore accuratezza è stata riscontrata per HA (86%), seguito dalla laminina (81%), PIIINP (74%) e TGF- β 1 (67%), ma valutati nel complesso i risultati dello studio prospettivo di Oberti non mostrano alcun vantaggio diagnostico dal fatto di avere incluso parametri non specifici.

I markers diretti presentano tuttavia alcuni limiti:

- riflettono l'entità del turnover cellulare della matrice, e hanno la tendenza ad innalzarsi quando è associata una marcata attività infiammatoria. Come conseguenza, l'estesa deposizione della matrice potrebbe non essere rilevata in presenza di infiammazione minima;

- non sono specifici del fegato e i loro livelli ematici potrebbero elevarsi anche in presenza di siti concomitanti di infiammazione. Uno studio del 2002 mostra come tutti questi indici, ad esclusione della laminina, aumentino all'aumentare del grado di infiammazione: pertanto la correlazione che deriva spiega anche perché, se utilizzati singolarmente, la loro specificità sia bassa.⁽⁶¹⁾

- i livelli sierici di tali markers dipendono dai valori di clearance che sono influenzati dalla disfunzione delle cellule endoteliali e da un danno dei meccanismi di escrezione biliare e di funzionalità renale.

Essendo la fibrosi epatica il risultato della perdita della normale funzione delle cellule epatiche per disorganizzazione da accumulo della matrice extracellulare, è chiaro che un'alterazione nella produzione e degradazione dell'ECM è responsabile di una compromissione del suo metabolismo ben rappresentata da tali indici. Comunque qualora si utilizzino solo markers sierici per diagnosticare fibrosi/cirrosi causata da epatiti croniche senza correlarli ai dati di stadiazione istologica, si rischia di sovrastimare la sensibilità della diagnosi.⁽⁶¹⁾

2.8 ACIDO IALURONICO IN MEDICINA UMANA

L'acido ialuronico (HA) è un glicosamminoglicano costituito da una lunghissima sequenza di unità disaccaridiche non solforate. La lunghezza della molecole, l'assenza di gruppi solfati e di legami covalenti permettono di distinguere HA da altri glicosamminoglicani. I polimeri disaccaridici sono costituiti da acido glicuronic e N-acetilglucosamina (Zanna *et al*). Viene sintetizzato da un complesso enzimatico presente sulla membrana cellulare (HAS1-HAS2-HAS3) a differenza degli altri glicosamminoglicani sintetizzati nel citoplasma e successivamente secreti per esocitosi ed è un componente della matrice extracellulare. E' prodotto da diverse cellule come fibroblasti, cheratinociti ed epatociti e rimane nella matrice legato a glicoproteine e glicosamminoglicani. Ha come principale substrato le CD44, presenti nelle cellule epiteliali e necessarie per il suo recupero e metabolismo. Le CD44 sono proteine transmembrana, monometriche, altamente glicosilate la cui funzione è di legare l'HA e altre glicoproteine dell'ECM. Sono principalmente molecole di adesione intercellulare espresse sui linfociti. L'acido ialuronico, particolarmente abbondante nel tessuto embrionario (cordone ombelicale), nel corpo vitreo e nel tessuto connettivo lasso; si localizza in tutti i tessuti animali dove esercita un'azione di resistenza alle forze compressive, espandendo i tessuti grazie alla sua notevole capacità di legare l'acqua. Presenta una struttura fortemente idrofila e dà soluzioni altamente viscosi. Esso è prodotto in grande quantità nei processi di riparazione tissutale, come la fibrosi conseguente a danno epatico, ed è presente anche nel liquido sinoviale delle articolazioni dove esercita una funzione lubrificante e nella cartilagine conferendo a tale tessuto grande resistenza alla compressione.⁽⁶²⁾ La degradazione⁽⁶³⁾ di HA può avvenire ad opera di due enzimi, la β -glucuronidasi e la N-acetilglucosaminidasi che sono capaci demolire le catene a partire dall'estremità non riducente. Esistono inoltre le endo- β -N-acetilesosaminidasi, le cosiddette ialuronidasi che attaccano i punti interni della catena. L'eliminazione dei frammenti avviene poi attraverso le urine. Come è noto l'HA è oggi ampiamente utilizzato nella medicina umana estetica in alternativa al collagene: può essere di estrazione animale (creste di gallo), ottenuto dalla fermentazione di batteri come *Streptococcus Zooepidermicus* oppure sintetizzato in laboratorio. Oltre al suo impiego nella medicina estetica l'acido ialuronico è il protagonista di numerosi studi condotti, soprattutto nell'ultima decade, in medicina umana al fine di verificare la sua attendibilità diagnostica come marker diretto e non invasivo di fibrosi epatica. La letteratura in merito e in nostro possesso è particolarmente ampia e dimostra le caratteristiche avanguardistiche di questo parametro sierico verso il quale si stanno indirizzando studi anche in medicina veterinaria. La possibilità di disporre di metodi più veloci e meno invasivi della

biopsia epatica, come per il cane anche nell'uomo, offre al clinico notevoli vantaggi snellendo il percorso che porta alla diagnosi definitiva e riducendo i costi di ospedalizzazione che un prelievo bioptico necessariamente richiede per il paziente. Tuttavia questo, ancora oggi, non sottrae valore alla stadiazione istologica che rimane il gold standard e quindi la procedura principe nella diagnosi di epatopatia cronica indipendentemente dalla causa, ma piuttosto da' un valore aggiunto ad essa migliorando l'accuratezza della diagnosi e permettendo in qualunque momento un monitoraggio meno invasivo della malattia e del trattamento terapeutico. I numerosi studi condotti coprono in ordine cronologico un arco di tempo che oscilla tra il 1997 e il 2008 circa e tutti dimostrano l'inconfutabile utilità di HA nella diagnosi di fibrosi e cirrosi.

Presso la facoltà di medicina di Anger⁽³⁵⁾ in Francia nel '97 è stata testata l'accuratezza diagnostica per la cirrosi di segni clinici, ecografici, radiografici, endoscopici e biochimici poiché si era visto che effettivamente erano utili nella diagnosi non invasiva dell'epatopatia. Tali parametri tuttavia sono stati valutati insieme solo in pochi studi precedenti nei quali la loro accuratezza, anche se si tratta di variabili indipendenti, è risultata elevata (70-95%). Inoltre in alcuni casi le variabili sono state cambiate, ad eccezione della conta piastrinica e della misurazione del diametro della vena porta. Le discrepanze ottenute nei risultati potrebbero essere attribuite alle differenti cause e alla diversa gravità delle patologie epatiche, alle variabili studiate o alla soggettività dell'osservatore. Comunque, markers sierici di fibrosi non sono stati considerati in nessuno di questi studi. Uno studio condotto invece in Francia mostra che, nell'ambito degli indici biochimici, l'acido ialuronico ha un'accuratezza diagnostica più alta tra 63 variabili (quindi > 85%) e che queste ultime aggiungono poche informazioni. Gli autori quindi suggeriscono l'uso di HA in alternativa ad altri metodi, a volte anche di difficile applicazione clinica. Inoltre la precisione di HA risulta indipendente sia dalla causa eziologia che dalla gravità della patologia e la curva di ROC mostra come sia adatto ad essere impiegato in programmi di screening della fibrosi.

Nell'utilizzare i markers di fibrosi occorre adottare una strategia che consideri almeno due situazioni:

in una popolazione di pazienti eterogenea, per il loro basso costo e la loro facile reperibilità, markers come l'indice di protrombina (marker indiretto) dovrebbe essere valutato e comparato con HA, che è più sensibile per epatiti virali o da alcool;

in popolazioni di pazienti con epatopatia da alcool o che hanno epatite B o C va usato HA perché è più accurato.

In questo studio i francesi concludono che, poiché la diagnosi non invasiva di cirrosi è stata possibile in 9 pazienti su 10, HA e l'indice di protrombina sono i markers migliori.⁽⁶⁴⁾

In altro studio che è stato condotto in Cina a Shanghai⁽⁶⁵⁾ nel 2002 si valuta la relazione tra i cambiamenti patologici del tessuto epatico e i livelli sierici di markers diretti come HA, ma anche PC-III, C-IV e laminina in pazienti con epatiti virali croniche. I livelli di tali indici risultano aumentare con la progressione della fibrosi (da S1 a S4) valutata istologicamente in accordo con i criteri di Xi'an del 2000. Si è inoltre riscontrato un aumento dei valori dell'ALT. Come abbiamo già visto le cellule stellate epatiche attivate producono collagene di tipi I, II e IV, laminina, fibronectina e ACIDO IALURONICO che è la principale risorsa dell'ECM. Il collagene di tipo IV è un elemento essenziale della membrana basale degli epatociti che produce pesanti depositi in fase cirrotica. Laminina e C-IV formano un solido complesso costituito da macromolecole che compiono alcune funzioni della membrana basale e il loro livello sierico è indice del grado di fibrosi epatica nell'area portale e nei sinusoidi epatici. HA, metabolizzato principalmente nelle cellule endoteliali, è però il migliore nella valutazione del grado di fibrosi. Lo studio dimostra che le concentrazioni sieriche di questi markers diretti aumentano all'aumentare della gravità della patologia e che raggiungono i valori più alti nello stadio di cirrosi epatica. Inoltre i valori di HA, laminina e C-IV sono più alti quando l'infiammazione epatica è attiva, mentre quando è stabile, soprattutto quando la Bil Tot è alterata, PC-III appare meno indicativo. Infatti la fibrosi epatica è una risposta di rigenerazione e ricostruzione di un danno epatico cronico. La stadiazione istologica ottenuta con la biopsia fornisce un'istantanea soggettiva del processo fibrotico e viene classificata in scale standardizzate. Lo studio vuole porre l'attenzione sull'utilità di markers non invasivi come HA, PC-III, laminina e C-IV che potrebbero aiutare a valutare non solo aspetti diversi delle scale di fibrosi ma soprattutto sono valori clinici supplementari che affiancano la biopsia nella diagnosi dell'epatopatia che ha causato fibrosi.

Molto simile a quello appena descritto è un altro studio prodotto sempre in Cina a Guangzhou⁽⁶⁶⁾ l'anno seguente che prende sempre in considerazione parametri diretti quali HA, PC-III e il collagene di tipo IV. I risultati ancora una volta dimostrano che tra questi markers l'acido ialuronico è quello più preciso, il migliore per diagnosticare la cirrosi. I valori ematici di questi indici, in base a quanto riportano gli autori dello studio, aumenta per stadi di fibrosi $> 0 = a S2$ con una significativa differenza tra S2-4 e gli stadi S0-S1. Essi hanno fissato lo stadio $> 0 = a S2$ come standard diagnostico per la fibrosi e lo stadio S4 per il fegato con cirrosi. I valori di cut off sia per HA che per PCIII sono pari a 90 $\mu\text{g/L}$ con sensibilità dell'80% e specificità del 60-70% mentre il cut off di HA

per i pazienti con CIRROSI sono uguali a 210 µg/L con sensibilità del 96.2% e specificità dell'85,3%: questi risultati quindi dimostrano che l'accuratezza diagnostica di HA nella valutazione della cirrosi è migliore di quella di PC-III e di C-IV nell'applicazione clinica. L'acido ialuronico in conclusione dovrebbe essere sempre impiegato nei programmi di screening di epatopatia nell'uomo.

Alla medesima conclusione era già pervenuto nel 1998 un gruppo di studio sempre cinese ma di Shanghai⁽⁶⁷⁾: attraverso una curva di analisi di ROC è stato dimostrato che lo ialuronato ha più grande capacità diagnostica di PC-III per discriminare pazienti con estesa fibrosi epatica da quelli in cui è assente o moderata. I valori di cut off di HA sono anch'essi analoghi e pari ad 85 µg/L nei pazienti con fibrosi e pari a 110 µg/L con sensibilità del 70% e specificità dell'89,4 % in quelli con cirrosi.

Poiché nell'uomo come negli animali le epatiti croniche possono conseguire anche a un sovraccarico del fegato con farmaci, droghe e altre sostanze tossiche è d'obbligo citare gli studi che a riguardo sono stati eseguiti in umana e che suggeriscono ancora il dosaggio dell'acido ialuronico e delle ialuronidasi come markers molto precoci di danno epatico tossico.

Poiché l'HA può essere rapidamente testato nel siero dopo un banale prelievo di sangue e aumenta già il giorno seguente dall'inizio dell'assunzione della sostanza tossica: sarebbe interessante dimostrare se anche nel cane HA abbia effettivamente un valore predittivo così attendibile e precoce. In particolare ricordiamo uno studio americano, eseguito a San Francisco⁽⁶⁸⁾ nel 2004, che ha analizzato sperimentalmente nel ratto l'incremento sierico dello ialuronato dopo somministrazione di una potente epatotossina, la dietilnitrosamina (DMN). Il DMN⁽⁶⁹⁾ è un prodotto chimico organico volatile, altamente tossico per l'uomo e ritenuto responsabile di effetti carcinogenetici. In dosi elevate è una potente epatotossina e può causare fibrosi epatica. L'induzione di tumore nel fegato di ratto dopo esposizione cronica a basse dosi è ben documentata. Il DMN è un sottoprodotto industriale e residuo di parecchi processi industriali. E' stato individuato nelle acque in California per la prima volta nel 1998-99. Lo studio dimostra che HA e le ialuronidasi sono indicatori ematici davvero precoci di danno epatico nel modello sperimentale analizzato. I livelli degli enzimi tendono ad aumentare già il giorno seguente l'assunzione, con un picco di attività enzimatica che viene raggiunto il secondo giorno e con solo un leggero decremento nel terzo. Campioni di sangue sono stati prelevati ogni 24 ore. L'aumentata sintesi di enzimi di demolizione di HA infatti riflette un'alterazione del turnover conseguente a maggiore deposizione di acido ialuronico. Questo è il primo studio in cui l'attività di enzimi come HAS-1 è stata utilizzata nello studio delle patologie epatiche. I livelli sierici di HA aumentano anche in risposta a stress che consegue a un'infezione, in corso di setticemia o shock e in pazienti

con gravi ustioni. Grazie alle sue proprietà idrofile richiama acqua ed espande i tessuti per prevenire o ritardare il collasso intravascolare. Congestione vascolare e compressione del parenchima epatico sono fenomeni che sicuramente accompagnano anche la fibrosi epatica: quindi l'aumento di HA è utile sia per contenere l'entità del danno sia a scopo diagnostico dato che si verifica precocemente. Il meccanismo con cui avviene è tuttora sconosciuto; gli autori hanno ipotizzato possa dipendere da diminuita degradazione da parte delle ialuronidasi.

Lo studio dell'acido ialuronico come marker di fibrosi epatica è proseguito anche negli anni successivi con studi in parte analoghi a quelli già descritti ma anche con lavori che hanno tentato un nuovo approccio confrontando l'utilità diagnostica di HA con quella di altri indici come l'APRI (AST/plt index) e di pannelli di markers biochimici introdotti nella pratica ospedaliera tra il 2003 e il 2006 quali Fibrotest e Actitest.

Tra gli studi sovrapponibili ai precedenti ricordiamo quello di P.Halfon, M.Bourlire *et al.* del 2005⁽⁷⁰⁾ in cui hanno valutato HA e cercato di determinare i suoi livelli di cut-off allo scopo di predire la presenza o assenza di fibrosi, fibrosi grave o cirrosi in pazienti con epatite C. Sono stati campionati 405 pazienti nello stesso giorno con misurazione di parametri biochimici e biopsia epatica, poi esaminate con la scala di METAVIR. In assenza di fibrosi, fibrosi grave e cirrosi i risultati hanno evidenziato livelli di HA pari a 16, 25 e 50 µg/L rispettivamente. Valori sierici invece molto più elevati di 121, 160 e 237 µg/L sono stati ottenuti in presenza di fibrosi, fibrosi grave e cirrosi. Gli autori hanno quindi concluso che l'acido ialuronico è un parametro accurato nella predizione di grave fibrosi epatica e pertanto anche questo studio supporta l'idea che HA possa essere molto utile clinicamente come marker non invasivo.

L'anno seguente tra gli studi che invece hanno tentato un nuovo approccio nella valutazione dello ialuronato sicuramente importante quello che è stato condotto da un gruppo di studiosi parigini⁽⁷¹⁾ che hanno confrontato HA con il Fibrotest e l'Actitest. Il Fibrotest, come abbiamo già visto, è un pannello di valutazione di diversi indici biochimici che include l' α 2-macroglobulina, γ -globulina, l'apolipoproteina A1, l'aptoglobina, la Bil Tot e GGT; Actitest aggiunge l'indice di attività necro-infiammatoria combinato con i precedenti cinque più l'ALT. Il Fibrotest (FT) ha valore predittivo per lesioni epatiche significative in pazienti con epatite C, B e da abuso di alcool. Poiché le caratteristiche della fibrosi sono simili in pazienti con steatoepatite non alcolica (NAFLD) è stato ipotizzato che anche per questi ultimi il valore diagnostico di FT sia lo stesso. Dall'esperienza degli autori nei pazienti con epatite C ed epatite alcolica, FT è risultato avere maggiore sensibilità rispetto ad HA, nella diagnosi di lieve, moderata fibrosi. Questo studio ci porta quindi a differenziare, nell'ambito dei markers non

invasivi, quelli più idonei per fasi precoci di fibrosi come il Fibrotest e quelli invece migliori per stadi più avanzati di malattia e cirrosi come abbiamo visto per HA nei precedenti studi. Il Fibrotest è quindi il punto di partenza per ottenere diagnosi sempre più precoci e ridurre le percentuali di morte per cirrosi: può consentire infatti un migliore monitoraggio di sintomi che accompagnano la fibrosi come l'ipertensione portale e una maggiore prevenzione per carcinomi epatocellulari.

Studi più recenti hanno, infine, preso in esame un altro marker indiretto, l'APRI index (AST/plt) che, come hanno già dimostrato, è sensibile solo per stadi avanzati di fibrosi (F3-F4). Nello studio si ipotizza che APRI in combinazione con differenti punti di cut-off di HA potrebbe essere un migliore indice di fibrosi rispetto agli stessi parametri presi singolarmente. In questo studio Kuroiwa quindi arriva a stabilire che l'APRI da solo ha un valore predittivo positivo (PPV) di 41,3% e una specificità dell'84,7%. Quando però vengono aggiunti punti differenti di cut-off di HA, il PPV e la specificità aumentano significativamente, soprattutto quando i valori superano i 300 µg/L.

2.9 ACIDO IALURONICO IN MEDICINA VETERINARIA

Per ora in medicina veterinaria su markers non invasivi è stato condotto solo uno studio preliminare a Tokyo, per altro molto recente (2009), nel quale Kanemoto *et al.*⁽²⁵⁾ hanno dimostrato la validità diagnostica e clinica dell'acido ialuronico (HA) come marker di cirrosi nel cane. Le malattie del fegato non rappresentano però l'unico ambito della medicina veterinaria nel quale si sia cercato di valutare l'acido ialuronico. Per esempio in Spagna nel 2008 è stato effettuato uno studio⁽⁷³⁾ sulla mucinosi cutanea dello Shar-pei che sarebbe causata da un eccessivo deposito di MUCINA nel derma: quest'ultima è una sostanza viscida, chiara e gelatinosa e prevalentemente costituita da GAG (glicosamminoglicani) che includono anche l'acido ialuronico. La malattia si associa anche a un aumento dei livelli ematici di HA e clinicamente si manifesta con lesioni dermatologiche come assottigliamento della cute e aspetto vescicolare. Istologicamente la mucina appare come un materiale leggermente basofilo che si dispone tra le fibre collagene del derma. Viene evidenziata con la colorazione di Alcian Blue (AB) / acido periodico di Schiff (colorazione di PAS). La mucinosi cutanea ha probabilmente un'origine genetica, colpisce soprattutto gli Shar-pei e spesso è associata a infezioni batteriche ed entropion.

Un altro studio⁽⁷⁴⁾ ha invece valutato la concentrazione sierica e nel liquido sinoviale di cherosolfato (KS) e HA in cani con osteoartrite articolare conseguente a rottura del legamento crociato craniale. Dallo studio emerge che la loro concentrazione, dopo essersi rialzata, diminuisce in uno, due, tre mesi dopo l'intervento chirurgico, se comparata con i livelli basali. I valori diminuiscono invece in un mese nei soggetti non operati. L'iniziale aumento e la successiva diminuzione della concentrazione nel liquido sinoviale di HA e KS potrebbero essere causate da un'inflammazione acuta in risposta alla traumatizzazione chirurgica che ha effetti negativi sul metabolismo della cartilagine e aumenta la produzione di proteoglicani immaturi.

Analogo al precedente studio è quello che è stato condotto da un gruppo di ricercatori Tailandesi⁽⁷⁵⁾ che dopo aver valutato, tramite l'impiego un kit Elisa, la concentrazione sierica di HA e condroitinsolfato (CS), hanno comparato i diversi valori ottenuti in due gruppi di cani, quelli affetti da displasia dell'anca (25) e quelli esenti (98). I risultati hanno evidenziato valori di CS sono molto più elevati nei cani con displasia rispetto ai sani, mentre i livelli di HA sono risultati maggiori nei cani esenti rispetto ai patologici (più bassi del 45%). Il gruppo dei cani sani era costituito da cani molto giovani, circa 11,2 mesi.

Il rialzo dei valori di condroitinsolfato (CS) nei cani displasici suggerisce che in questa patologia dell'accrescimento si instaura una degenerazione progressiva

della cartilagine che evolve ad osteoartrite. HA è una delle molecole della matrice extracellulare della cartilagine articolare (ECM). Lo studio precedentemente descritto ha mostrato che l'acido ialuronico può essere utilizzato come marker di osteoartrite conseguente a rottura del legamento crociato anteriore nel cane. E' questo invece il primo studio che lo valuta nella displasia dell'anca. Gli autori concludono che il comportamento diverso di CS e HA nella displasia dell'anca può essere comunque utile per la diagnosi differenziale di patologie articolari e per il loro monitoraggio.

Da questi studi si può quindi concludere che sia la mucinosi che l'osteoartrite sono malattie con patogenesi legata a difetti intrinseci del metabolismo di HA.

Analogamente nel loro studio i giapponesi (Kanemoto *et al.*)⁽²⁵⁾ hanno correlato la concentrazione ematica dell'acido ialuronico con il grado istologico di fibrosi dimostrando l'utilità di questo marker non invasivo nella diagnosi di cirrosi nel cane. Anche i meccanismi patogenetici della fibrosi infatti comprendono alterazioni della matrice extracellulare con aumentata deposizione di collagene e di altre molecole ed interferenza con i meccanismi di incorporazione e degradazione dell'HA dal circolo ematico al fegato, che porta a un suo inevitabile rialzo. Kanemoto nel suo studio ha distinto i pazienti in 4 gruppi: soggetti sani (gruppo 0), cani con malattie epatiche croniche ma senza cirrosi (gruppo 1), cani con cirrosi (gruppo 2) e cani con malattie extraepatiche (gruppo 3). Il gruppo di controllo includeva 9 Beagles, sia maschi che femmine, di età compresa tra 3 e 4. Sono stati ottenuti valori di cut-off pari a 400 µg/l sui quali sono state definite sensibilità, specificità, il valore predittivo positivo e negativo per pazienti con fegato cirrotico rispettivamente pari a 75% (6/8), 94,1% (16/17), 85,7% (6/7) e 88,9% (16/18). I risultati di questo studio hanno evidenziato che la concentrazione sierica di HA è maggiore nei cani con cirrosi rispetto a quelli con fibrosi ma senza ancora cirrosi. Essi pertanto in parte coincidono con i dati ottenuti in umana e suggeriscono che la concentrazione ematica dell'acido ialuronico nel cane potrebbe essere un importante test diagnostico ed essere utilizzato come marker di cirrosi nei pazienti con malattia epatica. La concentrazione di HA nel gruppo 1 è risultata significativamente più alta di quella dei cani con patologie extraepatiche (gruppo 3), mentre non è stata riscontrata differenza significativa né tra il gruppo 1 e quello di controllo né tra i gradi di fibrosi e la concentrazione sierica di HA nel gruppo 1 dei cani con malattia epatica ma senza cirrosi.

In contrasto con questi dati, in umana, è stato invece riportata una correlazione anche tra la concentrazione di HA e i gradi istologici di fibrosi (Patel *et al.*, Guehot *et al.*, 1996). Nello studio sono inoltre stati inclusi diversi tipi di epatite. Questo può aver contribuito alla variabilità di HA e potrebbe spiegare la mancanza di correlazione tra la concentrazione dell'acido ialuronico e i gradi di

fibrosi all'interno del gruppo 1. Kanemoto dimostra quindi che i pazienti canini con cirrosi hanno elevate concentrazioni ematiche di HA se paragonati a quelli che non hanno ancora sviluppato la cirrosi. La misura dell'HA circolante, per gli autori, potrebbe effettivamente essere un marker non invasivo di diagnosi per evidenziare la presenza o assenza di cirrosi epatica nel cane.

L'anno seguente (2010) è stato pubblicato sempre da studiosi giapponesi⁽⁷⁶⁾ un altro studio relativo all'acido ialuronico come marker di epatopatia. In questo caso è stata presa in considerazione una patologia vascolare, lo shunt portosistemico congenito (CPSS), e si sono comparati i valori sierici di acido ialuronico in cani affetti dalla malattia con quelli sani. I campioni di controllo e quindi i cani sani erano tutti Beagles femmine di peso intorno ai 10 kg. I risultati hanno evidenziato livelli di HA nettamente superiori nei cani con shunt (234 ng/ml) rispetto a quelli sani (67 ng/ml). Poiché i casi controllo però erano tutte femmine, della stessa razza e di peso maggiore rispetto ai casi patologici queste variabili potrebbero aver influenzato la differenza nei valori di HA tra i sani e i malati. Il volume totale di sangue che raggiunge il fegato è fornito per un 80% dalla vena porta e per un 20% dall'arteria epatica. In caso di shunt portosistemico congenito il sangue portale entra direttamente nel sistema venoso attraverso lo shunt. Gli autori affermano che la riduzione del flusso portale intraepatico potrebbe condurre a una diminuzione della clearance di HA nelle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici. I risultati mostrano che in seguito a correzione chirurgica dello shunt i livelli di HA diminuiscono in 14 cani su 17. Questo potrebbe indicare che un miglioramento della clearance di HA nelle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici è responsabile del ripristino del flusso portale intraepatico. L'aumento dei livelli sierici dell'acido ialuronico può quindi dipendere da un' aumentata produzione o da riduzione della clearance, ma l'aumento di produzione di HA causa fibrosi e cirrosi che non sono evidenziabili istologicamente, supportando l'ipotesi degli autori che l'aumento dei livelli sierici di HA in questi casi sia imputabile esclusivamente a riduzione della clearance sinusoidale. Concludono quindi che HA non risulta quindi utile in caso di shunt acquisito e di patologie epatiche congenite (come l'ipoplasia primaria della vena porta) con concomitante fibrosi.

Da quest'analisi bibliografica si può quindi dedurre l'indiscutibile utilità dell'acido ialuronico come marker di fibrosi ampiamente studiato in medicina umana e da essa è possibile trarre validi spunti per la ricerca anche in medicina veterinaria, dove però gli studi sono ancora in fase preliminare. Il primo passo è stato compiuto come già detto da Kanemoto *et al.* proponendo un primo incoraggiante risultato in veterinaria nell'ambito delle epatiti croniche. Il suo studio ha infatti fornito un ulteriore stimolo al nostro progetto di ricerca iniziato

nel 2007 al fine di aggiungere nuovi elementi al tema della fibrosi epatica nella clinica veterinaria e suggerire ulteriori spunti per nuove ricerche.

3 MATERIALI E METODI

I markers epatici valutati nel nostro studio, come precedentemente detto, sono stati AST/ALT ratio, APRI index e HA. La valutazione dell'attendibilità dei primi due markers è stata effettuata tramite uno studio principalmente retrospettivo, caso-controllo, mentre per quanto riguarda l'HA, questo è stato valutato tramite uno studio esclusivamente prospettivo.

Data la diversità d'impostazione dei due studi questi verranno trattati separatamente.

1° STUDIO

Presso la Sezione di Clinica Medica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università di Milano, dal 2005 al 2010 sono stati sottoposti ad esame bioptico epatico 54 cani, tra questi abbiamo selezionato come casi patologici, solo soggetti per i quali fosse stato eseguito un esame emocromocitometrico e biochimico, che presentasse alterazioni riferibili ad epatopatia, e per i quali ci fossero tagli istologici a disposizione per una nuova valutazione.

Come controlli, nonostante la struttura retrospettiva dello studio, sono stati da noi utilizzati, gli stessi cani selezionati per il nostro secondo studio riguardante la valutazione dell'acido ialuronico. Infatti sono stati prelevati campioni di sangue da soggetti ricoverati presso il Rifugio Canile Sanitario di Milano e soggetti riferiti per vari tipi di visita ad ambulatori veterinari privati nel settembre 2010.

I criteri di inclusione di tali controlli sono stati:

- 1) esame clinico nella norma (in particolare assenza di segni clinici riferibili ad epatopatie o patologie dell'apparato muscolo-scheletrico);
- 2) accettazione del contenimento fisico per la realizzazione del prelievo;
- 3) età compresa tra 2 e 5 anni; 2 anni per selezionare cani che avessero ormai completato lo sviluppo muscolo-scheletrico e 5 anni come limite superiore poiché le epatiti croniche, in accordo con quanto riferito in letteratura, in linea di massima, sono segnalate a partire dai 5 anni.
- 4) valutazione ematologica e biochimica nella norma

Alla fine della selezione dei soggetti il nostro primo studio ha potuto basarsi su 20 casi e 12 controlli.

Dei campioni ematologici e biochimici dei casi e dei controlli sono stati registrati conta piastrinica, AST e ALT.

Abbiamo poi calcolato per tutti i casi e i controlli i valori di AST/ALT ratio e di APRI index; il secondo indice è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST(U/L) / ULN}}{\text{PLT (10}^9\text{/L)}} \times 100$$

Dove ULN (Upper Limit Normal) viene fornito dal Laboratorio di Analisi, i base al macchinario in utilizzo, ed è risultato essere pari a 40 U/L.

Presso la Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare del Dipartimento di Patologia Animale e Sanità Pubblica Veterinaria i campioni bioptici dei casi patologici, in occasione della precedente valutazione istologica erano stati fissati in formalina tamponata al 10%, immersi in scala crescente di alcoli e chiarificati in xilene, quindi inclusi in paraffina. Da questa procedura sono così stati ottenuti dei blocchetti conservabili dai quali sono state tagliate sezioni seriate dello spessore di 5 micron adatte alla nuova valutazione istologica necessaria al nostro studio.

Le nuove sezioni dei campioni, sono state sottoposte a 3 diverse colorazioni istologiche:

- 1) Ematossilina-eosina, per ottenere una visione complessiva del tessuto e del quadro patologico esistente
- 2) PAS, per meglio visualizzare la presenza di glicogeno
- 3) Colorazione per la Reticolina: una colorazione a base di nitrato d'argento che evidenzia con nettezza le fibre di reticolina, importanti nella valutazione dell'entità della fibrosi.

Durante l'esame istologico dei 20 campioni patologici da noi raccolti, è stata posta attenzione a 3 lesioni che risultano fondamentali nella valutazione delle biopsie epatiche:

- 1) degenerazione epatocitaria: si presenta nel complesso molto diffusa, ma si tratta per lo più di glicogenosi e/o di degenerazioni diffuse ma poco gravi come la torbido-vacuolare;
- 2) flogosi: non è di comune riscontro nei casi esaminati e quando è presente è di lieve entità e riconducibile a piccoli focolai linfocitari;
- 3) fibrosi

La valutazione istologica di ciascuna di queste 3 lesioni cardine, è stata effettuata attraverso un sistema di tipo semiquantitativo avvalendosi di un punteggio (score) da 0 a 4 così formulato:

0 → assenza di lesione

1 → lesione di grado lieve

2 → lesione di grado moderato

3 → lesione grave

4 → lesione gravissima

La colorazione con la reticolina è stata necessaria per identificare al meglio la fibrosi. In diversi casi, come, segnalato dalla Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, è stata necessaria tale colorazione per evidenziare il collasso della reticolina, segno di perdita epatocitaria, che altrimenti non sarebbe stato possibile con il semplice impiego di Ematossilina e Eosina. Tale collasso è stato rilevato soprattutto nelle vicinanze degli spazi portali, ma spesso anche in corrispondenza della compagine del lobulo epatico.

Dopo aver effettuato le colorazioni e aver ottenuto una scala relativa allo stadio di fibrosi, è stata effettuata una analisi statistica utilizzando il software MED CALC versione 11.5.1 per Windows che mettesse in relazione, innanzitutto i valori assoluti di ALT e AST con i vari gradi di fibrosi (test di correlazione fra ranghi di Spearman)e, secondariamente la fibrosi con i valori di AST/ALT ratio e APRI index. Tuttavia, in una prima analisi, i dati sulla fibrosi, sono stati considerati come dicotomici (presenza-assenza), indipendentemente dallo stadio. Le variabili rappresentate da AST/ALT ratio e APRI index sono state analizzate con la tecnica ROC (receiver operating characteristic curve) per stabilire se il metodo fosse valido e per calcolare un valore soglia utile a discriminare la presenza/assenza di fibrosi.

2° STUDIO

Tra il 2007 e il 2010 ai soggetti afferiti alla Sezione di Clinica Medica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, e per i quali vi fosse diagnosi di sospetto di epatopatia cronica è stata costantemente proposta la biopsia epatica; i 6 casi per i quali è stato possibile effettuare questa procedura sono entrati a fare parte del nostro studio. Per ciascun paziente, è stato inoltre effettuato un prelievo di sangue, contestualmente all'effettuazione della biopsia epatica che ci permettesse, sia di valutare correttamente la situazione clinica del soggetto tramite esame emocromocitometrico e biochimico completo, sia di stoccare campioni di siero (-20°C previa centrifugazione e separazione) per poterne valutare la concentrazione di HA.

Gli ecografi utilizzati per l'esame ecografico dell'addome sono stati un ESAOTE MEGAS CVX ed un ESAOTE MyLab 70, dotati di sonda convex multifrequenza da 3.5-5 MHz, sonda microconvex multifrequenza da 5-7,5 MHz e sonda lineare multifrequenza da 7,5-10 MHz. I pazienti sono stati sottoposti ad anestesia generale ottenuta con un'iniezione endovenosa di Propofolo in bolo per l'induzione mentre il mantenimento è stato garantito mediante anestesia gassosa con Isoflurano e ossigeno con paziente intubato. La biopsia epatica eco-guidata è stata effettuata tramite tecnica a mano libera. L'esame è stato eseguito sfruttando le proiezioni standard descritte in letteratura. I cani sono stati quindi posti in decubito laterale destro e preparati con disinfezione e tricotomia dell'area attorno al punto di inserimento dell'ago, scelto in base alla migliore visualizzazione ecografica ottenuta. La sonda è stata inoltre posizionata in modo da poter ben visualizzare il tragitto dell'ago, Tru-Cut da 16 Gauges, verso l'organo, così da non arrecare danno alle strutture vascolari di grosso calibro o alla colecisti.

I campioni biotici ottenuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed esaminati istologicamente presso la Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare del Dipartimento di Patologia Animale e Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria secondo le stesse tecniche e gli stessi criteri di analisi descritti per lo studio precedente. Anche in questo caso abbiamo quindi ottenuto una valutazione dei vari gradi di fibrosi da 0 a 4.

I 12 controlli utilizzati in questo studio sono stati gli stessi precedentemente selezionati per lo studio di valutazione di AST/ALT ratio e APRI index e anche per questi soggetti è stato stoccato del siero per la successiva valutazione della concentrazione di HA. La concentrazione di HA nel siero, sia dei pazienti epatopatici che dei casi controllo, è stata determinata utilizzando un kit

competitivo Elisa (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Il kit utilizzato è lo stesso impiegato nello studio sulla mucinosi cutanea dello Shar-pei⁵². Sono state effettuate per tutti i campioni, in un'unica giornata, due letture. Ciascuna lettura ha inoltre fornito due valori assoluti della concentrazione di HA: il primo serve al tecnico che sta eseguendo il test per verificare l'attendibilità dei risultati forniti dalla macchina in base a valori di riferimento indicati nelle istruzioni; il secondo è stato ottenuto dopo l'aggiunta ai campioni della stop solution che interrompe la reazione chimica innescata dal reagente. Dati i due valori abbiamo ritenuto opportuno nella seconda lettura considerarne la media dato che la maggiore o minore velocità con cui è stata aggiunta la stop solution poteva aver influenzato il risultato.

Per la valutazione statistica dei risultati, realizzata attraverso il software MED CALC versione 11.5.1 per Windows, anche in questo studio i dati sulla fibrosi sono stati inizialmente considerati come dicotomici. La variabile concentrazione sierica dell'HA è stata poi analizzata con la tecnica ROC (receiver operating characteristic curve) per stabilire se il metodo fosse valido, e per calcolare una soglia discriminante le condizioni di assenza o presenza di fibrosi.

4 RISULTATI

4.1 1° STUDIO

I risultati ottenuti per AST/ALT ratio e APRI index sono mostrati in TABELLA 9 per i controlli e in TABELLA 10 per casi patologici.

TABELLA 9: AST/ ALT ratio e APRI index controlli

Controlli	AST U/l (<40)	ALT U/l (<60)	PLT 10 ⁹ /l	AST/ALT	APRI
Controllo 1	20	38	302	0.5263	0.1655
Controllo 2	14	47	330	0.2978	0.106
Controllo 3	20	48	298	0.4166	0.1677
Controllo 4	25	53	185	0.4716	0.3378
Controllo 5	24	60	261	0.4	0.2298
Controllo 6	42	71	254	0.5915	0.4133
Controllo 7	31	72	558	0.4305	0.1388
Controllo 8	25	40	256	0.625	0.2441
Controllo 9	30	56	105	0.5357	0.7142
Controllo 10	31	55	101	0.5636	0.7673
Controllo 11	16	26	103	0.6153	0.3883
Controllo 12	24	46	199	0.5217	0.3015

TABELLA 10: AST/ ALT ratio e APRI index casi patologici

Caso N°	AST	ALT	PIASTRINE	AST/ALT	APRI con ULN=40
Caso 1	28	85	373	0.33	0.18817
Caso 2	38	161	456	0.24	0.20833
Caso 3	90	330	201	0.28	1.1194
Caso 4	53	331	240	0.16	0.55208
Caso 5	78	99	232	0.79	0.84051
Caso 6	46	63	191	0.73	0.60209
Caso 7	24	113	398	0.21	0.15075
Caso 8	628	906	409	0.7	3.83863
Caso 9	87	475	190	0.18	1.14473
Caso 10	41	140	135	0.3	0.75925
Caso 11	71	402	332	0.18	1.14473
Caso 12	171	704	892	0.24	0.47926
Caso 13	28	65	322	0.37	0.21739
Caso 14	43	178	549	0.24	0.19581
Caso 15	22	148	467	0.15	0.11777
Caso 16	45	275	389	0.16	0.2892
Caso 17	42	92	342	0.46	0.30701
Caso 18	84	900	582	0.09	0.36082
Caso 19	66	332	299	0.2	0.55183
Caso 20	39	562	181	0.07	0.53867

Dei 20 campioni biotipici da noi analizzati, dopo aver effettuato le nuove colorazioni, è emerso che solo 1 caso mostra avere uno stadio 0, quindi assenza di fibrosi; 5 soggetti presentano uno stadio 1, compatibile con fibrosi lieve; 12 presentano uno stadio 2, compatibile con fibrosi moderata e solo 2 campioni presentano uno stadio 3 ovvero fibrosi grave. Nessun caso ha mostrato uno stadio 4 indicativo di lesione gravissima. (Tabella 11)

TABELLA 11

CASO N°	AST	ALT	PIASTRINE	AST/ALT	APRI con ULN=40	FLOGOSI GRADO	DEGENERAZIONE	FIBROSI STADIO
Caso 1	28	85	372	0,33	0.18817	0	1	1
Caso 2	38	161	456	0.24	0.20833	1	2	1
Caso 3	90	330	201	0.28	1.1194	1	2	3
Caso 4	53	331	240	0,16	0.55208	1	1	0
Caso 5	78	99	232	0.79	0.84051	0	2	1
Caso 6	46	63	191	0.73	0.60209	1	1	2
Caso 7	24	113	398	0.21	0.15075	1	2	2
Caso 8	628	906	409	0.7	3.83863	1	3	1
Caso 9	87	475	190	0.18	1.14473	0	1	2
Caso 10	41	140	135	0.3	0.75925	0	1	2
Caso 11	71	402	332	0.18	0.53463	3	3	3
Caso 12	171	704	892	0.24	0.47926	0	2	2
Caso 13	28	65	322	0.37	0.21739	0	2	2
Caso 14	43	178	549	0.24	0.19581	0	2	2
Caso 15	22	148	467	0.15	0.11777	0	2	2
Caso 16	45	275	389	0.16	0.2892	0	2	1
Caso 17	42	92	342	0.46	0.30701	1	2	2
Caso 18	84	900	582	0.09	0.36082	0	3	2
Caso 19	66	332	299	0.2	0.55183	1	2	2
Caso 20	39	562	181	0.07	0.53867	2	2	2

Per quanto riguarda la valutazione della correlazione tra valori assoluti di ALT e AST e grado di fibrosi, questa non ha dato risultati statisticamente significativi (ALT-fibrosi $P=0,411$; AST-fibrosi $P=0,426$)

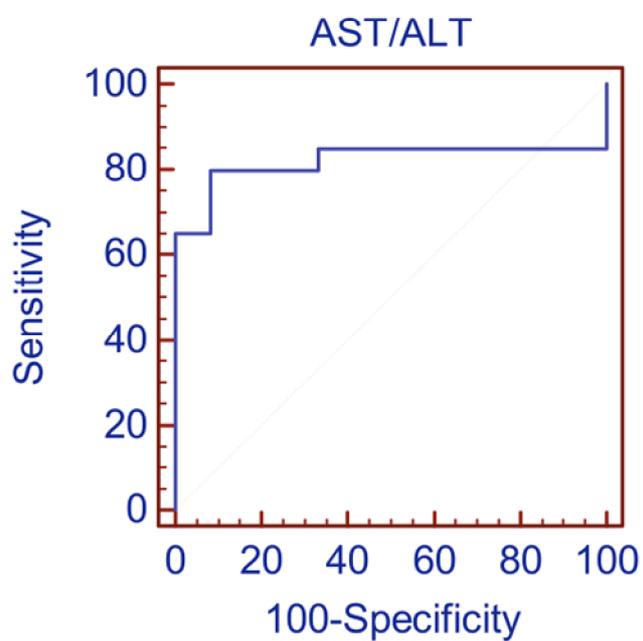
I risultati che abbiamo ottenuto tramite le ulteriori analisi statistiche sono sia grafici che tabulari.

In particolare il grafico ROC, realizzato sia per AST/ALT ratio che per APRI index, mette in relazione con una spezzata i valori di sensibilità e specificità del test, ad ogni valore soglia; tale test quindi lega la probabilità di ottenere un vero positivo nel gruppo dei malati veri (sensibilità) alla probabilità di ottenere un risultato falso positivo nel gruppo dei non malati (ossia 1 -specificità). Quindi per ogni valore soglia corrispondono in ordinata la proporzione di veri positivi e in ascissa la proporzione di falsi positivi. Viene poi calcolata direttamente da un software la soglia che ottimizza sensibilità e specificità.

La capacità discriminante di tale indice nel separare soggetti con assenza/presenza di fibrosi, è proporzionale all'area sottesa sotto la curva, ovvero l'AUC (Area Under Curve). Più la curva si avvicina all'angolo superiore sinistro, più il valore di AUC si avvicina a 1 e più il test sarà discriminante.

Per l' AST/ALT ratio abbiamo ottenuto la seguente curva ROC nella quale si osserva come la spezzata unisca tutti i punti sensibilità/specificità ad ogni soglia. L'AUC per AST/ALT è pari a $82,1\%$ e molto significativa ($P=0,0001$). Pertanto l'AST/ALT ratio rappresenta un valido metodo per discriminare assenza/presenza di fibrosi.

Grafico 1: curva ROC di AST/ALT ratio



Letto su una tabella il grafico viene così rappresentato:

TABELLA 12

Area sottesa dalla curva (AUC)	82,1
Errore Standard ^a	827
Intervallo di confidenza del 95% ^b	0.645 to 0.933
z statistico	3881
Livello di significatività P (Area=0.5)	1

Nella tabella di seguito vengono rappresentate la sensibilità e specificità di tale indice per ciascun valore soglia:

TABELLA 13

Valore soglia	Sensibilità	Specificità
< 0.07	0	100,00
<=0.28	65,00	100,00
<=0.298	65,00	91,67
<=0.37 *	80,00	91,67
<=0.4306	80,00	66,67
<=0.46	85,00	66,67
<=0.625	85,00	0
<=0.79	100,00	0

APRI index

La stessa analisi è stata eseguita per quanto riguarda sensibilità e specificità per diversi valori soglia di APRI index. Abbiamo così ottenuto anche per tale indice una rappresentazione grafica di ROC e ottenuto l'area sottesa dalla curva (AUC) che è risultata pari a 66,2 %, quindi piuttosto ridotta e non significativa.

Grafico 2: curva ROC di APRI index

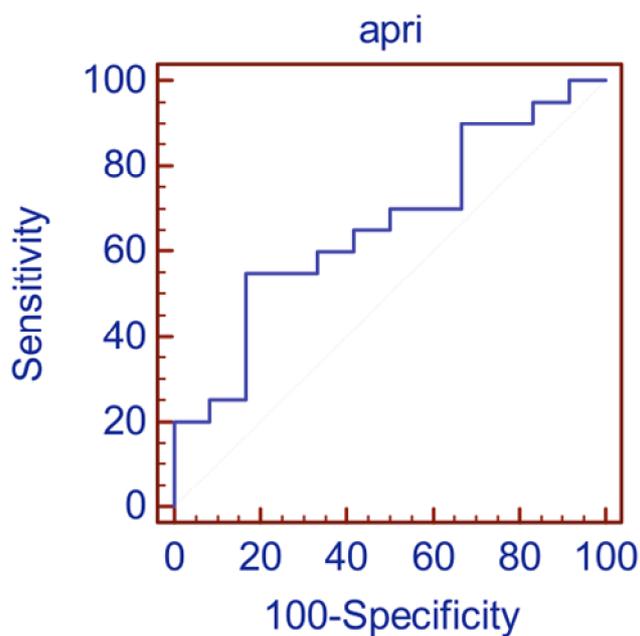


TABELLA 14

Area sottesa dalla curva (AUC)	66,2
Errore standard ^a	100
Intervallo di confidenza del 95% ^b	0.474 to 0.819
z statistico	1618
Livello di significatività P (Area=0.5)	1,056

4.2 2° STUDIO

I risultati ottenuti dagli esami ematologici ed ematochimici dei cani patologici e dei casi controllo sono rappresentati qui di seguito in Tabella 15 e 16.

TABELLA 15: Esami di laboratorio dei cani patologici.

	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC(10 ⁹ /uL)	WBC(/uL)	PLT(10 ⁹ /uL)	AST (U/l)	ALT (U/l)
Valore di riferimento	(37,1-57,0)	(12,9-18,4)	(5.700-8.800)	(5.200-13.900)	(143,3-400)	(<40)	(<60)
Caso 1	38	14,2	6.670	6.730	389	45	275
Caso 2	38	13,8	6.300	4.960	467	22	148
Caso 3	44,2	16,17	7.300	4.790	181	39	562
Caso 4	57,4	19,8	8.030	10.600	299	66	332
Caso 5	31,2	11,2	4.620	7.290	582	84	900
Caso 6	31,1	13	4.850	4.480	346	42	92

TABELLA 16: Esami di laboratorio dei casi controllo.

	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC(10 ⁹ /uL)	WBC(/uL)	PLT(10 ⁹ /uL)	AST (U/l)	ALT (U/l)
Valore di riferimento	(37,1-57,0)	(12,9-18,4)	(5.700-8.800)	(5.200-13.900)	(143,3-400)	(<40)	(<60)
Controllo 1	49,9	19,6	7.790	10.880	254	42	71
Controllo 2	40,1	14,6	6.150	20.670	558	31	72
Controllo 3	42,4	15,2	6.250	6.680	105	30	56
Controllo 4	48,6	18,7	7.350	10.790	101	31	55
Controllo 5	41,2	14,7	6.370	7.200	103	16	26
Controllo 6	39,3	13,5	5.690	9.100	330	14	47
Controllo 7	43,4	15,4	7.680	6.590	199	24	46
Controllo 8	45,9	16,5	6.790	15.730	256	25	40
Controllo 9	47,9	16,7	7.160	13.300	261	24	60
Controllo 10	50,7	17,8	7.160	7.100	185	25	53
Controllo 11	35,2	13,1	5.340	10.470	302	20	38
Controllo 12	41,7	14,4	6.590	10.400	298	20	48

Le colorazioni istologiche sui 6 campioni bioptici hanno permesso di stabilire lo stadio di flogosi, degenerazione e fibrosi che sono rappresentati in Tabella 17:

TABELLA 17

	Flogosi Stadio	Degenerazione	Fibrosi Stadi
CASO 1	0	2	1
CASO 2	0	2	2
CASO 3	2	2	2
CASO 4	1	2	2
CASO 5	0	3	2
CASO 6	1	2	3

In particolare la colorazione con la reticolina è stata necessaria per identificare la fibrosi al meglio. In diversi casi ha permesso di identificare il collasso della reticolina, segno della perdita epatocitaria, che altrimenti non sarebbe stato possibile con il solo utilizzo di Ematossilina e Eosina. Tale collasso è stato evidenziato soprattutto in vicinanza degli spazi portali, ma spesso anche in corrispondenza della compagine del lobulo epatico.

Sono di seguito rappresentati, sia graficamente che in tabella (Tabella 18 e 19), i valori delle letture ottenute con il test Elisa.

Grafico 3: Prima lettura [HA]

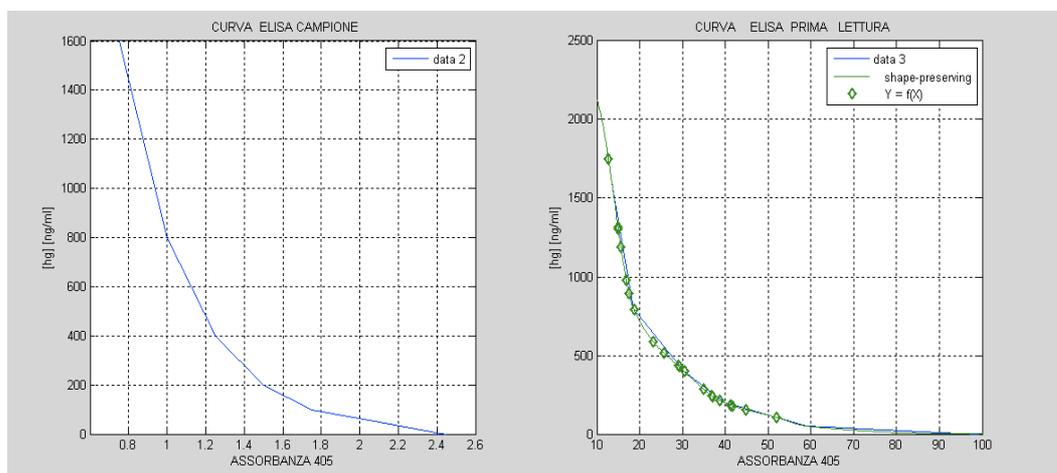


Grafico 4: Seconda lettura [HA]

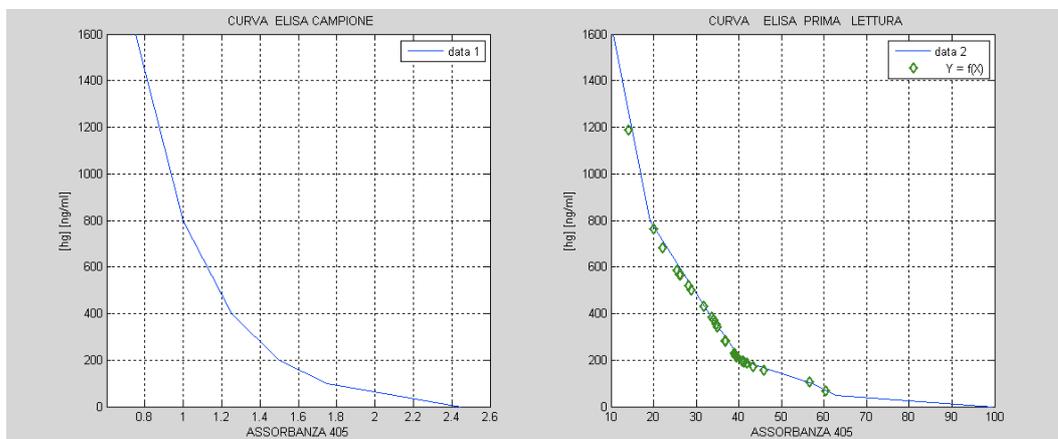


TABELLA 18: Valori assoluti e in percentuale della concentrazione di HA – prima lettura

Tabella prima lettura [HA]		
	1° valore % [HA]	1° valore assoluto (µg/L)
Caso 1	25,64	515,00
Caso 2	41,17	184,42
Caso 3	30,41	397,92
Caso 4	36,83	244,95
Caso 5	44,82	154,18
Caso 6	51,89	107,53
Controllo 1	17,49	895,15
Controllo 2	14,99	1301,80
Controllo 3	29,16	429,29
Controllo 4	18,71	789,53
Controllo 5	14,91	1317,25
Controllo 6	12,68	1750,97
Controllo 7	34,91	285,52
Controllo 8	15,6	1187,13
Controllo 9	23,09	590,33
Controllo 10	16,86	978,39
Controllo 11	37,06	240,58
Controllo 12	28,94	434,61

Media Controlli [HA]	850,05
-----------------------------	---------------

Media Patologici [HA]	267,33
------------------------------	---------------

TABELLA 19: Valori assoluti e in percentuale della concentrazione di HA – seconda lettura

Tabella seconda lettura [HA]					
	1° valore % [HA]	2° valore % [HA]	1° valore assoluto (µg/L)	2° valore assoluto (µg/L)	media valori assoluti (µg/L)
Caso 1	28,16	31,8	518,97	432,16	475,565
Caso 2	33,57	56,5	384,07	104,68	244,375
Caso 3	39,13	41,25	221,73	192,36	207,045
Caso 4	36,78	39,4	283,39	216,41	249,900
Caso 5	40,86	34,87	196,24	343,86	270,050
Caso 6	41,87	60,33	186,56	66,80	126,680
Controllo 1	28,92		501,31		501,310
Controllo 2	14,2		1186,89		1,186,890
Controllo 3	36,89	38,83	280,05	228,16	254,105
Controllo 4	19,97		764,79		764,790
Controllo 5	25,36		587,17		587,170
Controllo 6	22,17		681,48		681,480
Controllo 7	39,44	34,62	215,66	351,80	283,730
Controllo 8	26,23		565,08		565,080
Controllo 9	25,38		586,65		586,650
Controllo 10	26,14		567,32		567,320
Controllo 11	43,43	45,82	173,79	158,34	166,065
Controllo 12	33,98	41,00	371,74	194,83	283,285

Media Controlli [HA]	463,44
----------------------	--------

Media Patologici [HA]	262,27
-----------------------	--------

TABELLA 20: Analisi della Varianza per misure ripetute.

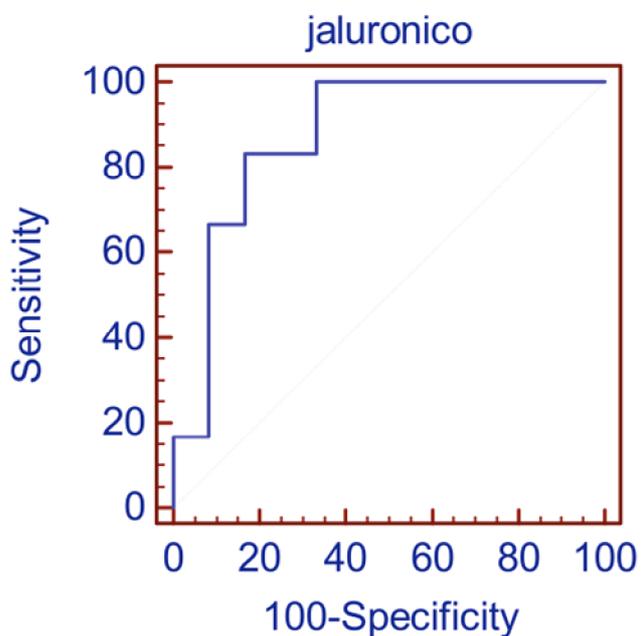
Questa analisi è stata effettuata per verificare la ripetibilità del test Elisa utilizzato per misurare la concentrazione di HA.

	Valore assoluto [HA] prima lettura ($\mu\text{g/L}$)	Valore assoluto [HA] seconda lettura ($\mu\text{g/L}$)
Caso 1	515,00	518,97
Caso 2	184,42	384,07
Caso 3	397,92	221,73
Caso 4	244,95	283,39
Caso 5	154,18	196,24
Caso 6	107,53	186,56
Controllo 1	895,15	501,31
Controllo 2	1301,80	1186,89
Controllo 3	429,29	280,05
Controllo 4	789,53	764,79
Controllo 5	1317,25	587,17
Controllo 6	1750,97	681,48
Controllo 7	285,52	215,66
Controllo 8	1187,13	565,08
Controllo 9	590,33	586,65
Controllo 10	978,39	567,32
Controllo 11	240,58	173,79
Controllo 12	434,61	371,74

Abbiamo ottenuto un $P=0,021$, pertanto non c'è differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.

Grafico 5: Curva ROC per acido ialuronico

I risultati ottenuti sono stati rappresentati graficamente in una curva ROC e in tabella. In particolare, il grafico ROC mette in relazione con una spezzata tutte le coppie sensibilità-specificità del test ad ogni soglia di valori, rappresentate da ciascun valore della variabile. Il software calcola automaticamente la soglia che ottimizza sensibilità e specificità.



5 DISCUSSIONE

Data la diversità dei due studi proposti nel nostro lavoro riteniamo opportuno mantenere distinta anche la discussione dei dati ottenuti; inizieremo con l'analisi dei dati riguardanti AST/alt ratio e APR index per poi proseguire nella valutazione dei dati ottenuti dall'analisi delle concentrazioni sieriche di HA.

5.1 AST/ALT ratio e APRI Index

Dalla letteratura, in campo medico veterinario, abbiamo solo indicazioni relative alle variazioni di enzimi come ALT e AST, in corso di epatiti croniche, fibrosi e cirrosi. L'ALT, enzima più specifico dell'AST⁽¹³⁾ nell'indicare un danno epatocellulare, presenta valori persistentemente elevati in corso di epatopatia cronica, sebbene più ridotti rispetto a patologie epatiche acute.⁽¹⁸⁾ L'aumentata produzione di ALT, da parte degli epatociti in corso di rigenerazione, può spiegare il costante aumento di attività enzimatica dopo il danno iniziale.⁽⁷⁾ Viene inoltre indicato, in letteratura, come tali valori tendano invece a diminuire nelle fasi terminali di patologie croniche. Infatti la massa epatica è ridotta al punto tale da non produrre più enzimi, cosicché l'ALT può addirittura risultare all'interno dei range di riferimento.^(7, 13)

I valori di ALT dei nostri casi patologici appaiono in accordo con la letteratura; infatti mentre nei controlli essi appaiono, con l'eccezione di soli due soggetti, all'interno dei range di riferimento (ALT < 60U/L), i nostri casi patologici sono risultati possedere valori di ALT elevati.

E' plausibile pensare che tali casi abbiano valori elevati di ALT in quanto presentano tutti diversi casi di fibrosi, ma nessuno di essi presenta già uno stadio terminale cirrotico, nella quale essi dovrebbero invece diminuire.

Rimane però da sottolineare, in accordo con la letteratura, che non è possibile osservare una relazione diretta tra stadio di fibrosi e livelli sierici di ALT come visto nella precedente analisi dei risultati statistici. Nei nostri soggetti patologici emerge infatti come due valori più elevati di ALT (>900U/L) si associno a diversi stadi di fibrosi, ovvero in un caso a uno stadio 1 e nell'altro a uno stadio 2. Inoltre negli stadi di fibrosi grave (stadio 3), i valori di ALT sono compresi tra 330-402 U/L, quindi, valori più bassi rispetto ai soggetti con stadi lievi e moderati. L'unico caso patologico che mostra uno stadio 0 di fibrosi, presenta valori di ALT equiparabili a quelli ottenuti in uno stadio 3.

In letteratura, viene indicato come le concentrazioni sieriche di AST in corso di epatiti croniche, a differenza di ALT, possano presentare aumenti relativamente ridotti.

Analizzando i risultati ottenuti vediamo che i controlli presentano valori tutti all'interno dei range di riferimento ($AST < 40$ U/L) con un unico soggetto borderline; nei casi patologici, in 6 soggetti, si riscontrano valori di AST nella norma e di questi, 2 presentano stadio 1 di fibrosi mentre 4 presentano stadio 2; negli altri 14 casi, i valori di AST appaiono lievemente aumentati, con l'eccezione di un unico soggetto che mostra 628 UI/L, associato tuttavia a uno stadio 1 di fibrosi. L'unico soggetto con stadio 0 presenta non solo valori di ALT elevati, ma anche l'AST appare oltre al limite superiore. Non si può dunque valutare alcuna relazione diretta tra le singole concentrazioni di AST e i diversi stadi di fibrosi così come già riscontrato all'analisi della letteratura e confermato dalla nostra prima valutazione statistica⁽¹⁶⁾

Dopo aver analizzato tali parametri singolarmente, abbiamo correlato AST e ALT in un rapporto definito AST/ALT ratio. Fino ad oggi non sono stati ancora proposti lavori relativi a tale marker indiretto in medicina veterinaria; partendo da tale considerazione abbiamo valutato i vari studi effettuati nel campo della medicina umana, dove viene confermata l'utilità di tale parametro per valutare soggetti con stadio grave di fibrosi e cirrosi. Riassumiamo qui brevemente gli studi analizzati di maggior interesse: nello studio proposto da Park *et al.*⁽⁴⁷⁾ viene sottolineato come, mentre i singoli valori di AST e ALT in pazienti con epatite C non siano correlabili con il reperto istologico in funzione della gravità della malattia, il rapporto tra i due enzimi possa essere rappresentativo di tali alterazioni epatiche; tuttavia nello studio proposto da Giannini *et al.*⁽⁴⁹⁾ e in quello di Sheth *et al.*⁽⁵¹⁾ gli autori sono partiti da un presupposto comune: l'elevata concentrazione sierica dell'AST risulta essere secondaria sia al danno mitocondriale, con rilascio dell'enzima in circolo, sia ad una diminuita clearance dell'AST, dovuta alla compromissione della funzionalità delle cellule dei sinusoidi da parte della progressione della fibrosi e cirrosi. In tali lavori, così come in quello proposto da Pohl *et al.*⁽⁵²⁾ i soggetti, divisi in funzione dello stadio di fibrosi, presentavano un AST/ALT ratio < 1 , associato ad assenza di fibrosi, stadio lieve o moderato (stadio 0-2) e un AST/ALT ratio ≥ 1 quelli con stadio grave di fibrosi o cirrosi (stadio 3-4).

Nel nostro studio i risultati sono concordi con la letteratura umana nell'osservare che i soggetti con stadio lieve presentano rapporti < 1 ; tuttavia nei due casi con stadio 3 il rapporto rimane tale.

Dal nostro studio appare però evidente come i valori di AST/ALT ratio nei controlli, appaiano più elevati dei casi patologici.

Questi ultimi, presentano un valore che va da 0 a 0,4; viceversa nei controlli, con l'eccezione di un caso che presenta un rapporto uguale a 0,29, gli altri hanno tutti valori compresi tra 0,4 e 0,62. Il fatto che i controlli abbiano valori di AST/ALT ratio più elevati rispetto a quelli dei casi, potrebbe dipendere dal fatto che in questi ultimi l'aumento dell'ALT è molto più elevato rispetto a quello dell'AST, a differenza di quello che accade nell'uomo.

Sebbene non sia osservabile un marcato aumento del rapporto, nei casi patologici, a differenza di quanto riportato in letteratura umana, attraverso l'analisi statistica da noi condotta, è stato possibile comunque arrivare a definire una relazione statisticamente significativa tra AST/ALT ratio e assenza/presenza di fibrosi.

Dato l'insufficiente numero di casi non è stato possibile correlare l'AST/ALT ratio con i diversi stadi di fibrosi; tuttavia abbiamo potuto ottenere un cut-off per AST/ALT, che ci permette di analizzare la fibrosi con un approccio di tipo quantitativo, ovvero assenza/presenza.

In TABELLA 13 sono stati valutati i diversi valori soglia associati a differenti sensibilità e specificità da 0 a 100%

Il valore soglia per la fibrosi è un AST/ALT ratio di 0,37 che rappresenta il miglior compromesso tra sensibilità e specificità.

Con un cut-off di 0,37, il test mostra infatti una sensibilità dell'80%, che rappresenta la capacità del test di identificare soggetti malati e, una specificità del 91,67%, che rappresenta invece la sua capacità di escludere i soggetti sani.

Pertanto un paziente con un valore di AST/ALT ratio $> 0,37$ avrà fibrosi con una probabilità dell'80%, mentre per un solo 8% sarà falso positivo.

Data l'assenza di studi a riguardo di tale marker in medicina veterinaria ed essendo questo ancora uno studio preliminare, non è stato ancora possibile valutare un'eventuale correlazione tra diversi valori di AST/ALT e i diversi stadi di fibrosi come è stato effettuato in medicina umana, dove tale indice attualmente consente di differenziare soggetti con assenza, stadio lieve e moderato di fibrosi da quelli con stadio grave.

Per quanto concerne la *conta piastrinica*, la letteratura in medicina veterinaria fornisce, come già visto, alcune indicazioni. Villiers e Blackwood⁽¹³⁾ suggeriscono solo una modica riduzione del numero di piastrine nelle malattie epatiche gravi ma Meyer e Harvey⁽¹⁷⁾ sottolineano una evidente differenza tra l'uomo e il cane. Nell'uomo la milza immagazzina circa il 30% della massa piastrinica totale mentre nel cane la contrazione splenica seguente ad una stimolazione α -adrenergica non provoca trombocitosi.

In medicina umana, vengono invece fornite più indicazioni riguardo a tale aspetto da parte di diversi autori, come riassumiamo qui di seguito.

Pohl *et al.*⁽⁵²⁾ nel 2001, sottolineano l'utilità di correlare la diminuzione della conta piastrinica con AST/ALT ratio, per diagnosticare casi avanzati di fibrosi. Sono seguiti altri lavori, come quello realizzato nel 2003 da Wai *et al.*,⁽⁴⁴⁾ che stabilisce un nuovo marker di fibrosi ovvero l'APRI index, basandosi appunto sul confronto tra AST e conta piastrinica. Viene messa in evidenza la notevole diminuzione delle piastrine, secondaria al loro sequestro e distruzione a livello splenico; ciò sembra dipendere dal peggioramento progressivo del grado di fibrosi e dell'ipertensione portale. Inoltre, nello studio proposto da Grigorescu,⁽⁶⁾ la trombocitopenia viene considerata un vero e proprio marker indiretto relativamente allo stadio di fibrosi. Egli prende spunto dal lavoro realizzato da Peck-Radosavljevic *et al.*,⁽⁴³⁾ dove si parte dalla considerazione che in associazione a patologie epatiche si possa evidenziare citopenia e che essa in passato sia stata attribuita esclusivamente a un sequestro di cellule a livello splenico (ipersplenismo). Gli autori correlano la presenza di trombocitopenia anche ad altri meccanismi tra i quali vengono considerati la mielosoppressione indotta da HCV, la diminuzione nella produzione di trombopoietina e patologie autoimmuni.

Nel cane, come segnalato da Meyer e Harvey⁽¹⁷⁾ si può verificare una trombocitopenia in seguito splenomegalia per sequestro delle piastrine circolanti (anche nel cane tale condizione viene definita come ipersplenismo), tuttavia come citato inizialmente, a differenza dell'uomo, dove tale sequestro raggiunge valori ragguardevoli fino ad un 30 %, nel cane esso appare molto più limitato e raro. Questo potrebbe appunto spiegare la discrepanza tra i nostri risultati e quelli indicati in letteratura umana. Nel nostro studio infatti non è stata riscontrata trombocitopenia.

Avendo tuttavia ottenuto un'elevata variabilità nei valori piastrinici, siamo stati indotti comunque a ricercare una relazione tra questo marker e la gravità della patologia.

Questa relazione è stata da noi analizzata tramite l'APRI index.

Sappiamo che tale indice, fino ad oggi, è stato studiato, così come AST/ALT ratio, solo in medicina umana; esso, come ampiamente dimostrato nei vari studi realizzati correla la gravità della fibrosi con l'incremento dei valori sierici dell'AST e la diminuzione della conta piastrinica. In medicina umana sono stati ottenuti 2 valori di cut-off per confermare l'assenza ($APRI \leq 1$) e presenza di cirrosi ($APRI > 2$). Come già visto per l'AST/ALT ratio, alla base dell'aumento di tali rapporti risiede un aumento dell'AST per le cause già citate.

Analizzando i risultati da noi ottenuti vediamo come nel nostro studio si siano evidenziati in tutti i controlli valori di APRI index $< 0,76$; i casi mostrano invece valori estremamente eterogenei di APRI index: a 10 con APRI $< 0,5$ si sono associati 3 casi di fibrosi 1 e 7 casi di fibrosi 2; agli altri 10 casi, con APRI variabile da 0,5 a 3,8 si sono associati stadi di fibrosi da 0 a 3, di cui l'unico caso con stadio 0 presentava un APRI = 0,5 mentre i 2 casi con stadio 3 presentavano rispettivamente uno APRI = 1,1 e l'altro APRI = 0,5.

Attraverso l'analisi statistica, anche per l' APRI index si è ricercato un valore soglia che potesse essere discriminante per definire soggetti con assenza/presenza di fibrosi.

Come è possibile osservare in TABELLA 14 il livello di significatività per l'APRI index risulta pari a $p=1,056$ e pertanto non può essere considerato un metodo utile per discriminare pazienti con assenza/presenza di fibrosi.

I limiti di tale rapporto, potrebbero essere individuati nella differente entità nel sequestro splenico delle piastrine tra le due specie (cane-uomo) e nel minor incremento dei valori sierici di AST nel cane. Questo tuttavia si può attribuire al fatto che nell'uomo tali aumenti siano secondari solo a gradi avanzati di fibrosi e a cirrosi. Nel nostro studio invece l'AST è stata valutata in casi patologici che nel complesso presentavano stadi lievi e moderati di fibrosi, pertanto essa mostrava dei valori al limite del range di normalità.

5.2 ACIDO IALURONICO

Riguardo la correlazione tra fibrosi e HA, per la realizzazione del nostro studio abbiamo preso in considerazione 12 cani sani (controlli) e 6 epatopatici (casi). Il numero ridotto di casi raccolti, nell'arco dei tre anni di esecuzione dello studio, è in larga parte attribuibile alla ridotta propensione da parte dei proprietari di cani con persistente rialzo degli enzimi epatici, ma solitamente poco o nulla sintomatici, a sottoporre il proprio animale a procedure invasive come la biopsia epatica, procedura che può risultare inoltre di difficile o impossibile esecuzione nei soggetti in cui l'epatopatia abbia dato una chiara manifestazione clinica (cirrosi, ascite). Non è stato inoltre possibile, per questioni etiche, avere una valutazione istologica dello stato del parenchima epatico dei casi controllo, che avrebbe necessitato l'effettuazione di una biopsia in anche questi casi, dovendoci così basare esclusivamente sullo stato clinico dei soggetti e sui risultati dei controlli biochimici per stabilire l'assenza di patologie epatiche sottostanti e quindi di fibrosi.

Per quanto riguarda la valutazione della concentrazione sierica dell'acido ialuronico esistono in commercio diversi Kit Elisa; quello da noi utilizzato è lo stesso impiegato nello studio della mucinosi cutanea dello Shar-pei (Echelon

Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA) ma diverso da quello utilizzato negli studi di Kanemoto⁽²⁵⁾ e K.Nganvongpanit.⁽⁷⁵⁾ Abbiamo scelto di utilizzare il kit Echelon poiché era quello disponibile in commercio sul mercato Europeo. Questo kit Elisa presenta alcuni limiti d'impiego che vale la pena considerare: la raccolta dei campioni sierici che devono essere sottoposti a lettura è particolarmente indaginoso poiché il siero, ottenuto per centrifugazione dal campione ematico, deve essere subito dopo stoccato a temperatura di congelamento di -20° C e in quantità adeguata; il reagente utilizzato nel kit inoltre è fotosensibile, il che implica una manipolazione attenta da parte di personale tecnico esperto.

Nel nostro studio, poiché sono state effettuate due letture, abbiamo ritenuto opportuno valutare la ripetibilità del test attraverso un'analisi statistica della varianza per misure ripetute. L'analisi è stata effettuata, come già visto, tra due gruppi: il primo rappresentato dai valori assoluti della concentrazione di HA ottenuti nella prima lettura e il secondo rappresentato dai valori assoluti della concentrazione di HA ottenuti dalla seconda lettura. Entrambi i gruppi erano costituiti dai 6 campioni patologici più i 12 controlli per un totale di 18 elementi. I risultati non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($P=0,021$) pertanto i valori ottenuti nelle due letture possono essere considerati sovrapponibili e quindi attendibili.

In medicina veterinaria gli studi sull'acido ialuronico disponibili in letteratura sappiamo essere solamente quattro, così come riportato nella sintesi bibliografica: lo studio spagnolo sulla mucinosi del cane Shar-pei⁽⁷³⁾ un secondo studio⁽⁷⁴⁾ che ha valutato la concentrazione sierica e nel liquido sinoviale di cheratosolfato (KS) e HA in cani con osteoartrite articolare conseguente a rottura del legamento crociato craniale, un terzo studio⁽⁷⁵⁾ thailandese in cui è stata comparato la concentrazione sierica di HA e condroitinsolfato (CS), in due gruppi di cani, quelli affetti da displasia dell'anca e quelli esenti. Infine l'ultimo studio, l'unico inerente al nostro lavoro, è quello di Kanemoto del 2009 dove è stato valutato HA come marker non invasivo di fibrosi epatica.

Dato il ridotto numero di studi in medicina veterinaria riguardanti l'acido ialuronico, non esiste un valore di concentrazione sierica di HA che possa essere considerato normale nel cane sano, dovremo quindi considerare i nostri risultati in comparazione con quelli ottenuti negli studi precedenti e considerando anche il tipo di kit elisa utilizzato per poterne valutare meglio l'attendibilità.

I risultati ottenuti nel nostro studio evidenziano che nei cani sani i valori della concentrazione sierica di acido ialuronico oscillano ampiamente, con una media pari a 535,656 μ /L. Considerato il numero limitato di casi controllo considerati, riteniamo più significativo indicare come range di normalità nel nostro campione il minimo e il massimo dei valori ottenuti (166,065 μ g/L e 1.186,890 μ g/L),

piuttosto che il valore medio \pm 2 D.S. I casi controllo dello studio sulla mucinosi, nel quale è stato utilizzato lo stesso kit Elisa, presentano concentrazioni di HA che oscillano tra 155,53 $\mu\text{g/l}$ e 301,62 $\mu\text{g/L}$ con un valore medio di 234,81 $\mu\text{g/L}$.

Kanemoto⁽²⁵⁾ e K.Nganvongpanit⁽⁷⁵⁾ (studio thailandese) hanno invece utilizzato un kit ELISA diverso, prodotto in Giappone.

Nello studio di Kanemoto i valori della concentrazione di HA nei cani sani variano da 19 $\mu\text{g/L}$ a 232 $\mu\text{g/L}$ con una media pari a 125,5 $\mu\text{g/L}$. Nello studio thailandese invece essi variano da 147,61 $\mu\text{g/L}$ a 343,29 $\mu\text{g/L}$ con una media pari a 245,45 $\mu\text{g/L}$. In quest'ultimo studio quindi il valore medio è simile a quello ottenuto nello studio della mucinosi nonostante sia stato impiegato un kit differente ma doppio rispetto a quello ottenuto da Kanemoto che ha invece impiegato il medesimo test Elisa. L'ampia variabilità rilevata tra i risultati del nostro studio, quello di Kanemoto e quello thailandese può trovare una spiegazione nelle differenze di sesso e peso dei soggetti considerati: nel cane infatti non è ancora chiara la relazione tra questi parametri e i livelli sierici di HA mentre nell'uomo è stata esclusa la correlazione con il sesso ma non ancora quella con il peso dell'individuo⁵⁶. Inoltre bisogna considerare l'ampia variabilità di razze e di incroci della popolazione canina nella quale si possono riconoscere gruppi con alterazioni genetiche delle caratteristiche del collagene, ad esempio razze condrodistrofiche, che potrebbero influire sulla determinazione dei valori normali di HA.

A nostro parere mancano anche studi che verifichino la sovrapponibilità dei risultati dei due test Elisa riportati in letteratura, nello studio thailandese e in quello di Kanemoto, che comunque forniscono valori doppi l'uno rispetto all'altro.

Riteniamo quindi che, sarà importante negli studi futuri cercare di identificare dei valori standard di HA tenendo in considerazione le variabili sopra elencate.

I valori della concentrazione di HA ottenuti nel nostro studio per i cani patologici oscillano da 126,680 $\mu\text{g/L}$ a 475,565 $\mu\text{g/L}$ con una media pari a 262,27 $\mu\text{g/L}$. Essi sono più bassi di quelli ottenuti nei cani sani e dall'analisi statistica effettuata mediante curva di ROC sembrerebbe che l'acido ialuronico tenda a diminuire con il progredire della fibrosi.

L'acido ialuronico presente in circolo è prodotto in diversi distretti tissutali. Nel fegato HA è principalmente prodotto dalle cellule stellate epatiche (o cellule di Ito) e approssimativamente il 90 % viene rimosso dalle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici^{22,38,56}. In numerosi studi di umana è stato dimostrato un marcato aumento dell' HA sierico in malattie croniche del fegato come la fibrosi epatica e

la cirrosi. Questo si pensa possa dipendere da un'umentata produzione di HA in caso di fibrosi e da una riduzione della clearance dell'acido causata da cambiamenti morfologici delle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici^{44, 45, 46, 47}. La fibrosi anche nel cane, che può essere l'esito di epatopatie ha diversa eziopatogenesi e si caratterizza per alterazioni nel metabolismo della matrice con modificazioni quantitative, come aumentata produzione di HA e qualitative come la sintesi di collagene di tipo I, III,IV . Il risultato è la sostituzione di una matrice interstiziale a bassa densità con una ad alta densità che altera le funzioni metaboliche e di sintesi degli epatociti.

I nostri risultati sembrerebbero contraddire queste affermazioni validate da numerosi studi.

Tenderemmo a non attribuire questa interpretazione alla scelta del metodo statistico dato che è stato utilizzato con successo in altri due studi di umana. (32, 46)

Potrebbero invece dipendere da altri fattori:

- in primo luogo il numero ridotto di campioni patologici raccolti;
- in seconda istanza il fatto che tutti e 6 i campioni presentano stadi lievi (1 caso) e moderati di fibrosi (5 casi) mentre anche Kanemoto nel suo studio afferma che l'acido ialuronico ha concentrazioni maggiori nei cani con fibrosi grave o cirrosi rispetto a quelli con epatite cronica ma non ancora in stadio avanzato.

6 CONCLUSIONI

Lo scopo che ci eravamo prefissati era quello di identificare markers non invasivi di fibrosi epatica, alterazione che rappresenta la principale conseguenza delle epatopatie croniche nel cane. E' importante riuscire a diagnosticare preventivamente la fibrosi, essendo essa ancora reversibile, a differenza della cirrosi. Oggi la medicina veterinaria ha a disposizione alcuni mezzi utili ma poco specifici per la diagnosi come parametri ematologici, biochimici, l'ultrasonografia addominale e l'esame radiografico ma, l'esame di scelta per diagnosticare la fibrosi nel cane, rimane la biopsia epatica definita appunto il gold standard. La stadiazione istologica può indirizzare non solo sul grado di fibrosi, ma anche su alcuni agenti responsabili di patologia cronica tramite l'impiego di colorazioni specifiche. La biopsia rappresenta tuttavia una tecnica invasiva, caratterizzata da rischi, tra i quali abbiamo ricordato l'emorragia e l'anestesia oltre ai limiti legati alla soggettività di interpretazione dei campioni. Tali complicanze possono, a volte, far rifiutare ai proprietari un approccio diagnostico invasivo come la biopsia. Ciò non permette dunque di impostare un protocollo terapeutico appropriato, la cui efficacia inoltre dovrebbe essere rivalutata attraverso l'esecuzione di una nuova biopsia per poter monitorare anche il paziente nel tempo. Inoltre un primo studio realizzato da Kanemoto *et al*,¹ alla ricerca di markers di fibrosi non invasivi come l'acido ialuronico, ha aperto la strada alla scoperta di nuovi parametri altrettanto non invasivi. E' così che abbiamo deciso di analizzare markers quali AST/ALT ratio e APRI index, che in medicina umana vengono utilizzati a tale scopo e rivalutare la variazione dell'acido ialuronico sierico in corso di epatopatie.

La prima parte del nostro lavoro parte dunque dal presupposto che in entrambe le specie, l'emivita di ALT e AST sia simile; si considera una vita media di circa 12 ore per l'AST e di 2-2,5 giorni per l'ALT nel cane⁸ e 17 ore per l'AST e 2 giorni per l'ALT nell'uomo.⁴⁶ Inoltre le localizzazioni dei due enzimi nell'epatocita sono le medesime, così come la presenza delle isoforme enzimatiche nei diversi organi. Infatti l'ALT è localizzato esclusivamente all'interno del citoplasma, viceversa l'AST si riscontra a livello citoplasmatico (20%) mitocondriale (80%) sia nel cane che nell'uomo. Il rilascio di tali enzimi, in seguito ad un danno acuto o cronico è sovrapponibile tra entrambe le specie. L'ALT aumenta in caso di danno diffuso indipendentemente dalla gravità, a differenza dell'AST che aumenta in corso di grave danno cellulare con liberazione dell'enzima dal compartimento mitocondriale.

Nonostante tali similitudini, si può osservare una discrepanza tra alcuni dati da noi ottenuti e quelli riportati in medicina umana.

Si può forse presupporre che un ruolo importante venga anche svolto dalla differente eziologia tra l'epatopatie del cane e quelle dell'uomo; infatti nell'uomo l'eziologia è prevalentemente virale, mentre nel cane, tramite l'impiego della vaccinazione, l'incidenza dell'epatite infettiva canina da Adenovirus tipo 1 (CAV-1) è notevolmente diminuita. Analogamente le epatiti da alcool non sono riscontrabili in medicina veterinaria. Nel cane vengono invece segnalate prevalentemente l'epatite cronica idiopatica e l'epatite associata ad accumulo di rame.

Altri limiti potrebbero risiedere nel campionamento bioptico, dove il prelievo di pochi frammenti del parenchima epatico, potrebbe non essere rappresentativo dell'aspetto globale dell'organo. Rimane inoltre da definire, come è invece già stato effettuato nel campo umano, una scala di valutazione istologica per determinare con esattezza il grado di fibrosi, che sia riproducibile e uguale per tutti. A tale proposito possiamo ringraziare la Professoressa Grieco, della Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, per aver realizzato un primo approccio a tale problema, forse da perfezionare, ma sicuramente originale e che ci ha aiutato alla valutazione della nostra casistica. Questo può quindi essere considerato solo uno studio preliminare, ovvero il punto di partenza per indagare sugli stessi e altri markers di fibrosi, utili non solo per la diagnosi ma anche allo scopo di monitorare il paziente nel tempo e di valutare l'efficacia della terapia. L'identificazione di un valore soglia per l'AST/ALT ratio in grado di discriminare soggetti con assenza/presenza di fibrosi è sicuramente un buon punto di partenza.

A nostro parere sarebbero utili studi successivi, su casistiche più ampie per ciascun grado di fibrosi epatica, al fine di stabilire:

se AST/ALT ratio possa riconoscere ulteriori livelli di significatività in relazione al singolo grado di fibrosi

conseguenza del punto precedente, se AST/ALT ratio possa essere utilizzabile, nel medesimo soggetto, come indice non invasivo della progressione della malattia

Riteniamo ragionevole pensare che l'APRI index anche in studi successivi non potrà fornire migliori performance rispetto a quelle di AST/ALT ratio per le motivazioni già citate nella discussione dello studio.

Per quanto riguarda la componente prospettiva del nostro studio abbiamo deciso di approfondire quale marker l'acido ialuronico, poiché in letteratura veterinaria esiste un unico studio specifico a riguardo, ovvero quello di Kanemoto ⁽²²⁾ del 2009.

I risultati da noi ottenuti si sono rivelati totalmente difforni da quelli disponibili. A prescindere da questo inaspettato risultato abbiamo voluto sottolineare

l'importanza, per gli studi futuri, di riuscire a identificare un range normale di riferimento della concentrazione di HA nel cane sano attraverso l'utilizzo, tra i kit Elisa disponibili in commercio, di quello che presenta le migliori caratteristiche di ripetibilità e costi contenuti. In tal senso un valido spunto viene fornito in questo studio affinché in futuro si presti attenzione, in modo critico, non solo al test utilizzato ma anche alla variabilità in età, razza e sesso dei soggetti sani in cui si valuta HA al fine di ottenere un valore di riferimento standardizzato e affidabile. Riteniamo inoltre utile cercare, nei successivi studi, di ampliare la casistica dei soggetti patologici ma considerare anche i limiti della metodica con cui si valuta la concentrazione dell'acido ialuronico: il kit Elisa da noi utilizzato ha infatti dimostrato di essere indaginoso per la necessità di congelare il siero ottenuto a -20° C prima di sottoporlo alla lettura della macchina, il reagente è fotosensibile e va manipolato con grande attenzione con impiego quindi di personale esperto e infine il costo del test è abbastanza elevato e consente la lettura dei campioni patologici solo in un'unica soluzione.

Sicuramente lo studio di Kanemoto²² conferma i dati riscontrati in umana, riguardo la diagnosi di cirrosi ma per questa alterazione esistono già tecniche diagnostiche non invasive e ben accettate dal proprietario come l'ecografia, attraverso la quale si nota il totale sovvertimento dell'architettura dell'organo, senza dover ricorrere alla valutazione della concentrazione ematica di HA. Infine la cirrosi è l'esito di un processo patologico cronico decisamente irreversibile per cui non si pone il problema di identificare un marker non invasivo che nel follow-up sostituisca la biopsia. Questo è invece necessario per gradi lievi o moderati di fibrosi in cui l'ecografia e altri metodi non sono utili. Se HA però serve solo per stabilire se c'è fibrosi o cirrosi, dati i limiti della metodica e dato che la cirrosi è diagnosticabile anche attraverso l'ecografia, riteniamo che l'utilità pratica di questo test sia limitata e che non sia ancora stato validato.

Questo studio potrebbe comunque fornire uno spunto per successive ricerche dove, anche qualora non si sia identificato un range standard di valori per HA nel cane sano, si potrà cercare di valutare nel medesimo soggetto la concentrazione di acido ialuronico come indice non invasivo della progressione della malattia. Un aspetto certamente positivo correlato allo svolgimento di questa tesi, è rappresentato dallo sviluppo di una scala semiquantitativa, istologica, da parte dei Colleghi della Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria, per la valutazione della fibrosi e delle altre alterazioni istologiche del fegato che potrà avere certamente un'utilità ed essere di appoggio per gli studi futuri.

BIBLIOGRAFIA

1. Atti del 4° Congresso Nazionale UNISVET Association, Milano, Italia, 12/13/14 febbraio, 2010.
2. S.J. Ettinger, E.C. Feldman in Clinica Medica Veterinaria, 6th Edn Vol. 2, Elsevier Masson, 2005.
3. WJ Banks, Istologia e anatomia microscopica veterinaria, (pp. 423-432), PICCIN, 1991
4. Jan Rothuizen *et al.* in WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease, WSAVA Liver Standardisation Group, Saunders Elsevier, 2006.
5. G.Aria, E.Arru, B.Biolatti, E.Bollo, G.Cammarata, M.Caniatti *et al.* in Trattato di Anatomia Patologica veterinaria a cura di F. Guarda e G. Mandelli 3th edn (pp.326-327). UTET, 2002.
6. Mircea Grigorescu. Noninvasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis. J Gastrointestin Liver Dis, Vol. 15 No. 2: 149-159, 2006.
7. S.J.Birchard, R.G.Shering. in Manuale di Clinica dei Piccoli Animali, 1th edn, PICCIN, 1996.
8. F.Poitout, D.J.Weiss, P.Jane Armstrong. Cell-mediated immune responses to liver membrane protein in canine chronic hepatitis. Veterinary Immunology and Immunopathology 57:169-178, 1997.
9. J.Boisclair, M.Doré, G.Beauchamp, L. Chouinard and C.Girard. Characterization of the Inflammatory Infiltrate in Canine Chronic Hepatitis. Veterinary Pathology 38:628-635, 2001.
10. Harrison *et al.* in Principi di Medicina Interna, 1th edn italiana della 15th edn originale, McGraw-Hill Companies, 2002.
11. G.Bettini, M.Morini, L.Mandrioli *et al.* in La citodiagnostica agoaspirativa nelle patologie epatiche del cane e del gatto. Confronto citologia/istologia in 90 casi consecutivi. Veterinaria, Anno 15, No. 3, 2001.
12. R.W.Nelson, C.G.Couto. in Medicina interna del cane e del gatto. 7edn, 2005 Edizioni veterinarie MASSON
13. E.Villiers, L.Blackwood in Gli esami di laboratorio. UTET, 2006.
14. E.Sevelius. Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. J Small Anim Pract 36(12): 521-528, 1995.

15. D.Meyer, D.C. Twedt. Chronic hepatitis: recent advances. www.dcavm.org, 2001.
16. J.Copper, C. Webstern. The diagnostic approach to asymptomatic dogs with elevated liver enzyme activities. *Veterinary Medicine*, 2006.
17. D.J.Meyer, J.W.Harvey. *Medicina di laboratorio veterinaria: interpretazione e diagnosi*. 3th edn Antonio Delfino Editore, 2007.
18. D.Twedt, *Abnormal liver enzymes: a practical clinical approach*, www.dvm360.com, 2009
19. L.Alvarez, J Whittemore, *Liver enzyme elevations in dogs: physiology and pathophysiology*, *Compendium: Continuing Educations for Veterinarians*, September 2009, CompendiumVet.com
20. D.Pennick, MA. D'anjou. *Atlas of small animal ultrasonography*. 1th edn, Backwell Publishing, 2008.
21. Nyland, Mattoon. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 2th edn SAUNDERS, 2002.
22. S.Faverzani, M.Lodi in *Ecografia clinica del cane e del gatto*. 1th edn Poletto editore, 2010.
23. M. Guillot, MA. D'njou, K.Alexander, C.Bèdard *et al*. Can sonographic findings predict the results of liver aspirates in dogs with suspected liver disease ?. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, Vol. 50, No.5: 513-518, 2009.
24. A.Honeckman. *Current Concepts in the Treatment of Canine Chronic Hepatitis*. *Clinical Techniques in Small Animals Practice*. Vol. 18, No. 4: 239-244, 2003.
25. Hideyuki Kanemoto, Koichi Ohno, Manabu Sakai, Ko Nakashima, Masashi Takahashi *et al*. *Blood Hyaluronic Acid as a Marker for Canine Cirrhosis*, 2009.
26. F.Barr. *Percutaneous biopsy of abdominal organs under ultrasound guidance*. *Journal of Small Animal Practice* 36: 105-113, 1995.
27. S.L.Vaden, Joyces S. Knoll *et al*. *Blackwell's five-minute veterinary consult : laboratory tests and diagnostic procedures*. *Canine & Feline*. 1th edn WILEY and BLACKWELL, 2009.
28. S.C.Vasanjee, L.J.Bubenik, G.Hosgood and R. Bauer. *Evaluation of Hemorrhage, Sample Size, and Collateral Damage for Five Hepatic Biopsy Methods in Dogs*. *Veterinary Surgery* 35:86-93, 2006.
29. S C.Kerwin. *Hepatic aspiration and biopsy techniques*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol.25, No. 2, 1995.

30. JH.Poldervaart, RP.Favier et al, Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006), *J Vet Intern Med* 2009; 23:72-80
31. YL. Mc.Grotty, IK Ramsey, CM.Knottenbalt. Diagnosis and management of hepatic copper accumulation in a Skye terrier. *J Small Anim Pract* 44(2):85-89, 2003.
32. Harrison *et al.* in *Principi di Medicina Interna*, 1th edn italiana della 15th edn originale, McGraw-Hill Companies, 2002.
33. Seung Ha Park, Tae Eun Park, Young Mook Kim *et al.* Non-invasive model predicting clinically-significant portal hypertension in patients with advanced fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24:1289-1293, 2009.
34. www.maggiorep.novara.it
35. F.Oberti, E.Valsesia, C.Pilette, M.C.Rousselet *et al.* LIVER, PANCREAS, AND BILIAR TRACT Noninvasive Diagnosis of Hepatic Fibrosis or Cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology* 113:1609-1616, 1997.
36. N.H.Afdhal, M.D.,F.R.C.P.I. and David Nunes *et al.* Evaluation of Liver Fibrosis: A Concise Review. *American Journal of Gastroenterology* pagg.1160-1174, 2004.
37. Stefan G. Hubscher. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. *Journal of Hepatology*, 29:1015-1022, 1998.
38. K.Ishak, A. Baptista, L. Bianchi, F.Callea et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22:696-699, 1995.
39. R.G.Knodell, K.Ishak, W.C.Black *et al.* MILESTONES IL LIVER DISEASE Scoring Chronic Hepatitis. *Journal of Hepatology* 38:382-386, 2003.
40. P.Bedossa, T.Poynard. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. 1996.
41. ZD.Goodman, Grading and staging system for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases, *Journal of Hepatology* 47 (2007): 598-607.
42. P.Pradat, A.Alberti, T.Poynard *et al*, Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European Collaborative Study, *Hepatology* 2002; 36:973-977.
43. M.Peck-Radosavljevic, Hypersplenism, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001 Apr, 13 (4): 317-323
44. Wai CT, Greeson JK, Fontana RJ *et al* ; A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patient with chronic hepatitis C; *Hepatology* 2003;38:518-526.

45. V.Ratziu, J.Massard, F.Charlotte, D.Dessous et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology* 6: 6, 2006.
46. Y.Bacq, Y.Schillio, JF.Brechot *et al*, Decrease of haptoglobin levels in patients with chronic viral hepatitis C, *Gastroenterol Clin Biol*, 1993, 17:364-369.
47. G.JH.Park, B.PC.Lin *et al*, Chronic viral hepatitis and liver cirrhosis Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: Is it a useful predictor of cirrhosis?, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2000) 15, 386-390
48. E.Giannini, R.Testa, V.Savarino, Liver enzyme alteration: a guide for clinicians, *CMAJ* 2005; 172 (3): 367-379.
49. E.Giannini, F.Botta *et al*, Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio, *Digestive Diseases and Sciences*, Vol.44, No.6 (June 1999), pp.1249-1253
50. E.Giannini, D.Risso, F.Botta *et al*, Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease; *Arch inter med*. 2003; 163: 218-224
51. SG.Sheth, SL.Flamm, FD.Gordon, S.Chopra, AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis virus infection, *Am. J. Gastroenterol*, 1998; 93: 44-8
52. A.Pohl, C.Behling *et al*, Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection, *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 3142-3146
53. WG.Shin, SH.Park *et al*, Simple tests to predict hepatic fibrosis in nonalcoholic chronic liver diseases, *Gut and Liver*, Vol. 1, No.2, December 2007, pp. 145-150
54. AA.Abdo, K.Al Swat *et al*, Validation of three noninvasive laboratory variables to predict significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C in Saudi Arabia, *Ann Saudi Med* 2007; 27 (2): 89-93
55. C.Lin, C.Chang *et al*, Retrospective evaluation of serum markers APRI and AST/ALT for assessing liver fibrosis and cirrhosis hepatitis B and C patients with hepatocellular carcinoma, *Intermed* 47: 569-575, 2008
56. A.Loaiza-del-Castillo, F.Paz-Pineda *et al*, AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis, *Annals of Hepatology* 2008; 7 (4): October-December: 350-357

57. R.Gomes da Silva Junior, R.Fakhouri *et al*, Aspartate aminotransferase to platelet ratio index for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients, *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 2008; 12 (1): 15-19
58. Y.Zhang, W.Wu *et al*, Noninvasive assessment of liver fibrosis with combined serum aminotransferase/platelet ratio index and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis B, *World J Gastroenterol* 2008, December 14; 14(46): 7117-7121
59. AA.Shaheen, RP.Myers, Diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index for the prediction of hepatitis C related fibrosis: a systematic review, *Hepatology* 2007 Sep; 46 (3):912-921
60. RR.Mummandi, JR.Petersen *et al*, Role of simple biomarkers in predicting fibrosis progression in HCV infection, *World J Gastroenterol* 2010 December 7; 16 (45): 5710-5715
61. Min Zheng, Wei-Min Cai, Hong-Lei Weng, Rong-Hua Liu. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *Journal of Gastroenterology* 8(6):1073-1076, 2002.
62. S. Capurro, B. G. Carrari, S. De Simone, C. Di Gregorio, M. Gallucci *et al*. in *Medicine e Chirurgia Estetica del viso e del collo* Vol.unico pag.38, ELSEVIER MASSON, 2007.
63. A. Giannetti, F.Serri. *Trattato di dermatologia: biologia e fisiopatologia cutanea. Principi di dignostica.* 2th edn., Vol. 1: pag.19, PICCIN, 2001.
64. P.Halfon, M. Bourliere, G.Pènaranda, R.Deydier. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp. Hepatol.* 4:6, 2005.
65. Guo-Guang Xu, Chen-Yu Luo, Shan-Ming Wu and Chun-Li Wang. The relationship between staging of hepatic fibrosis and the levels of serum biochemistry. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, Vol. 1, No2: 246-248, 2002.
66. Shi-Bin Xie, Ji-Lu Yao, Rong-Quin Zheng, Xiao-Mao Peng and Zhi-Liang Gao. Serum hyaluronic acid, procollagen type III and IV in histological diagnosis of liver fibrosis. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, Vol. 2, No 1: 69-72, 2003.
67. J.G. Chen, M.S. Chai, JI XW, *et al*. Diagnosis accuracy of serum markers for hepatic fibrosis evaluated by ROC curve analysis. *J Shanghai Med Test* 13: 7-9, 1998.
68. J.George and R. Stern. Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury. *Clinica Chimica Acta* 348: 189-197, 2004.

69. Peto, R. *et al.* Dose e rapporti di Tempo per induzione del tumore nel fegato e nell'esofago di 4080 ratti innati da ingestione cronica di N-Nitrosodiethylamine o della W-Nitrosodimetilammina,,. *Ricerca sul cancro* (51): 6452-6469.
70. P.Halfon, M. Bourliere, G.Pènaranda, R.Deydier. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp. Hepatol.* 4:6, 2005.
71. V.Ratziu, J.Massard, F.Charlotte, D.Dessous *et al.* Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology* 6: 6, 2006.
72. You-Xiang Zhang, Wen-Juan Wu, Yun-Zhi Zhang, Yan-L ng Feng, Xin-Xi Zhou, Qi Pan. Noninvasive assessment of liver fibrosis with combined serum aminotransferase/platelet ratio index and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology* 14(46): 7117-7121, 2008.
73. G. Zanna, D. Fondevilla, M. Bardagi, M.J. Docampot, A.Bassols e L.Ferrer. Cutaneous mucinosis in shar-pei dogs is due to hyaluronic acid depositino and is associated with high levels oh hyaluronic acid serum. *Journal compilation ESVD e ACVD* 19: 314-318, 2008.
74. Budsberg, S.C., Lenz, M.E. and Thonar. Serum and synovial fluid concentration of keratan sulfate and hyaluronan in dogs with induced stifle joint osteoarthritis following cranial cruciate ligament transection. *Am. Journal Veterinary Res.* 67:429-432, 2006.
75. K.Nganvongpanit, A. Itthiarbha, S.Ong-Chei et al. Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers of osteoarthritis in canine hip displasya. *Journal Vet Science* 9(3): 317-325, 2008.
76. M.Seki, K.Asano, M.Sakai, N.Kanno et el. Serum hyaluronic acidin dogs with congenital portosystemic shunts.*Journal of Small Animal Practice* 51:260-263, 2010.