

## Confronto tra marcatori sierici di fibrosi e biopsia epatica

Valentina Pecoraro<sup>1</sup>, Rosalba Monica Russo<sup>1</sup>, Giovanni Perricone<sup>2</sup>, Sergio Brenna<sup>1</sup>, Simonetta Granata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, S.S. Biochimica Clinica e <sup>2</sup>S.S. Epatologia e Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera Niguarda Ca' Granda, Milano

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 46° Congresso Nazionale SIBioC, 13-15 Ottobre 2014, Roma, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (V. Pecoraro), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.*

### ABSTRACT

**A comparison between serum biomarkers of fibrosis and liver biopsy.** Hepatic fibrosis is a common response to prolonged liver injury and the liver biopsy is the standard method for assessing it. However, searching for alternative noninvasive approaches is important and immunoenzymatic assays using monoclonal antibodies have been recently developed to investigate the diagnostic utility of serum biomarkers. In this study, we explore the relationship between the grade of liver fibrosis and some biochemical parameters. We considered the following markers: collagen IV (CIV), coliglicin (CG), hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and aminoterminal procollagen type III peptide (PIIP). All markers were analyzed by new chemiluminescence immunoassays. We enrolled 36 patients with liver disease and available liver biopsy data. Furthermore, we compared the serum marker concentrations of patients with those of 16 healthy volunteers. Results showed a significant increase in concentrations of CIV, CG and PIIP in patients with liver fibrosis. For CIV and PIIP, a significant difference was also observed among groups with different fibrosis grade. In particular, a significant increase was evident in patients with early fibrosis when compared to patients without fibrosis.

### INTRODUZIONE

La fibrosi epatica è il risultato di un processo patologico a carico del fegato scatenato, nella maggior parte dei casi, da agenti patogeni, i quali a loro volta attivano il sistema immunitario, che si adopera per riparare il tessuto danneggiato (1). Quando il processo di riparazione è fuori controllo, si innesca una proliferazione delle cellule del sistema immunitario e delle cellule stellate. L'attivazione e la proliferazione di queste ultime nello spazio di Disse comportano l'aumento della secrezione delle proteine, che costituiscono la matrice extracellulare (glicoproteine, glicosamminoglicani, proteoglicani). In condizioni fisiologiche sussiste un equilibrio tra la deposizione delle proteine della matrice e la loro degradazione a opera delle metalloproteasi, ma lo squilibrio di questo processo a favore della loro deposizione, comporta un accumulo di matrice extracellulare, che va a modificare l'architettura del fegato (2). La causa principale di fibrosi epatica è l'infezione da virus dell'epatite C (HCV), ma anche l'abuso di sostanze alcoliche e patologie autoimmuni. Di conseguenza, la valutazione della fibrosi epatica è importante non solo per

valutare la prognosi della malattia, ma anche per identificare i pazienti che necessitano di una terapia antivirale. Nei casi di epatite cronica in fase avanzata, la determinazione dello stadio di fibrosi è un importante predittore di mortalità e morbilità (3, 4).

La diagnosi di fibrosi epatica si basa fondamentalmente sulla biopsia d'organo (5). La biopsia epatica rimane tuttavia un metodo invasivo e non scevro da complicazioni, che colpiscono fino a 5% dei pazienti (6). L'accuratezza del dato bioptico è limitata da una significativa percentuale di errori di campionamento, oltre che da una variabilità intra- e interosservatore, e dalla difficoltà di discriminare stadi di fibrosi che si sovrappongono (7-9).

Dati i limiti della biopsia, molti ricercatori hanno concentrato la loro attenzione sulla ricerca di un approccio non invasivo che possa descrivere in maniera accurata lo stadio della patologia epatica e l'eventuale progressione in fibrosi. Sono stati condotti studi che hanno suggerito l'impiego di alcuni marcatori sierici, determinati singolarmente o in combinazione, che riflettono il coinvolgimento epatico, la presenza o l'assenza di fibrosi o cirrosi (10-12). Si tratta di molecole

Corrispondenza a: Valentina Pecoraro, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia - S.S. di Biochimica Clinica, A.O. Niguarda Ca' Granda, Piazza Ospedale Maggiore 3, 20161 Milano. Tel. 0264442438, Fax 0264442901, E-mail valepecoraro@gmail.com

Ricevuto: 23.01.2015

Revisionato: 03.03.2015

Accettato: 25.03.2015

che partecipano alla formazione della matrice epatica extracellulare, i cui livelli cambiano in caso di alterato metabolismo della matrice stessa (13). Tali marcatori di fibrosi epatica sono stati suddivisi in due categorie: a) marcatori diretti, che riflettono il "turnover" della matrice extracellulare e b) marcatori indiretti, che invece riflettono l'alterazione della funzione epatica (14, 15). I primi includono le glicoproteine, ad es., acido ialuronico (HA), laminina (LN), YKL-40, le proteine della famiglia del collagene, ad es., collagene tipo IV (CIV), propeptide aminotermiale del procollagene III (PIIIP), e le metalloproteasi. I secondi includono indici di base di chimica clinica, quali transaminasi,  $\gamma$ -glutamyltransferasi ( $\gamma$ GT), piastrine, albumina (ALB),  $\alpha_2$ -macroglobulina, aptoglobina, bilirubina (Bil).

Un marcatore di fibrosi ideale dovrebbe avere sensibilità e specificità elevate per discriminare i diversi stadi di fibrosi, dovrebbe essere facilmente determinabile, applicabile al monitoraggio della progressione o regressione della malattia, non risentire dei falsi positivi, ad es., nei pazienti con uno stato infiammatorio dovuto ad altre patologie. Al momento un marcatore sierico con queste caratteristiche non è stato identificato, ma la valutazione combinata di più molecole potrebbe essere informativa. Inoltre, il metodo per la determinazione di questi marcatori deve essere accurato, riproducibile, sicuro e completamente automatizzato (16). Date queste necessità cliniche e laboratoristiche, si sono ricercati i prodotti di sintesi e degradazione della matrice. Fino ad ora l'efficacia diagnostica di questi marcatori è stata deludente: alcuni si sono rivelati promettenti in condizioni come l'evoluzione di epatopatia alcolica in cirrosi, ad es. HA o PIIIP, altri devono ancora essere valutati in maniera approfondita (10). Un approccio alternativo di ricerca ha utilizzato modelli matematici, che prevedono la combinazione di indici multipli, espressione della severità della fibrosi epatica (Fibrotest).

Il nostro lavoro si è proposto di indagare il comportamento di 5 marcatori di fibrosi epatica in pazienti epatopatici e in controlli sani e di valutare la relazione tra le concentrazioni dei marcatori e il grado di fibrosi ottenuta dalla biopsia epatica. Il sistema di misura da noi utilizzato si basa su un metodo immunologico con rilevazione in chemiluminescenza mediante aminobutil-etil-isoluminolo, unitamente all'utilizzo di microsferi nanomagnetici.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nel periodo compreso tra febbraio e novembre 2014, seguendo la dichiarazione di Helsinki per quanto riguarda gli aspetti etici. Sono stati considerati i seguenti marcatori: CIV, coliglicina (CG), HA, LN e PIIIP, determinati su analizzatore Maglumi 2000 (Snibe Co. Ltd), in accordo con le indicazioni della ditta produttrice. Sono stati determinati anche i seguenti parametri biochimici sierici: aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT),  $\gamma$ GT, ALB e Bil su Cobas 8000 (Roche Diagnostics).

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette

Vacutainer, lasciati coagulare, centrifugati a 3000g per 15 min a 4 °C e analizzati entro una settimana dal giorno di raccolta. Il siero è stato separato e diviso in 2 aliquote. La prima aliquota è stata utilizzata per la determinazione dei parametri biochimici e la seconda per la determinazione dei marcatori di fibrosi epatica. Per questi ultimi sono state eseguite anche prove di imprecisione utilizzando 3 pool di sieri a tre livelli di concentrazione, ripetuti 10 volte.

Le concentrazioni dei marcatori di fibrosi epatica sono state misurate nel siero di 15 volontari sani. Sono stati anche selezionati pazienti affetti da patologie epatiche da sottoporre a biopsia. In particolare, sono stati raccolti e analizzati campioni di siero provenienti da 36 pazienti epatopatici. Lo stadio della fibrosi è stato valutato semi-quantitativamente in accordo con il sistema di "scoring" di Ishak, che prevede una stadiazione da 0 a 6: FO=assenza di fibrosi, F1=fibrosi portale, F2=fibrosi portale di maggiore estensione con o senza setti, F3=maggior estensione della fibrosi con "bridging" porto-portale occasionale, F4=estensione della fibrosi nelle aree portali con marcato "bridging" porto-portale, F5=marcato "bridging" porto-portale con noduli occasionali, F6=cirrosi. Il prelievo di sangue e la biopsia sono stati eseguiti nello stesso giorno.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il "software" STATA11. I risultati sono espressi come mediane e intervallo interquartile. La significatività è stata valutata mediante il test t di Student per le distribuzioni parametriche e i test di Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal e Wallis per le distribuzioni non parametriche. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per un  $P \leq 0,05$ .

## RISULTATI

I risultati delle prove di imprecisione sono riportati nella Tabella 1.

Le caratteristiche principali dei pazienti e dei volontari sani sono riportate nella Tabella 2. I pazienti con danno epatico rispetto ai controlli mostravano un aumento statisticamente significativo delle concentrazioni sieriche di CIV ( $P=0,001$ ), CG ( $P < 0,001$ ), HA ( $P=0,05$ ) e PIIIP ( $P < 0,001$ ) (Tabella 3). Il confronto tra volontari sani e pazienti con assenza di fibrosi (gruppo 1, F0) non ha evidenziato differenze per la maggior parte dei marcatori, ad eccezione della CG ( $P=0,01$ ). Considerando i 3 gruppi di fibrosi, si evidenziava una differenza significativa tra il gruppo 1 e il gruppo 2 per CIV ( $P=0,02$ ) e PIIIP ( $P=0,01$ ) (Figure 1 e 2), mentre non c'era differenza tra i gruppi 2 e 3 per tutti i marcatori (Tabella 3). La presenza di fibrosi comportava una variazione delle concentrazioni sieriche di tutti i marcatori ad esclusione di LN, concentrazioni che tendevano ad aumentare con l'aggravarsi della fibrosi, mostrando una differenza significativa tra il gruppo 1 (F0) e il gruppo 3 (F3-F6) per CIV ( $P=0,03$ ), HA ( $P=0,02$ ) e PIIIP ( $P=0,03$ ).

**Tabella 1***Imprecisione analitica della misura dei marcatori di fibrosi valutati*

	Siero 1		Siero 2		Siero 3	
	media (DS)	CV%	media (DS)	CV%	media (DS)	CV%
Collagene IV (µg/L)	139 (17,8)	12,8	9,9 (0,9)	9,1	8,0 (1,2)	15,0
Coliglicina (mg/L)	40 (0,5)	1,3	0,17 (0,03)	17,6	0,72 (0,02)	2,8
HA (µg/L)	269 (13,4)	5,0	9,6 (3,4)	35,4	15,6 (4,0)	25,6
Laminina (µg/L)	69 (14,1)	20,9	40 (4,0)	10,0	31 (3,4)	11,0
PIIIP (µg/L)	149 (13,7)	9,2	6,2 (1,4)	22,6	11,8 (2,3)	19,5

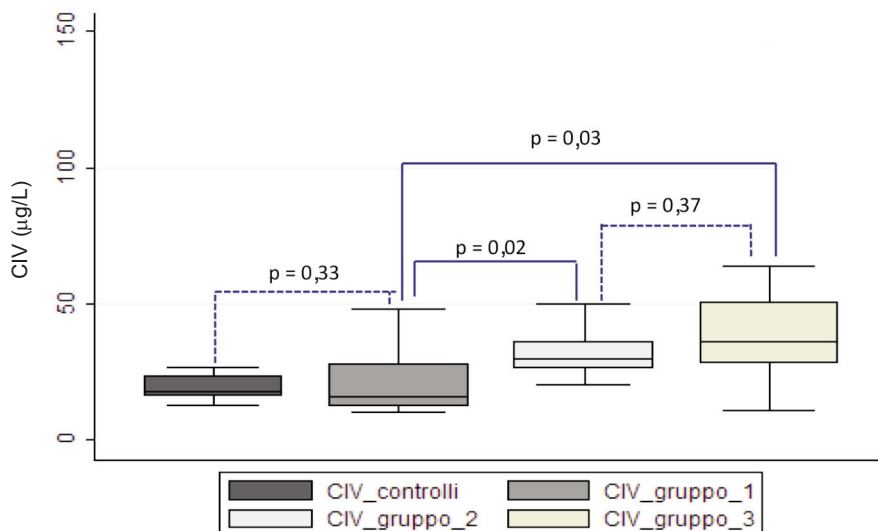
*HA, acido ialuronico; PIIIP, propeptide amminotermiale del procollagene III.***Tabella 2***Caratteristiche dei pazienti arruolati e dei controlli*

	Pazienti (n=36)	Controlli (n=15)	P
Età (anni)	54 (51-62) <sup>a</sup>	46 (30-54) <sup>a</sup>	<0,001
Maschi	25	4	0,005
Diagnosi di epatite virale C	26	NA	-
ALT (U/L)	117,2 (135,8) <sup>b</sup>	12,7 (14,1) <sup>b</sup>	0,002
AST (U/L)	85,9 (96,2) <sup>b</sup>	17,8 (9) <sup>b</sup>	0,005
γGT (U/L)	138,9 (142,5) <sup>b</sup>	16,8 (11,1) <sup>b</sup>	<0,001
S-Albumina (g/L)	42 (7,2) <sup>b</sup>	50 (5) <sup>b</sup>	NS
S-Bilirubina totale (mg/dL)	0,9 (1,3) <sup>b</sup>	0,7 (0,8) <sup>b</sup>	NS
Con trapianto epatico	9	NA	-
Stadio fibrosi			
F0	8	NA	
F1	13	NA	
F2	3	NA	
F3	5	NA	
F4	4	NA	
F5	2	NA	
F6	1	NA	

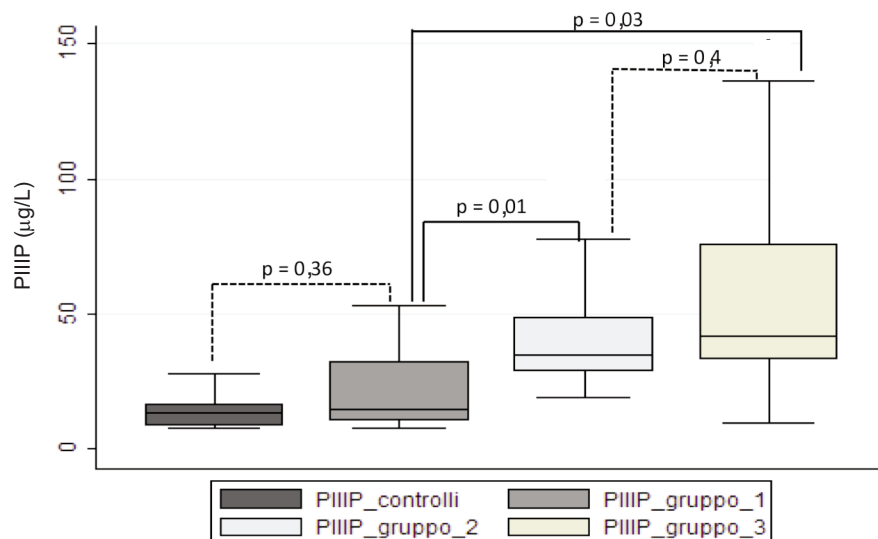
*Dati riportati come <sup>a</sup>mediana e intervallo interquartile o <sup>b</sup>media e DS.**NA, non applicabile; ALT, alanina amminotransferasi; AST, aspartato amminotransferasi; γGT, γ-glutamilttransferasi; NS, non significativo.***Tabella 3***Valori sierici dei marcatori di fibrosi epatica nei controlli e nei pazienti epatopatici, e concentrazioni in funzione dello stadio di fibrosi (mediana e intervallo interquartile)*

	Controlli	Pazienti	P	Gruppo fibrosi			P	P		
				Gruppo 1 (F0)	Gruppo 2 (F1 e F2)	Gruppo 3 (F3-F6)		Controlli vs 1	1 vs 2	2 vs 3
CIV (µg/L)	17,8 (16,1-23,2)	29,5 (20,9-39,0)	0,001	15,9 (11,8-27,7)	29,5 (26,1-36,3)	36,1 (27,8-50,5)	NS	0,02	NS	0,03
CG (mg/L)	0,7 (0,4-0,8)	3,9 (1,5-6,7)	<0,001	1,8 (1,1-9,7)	2,7 (1,4-6,6)	5,9 (3,6-6,7)	0,01	NS	NS	NS
HA (µg/L)	48,9 (37,8-59,4)	60,1 (42,7-151,8)	0,05	46,3 (29,8-67,2)	65,6 (42,7-142,8)	94,4 (56,7-288,3)	NS	NS	NS	0,02
LN (µg/L)	34,0 (16,3-36,8)	32,1 (29,2-36,8)	NS	31,5 (27,9-32,2)	32,6 (27,9-36,9)	33,8 (30,6-46,1)	NS	NS	NS	0,06
PIIIP (µg/L)	13,3 (8,3-16,5)	34,6 (25,2-50,1)	<0,001	14,8 (10,3-32,6)	34,9 (28,4-48,7)	41,5 (32,7-76,1)	NS	0,01	NS	0,03

*CIV, collagene tipo IV; NS, non significativo; CG, coliglicina; HA, acido ialuronico; LN, laminina; PIIIP, propeptide amminotermiale del procollagene III.*



**Figura 1**  
 Concentrazioni sieriche di collagene di tipo IV (CIV) nei controlli e nei pazienti nei diversi gruppi di fibrosi epatica.



**Figura 2**  
 Concentrazioni sieriche di propeptide aminoterminale del procollagene III (PIIIP) nei controlli e nei pazienti nei diversi gruppi di fibrosi epatica.

**DISCUSSIONE**

Il dosaggio dei marcatori sierici di fibrosi epatica è stato suggerito come un metodo semplice, non invasivo, veloce e relativamente economico per valutare il grado di fibrosi in pazienti con patologia epatica. Anche se i marcatori evidenziano una differenza tra i pazienti con fibrosi avanzata e i volontari sani, l'utilità nel discriminare le prime fasi della fibrosi rimane limitata (17, 18). Nel corso degli anni si sono ricercate alternative non invasive per valutare la fibrosi, ma a oggi nessun marcatore è raccomandato soprattutto a causa dell'eterogeneità e scarsa numerosità delle popolazioni sulle quali sono stati

condotti gli studi e a causa di metodi di valutazione insufficienti (19).

Il CIV è componente principale della membrana basale e le sue elevate concentrazioni plasmatiche possono riflettere il processo fibroso del fegato. La CG è un acido biliare, circola nel sangue legata all'ALB e solitamente è usata per lo screening delle patologie acute e croniche. Quando le cellule del fegato sono danneggiate, la bile si riempie di sedimenti e provoca un aumento della CG nel siero. HA, componente della matrice, sembrerebbe accurato e sensibile nel riflettere lo stato di fibrosi. E' sintetizzato dalle cellule stellate e poi eliminato dalle cellule endoteliali sinusoidali. I suoi livelli

aumentano in caso di epatite sia acuta sia cronica (16). LN è una proteina che si trova nella membrana basale e non deriva dalla degradazione del collagene. In caso di fibrosi si accumula intorno ai vasi e negli spazi perisinusoidali. PIIIP è un prodotto di degradazione del collagene e, nelle patologie croniche del fegato, le sue concentrazioni riflettono lo stadio di fibrosi, ma non è specifico per la fibrosi epatica in quanto aumenta anche in altre patologie (fibrosi polmonare, acromegalia, pancreatite cronica, patologie reumatologiche) (16).

In questo studio abbiamo indagato il comportamento di questi marcatori in 36 pazienti con danno epatico, sottoposti a biopsia, rispetto a un gruppo di controlli e valutato la relazione tra le concentrazioni dei marcatori e il grado di fibrosi. Le concentrazioni di queste proteine sono significativamente più elevate nei pazienti con patologie epatiche rispetto ai volontari sani e, anche se non è possibile discriminare in modo accurato i diversi stadi di fibrosi, è possibile notare una differenza tra i pazienti epatopatici con assenza di fibrosi e quelli con fibrosi in fase avanzata. Questa differenza è risultata statisticamente significativa per CIV, HA e PIIIP.

In questo, ma anche in altri studi, la relazione tra i marcatori sierici e lo stadio di fibrosi non è evidente. La difficoltà di identificare i pazienti con una moderata fibrosi (F1 e F2) è dovuta alla complessità della patologia stessa e ai limiti intrinseci alla biopsia. Dato che la biopsia epatica è accurata solo nel 80% dei casi ai fini della stadiazione, i marcatori potrebbero essere utilizzati come ausilio per differenziare l'assenza o la presenza di fibrosi. Inoltre la valutazione combinata dei marcatori dovrebbe tener presente il tipo di informazione che essi forniscono singolarmente, oltre alla presenza di eventuali fattori confondenti ( $\gamma$ GT, transaminasi, età), per i quali, dato l'esiguo numero dei campioni, non è stato possibile eseguire una valutazione statisticamente robusta.

Sono state condotte alcune revisioni sistematiche e meta-analisi per la valutazione delle prestazioni diagnostiche dei marcatori sierici nei pazienti con epatite C, nelle patologie epatiche alcoliche e non alcoliche (20-22). I nostri risultati sono in linea con quelli mostrati in letteratura. I marcatori sierici sono in grado di identificare i pazienti con fibrosi severa o cirrosi, mentre l'efficienza diagnostica è limitata nei primi stadi della fibrosi. Inoltre, l'alta eterogeneità e la mancanza di standardizzazione dei metodi analitici utilizzati per le determinazioni rendono difficile il confronto, rendendo problematica la generalizzabilità dei risultati (20-22). La disponibilità di piattaforme automatizzate per la determinazione dei marcatori potrebbe aiutare a superare in parte questo ostacolo.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-50.

2. Valva P, Casciato P, Diaz Carrasco JM, et al. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PLoS One* 2011;6:e23218.
3. Gutierrez-Reyes G, Gutierrez-Ruiz MC, Kershenobich D. Liver fibrosis and chronic viral hepatitis. *Arch Med Res* 2007;38:644-51.
4. Zeisberg M, Yang C, Martino M, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:23337-47.
5. Afdhal NH. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;299:1160-74.
6. Sebastiani G, Vario A, Guido M, et al. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686-93.
7. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
8. Poynard T, Ratziu V, Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000;14:543-8.
9. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
10. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-13.
11. Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E, et al. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003;39:179-86.
12. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for hepatic fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:779-86.
13. Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, et al. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol* 2005;11:4-6.
14. Grigorescu M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J Gastrointest Liver Dis* 2006;15:149-59.
15. Gümüşay O, Ozenirler S, Atak A, et al. Diagnostic potential of serum direct markers and non-invasive fibrosis models in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Research* 2013;43:228-37.
16. Baranova A, Lal P, Bircerdinca, et al. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol* 2011;11:91.
17. Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, et al. Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, Fibrospect II and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2008;103:928-36.
18. Fontana RJ, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2010;59:1401-9.
19. Seven G, Karatayli SC, Köse SK, et al. Serum connective tissue markers as predictors of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis B and D. *Turk J Gastroenterol* 2011;22:305-14.
20. Parkes J, Guha IN, Harris S, et al. Systematic review of the diagnostic performance of serum markers of liver fibrosis in alcoholic liver disease. *Comp Hepatol* 2012;11:5.
21. Parkes J, Guha IN, Roderick P, et al. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;44:462-74.
22. Guha IN, Parkes J, Roderick PR, et al. Non-invasive markers associated with liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2006;55:1650-60.