

Università degli Studi di Bologna

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dottorato di Ultrasonologia in Medicina Umana e Veterinaria

**VALIDAZIONE DELL'ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DI
UNA RETE NEURALE ARTIFICIALE NELLA PREDIZIONE
DELLA FIBROSI EPATICA DA EPATITE HCV STADIATA
CON BIOPSIA EPATICA ECOGUIDATA**

Tesi di Diploma di Dottorato
(MED09/Medicina Interna)

Relatore:
Prof. L. Bolondi

Presentata da:
Dr. G. Donati

XIX ciclo
Anno accademico 2005-'06

SOMMARIO	Pag. 1
1. INTRODUZIONE	Pag. 3
-FIBROSI EPATICA	Pag. 3
-CLASSIFICAZIONE DEL DANNO EPATICO	Pag. 6
-METODI DI VALUTAZIONE DELLA FIBROSI	Pag. 8
-EPATITE VIRALE C	Pag. 22
-STORIA NATURALE DELL'EPATITE C E FATTORI CHE INFLUENZANO IL DANNO EPATICO	Pag. 24
-INTRODUZIONE ALLE RETI NEURALI ARTIFICIALI	Pag. 31
2. SCOPO DELLO STUDIO	Pag. 35
3. PAZIENTI E METODI	Pag. 36
-SVILUPPO DELLA RETE NEURALE	Pag. 38
-ANALISI STATISTICA	Pag. 39
4. RISULTATI	Pag. 41
5. DISCUSSIONE	Pag. 46
6. CONCLUSIONE	Pag. 52
BIBLIOGRAFIA	Pag. 59

SOMMARIO

Nelle epatopatie croniche l'estensione della fibrosi è il principale determinante della prognosi. Sebbene la biopsia epatica rimanga il gold standard ai fini di una stadiazione, il crescente interesse nei confronti di metodi diagnostici non invasivi di fibrosi ha portato allo sviluppo di diversi modelli predittivi basati su parametri clinico-laboratoristici quali Fibrotest, indice APRI, indice Forns.

Gli scopi dello studio sono: di stabilire l'accuratezza di un'analisi con rete neurale artificiale (ANN), tecnica di cui è stata dimostrata l'efficacia predittiva in situazioni biologiche complesse nell'identificare lo stadio di fibrosi, di confrontarne i risultati con quelli ottenuti dal calcolo degli indici APRI e Forns sullo stesso gruppo di pazienti e infine di validarne l'efficacia diagnostica in gruppi esterni.

PAZIENTI E METODI

Sono stati raccolti i dati di 230 pazienti con epatite virale cronica HCV relata sottoposti a biopsia presso l'Ospedale Maggiore di Parma e di 42 pazienti con cirrosi HCV relata ottimamente compensata sottoposti a resezione epatica per HCC presso l'ospedale S.Orsola-Malpighi per un totale di 272 pazienti.

La rete neurale è stata costruita su sei variabili clinico-laboratoristiche risultate statisticamente correlate alla presenza di fibrosi epatica (% Albumina, PT, PLT, Età, Colesterolo totale e GOT) ed allenata inizialmente su un training group di 123 pazienti (45%) utilizzando un cross-validation group di 54 pazienti (20%). La rete è stata quindi testata sul rimanente gruppo di 95 pazienti (35%) ad essa sconosciuti (testing group). Il modello di rete neurale ottenuto è stato infine testato su un gruppo omologo di pazienti con casistica raccolta negli Ospedali di Padova (174 pazienti) e Rimini (40 pazienti).

Le abilità predittive di APRI, Forns e ANN sono state indagate e confrontate per mezzo sia del coefficiente di correlazione di Spearman (ρ) sia della receiver operating characteristic analysis (ROC) nei seguenti cut-off di fibrosi: F0/F1 versus F2-F4 e F0-F2 versus F3/F4.

RISULTATI

Nel testing group interno la performance di ANN risulta essere la migliore nel predire stadi più avanzati di fibrosi epatica (F0-F2 versus F3/F4) con AUC di 0.88 vs 0.75 (P= 0.013) e 0.80 (P= 0.029) di APRI e Forns rispettivamente. Il confronto tra i tre metodi non raggiunge significatività statistica nella predizione di fibrosi significativa ($F \geq 2$) nonostante i risultati apparentemente migliori ottenuti dalla rete neurale.

Se applicata ai gruppi esterni, la rete neurale elaborata mantiene un'accuratezza simile a quella osservata nel gruppo interno. In particolare, nella valutazione di F3-F4, l'applicazione della rete al gruppo formato dal totale di testing Set + external cohort ne conferma la superiorità nei confronti degli altri due metodi con un'area sotto la curva ROC di 0.88 (95%C.I. 0.83-0.91) contro 0.83 (0.78-0.87) di entrambi APRI e FORNS. Permane anche in questo non significativa la differenza tra i tre metodi nella predizione di fibrosi significativa ($F > 2$).

CONCLUSIONI

L'analisi con reti neurali artificiali costituisce un promettente strumento non invasivo nell'identificare fibrosi epatica significativa, ottenendo accuratezza progressivamente maggiore all'aumentare dello stadio di fibrosi.

Inoltre, il fatto che la performance di ANN non diminuisca quando tale strumento è applicato a gruppi di convalida esterni, supporta l'ipotesi che, a differenza dei modelli predittivi convenzionali, il modello delle reti neurali possa essere più universalmente applicabile.

1.INTRODUZIONE

1.1FIBROSI EPATICA

Con il termine fibrosi epatica si intende l'eccessivo accumulo di matrice extracellulare nel fegato, evento osservabile in quasi tutte le condizioni di danno cronico.

Le malattie epatiche associate a fibrosi sono:

1. Epatite cronica virale (HBV, HCV e HDV)
2. Epatite da tossici (alcolol, farmaci quali amiodarone, arsenico, contraccettivi orali, alcaloidi pirrolidizinici)
3. Epatopatie a genesi autoimmune (epatite autoimmune, cirrosi biliare primitiva)
4. Malattie ereditarie e metaboliche (emocromatosi, morbo di Wilson, galattosemia, malattia di Gaucher, malattia da accumulo di glicogeno, tirosinemia ereditaria, deficit di α 1-antitripsina)
5. Malattie parassitarie (Schistosomiasi)
6. Steatoepatite non alcolica
7. Alterazioni vascolari (congenite o acquisite, malattia di Budd-Chiari, cirrosi cardiaca)
8. Malattie delle vie biliari (colangite sclerosante primitiva)
9. Fibrosi epatica congenita.

Tra queste, l'infezione cronica da virus dell'epatite C e B, la steatoepatite alcolica e non alcolica (NASH) sono le principali cause di epatopatia cronica progressiva, e portano nel 20% - 40% dei casi ad un risultato finale comune: la cirrosi epatica. Essa è responsabile di una significativa morbilità e mortalità correlate allo sviluppo delle sue complicanze (ipertensione portale e sue conseguenze come varici esofagee, splenomegalia, ascite, encefalopatia epatica, peritonite batterica spontanea, sindrome epato-renale, sindrome epato-polmonare e carcinoma epatocellulare). Dal punto di vista anatomo-patologico, la cirrosi è un avanzato stadio di fibrosi, caratterizzato dalla formazione di noduli rigenerativi di epatociti separati da setti fibrosi (1). Ciò è conseguenza della necrosi degli epatociti, del collasso del sistema reticolare di supporto con conseguente deposizione di tessuto connettivo, del sovertimento del letto vascolare e della rigenerazione nodulare del rimanente parenchima. Si tratta di un processo progressivo che può svilupparsi in anni o decenni, perciò una corretta

stadiazione della fibrosi risulta estremamente importante non solo per la valutazione prognostica individuale del paziente ma anche per la prevenzione della progressione della malattia verso la cirrosi.

1.2 IL PROCESSO DI FIBROGENESI

Il tessuto epatico è costituito da due linee cellulari:

a) le cellule nobili parenchimali o epatociti, le quali svolgono la maggior parte delle funzioni alle quali è deputato il fegato;

b) le cellule non parenchimali:

- le cellule endoteliali delimitanti i sinusoidi, le quali contribuiscono a costituire i vasi sanguigni regolando l'afflusso di sangue,

- le cellule di Kupffer (di derivazione macrofagica) che, dotate di attività fagocitica, partecipano alla difesa da agenti infettivi e fungono da importanti mediatrici della risposta infiammatoria,

- i fibroblasti portali, presenti nel tessuto connettivo dei tratti portali attorno a vasi e strutture biliari,

- le cellule di Ito, note anche come cellule stellate o lipociti, ad elevato contenuto lipidico e sede di deposito di vitamina A, componenti critiche della risposta fibrogenica messa in atto in seguito ad insulti epatici e con funzione di sostegno grazie alla produzione di matrice extracellulare.

Se storicamente la fibrogenesi era stata considerato un processo passivo e irreversibile dovuto alla distorsione e scomparsa del normale parenchima e alla sua sostituzione con tessuto ricco di collagene, attualmente essa è considerata un processo dinamico rassomigliante al modello (comune ad altri tessuti) di guarigione di una ferita con accumulo di sostanza "cicatrizziale" in risposta a un danno cronico (1). Indipendentemente dai diversi agenti potenzialmente dannosi per il fegato (virus, farmaci, alcool, autoanticorpi, ferro), l'organo risponde con un percorso stereotipato comune: la deposizione di tessuto fibroso (2). In presenza di danno epatico infatti vengono progressivamente perse cellule parenchimali per necrosi o apoptosi, si deposita matrice nel tentativo di colmare i vuoti lasciati dalle cellule distrutte ed il fegato diviene sede di infiammazione con infiltrazione linfocitaria. Se questo processo si svolge in acuto ed è risultante in una moderata necrosi epatocitaria e modesto accumulo di matrice extracellulare, una volta neutralizzato

l'agente nocivo, si ha rigenerazione degli epatociti e ritorno della matrice alle sue caratteristiche normali. (Tale successione di eventi si osserva ad esempio, durante un'epatite virale acuta quando le difese immunologiche sono in grado di debellare l'agente infettante) (2). Nel caso di danno cronico persistente invece lo squilibrio tra i processi di morte cellulare, infiammazione e deposizione non permette alla matrice di essere riassorbita creando i presupposti per la fibrosi.

Nel fegato normale la matrice extracellulare (ECM) costituisce una piccola parte dell'organo (meno del 3% dell'area di sezione). Il termine ECM si riferisce alla disposizione delle varie macromolecole costituenti l'"impalcatura" del fegato. Oltre che nella capsula di Glisson, l'ECM è presente attorno ai tratti portal, nelle pareti sinusoidali, attorno alle vene centrolobulari. Essa partecipa alla costituzione della barriera tra flusso sanguigno e parenchima, e proprio tale posizione strategica è responsabile delle immediate e deleterie conseguenze delle sue modificazioni, qualitative e/o quantitative. Le maggiori componenti dell'ECM epatica sono i collagene, in particolare il tipo I, III, IV e V. Ogni isoforma è differente per localizzazione e funzione: i tipi I, III e V sono confinati prevalentemente al tratto portale e attorno alla vena centrale, il tipo IV, in associazione con laminina ed altre proteine forma uno strato simile ad una membrana basale a bassa densità lungo le pareti dei sinusoidi, essenziale per garantire facili scambi tra sangue e parenchima epatico. Altre componenti dell'ECM sono glicoproteine come laminina, fibronectina, tenascina e proteoglicani come eparan-dermatan-condroitin solfato, acido ialuronico, perlecani. La funzione principale della matrice è garantire coerenza meccanica e resistenza al fegato ma gioca un ruolo anche in altre funzioni biologiche come migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare ed espressione genica (2)

Nel fegato fibrotico, il metabolismo dell'ECM è un processo dinamico e il suo accumulo è prevalentemente conseguente all'attivazione delle "cellule stellate" le quali, insieme ad altri tipi cellulari, contribuiscono alla deposizione di molecole collageniche, proteoglicani e glicoproteine. Le componenti dell'ECM sono simili a quelle presenti nell'organo normale, ma sono quantitativamente aumentate (fino a sei volte tanto), con una ridistribuzione quantitativa e qualitativa tra le sue componenti (2).

Mentre il danno fibrotico iniziale è localizzato prevalentemente attorno alle triadi portali e non genera un pronunciato aumento dell'ECM totale, la progressione verso la cirrosi è caratterizzata dall'interessamento dell'intero lobulo. Un gran numero di cellule miofibroblastiche si accumula attorno alle vene centrolobulari seguito dall'accumulo di collagene di tipo I e III a formare setti porto-portali e porto-centrali e dalla sovraespressione di collagene di tipo IV nello spazio perisinusoidale del Disse a formare ex novo una lamina basale elettronica densa attorno ai sinusoidi. Quest'ultima si associa a cambiamenti nel fenotipo delle cellule sinusoidali con la perdita delle fenestrature. E' un processo detto "capillarizzazione dei sinusoidi" e comporta un'importante alterazione dei liberi scambi tra sangue e parenchima (2). Altre proteine sovraesprese nel fegato fibrotico sono laminina e fibronectina per quanto riguarda le glicoproteine e l'acido ialuronico per quanto riguarda i proteoglicani. La stretta correlazione tra cambiamenti nel microambiente ECM, alterazione della funzione epatocitaria e cambiamenti nel fenotipo delle cellule stellate mostrano il ruolo essenziale dell'ECM non solo come struttura di sostegno ma come luogo di continuo scambio di segnali con le cellule circostanti.

1.3 CLASSIFICAZIONE DEL DANNO EPATICO

Sono stati proposti diversi modelli per la classificazione del danno epatico:

KNODELL ET AL.

Nel 1981 Knodell e colleghi pubblicano l'indice di attività istologica (Histology activity index, HAI o Knodell score), il primo sistema per ottenere una descrizione oggettiva, semiquantitativa e riproducibile delle lesioni morfologiche dell'epatite cronica. Lo scopo era quello di fornire una terminologia sistematica in grado di rimpiazzare o migliorare quella tradizionale di tipo qualitativo e di sviluppare un modello di valutazione di biopsie seriate per delineare la progressione di malattia o la risposta all'intervento terapeutico. Il modello prevede 4 punteggi separati per ogni componente della lesione:

- da 0 a 10 per la necrosi periportale con o senza necrosi a ponte;
- da 0 a 4 per la degenerazione intralobulare e necrosi focale ;

- da 0 a 4 per l'inflammation portale;
- da 0 a 4 per la fibrosi.

Le prime tre categorie valutano complessivamente l'intensità dell'attività infiammatoria (grading) mentre la quarta indica il grado di fibrosi e l'alterazione dell'architettura epatica (staging). Il punteggio attribuisce maggiore peso alla prima categoria basandosi sul fatto che la necrosi periportale (piecemeal) e a ponte siano indicative di progressione verso la cirrosi. In tale modello si utilizzano valori in scala discontinua e la fibrosi è così classificata:

- 0 = assente
- 1 = espansione fibrosa portale
- 3 = fibrosi a ponte (porto-portale o porto-centrale)
- 4 = cirrosi

La somma degli scores viene riportata come HAI della biopsia e la critica che più frequentemente gli viene rivolta è quella di raggruppare attività necro-infiammatoria e fibrosi, mentre tali parametri descrivono lesioni di tipo differente ed hanno diversa implicazione prognostica non distinguendo tra epatite attiva, rimodellamento parenchimale e fibrosi (3,4).

ISHAK ET AL.

Nel 1994 Ishak e colleghi propongono una revisione del modello di Knodell apportandovi alcune modifiche: utilizzando una scala continua di valori descrivono il grado di attività e lo stadio di fibrosi come due parametri separati attribuendo un punteggio massimo di 18 per la componente necro-infiammatoria e di 6 per il grado di fibrosi (3, 4).

Quest'ultima è classificata come:

- 0 = assente
- 1 = espansione fibrosa di alcune aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
- 2 = espansione fibrosa della maggior parte delle aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
- 3 = espansione fibrosa della maggior parte delle aree portali con occasionali ponti porto-portali
- 4 = espansione fibrosa delle aree portali con marcata fibrosi a ponte (porto-portale o porto-centrale)

5 = marcata fibrosi a ponte (porto-portale e/o porto-centrale) con noduli occasionali (cirrosi incompleta)

6 = cirrosi.

SCHEUER SCORE

Nel 1991 Scheuer propose un sistema di stadiazione pensato in origine per le epatiti virali croniche ma ora applicato anche alle forme non virali. E' meno complesso dell'HAI, valuta separatamente attività portale/periportale, attività lobulare e fibrosi e attribuisce lo stesso peso alla componente portale e a quella lobulare dell'attività (3, 4, 5).

Esso prevede 4 stadi di fibrosi:

0 = fibrosi assente

1 = tratti portalari allargati e fibrotici

2 = setti periportalari o porto-portalari ma architettura parenchimale intatta

3 = fibrosi con distorsione dell'architettura ma non cirrosi franca

4 = cirrosi.

METAVIR SCORE

E' stato proposto dal gruppo di studio cooperativo francese METAVIR. Prevede due punteggi separati per la valutazione dell'attività istologica e per lo stadio di fibrosi. Esso riflette la combinazione di necrosi lobulare, infiammazione portale, necrosi piecemeal, necrosi a ponte. L'attività va da A0 ad A3 (da assenza di attività ad attività severa). La fibrosi è classificata nel modo seguente (3, 6):

F0 = no fibrosi

F1 = allargamento del tratto portale senza setti

F2 = allargamento del tratto portale con formazione di rari setti

F3 = numerosi setti senza cirrosi

F4 = cirrosi.

1.4 METODI DI VALUTAZIONE DELLA FIBROSI

Nel paziente con epatite virale cronica una precisa definizione dello stadio di fibrosi è il parametro più importante per determinare il rischio di progressione verso la cirrosi e per stabilire la necessità o meno di un trattamento antivirale immediato. Questo è

particolarmente vero per quei pazienti che sono ancora in una fase di buon compenso e non hanno segni clinici né laboratoristici manifesti di cirrosi. In tali pazienti la biopsia epatica rappresenta tuttora il gold standard per la valutazione di presenza, tipo e stadio di fibrosi. Ma si tratta di una procedura invasiva, costosa, soggetta ad un notevole grado di variabilità di valutazione per cui negli ultimi anni abbiamo assistito ad un crescente interesse verso la possibilità di identificare la fibrosi epatica utilizzando markers surrogati e non invasivi, misurabili nel sangue periferico.

1) BIOPSIA EPATICA

La biopsia rappresenta tuttora la tecnica gold standard per stabilire l'entità del danno epatico in termini di attività di malattia (grading) e dello stadio raggiunto dalla stessa (staging) ovvero della fibrosi.

La sua utilità è stata accertata non solo per la valutazione dello stadio di fibrosi, ma anche per le informazioni prognostiche riguardo alla progressione della malattia, per determinare l'urgenza con cui instaurare una terapia antivirale, per escludere diagnosi alternative, per predire la responsività alla terapia, per il monitoraggio a lungo termine dell'epatopatia attraverso biopsie seriate (7). Sebbene si sappia molto sulla storia naturale della malattia sulla base di studi condotti su ampie coorti di pazienti, predire il futuro corso della patologia a livello individuale rimane difficile. Delle potenziali variabili prognostiche le più affidabili appaiono il grado e lo stadio. Studi effettuati su biopsie seriate suggeriscono che i pazienti con epatopatia lieve e fibrosi limitata progrediscono più lentamente o affatto nel corso dei 10-20 anni successivi mentre l'epatopatia moderata-severa progredisce inevitabilmente verso la cirrosi nell'arco di 20-10 anni rispettivamente (8, 9). Inoltre, per quanto riguarda la risposta alla terapia, vari studi hanno asserito che l'assenza di cirrosi può costituire un predittore di risposta virale sostenuta dopo monoterapia con interferone o combinata interferone più ribavirina mentre al contrario il valore negativo predittivo di fibrosi è troppo basso per giustificare l'astensione dalla terapia (10).

Altri autori invece tendono a ridimensionare il ruolo della biopsia, considerando marginale il suo contributo nel fare diagnosi ed escludere diagnosi secondarie. Il suo maggior vantaggio è probabilmente il rendere possibile al clinico la scelta tra

l'intraprendere o meno un trattamento anti-virale, in particolare tenendo conto della complessità, costi ed effetti collaterali della terapia interferonica.

La biopsia epatica può essere considerata una procedura diagnostica sicura nonostante la sua invasività. Essa presenta costi mediamente elevati (\$1500-2000 per procedura negli USA) (11), con variabilità inter-intra osservatore e variabilità di campionatura (12).

Le complicanze maggiori, con l'affinamento delle tecniche e degli strumenti, con indicazioni più selettive e con l'assistenza ecografica, si sono notevolmente ridotte nel tempo ed oscillano tra lo 0.3% e lo 0.57%; anche la mortalità è notevolmente ridotta e varia dallo 0% allo 0.03% ed è prevalentemente causata da emorragia in pazienti con neoplasia (13, 14, 15).

Le complicanze maggiori sono qui sotto elencate: emorragie, perforazione intestinale, pneumotorace, coleperitoneo, emobilia, fistola artero-venosa, infezioni.

Le complicanze minori comprendono il dolore post-biopsia, avvertito dai pazienti in circa il 30% dei casi e le reazioni vaso-vagali (7, 11). E' stato dimostrato che i tassi di mortalità e di complicanze si riducono significativamente se l'operatore ha eseguito almeno 100 biopsie epatiche nel periodo di apprendimento o se la sua esperienza consiste almeno di 20-50 biopsie l'anno.

Diversi autori (16, 17) ritengono che, allo scopo di ridurre le complicazioni, l'ecografia, ove non possa guidare la biopsia in tempo reale, debba essere almeno eseguita prima della puntura allo scopo di riconoscere situazioni potenzialmente rischiose come la dilatazione delle vie biliari, l'ectopia della colecisti, la presenza di lesioni focali superficiali e le variazioni anatomiche del fegato.

Altri autori (18, 19) mettono in dubbio la reale efficacia della guida ecografica nel ridurre la frequenza delle complicazioni; una delle principali considerazioni è che la biopsia ecoguidata viene in molti centri eseguita presso i servizi di radiologia dove è disponibile l'ecografo: necessitando il paziente di successivo trasporto nel reparto di appartenenza, potrebbe mancare l'assistenza proprio nell'immediato post-bioptico, che è quello durante il quale si verifica almeno il 60% delle complicazioni.

Per quanto riguarda la variabilità osservatore dipendente, sembra esserci accordo interosservatore in una percentuale dal 70 al 90% ed

intraosservatore dal 60 al 90% (20), inoltre questa varia a seconda dell'aspetto istologico considerato: la discrepanza inter-osservatore è minima nel valutare la presenza di cirrosi, moderata nel valutare stadi intermedi di fibrosi e particolarmente alta nella valutazione dell'attività infiammatoria (21). Infatti la riproducibilità degli scores di infiammazione è molto più bassa rispetto alla riproducibilità nella stadiazione della fibrosi (22). Un altro limite emerso da alcuni studi è la probabilità di sottostimare la cirrosi, risultata variabile tra il 10 e il 30% dei casi di singole biopsie (22).

Inoltre, dipendentemente dalla patologia sottostante, la fibrosi può essere distribuita in modo diverso nelle varie parti del fegato; uno studio condotto recentemente su biopsie ottenute tramite laparoscopia dava differenze eccedenti 1 grado di fibrosi secondo Scheuer tra lobo sinistro e lobo destro in un terzo dei casi (33%) e nel 14,5 % dei casi la diagnosi di cirrosi veniva fatta in un lobo ma non nel controlaterale (23).

Sebbene l'uso di scores più standardizzati come Knodell, Metavir, Scheuer, abbia migliorato la variabilità inter ed intra osservatore, rimangono ancora fattori che influenzano significativamente l'accuratezza diagnostica. In particolare l'ampiezza del campione rimane un'importante sorgente di variabilità, per l'eterogeneità della distribuzione della fibrosi come sopra detto, e perché il campione rappresenta solo 1/50.000-1/100.000 dell'intero fegato (24).

Bedossa, esaminando il ruolo della biopsia nella stadiazione, mostra che al crescere dell'ampiezza bioptica diminuisce la variabilità di misurazione dell'area assoluta di fibrosi utilizzando lo score Metavir. In particolare osserva un 65% di classificazioni corrette per lunghezze di frustolo pari a 1,5 cm e un 75% per lunghezze pari a 2,5 cm (12).

Anche Colloredo ed coll. (25) hanno esaminato l'importanza delle dimensioni per un'accurata stadiazione, prendendo in considerazione campioni di lunghezza e diametro decrescenti e il numero di tratti portalari al loro interno. Più corto e stretto risulta il campione e maggiormente vengono sottostimati il grading e lo staging, con completa scomparsa del grado di attività severo e riduzione della metà di stadio di fibrosi severo per lunghezze di 1 cm. Anche la riduzione ad 1 mm del diametro porta a sottostimare grado e stadio di danno. Il fattore che influenza negativamente la valutazione di campioni di piccola taglia è probabilmente la riduzione dei tratti portalari contenuti

che dovrebbero essere sempre presenti in numero \geq a 11; ciò si verifica in ogni biopsia con lunghezza \geq 3 cm e larghezza uguale a 1,4 cm e in un 38,5 % di campioni con lunghezza pari a 1,5 cm e larghezza pari a 1,4 cm, mentre non si ha mai tale numero di tratti portali per lunghezza $<$ 1 cm e diametro $<$ 1,4 cm. In definitiva lo studio sostiene che la dimensione bioptica minima che contenga un numero sufficiente di spazi portali (11 tratti) è rappresentata da un campione di lunghezza di 2 cm e larghezza di 1,4 cm.

Anche per quanto riguarda l'influenza della guida ecografica sulla resa diagnostica della biopsia, le opinioni dei vari autori non concordano: secondo alcuni (26, 27) la resa non migliora con l'uso di tale guida, mentre secondo altri (28) la probabilità di ottenere materiale diagnostico è maggiore.

2) TECNICHE STRUMENTALI

Le tecniche radiologiche (ultrasonografia, tomografia computerizzata e risonanza magnetica) sono impiegate principalmente per individuare pazienti con segni di cirrosi epatica. Studi meno recenti identificavano nella riduzione del lobo destro e nel relativo aumento del sinistro e caudato un marker affidabile di cirrosi riportando alta specificità ma limitata sensibilità poiché le alterazioni morfologiche sono presenti solo nelle fasi più avanzate di malattia (22).

Aubè in uno studio del 1999 valuta alcuni parametri ecografici tra cui: morfologia epatica, flusso venoso portale, dimensioni della milza, nodularità della superficie epatica. Dei parametri misurati la nodularità di superficie, la lunghezza della milza e lunghezza epatica raggiungevano la massima accuratezza diagnostica dell'82-88%. In generale i criteri ecografici raggiungono la massima specificità nell'identificare la cirrosi (85-100%) combinata con una più modesta sensibilità (50-80%) (24). Vari studi nei quali si indagano dimensioni, morfologia, superficie ed ecogenicità epatiche, caratteristiche della vena porta (diametro e velocità del flusso portale), milza, dimensioni e diametro della vena splenica, indice di resistenza dell'arteria epatica permettono di individuare la presenza di cirrosi (29, 30). Emerge che l'irregolarità di superficie e la velocità di flusso portale risultano le due variabili indipendentemente associate a cirrosi che ne permettono l'identificazione corretta nell'82% dei casi (29).

Il valore diagnostico dell'ecografia è limitato dall'alta variabilità inter-osservatore e dai problemi tecnici e anatomici (meteorismo, obesità addominale) che possono impedire la misurazione di tutti i parametri necessari. In ogni caso, sia nello studio di Gaiani che in quello di Aubè, l'esame ecografico identifica la cirrosi in un sostanziale numero di pazienti nei quali la biopsia non aveva permesso una diagnosi definitiva. Perciò l'esame ultrasonografico ha un notevole valore complementare in quanto un'indagine correttamente eseguita permette di identificare pazienti con cirrosi anche in assenza del tipico pattern istopatologico alla biopsia (22).

Tomografia computerizzata e risonanza magnetica non sono specifiche per la ricerca di fibrosi e sono comunque inferiori all'ultrasonografia. Rispetto alla risonanza magnetica la TC ha però migliore capacità di rilevare lo stadio fibrotico (31). Tali tecniche sono limitate dall'esperienza dell'esaminatore, dalla accessibilità e dai costi. Inoltre i criteri impiegati non permettono di distinguere gli stadi precirrotici perché caratterizzano la fibrosi in modo più descrittivo che quantitativo (24).

Recentemente è stata sviluppata una tecnica non invasiva basata sull'analisi elastografica dell'elasticità dei tessuti. Tale tecnica utilizza una sonda con un vibratore a bassa frequenza 50Hz e un trasduttore a ultrasuoni che lavora a 5 MHz. La vibrazione induce onde elastiche che si propagano nel tessuto e viene misurata la velocità di propagazione del fronte d'onda nel tessuto. I valori ottenuti sono tanto maggiori quanto più è rigido, e quindi fibrotico l'organo osservato (25). Dagli studi condotti su tale metodica è emersa una elevata riproducibilità intra-inter operatore (coefficiente di variabilità del 3%) e capacità di quantificare la fibrosi. Le analisi AUROC mostrano elevati valori discriminativi per la fibrosi significativa e cirrosi (0.88 e 0.99 rispettivamente per stadi Metavir \geq F2 e = F4) (100). Un altro studio più recente di Zioli individua curve ROC di 0.79 per $F \geq 2$, 0.91 per $F \geq 3$ e 0.97 per $F = 4$, con un incremento di tali valori a 0.81, 0.95, 0.99 rispettivamente, se si considerano campioni bioptici di più grandi dimensioni. In conclusione tale tecnica sembra avere alto potere discriminativo per stadi avanzati di fibrosi e per cirrosi ed elevata riproducibilità oltre ad essere un metodo non invasivo, rapido e indolore. Limite ad essa è la mancata quantificazione dell'attività necroinfiammatoria e i limiti

tecniche legati al paziente (ascite, obesità, spazi intercostali troppo stretti).

3) *MARCATORI SERICI DI FIBROSI*

Una valutazione non invasiva dell'attività e dello stadio di malattia è di estrema utilità, anche al fine di monitorare nel tempo i pazienti con infezione cronica C. Sebbene infatti la biopsia rimanga il gold standard, bisognerebbe interpretare i suoi risultati con alcune riserve tenendo conto degli errori di campionamento e interpretativi. Perciò emerge sempre più pressante la necessità di avere a disposizione markers di fibrosi non invasivi e affidabili.

Il marker ideale di fibrosi dovrebbe avere tali caratteristiche: specifico per la fibrosi epatica, provvedere ad una misura di almeno uno tra stadio di fibrosi, attività di deposizione di matrice e attività di rimozione della matrice extracellulare, non influenzato da comorbidità (renali, reticolo-endoteliali), tempo di emivita e via di escrezione noti, sensibile agli effetti delle terapie, riproducibile, non eccessivamente costoso (21, 22, 32).

Sono stati valutati molti parametri clinici e di metabolismo della matrice mesenchimale nel tentativo di proporre un'alternativa alla biopsia. Molti marcatori però mostrano una stretta relazione con l'attività infiammatoria del danno epatico stesso e ciò può limitare la loro utilità nel definire un corretto stadio fibrotico. Inoltre non è del tutto chiaro se tali marcatori siano associati ad un aumento netto della produzione di matrice o ad una progressione fibrotica vera anche perchè negli stadi iniziali di fibrosi, l'insieme di ECM depositata è poco maggiore di quella del fegato normale. Per tali motivi il potere discriminante di tali marcatori è limitato, specialmente nel distinguere gli stadi precoci di fibrosi (24).

Al momento molti esperti, patologi e clinici, considerata la variabilità tra i laboratori, la scarsa riproducibilità, un tasso di diagnosi errate fino al 20%, non considerano ancora raccomandabile l'uso di tali metodi in sostituzione della biopsia (32). Una delle maggiori limitazioni può essere considerata la scarsa capacità di identificare e classificare stadi intermedi di fibrosi (10). D'altro canto il clinico necessita di uno strumento che se da un lato è non invasivo e ben accettato dal paziente rispetto alla biopsia, dall'altro non sottostimi lo stadio di fibrosi o la cirrosi.

Sebastiani e colleghi (32) suggeriscono che un modo razionale per usarli sia trovare un compromesso nel quale markers non invasivi vengano usati come primo strumento per classificare quei pazienti nei quali essi performano con la maggiore accuratezza, limitando la biopsia al sottogruppo nel quale non sia possibile fare una stadiazione non invasiva precisa.

I marcatori di fibrosi sono divisi in 2 gruppi principali: indiretti e diretti.

Gli indiretti riflettono prevalentemente le alterazioni della funzionalità epatica, non la deposizione di tessuto connettivale e per tale motivo sono particolarmente indicati nella diagnosi di cirrosi ma la loro sensibilità alla fibrosi iniziale è bassa.

I diretti invece riflettono il turnover della matrice cellulare e vengono perciò sempre più proposti come alternativa alla biopsia per una corretta stadiazione della fibrosi pre e post terapia e per stabilire la velocità di fibrogenesi ai fini prognostici.

MARCATORI INDIRECTI

1. RAPPORTO GOT/GPT (AST/ALT RATIO):

GOT e GPT, rilasciate in corso di danno agli epatociti, hanno un buon potere predittivo riguardo all'attività della malattia, ma la loro attività non è strettamente legata alla fibrosi. Inoltre, utilizzate da sole, non sono clinicamente utili perché troppo aspecifiche.

E' stato invece osservato che i livelli di GOT rispetto ai valori di GPT tendono a crescere in modo progressivo al progredire della fibrosi epatica. Numerosi studi hanno mostrato una correlazione diretta con lo stadio fibrotico, ed il valore del rapporto superiore a 1 è fortemente suggestivo per cirrosi sia nel caso di epatiti virali, nelle quali l'accuratezza diagnostica è pari al 79% che nel caso di steatosi non alcolica (NAFLD), mentre nel paziente con epatopatia alcool relata ha efficacia diagnostica più bassa (69%) (22). La sensibilità e la specificità di tale rapporto per la diagnosi di cirrosi sono state valutate in numerosi studi e mentre per la sensibilità sono state individuati valori variabili tra il 47% (35) e il 78% (34), la specificità ha mostrato valori pari al 90-97% a seconda degli studi considerati (33, 34, 35, 36).

Inoltre tale rapporto sembra indipendente dall'attività istologica di malattia e non ha un buon potere discriminante tra gli stadi pre-cirrotici (24). La maggiore forza di tale parametro è soprattutto la semplicità e la disponibilità immediata per il clinico.

2. CONTA PIASTRINICA:

La correlazione inversa tra conta delle piastrine e il grado di fibrosi epatica nell'epatite cronica C è stata approfondita in diversi studi (vedi discussione) ma pochi hanno stabilito il valore diagnostico della conta piastrinica di per sé. Nello studio di Giannini (34) la sensibilità e la specificità per diagnosi di cirrosi sono state valutate pari a 91% e 88% rispettivamente prendendo come livello di cut-off una conta inferiore a $130 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Tale studio ha evidenziato anche che combinando una conta piastrinica minore di $130 \times 10^3 / \mu\text{L}$ con il rapporto GOT/GPT > 1, l'accuratezza diagnostica cresce a valori di 97% e 86% di valore predittivo positivo e negativo rispettivamente.

3. TEMPO DI PROTROMBINA (PT):

E' un indice precoce di fibrosi ancora prima di essere un indice di funzione epatica (37). E' considerato l'indice indiretto con maggiore accuratezza diagnostica (86%) nell'individuare pazienti con cirrosi ed è ugualmente accurato nelle epatopatie virali ed alcoliche (22). Valori di PT $\geq 100\%$ e $\geq 105\%$ escludono rispettivamente una diagnosi di cirrosi e di fibrosi severa, mentre valori $\leq 70\%$ e $\leq 80\%$ depongono per presenza di cirrosi e fibrosi severa (37).

4. PGA INDEX:

Tale indice combina la misurazione del tempo di protrombina, gamma glutamil transferasi e apolipoproteina A1 (quest'ultima caratterizzata da una diminuzione in corso di fibrosi). La sua accuratezza nella diagnosi di cirrosi è del 78.5 % (22). In uno studio precedente Teare (38) riscontrava invece una sensibilità di 91% e una specificità di 81% per la diagnosi di cirrosi. Esso correla meglio con l'epatopatia alcolica rispetto a quella virale.

5. PGAA INDEX:

E' la forma modificata del PGA index con l'aggiunta del valore dell' $\alpha 2$ -macroglobulina che comporta un miglioramento della sua performance. La sua accuratezza diagnostica nei confronti della cirrosi risulta dell'80% (22) e la sua sensibilità e specificità sempre per la diagnosi di cirrosi sono risultate pari a 79% e 89%

rispettivamente (39). Come per il PGA index, la performance sembra essere migliore nei confronti delle epatopatie alcoliche rispetto a quelle di origine virale.

6. APRI (AST/Platelet Ratio Index):

Tale formula è stata derivata da Wai e collaboratori da un set di parametri laboratoristici di routine ed è il rapporto tra GOT e piastrine così ottenuto:

$$\text{APRI} = \text{GOT (UI/L)} \times 100 / \text{piastrine (10}^9\text{/L)}.$$

Esso aumenta il valore diagnostico rispetto al rapporto di GOT/GPT. Nello studio retrospettivo di Wai ed al. si individua nell'indice APRI il più semplice ed accurato test per la valutazione dei due end-point fibrosi significativa e cirrosi con un'area sotto la curva nella Receiving Operator Curve (AUROC) pari a 0.88 e a 0.94 rispettivamente e con una sensibilità dell'89% e specificità del 75% (40). Il maggiore vantaggio di tale test è la sua semplicità poiché usa due parametri di laboratorio analizzati di routine e il fatto che la sua performance non è tanto dissimile da quella di altri indici più complessi come FORNS e Fibrotest (22). La sua utilità pratica è limitata però dal fatto che nella categoria di pazienti con fibrosi severa solo il 51% può essere classificato come tale mentre l'accuratezza cresce all'aumentare dello stadio di fibrosi permettendo di identificare fino all'81% delle cirrosi tra i pazienti che ne sono portatori (24).

7. FIBROTEST:

In un recente studio pubblicato nel 2001 (70) Poynard e colleghi hanno valutato un indice derivato dal contributo di 5 parametri quali α 2-macroglobulina (proteina di fase acuta prodotta nelle sedi di infiammazione e fibrosi da epatociti e cellule stellate attivate), aptoglobina, apolipoproteina A1, gamma-GT e bilirubina totale, aggiustati per età e sesso i quali potessero essere predittivi di fibrosi epatica significativa e utili nel limitare il numero di biopsie richieste per selezionare i pazienti da sottoporre a trattamento antivirale. Utilizzando gli appropriati valori di cut-off, il valore predittivo positivo e negativo sono risultati rispettivamente del 91% e del 100% mentre la sensibilità e specificità di questo test per stadi METAVIR F2 o maggiori sono risultate del 75% e 85%, con migliore performance soprattutto per gli stadi più avanzati F3-F4. Con tale test gli autori suddividono il gruppo di studio in tre categorie di pazienti:

coloro nei quali si può identificare fibrosi significativa con elevata accuratezza, coloro nei quali si può identificare con elevata accuratezza una fibrosi non significativa, e un gruppo non adeguatamente caratterizzabile nel quale risulta necessaria la biopsia. Il Fibrotest ha quindi permesso di classificare correttamente un 46% dei pazienti esaminati, teoricamente eliminando per essi la necessità di biopsia (22, 41). Successivamente è stato confrontato con altri indici di fibrosi come conta piastrinica, tempo di protrombina, acido ialuronico, indice Forns e APRI verso i quali ha ottenuto risultati favorevoli. In particolare è risultato avere un più alto potere discriminativo per la fibrosi severa e la cirrosi rispetto all'APRI (42), ma performance generalmente peggiore sugli stadi intermedi (32). Nonostante l'importanza dei risultati raggiunti il giudizio sul Fibrotest rimane ancora controverso. Infatti quasi tutti i dati che lo riguardano originano da un unico gruppo di ricerca che è anche coinvolto nella commercializzazione del test e fino ad ora solo piccoli studi lo hanno validato esternamente. Inoltre sensibilità e specificità per stadi METAVIR \geq F2 sono state valutate inferiori da altri studi rispetto alla pubblicazione originale (24). Ad esempio lo studio di Rossi ed al. ha riscontrato un valore predittivo negativo dell'85% e positivo del 78%, significativamente più bassi dei valori originali (43).

8. ACTITEST:

Si tratta di una modificazione del Fibrotest attraverso l'inclusione della GPT, e riflette sia il livello di fibrosi epatica che quello di infiammazione e necrosi. Esso mostra un più elevato valore diagnostico nell'identificazione di individui con fibrosi più avanzata e maggiore attività istologica e può essere d'aiuto nel guidare la condotta terapeutica. La sua performance migliora con biopsie di più grandi dimensioni o con un maggior numero di tratti portalari che riflettono più fedelmente l'istologia globale del fegato.

Anche nel follow-up, pazienti con una risposta sostenuta all'interferone presentano una sostanziale riduzione negli scores Actitest e Fibrotest supportando il concetto che tali tests possano essere utili non solo nello staging iniziale della malattia epatica ma anche nel follow-up della risposta istologica alla terapia (44).

Attualmente si afferma che Fibrotest e Actitest abbiano più alti valori diagnostici rispetto a molti altri indici ma non siano ancora

sufficientemente accurati per poter sostituire la biopsia in particolare per via dei falsi-positivi e negativi derivanti dall'alterazione fegato indipendente dei valori sierici di bilirubina, aptoglobina e proteine di fase acuta (45).

9. FORNS'INDEX:

Si tratta di un indice proposto da Forns e collaboratori nel 2002 basato su quattro parametri di routine in base alla seguente equazione:

$$\text{Forns'index} = 7.811 - 3.131 \times \ln(\text{piastrine}) + 0.781 \times \ln(\text{GGT}) + 3.467 \times \ln(\text{età}) - 0.014 \times \text{colesterolo}.$$

L'indice nasce con lo scopo di differenziare la fibrosi assente/minima (F0-F1 sec. Scheuer) dalla fibrosi significativa (\geq F2) nell'epatite C. I cut-off identificati per definire la presenza o assenza di fibrosi sono 6.9 e 4.2, al di sopra e al di sotto dei quali è stata riscontrata la presenza di fibrosi severa con sensibilità del 30% e specificità di 95% e l'assenza di fibrosi severa con sensibilità 94% e specificità 51%. Esso riesce ad escludere fibrosi severa con un valore predittivo negativo pari al 96% contro un valore predittivo positivo per la presenza di fibrosi severa pari solamente al 66%. Si tratta quindi di un test utile nell'escludere pazienti con fibrosi minima ma di limitato valore nell'identificare pazienti con patologia epatica più avanzata. Se confrontato con il Fibrotest il Forns'index ha performance peggiore, con una AUROC di 0.78 verso una AUROC di 0.84 del Fibrotest (24). Una delle maggiori critiche fatta al Forns e anche all'APRI è quella di lasciare almeno un 50% di pazienti non classificati. Altra critica al Forns è che l'impatto dell'epatopatia sull'assetto lipidico e l'effetto dei farmaci ipolipemizzanti possa compromettere il risultato del test (22, 46).

10. GLYCOCIRRHOTEST:

Un gruppo di ricerca belga ha proposto una nuova classe di molecole per l'identificazione di fibrosi epatica attraverso un'analisi del profilo sierico degli oligosaccaridi legati all'azoto basata sulla valutazione di sequenze/frammenti di DNA. La ragione per testare tali molecole sta nel fatto che il fegato è una delle maggiori fonti delle glicoproteine circolanti e nei pazienti cirrotici è stata riscontrata un'iperespressione di 3 dei 14 glicani legati all'azoto presenti nel siero. Uno di questi è stato scelto e chiamato glicocyrrotest. Mentre la progressione METAVIR dallo stadio 0 allo stadio 3 non è associato ad un cambiamento dei glicani, lo stadio 4 è risultato associato ad un

picco di tali markers sierici. L'AUROC di tale test per la cirrosi è pari a 0.87, contro una AUROC del Fibrotest pari a 0.89 testato sugli stessi pazienti. La combinazione dei due metodi risulta in una sensibilità di 75% e specificità di 100% per l'identificazione di cirrosi compensate. Il glicocyrrotest distingue cirrosi compensate da epatopatia cronica non cirrotica con un 79% di sensibilità e un 86% di specificità, raggiungendo un picco di 100% di sensibilità e specificità per cirrosi scompensate (45). Il suo limite è legato all'incapacità di discriminare gli stadi pre-cirrotici (24).

MARCATORI DIRETTI

Appartengono a tale categoria una serie di markers sierici o urinari che sono direttamente coinvolti nella deposizione o nella rimozione di ECM. Poiché il turn-over della matrice è correlato sia alla deposizione di nuova ECM che alla rimozione e al suo rimodellamento, i livelli dei markers probabilmente riflettono sia l'attività che la massa totale di ECM sottoposta al rimodellamento. I loro livelli sono spesso elevati in condizioni di rapida progressione verso la fibrosi prima della deposizione di quantità significative di ECM (47, 48) e tendono a cadere in risposta al trattamento della patologia sottostante, spesso prima della riduzione visibile nello stadio di fibrosi (49, 50). Inoltre nelle epatopatie croniche la maggior parte di essi correla con lo stadio di fibrosi più di ogni altro indice di infiammazione sierico (51, 52, 53) e la buona correlazione esistente tra tali marcatori diretti suggerisce che misurino processi simili (22). Se prendiamo in considerazione gli errori di campionamento connessi con la biopsia, la performance di questi metodi può risultare molto buona.

Possiamo classificarli in base al rapporto con il metabolismo della matrice:

- marcatori che riflettono la deposizione di matrice (procollagene I e III, tenascina, TIMP, TGF- β)
- marcatori che riflettono la rimozione di matrice (procollagene e collagene IV, MMP)
- marcatori per i quali la relazione con deposizione piuttosto che rimozione non è completamente chiara (ialuronato, laminina, YKL-40).

Oppure in base alla struttura molecolare:

- i collagene (procollagene I e III, propeptidi rilasciati nel siero durante deposizione di matrice e rimodellamento; collagene tipo IV, rilasciato durante la degradazione e rimodellamento della matrice)
- glicoproteine e polisaccaridi (acido ialuronico, laminina, tenascina, YKL-40)
- collagenasi e loro inibitori (metalloproteinasi e loro inibitori)
- citochine coinvolte nella fibrosi come TGF- β , PDGF e la citochina antifibrotica IL-10.

I limiti di questi marcatori sono il non essere specifici del fegato in quanto possono essere anche di derivazione extraepatica, il fatto che la loro relazione con il contenuto totale di matrice, deposizione e degradazione solitamente è mista, e la loro dipendenza da clearance, metabolismo ed escrezione.

Il marcatore ideale dovrebbe stabilire in modo non invasivo la fibrosi riflettendo il grado di deposizione e rimozione della matrice anche relativamente all'impatto della terapia e delle informazioni prognostiche. Al momento nessuno di essi risponde pienamente a tali criteri (22).

Recentemente è inoltre cresciuto l'interesse verso l'uso che si può fare di tali marcatori anche nel valutare l'effetto del trattamento anti virale e nell'essere fonte di informazioni riguardo alla progressione della fibrosi. Se si identificheranno dei validi marcatori essi potranno essere utili strumenti nella ricerca di nuove terapie antifibrotiche. Molti studi li hanno usati per valutare l'effetto della terapia con interferon ed hanno mostrato che i livelli sierici di ialuronato, PIIINP, YKL-40 e TIMP1 cadono in pazienti che raggiungono una risposta biochimica e virale sostenuta alla terapia, al contrario in caso di recidiva essi tendono a ritornare a livelli pretrattamento . In particolare l'acido ialuronico e PIIINP sono stati trovati frequentemente correlati al miglioramento dello stadio di fibrosi più di markers istologici o biochimici di infiammazione. In alcuni studi l'interferone è stato associato a una caduta di tali markers sierici suggerendo un benefico e diretto effetto antifibrotico dell'IFN, in particolare data l'ipotesi di una sua inibizione diretta del TGF β (22). Comunque i risultati dei tanti studi condotti a tale proposito sono limitati da numerosi problemi di metodo, dalla mancanza di dati riguardanti sensibilità e specificità, dalla mancanza di

standardizzazione e dalla variabilità inter-laboratorio. Ad esempio potenziale fonte di errore nella valutazione di MMPs e TIMPs circolanti è la presenza anche di un pattern leucocitario, inoltre la scelta corretta del materiale campione (siero, plasma) può essere fonte di imprecisione.

In conclusione, i parametri derivanti dalla matrice extracellulare mostrano stretta correlazione con fibrosi, in particolar modo l'acido ialuronico e le metalloproteasi con un'accuratezza diagnostica più alta per l'individuazione di cirrosi rispetto agli stadi pre-cirrotici, pur tenendo conto del fatto che possono avere specificità ridotta per la stretta correlazione di molti con danno epatico e infiammazione.

Alla luce di tali risultati , nessun parametro non invasivo disponibile al momento è universalmente accettato come sostituto della biopsia epatica. Tra i metodi più semplici e con migliore performance vi sono l'APRI e il Forns mentre il Fibrotest, pur essendo più elaborato può accrescere il potere diagnostico. Tra i marcatori diretti l'acido ialuronico sembra raggiungere il maggior potere predittivo per la presenza di cirrosi (22).

1.5 EPATITE VIRALE C

Il virus dell'epatite virale C costituisce la principale causa di epatopatia cronica nel mondo e la più frequente causa di epatite virale in Italia. Si calcola che 170 milioni di persone (circa il 3 % della popolazione mondiale) siano cronicamente infetti dal virus C (54). Il rapporto WHO del 2002 testimonia che nel 2001 le epatopatie croniche sono state responsabili di 1,4 milioni di morti, dei quali 796.000 dovuti alla cirrosi e 616.000 dovuti ad epatocarcinoma. Circa il 20 % (10'000 morti/anno) di tali eventi sono attribuibili all'infezione da HCV. L'epatite C è la terza causa più comune di epatite virale acuta (5-15%) dopo l'epatite virale acuta A(47-49%) e l'epatite B(33-35%) (55).

La progressione a malattia cronica occorre nella maggior parte degli individui infettati e costituisce una delle principali cause di trapianto di fegato poiché porta, tramite un meccanismo di danneggiamento cronico, alla perdita di funzione dell'organo per progressiva

deposizione di tessuto fibrotico e sovvertimento della struttura parenchimale. Sul fegato trapiantato la reinfezione è quasi costante ed è documentata dalla persistenza dell'HCV-RNA nel 90% dei casi a 3 giorni dal trapianto. L'infezione da virus C inoltre incrementa il numero di complicanze nelle persone con coinfezione da virus HIV1. L'istituzione di misure di controllo (screening degli anticorpi anti HCV) nei Paesi evoluti ha praticamente eliminato la trasmissione attraverso sangue e derivati, e attualmente nel mondo occidentale i meccanismi principali di trasmissione sono l'abuso di droghe per via intravenosa ed in misura minore attraverso esposizione cutanea e mucosa al virus come avviene nel caso di rapporti sessuali con partners infetti ed esposizione occupazionale durante procedure medico-chirurgiche, mentre la trasmissione perinatale può accadere in caso di madri con elevata carica virale HCV o con infezione HIV associata. Fino al 10% dei casi, la sorgente di infezione rimane sconosciuta.

La prevalenza dell'infezione varia dal 0,5% del NordEuropa a tassi superiori al 20% nei Paesi nordafricani, in particolare Egitto.

Si tratta di un virus di piccole dimensioni, incapsulato, costituito da una catena di RNA, appartenente alla famiglia dei Flaviviridae.

Come accade a molti virus a RNA, la sua polimerasi manca dell'abilità di "correggere le bozze" perciò l'alto tasso di mutazione durante la replicazione virale comporta un'elevata eterogeneità genetica; essa costituisce la sfida principale al controllo immuno-mediato del virus C. Mediante sequenziamento nucleotidico sono stati identificati almeno 6 diversi genotipi dell'HCV, cioè gruppi geneticamente distinti insorti durante l'evoluzione del virus e differenti tra loro per almeno il 30% della sequenza. Diversi genotipi sono associati a differenze geografiche e differenze nelle modalità di acquisizione. I genotipi più diffusi in Europa occidentale e Stati Uniti sono 1a, 1b seguiti dal 2 e 3, mentre in Egitto il tipo 4, in Sud Africa il tipo 5 e nel SudEst Asiatico il tipo 6 sono prevalenti. La conoscenza del genotipo è particolarmente utile per il suo valore predittivo di risposta nei confronti della terapia antivirale. I tassi di risposta alla terapia combinata con interferone peghilato più ribavirina sono dell'88% per i genotipi 2 e 3 e del 48% per i genotipi 1, 4, 5 e 6. (56). Al contrario numerosi studi hanno escluso una correlazione tra

severità di malattia (intesa come stadio di fibrosi) e il genotipo (8, 57, 58).

La seconda componente dell'eterogeneità genetica è conosciuta come "quasispecie"; si tratta di popolazioni virali isolate all'interno dello stesso genotipo e nello stesso ospite, le cui sequenze differiscono in modo insufficiente (pochi punti percentuali) per poter definire un distinto genotipo. Tale eterogeneità interferisce con una efficace immunità umorale, inoltre dopo infezione acuta da HCV non si sviluppa immunità duratura contro reinfezioni.

La caratteristica peculiare del virus C è la tendenza a persistere nella maggior parte delle persone infettate acutamente e a determinare una epatopatia cronica. Indipendentemente dalla modalità di infezione con il virus, la probabilità di sviluppare un'infezione cronica dopo epatite acuta C varia tra il 55 e l'85% mentre una risoluzione dell'infezione entro 6 mesi avviene spontaneamente nel 10-40% delle epatiti acute (30).

1.6 STORIA NATURALE DELL'EPATITE C E FATTORI CHE INFLUENZANO LA PROGRESSIONE DEL DANNO EPATICO

L'epatite cronica C laboristicamente è caratterizzata dalla persistenza di transaminasi elevate e dalla presenza di HCV-RNA nel siero anche se in alcuni pazienti le transaminasi sieriche rimangono normali per lunghi periodi di tempo o tendono ad avere un caratteristico andamento oscillante.

I sintomi e segni clinici di malattia epatica in fase di compenso sono spesso inaffidabili nello stabilire la severità di malattia.

La maggior parte degli individui sono infatti asintomatici, anche se alcuni possono lamentare sintomi come astenia, fastidio addominale, ma sintomi e qualità di vita correlano assai poco con la severità di malattia. Nello stesso modo, segni fisici di epatopatia cronica come ittero, edemi declivi, epatosplenomegalia, ascite, encefalopatia sono frequentemente assenti fino a che il paziente non sviluppa cirrosi scompensata. Anche alcuni dati anamnestici (età avanzata, sesso maschile, consumo di alcool), hanno scarsa accuratezza nel predire lo stadio di fibrosi sulla biopsia, sebbene sia stata dimostrata una loro

influenza sul il tasso di progressione di fibrosi. Perciò né dati clinici, né storici da soli possono predire la fibrosi in maniera affidabile.

Nella valutazione della storia naturale dell'epatite cronica C vengono valutati routinariamente una serie di test laboratoristici come albumina, bilirubina totale, AST, ALT, ALP, PT, conta cellulare completa. I livelli sierici di GPT riflettono il danno epatico, ma la correlazione tra essa e il grado di fibrosi ed attività necroinfiammatoria è scarso. Nonostante la scarsa correlazione però, molti pazienti con transaminasi persistentemente normali hanno livelli di infiammazione e fibrosi inferiori e un più lento ritmo di progressione rispetto a pazienti con livelli elevati. In particolare sembra che i livelli di GOT abbiano una più forte correlazione con le alterazione istologiche epatiche e si può affermare che una riduzione della conta piastrinica, inversione del rapporto GOT/GPT e allungamento del PT sono i più precoci indicatori di cirrosi (21, 33, 35, 36).

Oltre ad un aumento delle transaminasi, si possono osservare elevazione delle gamma GT, della ferritina sierica, delle gammaglobuline e una ridotta conta piastrinica. In generale tali alterazioni sono associate ad una malattia più avanzata. Nel complesso la progressione a cirrosi avviene in modo insidioso e silente e viene sospettata sulla base di riscontri di laboratorio e ultrasonografici. Mediamente pazienti con cirrosi compensata hanno sopravvivenza a 10 anni vicina all'80%; la mortalità si aggira intorno al 2-6% per anno e scompenso si osserva nel 4-5% mentre HCC si sviluppa nell'1-3 % per anno.

La storia naturale dell'infezione da HCV è ancora oggetto di molte controversie: molti autori vedono la malattia come inesorabilmente progressiva con un'alta probabilità di evolvere verso la cirrosi e l'HCC. Altri ritengono il decorso maggiormente variabile, sostenendo che la maggior parte delle persone infette non muore a causa dell'infezione in sé quanto per le comorbidità che la accompagnano o per patologie completamente differenti. I tentativi fatti per delineare il decorso naturale della malattia sono ostacolati da alcune peculiarità del virus C: il fatto che raramente l'esordio acuto viene riconosciuto e la scarsità di sintomi nelle fasi precoci non ci permettono di definire con certezza l'effettiva durata di malattia. Inoltre, poiché l'intervallo

tra infezione e sviluppo di cirrosi può superare i tre decenni, fino ad ora sono stati condotti pochi studi prospettici. In generale, sia studi retrospettivi che prospettivi sono concordi nell'affermare che almeno il 20% della popolazione adulta infettata cronicamente sviluppa cirrosi entro 20 anni dall'infezione. Tenendo quindi conto dell'alta variabilità di progressione della fibrosi tra diversi individui, in uno studio condotto da Poynard ed al. su tre differenti gruppi di studio affetti da HCV si propone l'esistenza di almeno tre tipologie di pazienti: i cosiddetti "fast progressors", con un'elevata probabilità di sviluppare cirrosi in meno di 20 anni dall'infezione, "intermediate progressors", nei quali la cirrosi si può sviluppare nell'arco di 20-50 anni dall'infezione e gli "slow" o "minimal progressors", nei quali l'epatopatia può impiegare più di 50 anni ad evolvere (8). Considerare un tasso medio di progressione/anno non significa che l'evoluzione sia universale ed inevitabile ma è tutto sommato possibile identificare un tempo medio che intercorre tra infezione e cirrosi di circa 30 anni.

In un altro studio condotto nel 2001 dallo stesso autore del precedente (59) si identificano in modo approssimativo quattro distinti periodi di tempo a partire dall'infezione, durante i quali la progressione verso la cirrosi si articola in modo relativamente lineare con una accelerazione finale oltre i 50 anni d'età: il primo periodo della durata di circa 10 anni durante il quale non si evidenzia alcuna o una minima progressione (eccezion fatta per gli individui infettati dopo i 50 anni), un secondo periodo di 15 anni caratterizzato da una progressione lenta e regolare, un terzo periodo di 10 anni con un ritmo intermedio e un ultimo periodo di 5 anni in cui la progressione si fa più rapida.

Appare quindi evidente che il rischio di progressione della fibrosi costituisce un importante end-point surrogato per valutare la vulnerabilità individuale e per valutare l'effetto della terapia sulla storia naturale (57, 60).

L'attività e la fibrosi sono le due principali caratteristiche istologiche dell'epatite cronica C e sono descritte in diverse classificazioni.

Da diversi studi sono emersi dati contrastanti riguardo l'affidabilità di stadio e soprattutto del grado di attività istologica nel predire la fibrosi. Studi non recentissimi di Yano e Kage (9, 39) mostrano una stretta correlazione tra severità di infiammazione e stadio fibrotico e sostengono che pazienti con elevato stadio (fibrosi settale con

rigenerazione nodulare) ed elevato grado di necro-infiammazione portale/periportale e lobulare sviluppano cirrosi entro 10 anni di follow up. Questi risultati sono confermati da altri studi (61, 62, 63) supportando l'ipotesi che all'aumentare del danno epatico rappresentato dall'incremento di infiammazione peggiori anche lo stadio di fibrosi. Alcuni studi di Poynard e Massard (59, 57) invece rilevano una maggior correlazione tra fibrosi e progressione rispetto al grado infiammatorio. Il primo afferma che solo l'assenza di attività è associata a evoluzione più lenta, senza effetto progressivo sulla fibrosi al crescere del grado di attività. Il secondo sostiene che la sola fibrosi è considerabile il miglior marker di fibrogenesi, dal momento che pur esistendo una correlazione con grado di attività, in circa un terzo dei pazienti esiste discordanza. In conclusione non sarebbe corretto utilizzare il termine "attività significativa" come marker surrogato di epatopatia severa perciò lo stadio di fibrosi è considerato l'elemento più predittivo di progressione verso la cirrosi.

Diversi studi hanno posto in evidenza in particolare la correlazione tra alcuni elementi clinico-anamnestici e il rischio di progressione (cfr. Tabella 1):

- *ETA' AVANZATA*: è considerato il principale fattore di rischio perché l'infezione da virus C diventa più fibrogenica con l'avanzare dell'età dell'ospite, con una probabilità di progressione in soggetti sopra ai 60 anni 300 volte superiore a quella di una popolazione avente le stesse caratteristiche ma età inferiore ai 40 anni. (Ciò è probabilmente spiegabile con una maggiore vulnerabilità agli agenti ambientali dell'organismo anziano, in particolare allo stress ossidativo, alla riduzione del flusso ematico, alla riduzione delle funzioni mitocondriali, alla ridotta capacità di difesa immunitaria che fa sì che i meccanismi di risposta all'HCV siano più deboli). Lo stesso vale per la progressione della recidiva di epatite C sul fegato trapiantato: l'età più avanzata del donatore è un fattore di rischio per recidiva che porta a più severe epatiti post-trapianto e a più breve tempo di progressione verso la cirrosi (9, 59, 57, 58, 64).

- *SESSO MASCHILE*: le epatopatie croniche progrediscono a ritmi diversi nei due sessi e le principali sequele come cirrosi e HCC sono più frequenti negli uomini. Nell'HCV il sesso maschile rappresenta un

fattore di rischio indipendente per la progressione della malattia con un tasso di progressione 10 volte più rapido rispetto al sesso femminile, indipendentemente dall'età considerata (57). Sembrano giocare un ruolo importante gli estrogeni, che in esperimenti di danno epatico indotto artificialmente hanno mostrato la capacità di modulare la fibrogenesi, bloccando la proliferazione delle cellule stellate e la fibrogenesi da loro operata. Il meccanismo d'azione degli estrogeni rimane da chiarire: è stata suggerita un'azione di "scavenger" di radicali liberi basata sull'ipotesi che il danno da specie reattive dell'ossigeno stimoli la sintesi di collagene. Altro meccanismo d'azione è la loro capacità di modificare l'espressione di mediatori solubili come il TGF- β (57, 65).

- *ALCOOL*: il ruolo del consumo di alcool è stato stabilito per livelli di assunzione superiori a 40-50 g/die. Per livelli di apporto minori i risultati sono discordanti e in generale le conclusioni devono essere prudenti data la difficoltà di quantificare con certezza l'assunzione. Comunque sembra che il consumo di alcool influenzi la velocità di progressione in particolare in pazienti in stadi medio-avanzati, che sia meno influente dell'età e diventi significativo solo a livelli tossici di apporto (57, 66).

- *COINFEZIONE DA HIV*: la prevalenza di cirrosi nei pazienti coinfectati da virus HCV-HIV è tre volte superiore a quella di pazienti con la sola infezione da HCV. Diversi studi hanno dimostrato che la sieropositività da HIV accelera la progressione fibrotica dovuta all'epatopatia cronica C. In particolare sembra che nel paziente coinfectato, un consumo alcolico superiore ai 50 g/die, una conta delle cellule CD4 inferiore a 200/ μ L ed età superiore a 25 anni al momento dell'infezione da HCV abbiano un importante valore prognostico negativo (45).

- *GENOTIPO*: fattori virus-relati come genotipo, carica virale al momento della biopsia e quasispecie non sono associati a fibrosi (8, 59, 57).

• *FATTORI METABOLICI:*

- **STEATOSI:** è un reperto istologico frequente nelle persone con epatopatia cronica HCV relata, e risulta presente dal 30 al 70% dei casi (62) suggerendo che l'infezione abbia un ruolo nel determinare l'accumulo di grasso epatico. Nella popolazione generale le due principali cause di steatosi cioè alcool e diabete mellito di tipo 2, giocano un ruolo importante anche nell'epatite cronica C. La maggioranza degli studi è concorde nell'affermare che la steatosi rifletta la severità di malattia in quanto è associata ad una maggiore attività necroinfiammatoria e fibrosi (57, 63) ed anche a una maggiore incidenza di HCC, indipendentemente da età, cirrosi, terapia antivirale (57). Non è invece ancora chiaro quanto sia stretta la relazione tra virus C e steatosi, quanto la steatosi sia la causa di una più rapida evoluzione della malattia e quanto invece essa sia una conseguenza delle alterazioni metaboliche (obesità, insulino resistenza, dislipidemia) presenti nel paziente indipendentemente dall'infezione. Fartoux propone il meccanismo della perossidazione lipidica per spiegare l'associazione col danno epatico: secondo l'ipotesi dei due colpi la steatosi aumenta la sensibilità degli epatociti allo stress ossidativo e l'intervento dell'infezione cronica C comporta produzione di specie reattive dell'ossigeno (63).

- **DIABETE:** dati epidemiologici documentano una associazione tra epatite C e diabete di tipo 2 e generalmente lo stadio di fibrosi risulta più elevato in individui diabetici. In un ampio studio condotto su 710 pazienti è stata dimostrata l'associazione tra elevati livelli di glicemia e fibrosi più avanzata (68). Sembra che l'impatto fibrogenico dell'iperglicemia sia più alto dell'impatto dell'obesità, suggerendo che la misurazione della glicemia possa fornire informazioni sul ruolo fibrogenico della sottostante insulino-resistenza più accuratamente rispetto alla misurazione del body mass index (BMI). Nel valutare l'impatto dell'insulino resistenza sulla progressione del danno epatico bisogna considerare vari aspetti: è probabile che abbia un effetto indiretto attraverso la via della steatosi in quanto l'insulino resistenza ha come effetto l'aumento della lipolisi negli adipociti con incremento degli acidi grassi liberi circolanti e inibisce l'ossidazione dei lipidi epatici risultante in deposizione di trigliceridi negli epatociti. Inoltre è dibattuto se l'insulino resistenza sia causa o piuttosto conseguenza della steatosi poiché l'eccesso di acidi grassi liberi circolanti sembra

avere un ruolo nell'indurre la down regulation di un componente del recettore dell'insulina. Infatti riducendo sperimentalmente la steatosi migliora l'insulino resistenza (66). Ad avvalorare invece l'ipotesi del ruolo diretto dell'insulino resistenza diversi studi (69, 63, 66, 70) suggeriscono che essa giochi un ruolo nello stimolare la mitogenesi delle HSC, la sintesi di collagene e la sovraespressione di fattori di crescita dei connettivi. Si ipotizza che parte della accelerazione della progressione verso la cirrosi osservata nell'età più avanzata sia attribuibile allo sviluppo di insulino resistenza tipico di questa età. Un fattore che può inficiare la correttezza di tali studi è l'alterazione dell'omeostasi glucidica cirrosi-indotta, anche se si documenta un'associazione significativa tra DM2 e fibrosi anche dopo l'esclusione dei pazienti cirrotici. Sembra comunque che una glicemia alta sia particolarmente associata a stadi di fibrosi intermedi e avanzati, suggerendo un ruolo più importante nel perpetuare il danno piuttosto che nell'iniziarlo (70).

- **OBESITA'**: In generale l'obesità sembra peggiorare l'istologia dell'epatite cronica. E' stata documentata una significativa associazione tra obesità e steatosi e tra steatosi e fibrosi ma non un'associazione diretta tra obesità e fibrosi. In generale le persone obese hanno fibrosi più avanzata di quelle magre, ma ciò non appare indipendente da altri fattori come iperglicemia e diabete. Probabilmente tali risultati derivano dal fatto che negli studi fatti mancava la distinzione tra obesità viscerale e periferica dal momento che solo quella viscerale è correlata a insulino-resistenza e alle sue complicanze, in particolare steatosi. Quindi, per via delle complesse interazioni tra insulino resistenza e danno epatico non è chiaro lo specifico contributo dell'obesità. E' comunque dimostrato che una perdita di peso si accompagna alla riduzione della steatosi, ad un miglioramento della sensibilità all'insulina e al calo dei livelli dei markers di attivazione delle HSC e di conseguenza ad una ridotta fibrosi, e ancora, che il trattamento chirurgico dell'obesità è seguito dalla diminuzione della fibrosi epatica (70).

Per quanto riguarda il rischio di fibrosi in pazienti con transaminasi normali, essi generalmente hanno un tasso di progressione inferiore ma fino al 19% di essi mostra una velocità di evoluzione moderata-alta che costituisce un'indicazione importante alla terapia antivirale

per cui sarebbe raccomandabile una valutazione preliminare dello stadio di fibrosi in tutti i pazienti con positività per HCV-RNA.

Sono particolarmente a rischio di progressione adulti con infezione cronica e transaminasi normali sopra ai 65 anni in quanto più frequentemente sono portatori di fibrosi estesa (70)

1.7 INTRODUZIONE ALLE RETI NEURALI ARTIFICIALI (ANN)

Le reti neurali rientrano nel filone dell'intelligenza artificiale. Quest'ultima è l'area dell'informatica dedicata alla produzione di programmi capaci di elaborazione sofisticata simile a quella cerebrale. L'idea di base è di riprodurre l'intelligenza e in particolare modo l'apprendimento simulando all'elaboratore la struttura neuronale del cervello.

Il cervello umano contiene 100 miliardi di neuroni che costituiscono i nodi della nostra rete neurale. Tra essi vi sono milioni di miliardi di connessioni tramite le sinapsi. Ogni neurone ha una soglia di attivazione caratteristica: se i segnali provenienti da altri neuroni la superano, esso si attiva e trasmette un segnale elettrico lungo l'assone che arriva ai dendriti di altri neuroni. Le sue due caratteristiche fondamentali sono: plasmabilità e scomposizione dell'informazione. Plasmabilità perché le sinapsi possono modificarsi nel tempo interagendo con i segnali dal mondo esterno e scomposizione perché in una rete neurale le informazioni sono scomposte in informazioni elementari contenute in ogni singolo neurone.

Una rete neurale artificiale è costituita da un gruppo di unità elementari (neuroni o nodi) legate tra loro da connessioni pesate (weighted connections). Una delle fondamentali caratteristiche è di poter imparare tramite esempi. Imparano attraverso l'esposizione a coppie di dati, associando ogni informazione che gli viene data (input) al corrispondente risultato atteso (output). Basandosi sulla conoscenza accumulata durante l'addestramento ANN assegna degli output (cioè diagnosi) a nuovi input. Perciò una volta addestrata ANN può identificare patterns o gruppi di dati mai incontrati prima. Recenti studi hanno dimostrato che l'analisi con reti neurali è potenzialmente più efficace della statistica convenzionale quando l'impatto prognostico di una variabile è influenzato da quello di altre variabili

in una funzione complessa multidimensionale e non lineare, come avviene ad esempio nel caso del nostro studio, per la predizione di fibrosi significativa in corso di epatopatia cronica (71, 72).

Il tentativo di realizzare delle simulazioni delle strutture nervose del tessuto cerebrale è sfociato nella identificazione di modelli matematici che non hanno molte affinità con i modelli biologici. Non sono ancora chiari i meccanismi di apprendimento del cervello umano e le reti sono attualmente un sistema di trattamento dell'informazione in modo distribuito con algoritmi di apprendimento dedicati.

Però esse hanno caratteristiche simili al cervello umano: capacità di apprendere tramite esempi, scarsa precisione ma alta elasticità di interpretazione dell'input, capacità di estrapolazione. L'elasticità è la cosiddetta "resistenza al rumore": un sistema programmato ha bisogno di un input ben preciso per dare una risposta corretta mentre una rete neurale è in grado di dare una risposta abbastanza corretta ad input parziali o imprecisi rispetto a quelli usati negli esempi di addestramento (73).

FUNZIONAMENTO DELLA RETE

Una rete può essere vista come un sistema in grado di dare una risposta a una domanda o di fornire un output in risposta ad un input. La combinazione input/output (la funzione di trasferimento) non viene programmata, ma ottenuta tramite un processo di "addestramento" con dati empirici.

La rete è composta da uno strato di input, formato dai diversi dati disponibili per l'analisi, uno o più strati nascosti (hidden perché non interagiscono con l'ambiente esterno) e uno strato di output, che rappresenta i diversi risultati (Figura 1). Ogni neurone di ogni strato sarà collegato ad ogni neurone dello strato successivo, mentre non vi saranno collegamenti tra i neuroni dello stesso strato. Gli strati decisionali di tale rete sono lo strato intermedio e lo strato di output non essendo lo strato di input uno strato decisionale perché non ha pesi modificabili in fase di apprendimento sui suoi ingressi.

In pratica la rete apprende la funzione che lega un output con un input attraverso la presentazione di esempi corretti di coppie input/output. Ogni nodo somma gli impulsi pesati che gli giungono dalle connessioni dell'input e produce un output che è una funzione non-lineare della rete degli input, mimando il modo in cui impulsi

sopraggiungenti si addensano su un neurone biologico che si attiva se tali segnali superano la sua soglia di attivazione (73). Per ogni input presentato alla rete nel processo di apprendimento esso si propaga lungo gli strati fino a fornire un output (predicted) che si discosta di una certa quantità delta dall'output desiderato (observed): tale segnale di errore è quindi trasmesso all'indietro (backpropagation of error) nella rete e l'algoritmo di addestramento aggiorna alcuni parametri della rete nella direzione desiderata al fine di ridurre l'errore globale al minimo.

Ogni volta che viene presentato un esempio quindi, l'algoritmo avvicina un poco i parametri della rete ai valori ottimali per la soluzione dell'esempio: in tal modo l'algoritmo cerca di "accontentare" tutti gli esempi un po' per volta. I parametri di cui si parla sono i pesi o fattori di collegamento tra i neuroni che compongono la rete.

Dopo la fase di apprendimento, la rete è in grado di fornire un output in risposta ad un input anche diverso da quelli usati negli esempi di addestramento. Ne consegue una capacità della rete di interpolazione ed estrapolazione sui dati del training set utile per il trattamento e la previsione di fenomeni di cui non sia chiaro matematicamente il legame tra input e output. In ogni caso la rete si comporta come una "black box", poiché non svela in termini leggibili la funzione di trasferimento che è contenuta al suo interno (72). Di questo tipo fa parte la rete a retropropagazione dell'errore o error back propagation che è quella attualmente più utilizzata per efficacia e flessibilità.

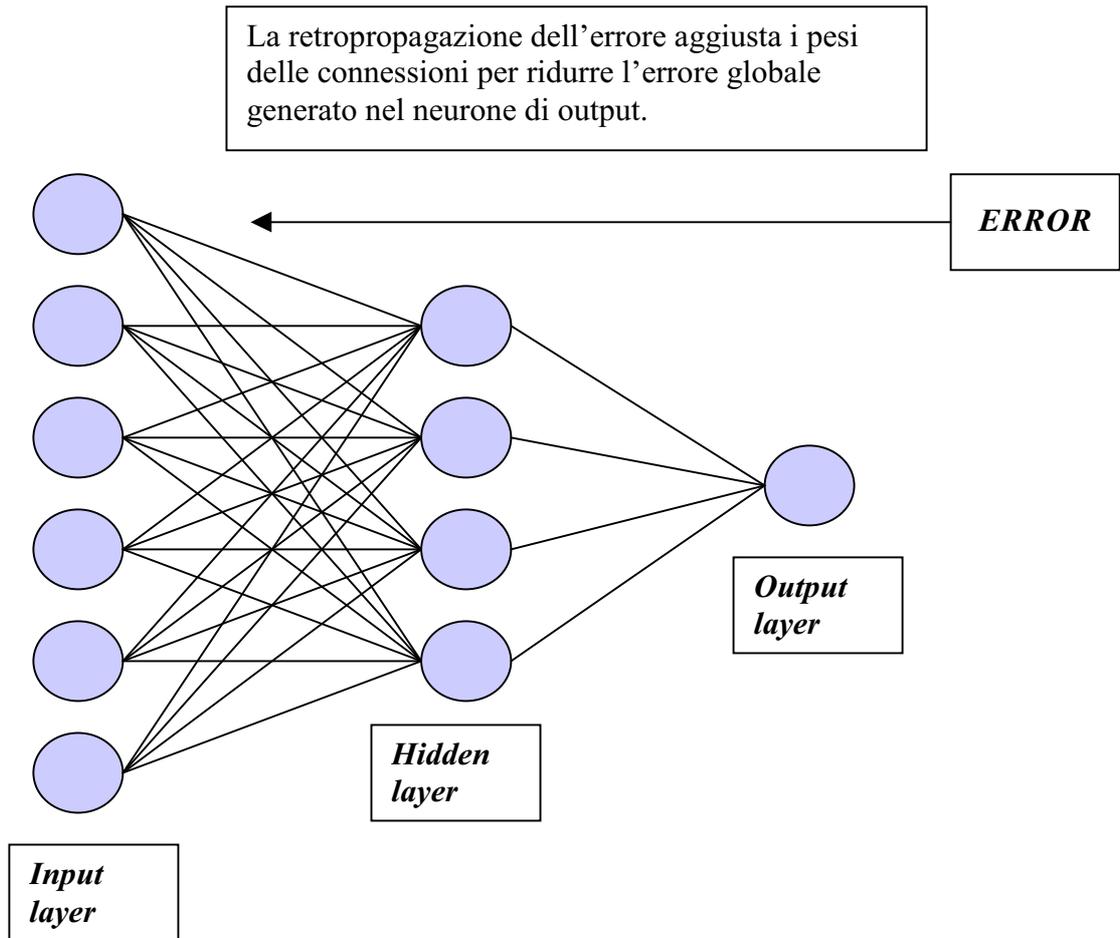


Figura 1. Esempio di rete neurale a tre strati con retropropagazione dell'errore.

2. SCOPI DELLO STUDIO

Scopi dello studio sono stati di stabilire l'accuratezza di un'analisi con reti neurali artificiali nell'identificare la presenza di fibrosi epatica significativa (stadio secondo Scheuer \geq 2), confrontare i risultati con quelli di alcuni modelli di predizione non invasiva di fibrosi epatica basati su parametri clinico-laboratoristici, in particolare l'indice APRI e l'indice FORNS ed infine effettuare una validazione dell'analisi con rete neurale testandola su gruppi esterni.

3. PAZIENTI E METODI

Lo studio ha previsto lo sviluppo della rete neurale su di un cosiddetto gruppo interno e la sua successiva validazione su gruppi esterni.

Il gruppo interno era formato da un totale di 272 pazienti con epatopatia cronica HCV-relata studiati retrospettivamente. Inizialmente sono stati raccolti 230 casi consecutivi provenienti dalle cartelle del Dipartimento di malattie infettive dell'ospedale Maggiore di Parma. Si tratta di pazienti con epatite virale cronica HCV sottoposti a biopsia epatica tra il 1998 e il 2006 ai fini di una stadiazione prima di effettuare la terapia antivirale.

In questo gruppo lo stadio più avanzato di fibrosi F4 era scarsamente rappresentato. Ciò probabilmente deriva dal fatto che l'ecografia è la metodica di prima linea nella valutazione del paziente con epatopatia cronica ed essa da sola è dotata di sensibilità sufficiente allo scopo di diagnosticare o escludere la cirrosi, mentre la biopsia rimane limitata a quei casi in cui si richieda la valutazione accurata del grado di attività infiammatoria e stadio fibrotico in vista di specifica terapia.

Perciò, allo scopo di sviluppare la rete neurale in maniera ottimale, cioè con percentuali di pazienti rappresentanti i diversi stadi di fibrosi F0 - F4 in modo equilibrato, sono stati aggiunti 42 ulteriori pazienti in stadio F4 provenienti dalla casistica dell'ospedale Sant'Orsola - Malpighi di Bologna e sottoposti a resezione epatica per HCC tra il 1996 e il 2006. Questa casistica rappresenta quindi pazienti con cirrosi ottimamente compensata, in quanto quelli con cirrosi avanzata non trovano indicazione a resezione epatica anche in presenza di tumore maligno e rappresentano quindi pazienti simili a quelli che potrebbero venire sottoposti a biopsia.

Il gruppo esterno era formato da 214 pazienti di cui 174 arruolati retrospettivamente presso il centro di Padova e 40 presso l'Ospedale di Rimini.

I criteri di inclusione nel gruppo di studio sono stati:

- 1) Presenza di epatopatia cronica virus C relata (HCV-IgG, HCV-RNA positività);
- 2) Epatopatia in fase di ottimo compenso (Classe Child-Pugh A5);
- 3) Raccolta dei dati clinici ed esecuzione di esami ematici al momento della biopsia o della resezione epatica;

4) Lunghezza del frustolo bioptico non inferiore ad 1 cm nei pazienti sottoposti a biopsia epatica.

Di ciascun paziente sono stati raccolti i seguenti dati: età, sesso, GOT (UI/L), GPT (UI/L), Gamma GT (UI/L), fosfatasi alcalina (UI/L), bilirubina totale e diretta (mg/dL), proteine totali e percentuale di albumina, creatinina (mg/dL), emoglobina (g/dL), conta piastrinica ($\times 10^3/\mu\text{L}$), conta globuli bianchi ($\times 10^3/\mu\text{L}$), PT(%), colesterolo (mg/dL), stato sierologico HBV (HBsAg e HBcAb).

Lo stadio di fibrosi è stato valutato in base al sistema di stadiazione di Scheuer che prevede 4 stadi di fibrosi:

0 = fibrosi assente

1 = tratti portalì allargati e fibrotici

2 = setti periportalì o porto-portalì ma architettura parenchimale intatta

3 = fibrosi con distorsione dell'architettura ma non cirrosi franca

4 = cirrosi.

La distribuzione dei vari stadi di fibrosi tra i gruppi in studio è mostrata nella tabella 1.

Stadio Fibrosi	Gruppo interno Parma-Bologna (n=272)	Gruppo esterno Padova (n=174)	Gruppo esterno Rimini (n=40)
F0	4% (11 pz)	2.9% (5 pz)	25% (10 pz)
F1	30.5%(83pz)	33.3% (58 pz)	30% (12 pz)
F2	29.1%(79pz)	43.7% (76 pz)	20 % (8 pz)
F3	15,1% (41 pz)	10.9% (19 pz)	17.5% (7 pz)
F4	21.3% (58pz)	9.2% (16 pz)	7.5% (3 pz)

Tabella 1. Distribuzione degli stadi di fibrosi tra i gruppi oggetto di studio.

Gli indici APRI e FORNS sono stati calcolati secondo le seguenti formule:

1) APRI = GOT x 100 / piastrine;

2) FORNS = 7.811 - 3.131*LN(piastrine) + 0.781*LN(GOT) + 3.467*LN(età) - 0.014*LN(colesterolo).

3.1 SVILUPPO DELLA RETE NEURALE

Tutte le variabili cliniche dei 272 pazienti in studio sono state inizialmente considerate potenzialmente in grado di predire lo stadio di fibrosi. Tale correlazione è stata indagata per mezzo dell'ANOVA test. Le variabili risultate significative all'ANOVA, cioè differenti tra i pazienti con o senza fibrosi di diverso grado, sono state quindi trasformate nei loro logaritmi naturali ed utilizzate per costruire la rete neurale. La trasformazione logaritmica serve a bilanciare la distribuzione non gaussiana dei dati. Seppur statisticamente correlate allo stadio di fibrosi le variabili Proteine totali, GPT e Fosfatasi alcalina non sono state incluse nell'analisi per i seguenti motivi: Proteine totali e GPT, rispettivamente con percentuale di albumina e GOT, sono risultate significativamente correlate al Pearson test ($p < 0.001$ in entrambi i casi); la Fosfatasi alcalina è stata misurata con un sistema di laboratorio diverso tra i pazienti sottoposti a biopsia epatica presso l'ospedale di Parma e a resezione presso l'ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.

Le variabili età, GOT, GGT, colesterolo totale, percentuale di albumina, PT e conta piastrinica sono state inizialmente utilizzate per costruire la rete neurale. La rete neurale in principio è stata costruita con un input layer formato da 7 neuroni, un hidden layer formato da 4 neuroni ed un output layer a rappresentare lo stadio di fibrosi secondo Scheuer nell'intervallo tra 0 e 4. La rete è stata allenata sul 75% della popolazione in studio per mezzo del back-propagation of error: i vari input vengono presentati alla rete neurale, la quale assegna ad ogni variabile un determinato "peso" (weight of connection) nel determinare l'output. Al termine dell'assegnazione dei pesi viene generato un risultato (predicted output), che viene confrontato con il risultato atteso (observed output); dalla differenza tra i due output si genera un errore e i pesi di ogni variabile vengono quindi modificati allo scopo di ridurre questo errore al minimo. Il 25% della popolazione in studio è stata utilizzata come cross-validation group: questo gruppo è indispensabile alla rete neurale per evitare che memorizzi il risultato anziché trovare il peso giusto di ogni variabile e generalizzare il risultato ottenuto, l'assenza di questo gruppo

comporterebbe un'ottima predittività nel training group ma una scarsa predittività in un gruppo di pazienti mai osservati dalla rete neurale.

Allo scopo di determinare la serie ottimale di variabili nel predire il risultato atteso tra quelle significative all'ANOVA, è stata eseguita l'analisi della sensibilità della rete. Tale analisi fornisce la relativa importanza delle variabili immesse nel determinare l'output, con il valore 0 a rappresentare una variabile che non ha validità nella predizione e il valore 1 rappresentante una variabile che invece ha la massima efficacia nella predizione: le variabili risultate senza valore predittivo sono state escluse dalla rete. La variabile GGT è così stata esclusa dalla rete neurale ed il modello finale è formato da 6 neuroni nell'input layer (età, colesterolo totale, piastrine, GOT, percentuale di albumina e PT).

La rete neurale ottenuta è stata quindi allenata nuovamente su 123 pazienti scelti casualmente dal numero totale (training group; 45%) con un cross-validation group di ulteriori 54 pazienti (20%). Una volta ottenuta una buona predittività nel training group la rete è stata testata sui rimanenti 95 pazienti (35%) sconosciuti alla rete neurale, allo scopo di determinare la sua abilità nella predizione della fibrosi in un set di pazienti mai osservati in precedenza (testing group).

Una volta selezionata la rete migliore in termini di accuratezza predittiva essa è stata testata sui rimanenti 95 pazienti (35%) sconosciuti alla rete (Testing Set), sui gruppi di convalida esterni (Padova e Rimini), e infine su un gruppo risultante dalla somma di Testing Set e Gruppi Esterni allo scopo di confermare il suo potere predittivo e verificare la possibilità di applicare il sistema a diversi gruppi di pazienti.

3.2 ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono state espresse in media e deviazione standard. La correlazione con i vari stadi di fibrosi è stata eseguita applicando l'ANOVA test. Le abilità predittive dell'APRI, del Forns e della rete neurale sono state indagate per mezzo sia del coefficiente di correlazione di Spearman (ρ) sia della receiver operating characteristic analysis (ROC) nei seguenti cut-off di stadio di fibrosi:

F0 / F1 versus F2 - F4; F0 - F2 versus F3 / F4. L'analisi ROC è il metodo raccomandato per stabilire l'accuratezza di un test diagnostico. Le aree sotto la curva ROC dei tre sistemi predittivi sono state comparate con il metodo di Hanley – McNeil. I risultati sono stati espressi in termini di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo per i migliori cut-off. L'accuratezza della rete neurale è stata rappresentata anche come rapporto di probabilità negativo o positivo (likelihood ratio). Tale rapporto incorpora la sensibilità e la specificità di un test in una singola misura, che è indipendente dalla prevalenza della malattia nella popolazione, rendendo il risultato meglio applicabile a diverse composizioni del campione. Un rapporto di probabilità positivo/negativo può essere usato rispettivamente per avvalorare o escludere la diagnosi di malattia con una efficacia proporzionale a valori più o meno elevati.

Valori superiori a 10 indicano elevato rapporto di probabilità (alto valore predittivo positivo) mentre valori tra 5 e 10 hanno moderato potere predittivo positivo. Per rapporti di probabilità negativi, i valori indicanti alto o moderato potere predittivo si collocano rispettivamente sotto 0.1 e tra 0.1 e 0.2. Valori intorno all'1 indicano che non si possono trarre informazioni utili dalle variabili cliniche né per porre diagnosi di inclusione né di esclusione.

Una $p < 0.05$ è stata considerata significativa in tutte le analisi. La rete neurale è stata costruita per mezzo di Neurosolution V4.0 (Neurodimension inc, Fl, USA), l'ANOVA e l'analisi ROC sono state eseguite per mezzo di MedCalc 7.2.1.0 (MedCalc software, Mariakerke, Belgium).

4. RISULTATI

4.1 ANALISI DI VARIABILI SINGOLE

Le variabili età, GOT, GPT, GGT, fosfatasi alcalina, percentuale di albumina, conta piastrinica, PT e colesterolo totale sono risultate significativamente correlate allo stadio di fibrosi mentre la bilirubina totale è risultata uguale tra i diversi stadi di fibrosi.

In particolare:

- 1) la fibrosi aumenta all'aumentare dell'età;
- 2) le GOT e le GPT crescono con l'aumentare dello stadio di fibrosi, tuttavia non c'è differenza tra i valori di F3 rispetto ad F4 ($P>0.05$);
- 3) la GGT aumentano all'aumentare dello stadio di fibrosi, tuttavia non c'è differenza tra i valori di F3 rispetto ad F4 ($P>0.05$);
- 4) la fosfatasi alcalina aumenta all'aumentare dello stadio di fibrosi, tuttavia i diversi metodi di analisi di laboratorio tra il gruppo sottoposto a biopsia (Parma) e a resezione (Bologna) non consentono di considerare questo dato attendibile, tale variabile è stata quindi esclusa da ulteriori analisi;
- 5) la percentuale di albumina, l'INR, la conta piastrinica ed il colesterolo totale scendono all'aumentare dello stadio di fibrosi; tuttavia non vi è differenza nell' INR tra F0 ed F1 ($P>0.05$).

4.2 RETE NEURALE

La figura 2 riporta i diversi pesi delle variabili considerate nel determinare l'output della rete neurale. Si può osservare che il maggior contributo viene fornito dalla percentuale di albumina, mentre le GGT non forniscono alcun contributo all'output e vengono escluse dalla rete neurale.

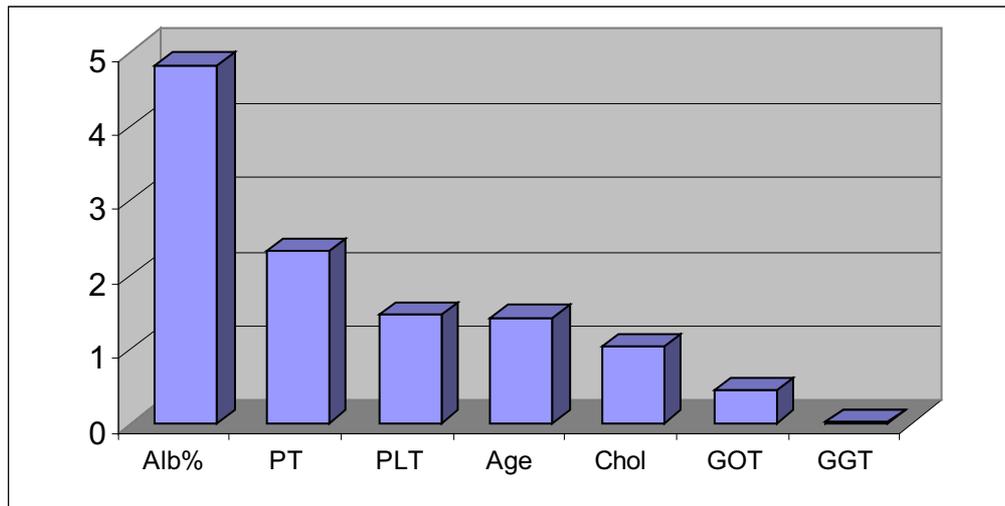


Figura 2. Analisi di sensibilità delle variabili della rete neurale; i valori mostrati per ogni variabile sono una misura della sua importanza relativa.

La rete neurale artificiale finale è quindi composta dalle prime sei variabili (Figura 6).

ANN: 6 – 4 – 1

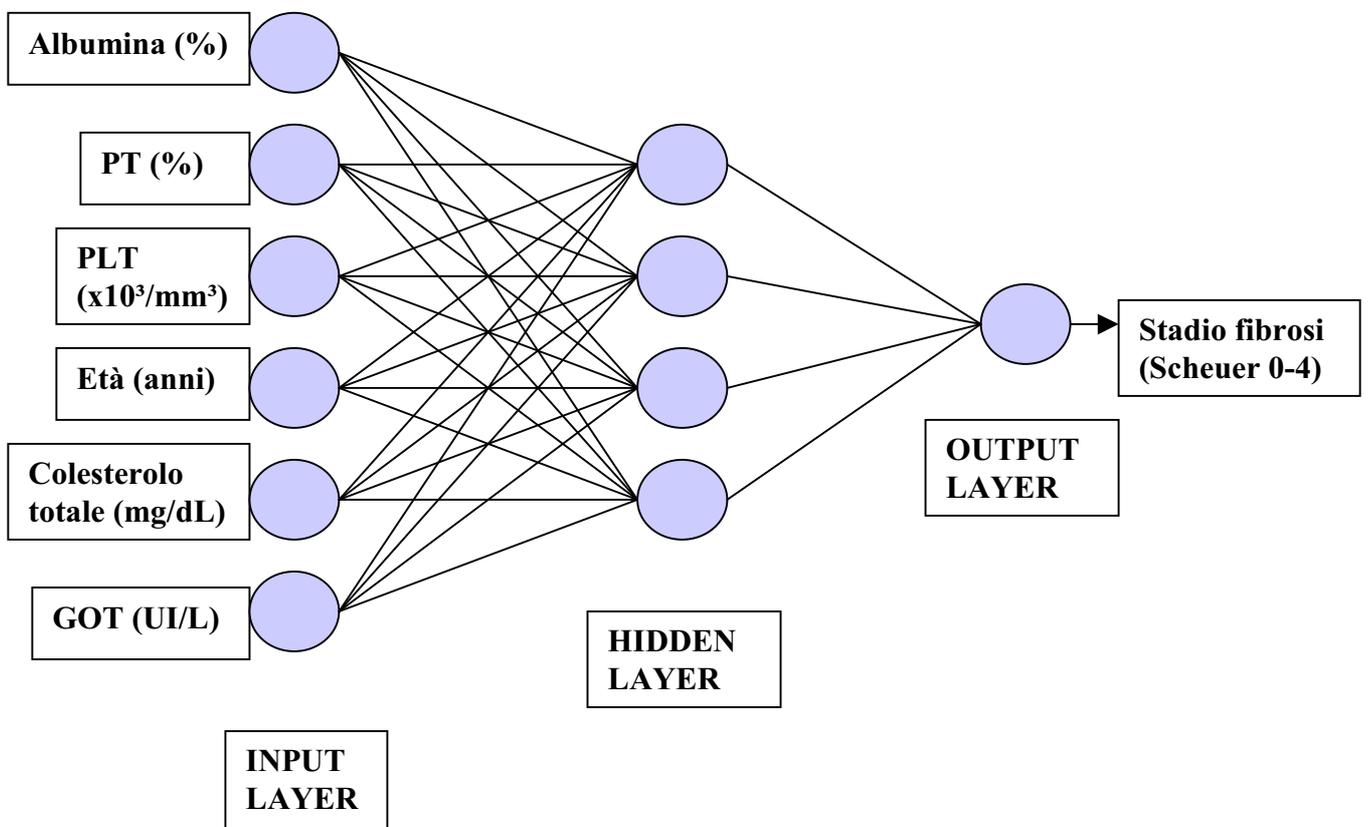


Figura 6. Rappresentazione schematica del modello di rete neurale artificiale (ANN) a tre strati sviluppato per identificare lo stadio di fibrosi.

Nel gruppo di 95 pazienti del testing group interno il coefficiente di Spearman (rho) per la rete neurale è di 0.699, più elevato di quello dell'APRI (0.503) e del FORNS (0.558) indicando una migliore accuratezza della rete neurale rispetto a questi indici nel predire i diversi stadi di fibrosi. Tale coefficiente si mantiene più elevato per la rete neurale (0.611) rispetto a quello dell'APRI (0.545) e del FORNS (0.528) anche nei gruppi di convalida esterni sommati al testing group.

Considerando il gruppo interno la performance di ANN risulta essere la migliore nel predire stadi più avanzati di fibrosi epatica (F0-F2 versus F3/F4) con AUC di 0.88 vs 0.75 (P= 0.013) e 0.80 (P= 0.029) di APRI e Forns rispettivamente.

In tal caso il cut-off dell'analisi con ANN avente maggiore specificità, PPV e PLR è risultato essere 3.2 (vedi Tabella 2) ovvero al di sopra di questa soglia la probabilità di avere fibrosi F3 – F4 è del 100% (Specificità e PPV = 100%; PLR tendente ad infinito).

OUTPUT	Sensib (%)	Specif(%)	PPV (%)	NPV (%)	PLR	NLR
1.2	100	21.1	45.8	100	1.27	-
1.7	81.6	59.6	57.4	82.9	2.02	0.31
2.2	73.7	89.5	82.4	83.6	7	0.29
2.6	60.5	98.2	95.8	78.9	34.5	0.40
3.2	42.1	100	100	72.2	∞	0.58

Tabella 2. Accuratezza diagnostica dell'analisi con ANN nella predizione degli stadi di fibrosi F3-F4 vs F0-F2 per i diversi livelli di cut-off di output.

Il confronto tra i tre metodi non raggiunge significatività statistica nella predizione di fibrosi significativa ($F \geq 2$) nonostante i risultati apparentemente migliori ottenuti dalla rete neurale (tabella 5).

La Tabella 3 mostra un confronto tra i risultati dei tre metodi non invasivi ANN, APRI e FORNS nell'identificare fibrosi significativa ($\geq F2$) considerando i rispettivi migliori valori di cut-off.

	ANN	APRI	FORNS
Cut -off	2.5	0.28	9.1
Sensibilità (%)	49.1	68.4	47.4
Specificità (%)	100	68.4	97.4
PPV (%)	100	76.5	96.4
NPV (%)	56.7	59.1	55.2
PLR	∞	2.17	18.0
NLR	0.52	0.46	0.54

Tab 3. Confronto tra i risultati dei tre metodi non invasivi nell'identificare fibrosi significativa (≥ 2 sec. Scheuer) nel testing group.

La Tabella 4 riporta invece i valori di sensibilità, specificità, i valori predittivi positivi (PPV) e negativi (NPV), i likelihood ratio positivi (PLR) e negativi (NLR) in rapporto ai diversi cut-off considerati dell'output della rete neurale nella predizione di fibrosi significativa ($\geq F2$).

Per valori inferiori a 1.2 la sensibilità è del 100% con un valore predittivo negativo del 100% ed un rapporto di probabilità negativo tendente a zero: ciò significa che al di sotto di questa soglia la probabilità di avere uno stadio di fibrosi F0 – F1 è del 100%. Per valori intermedi si ottengono dei bassi rapporti di probabilità positivi (sempre inferiori a 5) e degli alti rapporti di probabilità negativi (sempre superiori a 0.2) che riflettono la parziale sovrapposizione dei due gruppi (F0 – F1 vs F2 – F4) rispetto all'output della rete neurale. Tuttavia per valori superiori a 2.5 la specificità è del 100% con un PPV del 100% ed un PLR tendente ad infinito: ciò significa che al di sopra di questa soglia la probabilità di avere fibrosi F2 – F4 è del 100%.

OUTPUT	Sensib(%)	Specif (%)	PPV(%)	NPV(%)	PLR	NLR
1.2	100	21.1	65.5	100	1.27	-
1.5	89.5	47.4	71.8	75	1.70	0.22
1.8	70.2	68.4	76.9	60.5	2.22	0.44
2.0	57.9	76.3	78.6	54.7	2.44	0.55
2.3	50.9	97.4	96.7	56.9	19.33	0.50
2.5	49.1	100	100	56.7	∞	0.52

Tab 4. Accuratezza diagnostica dell'analisi con ANN nel predire fibrosi significativa ($F \geq 2$) sul testing group a differenti valori di cut-off di output della rete

Quando applicato sui gruppi esterni, il modello di rete neurale elaborato mantiene un'accuratezza simile a quella osservata nel primo gruppo, in particolare, nella valutazione di F3-F4, l'applicazione della rete al gruppo formato dal totale di testing Set + gruppi esterni ne conferma la superiorità nei confronti degli altri due metodi con un'area sotto la curva ROC di 0.88 (95% C.I. 0.83-0.91) contro 0.83 (0.78-0.87) di entrambi APRI e FORNS.

Anche in questo caso il confronto tra i tre metodi non raggiunge significatività statistica nella predizione di fibrosi significativa ($F \geq 2$).

Fibrosi ≥ 2	ANN	APRI	FORNS
Parma-Bologna	0.79 (0.66-0.87)	0.73(0.63-0.82)	0.74 (0.64-0.82)
Padova	0.72(0.64-0.78)	0.75(0.68-0.81)	0.68(0.61-0.75)
Rimini	0.91(0.78-0.98)	0.80(0.64-0.91)	0.86(0.71-0.95)
*Testing Set e gruppi esterni	0.77 (0.72-0.82)	0.75(0.69-0.79)	0.74(0.68-0.79)

Tab 5. Confronto tra le curve ROC dei tre metodi non invasivi nell'identificare fibrosi significativa ($F \geq 2$)

***valori di P**

ANN vs APRI=0.297

ANN vs FORNS=0.105

APRI vs FORNS=0.749

5. DISCUSSIONE

Il virus dell'epatite C (HCV) è la principale causa di epatopatia cronica con circa 170 milioni di persone infettate nel mondo (56). E' la principale causa di cirrosi e costituisce la più frequente indicazione al trapianto di fegato. L'aumento di incidenza nelle ultime decadi è risultato in un aumento del numero di pazienti da sottoporre a valutazione diagnostica, prognostica e terapeutica. La storia naturale dell'infezione da virus C rimane ancora oggetto di controversie. Studi fatti su pazienti a partire dall'esordio di malattia suggeriscono che l'infezione cronica da HCV sia una malattia relativamente benigna in quanto la maggior parte dei pazienti rimane asintomatica dopo venti anni di follow up e l'incidenza di eventi clinicamente rilevanti (cirrosi, scompenso epatico, HCC) sembra essere bassa. In contrasto, da studi valutanti le conseguenze a lungo termine di epatiti croniche precedentemente diagnosticate, emerge che lungo un follow up di due decadi, una significativa porzione di pazienti (20-30%) sviluppa cirrosi (66).

La velocità di progressione verso la cirrosi è soggetta ad una notevole variabilità inter individuale. Studi su larga scala portati avanti da Poynard e colleghi identificano tre categorie di pazienti: i progressori rapidi, intermedi e lenti con un tasso medio di progressione verso la cirrosi di circa trenta anni. I fattori più significativamente associati al rischio di progressione sono risultati l'età avanzata al momento dell'infezione, il sesso maschile, l'eccessivo consumo di alcool seguiti da fattori metabolici e dalla coinfezione da HIV. A causa di tale variabilità, al momento della diagnosi è difficile predire il rischio di evoluzione di malattia nel singolo paziente.

La valutazione dell'istologia epatica è perciò parte essenziale dell'inquadramento diagnostico iniziale del paziente affetto da epatopatia cronica virale. Lo stadio di fibrosi è il più importante endpoint surrogato nel predire morbilità e mortalità a fini prognostici e nel valutare l'impatto della terapia antivirale sulla storia naturale della malattia. Esso è la deleteria e variabile conseguenza dell'infiammazione epatica cronica ed è caratterizzata dalla deposizione di componenti della matrice extracellulare con successiva distorsione dell'architettura epatica, alterazione del microcircolo e della funzione epatocitaria.

Pertanto, dal momento che la storia naturale della malattia risulta variabilmente influenzata da fattori ambientali, legati all'ospite e virus relati, essa non costituisce uno strumento affidabile e generalizzabile ad ogni singolo paziente. In base a tali considerazioni, la conoscenza dello stadio fibrotico diventa essenziale per stabilire la prognosi e per supportare decisioni terapeutiche, tenendo conto del fatto che la terapia antivirale è costosa, gravata da numerosi effetti collaterali e non sempre efficace. Infatti il riscontro di malattia lieve (equivalente a fibrosi minima o assente) indica probabile una lenta progressione e la possibilità di ritardare il trattamento, mentre i pazienti con malattia avanzata (fibrosi significativa) quasi invariabilmente svilupperanno cirrosi nell'arco di 10-20 anni perciò necessitano di un'immediata valutazione del regime terapeutico più appropriato (46). E ancora in caso di diagnosi di cirrosi, va considerato l'inizio di un attento follow up per la diagnosi precoce di HCC e delle altre complicanze della cirrosi.

La biopsia epatica è tuttora la tecnica considerata il gold standard per individuare presenza e stadio di fibrosi. Ma si tratta di una procedura invasiva, non sempre tollerata dal paziente, con controindicazioni e complicanze, prima fra tutte il dolore presente fino a un 25% dei casi (76). E' inoltre soggetta ad elevata variabilità interosservatore nella stadiazione e comporta un rischio di sottostimare la cirrosi del 15-30%. Per questo negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse verso la possibilità di identificare la fibrosi epatica utilizzando marcatori non invasivi, misurabili nel sangue periferico.

Dai numerosi studi pubblicati possiamo trarre alcune conclusioni (24). Quando usati singolarmente i parametri biochimici misurati di routine (GOT, GPT, GGT, PT, albumina) hanno limitata accuratezza diagnostica, se invece vengono inclusi in scores multiparametrici (AAR, APRI, Forns) possono correttamente classificare fino al 50% dei pazienti. Tests più elaborati (Fibrotest) possono ulteriormente aumentare l'accuratezza diagnostica. I markers diretti di ECM sono associati con lo stadio istologico in quasi tutti gli studi ma con significative sovrapposizioni per gli stadi di fibrosi vicini, comunque essi mostrano la migliore accuratezza diagnostica nel fare diagnosi di cirrosi mentre sono insufficienti nell'identificare stadi di fibrosi precoci e mancano di standardizzazione e validazione.

Il nostro studio è nato con lo scopo di stabilire l'accuratezza dell'analisi con le reti neurali artificiali nell'identificare lo stadio di fibrosi epatica. Infatti recenti studi (74, 75) hanno dimostrato che una analisi con reti neurali artificiali ha potenzialmente più successo rispetto alle tecniche statistiche convenzionali quando l'impatto prognostico di una variabile è influenzato da quello di altre variabili in una funzione complessa, multidimensionale e non lineare. Tale situazione può essere il caso di un sistema biologico complesso come la progressione della fibrosi nelle epatopatie croniche.

Abbiamo costruito la rete neurale usando comuni parametri clinico-laboratoristici disponibili al momento della biopsia e testato la sua abilità nell'identificare fibrosi significativa. Lo studio evidenzia che l'analisi con ANN, basata su 6 parametri facilmente accessibili, è uno strumento valido e affidabile nel predire la presenza/assenza di fibrosi significativa in pazienti con epatopatia cronica C e che tale analisi performa meglio dei metodi convenzionali di analisi con regressione logistica.

L'abilità predittiva di ANN è stata confrontata con quella di APRI e Forns per mezzo del coefficiente di correlazione di Spearman e della ROC curve analysis nei successivi cut-off di fibrosi F0/1 vs F2-4 e F0-2 vs F3/4. Considerando la predizione di fibrosi significativa (F2-4) la rete neurale presenta una AUROC di 0.79 contro una AUC di APRI e Forns di 0.73 e 0.74 rispettivamente e quindi non significativamente differente.

Nella predizione degli stadi di fibrosi più avanzata (F3 – F4) invece l'abilità predittiva di ANN è risultata superiore (0.88) a quella di APRI (0.75) e Forns (0.80) evidenziando come l'accuratezza progressivamente migliori con l'aumentare della fibrosi.

Applicando la rete neurale a gruppi esterni la sua performance non cambia, ottenendo AUC simili a quelle del gruppo interno ed in particolare confermano la sua superiorità rispetto agli altri indici nel predire gli stadi più avanzati di fibrosi.

In uno dei gruppi esterni (Rimini) ANN raggiunge AUC molto elevate ma ciò potrebbe essere dovuto alla non elevata numerosità del campione e al fatto che il gruppo di pazienti con fibrosi F2 è poco rappresentato e quindi la rete riesce a discriminare più facilmente gli stadi di fibrosi avanzati da quelli precoci.

Il maggior vantaggio dell'APRI nei confronti della rete neurale è la semplicità della formula e l'utilizzo di parametri laboratoristici misurati di routine che ne fanno uno strumento utile al clinico nella pratica quotidiana al letto del paziente (32). Ha però dei limiti: mostra un valore predittivo notevolmente inferiore all'analisi con ANN, comporta una sovrapposizione tra pazienti con diversi stadi di fibrosi e necessita di conferme in studi prospettici (40).

Per quanto riguarda l'indice Forns, esso ha discreta performance in particolare nell'escludere la presenza di fibrosi significativa (32), però manca di informazioni sulla cirrosi poiché non è sufficientemente accurato nell'individuare la fibrosi significativa, avendo un valore predittivo positivo di solo 66% nello studio originale (46).

Inoltre si ipotizza che la sua accuratezza diminuisca nei pazienti portatori di genotipo HCV 3, che risulta associato a più bassi livelli di colesterolo rispetto agli altri genotipi (32).

Mentre la semplicità e la rapida disponibilità dell'APRI sono caratteristiche che lo rendono più facilmente utilizzabile rispetto ad ANN, altrettanto non si può dire del Forns'index. La complessità della formula logaritmica e la necessità di un calcolatore non lo rendono più maneggevole rispetto all'algoritmo delle reti neurali.

La performance di ANN non è stata confrontata con quella del Fibrotest, attualmente la metodica diagnostica non invasiva più studiata nella letteratura scientifica. Esso usa alcuni parametri non dosati routinariamente nel siero dei pazienti come apolipoproteinaA1, α 2-macroglobulina, aptoglobina, richiede una precisa standardizzazione nelle procedure di laboratorio e necessita dell'applicazione su calcolatore di una formula a pagamento. Inoltre i parametri utilizzati risentono dell'influenza di fattori extraepatici come infiammazione, infezione ed emolisi.

Sulla base dei promettenti risultati delle analisi con reti neurali artificiali e dato il crescente interesse a trasformare queste ultime in uno strumento al servizio del clinico nella pratica di tutti i giorni, si può prevedere che nel futuro si possa creare un programma facilmente accessibile attraverso internet dal quale ottenere una predizione del rischio di fibrosi epatica immettendo i valori delle variabili necessarie, così come è accaduto per il punteggio MELD nella valutazione prognostica dei pazienti con epatopatie in stadio finale e

conseguentemente nello stabilire la priorità in lista di trapianto di fegato.

L'analisi di sensibilità mostra che la rete neurale raggiunge la performance migliore utilizzando alcune variabili comuni all'APRI e al Forns come piastrine, età, colesterolo totale e GOT con l'aggiunta della percentuale di albumina e del tempo di protrombina.

Il maggior contributo viene fornito dalla percentuale di albumina che, come è noto, essendo sintetizzata solo dagli epatociti è un buon indicatore della capacità di sintesi del fegato. L'ipoalbuminemia è infatti di frequente riscontro nelle epatopatie croniche, riflettendo un grave danno epatico. Essa non è comunque specifica di malattia epatica e può essere presente in altre condizioni quali la malnutrizione proteica, le enteropatie protido-disperdenti, la sindrome nefrosica e le infezioni croniche.

Anche INR, conta piastrinica e colesterolo scendono all'aumentare dello stadio di fibrosi.

Per il PT vari studi hanno mostrato una buona correlazione con il grado di fibrosi anche quando preso singolarmente (37). Esso valuta complessivamente i fattori II, V, VII, e X della coagulazione che vengono sintetizzati esclusivamente dagli epatociti. Un suo allungamento perciò si osserva in caso di danno epatocitario come conseguenza di una ridotta sintesi epatica. Sono ipotizzati inoltre altri meccanismi come un'alterata carbosilazione delle proteine vitamina K dipendenti, un intrappolamento della trombina e altri fattori all'interno di componenti dell'ECM durante la capillarizzazione dei sinusoidi e il consumo di trombina operato dai suoi recettori sovraespressi sulla superficie delle HSC durante la fibrogenesi (37).

Per quanto riguarda la trombocitopenia, essa sembra correlata sia allo sviluppo di ipertensione portale che alla ridotta produzione di trombopoietina (77, 78). E'ormai accertato che l'ipertensione portale conduce ad un aumento di dimensioni della milza con sequestro piastrinico. Ma dal momento che la trombocitopenia si mantiene anche dopo splenectomia o decompressione portale (78) mentre si risolve dopo trapianto di fegato, probabilmente entrano in gioco altri meccanismi. La trombopoietina è la citochina che regola la maturazione dei megacariociti e la produzione di piastrine ed il luogo di maggiore produzione è il fegato. Nella cirrosi esiste una

correlazione diretta tra trombocitopenia e livelli circolanti di trombopoietina e tra il calo nel numero delle piastrine e l'aumentare dello stadio di fibrosi, indipendentemente dalle dimensioni della milza, perciò possiamo dire che i livelli di trombopoietina dipendono dalla massa epatica funzionante, correlando la trombocitopenia con la funzione degli epatociti ed il grado di fibrosi e necrosi.

La diminuzione dei livelli di colesterolo totale, come per l'albumina e PT, è determinata dalla ridotta capacità di sintesi del fegato fibrotico. Poiché è improbabile che tale capacità sia alterata già nelle fasi precoci di malattia, sono stati chiamati in causa altri meccanismi per spiegare l'alterato profilo lipidico di pazienti con infezione cronica virale. Fabris (79) in uno studio mostra come pazienti con infezione cronica da virus C abbiano un colesterolo sierico più basso rispetto a pazienti con HBV indipendentemente da età, sesso, funzione epatica, perciò l'autore riflette sul fatto che il profilo lipidico possa variare dipendentemente dal diverso profilo di citochine lipogeniche determinato dai differenti agenti eziologici.

Altra variabile correlata a fibrosi nell'analisi con ANN è l'età. Il suo valore come marcatore di fibrosi risulta ovvio in quanto la progressione della malattia è tempo-dipendente perciò è considerabile un marker surrogato di durata di malattia (59). Inoltre l'età al momento dell'infezione da virus C influenza l'outcome dell'epatopatia e pazienti infettati a un'età superiore ai 40 anni sono a maggior rischio di progressione di malattia (8, 59). Sicuramente la durata dell'infezione sarebbe un più preciso indicatore di fibrosi, ma il meccanismo e il momento di acquisizione del virus C rimane sconosciuto in buona parte dei pazienti rendendo difficile stabilire la durata esatta di malattia.

L'ultimo parametro emerso dall'analisi di sensibilità della rete neurale come significativo nella predizione di fibrosi è il valore di GOT. In condizioni normali le quantità di GOT e GPT circolanti sono in rapporto simile tra loro. Nella maggior parte delle epatopatie osserviamo un incremento più cospicuo di GPT dovuto a una più rapida clearance plasmatica delle GOT e dal fatto che le GPT sono localizzate esclusivamente nel citoplasma e attraversano così più facilmente le membrane cellulari danneggiate. Con l'avanzare della fibrosi il danno mitocondriale porta ad un rilascio più marcato di GOT (presente sia nel citoplasma che nei mitocondri) rispetto a GPT e

progressivamente si riduce la clearance di GOT i cui livelli aumentano nel siero.

6. CONCLUSIONI

L'analisi con reti neurali artificiali costituisce un promettente strumento non invasivo nell'identificare fibrosi epatica significativa, ottenendo accuratezza progressivamente maggiore all'aumentare dello stadio di fibrosi.

Inoltre, il fatto che la performance di ANN non diminuisca quando tale strumento è applicato a gruppi di convalida esterni, supporta l'ipotesi che, a differenza dei modelli predittivi convenzionali, il modello delle reti neurali possa essere più universalmente applicabile. In base ai risultati emersi, tale nuovo tipo di approccio non invasivo alla fibrosi sembra avere potenzialità e facilità d'uso per divenire uno strumento al servizio della pratica clinica, permettendo di ipotizzare ad esempio, la creazione di un programma accessibile tramite internet dal quale ottenere una predizione del rischio di fibrosi immettendo i valori delle variabili necessarie.

BIBLIOGRAFIA

1. Bataller R., & Brenner D. A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigations* 2005; 115: 209-218.
2. Bedossa P. and Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *Journal of Pathology* 2003; 200: 504–515.
3. Brunt E.M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31: 241-246.
4. Gareth P. Jevon. Grade and Stage in Chronic Hepatitis. *Pediatric and Developmental Pathology* 2001; 4: 372–380.
5. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology* 1991;13:372-374.
6. Bedossa P et al. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1996;24 (2): 289-293
7. Dienstag J L. The Role of Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S152-S160.
8. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups, Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-832.
9. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, et al. The long term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334-1340.
10. Gebo K et al. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology* 2002; 36: S161-S172.
11. Saadeh at al. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33 (1).
12. Bedossa et al .Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38 (6).
13. Sherlock S, Doodley J. Disease of the liver and biliary system. Oxford: Blackwell Science, 2002; 37-46.
14. Piccino F, Sagnelli E, Pasquale G, et al. Complication following percutaneous liver biopsy. A multicenter retrospective study on 68276 bipsies. *J Hepatol* 1986; 2: 165-73.
15. Tobleks AL, Nord HJ. Liver biopsy: review of methodology and complications. *Dig Dis* 1995; 13: 267-74.

16. Smith EH. Complications of percutaneous abdominal fine-needle biopsy. Review: Radiology 1991; 178: 253-58
17. Degos F, Benhamou JP. Quelles modalites ponction-biopsie du foie? Gastroenterol Clin Biol 1993 ; 17 : 197-99.
18. Vautier G, Scott B, Jenkins D. Liver biopsy: blind or guided? BMJ 1992; 309: 1455-456.
19. Van Leewen DJ, Wilson L, Crowe DR. Liver biopsy in the mid-1990s: questions and answers. Seminars in Liver Disease 1995; 15: 340-359.
20. Bedossa P, Poynard T and the metavir Cooperative group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1994; 20: 15-20.
21. Fontana RJ, Lok ASF. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2002; 36: 57-64.
22. Afdhal H, Nezam and Nunes David. Evaluation of liver fibrosis: A Concise review. American Journal of Gastroenterology 2004; 99: 1160.
23. Regev A et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. American Journal of Gastroenterology 2002; 97: 2614-2618.
24. Lichtinghagen R, Bahr MJ. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. Expert. Rev. Mol. Diagn. 2004; 4: 715-726.
25. Colloredo et al. Impact of liver biopsy size in histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. Journal of Hepatology 2003; 39: 239-244.
26. Gilmore IT, Burroughs A, Murray-Lyon IM, et al. Indications, methods and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by British Society of Gastroenterology and Royal College of Physicians of London. Gut 1995; 36: 437-441.
27. Lindor KD, Bru C, Jorgensen RA, et al. The role of ultrasonography and automatic-needle biopsy in outpatient percutaneous liver biopsy. Hepatology 1996; 23: 1079-83.
28. Caturelli E, Giacobbe A, Facciorusso D, et al. Percutaneous biopsy in diffuse liver disease: increasing diagnostic yield and decreasing complication rate by ultrasound assessment of puncture site. Am J Gastroenterol 1996; 91: 1318-21.

29. Gaiani S. et al. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *Journal of Hepatology* 1997 Vol 27, Issue 6:979-985.
30. Piscaglia et al. Influence of liver fibrosis on hepatic artery Doppler resistance index in chronic hepatitis of viral origin. *Scand J Gastroenterol*, 2001; 36(6):647-52.
31. Lenhart M, Feuerbach S. Role of computed tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of hepatitis and liver cirrhosis. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 2005;94(16):635.
32. Sebastiani G, and Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 21: 3682-3694.
33. Imperiale TF Said AT, Cummings OW et al. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology* 2000;95;2328-32.
34. Giannini E, Risso D, Botta F 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 Intern Med* 2003 ;163: 218-24.
35. Pohl A, Behling C, Oliver D et al. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictor of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *American Journal of Gastroenterol* 2001; 96; 3142-6.
36. ParkGJ, Lin BP, Ngu MC, et al. Aspartate aminotransferase: aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection. It is a useful predictor of cirrhosis ? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000; 15; 386-390.
37. Croquet et al. Prothrombin index in an indirect marker of severe liver fibrosis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 14(10)1133-41.
38. Teare JP, Sherman D, Greenfield SM et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentration and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993; 342;895-8.

39. Kage M et al. Long term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997; 25: 1028-1031.
40. Wai CT, Greeson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38;518-26.
41. Imbert-Bismut F, Ratziu V et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-1075.
42. Le Calvez S, Thabut D et al. The predictive value of Fibrotest versus APRI for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 862-863.
43. Rossi E, Adams L, Pins A et al. Validation of the Fibrotest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2003;49; 450-4.
44. Poynard T, McHutchison et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon α 2b and Ribavirina. *Hepatology* 2003; 38: 481-492.
45. Blanc JF et al. Investigation of liver fibrosis in clinical practice. *Hepatology research* 2005; 32: 1-8.
46. Forns X, Ampurdanes S et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986-992.
47. Pares A Deulofeu R, Gimenez A et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996;24;1399-403.
48. Ramadori G, Zohrens G Manns M et al. Serum hyaluronate and type III procollagen aminoterminal propeptide concentration in chronic liver disease. Relationship to cirrhosis and disease activity. *European Journal of Clinical Investigation* 1991;21:323-30.
49. Niemela O, Risteli J, Blake JE, et al. Markers of fibrogenesis and basement membrane formation in alcoholic liver disease. Relation to severity, presence of hepatitis, and alcoholic intake. *Gastroenterology* 1990; 98:1612-9.
50. Camps J, Garcia-Granero M, Riezu-Boi JI et al. Prediction of sustained remission of chronic hepatitis C after 1-2 month course of alfa-interferon. *Journal of Hepatology* 1994;21:4-11

51. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: Quantitative image analysis vs semiquantitative scores. Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology* 1998 ;28 :439-46
52. McHutchinson JG, Blatt LM, de Medina M et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C an its relationship to liver histology. Consensus Interferon Group. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000;15:945-51.
53. Leroy V, de Traversay C Barnoud R et al. Changes in histological lesions and serum fibrogenesis markers in chronic hepatitis C patients non responders to interferon alpha. *Journal of Hepatology* 2001; 35:120-6
54. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 41-52.
55. Forns X, Sanchez-Tapias JM: Chronic viral hepatitis C, in *Clinical gastroenterology and hepatology*, Weinstein WM, Hawkey CJ, Bosch J. Elsevier, Mosby 2005.
56. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C: review. *Lancet* 2003; 362: 2095-2100.
57. Massard J et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 2006; 44: 19-24.
58. Ryder S D. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004; 53: 451-455.
59. Poynard T et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 2001; 34: 730-739
60. Sobesky R, Mathurin P et al. Modeling the impact if IFN α treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. *Gastroenterology* 1999; 116: 378-386.
61. Ghany MG, Kleiner DE et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 97-104.
62. Perumalswami P et al. Steatosis and Progression of Fibrosis in Untreated Patients With Chronic Hepatitis C Infection. *Hepatology* 2006;43: 780-787.
63. Monto A, Alonzo J et al. Steatosis in chronic hepatitis C: Relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002; 36: 729-736.

64. Wong V, Caronia S et al. Importance of age in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 1997; 4: 255-264.
65. Bissell DM. Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology* 1999; 29: 988-989.
66. Fartoux L et al. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; 54: 1003-1008.
67. Benhamou Y, Bochet M et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc group. *Hepatology* 1999; 30: 1054-1058.
68. Ratziu V et al. LIDO study group. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 2003; 39: 1049-1055.
69. Hui JM, Sud A, Farrell GC et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology*. 2003; 125(6):1695-704.
70. Sud A, Hui JM et al. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* 2004; 39: 1239-1247.
71. Cucchetti A, Vivarelli M, Heaton ND, Phillips S, Piscaglia F, Bolondi L et al. Artificial neural network is superior to MELD in predicting mortality of patients with end-stage liver disease. *Gut* 2006; Jun 29.
72. Piscaglia F, Cucchetti A et al. Prediction of significant fibrosis in HCV- infected liver transplant recipients by artificial neural network analysis of clinical factors. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006 (ahead of print).
73. Basheer IA, Hajmeer M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *Journal of Microbiological Methods* 2000; 43: 3-31.
74. Cross Simon S, Harrison RF, Kennedy RL. Introduction to neural networks. *Lancet* 1995; 346: 1075-1079.
75. Baxt William G. Application of artificial neural networks to clinical medicine. *Lancet* 1995; 346: 1135-1138.
76. Ziolkowski M et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; vol 41, No 1.

77. Adinolfi LE, Giordano MG et al. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. *British Journal of Haematology* 2001; 113: 590-595.
78. Giannini E, Borro P et al. Serum thrombopoietin levels are linked to liver function in untreated patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 2002; 37: 572-577.
79. Fabris C et al. Blood lipids of patients with chronic hepatitis: differences related to viral etiology. *Clin Chim acta* 1997; 261: 159-165.