

RIASSUNTO

Lo studio di mutazioni e polimorfismi in geni coinvolti nell'etiopatogenesi di svariate malattie è ormai pratica consolidata.

Le patologie infiammatorie pancreatiche, pancreatite acuta, acuta ricorrente e cronica hanno spesso un'origine multifattoriale a cui partecipano fattori ambientali, abitudini voluttuarie e predisposizione genetica.

La pancreatite acuta è una patologia associata ad una intensa risposta infiammatoria. Monocyte Chemoattracting Protein-1 (MCP-1) è una chemochina con un ruolo centrale nell'instaurare e nel mantenere il processo infiammatorio. Il polimorfismo -2518 G della regione regolatrice del gene per MCP1 altera il livello di espressione di questa chemochina accrescendo la risposta infiammatoria. Gli studi svolti dal Dott. Bertolini volgono a valutare la presenza di tale polimorfismo in pazienti affetti da pancreatite acuta e acuta ricorrente. I risultati ottenuti nella prima fase dello studio hanno individuato un'associazione del polimorfismo con la pancreatite acuta ricorrente che ha portato ad ampliare la numerosità del campione in analisi per garantire la significatività dello studio, ha altresì portato a volgere lo sguardo verso la pancreatite cronica e le malattie infiammatorie croniche intestinali, patologie nelle quali un alterato processo flogistico può avere effetto sulla severità della sintomatologia. È stato identificato, in questa fase un trend di associazione con la pancreatite cronica che non ha tuttavia raggiunto una significatività statistica, probabilmente a causa delle diverse eziologie del campione in esame, è stata comunque rilevata un'associazione significativa nei soggetti obesi affetti da tale patologia. Nessuna associazione significativa è stata individuata per quanto concerne le malattie infiammatorie croniche intestinali.

Sulla base dei dati ottenuti per MCP1 e di una valutazione della letteratura relativa al coinvolgimento dei processi flogistici nell'etiopatogenesi della pancreatite acuta, acuta ricorrente e cronica, si è deciso di studiare gli effetti del polimorfismo del gene GSTT1 nei pazienti affetti da tali patologie. Il polimorfismo in questione comporta la delezione del gene per la Glutathione-S-Transferasi Theta1 e conseguente assenza della proteina. Tale proteina, quando presente, catalizza la coniugazione del glutathione ridotto con reattivi elettrofili quali i radicali liberi derivati dall'ossigeno e alcuni xenobiotici; tuttavia la presenza della proteina è accessoria in quanto esistono altre transferasi del glutathione in grado di svolgere la stessa funzione. Diversi studi hanno mostrato come la presenza di GSTT1 comporti una deplezione precoce del glutathione e pertanto una funzione

protettiva compromessa dello stesso nei tessuti pancreatici, sembrerebbe dunque che sia più utile l'assenza di tale gene per garantire un danno tissutale minore nelle cellule del pancreas.

I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa nella frequenza del polimorfismo in nessuno dei gruppi analizzati quando confrontati tra loro o rispetto al gruppo di controllo e neppure quando il gruppo dei pazienti affetti da pancreatite acuta è stato valutato rispetto al grado di severità della malattia. Si può pertanto concludere che, nella popolazione in esame, il polimorfismo GSTT1*A/null non è coinvolto nello sviluppo delle patologie oggetto dello studio e nella loro severità.

Per proseguire nello studio dei fattori genici associati alle malattie infiammatorie croniche intestinali ed esistendo pochi studi sulla popolazione italiana il dott. Bertolini ha indagato anche la possibile associazione delle tre principali mutazioni (R702W, G908R e 1007fs) del gene NOD2/CARD15, codificante per la proteina cellulare NOD2, espressa dalle cellule dell'epitelio intestinale e dalle cellule dell'immunità a livello della mucosa; tale proteina funziona in associazione con il recettore per i costituenti della parete batterica. Essa ricopre un ruolo nell'attivazione del fattore di trascrizione NFκB e nella trascrizione di citochine pro-infiammatorie, così come sembra essere coinvolta nell'apoptosi di cellule dell'immunità attivate. Le mutazioni studiate comportano un'inadeguata risposta infiammatoria nei confronti di antigeni endoluminali, processo che caratterizza la patogenesi delle malattie infiammatorie croniche. Lo studio ha rilevato un'associazione significativa tra la presenza della mutazione 1007fs e il morbo di Crohn e più in particolare con una localizzazione ileale della malattia e con la variante clinica stenotante/fissolizzante coesistenti nello stesso soggetto.

1 - INTRODUZIONE

1.1 – IL PANCREAS

Il pancreas è una ghiandola annessa all'apparato digerente, di consistenza parenchimatosa e dotata di scarsa componente stromale (pancreas deriva dal greco *pan*, tutto e *kreas*, carne). Funge da ghiandola endocrina ed esocrina. La componente endocrina comprende vari tipi cellulari organizzati in aggregati sferici noti come isole di Langherans e secerne ormoni implicati soprattutto nel mantenimento dell'omeostasi glucidica. La componente esocrina è formata dalle cellule acinari e da un complesso sistema di dotti secretori. Le cellule acinari sintetizzano enzimi digestivi che svolgono la loro azione nell'intestino, dove il secreto pancreatico si riversa attraverso il sistema duttale[1-2].

1.1a - EMBRIOLOGIA

Nell'uomo il pancreas origina da due distinti ispessimenti dell'epitelio dell'intestino anteriore primitivo, noto anche come foregut. Infatti alla fine della quarta settimana di gestazione, sul lato posteriore del duodeno, compare l'*abbozzo pancreatico dorsale* che si sviluppa dietro a quello dello stomaco. Pochi giorni dopo, sul lato opposto del duodeno fa la sua comparsa l'*abbozzo pancreatico ventrale*, un altro ispessimento endodermico che si sviluppa invece nelle adiacenze dell'endoderma epatico.

Sia il fegato che il pancreas si sviluppano, infatti, come estroflessioni dell'intestino primitivo craniale (foregut) e l'acido retinoico sembra svolgere un ruolo cruciale nel determinare quale porzione dell'endoderma si differenzierà in tessuto pancreatico[3].

La gemma dorsale è più grande e posta cranialmente rispetto a quella ventrale; il suo dotto escretore, formatosi nel corso della quinta settimana, drena direttamente in duodeno. Il dotto escretore dell'abbozzo ventrale, invece, confluisce unitamente al coledoco in duodeno, ad un livello inferiore rispetto al dotto escretore del pancreas dorsale[4].

Durante la quinta settimana, la gemma ventrale e il tratto di coledoco che la unisce al duodeno ruotano insieme attorno al tubo dell'intestino migrando verso il lato dorsale dello stesso. La gemma ventrale si viene così a trovare inferiormente e posteriormente rispetto alla gemma dorsale[4]: all'inizio della sesta settimana i due abbozzi pancreatici vengono a contatto e alla fine della stessa si fondono completamente formando il *pancreas definitivo*. Dall'abbozzo dorsale origina quasi tutta la sostanza pancreatica ossia la testa, il corpo e la coda[5]; da quello ventrale si forma la parte inferiore della futura testa con il suo prolungamento noto come processo uncinato.

I dotti dei due abbozzi portano contributi molto diversi alle strutture definitive: il dotto della gemma ventrale si anastomizza alla sua origine con il dotto della gemma dorsale; esso andrà pertanto a costituire il principale sistema duttale drenante la ghiandola chiamato dotto di Wirsung. Prima di sfociare in duodeno si unisce, come già detto, al coledoco, formando con esso l'ampolla di Vater. Quel segmento del dotto pancreatico dorsale che va dall'anastomosi allo sbocco in duodeno spesso degenera o persiste sottoforma di piccolo residuo che prende il nome di dotto di Santorini[5].

Sia le cellule esocrine che le endocrine derivano dall'endoderma duodenale, sebbene in passato si riteneva che quelle endocrine migrassero negli abbozzi pancreatici dalla cresta neurale[5].

Negli ultimi dieci anni sono stati compiuti notevoli passi avanti nella comprensione dei meccanismi molecolari che sottostanno alle varie tappe dello sviluppo del pancreas nei vertebrati. L'intero processo inizia durante la gastrulazione, quando l'epiblasto, formato da cellule multipotenti, dà origine a tre foglietti embrionali: l'endoderma, il mesoderma e l'ectoderma[1].

Gli organi dell'apparato gastrointestinale e le ghiandole annesse derivano dall'endoderma, tranne che nella loro componente connettivale e muscolare che è invece di origine mesodermica[5].

L'induzione dell'endoderma sembra essere governata dal TGF- β (Transforming Growth Factor) proveniente dall'ectoderma adiacente e dal mesoderma all'interno della stria primitiva e del nodo di Hensen[1]. Completata la gastrulazione per una serie di complessi movimenti morfogenetici cui le cellule endodermiche vanno incontro passivamente, si viene a delineare il tubo intestinale primitivo. Da più parti di questo si sviluppano evaginazioni che sono destinate a formare vari organi differenziati, tra cui anche il pancreas. Nei vertebrati esiste quindi una "regionalizzazione" dell'endoderma: le sue varie porzioni vengono cioè precocemente indirizzate verso specifici destini cellulari in relazione alla loro posizione lungo l'asse antero-posteriore o dorso-ventrale dell'endoderma stesso. Sembra che questa compartimentalizzazione avvenga già durante la gastrulazione per mezzo di segnali inviati dai tessuti circostanti.

I segnali induttivi determinano un diverso pattern di espressione genica nell'endoderma orientato secondo l'asse antero-posteriore e dorso-ventrale[2]. Proprio per questo le cellule che si trovano in aree specifiche dell'endoderma sono successivamente in grado di rispondere ai segnali che invece dirigono la differenziazione dei vari organi.

Un aspetto estremamente affascinante è proprio quello di capire quali segnali e quali vie presiedono alla specificazione nell'endoderma di quella parte dello stesso che è destinata a diventare il pancreas. L'identificazione di tali segnali potrebbe avere ripercussioni cliniche nell'eventuale generazione di cellule pancreatiche produttrici di insulina a partire da cellule staminali adulte o embrionali da utilizzare per il trapianto nei pazienti diabetici.

L'impiego di modelli animali transgenici ha permesso di individuare alcuni dei fattori chiave coinvolti nelle tappe più precoci del processo di differenziazione dell'endoderma in senso pancreatico. Si tratta di segnali che provengono dall'ambiente circostante e che hanno azioni istruttive, cioè portano precise informazioni che consentono di definire l'identità del pancreas nell'endoderma naive; o azioni permissive, che consentono alle cellule di continuare il loro specifico programma di differenziazione[2].

Si è già detto che il pancreas deriva dalla fusione di due distinte gemme endodermiche e che queste danno origine a parti altrettanto distinte della ghiandola matura. Ciò significa che le cellule dei due abbozzi hanno un diverso corredo di espressione genica e un diverso e specifico percorso di differenziamento.

Queste differenze sono dovute primariamente alle interazioni delle gemme con i tessuti circostanti: l'endoderma del pancreas dorsale si trova sulla linea di mezzo dell'embrione e al momento della specificazione ha contatti diretti con la notocorda e successivamente con l'aorta dorsale; le interazioni tissutali dell'endoderma che formerà il pancreas ventrale sono completamente differenti, essendo questo esposto, insieme all'abbozzo epatico, ai segnali provenienti dal foglietto del mesoderma laterale[2].

1.1b - MALFORMAZIONI CONGENITE DEL PANCREAS

Data la notevole complessità del processo morfogenetico del pancreas non sorprende che possa esistere un certo numero di varianti anatomiche e di anomalie congenite del pancreas e dei suoi dotti. Tali anomalie, alcune delle quali estremamente rare, sono nella maggior parte dei casi silenti e rappresentano un rilievo casuale in corso di indagini endoscopiche, di interventi chirurgici o di autopsie. Alcune però possono assumere rilevanza clinica presentandosi con segni e sintomi relativi al dislocamento o compressione di organi circostanti, a pancreatiti o ad una anomala secrezione sia esocrina che endocrina.

Di seguito saranno trattate solo alcune di dette anomalie.

Agenesia e ipoplasia pancreatiche.

La completa assenza della ghiandola pancreatica è una condizione di rarissimo riscontro nei soggetti nati vivi, essendo di solito associata ad altre gravi malformazioni incompatibili con la vita[4]. Infatti oltre alla completa assenza delle secrezioni pancreatiche esocrine ed endocrine con

maldigestione, malassorbimento e diabete mellito dalla nascita, questa condizione è spesso associata a un grave ritardo di crescita intrauterino. L'agenesia pancreatica può manifestarsi come malattia monogenica[1]. In un singolo paziente è stata dimostrata una mutazione nel gene che codifica per PDX1 [6], un fattore di trascrizione che svolge un ruolo chiave nello sviluppo del pancreas. Più di recente è stata dimostrata l'associazione tra una mutazione del gene PTF1A, che codifica per il fattore di trascrizione 1 alfa e una malformazione caratterizzata da agenesia pancreatica e cerebellare[7].

L'ipoplasia del pancreas è invece una condizione spesso asintomatica alla nascita, data la notevole riserva funzionale della ghiandola. Coinvolge più di frequente il pancreas dorsale e, data la localizzazione della maggior parte delle isole di Langerhans nel corpo e nella coda pancreatici si manifesta più spesso con il diabete. L'ipoplasia del pancreas dorsale è spesso associata a polisplenia e a malrotazione intestinale. L'agenesia parziale può però riguardare anche il pancreas ventrale in maniera isolata.

In ogni caso si tratta quasi sempre di condizioni sporadiche e non sono noti i geni che potrebbero determinare queste anomalie nell'uomo[1].

Pancreas anulare

Si definisce pancreas anulare quella condizione in cui la seconda porzione duodenale è completamente circondata, e a volte strozzata, da un tralcio di tessuto pancreatico che si stacca, a guisa di anello, dalla testa del pancreas.

Talvolta l'anello può non essere completo e la porzione anteriore del duodeno resta in tal caso, libera. Si distinguono ancora il pancreas anulare extramurale, in cui l'anello pancreatico non aderisce alla parete duodenale, da quello intramurale in cui il tessuto pancreatico contrae rapporti di fissità con le fibre muscolari del duodeno[4].

L'incidenza della malformazione è stimata ad 1 su 20.000.

Sebbene l'anomalia possa rimanere asintomatica sino all'età adulta, nella maggior parte dei casi si manifesta molto precocemente con i segni e i sintomi di un'ostruzione duodenale. Il pancreas anulare è responsabile dell'8-21% dei casi di ostruzione duodenale neonatale[1]. La patogenesi non è nota o meglio è controversa, essendoci numerose ipotesi tutte possibili, ma nessuna suffragata da dati certi. L'anomalia è associata ad altre malformazioni congenite quali l'atresia e la malrotazione intestinali, fistole tracheoesofagee e difetti cardiaci.

Pancreas divisum.

E' l'anomalia di sviluppo più frequente del pancreas e deriva da un'incompleta o assente fusione dei due abbozzi pancreatici, il ventrale e il dorsale, e in particolare dei loro sistemi duttali[8] Questo fa sì che la maggior parte delle secrezioni pancreatiche venga drenata nella papilla minor tramite il dotto di Santorini, che tuttavia, per il suo calibro, può risultare inadeguato rispetto al volume dei secreti[4].

Considerando che l'incidenza riportata per tale anomalia nei pazienti senza alcuna patologia pancreatica è del 4-14% nelle serie autoptiche e del 2-8% negli studi eseguiti con la colangiopancreatografia endoscopica retrograda (ERCP)[9], il pancreas divisum dovrebbe essere considerato una variante della normale anatomia pancreatica piuttosto che una vera malformazione congenita[1]

Ancora molto controversa e dibattuta è l'associazione del pancreas divisum con le patologie pancreatiche e quindi la rilevanza clinica dell'anomalia. Il pancreas divisum potrebbe predisporre a pancreatiti acute, ricorrenti o croniche, agendo con un meccanismo patogenetico di tipo ostruttivo[10-11]. Studi più ampi hanno documentato che l'incidenza della malformazione nei pazienti con pancreatite cronica è simile a quella riscontrata nei soggetti sani o nei gruppi di controllo[12-13].

Pancreas aberrante o ectopico.

E' riscontrato con una prevalenza variabile dall' 1 più del 13% dei rilievi autoptici, ma è quasi sempre clinicamente asintomatico rappresentando un rilievo casuale in corso di indagini endoscopiche, di interventi chirurgici o di autopsie[14]. Si tratta della presenza di foci di tessuto pancreatico che, sottoforma di noduli di 3-4 cm, di consistenza parenchimatosa e di colore giallastro, si localizzano nella sottomucosa della parete del tubo digerente[4]. Il tessuto ectopico è localizzato soprattutto nel tratto gastroenterico superiore, includendo lo stomaco (in particolare l'antro), il duodeno, il digiuno e il diverticolo di Meckel. Localizzazioni insolite sono l'ileo, la milza, il fegato, il mesentere e l'ombelico[8]. L'aspetto istologico è quello del tessuto pancreatico normale, organizzato in lobuli, dotti e acini; nel 30% dei casi è presente tessuto insulare[4]. A seconda della localizzazione il pancreas ectopico può dare dei sintomi associati a pancreatiti, ulcerazioni, ostruzione biliare, ostruzione intestinale, sanguinamenti gastrointestinali[15]); inoltre è stata descritta l'associazione con tumori e formazionisticistiche[16].

1.1c - ANATOMIA

Il pancreas è una grossa ghiandola lobulare, di consistenza molle e colorito grigiastro. È lunga 12-15cm, con un'altezza di 4cm (a livello del corpo) ed uno spessore di 1,5-2 cm, per un peso complessivo che è mediamente di 80 grammi.

E' un organo retroperitoneale, sito quindi in profondità nella cavità addominale dove giace davanti alle prime vertebre lombari e dietro lo stomaco, orientato pressoché trasversalmente dal duodeno alla milza.

La sua lunghezza, nell'adulto, è in media 12-15 cm e il suo peso è di circa 80 grammi. La sua estremità di destra, slargata, detta *testa*, si continua nel *corpo* tramite il *collo*, leggermente ristretto; l'estremità di sinistra, sottile, forma la *coda*. Dalla testa si diparte un prolungamento, il *processo*

uncinato, che dirigendosi in basso e a sinistra e incurvandosi su se stesso va a collocarsi al di sotto del corpo, risalendo più o meno posteriormente a questo.

Il *dotto pancreatico principale*, o di *Wirsung*, decorre nello spessore del parenchima ghiandolare con una direzione corrispondente al maggior asse dell'organo; origina dalla confluenza dei piccoli dotti lobulari della coda e, percorrendo il corpo verso destra, riceve altri dotti lobulari che vi sboccano quasi ad angolo retto (“a spina di pesce”). Aumentando di calibro, raggiunge il collo del pancreas dove volge in basso, posteriormente e a destra, avvicinandosi al coledoco. I due dotti attraversano obliquamente la parete della seconda porzione duodenale e qui si uniscono a formare l'*ampolla epatopancreatica* o di *Vater*. L'estremità distale e ristretta di questa ampolla si apre alla sommità della *papilla duodenale maggiore*.

La porzione terminale del coledoco, del dotto di *Wirsung* e l'*ampolla di Vater* sono provvisti di un sistema particolare di fibrocellule muscolari lisce che, nel loro insieme, formano un complesso sfinterico noto come *sfintere di Oddi*; è possibile distinguere, in questo complesso sfinterico, uno sfintere del coledoco, uno sfintere pancreatico ed uno sfintere ampollare.

Il *dotto pancreatico accessorio*, o di *Santorini*, decorre nello spessore della porzione superiore della testa, originando nel punto in cui, a livello del collo, il dotto di *Wirsung* volge in basso formando un gomito. Dopo un breve tragitto, sbocca in duodeno aprendosi sulla piccola ed arrotondata *papilla duodenale minore*, posta circa 2 cm più in alto della papilla maggiore.

Il pancreas è formato da due tipi distinti di tessuto ghiandolare intimamente associati tra loro: la componente principale dell'organo è esocrina e in essa sono inclusi gli isolotti pancreatici di cellule endocrine (*isole di Langerhans*)[17]. Anche nelle sezioni a basso ingrandimento si può facilmente riconoscere la componente esocrina, nettamente predominante, da quella endocrina che, con i suoi 0,7-1 milioni di isole di Langerhans[18], costituisce appena l'1-2% del volume del pancreas.

Il pancreas esocrino (circa l'85% di tutto l'organo) è una ghiandola composta, tubuloacinosa ramificata, circondata e parzialmente suddivisa in lobuli da una trama di connettivo lasso. Il lobulo rappresenta l'unità strutturale del parenchima pancreatico; è costituito da un insieme di acini

ghiandolari che, con il loro *canalicolo (o dotto) intercalare*, costituiscono le unità funzionali del pancreas esocrino. Le cellule secernenti hanno forma piramidale, nucleo in posizione basale, abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e un vistoso apparato di Golgi in posizione sovranucleare; gli apici di tali cellule appaiono ricchi di granuli secretori e si proiettano verso il lume di un piccolo dotto che si invagina in ciascuna massa secernente e rappresenta la porzione più distale del sistema duttale. Le cellule di rivestimento di questi dotti sono spesso visibili al centro degli acini secretori e pertanto sono note come cellule centro-acinose.

Il sistema duttale è costituito da dotti di calibro progressivamente crescente rappresentati dai dotti intercalari, che drenano direttamente gli acini, da quelli interlobulari che decorrono nei setti connettivali e collegano i vari lobi del pancreas e per la maggior parte drenano, attraverso i dotti lobari, nel dotto di Wirsung[17, 19]. Le cellule duttali dei dotti intercalari formano un epitelio squamoso semplice, che presto diventa cuboidale, e sono circondate da scarso connettivo. Quando il calibro dei dotti aumenta l'epitelio si fa cuboidale, poi cilindrico e ancora cilindrico pluristratificato. Le cellule duttali del Wirsung formano un epitelio colonnare e sono circondate da abbondante tessuto connettivo[20].

Il pancreas endocrino rappresenta il restante 25% dell'organo; esso è costituito da più di un milione di *isole di Langerhans*, raggruppamenti sferoidali di cellule che l'immunoistochimica ha rivelato essere di diverso tipo: le cellule β , produttori di insulina, sono le più numerose (circa il 75% di tutte le cellule endocrine) ed occupano la zona centrale delle isole di Langerhans. Le cellule α , produttori di glucagone, sono il 20% circa della popolazione cellulare insulare, sono poste alla periferia.

Le cellule δ , poste anch'esse principalmente in periferia sono responsabili della secrezione di somatostatina. Sparse, anche isolatamente, nel pancreas esocrino ci sono altri tipi di cellule endocrine come le cellule PP che producono e secernono il polipeptide pancreatico (PP), e le D1 che hanno come prodotto di secrezione il polipeptide intestinale vasoattivo (VIP)[17, 19, 21].

1.1d - FISIOLOGIA

Pancreas esocrino

Nell'uomo vengono secreti giornalmente circa 1500 ml di succo pancreatico, con un flusso di 1.5 ml /min. Il succo pancreatico è costituito da una componente acquosa, ricca di bicarbonato (circa 113 mEq/l contro i 24 mEq/l presenti nel plasma), e da una componente enzimatica, costituita prevalentemente dagli enzimi necessari alla digestione dei carboidrati, delle proteine e di grassi. L'elevata concentrazione di bicarbonati rende il succo pancreatico alcalino (pH 7.0-8.3), atto quindi a neutralizzare il chimo acido contenuto nel duodeno[22].

Le cellule acinari sono responsabili della sintesi della componente enzimatica del succo pancreatico; il loro secreto, definito "primario", si caratterizza per una tonicità ed una concentrazione ionica del tutto simile a quella del sangue e contiene venti differenti tipi di proteine, rappresentate principalmente dai precursori inattivi degli enzimi digestivi pancreatici (zimogeni).

I meccanismi alla base della secrezione esocrina del pancreas sono stati delucidati più di trenta anni fa da Palade[23], il quale dimostrò il verificarsi, all'interno della cellula acinare, di un movimento vettoriale delle proteine destinate alla secrezione dal versante baso-laterale, dove sono sintetizzate, verso la regione perinucleare fino alla zona apicale.

La sintesi proteica inizia in corrispondenza dei ribosomi del reticolo endoplasmatico rugoso, all'interno del quale le proteine, una volta assemblate, acquisiscono la loro struttura terziaria. Attraverso un sistema di trasporto mediato da vescicole, esse raggiungono l'apparato del Golgi; qui gli zimogeni vengono separati dalle altre proteine secrete in modo costitutivo ed immagazzinati in granuli secretori (processo di *secrezione regolata*). In particolare la selezione degli zimogeni avviene in corrispondenza del lato "trans" (apicale) dell'apparato del Golgi; essa non è altro che un processo di aggregazione pH dipendente: le proteine infatti che vanno incontro ad aggregazione a

valori di pH pari a 6 (quali quelli del lato trans del Golgi), vengono immagazzinate nei granuli cosiddetti immaturi.

Attraverso una fase di rimodellamento, caratterizzata dalla fusione dei granuli e gemmazione di nuove vescicole, i granuli immaturi si trasformano in granuli maturi, pronti per essere secreti in risposta agli stimoli secretagoghi[24].

Dalla superficie dei granuli secretori possono originarsi alcune vescicole, contenenti proenzimi, dirette alla membrana apicale, probabilmente attraverso il transito per il compartimento endosomiale: tali vescicole formano una via di secrezione, analoga a quella costitutiva (“*constitutive-like pathway*”), non sottoposta all’azione degli agenti secretagoghi, la quale è responsabile del rilascio costante di modeste quantità di enzimi nel lume duodenale e che contribuisce pertanto al processo digestivo tra un pasto e l’altro.

Alcune delle vescicole gemmanti dai granuli maturi possono poi dirigersi direttamente alla membrana apicale, costituendo quella che viene chiamata la via di *secrezione regolata “minore”* (“*minor regulated pathway*”), sensibile a livelli molto bassi di agenti secretagoghi[25].

Il 95% della secrezione pancreatica segue, comunque, la via regolata. L’attività secretoria delle cellule acinari è stimolata principalmente dalla colecistochinina (CCK), ormone prodotto dalla mucosa duodenale, e dalla acetilcolina (Ach), neurotrasmettitore liberato dalle terminazioni vagali. Entrambi i mediatori, legandosi ai rispettivi recettori presenti sulla membrana basolaterale delle cellule acinari (recettori CCK1 e 2 per la CCK e M1 e M2 per l’Ach), sono responsabili di un aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di calcio, immagazzinato nel reticolo endoplasmatico liscio. L’incremento del calcio a sua volta promuove l’attivazione a cascata di una serie di protein-chinasi coinvolte nell’evento finale: la secrezione di granuli di zimogeno [26].

Sulla membrana basolaterale delle cellule acinari sono localizzati altri recettori, quali il recettore del VIP (Vaso-Intestinal Peptide), della secretina (il cui bersaglio principale sono però le cellule duttali), del peptide ipofisiario attivante l’adenilato ciclasi (PACAP).

Tali recettori sono tutti accoppiati all'adenilato ciclasi, responsabile di un aumento dei livelli intracellulari di cAMP (adenosin monofosfato ciclico); il cAMP innesca, a sua volta, la secrezione dei granuli tramite l'attivazione della protein-chinasi A.

Anche il recettore dell'angiotensina II (Ang-II) è presente sulle cellule acinari, e sembra promuovere il loro processo di secrezione attraverso un incremento del calcio citosolico[24].

Le cellule acinari secernono, assieme agli enzimi, piccole quantità di un fluido isotonico rispetto al sangue. Anche la composizione ionica è analoga a quella sanguigna: Na^+ e Cl^- sono infatti gli elettroliti più concentrati.

La secrezione di Cl^- dipende dalla presenza, sulla membrana apicale, di un canale del Cl^- , il CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), attraverso cui l'anione fuoriesce sospinto da un gradiente elettrochimico creato dal co-trasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ presente sulla membrana basale; una pompa Na^+/K^+ fornisce il gradiente del Na^+ necessario per attivare il co-trasportatore. La secrezione del Cl^- genera un voltaggio negativo nel lume acinare responsabile, a sua volta, del passaggio di Na^+ e di acqua per via paracellulare, attraverso le tight-junctions tra le cellule acinari.

La maggior parte della componente acquosa del succo pancreatico proviene dalle cellule duttali, deputate alla produzione di un fluido ricco di bicarbonati che alcalinizza e diluisce il secreto primario delle cellule acinari. La secrezione del bicarbonato è strettamente dipendente da quella del Cl^- , la quale avviene con un meccanismo identico a quello descritto per le cellule acinari.

Una volta che il Cl^- , grazie al CFTR, ha raggiunto il lume, viene scambiato con il bicarbonato intracellulare, che viene così riversato in sede extracellulare. Le fonti di bicarbonato nella cellula sono due: la prima è l'enzima anidrasi carbonica, che catalizza la formazione di bicarbonati a partire dall'acqua e dalla CO_2 , la seconda è il cotrasportatore basolaterale $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$.

La secretina e l'Ach sono i più importanti stimoli fisiologici alla secrezione duttale.

La secretina possiede un recettore accoppiato all'adenilato ciclasi, responsabile di un incremento del cAMP intracellulare, il quale, a sua volta, attiva le protein-chinasi A.

Tali enzimi fosforilano e attivano il CFTR.

L'Ach causa un aumento della concentrazione intracitoplasmatica di calcio, ione che sembra modulare l'apertura di canali del Cl^- calcio-dipendenti, e quindi, in ultima analisi, favorire la secrezione di bicarbonati attraverso lo scambio Cl^-/HCO_3^- .

Anche la CCK agisce sulle cellule duttali con un meccanismo del tutto simile a quello della Ach, legato anch'esso al calcio come secondo messaggero [27].

La secrezione del succo pancreatico avviene in tre fasi: *cefalica*, *gastrica* ed *intestinale*.

La *fase cefalica* viene evocata dal sapore, dall'odore o anche dalla sola vista del cibo. I mediatori sono costituiti dall'Ach, liberata dalle terminazioni vagali, e dalla gastrina, simile per struttura alla CCK, ma secretagogo pancreatico molto meno potente rispetto a questa; l'Ach promuove essa stessa il rilascio di gastrina dalle cellule G dell'antro gastrico.

Durante la *fase gastrica*, i riflessi vagovagali, evocati dalla distensione dello stomaco, stimolano la produzione di piccoli volumi di succo pancreatico a elevato contenuto proteico. Anche la gastrina contribuisce, in questa fase, allo stimolo secretorio.

Nella *fase intestinale*, l'arrivo del chimo acido nel duodeno attiva la secrezione di ingenti quantità di succo pancreatico ricco di bicarbonati e relativamente povero di enzimi. Questo tipo di risposta pancreatica è mediata principalmente dalla secretina, rilasciata dalle cellule della mucosa duodenale e digiunale a seguito della riduzione del pH luminale.

La presenza all'interno del duodeno di peptidi, aminoacidi ed acidi grassi promuove la secrezione della componente enzimatica del succo pancreatico attraverso l'ormone CCK, sintetizzato dalla mucosa duodeno-digiunale.

Secretina e CCK potenziano la loro azione a vicenda, dal momento che i recettori della secretina sono presenti sulle cellule acinari, così come quelli della CCK sulle cellule duttali.

L'inibizione della secrezione pancreatica sia enzimatica che elettrolitica è controllata da stimoli nervosi ortosimpatici, che verosimilmente agiscono riducendo l'apporto ematico alla ghiandola, e da alcuni ormoni gastrointestinali.

I più importanti sono: il glucagone che determina una riduzione della secrezione di bicarbonato dopo stimolo con secretina, CCK o entrambi; la somatostatina che antagonizza gli effetti della secretina probabilmente per competizione con il medesimo recettore; il polipeptide pancreatico per il quale è stata dimostrata un'azione inibente sulla secrezione di bicarbonato in alcune specie animali ma non confermata nell'uomo.

L'insieme di tutti questi meccanismi di controllo è integrato in maniera tale da garantire una risposta rapida ed adeguata in seguito all'alimentazione.

Gli enzimi prodotti dal pancreas hanno un ruolo centrale nella digestione delle principali classi di macronutrienti: i carboidrati, le proteine e i lipidi. Sono sintetizzati dalle cellule acinari e successivamente immagazzinati in granuli di zimogeno che si localizzano nella loro porzione apicale. In risposta a stimoli adeguati le cellule liberano gli enzimi nel lume con un processo di esocitosi. Di seguito sono descritti suddivisi per classi.

1) Proteasi

Rappresentano il principale prodotto di secrezione delle cellule acinari (80%) e la principale risorsa del nostro organismo per la digestione delle proteine introdotte con l'alimentazione. Le proteasi pancreatiche sono tutte prodotte in forma inattiva, come pro-enzimi, attivati in condizioni fisiologiche solo all'interno del lume intestinale; comprendono endopeptidasi (tripsine, chimotripsine ed elastasi), che scindono legami peptidici situati all'interno della catena polipeptidica, ed eso-peptidasi (carbossipeptidasi), che invece staccano gli aminoacidi carbossiterminali.

Dalla loro azione originano oligopeptidi, ulteriormente idrolizzati da parte di enzimi dell'orletto a spazzola degli enterociti, e aminoacidi liberi, che possono essere assorbiti attraverso la mucosa intestinale.

Le endopeptidasi fanno parte della famiglia delle proteasi seriniche così definite perché posseggono un residuo di serina nel sito attivo; le esopeptidasi sono invece metalloenzimi contenenti zinco[22, 28].

Tripsinogeno e tripsine

Il tripsinogeno è il più importante tra gli enzimi pancreatici perché la sua attivazione a tripsina innesca una cascata enzimatica che conduce all'attivazione anche di tutti gli altri proenzimi. Nel succo pancreatico sono stati descritti diversi tipi di tripsinogeno, definiti cationico, anionico e mesotripsinogeno, in base alla loro mobilità elettroforetica[29]). Il più abbondante è il tripsinogeno cationico codificato dal gene PRSS1 (attualmente con tale sigla si intende in maniera interscambiabile sia il gene, sia la proteina) che rende conto dei due terzi dall'attività totale della tripsina; il secondo è il tripsinogeno anionico o PRSS2; la terza forma è il mesotripsinogeno o PRSS3 che contribuisce a meno del 5% dell'attività tripsinica. È stata descritta anche una quarta forma, detta pancreasina, ma ad oggi non sono note le sue proprietà né biologiche né fisiologiche[31]. Il tripsinogeno è convertito nella sua forma attiva per azione di una peptidasi di natura glicoproteica che si localizza sull'orletto a spazzola degli enterociti, l'enterochinasi: essa agisce rimuovendo per idrolisi, dall'estremità N-terminale della molecola, un esapeptide che ne maschera il sito attivo[30].

La tripsina stessa è in grado di autoattivarsi, tramite la rimozione di un peptide di 8 aminoacidi, TAP o Tripsinogen Activation Peptide, tra il residuo di Lisina in posizione 23 e quello di Isoleucina in posizione 24 del tripsinogeno. L'efficacia di questo meccanismo sembra marcatamente aumentata in presenza di calcio e dipende anche dal pH[31]. Inoltre, l'attivazione del tripsinogeno può essere mediata dalla catepsina B, una proteasi lisosomiale che si colocalizza nei granuli di zimogeno con il tripsinogeno, anche se questo meccanismo sembra avere un'importanza limitata nell'organismo umano[32].

Data la possibilità dell'autoattivazione della tripsina, e considerato il ruolo di questo enzima nella cascata che conduce all'attivazione di tutti gli altri enzimi digestivi, devono esistere meccanismi fisiologici in grado di impedire che tale processo avvenga all'interno del parenchima pancreatico.

Un possibile meccanismo agisce a livello delle cellule acinari ed è rappresentato dalla compartimentalizzazione cellulare: il tripsinogeno e gli altri proenzimi sono localizzati e protetti all'interno dei loro granuli citoplasmatici.

Un altro meccanismo agisce a livello del sistema duttale ed è rappresentato dall'inibitore pancreatico secretorio della tripsina [PSTI o inibitore proteasico serinico Kazal tipo 1 (Spink 1)]; esso si localizza nei granuli di zimogeno assieme al tripsinogeno ed è normalmente co-secreto dalle cellule acinari. Il rapporto stechiometrico è di 5:1 per cui può essere inibito al massimo il 20% della tripsina[33].

Inoltre la tripsina è in grado di catalizzare la sua stessa autolisi attraverso l'idrolisi della catena che connette i due domini globulari della tripsina, in corrispondenza di un residuo di arginina (R122). Anche in questo meccanismo è coinvolto il calcio, ostacolando l'autolisi e favorendo quindi la persistenza della tripsina in forma attiva[31].

Chimotripsinogeno

E' il precursore inattivo della chimotripsina, una proteasi serinica che ha specificità per legami peptidici in cui un residuo aminoacidico è dato da un AA aromatico. L'attivazione del chimotripsinogeno è mediata dalla tripsina che idrolizza il legame tra Arg15 e Ile-16; il peptide N-terminale di 15 AA resta legato alla proteina per mezzo di un ponte disolfuro tra Cys 1 e Cys 122. Si forma così la α -chimotripsina, attiva ma instabile. Questa molecola possiede tre legami superficiali[13-14; 146-147; 148-149]che sono suscettibili di un'ulteriore idrolisi da parte della chimotripsina stessa: questa autoattivazione porta alla formazione della α -chimotripsina o semplicemente chimotripsina, una proteina di 241 AA, formata da tre catene polipeptidiche[30].

ElastasiLe elastasi sono proteasi seriniche che idrolizzano legami peptidici in corrispondenza di residui di alanina, glicina e serina. Sono in grado di digerire l'elastina, una proteina extracellulare altamente insolubile che conferisce le proprietà elastiche ai tessuti. L'elastasi pancreatica deriva da un precursore inattivo, la proelastasi, attivato dalla tripsina[31]. Sono state identificate due forme di elastasi nel succo pancreatico[34-35] ma non si conosce con esattezza il loro meccanismo di secrezione e la regolazione della stessa.

2) Lipasi

Le lipasi sono prodotte quasi esclusivamente dal pancreas e sono indispensabili per la digestione dei lipidi introdotti con la dieta.

Comprendono la glicerolo estere idrolasi ("lipasi pancreatica"), la colipasi, la fosfolipasi A2 e la carbossilesterasi.

Lipasi pancreatica (PTL)

La lipasi pancreatica è una serin-esterasi che idrolizza i legami esterei in posizione C1 e C3 dei triacilgliceroli, producendo acidi grassi liberi, i composti intermedi 1,2-diacilglicerolo e 2-3-diacilglicerolo e infine il 2-monoacilglicerolo. È una proteina di 48.000 dalton, costituita da una singola catena polipeptidica di 466 aminoacidi. Possiede due domini: quello N-terminale di 333 aminoacidi, contiene il sito attivo che normalmente è nascosto da un segmento ad alfa-elica che lo copre come un coperchio.

In questa conformazione la lipasi è inattiva. Il dominio C-terminale ha una struttura a beta-foglietto e comprende il sito di legame della procolipasi.

È proprio a seguito dell'interazione con la procolipasi che il sito attivo della lipasi viene smascherato e l'enzima passa nella sua conformazione attiva. L'apertura del "coperchio" espone oltre alla triade catalitica contenente serina, un incavo ossianionico adiacente al sito attivo in cui il substrato lipidico apolare riesce a penetrare e può essere idrolizzato[30-31].

Colipasi

La colipasi è una piccola proteina di 10000 dalton priva di una propria attività enzimatica. E' secreta dal pancreas in forma inattiva, la procolipasi, e viene attivata dalla tripsina a livello duodenale, tramite il clivaggio di un pentapeptide N-terminale, chiamato enterostatina. La colipasi ha l'importante funzione di permettere l'attivazione della lipasi pancreatica e soprattutto di stabilizzarla nella sua forma attiva in presenza nel duodeno di sostanze inibenti quali i sali biliari, i fosfolipidi, le proteine e i carboidrati alimentari[31].

Fosfolipasi A2

La fosfolipasi A2 catalizza l'idrolisi del legame estereo dell'acido grasso legato al carbonio 2 del glicerolo della fosfatidilcolina, con formazione di una molecola di acido grasso e di lisofosfatidilcolina. Ha un peso molecolare di 14000 dalton ed è composta da una sequenza di 125AA che comprende un peptide segnale di 7AA e un peptide di attivazione. Per funzionare necessita di calcio ed è in grado di attaccare i fosfolipidi emulsionati dai sali biliari[22; 31].

CarbossilesterasiLa carbossilesterasi è attiva su vari substrati: in vitro è in grado di idrolizzare trigliceridi, esteri del colesterolo, fosfolipidi, lisofosfolipidi, ceramidi, esteri delle vitamine liposolubili, galattolipidi. L'enzima ha un peso molecolare di 100000 dalton ed è una glicoproteina, ricca in residui di prolina. La struttura non è stata dettagliatamente descritta, ma l'enzima possiede la triade enzimatica contenente serina come la lipasi e anche il suo sito attivo e' mascherato da un'ansa superficiale altamente mobile[22, 31].

Proteine correlate alla lipasi pancreatica (PRLP)

Il pancreas umano secerne altre due proteine (PRLP1 e PRLP2) che hanno dal 65 al 70% della sequenza aminoacidica in comune con la lipasi pancreatica, e una struttura ad essa sovrapponibile. Differiscono dalla lipasi per la specificità di substrato: la PRLP2 idrolizza trigliceridi, fosfolipidi, e galattolipidi; il substrato della PRLP1 invece non è noto[31].

3) Amilasi

L'amilasi pancreatica è una glicoproteina di 57000 dalton, contenente una singola catena oligosaccaridica. Scinde i legami alfa-1,4 glicosidici degli amidi e del glicogeno portando alla liberazione di destrine, un insieme di maltosio, maltotriosio (a 2 e 3 molecole di glucosio) e di oligosaccaridi con 6-8 unità di glucosio che contengono sia i legami alfa-1,4 che alfa-1,6. La digestione delle destrine è completata dagli enzimi dell'orletto a spazzola.

4) Ribonucleasi e Desossiribonucleasi

Riducono RNA e DNA nei loro costituenti nucleotidici. I nucleotidi sono in parte assorbiti come tali ed in parte ridotti, dagli enzimi dell'orletto a spazzola, a nucleosidi e basi puriniche e pirimidiniche libere.

Pancreas endocrino

La componente endocrina del pancreas è costituita da vari tipi di cellule differenziate nella produzione di ormoni polipeptidici diversi. L'insulina è stato il primo ormone ad essere identificato. Ha un peso molecolare di 6000 dalton ed è costituito da due catene polipeptidiche, A e B, rispettivamente di 21 e 30 aminoacidi, legate da due ponti disolfuro; un terzo ponte è presente nella catena A.

E' sintetizzata come pre-pro-insulina e la rimozione del suo peptide N-terminale di 24 aminoacidi dà origine alla pro-insulina. Mentre viene immagazzinata nell'apparato di Golgi, la pro-insulina subisce un lento processo di scissione in cui si generano l'insulina e il peptide C; entrambi sono accumulati nei granuli di secrezione e successivamente liberati in quantità equimolari. La secrezione dell'insulina è regolata principalmente dai livelli di glucosio circolanti: la riduzione della glicemia la inibisce mentre l'aumento la stimola potentemente. Numerosi altri stimoli ormonali e neurogeni hanno però un ruolo nel controllo della secrezione dell'ormone: il mannosio, alcuni aminoacidi, la stimolazione vagale e quella beta-adrenergica e alcuni ormoni gastrointestinali (GIP,

GPL-1, CCK, secretina, gastrina) stimolano il rilascio di insulina; la somatostatina e la stimolazione alfa-adrenergica la inibiscono.

Essa agisce su numerosi tessuti bersaglio dotati di specifici recettori per l'ormone, che appartengono alla classe dei recettori tirosinchinasici. Ha effetti molteplici e fondamentali per l'intero organismo: interviene nel controllo del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine, comportandosi come ormone anabolico e cioè favorendo la conservazione dell'energia introdotta con gli alimenti. A livello epatico stimola la sintesi di glicogeno e trigliceridi mentre inibisce la gluconeogenesi, la glicolisi e la chetogenesi; nel muscolo scheletrico stimola la captazione di aminoacidi e la sintesi proteica, come pure quella di glucosio, e la glicogenosintesi; a livello del tessuto adiposo promuove l'accumulo di trigliceridi.

Il glucagone è un polipeptide di 29 aminoacidi derivante da un precursore di 160 residui aminoacidici, il prepro-glucagone, codificato da un gene sito sul cromosoma 2. La più importante funzione del glucagone è di contribuire al mantenimento di valori glicemici costanti, anche in presenza di aumentate richieste tissutali di glucosio: è secreto in risposta all'ipoglicemia e funziona in senso iperglicemizzante. Agisce soprattutto a livello epatico stimolando la glicogenolisi, la gluconeogenesi e la chetogenesi. Anche alcuni aminoacidi, l'acetilcolina, le catecolamine, i glucocorticoidi, alcuni ormoni gastrointestinali (gastrina, CCK, GIP) stimolano il rilascio di glucagone dalle cellule alfa.

La somatostatina prodotta dalle cellule δ del pancreas è un peptide di 14 aminoacidi che controlla con meccanismo paracrino la funzione delle cellule α e β comportandosi come potente inibitore della secrezione di insulina e glucagone.

Le *cellule PP*, infine, secernono il polipeptide pancreatico (PP), il quale, sinergicamente alla somatostatina, inibisce la secrezione esocrina del pancreas[4].

1.2 - LE MALATTIE INFIAMMATORIE DEL PANCREAS

1.2a - PANCREATITE ACUTA

Definizione

La pancreatite acuta è una malattia infiammatoria del pancreas a decorso acuto che frequentemente si estende ai tessuti peripancreatici e che talvolta arriva a coinvolgere organi a distanza[36].

Epidemiologia

La pancreatite acuta è la più frequente malattia del pancreas ed è osservata in ogni parte del mondo[37]. La sua incidenza è estremamente variabile nelle diverse aree geografiche, e va da 5,4 a 79,8 nuovi casi su 100.000 abitanti l'anno. Essa risulta tuttavia complessivamente in aumento, e questo a seguito sia di un miglioramento delle capacità diagnostiche, sia di un incremento della prevalenza dei fattori di rischio[38, 39]. Negli Stati Uniti la pancreatite acuta colpisce 100.000 individui all'anno[40]. In Gran Bretagna l'incidenza varia da 10 a 20 casi su un milione di abitanti all'anno[41], mentre in Italia è stimata attorno ai 5-6 casi su 100.000 abitanti all'anno[42].

La mortalità complessiva è del 10%-15%, oscillando da valori inferiori al 5% per la forma lieve di malattia, al 20%-25% per la forma severa[41].

Circa metà dei decessi si ha nelle prime due settimane e sono in genere riconducibili a insufficienza d'organo. Il restante 50% si verifica nelle settimane o nei mesi successivi, e la morte è per lo più attribuibile a insufficienza d'organo associata a necrosi infetta o alle complicazioni di una necrosi sterile[43].

Per quanto riguarda le complicazioni, il 57% dei pazienti ricoverati per pancreatite acuta sviluppa una raccolta fluida[44]; le pseudocisti compaiono nel 2%-15% dei pazienti[42], mentre gli ascessi si riscontrano nel 2%-6% dei casi[4].

Nei pazienti colpiti da pancreatite acuta severa, l'insufficienza d'organo si manifesta nel 50% dei casi, mentre la prevalenza delle infezioni a carico del tessuto necrotico è del 15%-20% [43].

Il primo studio prospettico multicentrico sulla pancreatite acuta condotto in Italia risale al 2004. In esso si riconosceva che, in linea con i dati mondiali, la forma più frequente di malattia era quella lieve (75% dei casi) e che il fattore eziologico più spesso implicato era la litiasi biliare. Si segnalava un'età media di insorgenza di $59,6 \pm 20$ anni ed una mortalità complessiva del 5,2%, oscillante dal 1,2% per la pancreatite acuta lieve al 17,1% per la pancreatite acuta severa[45].

Oggi abbiamo a disposizione i dati aggiornati[46]: l'età media di insorgenza di malattia risulta di $62,0 \pm 18,2$ anni; i maschi sono più giovani ($59,7 \pm 18,2$ anni) delle femmine ($64,3 \pm 17,9$ anni). Come nel resto del mondo la forma più frequente di malattia quella è lieve (85,8% dei casi); infatti la forma severa si riduce al 14,2% dei casi.

La mortalità complessiva è del 5% e va dal 3% per la pancreatite lieve e al 17% per la severa.

Classificazione

Classificazione di Marsiglia del 1963

In tale classificazione, il termine pancreatite acuta è usato per descrivere un episodio di flogosi acuta del pancreas, responsabile di lesioni tessutali che vanno dall'edema interstiziale all'emorragia, alla necrosi della ghiandola e del tessuto adiposo peripancreatico. L'identificazione e la rimozione dell'agente causale consentono la restitutio ad integrum sia morfologica che funzionale dell'organo. Viene inoltre riconosciuta un'entità clinica a sé stante, la pancreatite acuta ricorrente, caratterizzata da ripetuti attacchi di pancreatite acuta[47].

Classificazione di Cambridge del 1983 In questo sistema classificatorio, la pancreatite acuta è definita come una malattia infiammatoria del pancreas, caratterizzata, dal punto di vista clinico, da dolore addominale e, dal punto di vista laboratoristico-diagnostico, dall'incremento dei livelli sierici

ed urinari degli enzimi pancreatici. Viene riconosciuto che la malattia può ricorrere, e presentarsi sia in una forma lieve che in una severa[48].

Classificazione di Marsiglia del 1984

Viene confermata la distinzione della pancreatite acuta in una forma lieve ed in una severa. La prima è caratterizzata da un decorso clinico benigno ed alterazioni morfologiche quali l'edema interstiziale e la necrosi modesta del tessuto adiposo peripancreatico. La seconda si contraddistingue per la comparsa di necrosi della ghiandola e del tessuto adiposo intra e peripancreatico, spesso associata a stravasi ematici; clinicamente il paziente tende a sviluppare ipotensione, insufficienza renale e respiratoria, che ne possono causare la morte[49].

Tali aspetti classificativi rimangono invariati nella revisione del 1988 (classificazione di Marsiglia-Roma)[50].

Classificazione di Atlanta del 1992

E' l'attuale classificazione di riferimento per la pancreatite acuta; in essa la patologia continua ad essere distinta in una forma lieve ed in una severa[51]. La pancreatite acuta si definisce severa in presenza di :

-insufficienza d'organo, che comprende: pressione arteriosa sistolica inferiore a 90 mmHg, PaO₂ inferiore a 60 mmHg, insufficienza renale (creatinina sierica superiore a 2 mg/dl dopo reidratazione) e sanguinamento gastrointestinale superiore a 500 ml/24h;

-complicazioni locali, quali necrosi pancreatica (almeno il 30% del parenchima o più di 3 cm di dimensioni), pseudocisti pancreatiche (raccolte di succo pancreatico delimitate da una parete di tessuto fibroso o granulomatoso), e ascessi pancreatici (raccolte circoscritte di pus non contenenti o contenenti solo in minima parte tessuto necrotico);-segni prognostici sfavorevoli, quali il raggiungimento di un punteggio maggiore o uguale a tre utilizzando i criteri di Ranson[52] e maggiore o uguale a otto con i criteri dell'Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)-II[53]. Nella medesima classificazione la pancreatite acuta lieve viene definita come una flogosi del pancreas non associata a disfunzione d'organo o con disfunzione presente solo in

minima parte. Essa rappresenta la forma più frequente di malattia (75%-85% dei casi); 15%-25% dei casi si presentano invece in forma severa[54].

Eziologia

Le cause di pancreatite acuta sono elencate nella tabella 1.

I calcoli biliari sono la causa principale di tale patologia essendo responsabili del 35%-60% dei casi a seconda della popolazione considerata[38, 55-56].

L'incidenza della pancreatite acuta biliare è maggiore nelle donne caucasiche con più di 60 anni e nei pazienti con calcoli di piccole dimensioni (< 5 mm di diametro) o con microlitiasi[57-58]. Il termine microlitiasi è in genere usato come sinonimo di fango biliare; più precisamente per microlitiasi si intende la presenza di calcoli con un diametro inferiore ai 3 mm, mentre il fango biliare è una sospensione di cristalli, mucina, glicoproteine, detriti cellulari e materiale proteinaceo[59].

Poco più di un secolo fa, Opie ipotizzò per primo una correlazione tra litiasi biliare e pancreatite[60].

La letteratura ha proposto due meccanismi principali tramite cui un calcolo può causare la malattia[43]:

-Teoria del canale comune: l'ostruzione della papilla di Vater ad opera di un calcolo può indurre il reflusso di bile dal coledoco nel dotto di Wirsung; gli acidi biliari, captati da un trasportatore localizzato sul versante apicale delle cellule acinari pancreatiche, determinano un aumento della concentrazione intracitoplasmatica di calcio, responsabile a sua volta della disfunzione mitocondriale e della necrosi cellulare[61].

-Teoria del dotto pancreatico ostruito: la sola ostruzione del dotto è di per sé sufficiente a causare la pancreatite modificando il metabolismo del calcio nelle cellule acinari[62]. L'abuso di alcol è in genere citato come la seconda più frequente causa di pancreatite acuta dopo la litiasi biliare (25%-

30% dei casi), nonostante solo una piccola percentuale di etilisti sviluppi la malattia[63]. La “pancreatite alcolica” è infatti un’entità clinica molto controversa; la comunità scientifica cerca di comprendere se si tratti di una malattia cronica ab inizio o se diventi tale dopo ripetuti attacchi di pancreatite acuta. Studi istologici hanno chiaramente dimostrato come gli episodi flogistici acuti siano comunque associati a lesioni croniche e che dunque le acuzie si sviluppino su un pancreas già affetto da pancreatite cronica[38, 64-66].

Una vasta gamma di farmaci (più di trecento) è implicata nello sviluppo di pancreatite acuta, per lo più attribuibile a reazioni idiosincrasiche. Quelli per cui è stata riconosciuta un’associazione certa sono: gli antimetaboliti come l’azatioprina, la 6-mercaptopurina e gli alcaloidi della vinca, i diuretici dell’ansa e tiazidici, le sulfonamidi, gli aminosalicilati (sulfasalazina e mesalazina), le tetracicline, l’acido valproico, l’ α -metildopa, i farmaci usati nella terapia della infezione da virus dell’immunodeficienza acquisita come la didanosina[67].

Alcuni disordini metabolici predispongono alla pancreatite acuta come l’ipercalcemia e l’ipertrigliceridemia. L’associazione tra ipercalcemia e pancreatite acuta fu suggerita per la prima volta da Cope et Al. [68]; successivi studi confermarono tale correlazione e delinearono il ruolo dell’ipercalcemia nell’attivazione[69] e nella successiva stabilizzazione [70] della tripsina.

Per quanto riguarda l’ipertrigliceridemia, solo valori di trigliceridi superiori a 1000 mg/dl, apprezzabili quasi esclusivamente nelle dislipidemie familiari o primarie (di tipo 1 e 5), possono causare la pancreatite acuta. E’ probabile che l’idrolisi dei trigliceridi da parte della lipasi pancreatica determini l’accumulo di acidi grassi liberi che risultano tossici per le cellule acinari[71].

La pancreatite acuta può avere anche un’eziologia infettiva; molteplici virus e batteri sono stati chiamati in causa (vedi tabella 1) in quanto responsabili di una infezione diretta delle cellule acinari, ma i meccanismi patogenetici rimangono ancora poco chiari. I parassiti (Ascaridi per lo più) possono causare pancreatite ostruendo il dotto pancreatico[72].

Un gruppo di ricercatori[73] ha ipotizzato che alcol e virus agiscano sinergicamente nel causare danno pancreatico e che, nel dettaglio, l’alcol renda l’organo più suscettibile all’azione di ceppi,

virulenti e non, di Coxackie virus di tipo B, in analogia a quanto accade a livello epatico con i virus B e C dell'epatite.

I traumi possono causare pancreatite, inclusi quelli iatrogeni quali la colangiopancreatografia retrograda endoscopica, o ERCP (fino ad un 15% dei casi), la gastrectomia distale, la splenectomia, l'esplorazione del coledoco, la sfinterotomia endoscopica[43].

Anomalie anatomiche come il pancreas divisum e le malformazioni cistiche delle vie biliari, le disfunzioni dello sfintere di Oddi (SOD), gli adenomi e i carcinomi ampollari e, più in generale, i tumori biliopancreatici, l'ostruzione del dotto pancreatico ad opera di calcoli o mucina possono causare una flogosi acuta del pancreas, ma più frequentemente si associano a pancreatite acuta ricorrente[66]; essi verranno pertanto trattati in modo più approfondito in seguito.

La pancreatite autoimmune, una forma di pancreatite cronica sostenuta da un processo infiammatorio su base autoimmune, caratterizzato da infiltrazione linfocitaria, fibrosi e disfunzione d'organo, raramente si presenta con episodi di dolore addominale che richiamano quelli della pancreatite acuta[74].

La tendenza a sviluppare episodi di pancreatite acuta può essere infine geneticamente determinata. Pazienti portatori di mutazioni geniche che tendono a sviluppare nel tempo una pancreatite cronica possono presentare, nelle fasi iniziali del loro decorso clinico, episodi, spesso ricorrenti, di pancreatite acuta.

I geni coinvolti sono: il gene del tripsinogeno cationico (PRSS1), il gene dell'inibitore delle serin-proteasi Kazal tipo 1 (SPINK1) ed il gene che codifica per il canale del cloro CFTR (Cystic Fibrosis Conductance Regulator)[66]. Tali mutazioni verranno più dettagliatamente esaminate nei capitoli successivi riguardanti specificatamente la pancreatite acuta ricorrente e la pancreatite cronica, nella cui patogenesi detengono un ruolo cruciale.

Qualora non sia possibile stabilire l'eziologia della pancreatite, essa viene definita idiopatica; le attuali raccomandazioni suggeriscono che l'eziologia della pancreatite dovrebbe essere determinata nell'80% dei casi e che non più del 20% di essi andrebbe etichettato come idiopatico[56].

Per concludere, questi sono i dati italiani: le forme ad eziologia biliare sono le più frequenti (69,3%), quelle correlate all'abuso di alcol rappresentano il 6% dei casi e le restanti eziologie (post-chirurgica, post-ERCP, traumatica, associata a farmaci, a iperlipidemia e a pancreas divisum) il 7,1%. Il 17,1% rimane ad eziologia sconosciuta (idiopatica)[46].

Fisiopatologia

Eventi precoci

La pancreatite acuta consegue all'inappropriata e precoce attivazione all'interno delle cellule acinari degli enzimi digestivi, i quali innescano l'auto-digestione del tessuto pancreatico, con possibile coinvolgimento dei tessuti adiacenti, risposta infiammatoria sistemica ed insufficienza multi-organo[75].

I meccanismi sottostanti all'attivazione degli zimogeni sono molteplici.

Uno degli eventi più precoci consiste nell'arresto della secrezione dei pro-enzimi mentre la loro sintesi continua[76].

Segue la co-localizzazione di idrolasi lisosomiali come la catepsina B all'interno di strutture vacuolari instabili contenenti gli zimogeni[77] ed il clivaggio del tripsinogeno a tripsina[78].

L'attivazione del tripsinogeno è considerata l'evento cardine nella fisiopatologia della pancreatite acuta[79], dal momento che la tripsina a sua volta causa l'attivazione di altro tripsinogeno e degli altri pro-enzimi pancreatici quali la pro-fosfolipasi e la pro-elastasi, con un meccanismo a cascata che, se l'azione degli inibitori non è sufficiente, porta all'autolisi della ghiandola.

L'inibitore delle serin-proteasi Kazal tipo 1 (SPINK1), presente fisiologicamente nei granuli secretori delle cellule acinari, si lega al sito attivo della tripsina con un rapporto 1:1, inibendone l'attività; quando più del 10% di tutto il tripsinogeno è stato ormai attivato, questo meccanismo di protezione non è però più sufficiente[80].

Il calcio sembra infine svolgere un ruolo importante nella fisiopatologia della pancreatite acuta, soprattutto nelle tappe iniziali: un aumento delle concentrazioni intracitoplasmatiche di calcio e una compromissione delle vie del segnale calciodipendenti causerebbero la vacuolizzazione delle cellule acinari e contribuirebbero all'attivazione del tripsinogeno[75].

La morte delle cellule acinari: necrosi versus apoptosi

In corso di pancreatite acuta la morte cellulare può avvenire sia per necrosi che per apoptosi. L'apoptosi, nota anche come "morte cellulare programmata", è caratterizzata da eventi quali la riduzione del volume cellulare, la condensazione della cromatina e la formazione di corpi apoptotici e non causa l'infiammazione ed è fondamentale per garantire l'omeostasi dei tessuti. Il controllo e la regolazione del processo apoptotico dipendono da una famiglia di proteine, le bcl-2 (da *B cells lymphoma*, dove la loro capostipite venne per la prima volta descritta), in grado di modulare la permeabilità mitocondriale, mentre i bracci effettori sono rappresentati da un gruppo di proteasi, note come caspasi. La necrosi è invece un tipo di morte cellulare che interviene esclusivamente in condizioni patologiche e costituisce la più grave forma di risposta al danno cellulare. Essa si contraddistingue per rigonfiamento e disfunzione dei mitocondri, rottura della membrana cellulare e dispersione del contenuto nell'interstizio con conseguente flogosi. Le concentrazioni di ATP (adenosina tri-fosfato) cellulare sono determinanti nell'indirizzare il processo di morte di una cellula in senso necrotico o l'apoptotico e questo vale anche per il pancreas[81]; il motivo risiede nel fatto che l'ATP è necessario per l'attività delle caspasi. E' stato dimostrato che quando l'apoptosi prevale sulla necrosi la severità del processo infiammatorio è minore[82].

Ruolo dell'infiammazione

Il danno tissutale provocato dall'attivazione intraparenchimale degli enzimi conduce ad una risposta flogistica locale e sistemica, in cui giocano un ruolo fondamentale i mediatori dell'infiammazione. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interleuchina (IL)-1 β , IL-6, Platelet Activating Factor (PAF),

Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, IL-8, Growth-Related Oncogene (GRO)- α , la proteina chemotattica dei monociti di tipo 1 (MCP-1) e la sostanza P fanno parte dei mediatori pro-infiammatori, mentre la componente del complemento C5a, IL-10, il recettore solubile del TNF- α , l'antagonista del recettore della IL-1 e la neuropeptidasi neutra (NEP) costituiscono i mediatori antinfiammatori[75]. Dopo l'insulto iniziale, comincia un'intensa migrazione di leucociti dal circolo agliacini pancreatici, che richiede prima l'adesione all'endotelio e poi il passaggio attraverso la parete vascolare. Questo processo, noto come chemotassi, dipende dall'interazione dei leucociti con specifiche molecole, le chemochine, che li guidano, grazie ad un gradiente di concentrazione, verso i tessuti danneggiati[83].

Le chemochine sono citochine dal basso peso molecolare (8-10 kDa) in grado di stimolare, non solo la chemiotassi, ma anche l'attivazione dei leucociti. Vengono suddivise sulla base della loro struttura primaria in due grandi famiglie: quella delle CXC (o α) chemochine, dove i due residui di cisteina N-terminali della molecola sono separati da un aminoacido, e quella delle CC (o β) chemochine, in cui i due residui sono adiacenti.

Il gruppo delle CC chemochine include la proteina chemotattica dei monociti (MCP) di tipo 1, 2 e 3, la proteina infiammatoria dei macrofagi (MIP) 1 α e 1 β , RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cells expressed and Secreted) ed esercita la propria azione prevalentemente sui monociti, i linfociti e gli eosinofili; quello delle CXC chemochine, invece, comprende IL-8, GRO- α , il peptide derivato dall'epitelio attivante i neutrofili (ENA)-78, ed agisce principalmente sui neutrofili. Le chemochine si legano ad una famiglia di recettori che possiedono sette domini transmembranari e che sono accoppiati a proteine G; essi sono espressi sulla superficie dei leucociti e garantiscono un reclutamento estremamente selettivo degli stessi[84].

Una volta raggiunto il tessuto, i leucociti rilasciano specie reattive dell'ossigeno, citochine ed enzimi proteolitici, contribuendo in questo modo al danno pancreatico e sistemico.

Queste osservazioni suggeriscono un ruolo molto importante delle chemochine nelle prime fasi del processo fisiopatologico che caratterizza la pancreatite acuta[75].

Le cellule acinari del pancreas sono in grado di sintetizzare e rilasciare citochine proinfiammatorie, quali TNF- α (85) e PAF (86), CXC chemochine quali Interferon Inducible Protein (IP)-10 e GRO- α , e CC chemochine come MCP-1 e RANTES [87-90].

MCP-1 e RANTES vengono prodotte, assieme a IL-8, anche dai mio fibroblasti periacinari, la forma attiva delle cellule stellate del pancreas[91].

L'mRNA di MCP-1 e di CINC (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant, l'analogo di GRO- α nel ratto) risulta incrementato già entro un'ora dall'induzione della pancreatite sperimentale nel ratto, mentre i loro livelli sierici aumentano a 6 ore di distanza, rientrando nella norma 24 ore dopo.

Il ruolo di tali chemochine nelle fasi iniziali del processo infiammatorio è pertanto rilevante; costituendo, infatti, un importante segnale proveniente dalle cellule acinari del pancreas e finalizzato ad attirare leucociti nell'organo danneggiato[88, 92].

Anatomia Patologica

Nella pancreatite acuta è presente una gamma estremamente ampia di reperti morfologici, dall'edema interstiziale nella forma lieve ad aree confluenti di necrosi e di emorragia nella forma severa[55]. Le alterazioni morfologiche di base sono:1) la lesione microvascolare, responsabile dell'edema;

- 2) la steatonecrosi, conseguenza della distruzione enzimatica degli adipociti: gli enzimi lipolitici, una volta attivati, dissolvono le membrane cellulari e idrolizzano i trigliceridi immagazzinati. Gli acidi grassi così liberati si combinano con il calcio a formare sali insolubili che precipitano in loco creando aree bianche come il gesso, apprezzabili all'esame macroscopico;3) una risposta infiammatoria acuta;
- 4) la digestione del parenchima pancreatico ad opera delle proetasi;
- 5) la distruzione dei vasi sanguigni e la conseguente emorragia interstiziale.

Nella forma lieve le alterazioni istologiche si limitano all'edema interstiziale e alla presenza di limitate aree di steatonecrosi a carico del pancreas e del tessuto peripancreatico. L'edema interstiziale si risolve spontaneamente in pochi giorni, e i piccoli focolai di necrosi guariscono completamente con minimi esiti fibrotici[93].

Nella pancreatite acuta severa la necrosi coinvolge il pancreas in modo massivo, estendendosi agli acini, ai dotti e alle isole del Langerhans. Il danno può interessare anche le strutture vascolari ed essere tanto severo da causare un'emorragia del parenchima pancreatico. Macroscopicamente la ghiandola presenta aree emorragiche rosso-nerastre frammiste a zone giallastre e calcifiche di steatonecrosi. Focolai di steatonecrosi possono comparire in tutti i depositi di tessuto adiposo, come l'omento, il mesentere ed anche il tessuto sottocutaneo[94].

Le aree di necrosi inferiori a 4-5 cm possono essere lentamente riassorbite, mentre quelle più estese si organizzano nell'arco di 4-6 settimane in cavità pseudocistiche[93].

Presentazione clinica

Il dolore addominale, localizzato in genere in epigastrio, è il sintomo principale della pancreatite acuta; la tipica irradiazione “a sbarra” ad entrambi gli ipocondri e posteriormente al dorso, è presente nel 40%-70% dei pazienti. Il dolore aumenta progressivamente di intensità raggiungendo il culmine 30-60 minuti dopo l'esordio e può persistere per ore o giorni[66]. Il perdurare della sintomatologia dolorosa oltre questo limite temporale è associato allo sviluppo di complicazioni locali quali raccolte fluide ad insorgenza acuta, pseudocisti ed aree di necrosi[55].

Nella pancreatite acuta biliare il dolore è tipicamente improvviso, ad insorgenza acuta, trafittivo e ben localizzato in regione epigastrica, mentre nelle pancreatiti ereditarie, ad eziologia metabolica o correlate all'abuso di alcol, l'esordio può essere più graduale e il dolore meno localizzato[95].

La pancreatite acuta non accompagnata a dolore addominale è un'entità clinica riconosciuta che può presentarsi in corso di shock di origine sconosciuta, durante il decorso post-operatorio, nei pazienti che sono stati sottoposti a trapianto di rene, nei pazienti in trattamento dialitico peritoneale, nella chetoacidosi diabetica[96].

Nausea e vomito frequentemente si associano al dolore.

L'obiettività addominale varia notevolmente da paziente a paziente; essa va da una modesta reazione di difesa, associata in genere a distensione e meteorismo dovuti all'ileo paralitico, ad una peritonite generalizzata, tipica delle forme più gravi.

Ecchimosi grigio-bluastrae sui fianchi (segno di Grey-Turner) e in regione periombelicale (segno di Cullen) vengono di solito riscontrate nella forma severa e sono dovute all'infiltrazione emorragica del sottocute.

La patologia può evolvere verso una flogosi generalizzata (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), responsabile di insufficienza respiratoria e scompenso cardiocircolatorio; l'ipotensione e l'ipossia che ne conseguono possono portare ad alterazione del sensorio ed insufficienza renale.

Sete, oliguria, tachicardia e tachipnea, associate ad agitazione psicomotoria ed a stato confusionale caratterizzano un decorso clinico severo e rendono necessario il ricovero del paziente in una unità di terapia intensiva[95].

L'insufficienza d'organo si verifica con una maggior frequenza nei pazienti affetti da pancreatite severa rispetto a quelli colpiti dalla forma lieve (circa un 50% dei pazienti a fronte di un 5%-10% rispettivamente) e, quando è presente, comporta un aumento della mortalità proporzionale al numero di organi coinvolti (10% nel caso di un solo organo interessato; 30%-50% nel caso di MOF, Multi Organ Failure)[43].

Il primo segno di MOF nei pazienti con pancreatite acuta consiste in una riduzione della funzione respiratoria sostenuta dalla sindrome da distress respiratorio dell'adulto (ARDS), seguita poi dal coinvolgimento dell'apparato cardiocircolatorio, del rene e del fegato[97].

La febbre, in genere presente, può essere espressione della flogosi sistemica mediata dalle citochine, oppure di una colangite in caso di ostruzione della via biliare. Un rialzo febbrile riconducibile a necrosi infetta non compare prima di due o tre settimane[55].

Diagnosi

Il riscontro clinico di sintomi come il dolore addominale, la nausea ed il vomito, ed il rilievo laboratoristico di elevati livelli sierici di enzimi pancreatici, rappresentano i cardini della diagnosi da pancreatite acuta[53, 61, 71].

Indagini bioumorali Il dosaggio dell'amilasi è quello più frequentemente eseguito, nonostante l'iperamilasemia non sia specifica della pancreatite acuta, ma venga riscontrata in un elevato numero di condizioni patologiche che tendono tutte a presentarsi con un quadro di addome acuto (la perforazione di un viscere, l'ischemia e l'ostruzione intestinale, la rottura di un aneurisma dell'aorta addominale o di una gravidanza ectopica, l'appendicite acuta), oltre all'insufficienza renale, alle malattie delle vie biliari

(colangite, colecistite e coledocolitiasi), alla parotite e ad altre malattie del pancreas diverse dalla pancreatite acuta quali la pancreatite cronica, il carcinoma e le pseudocisti.

Un livello di amilasi sieriche pari a tre volte il valore normale è accettato come accurato cut-off. Va ricordato, a tal proposito, come i riferimenti citati vanno comunque sempre interpretati alla luce della clinica, facendo particolare riferimento al momento di insorgenza della sintomatologia dolorosa[96].

L'iperamilasemia può mancare negli attacchi di lieve entità, negli episodi di acuzie in un paziente affetto da pancreatite cronica, soprattutto nelle forme alcol-correlate, e nei pazienti con ipertrigliceridemia. La specificità dell'amilasi è dell'88% circa, mentre la sensibilità è attorno al 72%.

Il dosaggio della lipasi possiede una maggior sensibilità e specificità rispetto a quello della amilasi (pari a 100% e 96% rispettivamente), e quindi un'accuratezza superiore.

La sensibilità più elevata della lipasi sembra derivare dalla sua maggiore emivita.

La lipasi rimane in circolo infatti per 8-14 giorni dopo un picco alla ventiquattresima ora, mentre le concentrazioni sieriche dell'amilasi decrescono già dopo 3-4 giorni[55].

Esistono comunque delle condizioni cliniche associate ad un aumento della lipasi sierica diverse dalla pancreatite acuta; tra queste ricordiamo sempre l'appendicite acuta, le malattie delle vie biliari, la pancreatite cronica, il carcinoma e le pseudocisti pancreatiche, l'insufficienza renale cronica.

Altri enzimi pancreatici quali l'isoamilasi, la fosfolipasi A₂ l'elastasi 1, il tripsinogeno cationico, ecc. possono essere misurati nel siero e nelle urine[98] e potrebbero diventare utili strumenti diagnostici, ma non rientrano, ad oggi, nella comune pratica clinica[66].

Parametri laboratoristici come l'iperbilirubinemia, suggeriscono un'eziologia biliare della malattia, spesso associata ad un incremento delle transaminasi.

I livelli di AST (Aspartato-Amino-Trasferasi) sono un parametro preso in considerazione da diversi sistemi prognostici, e risultano molto più elevati nella pancreatite severa rispetto alla lieve, essendo correlati ad una seria compromissione epatica.

La leucocitosi, infine, compare in corso di SIRS [99].

Diagnostica per immagini

La diagnosi di pancreatite acuta è supportata dalla radiologia. La diagnostica per immagini consente inoltre di individuare segni prognostici e complicazioni, ma solo in pochi casi permette di risalire alla causa della malattia. L'ecografia transaddominale difficilmente riesce a visualizzare il pancreas, soprattutto in caso di spiccato meteorismo, anche se, dal recente studio italiano di Uomo et Al. [46], la metodica si è dimostrata in grado di visualizzare edema ghiandolare, anomalie dell'ecostruttura e raccolte fluide peripancreatiche, proponendosi dunque in questo senso come alternativa alla Tomografia assiale Computerizzata (TC) con mezzo di contrasto (m.d.c.) nei pazienti con pancreatite acuta lieve.

L'utilità dell'ecografia transaddominale risiede principalmente nella semplicità della metodica, nella capacità di identificare la presenza di calcoli e fango biliare e di individuare una dilatazione del coledoco. In caso di referto negativo, il test più sensibile per diagnosticare la presenza di calcoli biliari potenzialmente misconosciuti durante il primo esame, è un'ulteriore ecografia transaddominale[100].

La sensibilità della metodica è infatti superiore a quella della risonanza magnetica nucleare (RMN), ma crolla quando si tratta di individuare calcoli nel coledoco distale[58, 101].

Superiore in questo senso si dimostra l'eco-endoscopia (EUS), utile anche ai fini di valutare la necessità di eseguire una ERCP (colangio-pancreatografia retrograda endoscopica)[102].

L'ERCP, effettuata in associazione o meno alla sfinterotomia endoscopica per estrarre il calcolo intrappolato nell'ampolla del Vater, ha dimostrato di poter ridurre del 73% l'incidenza di complicazioni nei pazienti con pancreatite biliare severa[103].

Il ruolo della TC nella pancreatite acuta è quello di confermare la diagnosi, escludere altre cause di dolore addominale, stabilire la severità della malattia (attraverso l'indice di severità TC) ed individuare le complicazioni[104].

I reperti TC vanno da un ingrandimento focale o diffuso del pancreas a stravasi e raccolte fluide perighiandolari, fino alla necrosi pancreatico, identificata dal mancato enhancement del tessuto dopo la somministrazione di m.d.c. endovenoso. La necrosi può non evidenziarsi completamente prima di 72 ore dall'insorgenza della malattia e l'esecuzione troppo precoce di una TC con m.d.c. può sottostimare la severità della pancreatite[55, 66].

Un'acquisizione recente riguarda il potenziale danneggiamento da parte del m.d.c. del microcircolo pancreatico. Esso sarebbe responsabile di un aggravamento dell'entità della necrosi dell'organo e quindi del peggioramento del decorso della pancreatite acuta[104]. Questo processo può essere dimostrato in alcuni modelli animali di pancreatite acuta, ma non in tutti.

L'unico studio randomizzato effettuato al riguardo escluderebbe questa eventualità[105].

E' raccomandato infine eseguire una TC in tutti i pazienti con insufficienza d'organo, dolore addominale persistente e segni di sepsi[56].

La RMN con gadolinio è accurata tanto quanto la TC nell'imaging del pancreas e nello stabilire il grado di severità della pancreatite acuta, inclusa la documentazione del grado di necrosi ghiandolare. E' difficile tuttavia sottoporre un paziente critico a questo tipo di esame strumentale, perciò la TC è da preferirsi[106].

Definizione della severità

Stabilire precocemente la severità della pancreatite acuta è fondamentale per una corretta gestione del paziente attraverso un trattamento tempestivo ed adeguato. Un'ampia gamma di sistemi prognostici sono stati delineati ai fini di identificare i pazienti affetti da pancreatite acuta a rischio di sviluppare complicazioni e di andare incontro a morte[107]. I criteri di Ranson prendono in

considerazione undici parametri (l'età, la conta leucocitaria, la glicemia, i livelli sierici dell'aspartato-amino transferasi e della lattato deidrogenasi, l'ematocrito, il sequestro di fluidi, la calcemia, la PaO₂, l'azotemia ed il deficit di basi), di cui i primi cinque valutati all'ingresso e gli altri sei nelle 48 ore successive: esiste una relazione lineare tra mortalità e numero di alterazioni riscontrate in tali parametri: il rilievo di tre o più alterazioni tra quelle elencate è indice di un attacco severo di pancreatite[52].

Sono state successivamente introdotte delle modifiche a tali criteri per la pancreatite acuta ad eziologia biliare, riducendo il numero dei fattori prognostici a dieci (vedi tabella 2).

Nonostante specificità e valore predittivo positivo siano piuttosto bassi (77% e 49%), i criteri di Ranson sono tuttora ampiamente applicati anche nei trials clinici, e sono utili in quanto focalizzano l'attenzione del medico sull'organo che più probabilmente andrà incontro a deficit di funzione[97].

Un sistema prognostico sviluppato in seguito è quello di Glasgow (o di Imrie, dal nome dell'autore), che riduce il numero di fattori da undici a otto (vedi tabella 3).

Anche in questo caso, il rilievo di tre o più alterazioni tra quelle indicate è espressione di severità della malattia[108].

L'accuratezza complessiva è simile ai più laboriosi criteri di Ranson.

Un limite di entrambi i sistemi prognostici, tuttavia, è che la raccolta dei dati viene completata 48 ore dopo l'ingresso del paziente.

Lo score APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation-II) fornisce informazioni prognostiche paragonabili a quelle dei criteri di Ranson e di Glasgow, avendo però il vantaggio di poter essere calcolato in un qualsiasi momento del ricovero del paziente, ed aggiornato al modificarsi delle sue condizioni cliniche, consentendo così il monitoraggio dell'andamento della malattia e della risposta alla terapia[66].

L'APACHE-II prevede la valutazione di parametri come la temperatura corporea, la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, il pH arterioso, la concentrazione sierica di Na⁺, K⁺ e creatinina,

l'ematocrito, la conta leucocitaria, l'età, il punteggio ottenuto nella scala del coma di Glasgow, la PaO₂.

Un punteggio ≥ 8 è indice di una pancreatite acuta severa[53].

Sono state sviluppate due varianti semplificate dell'APACHE-II (Simplified Acute Physiology Score-SAPS e SAPS II), validate per predire la severità della pancreatite nei pazienti ricoverati in terapia intensiva[109], così come è stata elaborata una forma di APACHE ancora più complessa, l'APACHE-III, la quale però non è stata completamente validata[110].

Sulla base dell'osservazione che l'obesità è un fattore di rischio per la pancreatite acuta severa[111-112], è stata proposta una variante dell'APACHE-II comprendente tra i parametri valutati l'indice di massa corporea (BMI, Body Mass Index). La nuova scala "APACHE-0" prevede l'aggiunta di un punto per un BMI tra 25 e 30 Kg/m² (sovrappeso) e due punti per un BMI ≥ 30 (obesità), aumentando così l'accuratezza dello score prognostico[113].

Uno studio successivo però non conferma tale dato[112].

I sistemi prognostici citati si caratterizzano tutti per un alto numero di falsi positivi e per un basso valore predittivo positivo: molti pazienti con uno score di APACHE II ≥ 8 (o di Ranson ≥ 3) non sviluppano complicazioni e non muoiono; questo perchè la forma severa di malattia non ha una prevalenza elevata (circa il 15% di tutti i casi di pancreatite)[66].

La necrosi pancreatica rientra nei criteri di Atlanta per la definizione di severità della pancreatite acuta. Balthazar et Al. svilupparono un sistema di punteggio, l'indice di severità TC, basato sui reperti delle scansioni TC eseguite con m.d.c., quali l'estensione dell'edema pancreatico, la presenza di raccolte fluide peripancreatiche e di necrosi. Pazienti con un indice di 0 o 1 hanno morbilità e mortalità nulle; un punteggio pari a 2 corrisponde ad un tasso di morbilità del 4% ed ad una mortalità nulla, mentre un punteggio da 7 a 10 indica una morbilità del 92% ed una mortalità del 17%. Ciò suggerisce come una necrosi estesa sia associata con maggior probabilità di una insufficienza d'organo e ad una prognosi sfavorevole[104].

Numerosi parametri laboratoristici sierici ed urinari sono stati identificati e studiati ai fini di un loro potenziale utilizzo come markers prognostici; tra questi IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, la Proteina C Reattiva, TNF ed il suo recettore solubile, PAF, il peptide di attivazione del tripinogeno, l'elastasi leucocitaria, la procalcitonina, ecc, ma i dati che a disposizione sono limitati[66].

La Proteina C Reattiva (PCR) è una proteina di fase acuta che viene sintetizzata dagli epatociti su stimolo della IL-1 e della IL-6, raggiungendo il picco sierico 72 ore dopo l'insorgenza del dolore.

Ad oggi, la PCR è il miglior marker biochimico che da solo è in grado di predire la severità della pancreatite acuta, con una accuratezza che è massima a 48 ore dall'insorgenza dei sintomi[97] e che è paragonabile a quella dei criteri di Ranson, di Glasgow e all'APACHE II score[66].

Una concentrazione sierica di 150 mg/dl viene considerata il valore soglia per discriminare tra le forme lievi e severe di pancreatite[36].

Dal momento che i livelli di MCP-1 risultano drammaticamente aumentati nei pazienti affetti da pancreatite acuta che sviluppano complicanze locali e sistemiche[92], tale chemochina è stata proposta come marker della risposta infiammatoria in grado di predire la severità della patologia[97].

In conclusione, gli elementi che abbiamo a disposizione per predire la severità di un attacco di pancreatite sono quelli elencati nella tabella 4. Il successivo monitoraggio dell'andamento malattia richiede ripetute valutazioni cliniche, dosaggi regolari della PCR sierica (due volte alla settimana), ed esecuzione di una TC quando necessario[56].

Complicazioni

Le complicazioni della pancreatite acuta possono essere locali o sistemiche. Le complicazioni locali includono la necrosi pancreatica (sterile o infetta), le raccolte fluide, le pseudocisti e l'ascesso; le complicazioni sistemiche comprendono lo sviluppo di insufficienza d'organo (in particolare di insufficienza respiratoria associata ad ARDS ed insufficienza renale), la comparsa di instabilità circolatoria fino allo shock e le emorragie gastrointestinali[51]. Una ridotta tolleranza al glucosio è

stata riscontrata nel 25%-35% dei pazienti con pancreatite acuta severa[114], mentre l'ipocalcemia è relativamente comune ed è per lo più attribuibile all'ipoalbuminemia[66].

Si definisce necrosi pancreatica la presenza di zone focali o diffuse del parenchima pancreatico che non vanno incontro ad enhancement durante l'esecuzione di una TC con mezzo di contrasto., e che risultano superiori rispettivamente a 3 cm e al 30% di tutto il pancreas[51].

Nell'arco di alcune settimane o mesi il materiale necrotico tende ad andare incontro ad un processo di colliquazione, circondandosi di una parete di tessuto granulomatoso simile a quella delle pseudocisti (necrosi pancreatica organizzata).

La presenza di necrosi pancreatica, sia essa organizzata o no, non pone indicazione ad alcun tipo di intervento specifico; la diagnosi viene posta tramite la TC con mdc.

Ai fini della determinazione della percentuale di componente solida e liquida dell'area necrotica, risultano superiori alla TC la RMN e l'eco-endoscopia.

La presenza di batteri e/o miceti nel tessuto necrotico caratterizza il quadro dellanecrosi infetta[43].

Il sospetto clinico nasce dall'aggravamento del dolore addominale, dalla comparsa di febbre e di leucocitosi, tipicamente 1-2 settimane dall'insorgenza della malattia.

La diagnosi viene posta tramite il riscontro alle scansioni TC di gas all'interno della raccolta e attraverso l'esame colturale eseguito su un campione di materiale prelevato tramite aspirato con ago sottile (FNA).

Tutti i pazienti in cui sia stata diagnosticata una necrosi infetta devono essere sottoposti al drenaggio della raccolta, che può essere radio-guidato, endoscopico o chirurgico (necrosectomia)[36]. Un approccio meno invasivo come quello radiologico, endoscopico o laparoscopico è tanto più efficace quanto maggiore è la percentuale di tessuto colliquato[66]. Il gold-standard rimane comunque, ad oggi, la necrosectomia[56].

Le raccolte fluide intra e peripancreatiche sono frequenti nei pazienti con pancreatite moderata e severa, e raramente richiedono un trattamento specifico. Circa la metà delle raccolte fluide si risolve spontaneamente nell'arco di sei settimane, mentre il 15% si trasforma in una pseudocisti.

La pseudocisti è definita come una raccolta di succo pancreatico delimitata da una parete di tessuto fibroso e granulomatoso non rivestita internamente da epitelio, che si può formare a seguito di una pancreatite acuta, di una pancreatite cronica o di un trauma pancreatico. Essa può essere del tutto asintomatica, così come causare dolore addominale ed ostruzione del duodeno, dello stomaco o del coledoco; può andare incontro a sua volta a complicazioni quali l'infezione, la rottura, il sanguinamento[115-116].

L'infezione di una pseudocisti comporta l'accentuazione del dolore addominale, la comparsa di febbre e di leucocitosi.

Il drenaggio di una pseudocisti infetta è in genere agevole dato il suo contenuto liquido.

La rottura di una pseudocisti in cavità peritoneale è responsabile della comparsa di peritonite ed ascite. L'esecuzione di una paracentesi ed il successivo riscontro di una elevata concentrazione di amilasi (> 20.000 UI/l) consentono di porre diagnosi.

La maggior parte dei pazienti viene trattata in modo conservativo tramite il posizionamento di drenaggi, la nutrizione parenterale, la somministrazione di diuretici ed octreotide. Alternative terapeutiche sono la pancreatectomia distale per le lesioni della coda e la pancreaticodigiunostomia per quelle della testa.

La pseudocisti può rompersi anche nel cavo pleurico, generando una fistola pleuropancreatica e la formazione di un versamento toracico, per la cui diagnosi è necessaria una toracentesi[117].

Il sanguinamento può rimanere confinato all'interno della lesione o presentarsi sotto forma di un'emorragia digestiva qualora la pseudocisti comunichi con il tratto gastrointestinale o con il dotto pancreatico; la terapia consiste nell'embolizzazione del vaso sanguinante identificato all'arteriografia[66].

Le pseudocisti di piccole dimensioni e asintomatiche non richiedono alcun trattamento; mentre è indicata la terapia per quelle che persistono per più di sei settimane, che aumentano continuamente di dimensioni e che sono sintomatiche[118].

Il trattamento consiste nella resezione, nel drenaggio esterno o in quello interno. La resezione è indicata quando non implica una perdita importante di parenchima pancreatico, come per le piccole pseudocisti della coda del pancreas.

Il drenaggio esterno può essere posizionato chirurgicamente o per via percutanea, mentre il drenaggio interno può essere ottenuto sia attraverso una cistogastrostomia, una cistoduodenostomia od una cistodigiunostomia sia, in modo meno invasivo, tramite il confezionamento per via endoscopica di una fistola cisto-enterica o, se la pseudo cisti comunica col dotto di Wirsung, attraverso il posizionamento di uno stent trans papillare[119].

L'ascesso, infine, è la conseguenza dell'infezione di una pseudocisti o di una piccola area necrotica colliquata[66].

Terapia

Terapia di supporto

La terapia di supporto prevede la somministrazione di fluidi, la prevenzione dell'ipossiemia, l'analgesia e la correzione degli squilibri elettrolitici e metabolici. L'ipovolemia è la conseguenza del vomito, della sudorazione profusa e del sequestro di fluidi nel "terzo spazio" a seguito della flogosi generalizzata, ed è segnalata dalla comparsa di emoconcentrazione, tachicardia, oliguria, iperazotemia ed ipotensione. Una fluidoterapia aggressiva è in grado di prevenire, o quanto meno di minimizzare, la compromissione della microcircolazione pancreatico e quindi di ridurre l'incidenza della necrosi pancreatico. Il monitoraggio della efficacia della fluidoterapia è costituito dalla valutazione dei segni vitali, della quantità delle urine emesse e dall'ematocrito. E' necessario prevenire l'ipossiemia attraverso la somministrazione di ossigeno nelle prime 24-48 ore, accompagnata da uno stretto monitoraggio della SaO₂ tramite il pulsossimetro[43]. L'ipocalcemia solitamente non richiede alcun trattamento sino a quando non compaiono segni di ipereccitabilità neuromuscolare come il segno di Chovsteck e di Trousseau, mentre per il trattamento

dell'iperglicemia è necessaria la somministrazione di insulina nella maggior parte dei pazienti con pancreatite severa e in molti con pancreatite moderata.

L'ipertrigliceridemia, oltre ad essere, quando particolarmente severa, una causa di pancreatite acuta, ne è anche una conseguenza; in genere non richiede alcuna terapia, ma una piccola percentuale di pazienti deve essere sottoposta a plasmferesi. Per il controllo della sintomatologia dolorosa si somministrano in genere analgesici quali morfina o meperidina per via parenterale.

Nonostante riserve siano state avanzate sull'uso della morfina per la possibilità che essa causi spasmo dello sfintere di Oddi, non c'è nessuna evidenza che ciò accada nell'uomo[66].

Supporto nutrizionale

Nella pancreatite acuta lieve il supporto nutrizionale non è necessario dal momento che il paziente riprende ad alimentarsi spontaneamente nei primi giorni del ricovero in ospedale; nella pancreatite acuta severa è invece raccomandata una nutrizione enterale o parenterale totale. Un recente studio ha dimostrato come la nutrizione enterale sia superiore a quella parenterale totale, riducendo il numero di complicazioni sia locali che sistemiche e la mortalità dei pazienti[120].

Uso degli antibioticiSe esiste un generale accordo in merito al fatto che la somministrazione di antibiotici a scopo profilattico non sia giustificata nei pazienti con pancreatite acuta lieve[121], il ruolo della terapia antibiotica nei pazienti con pancreatite acuta severa nel prevenire lo sviluppo di una necrosi infetta è tuttora molto controverso. L'efficacia profilattica degli antibiotici è stata inizialmente dimostrata nello studio randomizzato di Pederzoli et Al. [122] e successivamente confermata da Bassi e colleghi[123]. Nessun accordo in merito è stato raggiunto dalla UK Working Party[56], mentre un recente studio randomizzato controllato in doppio cieco ha invece concluso come non esista alcuna differenza statisticamente significativa nella prevalenza di necrosi infette e nella mortalità tra i pazienti trattati con meropenem e quelli che hanno ricevuto il placebo[124].

Nel caso di una necrosi infetta confermata da FNA, va instaurata una terapia antibiotica mirata in base all'antibiogramma[43].

Terapia per ridurre la frequenza e la severità delle complicazioni

Il presupposto che una riduzione della secrezione pancreatica (ottenuta con il posizionamento del sondino naso-gastrico e la somministrazione di H2-antagonisti, inibitori di pompa protonica, atropina, 5-fluoro-uracile, somatostatina ed octreotide) abbia ripercussioni positive sull'outcome del paziente è stato per anni un elemento fondante della terapia dei pazienti con pancreatite acuta. Una meta-analisi sull'efficacia della somatostatina e dell'octreotide ha dimostrato che sia la somatostatina che l'octreotide non garantiscono nessun beneficio ai pazienti con pancreatite acuta lieve, mentre solo la somatostatina (ma non l'octreotide) è in grado di determinare una riduzione della mortalità globale nei pazienti affetti da pancreatite acuta severa[108].

Il ruolo delle proteasi nella risposta flogistica sistemica è incerto, oggi si tende ad attribuire maggior importanza alla cascata infiammatoria delle citochine[66]. L'inibitore delle proteasi gabesato mesilato si è dimostrato in grado di ridurre l'incidenza delle complicazioni, ma non la mortalità complessiva dei pazienti[125].

L'ERCP, come suddetto, associata o meno a sfinterotomia endoscopica, è infine capace di ridurre del 73% l'incidenza di complicazioni nei pazienti con un calcolo intrappolato nell'ampolla del Vater[103].

1.2b - PANCREATITE ACUTA RICORRENTE

Definizione

La pancreatite acuta ricorrente è una malattia infiammatoria che colpisce le cellule acinari del pancreas, responsabile dell'alterazione della struttura dell'organo e del suo deterioramento funzionale[55, 126]. Episodi ricorrenti di pancreatite acuta possono infatti portare ad una perdita progressiva della funzione secretoria esocrina ed endocrina del pancreas, configurando un quadro di pancreatite cronica[28].E' stato altresì notato come pazienti che manifestano clinicamente ripetuti attacchi di pancreatite acuta, possono già presentare, a livello pancreatico, alterazioni tipiche della pancreatite cronica evidenziate dall'ERCP, dall'EUS e dai test di funzionalità pancreatica[119].

Epidemiologia

Poco più di un quarto (27%) dei pazienti che hanno subito un attacco di pancreatite acuta tende ad sviluppare un quadro di pancreatite acuta ricorrente costellato da ripetuti episodi di malattia[127]. Una percentuale leggermente superiore, 31%, viene riportata da Zhang e colleghi (128). Nell'esperienza di Gullo et Al. [127] i pazienti colpiti sono soprattutto maschi (73,3%), con un'età media di 43 anni (range: 16-95 anni).

La mortalità complessiva è del 5,9% e quasi tutti i decessi si verificano al secondo attacco di pancreatite. Non esisterebbe una differenza statisticamente significativa tra la mortalità dei pazienti colpiti da pancreatite acuta e quelli che sviluppano la forma ricorrente della malattia.

Eziologia

Le cause di pancreatite acuta ricorrente sono elencate nella tabella 5. Somogyi e colleghi[129] suggeriscono la classificazione delle cause di pancreatite acuta ricorrente in tre categorie: -Tossiche-metaboliche, come l'alcol, l'ipercalcemia, l'ipertrigliceridemia, e i farmaci. -Meccaniche-ostruttive, quali la coledocolitiasi (microlitiasi), ostruzioni ampollari e periampollari (diverticoli, cisti, tumori, stenosi ed infezioni), ostruzioni del dotto pancreatico (tumori, stenosi benigne), malformazioni congenite (pancreas divisum ed anulare). -Miscellanea, comprendente cause vascolari (ipotensione, vasculiti, embolia, stati di ipercoagulabilità), genetiche (pancreatite ereditaria), infettive, autoimmuni. La più frequente causa non solo di pancreatite acuta, ma anche di pancreatite acuta ricorrente è ritenuta la litiasi biliare[128-129]. Per quanto riguarda la microlitiasi, essa sembra essere responsabile di circa due terzi dei casi di pancreatite acuta ricorrente inizialmente etichettati come idiomatici[130]. In quei pazienti in cui è stata posta diagnosi di pancreatite acuta ricorrente idiopatica (10%-30% dei casi), una valutazione più approfondita può portare all'identificazione di cause ben definite quali microlitiasi, pancreas divisum od anulare, disfunzione dello sfintere di Oddi, pancreatite ereditaria, fibrosi cistica, coledococoele, tumori biliopancreatici, una giunzione biliopancreatica anomala[131].

Pancreas divisum

Il pancreas divisum è la più comune malformazione congenita del pancreas, la cui prevalenza nei reperti autoptici va dal 4,4% al 12%. Esso origina dalla fusione incompleta dell'abbozzo pancreatico dorsale con quello ventrale, evento che si verifica nel corso della sesta settimana di gestazione. La conseguenza è che il dotto ventrale (di Wirsung) continua a drenare esclusivamente il pancreas ventrale, mentre la maggior parte della ghiandola, l'abbozzo dorsale, fa capo, tramite il dotto dorsale (di Santorini), alla papilla minore, spesso stenotica in questi pazienti. La sproporzione tra le piccole dimensioni del sistema duttale e la grande quantità di succo pancreatico che deve essere

drenato attraverso di esso, crea le condizioni per lo sviluppo di ipertensione duttale, che predispone a sua volta alla pancreatite[132].

A volte il dotto pancreatico dorsale e ventrale possono comunicare attraverso esili e sottili canali, configurando il quadro di pancreas divisum incompleto, che in termini di presentazione clinica e di risposta al trattamento non differisce dal pancreas divisum[133].

Il ruolo del pancreas divisum nell'eziologia della pancreatite ricorrente è piuttosto controverso, dal momento che solo una piccola percentuale di pazienti con questa variante anatomica sviluppa episodi ricorrenti di pancreatite[134-135]; tuttavia il 25% dei pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente definita inizialmente come idiopatica ha il pancreas divisum. Per questo motivo la valutazione di un paziente con pancreatite acuta ricorrente dovrebbe includere ERCP e colangiopancreato-risonanza magnetica (CPRM) per indagare la presenza di tale malformazione[129].

Pancreas anulare

Il pancreas anulare è una malformazione congenita in cui un lembo nastriforme di tessuto pancreatico circonda più o meno completamente il duodeno, in genere all'altezza della papilla maggiore. Il difetto si verifica in utero quando l'abbozzo pancreatico ventrale aderisce alla parete duodenale, fissandosi ad essa.

La prevalenza è di 1/7000-1/20.000 reperti autoptici, e spesso è riscontrabile una comorbidità con la sindrome di Down, malformazioni cardiache, fistola tracheoesofagea, diverticolo di Meckel ed ano imperforato. I sintomi possono comparire durante l'infanzia, e sono in genere riconducibili all'ostruzione duodenale, o in età adulta, e sono in questo caso rappresentati da dolore addominale, pancreatite acuta ricorrente, pancreatite cronica, sintomi da ostruzione della via biliare principale[136]. La diagnosi è posta tramite ERCP [114]).

Coledococoele

Il coledococoele è una malformazione cistica della via biliare, congenita od acquisita, nella quale il segmento distale (intramurale) del coledoco è dilatato e protrude all'interno del lume duodenale. Varia da alcuni millimetri a diversi centimetri di dimensione ed è associato a coliche biliari, ittero ostruttivo e a pancreatite acuta ricorrente; la flogosi pancreatica si sviluppa quando la dilatazione cistica con il suo contenuto (fango biliare o calcoli) ostacola il drenaggio del succo pancreatico nel duodeno.

Di tutte le malformazioni cistiche delle vie biliari, solo il coledococoele è stato associato a pancreatite acuta ricorrente[137].

La diagnosi viene posta tramite ERCP, durante la quale la papilla duodenale maggiore appare rigonfia e soffice ("pillow sign")[131].

Giunzione bilio-pancreatica anomala

La giunzione bilio-pancreatica viene definita anomala quando il canale comune è troppo lungo (>15 mm). Essa si associa a colangiocarcinoma, adenocarcinoma della colecisti, cisti del coledoco e pancreatite acuta ricorrente, dal momento che lo sfintere non separa completamente la via biliare dal Wirsung e la bile è libera di refluire nei dotti pancreatici[138]. Gli esami strumentali in grado di evidenziare tale anomalia sono ERCP, colangio-pancreatoRM ed EUS[131].

Disfunzione dello sfintere di Oddi Lo sfintere di Oddi è una struttura fibromuscolare lunga 5-15 mm che avvolge il tratto distale del coledoco, del Wirsung ed il canale comune. Esso regola il flusso di bile e di succo pancreatico nel duodeno, inibisce il reflusso del contenuto duodenale nel coledoco e nel Wirsung, e promuove il riempimento della colecisti da parte della bile. La disfunzione dello sfintere di Oddi può avere un base organica (stenosi) o funzionale (spasmo) e può essere causa di una sintomatologia prevalentemente biliare o pancreatica.

Sia la forma biliare che quella pancreatica di malattia vengono classificate secondo Geenen e Hogan in tre varianti (tipo I, II e III).

Nel caso della forma pancreatica, la variante di tipo I, in genere riconducibile a stenosi, è caratterizzata da episodi ricorrenti di pancreatite, accompagnati da innalzamento sierico degli enzimi pancreatici, ridotto drenaggio del succo pancreatico in duodeno e dilatazione del Wirsung.

Il tipo II è una variante intermedia tra il tipo I e III.

La variante di tipo III si contraddistingue per dolore addominale isolato.

La manometria dello sfintere di Oddi (SOM) è il gold standard per la diagnosi di disfunzione dell'Oddi, che viene stabilita in caso di valori pressori superiori a 40 mmHg [139].

Si stima che la disfunzione dello sfintere di Oddi sia alla base di un terzo delle forme di pancreatite acuta ricorrente inizialmente definite come idiopatiche[131].

Tumori biliopancreatici

I tumori biliopancreatici, in particolare adenomi ed adenocarcinomi ampollari, l'adenocarcinoma del pancreas ed i tumori neuroendocrini possono essere causa di episodi ricorrenti di pancreatite e devono essere sempre sospettati nel paziente di mezza età od anziano[56].TC, RM, eco-endoscopia (EUS) ed ERCP consentono di identificare la lesione, ma la conferma diagnostica è solo istologica e viene data dall'esecuzione di una biopsia TC-guidata, di un brushing durante ERCP, o di un ago-aspirato EUS-guidato[131]

Ruolo della genetica

La pancreatite ereditaria è una malattia autosomica dominante con una penetranza dell'80%, la quale si presenta clinicamente con ripetuti attacchi di pancreatite acuta che compaiono tipicamente prima dei dieci anni di età.Molti pazienti tendono a sviluppare, nel tempo, pancreatite cronica

associata a calcificazioni, pseudocisti, dolore addominale cronico, insufficienza esocrina e diabete mellito; alcuni cancro pancreatico[140].

Nel 1996 Whitcomb e colleghi identificarono il gene principalmente coinvolto in tale patologia: esso codifica per il tripsinogeno cationico (o serin-proteasi 1, PRSS1) ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q35).

Tre differenti tripsinogeni sono stati descritti nel succo pancreatico dell'uomo, definiti, sulla base della loro mobilità elettroforetica, come tripsinogeno cationico (PRSS1), tripsinogeno anionico (PRSS2) e mesotripsinogeno (PRSS3).

PRSS1 è quello sintetizzato in quantità maggiore, che va incontro molto più facilmente ad autoattivazione e che è più resistente all'autolisi[34].

La mutazione puntiforme G/A dell'esone 3 del gene di PRSS1 comporta la sostituzione di una arginina con una istidina nella molecola dell'enzima (R122H); tale mutazione lo rende resistente, una volta attivato a tripsina, all'idrolisi da parte dell'enzima Y e della mesotripsina.

Tali proteasi sono responsabili, assieme all'inibitore pancreatico della tripsina (PSTI, noto anche come inibitore delle serin-proteasi Kazal tipo 1 o SPINK1), della degradazione della tripsina e contrastano quindi la cascata di attivazione intrapancreatica degli enzimi.

Nei pazienti con pancreatite ereditaria, venendo dunque a mancare uno dei due meccanismi di protezione descritti, non appena l'entità del fenomeno di attivazione del tripsinogeno supera la capacità inibitoria del PSTI, si verifica un episodio di pancreatite[28].

La mutazione R122H è la più frequente nella popolazione mondiale; assieme a questa, altre mutazioni sono state descritte, quali N29I, A16V, N29T, K23R, D22G, R122C, E79K [55].

In particolare, N29I, localizzata sull'esone 2, promuove, come R122H, l'autoattivazione del tripsinogeno[141], mentre E79K e A16V favoriscono l'attivazione del tripsinogeno tramite rispettivamente la transattivazione di PRSS2 e dell'enzima chimotripsina C [142-143].

Recentemente è stata riportata anche l'associazione tra pancreatite ereditaria e la ripetizione di un segmento genico di 60kb contenente i geni di PRSS1 e di PRSS2 [144].

D22G e K23R sono infine mutazioni che facilitano anch'esse l'attivazione del tripsinogeno a tripsina, ma sono veramente rare e hanno una penetranza molto bassa[145].

Il CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) è un canale del cloro attivato dal cAMP (adenosina monofosfato ciclico) localizzato sulla membrana apicale dell'epitelio duttale delle ghiandole sudoripare e salivari, del pancreas, del fegato, dell'apparato genito-urinario, delle vie aeree, dell'intestino e della colecisti. Nel pancreas il CFTR regola la secrezione di acqua e bicarbonato, alcalinizzando e fluidificando il succo pancreatico. La fibrosi cistica è una malattia genetica, trasmessa come tratto autosomico recessivo, causata da più di 1300 mutazioni del gene del CFTR (la più frequente è la $\Delta F508$), responsabili di una riduzione o dell'eliminazione dell'attività di questo canale, e quindi della comparsa di secrezioni dense e viscosi.

Tali mutazioni vengono raggruppate in cinque classi: le prime tre sono responsabili della soppressione o di una marcata riduzione (<1%) della funzione del CFTR (mutazioni "severe"); la IV e la V classe comportano invece una perdita parziale dell'attività del canale, compresa tra l'1% ed il 10% (mutazioni "lievi")[146].

I sintomi clinici sono strettamente correlati alla funzione residua del CFTR: se essa è inferiore all'1% di quella normale, la malattia si manifesta nella sua forma più severa, coinvolgendo vari organi ed apparati, in particolare quello respiratorio, mentre un deficit di funzione compreso tra l'1% ed il 10% è responsabile di varianti mono o paucisintomatiche della patologia[147].

Per quanto riguarda il pancreas, la fibrosi cistica è la più comune malattia genetica che interferisce con la sua funzione esocrina[148]; i pazienti affetti dalle tipiche manifestazioni cliniche della fibrosi cistica e quindi da insufficienza pancreatica tendono ad avere due (una per allele) mutazioni severe del gene del CFTR (omozigosi), mentre quei pazienti (10%-15% dei casi) che si presentano clinicamente con ricorrenti episodi di pancreatite tendono a possedere una sola mutazione lieve

(eterozigosi)[149], oppure una mutazione lieve ed una severa, o ancora due mutazioni lievi diverse, una per ciascun allele (doppia eterozigosi)[150, 151].

Sono individui, questi ultimi, in cui l'attività esocrina del pancreas è sostanzialmente conservata e che quindi non manifestano i sintomi dell'insufficienza pancreatica; essi presentano inoltre una forma clinica molto attenuata di fibrosi cistica, non accompagnata dai classici sintomi respiratori e localizzata, in genere, ad un unico apparato (ad esempio quello riproduttivo)[150], e questo perché il loro genotipo causa una perdita solo parziale dell'attività del CFTR.

Nella patogenesi della pancreatite è implicata l'alterata composizione del succo pancreatico, particolarmente concentrato, viscido e povero di acqua, in grado di causare la precipitazione di materiale proteico ("plugs"), con conseguente ostruzione del sistema duttale[152].

Una singola mutazione lieve o la doppia eterozigosi per due diverse mutazioni lievi o per una mutazione lieve ed una severa aumenterebbe dunque il rischio di pancreatite. Tuttavia, non è ancora stato chiarito se la presenza di tali mutazioni è di per sé sufficiente a causare l'insorgenza della pancreatite o è soltanto una condizione predisponente su cui poi agiscono altri meccanismi patogenetici come la microlitiasi o la disfunzione dello sfintere di Oddi, presenti rispettivamente, secondo Frulloni et Al., nel 75% e nel 50% dei pazienti con pancreatite ricorrente e nel 60% e 100% dei pazienti con pancreatite cronica[152].

Recentemente è stato inoltre osservato come un'alterata funzione del CFTR possa agire sinergicamente ad altre condizioni predisponenti quali il pancreas divisum o ad altri fattori anche ambientali, nello sviluppo della pancreatite acuta ricorrente[134-135].

Anche mutazioni del gene di SPINK1, l'inibitore pancreatico della tripsina, sono state descritte in associazione non solo alla pancreatite cronica (vedi capitolo successivo), ma anche alla pancreatite acuta ricorrente, più spesso come mutazioni eterozigoti associate a mutazioni, sempre eterozigoti, del gene del CFTR (transeterozigosi); la co-esistenza di mutazioni a carico di SPINK1 aumenterebbe dunque il rischio di pancreatite[126, 151].

Approccio al paziente affetto da pancreatite acuta ricorrente

L'approccio al paziente affetto da pancreatite acuta ricorrente proposto dal *Pancreatic Disease Center*, dell'Università di Cincinnati, modificato dal *Midwest Multicenter Pancreatic Study Group*, è il seguente:1. Escludere la pancreatite cronica e i tumori biliopancreatici.

2. Eseguire l'ERCP (è da segnalare che le seguenti indicazioni sono state definite in America ove la colangio-pancreato-RMN con o senza secretina non è molto diffusa a causa dei costi. In Europa è indicata prima la RMN, non invasiva e priva di possibili complicazioni).Questo esame consentirebbe infatti di individuare anomalie congenite come il pancreas divisum od anulare, evidenziare stenosi del dotto di Wirsung, coledocolitiasi e microlitiasi e stenosi ampollari; di fronte ad un colangiopancreatogramma negativo ed evidenza di coledocolitiasi o stenosi ampollari, viene proposta l'esecuzione di una sfinterotomia associata o meno a colecistectomia.
3. Se la pancreatite ricorre nuovamente, si consiglia di eseguire, per arrivare alla diagnosi, la manometria dello sfintere di Oddi, i test genetici, la determinazione dei potenziali nasali, i test di funzionalità pancreatica, i markers della pancreatite autoimmune.4. Se i risultati degli esami indicati sono negativi, la pancreatite acuta ricorrente viene classificata come idiomatica[129].

1.2c - PANCREATITE CRONICA

Definizione

La pancreatite cronica è una patologia infiammatoria cronica del pancreas caratterizzata da un danno progressivo e irreversibile che coinvolge la ghiandola nella sua interezza, associato clinicamente a dolore, spesso invalidante. La perdita continua di parenchima pancreatico esita eventualmente in un'insufficienza sia esocrina che endocrina che si manifesta con maldigestione e diabete mellito[29, 152].

La fibrosi, l'atrofia delle cellule acinari e delle insule e l'infiltrato infiammatorio di tipo cronico sono le alterazioni istologiche che stravolgono la normale architettura pancreatica e che definiscono la cronicità del processo patologico[33 119]. Altre caratteristiche istologiche sono specifiche e distintive di alcune forme di pancreatite cronica, come l'infiltrato prevalentemente linfocitario della pancreatite autoimmune, piuttosto che le numerose calcificazioni parenchimali della pancreatite tropicale[29]. In realtà va sottolineato che né la definizione nosografica né la classificazione della malattia hanno ad oggi ottenuto un consenso unanime da parte dei pancreatologi: questo è attualmente uno dei problemi più dibattuti e più aperti riguardanti la pancreatite cronica[153].

Epidemiologia

Definire la reale incidenza e prevalenza della pancreatite cronica non è semplice. Tale difficoltà è dovuta da una parte all'esistenza di casi di pancreatite cronica del tutto silenti dal punto di vista clinico, e dall'altra all'incapacità di diagnosticare la malattia specie nelle fasi iniziali. Quest'ultimo aspetto è confermato se si considera che l'incidenza della pancreatite cronica sembra essere in continuo aumento negli ultimi anni: in un'eccellente review del 1995 [119] è riportata una

prevalenza oscillante tra lo 0,04% e il 5%; oggi si ritiene che l'incidenza oscilli tra il 3,5 e il 10 su 100.000 all'anno[29] e che la prevalenza sia del 13% [33]. Quasi certamente questo apparente aumento dell'incidenza della malattia è ascrivibile al miglioramento delle indagini diagnostiche, soprattutto alla diffusione delle tecniche di imaging[152].

In generale l'età media di insorgenza della pancreatite cronica è riportata attorno alla quarta decade di vita; il rapporto M: F di circa 3:1.

Sebbene il principale fattore associato alla pancreatite cronica nei paesi occidentali sia ancora l'abuso alcolico, ad oggi sono state descritte molte forme di pancreatite cronica diverse per eziologia, patogenesi, caratteristiche cliniche e storia naturale. Anche per questo è molto complesso riuscire ad ottenere stime precise della prevalenza della malattia. Oltre all'alcol sono considerati fattori di rischio per la pancreatite cronica il fumo, l'iperlipidemia, l'ipercalcemia, l'ostruzione del dotto pancreatico principale, le alterazioni genetiche.

Grande interesse stanno suscitando negli ultimi anni la pancreatite cronica autoimmune e quella tropicale.

La pancreatite autoimmune è una forma rara di pancreatite. La prevalenza e l'incidenza globali non sono ancora state determinate[74]: alcuni studi hanno riportato una prevalenza del 5-6% tra tutti i pazienti con pancreatite cronica[54]. D'altra parte però caratteristiche cliniche e biochimiche della pancreatite autoimmune sono state ritrovate nel 40% dei pazienti con pancreatite cronica idiomatica[155].

La malattia colpisce entrambi i sessi pur essendo due volte più frequente negli uomini, e anche questa forma compare nella maggior parte dei casi dopo i 50 anni[74].

La pancreatite tropicale, è una forma di pancreatite cronica ad insorgenza giovanile presente soprattutto in Africa ed India. Anche per questa forma non ci sono stime epidemiologiche precise[156]. Uno studio epidemiologico del 1994 [157] nello stato del Kerala, nel sud dell'India, (condotto su 28567 individui sani appartenenti a 6079 famiglie) ha stimato una prevalenza della pancreatite cronica di 126/100000 abitanti e di 98/100000 per la forma calcifica.

Classificazione

Ripercorrere la storia della classificazione delle pancreatiti vuol dire riproporre il cammino che ha portato, dalla prima definizione della pancreatite cronica nel 1946 [158], alle attuali conoscenze sulla malattia. Ogni classificazione è stata infatti frutto del suo tempo e del bagaglio di nozioni possedute, ed ha rappresentato il tentativo di dare loro uniformità e sistematicità.

Negli ultimi anni molti sforzi sono stati compiuti per cercare di ottenere un nuovo sistema di classificazione della pancreatite cronica, proprio alla luce di quanto ora noto sulla malattia. Vi è infatti l'assoluta necessità di poter disporre di un sistema standardizzato che sia semplice e pratico, ma accurato e oggettivo, e che racchiuda in un unico schema l'eziologia, la patogenesi, le caratteristiche morfologiche e funzionali, lo stadio clinico e la severità della malattia[33, 159].

La mancanza di questo giustifica la reale difficoltà di confrontare dati e studi presenti in letteratura, di uniformare le caratteristiche dei pazienti da inserire nei trials clinici, e soprattutto di migliorare la terapia e formulare un giudizio prognostico più corretto.

È possibile affermare che, nonostante tale necessità sia compresa da molti e i numerosi simposi organizzati a questo scopo, ancora oggi non esiste uno schema classificativo uniformemente accettato e universalmente valido[153, 159-160)].

Classificazione di Marsiglia e successive revisioni.[47, 49, 50]

In occasione del Simposio Internazionale tenutosi a Marsiglia nel 1963 [47] venne sviluppata una prima classificazione delle pancreatiti che teneva conto soprattutto delle loro caratteristiche istologiche ed eziologiche[153, 159]. Il sistema di Marsiglia introduce la distinzione tra pancreatite acuta e cronica: per essere definita tale, l'acuta deve vedere la sua risoluzione clinica ed istologica una volta eliminati i fattori scatenanti, mentre la diagnosi di pancreatite cronica richiede un reperto di irregolarità istologiche permanenti. In pratica nella pancreatite acuta la ghiandola è normale prima dell'attacco e tale ritorna dopo la risoluzione dello stesso; mentre nella pancreatite cronica la

ghiandola è anomala sia prima che dopo l'attacco[119]. La classificazione comprende anche altre due entità: la pancreatite acuta ricorrente, caratterizzata da attacchi ricorrenti di flogosi con piena risoluzione clinica ed istologica; e la pancreatite cronica ricorrente, distinta dalla pancreatite cronica su base clinica per la pregressa esperienza di più episodi di dolore addominale. Le due successive revisioni del 1984 e del 1988 cercarono di caratterizzare più accuratamente i reperti istopatologici per individuare aspetti fisiopatologici comuni.

Nella classificazione del 1984 è introdotta come entità distinta la "pancreatite cronica ostruttiva", caratterizzata da un'ostruzione del dotto pancreatico principale con dilatazione a monte del sistema duttale e atrofia diffusa e uniforme del parenchima, in assenza di calcoli. Solo per questa forma viene accettata la possibilità di un miglioramento della patologia alla rimozione della causa ostruttiva.

Con le conferenze di Marsiglia e poi di Roma del 1988 [50] la classificazione è ulteriormente ampliata con l'inclusione di altre due forme: la "pancreatite cronica calcificante", caratterizzata dalla presenza di precipitati proteici, "plugs", che possono calcificare e formare veri calcoli intraduttali; e la "pancreatite cronica infiammatoria", in cui il parenchima esocrino perso è sostituito da fibrosi diffusa con un infiltrato di cellule mononucleate[153, 161] Queste classificazioni presentano numerosi limiti di applicabilità, tra cui quello di riferirsi a caratteristiche istologiche, molto difficili da valutare nella normale pratica clinica[161]. Inoltre non è affrontato in alcun modo il problema della correlazione tra morfologia e funzione, della definizione di gradi di severità, né la categorizzazione dei possibili reperti delle tecniche di imaging[159]

Classificazione di Cambridge.[48]

Un gruppo internazionale di esperti si riunì a Cambridge, nel 1983, con l'obiettivo di ridiscutere la classificazione delle pancreatiti alla luce degli sviluppi che avevano avuto luogo nei venti anni dalla classificazione di Marsiglia. Il gruppo di lavoro fu inizialmente diviso in cinque sottogruppi di esperti che si occuparono di fare il punto sull'eziologia, sui metodi di valutazione della funzione esocrina del pancreas, sulle tecniche di imaging, sull'istologia e sulla chirurgia. La classificazione di Cambridge, frutto di questo lavoro, riconosce due sole distinte categorie di malattie infiammatorie del pancreas: la pancreatite acuta e cronica definendo la seconda come un'infiammazione continua del pancreas con modificazioni morfologiche irreversibili, che dà tipicamente dolore e/o perdita di funzione[48]. Si ammette la possibilità che la pancreatite cronica si manifesti con episodi acuti ricorrenti e che non sempre sia presente il dolore[153]. Inoltre è proposto, per la pancreatite cronica, uno schema classificativo basato non sull'istologia, ma sulle indagini di imaging in particolare endoscopia, tomografia computerizzata e ecografia. (Tab6-7)

Proposte classificative più recenti.

Come già sottolineato, altri sistemi classificativi sono stati proposti negli ultimi 10 anni ma non sono universalmente accettati. Uno di questi[162] ha introdotto una dettagliata subclassificazione della pancreatite cronica calcifica su base eziologica (alcolica, ereditaria, ipercalcemica, iperlipoproteinemica, farmaco-indotta e idiopatica), considerandola l'espressione di una risposta stereotipata del pancreas esocrino a vari insulti cronici; inoltre la classificazione prevede la suddivisione della malattia in quattro stadi clinici (evidenti per la forma ad eziologia alcolica): I) latente o subclinico; II) precoce o stadio infiammatorio; III) tardivo o stadio dell'insufficienza pancreatica severa; IV) avanzato o stadio della pancreatite indolore secondaria.

La classificazione di Zurigo del 1997[163] è stata concepita specificatamente per la pancreatite cronica alcolica e considera separatamente gli aspetti diagnostici, l'eziologia, la stadiazione clinica e le caratteristiche del dolore, ponendo l'accento, così, sul dinamismo e sulla multiformità della malattia[164]. Sulla base di tutte queste caratteristiche distingue la pancreatite cronica "probabile"

da quella “definita”. Limite di questo sistema è la ristrettezza alla pancreatite alcolica e la mancanza di informazioni sullo stadio della malattia.

Nello stesso periodo una classificazione simile è stata proposta dalla *Japan Pancreas Society*[165]: essa suddivide la pancreatite cronica in definita, probabile e possibile, sulla base dei rilievi delle metodiche di imaging, dei test funzionali e degli esami istologici; risulta carente nella definizione degli aspetti eziopatogenetici e perciò non sempre utile nella pratica clinica[164].

Nel 2001 è stato introdotto il sistema TIGAR-O [33], il cui merito fondamentale è proprio la dettagliata classificazione sulla base dei fattori di rischio associati allo sviluppo di pancreatite cronica, alla luce soprattutto delle recenti acquisizioni in ambito genetico.

Nel 2002 è stato proposto il sistema ABC che suddivide i pazienti con pancreatite cronica in tre categorie: A) pazienti senza dolore; B) pazienti con dolore e senza complicanze; C) pazienti con dolore e complicanze[166]. Anche questo sistema ha dei limiti, non differenziando chiaramente i vari gradi di severità della malattia e non consentendo la classificazione delle possibili presentazioni cliniche della stessa[159].

Le ultime proposte classificative sono estremamente recenti: la classificazione di Manchester (2006) e quella di M-ANNHEIM (2007).

Il sistema di Manchester enfatizza la necessità di una classificazione che tenga conto della stadiazione delle fasi della malattia e propone la distinzione in: pancreatite cronica lieve, moderata e avanzata (“end-stage”) in base ad una serie di parametri clinici, morfologici, funzionali e in base alla presenza o meno di complicanze[167]. L’ultima proposta è il sistema di M-ANNHEIM [159] che sembra racchiudere tutte le precedenti classificazioni della malattia. Questo sistema è basato sull’assunto che nella maggior parte dei pazienti la malattia è dovuta all’interazione di più fattori di rischio; la “M” è acronimo di “Multiple risk factor classification”. I vari fattori di rischio sono stati raggruppati in categorie e “ANNHEIM” è l’acronimo di queste categorie: alcol, fumo (nicotine), fattori nutrizionali, fattori ereditari (hereditary), dotti efferenti, fattori immunologici e fattori metabolici e miscellanea. Oltre all’eziologia la classificazione comprende la suddivisione in stadi

clinici, una serie di criteri diagnostici ben precisi che includono anche i criteri ecoendoscopici e colangiografici, e un sistema di punteggio a score che definisce la severità clinica.

Eziologia e patogenesi

Inizialmente la pancreatite cronica è stata considerata come un'unica malattia dovuta all'eccessivo consumo di alcol e la maggior parte dei casi in cui questo fattore non era presente, erano etichettati come "pancreatite cronica idiopatica".

La classificazione di Marsiglia-Roma è basata proprio sull'individuazione di un ipotetico meccanismo patogenetico comune nelle varie forme di pancreatite calcificante-calcifica, di cui quella indotta dall'alcol è la più frequente. Caratteristica istologica fondamentale di questa forma di pancreatite è la presenza di "plugs", ossia tappi determinati dalla precipitazione di proteine all'interno dei dotti interlobulari ed intralobulari. Questi plugs sono inizialmente costituiti da cellule degenerate immerse in una trama reticolare; successivamente si ingrandiscono, arricchendosi di materiale amorfo, e formano aggregati laminari; contengono diverse proteine, tra cui enzimi pancreatici, glicoproteine e mucopolisaccaridi acidi. I *plugs* proteici ed i calcoli neoformati, in conseguenza alla deposizione di sali di calcio, determinano alterazioni duttali, fenomeni di disepitelizzazione e conseguente risposta infiammatoria periduttale con fibrosi stenosante. La dilatazione e la stasi che ne conseguono favoriscono un'ulteriore precipitazione proteica e l'atrofia acinare.

Nella litogenesi duttale sarebbero implicate alterazioni qualitative e quantitative della litostatina, una proteina di 14,000 dalton secreta dalle cellule acinari e capace di impedire la precipitazione del calcio. La litostatina è presente in grandi quantità nei plugs e nei calcoli, insieme alla proteina GP2, anch'essa secreta dalle cellule acinari e presente nel succo pancreatico[119, 168].

Secondo questa teoria, la formazione dei plugs nei dotti pancreatici rappresenta un comune tipo di risposta del pancreas a diversi insulti esogeni ed endogeni, in primis all'azione tossica dell'alcol.

Un'aumentata degradazione della litostatina da parte di fattori endogeni (tripsina attiva endoduttale, enzimi lisosomiali etc.) e tossici esogeni (alcol e fumo) determina cioè la precipitazione di materiale fibrillare proteico insolubile (*plugs*) nei dotti; su tale matrice successivamente si depositano cristalli di calcio in virtù della insufficiente concentrazione nel succo di litostatina e di altri inibitori fisiologici della precipitazione di tali sali. Inoltre le forme eredo-familiari potrebbero essere causate da un deficit ereditario di litostatina[169]. A partire dagli anni '90 sono emersi numerosi altri aspetti circa l'eziologia e la patogenesi della pancreatite cronica.

Nonostante nei paesi occidentali ancora oggi l'abuso alcolico sia il principale fattore associato allo sviluppo di pancreatite cronica, nel tempo ne sono stati descritti molti altri.

Oggi con il termine pancreatite cronica si individuano quindi forme di malattia con epidemiologia, eziologia, caratteristiche istologiche e morfologiche diverse[169]. Con poche eccezioni, l'esatta eziologia della maggior parte dei casi di pancreatite cronica è nota solo in parte e probabilmente la malattia origina dall'interazione di più fattori, ambientali e genetici, con azione additiva e sinergica[29, 33]; i meccanismi patogenetici potenzialmente implicati sono di conseguenza multipli ma nulla vieta che ne possa esistere uno unificante; una via comune potrebbe ad esempio essere rappresentata dall'attivazione delle cellule stellate pancreatiche (PSC), recentemente individuate. Proprio questa scoperta ha condotto alla vera novità patogenetica emersa in questi anni: la possibilità che una pancreatite acuta possa evolvere in una pancreatite cronica (concetto della necrosi-fibrosi)[170].

Si descrivono i meccanismi patogenetici coinvolti nelle varie forme di pancreatite utilizzando la classificazione eziologica ripresa dal sistema TIGAR-O e M-ANNHEIM.

1) Cause tossiche e metaboliche (alcol, nicotina, fattori nutrizionali, fattori metabolici e miscellanea)

AlcolUna possibile relazione tra consumo di alcol e pancreatite cronica è stata ipotizzata già da molti anni e l'alcol è ancora considerato il principale fattore eziologico della malattia nei paesi industrializzati, dove l'abuso alcolico è documentabile nel 55-80% dei pazienti[33].La gran parte degli studi sulla patogenesi della pancreatite cronica si riferiscono, proprio per questo motivo, alla forma alcolica ed è scaturita fondamentalmente da due osservazioni cliniche. La prima è che l'incidenza della pancreatite è proporzionale alla quantità di alcol assunta: un ampio studio multicentrico del 1978 [171], poi confermato da altri, suggerì come un consumo elevato ($>150 \pm 84$ g/die) protratto nel tempo (>15 anni) possa causare la malattia; questi dati fanno pensare che vi possa essere un meccanismo patogenetico dose-dipendente.

D'altra parte la patologia pancreatica si manifesta solo nel 5%-10% degli etilisti cronici e, ad individui con elevata suscettibilità all'azione tossica dell'etanolo, possono essere sufficienti pochi anni di consumo di alcol perché si delinei un quadro clinico tipico; pertanto l'alcolismo cronico interverrebbe nella genesi della malattia in sinergia con altri fattori di tipo dietetico (dieta ricca di proteine e di grassi), ambientale (agenti infettivi) e genetico.

Nonostante numerosi studi abbiano tentato di individuare i fattori implicati nella suscettibilità individuale al danno alcolico, i risultati sono stati in molti casi scoraggianti e la questione non ancora risolta[29, 172].

Sono state formulate varie ipotesi, non mutualmente esclusive.

L'*ipotesi ostruttiva*, precedentemente illustrata, considera come evento patogenetico centrale la precipitazione endoduttale di aggregati proteici (*plugs*) su cui possono formarsi veri e propri calcoli.

Da questo dipendono secondariamente il danno duttale, l'atrofia e la fibrosi parenchimale.

Alcune evidenze suggeriscono che l'ingestione cronica di alcol possa stimolare questo processo:

- 1) negli etilisti vi è un aumento della concentrazione totale di proteine nel succo pancreatico[173] e quindi un aumento della viscosità dello stesso;
- 2) vi è anche la capacità di sintetizzare più litostatine,(174) proteine secrete dalle cellule acinari e note componenti dei plugs;

- 3) l'alcol induce nei topi la riduzione del contenuto di GP2 nelle cellule acinari (175) verosimilmente per un'aumentata secrezione della proteina nel succo pancreatico; anche la glicoproteina G2 è componente dei plugs[168].

L'*ipotesi tossico-metabolica* ritiene l'alcol e i suoi metaboliti direttamente tossici, soprattutto sulle cellule acinari.

Come nel fegato, l'alcol è metabolizzato anche nel pancreas con metabolismo ossidativo, producendo acetaldeide, o con metabolismo non ossidativo, originando esteri etilici degli acidi grassi (FAEE). Infatti nel pancreas è stata dimostrata la presenza degli enzimi coinvolti sia nella via del metabolismo ossidativo (alcol deidrogenasi, citocromo P450E1 e catalasi) che non ossidativo (FAEE- sintetasi). Inoltre l'esposizione all'alcol determina un'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno e una riduzione delle difese antiossidanti (ipotesi dello stress ossidativo).

Alcol, acetaldeide, FAEE, e specie reattive dell'ossigeno provocano numerosi effetti deleteri sulle cellule acinari. Alcuni di questi potrebbero favorire l'attivazione prematura degli zimogeni con innesco del processo di autodigestione della ghiandola: l'alcol determinerebbe un aumento nella produzione di enzimi pancreatici, associato a quello della catepsina B; i FAEEs inoltre sembrano aumentare la fragilità delle membrane dei lisosomi e dei granuli di zimogeno.

Il meccanismo non è noto ma potrebbe essere una conseguenza della riduzione della GP2, che determina la forma e la stabilità di queste strutture; anche le specie reattive dell'ossigeno potrebbero avere un ruolo nella destabilizzazione delle membrane dei granuli di zimogeno.

Un altro meccanismo di danno potrebbe essere legato all'attivazione di particolari vie di segnalazione intracellulari: l'alcol, l'acetaldeide e i radicali liberi modulerebbero l'espressione dei fattori di trascrizione NFκ-B e AP-1 che a loro volta controllano l'espressione di citochine infiammatorie.

Un aspetto poco considerato è che il danno indotto dall'alcol alle cellule acinari potrebbe avere una base ischemica: l'etanolo sembra infatti interferire con la microcircolazione pancreatica[176-177]

L'*ipotesi della necrosi-fibrosi* postula che ripetuti episodi di pancreatite acuta con necrosi cellulare possano condurre allo sviluppo di pancreatite cronica con il rimpiazzo del tessuto necrotico con la fibrosi. Questa teoria, non ancora accettata all'unanimità, ha trovato conferme sia cliniche che sperimentali: ripetuti e severi attacchi di pancreatite acuta nell'uomo e ripetuti attacchi di pancreatite subacuta in modelli animali possono portare allo sviluppo di una pancreatite cronica[170]. In pratica un episodio di pancreatite acuta, provoca l'infiammazione e la necrosi di aree periduttali del parenchima pancreatico. La fase di riparazione è associata alla sintesi e deposizione di fibre collagene (fibrosi) e questo può portare a compressione del sistema duttale; l'aggravamento dell'ostruzione determina stasi, secondaria formazione di calcoli intraduttali, ed infine atrofia acinare[178].

Tutta una serie di studi volti alla comprensione del meccanismo che conduce alla fibrosi pancreatica hanno portato all'individuazione nel pancreas esocrino di un'altra popolazione di cellule residenti, le cellule stellate pancreatiche (PSC).

Le PSC sono simili alle cellule stellate del fegato che furono descritte per la prima da Karl Von Kupfer nel 1876 e che inizialmente furono considerate cellule fagocitarie.

Devono il loro nome alla loro forma, appunto simile ad una stella e sono presenti anche in altri organi come il polmone e il rene[179]. Watari *et al*[180], nel 1982, descrissero la presenza di cellule contenenti vitamina A nel pancreas di topi a cui veniva somministrata tale vitamina.

Successivamente tali cellule, appunto le PSC, sono state isolate e caratterizzate sia nel topo che nell'uomo[181-182]

Sono cellule dotate di processi citoplasmatici che si inseriscono tra le altre cellule pancreatiche, con cui contraggono stretti rapporti.

Sono in grado di passare dallo stato quiescente a quello attivato in risposta a numerosi stimoli: le cellule quiescenti contengono depositi lipidici e di vitamina A, ed esprimono marker come la desmina e la proteina gliofibrillare acida (GFAP); le cellule attivate assumono un fenotipo miofibroblastico e sono caratterizzate dalla scomparsa dei globuli di lipidi e dall'espressione

dell'alfa-actina del muscolo liscio (alfa-SMA). L'attivazione delle PSC facilita la loro proliferazione, la migrazione, e la deposizione di matrice extracellulare (ECM); questo può condurre alla fibrosi o al rimodellamento dell'ECM, nel quadro dei meccanismi di riparazione che rispondono al danno pancreatico.

Nel pancreas solitamente le PSC attivate si ritrovano nel contesto di aree di necrosi estesa e di infiammazione, in un ambiente ricco di citochine, fattori di crescita e specie reattive dell'ossigeno. E' stato dimostrato che il danno pancreatico precede l'attivazione di queste cellule[183-185]: sono le sostanze liberate in risposta alla necrosi e all'infiammazione del pancreas che attivano per via paracrina le PSC, le quali sono poi in grado, con un meccanismo autocrino, di mantenersi in tale stato.

L'alcol può indurre l'attivazione delle cellule stellate secondo due vie: con un meccanismo di azione diretto oppure tramite l'induzione di infiammazione pancreatica e conseguente rilascio di numerose citochine. Studi in vitro hanno dimostrato che le cellule stellate sono direttamente attivate dall'alcol e che esse stesse possiedono gli enzimi per metabolizzarlo. L'attivazione delle PSC indotta dall'etanolo è completamente inibita dal 4-metilpirazolo, un inibitore dell'enzima alcol deidrogenasi e non ha luogo se le cellule vengono incubate con acetaldeide in presenza di sostanze antiossidanti come la vitamina E. Ciò suggerisce che l'alcol sia in grado di indurre l'attivazione delle cellule stellate attraverso la sua riduzione ad acetaldeide che causa uno stress ossidativo all'interno delle stesse. Le cellule stellate possono essere attivate anche con un meccanismo paracrino da citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6, MCP1, TGF- β , PDGF) che vengono liberate durante episodi di pancreatite alcolica con necrosi infiammatoria. Queste citochine possono altresì essere prodotte dalle cellule stellate, che sono in grado così di autoattivarsi. Il meccanismo autocrino appena descritto potrebbe avere un ruolo nel perpetuare l'attivazione delle PSC anche quando i fattori causali iniziali non sono più presenti e quindi nel rendere persistente la produzione di matrice extracellulare conducendo verosimilmente alla fibrosi pancreatica[29, 178-179]).

Tabagismo

Il fumo di sigaretta è stato descritto come un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di pancreatite cronica[186].

In particolare sebbene l'alcol sia riconosciuto come fattore causale principale, il fumo ha dimostrato di avere un'azione additiva a quella dell'alcol nell'indurre la malattia[187-188].

Il rischio relativo di un fumatore rispetto ad un non fumatore varia tra il 7,8 e il 17,3 [187; 189] e sembra essere dose dipendente[189].

Recentemente è stato documentato anche il suo ruolo nell'accelerare la progressione della malattia[190]. Il meccanismo patogenetico con cui il fumo contribuisce al danno è sconosciuto. E' noto che esso attraverso l'acetaldeide ed i derivati cianidrici, costituenti della fase gassosa, esplica un'azione citotossica sulle cellule acinari, inibisce la secrezione pancreatica di bicarbonati, diminuisce l'attività della proteina inibente la tripsina e i livelli sierici di α 1-antitripsina[29]. Inoltre studi di laboratorio hanno dimostrato che l'esposizione alla nicotina induce l'attivazione di molte vie di trasduzione del segnale che conducono ad un aumento del rilascio intracellulare di calcio, forse responsabile della citotossicità e del danno cellulare[190].

Ipercalcemia

L'ipercalcemia, soprattutto sostenuta da una condizione di iperparatiroidismo, è una rara causa di pancreatite. Il meccanismo patogenetico alla base del danno sarebbe di tipo ostruttivo: la precipitazione di sali di calcio all'interno dei dotti pancreatici con danno epiteliale dovuto all'azione tossica diretta dello ione Ca^{+} sulle cellule duttali ed acinari e conseguente precipitazione di aggregati proteici e formazione di plugs.

Inoltre, alti livelli di calcio attivano di per sé il tripsinogeno e stabilizzano la tripsina, avendo un ruolo importante come causa di pancreatite acuta[29, 191].

Iperlipidemia

Le iperlipidemie familiari, in particolare l'ipertrigliceridemia, sono una causa rara di pancreatite. Si presentano nei casi più tipici come pancreatite acuta o acuta ricorrente e, talvolta, in forma cronica. Il rischio è aumentato in pazienti con iperlipidemia familiare di tipo I (deficit di lipoproteina lipasi e apoproteina CII), di tipo IV (iperlipemia familiare combinata) e V (ipertrigliceridemia familiare). In assenza di altri fattori, l'elevazione dei TG oltre i 1000 mg/ml è in grado di scatenare un attacco di pancreatite acuta. Il meccanismo patogenetico sarebbe probabilmente da ricondurre all'idrolisi dei trigliceridi da parte della lipasi pancreatica con accumulo di acidi grassi liberi in elevata concentrazione, nelle cellule acinari. Questi sono tossici e determinano danno alle cellule e anche al microcircolo pancreatico. Inoltre l'aumentata concentrazione di chilomicroni nel sangue provocherebbe la precipitazione di aggregati lipidici, quindi ischemia e susseguente acidosi; nell'ambiente acido gli acidi grassi liberi determinano l'attivazione intrapancreatica del tripsinogeno[71].

Si ritiene che la presenza di valori sierici di TG superiori ai 500 mg/dl sia un fattore di rischio associato pancreatite ricorrente[192]. L'associazione con la pancreatite cronica è meno evidente dato che l'iperlipidemia è stata associata alla pancreatite cronica solo in una piccola percentuale di pazienti[193].

Farmaci e tossici esogeni o endogeni

Numerosi farmaci sono in grado di provocare pancreatiti acute. Per alcuni (tetracicline, sulfonamidi, calcio, diuretici, azatioprina, estrogeni ecc.) l'associazione è ormai definita, per altri solo ipotizzata (steroidi, ciclosporina, paracetamolo, rifampicina ecc.).

Vi sono pochi casi in letteratura di pancreatite cronica associata all'uso di farmaci. Nel 1987 Amman *et al* riportarono i risultati di uno studio effettuato per valutare l'incidenza della pancreatite cronica nei pazienti con insufficienza renale cronica. In 53 pazienti l'abuso di analgesici era il fattore causale della nefrite. Solo nei pazienti con questa storia furono ritrovate calcificazioni pancreatiche, in una percentuale del 10%. Questo studio ha ipotizzato che la fenacetina o il

paracetamolo potessero causare la pancreatite cronica. Il meccanismo fisiopatologico è però sconosciuto[194].

Consistenti sono i dati che associano le pancreatiti, acuta e cronica, all'insufficienza renale cronica; in questi pazienti sono state documentate sia alterazioni morfologiche che funzionali[29]. Il danno sembrerebbe dovuto ad un effetto tossico diretto delle tossine uremiche[195].

2) *Cause genetiche (fattori ereditari)*

La predisposizione genetica alla pancreatite cronica fu riconosciuta sin dal 1952 [196]

e seguita dalla descrizione di numerosi casi familiari della malattia[197].

Grazie ai progressi nel campo della genetica e soprattutto alla decodificazione del genoma umano è stato possibile individuare vari geni, le cui mutazioni o polimorfismi, potrebbero spiegare non solo l'esistenza delle forme ereditarie e familiari di malattia, ma anche la suscettibilità individuale al danno pancreatico in presenza di altri fattori eziologici noti, o la severità delle manifestazioni cliniche.

D'altra parte è possibile anche che tali studi conducano all'identificazione di geni protettivi: un recente studio ha identificato una variante del gene del tripsinogeno anionico (PRSS2) che sembra proteggere dalla malattia[198].

I fattori genetici hanno un ruolo causale nelle forme ereditarie e familiari della malattia, ma hanno un ruolo sicuramente importante anche nei casi di pancreatite cronica idiopatica; recentemente anche per la pancreatite cronica tropicale è stato proposto il ruolo della genetica.

Pancreatite cronica ereditaria, familiare ed idiopatica

La “*pancreatite cronica ereditaria*” è forma molto rara di pancreatite. E' una malattia genetica trasmessa con ereditarietà autosomica dominante con penetranza elevata (80%) ed espressività variabile[199]. La malattia è causata da mutazioni a carico del gene sito PRSS1 [200]; tale gene

codifica per il tripsinogeno cationico[28], principale tipo di tripsinogeno sintetizzato dalle cellule acinari del pancreas esocrino.

Con il termine “*pancreatite cronica familiare*” si indicano quei casi di pancreatite cronica che insorgono in famiglie in cui la ricorrenza di malattia è superiore rispetto al valore atteso riferendosi alla popolazione generale. A differenza della pancreatite cronica ereditaria, non sono però dimostrabili le suddette mutazioni del PRSS1, che infatti giustificano solo il 60% [197] delle forme ereditarie intese in senso più lato. Anche in questi casi vi è evidentemente alla base l’ereditarietà ma i geni implicati e la modalità di trasmissione sono diversi.

La *pancreatite cronica* viene definita “*idiopatica*” quando non si riesce a documentare alcuna causa nota potenzialmente implicata nella genesi della malattia.

La pancreatite cronica idiopatica ha una età d’insorgenza bimodale e viene distinta in “early onset”, con picco di incidenza intorno ai vent’anni e “late-onset”, con picco di incidenza dopo i 50 anni[201].

Nelle ultime decadi il numero di pancreatiti idiopatiche si è drasticamente ridotto per la scoperta di numerosi fattori ambientali e biochimici ma soprattutto genetici, associati alla malattia[29; 33]. E’ facile supporre che queste si ridurranno ancora con l’avanzare della ricerca e con la scoperta di nuovi geni e nuove mutazioni che potranno spiegarle.

Mutazioni del gene del tripsinogeno cationico (PRoteasi Serinica 1, PRSS1)

Due mutazioni del PRSS1 sono state identificate nei pazienti con pancreatite cronica ereditaria e sono considerate causa della malattia[28], la mutazione R122H e la mutazione N29I. La prima è una transizione guanina-adenosina sul codone 122 della porzione codificante del suddetto gene (esone tre); tale scambio determina la sostituzione di un residuo di arginina con uno di istidina nella struttura della proteina. L’arginina 122 si trova sulla catena aminoacidica posta a cerniera tra i due domini globulari che formano la molecola del tripsinogeno; questa catena è il sito d’attacco iniziale del processo di autolisi della tripsina, un importante meccanismo di difesa che impedisce il danno

pancreatico quando il tripsinogeno viene attivato all'interno della ghiandola anziché nel lume intestinale. Secondo questi autori la mutazione renderebbe la tripsina resistente all'auto-inattivazione e di conseguenza il pancreas più suscettibile al danno. La mutazione N29I riguarda il codone 29 (esone 2) del medesimo gene; consiste nella sostituzione di un'asparagina in posizione 29 con un'isoleucina. Questa mutazione si associa ad un quadro clinico sovrapponibile a quello causato dalla mutazione R122H, ma con meccanismo patogenetico diverso e non completamente chiarito. Altre mutazioni del gene PRSS1 sono state studiate ma nessuna di queste è stata chiaramente associata alla pancreatite cronica ereditaria, intesa come una malattia autosomica dominante.

In generale tutte queste osservazioni fanno supporre che il meccanismo patogenetico comune implicato nelle pancreatiti sostenute da mutazioni del PRSS1, sia l'aumento dell'attivazione intrapancreatica del tripsinogeno e la stabilizzazione della tripsina (mutazione R122H) sarebbe da considerare un meccanismo accessorio[29, 33, 197].

La pancreatite cronica ereditaria può anche essere considerata un modello per spiegare la relazione tra le varie patologie infiammatorie del pancreas, a sostegno dell'ipotesi che la pancreatite acuta può evolvere in pancreatite cronica. Infatti, nella maggior parte dei casi, tale malattia si manifesta clinicamente con attacchi di pancreatite acuta finché non compaiono le caratteristiche tipiche della forma cronica, che si differenziano dalle altre forme di tale patologia solo per l'insorgenza precoce[199].

Mutazioni del gene della fibrosi cistica (CFTR)

Anche il gene della fibrosi cistica, il cui locus è il 7q32, è in qualche modo coinvolto nella patogenesi della pancreatite cronica.

La proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) è un canale del cloro posto sulla membrana apicale delle cellule epiteliali secretorie, la cui funzione è fondamentale per

la secrezione di fluidi ed elettroliti soprattutto nel tratto respiratorio e digestivo. Il CFTR promuove l'efflusso transmembrana di ioni cloro, generando un gradiente elettrochimico che consente la contestuale fuoriuscita di acqua, sodio e bicarbonato[29, 202].

La perdita di funzione del CFTR, conseguente a mutazioni del gene, è responsabile della fibrosi cistica (FC) o mucoviscidosi, una grave malattia ereditaria autosomica recessiva che si caratterizza soprattutto per le disfunzioni respiratorie e l'insufficienza pancreatica[29].

Mutazioni o particolari polimorfismi del gene potrebbero essere un fattore di rischio anche per la pancreatite cronica alterando il flusso e la composizione del succo pancreatico[197].

Nel 1998 due studi hanno documentato l'associazione delle più comuni mutazioni del CFTR con la pancreatite cronica idiomatica[90, 202]

Attualmente si ritiene che la pancreatite cronica idiopatica possa rappresentare una forma atipica di fibrosi cistica data dalla combinazione di due mutazioni lievi del CFTR o di una lieve e una severa.

Oppure la mutazione di CFTR potrebbe agire nella patogenesi della malattia insieme a mutazioni o varianti del PRSS1 e di SPINK1 [204].

Mutazioni del gene del *Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor* (PSTI) (o inibitore proteasico Kazal tipo 1 o SPINK 1)

L'inibitore pancreatico secretorio della tripsina (SPINK 1) è un peptide di 56 aminoacidi, codificato da un gene situato sul cromosoma 5.

SPINK 1 (o PSTI) inibisce specificatamente fino al 20% del tripsinogeno attivato bloccando fisicamente il sito attivo.

E' sintetizzato dalle cellule acinari, si colocalizza con il tripsinogeno nei granuli di zimogeno con un rapporto stechiometrico di circa 5:1 e realizza la prima linea di difesa contro l'attivazione prematura del tripsinogeno nelle cellule acinari[33, 197, 205].

L'attenzione sulle possibili mutazioni di SPINK1 quale possibile fattore patogenetico nella pancreatite cronica è derivata dalla constatazione che molti casi di pancreatite cronica ereditaria non

erano associati a mutazioni del PRSS1. Si è ipotizzato allora che la pancreatite cronica potesse derivare dalla perdita di funzione dell' inibitore pancreatico della tripsina: mutazioni del gene SPINK 1 potrebbero portare ad un' aumentata attivazione della tripsina all' interno del pancreas causando pancreatite.

La mutazione più frequente del gene SPINK 1 è N34S che è il risultato di una transizione A-G che causa la sostituzione di un' asparagina con una serina al codone 34, esone 4. Witt et al.[206] per primi hanno dimostrato questa mutazione in 18 su 96 bambini e adolescenti con pancreatite cronica; 6 di questi erano omozigoti per tale mutazione.

La stessa mutazione è presente anche nel 15-40% dei pazienti con pancreatite cronica idiopatica e in circa il 2% della popolazione generale[29].

La maggior parte degli autori ritiene che le mutazioni dello SPINK 1 non siano sufficienti per causare pancreatite ereditaria: la pancreatite cronica idiopatica è rara e la mutazione N34S è relativamente frequente nella popolazione generale. L' ipotesi più probabile è che le mutazioni dello SPINK 1 agiscano come agenti modulanti, per esempio, abbassando l' età d' insorgenza o aumentando la severità della pancreatite causata da altri fattori genetici ed ambientali. Inoltre l' eventuale perdita di funzione dello SPINK, se permane l' integrità del sito di autolisi R122 della tripsina e degli altri meccanismi di controllo, verrebbe vicariata da un incremento dell' efficienza di questi sistemi, senza lo sviluppo della malattia[33, 207].

Pancreatite tropicale.

La pancreatite cronica tropicale è un tipo particolare di pancreatite cronica idiopatica che è stata descritta nei paesi tropicali: India[208], Nigeria, Uganda, Kenya, Sri Lanka, Madagascar, Zaire e recentemente anche in Cina e Malesia[209]. Le cause e la patogenesi della malattia, non sono attualmente note: è possibile che il meccanismo patogenetico ultimo sia sovrapponibile a quello

delle altre forme di pancreatite, l'attivazione delle cellule stellate in aree di necrosi pancreatiche con deposizione di matrice e conseguente fibrosi (sequenza necrosi-fibrosi). Anche nella pancreatite tropicale infatti lo stadio terminale della malattia è dominato dalla sostituzione fibrotica del parenchima ghiandolare. Quale sia però l'agente eziologico in grado di innescare questa sequenza non è ancora noto. Sono stati considerati la malnutrizione, l'ingestione della radice di cassava o tapioca, infezioni virali o parassitarie, meccanismi autoimmunitari. Al momento sono seriamente considerate solo due ipotesi: lo stress ossidativo e alterazioni genetiche[156].

L'ipotesi dello stress ossidativo come meccanismo implicato nella patogenesi della pancreatite cronica è stata proposta diversi anni fa da Braganza et al[210], i quali hanno sostenuto che il danno pancreatico potesse essere causato da una iperattività delle ossidasi epatiche con generazione di enormi quantità di radicali liberi dell'ossigeno.

Sempre Braganza *et al*[211] hanno dimostrato che i pazienti con pancreatite cronica, indipendentemente dall'eziologia, sono carenti in antiossidanti e quindi più vulnerabili al danno ossidativo. Inoltre la supplementazione con antiossidanti migliora la sintomatologia, riducendo l'uso di analgesici[212]. In India, dove la pancreatite tropicale è maggiormente diffusa, vari studi hanno dimostrato che l'introduzione di sostanze antiossidanti e i livelli ematici delle stesse sono bassi nella popolazione generale[213]. Lo stesso dicasi per pazienti affetti da questa forma di pancreatite[214].

Anche per la pancreatite tropicale è stata chiamata in causa la genetica; il fatto che questa forma di pancreatite sia endemica in determinate zone, specie in India, suggerisce che ci possa essere una predisposizione genetica, anche alla luce della mancata dimostrazione di un fattore causale di tipo ambientale.

Studi su coorti di pazienti in India e in Bangladesh hanno dimostrato che le mutazioni del gene PRSS1, causa di pancreatite ereditaria, non sono presenti nei pazienti con diabete pancreatico fibrocalcoloso (FCDP)[215] una variante della pancreatite cronica tropicale; al contrario nei pazienti con tale malattia è stata documentata l'associazione con mutazioni di SPINK1 [216]. La

mutazione N34S del gene SPINK1 inoltre è stata dimostrata nei pazienti con pancreatite cronica tropicale[217-218].

Come già detto le mutazioni di SPINK1 non causano direttamente la malattia ma agiscono come fattori modulanti le caratteristiche della stessa. Recentemente è stata dimostrata la presenza di polimorfismi del gene CTSB nei pazienti con pancreatite cronica tropicale. Tale gene codifica per la catepsina B, un'idrolasi lisosomiale che si crede possa avere un ruolo nell'attivazione del tripsinogeno: la mutazione L26V è associata in maniera statisticamente significativa alla malattia, in India. È stata ritrovata sia nei pazienti con mutazione N34S di SPINK1 che nei pazienti in cui tale mutazione non era presente[(156)]; la frequenza dei polimorfismi S53G e C595T è invece alta solo nei pazienti che hanno anche la mutazione N34S di SPINK1.

3) Autoimmunità (fattori immunologici)

Pancreatite autoimmune

Il termine “pancreatite autoimmune” fu introdotto da Yoshida *et al.* nel 1995 per descrivere una forma di pancreatite cronica associata a manifestazioni di autoimmunità dimostrabili con esami di laboratorio, istologici e clinici[218].

E' caratterizzata da un processo infiammatorio di tipo autoimmunitario, che determina la comparsa nella ghiandola di un infiltrato, prevalentemente linfocitario (T CD4+ e CD8+), associato a fibrosi e disfunzione dell'organo, in assenza di calcificazioni[74].

La patogenesi della malattia è ancora in larga parte sconosciuta, nonostante diverse evidenze suggeriscano che alla base di questa ci sia un meccanismo autoimmune: l'associazione con altre malattie autoimmuni, la presenza di elevati livelli di immunoglobuline (soprattutto IG4) e di autoanticorpi in circolo, l'infiltrato linfocitario, la risposta alla terapia steroidea.

L'ipotesi più plausibile è che un'aberrante espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, (HLA-DR), porti alla presentazione di auto antigeni espressi dalle cellule pancreatiche ai linfociti T con conseguente sviluppo di una risposta infiammatoria di tipo cellulomediato contro il self[29].

L'infiammazione secondaria, cioè l'infiltrazione di linfociti attivati, si localizzerebbe attorno ai dotti pancreatici, e, anche per il rilascio da parte dei linfociti di linfocine fibrogenetiche, evolverebbe verso una fibrosi periduttale che oblitera il lume e determina un'ostruzione al deflusso del secreto pancreatico. La caratteristica istologica fondamentale della pancreatite autoimmune è proprio l'infiltrato infiammatorio che si dispone come un collare attorno ai dotti pancreatici[74].

4) Cause ostruttive (dotti efferenti)

La pancreatite cronica ostruttiva è una forma distinta e rara di pancreatite cronica in cui è l'ostruzione del dotto pancreatico principale a innescare il processo che conduce all'atrofia delle cellule acinari e alla fibrosi diffusa del parenchima dell'organo. Tale ostruzione può essere secondaria a traumi, tumori, malformazioni congenite quali il pancreas divisum, cisti e stenosi della papilla di Vater o della papilla minor.

Controverso è invece il ruolo dei disordini funzionali dello sfintere di Oddi. (SOD) Questa forma di pancreatite cronica può regredire o migliorare con la rimozione della causa ostruttiva.

Anatomia Patologica

La pancreatite cronica si caratterizza dal punto di vista istologico per la fibrosi, distribuita in modo irregolare, per la diminuzione del numero di acini con risparmio relativo della componente insulare, per la presenza di ostruzioni duttali a vari livelli e infine per il ricco infiltrato

infiammatorio. Macroscopicamente il pancreas appare di consistenza dura, con dotti dilatati e foci ben evidenti di calcificazioni; comune è anche il reperto di pseudocisti pancreatiche[203].

Nella malattia iniziale il quadro è vario ed incostante. La fibrosi è localizzata alle aree intralobulari o interlobulari, e sostituisce gli acini persi; le isole sono indenni e vi è un intenso infiltrato cellulare. Possono ritrovarsi aspetti comuni alla pancreatite acuta con edema, infiammazione acuta e necrosi lipoidea[119].

Con il progredire della malattia la fibrosi diventa diffusa e coinvolge i dotti pancreatici che mostrano numerose irregolarità dovute alla creazione di stenosi e dilatazioni; i precipitati proteici si fanno più cospicui, calcificano grossolanamente e ostruiscono i dotti pancreatici maggiori.

L'aspetto morfologico della ghiandola può variare a seconda dell'eziologia della pancreatite.

Nella pancreatite autoimmune il pancreas si rivela quasi sempre diffusamente solido e duro all'esame macroscopico; in alcuni pazienti si può delineare una "massa" focale nel parenchima pancreatico.

La caratteristica distintiva all'esame microscopico è l'infiltrato periduttale di linfociti e plasmacellule che forma un vero e proprio collare attorno ai dotti. Si tratta di linfociti T CD4+ e CD8+, e in misura minore di linfociti B. I setti interlobulari sono ispessiti per la proliferazione di miofibroblasti e per l'infiltrazione linfo-plasmacellulare[74].

La pancreatite cronica tropicale si caratterizza morfologicamente per la presenza di numerosi calcoli intraduttali, associati a dilatazione dei dotti e ad un background di fibrosi. I calcoli sono situati nel dotto principale o nelle sue collaterali; sono di aspetto e dimensione variabile, da quelli molto piccoli che si ritrovano nella coda, a calcoli di 4-5 cm, localizzati soprattutto vicino alla testa del pancreas. Risultano composti da detriti epiteliali, materiale mucinoso e fibrina mentre la sostanza calcificante è il carbonato di calcio sottoforma di calcite.

Microscopicamente le alterazioni maggiori in questa forma di pancreatite, si riscontrano a livello duttale: l'epitelio è danneggiato e denudato e in alcune aree è presente metaplasia. La fibrosi è localizzata attorno ai dotti mentre l'infiltrato infiammatorio, pure presente, è sparso[156].

Clinica, complicazioni e terapia

Le caratteristiche cliniche della pancreatite cronica sono assolutamente prive di specificità, soprattutto riferendosi all'esordio della malattia. E' facile infatti immaginare che nello stadio più avanzato della pancreatite, quando gran parte del tessuto pancreatico esocrino ed endocrino è stato ormai sostituito dalla fibrosi, il quadro clinico sia dominato da segni e sintomi riferibili alla perdita di funzione pancreatico e quindi dalla maldigestione e dal diabete mellito. La storia naturale della malattia è caratterizzata infatti da una lenta progressione verso lo stadio terminale, dominato dall'insufficienza pancreatico. In questo lungo processo si possono distinguere: una fase preclinica, di solito assolutamente asintomatica; una fase dominata da episodi ricorrenti di dolore addominale di presunta origine pancreatico, senza evidenza di pancreatite cronica; un'ulteriore fase in cui compaiono segni specifici della malattia, come le calcificazioni o la dilatazione duttale. Ogni paziente con pancreatite cronica ha la sua storia naturale: in alcuni l'esordio può essere il dolore addominale ricorrente intervallato da periodi di relativo benessere, in altri la malattia può esordire già nella sua fase più avanzata; in altri ancora l'esordio può essere rappresentato da un episodio grave di pancreatite acuta necrotico emorragica, in cui il processo di riparazione conduce nel tempo verso la pancreatite cronica.

Non bisogna dimenticare che in ciascuna di queste fasi il quadro clinico può risultare ulteriormente diversificato per la comparsa di numerose complicanze, che hanno un ruolo importante nella prognosi della malattia.

Di seguito sono descritte le principali caratteristiche cliniche della pancreatite cronica, i meccanismi fisiopatologici che le determinano e le possibilità terapeutiche per migliorarle.

1) Dolore

Il dolore è il sintomo principale della pancreatite cronica e rappresenta una delle indicazioni alla terapia chirurgica.

E' un dolore continuo e profondo, localizzato in epigastrio con irradiazione a entrambi gli ipocondri o posteriormente (a "barra" o a "cintura"), ma può essere anche diffuso ai quadranti addominali superiori. Di solito aumenta con l'ingestione di cibo e può accompagnarsi a nausea e vomito. Questo può portare a riduzione dell'alimentazione e contribuire alla perdita di peso, dovuta principalmente alla maldigestione.

E' da sottolineare che un certo numero di pazienti con pancreatite cronica può non presentare affatto il sintomo dolore[29, 119].

L'evoluzione della sintomatologia dolorosa non è prevedibile. E' stato proposto che il sopravvenire dell'insufficienza pancreatica conduca nel tempo alla scomparsa del dolore (ipotesi del "burn-out"), ma la questione è ancora controversa e irrisolta. Pochi studi hanno valutato compiutamente l'evoluzione clinica della malattia. Layer et al[201] hanno identificato due forme clinicamente diverse nell'ambito della pancreatite cronica idiopatica: una ad insorgenza giovanile e l'altra ad insorgenza tardiva. La prima esordisce nell'infanzia e nell'adolescenza con sintomatologia dolorosa molto severa mentre la funzionalità pancreatica è mantenuta per molto tempo. La seconda è caratterizzata da insorgenza tardiva e il dolore è scarso o del tutto assente. Un altro studio[219] ha valutato in maniera prospettica (follow-up medio di 17 anni) l'evoluzione della malattia in una coorte di 207 pazienti con pancreatite cronica alcolica. Sono stati individuati due pattern di manifestazione del dolore: il tipo "A", ossia episodi ricorrenti di dolore di gravità variabile; e il tipo "B", caratterizzato da periodi prolungati di dolore o da dolore continuo su cui si instaurano episodi di accentuazione ed esacerbazione dello stesso. Nella fasi iniziali della malattia sono presenti episodi dolorosi di tipo A e/o B; con prevalenza dei secondi in caso di complicanze.

Patogenesi

La patogenesi del dolore è multifattoriale e probabilmente i meccanismi che lo determinano sono diversi da paziente a paziente. Due teorie sono state proposte per spiegare la genesi del dolore nella pancreatite cronica: la teoria neurogenica e quella dell'ipertensione intraduttale e interstiziale.

Secondo la teoria neurogenica i nervi pancreatici e peripancreatici risultano danneggiati dai processi patologici sottesi alla malattia e questo determina la loro esposizione a sostanze nocicettive, prodotte dalle cellule infiammatorie, o agli enzimi pancreatici.

Anche i radicali liberi e lo stress ossidativo contribuiscono in tal senso alla patogenesi del dolore. Il sintomo è dovuto quindi alla trasmissione di questi stimoli algogeni attraverso il plesso celiaco.

L'ipotesi alternativa considera il dolore pancreatico come risultato dell'aumentata pressione nel parenchima pancreatico o nel sistema duttale. La pressione nei dotti può aumentare come conseguenza della produzione continua di succo pancreatico a monte di un segmento ostruito da restringimenti, stenosi o calcoli. L'aumento della pressione interstiziale può essere dovuto alla fibrosi che limita la capacità del pancreas di espandersi durante la secrezione esocrina e di assorbire così gli aumenti di pressione creati dall'aumento del volume del sistema duttale.

Molti altri meccanismi potrebbero avere un ruolo nel determinare il dolore pancreatico: attacchi acuti di pancreatite, la formazione di pseudocisti, la trombosi del sistema portale o della vena splenica, l'ostruzione del sistema biliare e una predisposizione genetica[220-221].

Terapia

L'approccio terapeutico al paziente con pancreatite cronica ha come obiettivo fondamentale quello di ridurre o eliminare la sintomatologia dolorosa, spesso determinante la bassa qualità di vita di questi pazienti. La terapia può essere medica, endoscopica o chirurgica. Va premesso che, a prescindere dalla terapia, è indispensabile consigliare ai pazienti l'astensione dall'alcol e dal fumo e garantire un adeguato supporto nutrizionale.

Terapia medica.[29, 152]

Il controllo del dolore è ottenibile, in molti casi, con i farmaci antinfiammatori non steroidei, in particolare con il paracetamolo che rappresenta il farmaco di prima scelta a tale scopo.

Alcuni pazienti necessitano invece di analgesici maggiori, come gli oppioidi. L'uso degli oppioidi va proposto con cautela, tenendo in considerazione gli importanti effetti collaterali: le alterazioni della motilità gastrointestinale e lo spasmo dello sfintere di Oddi, la depressione del sistema nervoso centrale e soprattutto il rischio della farmacodipendenza. Tra gli oppioidi è di scelta il tramadolo che esercita una doppia azione farmacologica essendo un agonista dei recettori degli oppioidi ed un bloccante del *reuptake* di serotonina e noradrenalina.

La supplementazione di enzimi pancreatici ha lo scopo di ridurre la secrezione pancreatica e di conseguenza la pressione parenchimale e duttale. Infatti la somministrazione esogena di enzimi in capsule gastroprotette liberati nell'intestino, provoca per via neurale riflessa e mediata dalla CCK una diminuzione della secrezione pancreatica.

Lo stesso risultato può essere ottenuto con l'octreotide, uno dei più potenti inibitori della secrezione pancreatica.

Anche il danno da radicali liberi è implicato nella patogenesi del dolore della pancreatite cronica. L'uso di antiossidanti (beta-carotene, vitamina C, vitamina E, metionina etc) potrebbe essere utile in alcuni pazienti.

Terapia endoscopica.[152]

Le manovre endoscopiche consentono l'eliminazione degli ostacoli che ostruiscono il dotto maggiore creando ipertensione duttale, uno dei meccanismi implicati nella genesi del dolore.

A seconda della natura dell'ostruzione l'approccio è diverso: in caso di stenosi cicatriziali e fibrotiche è possibile applicare una protesi, in presenza di un calcolo è possibile estrarre il calcolo associando una litotrixxia extracorporea o endoduttale. Sia l'applicazione di *stent* che la rimozione dei calcoli si giovano di una sfinterotomia preventiva. La sfinterotomia da sola è applicabile per

quei pazienti che presentano fibrosi o stenosi perisfinteriali. L'endoscopia può essere indicata, in pazienti selezionati, nel drenaggio di alcune pseudocisti.

Terapia chirurgica.[4]

Il dolore intrattabile è un'indicazione alla terapia chirurgica, insieme al dolore associato a complicanze pancreatiche ed extrapancreatiche. L'intervento dovrebbe essere conservativo in assenza di insufficienza ghiandolare e radicale nel caso si sospetti una neoplasia, potenziale complicanza della pancreatite cronica. L'approccio chirurgico può essere scelto anche per il drenaggio duttale e per il blocco del plesso celiaco.

2) Maldigestione

La steatorrea e la perdita di peso sono altre due manifestazioni importanti della pancreatite cronica e sono determinate dalla perdita della funzionalità esocrina del pancreas e quindi dalla mancata secrezione del succo pancreatico.

Il pancreas ha una grande riserva funzionale, di conseguenza le manifestazioni cliniche dell'insufficienza esocrina sono tardive. La steatorrea, dovuta alla mal digestione lipidica, compare solo quando la lipasi pancreatica si è ridotta a meno del 10% del normale; solitamente la maldigestione lipidica precede quella dei carboidrati e delle proteine perché la secrezione delle lipasi decresce più rapidamente di quella delle amilasi e delle proteasi. D'altra parte però la presenza di materiale lipidico in digerito nell'intestino compromette la digestione e l'assorbimento anche degli altri macronutrienti. Altri sintomi, assolutamente aspecifici, legati alla maldigestione sono la flatulenza, il meteorismo, il gonfiore addominale, i crampi addominali, le alterazioni dell'alvo[29, 119, 222].

Terapia

L'insufficienza esocrina richiede la terapia sostitutiva con enzimi pancreatici che solitamente è basata sulla valutazione clinica del paziente e quindi sulla presenza di steatorrea e perdita di peso. Gli enzimi pancreatici vanno assunti con i pasti in formulazioni gastroprotette. La dose è approssimativamente di 25.000-50.000 U di lipasi/pasto; anche se spesso sono necessarie dosi maggiori associate a PPI [29].

2) Diabete

Gli isolotti pancreatici sono inizialmente risparmiati dal sovertimento del parenchima e dalla sostituzione fibrosa che caratterizzano la pancreatite cronica.

Nella maggior parte dei casi quindi l'insufficienza endocrina si manifesta nella fase avanzata della malattia ed è data dalla comparsa di diabete mellito conseguente alla scarsa produzione sia di insulina che di glucagone[29, 119]. La "American Diabete Association" ha classificato il diabete associato alla pancreatite cronica come di tipo IIIc [223].

Terapia

La terapia del diabete richiede la somministrazione di insulina, non diversamente dal diabete di tipo I. Il problema maggiore è correlato alla scarsità di glucagone che predispone a un maggior rischio di ipoglicemia. Questo rappresenta un problema serio nei pazienti con scarsa compliance e che non si astengono dall'assunzione di alcol.

Complicanze

Le complicanze più frequenti sono rappresentate dalla comparsa di pseudo cisti pancreatiche e dall'ostruzione della via biliare principale e del duodeno. Raramente si verifica un coinvolgimento dell'asse vascolare splenico, mesenterico e portale (pseudoaneurismi multipli – ipertensione portale settoriale); talvolta ascite e cirrosi epatica. E' stata inoltre dimostrata l'aumentata incidenza del

carcinoma pancreatico soprattutto nei pazienti affetti da pancreatite cronica familiare rispetto alla popolazione generale.

Pseudocisti pancreatiche

La pseudocisti pancreatica è una cavità cistica sprovvista, a differenza della cisti vera e propria, di rivestimento epiteliale. Le sue pareti sono costituite quindi da aderenze tissutali fibrose postinfiammatorie. Ha contenuto fluido principalmente costituito da succo, enzimi pancreatici e frustoli necrotici e può trovarsi completamente all'interno del parenchima pancreatico o nelle adiacenze della ghiandola. Le pseudo cisti complicano sia la pancreatite acuta che cronica; in quest'ultima in particolare la pseudocisti può essere "cronica" o insorgere a seguito di un episodio di pancreatite acuta. Quelle che insorgono dopo un episodio flogistico acuto sono conseguenti allo spandimento degli enzimi pancreatici e alla necrosi con formazione di una raccolta fluida sterile. Oppure possono originare da una dilatazione del sistema duttale e sono, pertanto, spesso comunicanti con lo stesso. Inizialmente mal definite, crescono col tempo, possono continuare ad aumentare di volume, causare dolore, infettarsi o comprimere gli organi adiacenti e rompersi.

Terapia

Se la pseudocisti è piccola e/o asintomatica non è indicato alcun trattamento; in caso contrario le possibilità terapeutiche sono il drenaggio della raccolta o la resezione pancreatica. Il drenaggio può essere interno, chirurgico o endoscopico, o esterno, chirurgico o percutaneo. La resezione è indicata se la pseudocisti è difficile da drenare perché completamente indovata nel parenchima e se si trova a livello della coda del pancreas[4].

Ostruzione della via biliare

E' caratteristica delle fasi tardive della malattia quando la fibrosi cefalica determina stenosi od occlusione completa della porzione intrapancreatica del coledoco. In alcuni casi la stenosi può essere dovuta a compressione da parte di una pseudocisti.

La manifestazione clinica è la colestasi extraepatica che per lungo tempo si estrinseca con i soli segni bioumorali (aumento ALP e GGT) e solo in fase tardiva, con ostruzione completa, compare un ittero franco. La frequenza varia dal 20 al 30 % dei casi.

Ostruzione duodenale.

E' una complicanza rara, sostenuta dall'estensione della fibrosi o dalla presenza di una pseudocisti, coinvolgenti la regione antro-duodenale. Provoca sintomatologia ostruttiva con ristagno gastrico e vomito.

Ipertensione portale

La fibrosi della ghiandola pancreatica determina in una percentuale variabile fra 3% e 8% compressione e trombosi della vena splenica che talvolta si estende al tratto portale. In questo caso compaiono splenomegalia e varici esofagee.

Ascite pancreatica

E' una complicanza rarissima: riconosce la sua genesi nella rottura di pseudocisti ed eccezionalmente nell'ipertensione portale (secondaria alla cirrosi epatica associata).

Cancro pancreatico

La pancreatite cronica è un fattore di rischio per lo sviluppo di un cancro pancreatico[224]. Il rischio è molto alto nella pancreatite cronica ereditaria[199] e in particolare se tra i fattori causali della pancreatite cronica figura anche il fumo di sigaretta.

1.3 - MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1)

MCP-1 è una potente CC-chemochina di 76 aminoacidi rilasciata dai monociti e capace di attirare linfociti, mast-cellule, eosinofili ed altri monociti durante il processo infiammatorio [225]. In aggiunta alla chemotassi, MCP-1 esercita sui monociti un'azione simile a quella che la IL-8 ha sui neutrofili: essa promuove cioè un incremento delle concentrazioni intracitoplasmatiche di calcio, innescando il “burst” respiratorio dei monociti [226]. MCP-1 è prodotta non solo dai monociti, ma anche dalle cellule endoteliali, dalle fibrocellule muscolari lisce della parete delle arterie [227], dalle cellule della mucosa intestinale nei soggetti affetti da malattia infiammatoria cronica [228].

Nel pancreas, MCP-1 viene rilasciata sia dalle cellule acinari [87, 88, 89, 90], sia dai miofibroblasti periacinari, la forma attiva delle cellule stellate [91].

In particolare, nelle cellule acinari, la sintesi di MCP-1 è indotta dal TNF- α , attraverso una via dipendente dal calcio, e dal fattore nucleare κ B (Nf- κ B) [89].

Nf- κ B è un fattore di trascrizione coinvolto nella sintesi di molteplici mediatori proinfiammatori.

Nelle cellule quiescenti è sequestrato nel citoplasma sotto forma di un complesso ternario legato a specifiche proteine chiamate inibitori di κ B (I κ B). Dopo stimolazione, le I κ B vengono fosforilate, ubiquitinate e degradate dai proteasomi e Nf- κ B è così libero di traslocare nel nucleo, dove esercita la propria azione [229].

1.3a – IL RUOLO DI MCP1 NELLA PANCREATITE ACUTA

Come descritto nel capitolo concernente la pancreatite acuta, la sintesi di MCP-1 aumenta nelle primissime fasi del processo infiammatorio, suggerendo un ruolo cruciale di tale chemochina nel modulare gli eventi che conducono al danno d'organo [88].

MCP-1 sembra inoltre essere correlata all'insorgenza di complicazioni locali, quali necrosi ed infezioni pancreatiche, e sistemiche, come insufficienza renale e scompenso cardiocircolatorio, erigendosi pertanto a determinante della severità del processo infiammatorio. Evidenze cliniche suggeriscono infatti che la pancreatite acuta severa sia associata a concentrazioni locali e sistemiche di MCP-1 significativamente elevate [92].

Il polimorfismo -2518 A/G

La trascrizione del gene di MCP-1 è sottoposta al controllo da parte di due regioni regolatrici, una prossimale ed una distale.

La prima, posta 150 basi a monte del sito di inizio di trascrizione del gene, è responsabile del livello basale di espressione dello stesso e risponde a citochine quali TNF, IL-1 β e interferon- γ .

La seconda, localizzata tra le 1.8 a 2.7 Kb a monte del sito d'inizio della trascrizione, include due regioni riconosciute dal fattore di trascrizione Nf- κ B ed è fondamentale per la sintesi di MCP-1 indotta da citochine [230].

Recentemente è stato descritto da Rovin e colleghi [231] un polimorfismo nella regione regolatrice distale del gene di MCP-1 localizzato 2518 basi a monte del sito inizio trascrizione, risultante nella sostituzione di una base azotata purinica, l'adenina (A), con un'altra, sempre purinica, la guanina (G) (il polimorfismo -2518 A/G di MCP 1). Tale polimorfismo influenza l'attività trascrizionale della regione regolatrice distale, determinando un incremento dei livelli di espressione di MCP-1 in risposta ad uno stimolo infiammatorio.

Gli individui recanti l'allele G, sia in eterozigosi sia in omozigosi, sintetizzano quantità maggiori di chemochina rispetto ai soggetti "wilde type"(A/A) in modo dose-dipendente: ciò significa che gli individui omozigoti (G/G) producono più MCP-1 degli eterozigoti (A/G).

La frequenza dell'allele G è diversa nelle varie aree geografiche: maggiore negli Asiatici e nei Messicani (47%) rispetto ai Caucasicci (29%); non c'è invece alcuna differenza statisticamente significativa tra Caucasicci (29%) ed Afroamericani (22%).

Il polimorfismo -2518 di MCP-1 è stato associato alla progressione di molteplici malattie infiammatorie, tra cui l'asma [232], il lupus eritematoso sistemico [233], l'aterosclerosi [234], il morbo di Crohn [235] e l'epatite C [236].

Nel 2005, Papachristou e colleghi [237] hanno indagato l'esistenza di una possibile correlazione tra il polimorfismo -2518 A/G e la severità della pancreatite acuta, dal momento che esso comporta livelli più elevati di chemochina circolante e pertanto un incrementato reclutamento di cellule della flogosi ove vi sia un qualche tipo di danno.

Gli autori hanno riscontrato una stretta associazione tra l'espressione di MCP-1 e la severità della pancreatite.

Essi sostengono che i soggetti portatori dell'allele G, sia omozigoti che eterozigoti, producendo molta più chemochina, tendano a sviluppare una pancreatite severa (score di Ranson ≥ 3 e di APACHE ≥ 8) anche a fronte di un insulto di entità moderata, laddove gli individui wilde type (A/A) andrebbero incontro invece ad una malattia lieve (score di Ranson = 1 e di APACHE = 4).

Nel caso di insulto importante, i soggetti A/A tenderebbero ad essere affetti da un forma severa di pancreatite, mentre i pazienti con genotipo A/G o G/G sarebbero a rischio di vita.

Esisterebbe pertanto una predisposizione geneticamente determinata a sviluppare forme lievi o severe di malattia.

Livelli più elevati di MCP-1, sostenuti dal polimorfismo -2518 A/G, costituirebbero pertanto un prezioso marker prognostico di severità, consentendo di discriminare pazienti ad alto o basso rischio nei confronti di un decorso clinico severo della malattia.

1.3b – IL RUOLO DI MCP1 NELLA PANCREATITE CRONICA

Come descritto nel capitolo riguardante la pancreatite cronica, la fibrosi parenchimale è uno degli aspetti morfologici più rilevanti di tale patologia [238].

Tra le diverse citochine, MCP-1 in particolare svolge un ruolo fondamentale nell'innescare e far progredire la fibrosi pancreatica, in analogia con quanto già descritto a livello epatico [239] e polmonare [240].

MCP-1, rilasciata dalle cellule acinari, dalle cellule duttali, e dall'endotelio vascolare a seguito di un danno d'organo, recluta dal torrente circolatorio T-linfociti, mast-cellule e monociti [225], promuovendone l'attivazione [226]. I monociti, una volta attivati, sintetizzano una vasta gamma di mediatori dell'infiammazione, quali IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 1 e PDGF che, sinergicamente a quelli rilasciati dal tessuto pancreatico, agiscono sulle cellule stellate pancreatiche (PSC) determinandone la trasformazione a miofibroblasti.

Tali cellule, come precedentemente spiegato, sono in grado di proliferare, sintetizzare collagene ed altre proteine della matrice extracellulare, innescando la fibrosi dell'organo.

MCP-1 agirebbe pertanto come fattore pre-fibrogenico [241]

I monociti reclutati, oltre ai mediatori citati, producono a loro volta MCP-1, amplificando la risposta infiammatoria [242].

Il ruolo cruciale di MCP-1 nella pancreatite cronica è stato confermato dallo studio di Zhao e colleghi.

Gli autori hanno indagato gli effetti della neutralizzazione di MCP-1 nella pancreatite cronica sperimentale del ratto, utilizzando una forma mutata di chemochina (mMCP-1), che agisce da antagonista nei confronti di MCP-1, contrastandone gli effetti biologici.

La terapia genica anti-MCP-1 ha portato ad un miglioramento delle lesioni pancreatiche, ad una conservazione della funzione esocrina dell'organo, ad una riduzione della flogosi e della fibrosi del 50%, grazie ad un minor sequestro tissutale di monociti e ad una minor attivazione delle PSC.

Anche l'espressione intrapancreatica dell'mRNA di TGF- β , di PDGF, di IL-1 β e di IL-6 risultava significativamente ridotta.

MCP-1 contribuirebbe pertanto in modo determinante alla progressione della pancreatite cronica: contrastare la sua azione potrebbe arrestare lo sviluppo della fibrosi pancreatica [243].

L'osservazione infine che le PSC sono in grado a loro volta di rilasciare MCP-1 su stimolo di IL-1 β [244], pone tale chemochina al centro di un circuito flogosi-fibrosi in grado di mantenersi autonomamente [242].

Un ulteriore meccanismo attraverso cui MCP-1 contribuisce alla fibrosi dei tessuti danneggiati è rappresentato dalla induzione dell'angiogenesi [243], che è uno degli aspetti fondamentali del processo di riparazione tissutale

Il polimorfismo -2518 A/G

Nonostante gli studi a sostegno dell'importanza di MCP-1 nella patogenesi della fibrosi pancreatica, Sass e colleghi [244] non hanno riscontrato alcuna associazione tra la pancreatite cronica ed il polimorfismo -2518 A/G del gene di MCP-1, descritto per la prima volta da Rovin e colleghi [231], responsabile di un incremento dell'attività sintetica di tale chemochina. La mancanza di una differenza statisticamente significativa della frequenza dell'allele G nei pazienti affetti da pancreatite cronica rispetto ai soggetti sani di controllo suggerirebbe che tale polimorfismo non costituisca un elemento di suscettibilità genetica nei confronti della malattia [244].

1.4 - GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE Theta 1

Tra i geni indagati per la predisposizione allo sviluppo di patologia infiammatoria del pancreas, è stato recentemente suggerito come la Glutathione-S-Transferasi Theta (GSTT1) possa rivestire un ruolo importante nella patogenesi di malattia. GSTT1 è una delle molteplici proteine ad azione anti-ossidante che inattiva i radicali liberi dell'ossigeno attraverso reazioni di ossido-riduzione, utilizzando come substrato il glutathione ridotto (GSH), che viene quindi consumato. Essa fa parte di una famiglia di proteine dimeriche ad azione antiossidante, di cui oggi conosciamo differenti classi distinguibili per struttura e specificità di substrato: Alpha, Mu, Pi, Theta.

Della forma Theta sono note due isoforme, GSTT-1 e GSTT-2, ed il gene codificante è situato sul cromosoma 22q11.2. L'interesse per GSTT1 è legato alla peculiare distribuzione tissutale di questa sottoclasse all'interno delle cellule acinose, ove le altre forme sono solo debolmente espresse o assenti [245]. La sua espressione ha, inizialmente, un effetto protettivo che si esplica nella riduzione dello stress ossidativo; tuttavia GSTT1 necessita per la sua attività di grandi quantità di glutathione, comportando un rapido consumo dello stesso e conseguente paradossale aumento dello stress ossidativo. Il gene di GSTT1 è deletato in una percentuale della popolazione variabile dal 16 al 38% secondo i diversi studi [245-246]; la delezione può presentarsi in omozigosi con assenza di trascrizione, oppure su un solo cromosoma comportando espressione e funzione ridotte. La presenza o assenza del gene corrisponde, rispettivamente, al fenotipo coniugatore (GSTT1*A) o non-coniugatore (GSTT1-null) [246]. Alcuni studi hanno rilevato un'associazione tra il fenotipo coniugatore e la pancreatite acuta, correlando l'espressione dell'enzima con la severità di malattia in modo dose dipendente [247]. Nei pazienti GSTT1*A si è evidenziato un maggiore consumo di glutathione ridotto (rilevato come concentrazione eritrocitaria dello stesso) che si accresce ulteriormente nelle forme severe rispetto alle lievi. La dose-dipendenza comporta un'incrementata deplezione di GSH nelle cellule in cui la delezione è assente (GSTT1*A/GSTT1*A) e che hanno,

pertanto, una elevata espressione dell'enzima se paragonate a quelle con espressione bassa (GSTT1*A/GSTT1-null) o assente (GSTT1-null/ GSTT1-null)[247].

1.5 - CENNI DI FISIOLOGIA DELL'INTESTINO

Intestino tenue

Le funzioni principali dell'intestino tenue sono la digestione e l'assorbimento degli alimenti, il trasporto dei residui alimentari fino all'intestino crasso e la produzione di sostanze di natura ormonale.

Queste funzioni sono rese possibili da tre attività principali:

- 1) attività motoria;
- 2) attività digestiva e di assorbimento;
- 3) attività endocrina.

Attività motoria

Caratterizzata da:

- movimenti di segmentazione: efficaci nel mescolare il chimo con le secrezioni digestive e permettere il contatto con la superficie mucosa;
- movimenti peristaltici: favorevoli la progressione del contenuto intestinale in senso aborale.

Il transito è regolato dalla valvola ileocecale, la cui apertura avviene in corrispondenza dell'arrivo dell'onda peristaltica; esso ha una durata di circa quattro ore.

Notevole importanza rivestono i riflessi enteroenterici:

- riflesso gastroileale: la distensione gastrica stimola la peristalsi ileale e l'apertura della valvola ileocecale;
- riflesso inibitorio digiunogastrico: la distensione digiunale provoca l'inibizione dello svuotamento gastrico;

- riflesso inibitorio intestino-intestinale: la distensione di un segmento intestinale inibisce la motilità dei segmenti adiacenti.

L'attività motoria è regolata dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico, che rispettivamente inibiscono e stimolano la peristalsi, ai quali si aggiunge il controllo del sistema nervoso enterico, capace di liberare sostanze localmente attive(istamina, serotonina, prostaglandine...)[22].

Attività digestiva e di assorbimento

Il chimo, prodotto di una primaria digestione gastrica, subisce nel tenue due fasi di trattamento:

- una fase endoluminale, in cui agiscono gli enzimi idrolitici salivari e pancreatici e i sali biliari;
- una fase parietale, a livello dell'enterocita, nella quale agiscono enzimi specifici sia del brush border sia della membrana basolaterale.

I meccanismi di assorbimento dei principali nutrienti possono essere così riassunti:

- a) carboidrati: idrolizzati dalle amilasi salivari e pancreatiche a monosaccaridi e disaccaridi; i primi sono assorbiti come tali, i secondi vengono scissi da disaccaridasi dell'enterocita e immessi nel circolo portale[248];
- b) proteine: digerite dalla pepsina gastrica e da enzimi pancreatici (tripsina, chimotripsina, eso- ed endopeptidasi), sono ridotte ad aminoacidi ed oligopeptidi che a loro volta vengono scissi da oligopeptidasi; gli aminoacidi sono trasportati attraverso la membrana luminale e basolaterale per mezzo di meccanismi sia sodio-dipendenti che sodio- indipendenti[249];
- c) grassi: la lipolisi richiede la partecipazione della lipasi pancreatica, della colipasi e dei sali biliari. Tali proteine contribuiscono a formare micelle in grado di veicolare i grassi attraverso l'epitelio fino ai linfatici.

Gli esteriferi del colesterolo vengono idrolizzati prima da un'esterasi pancreatica nel lume intestinale, in seguito da un'esterasi a livello dei microvilli. Il colesterolo libero entra quindi nell'enterocita ed è secreto nei linfatici[250, 251];

- d) vitamine liposolubili: sono contenute nelle miscele di grassi della dieta e subiscono lo stesso destino dei tali sostanze;
- e) acqua e sodio: assorbiti per via transcellulare (attraverso l'enterocita) e per via paracellulare; i due sistemi sono in connessione reciproca; infatti per fare entrare acqua e sodio è necessaria la creazione di un gradiente di soluti ad opera della Na/K ATPasi della membrana basolaterale;
- f) vitamine idrosolubili: tiamina e riboflavina seguono l'acqua per diffusione passiva; l'acido folico è scisso da complessi poliglutammati in cui è ingerito e quindi assorbito; la vitamina B12 è assorbita prevalentemente a livello dell'ileo distale grazie al legame con il fattore intrinseco, secreto dalle cellule parietali gastriche[252];
- g) calcio: presente nella dieta come sale, il suo assorbimento è vitamina D-dipendente; altre proteine all'interno dell'enterocita (proteina legante il calcio e calmodulina) regolano tale processo[253];
- h) ferro: gli enterociti presentano recettori specifici e proteine di trasporto che assorbono ferro, reso solubile dall'acidità gastrica; tale processo è maggiore nel duodeno-digiuno rispetto all'ileo[254].

Attività endocrina

Lungo tutto il tenue troviamo cellule endocrine intercalate agli enterociti; queste producono diverse sostanze in risposta a stimoli rappresentati dal chimo acido e dai prodotti della digestione. Tra le principali sostanze prodotte citiamo:

- le enterochinasi, attivatrici del tripsinogeno pancreatico;
- la colecistochinina (CCK) e la secretina, che rispettivamente stimolano la secrezione degli enzimi e della componente acquosa da parte del pancreas; la CCK favorisce inoltre la contrazione della colecisti;
- la gastrina, importante stimolo per la secrezione acida gastrica;

- la motilina, il polipeptide pancreatico, il VIP, la bombesina, ormoni regolatori della secrezione e della motilità gastrica ed intestinale.

Intestino crasso

Le principali funzioni dell'intestino crasso sono la conservazione del contenuto idrico e salino e il contenimento ed espulsione delle feci e sono garantite da attività assorbente, secretoria, motoria.

Attività assorbente

il colon assorbe più del 90% di acqua ed elettroliti che arrivano dall'ileo. Le vie di assorbimento sono due:

- transcellulare, attraverso porocanali (trasporto passivo) o attraverso carrier specifici (trasporto facilitato);
- paracellulare, attraverso le tight junctions.

Il primo motore dell'assorbimento è dato dalla pompa del sodio a livello della membrana basolaterale: questa secerne sodio dall'enterocita verso l'interstizio, favorisce l'ingresso di sodio dal lume e genera un gradiente elettrico lumenale di riassorbimento di anioni; l'acqua viene assorbita passivamente seguendo i soluti.

Ricordiamo inoltre che l'abbondante flora batterica del colon provvede alla decomposizione dei residui glucidici e proteici e partecipa nella sintesi e assorbimento di vitamine B e K.

Attività secretoria

Le secrezioni del colon sono inferiori, per volume, rispetto a quelle del tenue, ma più ricche di muco, prodotto dalle cellule caliciformi. La componente acquosa è ricca di bicarbonato e potassio. Lo stimolo secretivo è determinato dalla stimolazione meccanica del materiale in transito e dall'attività del sistema parasimpatico, mentre è inibito dal sistema simpatico.

Attività motoria

I movimenti del colon possono essere suddivisi in:

- movimenti non propulsivi, ovvero contrazioni segmentarie (austrazioni) che suddividono il colon in segmenti adiacenti al fine di rimescolare il contenuto intestinale e favorire l'assorbimento;
- movimenti propulsivi o di massa, che si verificano da una a tre volte al giorno e hanno la funzione di sospingere il contenuto intestinale in senso aborale;
- movimenti antipropulsivi, tipici delle regioni prossimali del colon, il cui compito è quello di trattenere il chimo in quella sede per riassorbire la maggior quota possibile di acqua e sali[22].

Attività immunologica dell'intestino sano

L'attività immunologica della mucosa intestinale costituisce un meccanismo importante visto il carico antigenico a cui il sistema gastroenterico risulta costantemente esposto.

Il sistema immunitario non è in grado di riconoscere prontamente qualsiasi antigene batterico, ma piuttosto focalizza la sua attenzione verso poche strutture altamente conservate, presenti in una grande maggioranza di microrganismi. Questi patterns molecolari associati a patogeni, sono costituiti da lipopolisaccaridi, peptidoglicani, mannani, DNA batterico, RNA e glicani. Sebbene si tratti di molecole distinte, queste presentano alcune caratteristiche comuni:

- sono prodotti dai soli microrganismi patogeni, non dai loro ospiti;
- sono strutture essenziali per la sopravvivenza del patogeno;
- sono solitamente strutture costanti, espresse da intere classi di patogeni[255-256]

Ci sono evidenze emergenti di un dinamico interscambio tra antigeni luminali, epitelio intestinale e tessuto linfoide sub-epiteliale, costituito dalle placche di Peyer. La strategica dislocazione delle cellule epiteliali rende conto della loro funzione come prima linea di difesa nei confronti di antigeni

luminali e consente loro di interagire sia con antigeni del lume sia con le cellule dell'immunità residenti nella lamina propria.

Antigeni intestinali capaci di attraversare l'epitelio vengono riconosciuti da cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi e cellule dendritiche, processati e presentati a cellule T nella lamina propria. Nei soggetti sani le APC e le cellule epiteliali espongono una varietà di recettori per tali agenti e per citochine infiammatorie[257].

Un secondo livello di difesa è costituito dalle placche di Peyer, tessuto linfoide costituito da follicoli linfatici di cellule B alternati ad aree di linfociti T, cellule dendritiche e macrofagi.

Il collegamento tra le placche di Peyer ed il lume intestinale è rappresentato dall'epitelio intestinale, la cui caratteristica principale è data dalla presenza di cellule specializzate M; queste cellule fungono da trasportatori di antigeni proteici verso le cellule dendritiche e i linfociti residenti in tasche subito al di sotto della membrana basale. Le cellule M non esprimono molecole MHC II e possiedono pochi lisosomi sembra pertanto possibile che trasportino l'antigene senza processarlo. Gli antigeni luminali vengono riconosciuti dalle APC con due possibili conseguenze:

- trasduzione del segnale intracellulare TLR- o NOD-mediato, risultante nell'attivazione di NF κ B, nella trascrizione di fattori dell'infiammazione e nell'amplificazione del processo infiammatorio;
- processazione dell'antigene e presentazione a cellule T in associazione ad MHC II e attivazione dei meccanismi dell'immunità umorale e cellulo- mediata[269].

Alla fine di tali processi si giunge all'eliminazione dell'antigene e alla soppressione dell'attività immunitaria mediata da regolatori negativi. Nella mucosa intestinale sana agiscono, infatti, fattori immunosoppressivi, quali il fattore di crescita trasformante β 1(TGF β 1), che induce l'apoptosi delle cellule attivate dell'immunità[270].

Il TGF β 1 lega il proprio recettore di membrana, TGF β RII, dotato di attività tirosin-chinasica; che fosforila e attiva un secondo recettore, TGF β I: entrambi sono necessari per la trasduzione del segnale intracellulare. I due recettori fosforilano i fattori di trascrizione Smad2 e 3 che formano un

complesso eterodimerico con Smad4, entrano nel nucleo e regolano l'attività di geni bersaglio. Il meccanismo molecolare che conduce alla morte apoptotica non è completamente noto e vede probabilmente coinvolta una proteina Daxx, recettore associato alla proteina Fas in grado di mediare l'attivazione di JNK e i meccanismi di morte apoptotica cellulare[271-272]. TGF- β previene inoltre l'attivazione di NF κ B dovuta a TNF- α .

1.6 - PRINCIPALI PROTEINE COINVOLTE NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA INTESTINALE

Toll-like receptors

Il primo recettore appartenente alla famiglia dei “toll-receptors” fu identificato in *Drosophila* come componente coinvolto nella via di segnale che controllava la polarizzazione dell’embrione. Il sequenziamento del gene d’origine rivelò che esso codifica per una proteina transmembrana con un esteso dominio extracellulare ricco in leucine e un dominio intracitoplasmatico molto simile al recettore per IL-1 (IL1-R) dei mammiferi. I due recettori risultavano coinvolti nell’attivazione della via di trasduzione del segnale intracellulare mediata dal fattore di trascrizione nucleare NFκB e nell’induzione della risposta immune ed infiammatoria[258].

Omologhi dei Toll receptors di *Drosophila* sono stati identificati nei mammiferi e sono stati perciò definiti Toll-like receptors (TLRs).

Il primo Toll-like receptor identificato nell’uomo è stato TLR4. La dimostrazione che questo recettore era coinvolto nell’immunità innata ed in particolare nel riconoscimento del lipopolisaccaride batterico giunse quando si evidenziò che la mutazione del gene per tale recettore rendeva una popolazione di topi non responsiva al lipopolisaccaride stesso e così resistente allo shock endotossico[259].

Perchè avvenga il riconoscimento del da parte dei TLRs sono necessarie altre due componenti: CD14, recettore ancorato sulla superficie di macrofagi e cellule B, e la proteina intracellulare MD2, proteina presente sia sulla superficie cellulare in associazione a TLR4 come co-recettore, sia in forma monomerica o tetramerica solubile[260]. Il lipopolisaccaride batterico si lega inizialmente una proteina sierica, la lipopolysaccharide-binding protein (LBP), che lo trasferisce a CD14, il quale a sua volta determina la dimerizzazione del complesso TLR-MD2. Questo interagisce con una

proteina intracellulare adattatrice definita myeloid differentiation factor 88 (MyD88) che attiva una proteina chinasi associata al recettore dell'IL-1 (IRAK).

IRAK è poi fosforilata e accoppiata alla tumor necrosis factor-associated factor (TRAF-6); la conseguente oligomerizzazione di TRAF-6 attiva un membro della famiglia delle proteine chinasi mitogene (MAP3K) che a sua volta conduce all'attivazione delle chinasi dell'inibitore di κ B (IKK1 e IKK2). Tale inibitore (I κ B) è legato ad NF κ B e ne impedisce la funzione. In seguito a fosforilazione I κ B viene degradazione: NF κ B risulta quindi libero di traslocare nel nucleo e favorire la trascrizione di citochine a livello del DNA. A seguito di tale traslocazione si ha il legame a diverse regioni promotrici di geni codificanti per citochine quali IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, complesso maggiore di istocompatibilità, molecole di adesione di tipo 1 e ossido nitrico sintetasi con meccanismo simile a quello indicato in precedenza per l'attivazione, NF κ B dipendente, di MCP1 [261-263] (Tab.8)

NOD1 e NOD2

Sono proteine citosoliche appartenenti alla famiglia dei Nod-like receptor (NLR), rappresentanti la controparte intracellulare dei TLR; risultano costituite da tre regioni funzionali:

- la regione C terminale, contenente un dominio ricco di leucine (Leucine Rich Repeat, LRR) e importante nell'interazione tra proteine;
- la regione centrale, costituita da un Nucleotide-binding Oligomerisation Domain (NOD) coinvolto nell'auto oligomerizzazione della proteina;
- la regione N-terminale che può essere caratterizzata da tre diverse strutture: un dominio pirico, regioni CARD (caspase activity recruitment domain) o un dominio BIR (Baculovirus "Inhibitor of apoptosis" Repeat).

NOD2 riconosce il muramildipeptide, molecola correlata con la struttura del peptidoglicano comune a batteri Gram positivi e Gram negativi, NOD1 invece riconosce solo il peptidoglicano contenente acido meso-diaminopimelico, espresso unicamente dai Gram negativi. In seguito al legame con queste strutture NOD1 e NOD2 formano rapidamente strutture oligmeriche e reclutano una proteina chinasi Rip2 (chiamata anche RICK e CARDIAK). Il complesso che si forma attiva a sua volta le chinasi correlate con la proteina inibitrice di NFκB (IκB). La fosforilazione di IκB ne determina la degradazione e la perdita del controllo inibitorio sul fattore di trascrizione nucleare.

NFκB sarebbe quindi in grado di interagire con il DNA, promuovendo la trascrizione dei mediatori dell'infiammazione precedentemente citati, quali citochine infiammatorie e recettori cellulari per le stesse, chemochine, enzimi dell'infiammazione, molecole di adesione.

NOD2 sembra inoltre un promotore indiretto nella produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-10 e TGF-β) indotta dal legame di antigeni con il recettore LTR. Infatti mutazioni di NOD2 sono state associate ad un deficit nel rilascio di IL-10 e TGF-β dalle cellule mononucleate del sangue che si avrebbe normalmente in seguito al legame di antigeni a TLR2, il meccanismo con cui questo processo si verifica, tuttavia, non è stato ancora chiarito[264].

L'attivazione di NOD2 è modulata da "proteine di regolazione della morte cellulare", la chinasi TAK1 e la proteina di membrana basolaterale, erbina. Studi recenti hanno evidenziato che erbina è una proteina regolatrice nella trasduzione del segnale intracellulare NOD-dipendente, in grado di legare NOD attraverso il dominio CARD e di inibire l'attivazione di NFκB e quindi la trascrizione di citochine infiammatorie[265].

Studi sulla funzione della proteina chinasi TGFβ-dipendente (TAK1) hanno evidenziato che la sua partecipazione è richiesta nell'attivazione di NFκB NOD-dipendente. TAK è anche attivata da citochine proinfiammatorie quali IL-1, TNF-α e IL-18 e ciò sta ad indicare quanto sia elevato il grado di interazione tra citochine infiammatorie e recettore NOD.

TAK gioca un doppio ruolo nella risposta infiammatoria: il primo, come regolatore positivo nell'attivazione di NFκB mediato da citochine infiammatorie; il secondo vede TAK agire da regolatore negativo nella via di trasduzione del segnale NOD-mediata[266].

IL-1

IL-1 è una potente citochina coinvolta in diversi processi immunologici ed infiammatori. Queste attività vengono svolte principalmente attraverso l'attivazione di NFκB: la cascata di segnali che termina nell'attivazione di tale fattore prende origine dal legame di IL-1 al suo recettore IL-1R che induce il reclutamento di una proteina accessoria co-fattoriale chiamata IL-1AcP. Il complesso IL-1R/IL-1AcP, attraverso la mediazione di MyD88, lega e fosforila IRAK; tale proteina si associa ad TRAF-6; la conseguente oligomerizzazione attiva MAP3K che a sua volta conduce all'attivazione delle IKK1 e 2. La fosforilazione di IκB comporta la sua degradazione e la liberazione di NFκB, che traslocando nel nucleo favorisce la trascrizione di citochine a livello del DNA [267].

TNFα

TNFα regola l'attivazione della risposta immune derivante da differenti vie di segnale: queste possono condurre a morte apoptotica, attraverso l'attivazione di una via che coinvolge le c-Jun-chinasi (JNK) e le caspasi, oppure al contrario ad un'inibizione della morte cellulare, attraverso una seconda via, che dal recettore di TNF-α conduce, con la mediazione di TRAF e delle IKK, all'attivazione di NFκB i cui geni bersaglio codificano per inibitori di JNK e delle caspasi.

Il gene che codifica per il TNF-α, è situato sul braccio corto del cromosoma 6, ove si localizzano i geni dell'MHC e dista 1.000 paia di basi dal locus HLA-DR e 1.100 dai geni per le linfofosfine-α

(LT- α , precedentemente conosciuta come TNF- β) e β (LT- β), proteine con potenti proprietà citotossiche secrete da linfociti, che condividono gli stessi recettori del TNF e simili meccanismi d'azione.

Il TNF- α è un ormone polipeptidico di 17000 Dalton prodotto principalmente da macrofagi attivati e da un vasto numero di cellule fra cui linfociti e natural killer. Questi elementi cellulari sono stimolati da endotossine, fattori del complemento (anafilotossina C5a), citochine come IL-1, IL-2, IL-6 e dal TNF stesso. In origine il suo peso molecolare è di 26000 Dalton, successivamente viene clivato da una metalloproteinasi detta TACE (enzima convertente il TNF) che produce la proteina matura. Facendo parte della famiglia delle citochine, il TNF- α ha comune con esse molte caratteristiche tra cui il pleiotropismo, la ridondanza, l'azione paracrina ed autocrina.

Nei macrofagi non esiste una forma d'accumulo della molecola, ma essa viene sintetizzata ex novo dopo l'attivazione cellulare. Si è osservata una inibizione quasi totale della sua sintesi conseguente la somministrazione di glucocorticoidi, presumibilmente per una inibizione della trascrizione di RNA messaggero (mRNA) o della traduzione dello stesso, mentre l'interferon- γ sembra possedere effetti opposti.

Il TNF svolge diverse azioni durante il processo flogistico, potendo agire come pro- od anti-infiammatorio in relazione a molteplici variabili; l'effetto biologico di questa citochina dipende infatti, dalla sua concentrazione, durata d'azione, esposizione della cellula bersaglio e dalla presenza di altri mediatori che possano agire in sinergismo o in antagonismo con essa.

In particolare si è osservata una sua azione chemiotattica sui monociti e polimorfonucleati, stimolatrice la fagocitosi e l'adesione cellulare, inducente la produzione di Specie-Ossigeno-Reattive (R.O.S.) ad azione ossidante, come l'anione idrossilico e l'anione superossido e infine una capacità favorente fenomeni coagulativi a livello endoteliale. Questa citochina aumenta anche il numero delle diverse molecole di adesione, coinvolte in più tappe del processo infiammatorio, come: la molecola di adesione intracellulare dei leucociti (ICAM-1), la molecola di adesione leucocitaria endoteliale (ELAM-1), la molecola inducibile di adesione cellulare (INCAMs) e

vascolare (VCAM-1) che intervengono nelle fasi tardive del processo flogistico. Inoltre, ampiamente dimostrata è la sua proprietà inducente l'espressione di antigeni MHC su diversi citotipi, che si traduce in un aumento del numero di cellule presentanti l'antigene (APC). L'aumento nel plasma e nei tessuti della concentrazione del TNF- α , suggerisce un coinvolgimento in parecchie patologie infiammatorie ed autoimmuni.

Agendo come fattore di crescita, il TNF- α stimola direttamente la proliferazione di fibroblasti e cellule mesenchimali, induce la produzione di altre citochine che promuovono la crescita e la proliferazione di cellule e matrice e stimolando il fattore di crescita epidermico, genera fenomeni angiogenici. Sono stati individuati due tipi diversi di recettori per il TNF- α : TNF-R1 con peso molecolare 60 KDa e TNF-R2 di 80 Kda. Entrambi questi recettori sono proteine integrali di membrana, ma dopo processi proteolitici possono, in parte, passare in circolo e, infatti, si possono reperire in modica quantità anche nelle urine. Vi sono evidenze che i recettori 'solubili' in circolo, siano una parte dell'intera proteina presente sulla membrana e precisamente la porzione extracellulare con capacità paradossalmente antagonizzanti il TNF- α sul recettore di membrana. Si è osservato che al TNF-R1 e R2, può legarsi anche la LT- α , promuovendo con questo, la formazione di aggregati linfocitari in regioni di flogosi cronica.

La formazione del complesso TNF-recettore attiva una varietà di vie biochimiche che includono la trasduzione del segnale dalla membrana, ad opera di una proteina-G, la sua amplificazione attuata da una adenilato-ciclastasi, l'attivazione di una fosfolipasi e proteina chinasi con generazione finale di un secondo messaggero. Questa cascata di eventi si traduce in una risposta cellulare cito-specifica[268].

1.7 - MORBO DI CROHN E RETTOCOLITE ULCEROSA

1.7a - DEFINIZIONE

Morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa sono malattie infiammatorie croniche del tratto gastrointestinale.

Nonostante presentino molte caratteristiche patologiche comuni, esse rimangono due differenti malattie, il cui esito finale è il danno a carico della parete del tratto gastroenterico.

Il morbo di Crohn (MC) è un'infiammazione granulomatosa in grado di coinvolgere potenzialmente tutto il tratto gastroenterico, dalla bocca all'ano.

La rettocolite ulcerosa (RCU) è un'affezione cronica caratterizzata da uno stato infiammatorio della mucosa colica che insorge nel retto e può estendersi in maniera continua nel colon fino al cieco; non coinvolge mai altri tratti dell'apparato gastroenterico.

Epidemiologia

L'incidenza delle malattie infiammatorie croniche è in costante aumento dal Secondo dopoguerra in tutto il Nord Europa, nel Regno Unito e negli Stati Uniti: l'incidenza in queste regioni è di circa 7 abitanti/100.000/anno per morbo di Crohn e 11 abitanti/100.000/anno per rettocolite ulcerosa. E' facile intuire quanto le nuove conoscenze mediche e diagnostiche abbiano inciso a tal proposito.

La prevalenza è stata stimata intorno allo 0,4% della popolazione Statunitense e allo 0,5% di quella Canadese.

Si è rilevato un notevole incremento anche in zone fino ad oggi considerate a bassa incidenza (0,5 abitanti/100.000/anno): Sud Europa, Medio Oriente, Asia Orientale, India e America Latina.

Studi condotti sulla eterogenea popolazione Statunitense rendono sempre più evidente il fatto che le malattie infiammatorie croniche non riguardano esclusivamente popolazioni di razza Caucasica, ma interessano anche le popolazioni Sud Americane ed Afro-Americani. Questo mostra quanto complessa sia l'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali nell'insorgenza della patologia[273].

In Italia l'incidenza del morbo di Crohn si aggira intorno a 4/100.000/anno e la prevalenza è di circa 50/100.000 abitanti. Sono colpiti soprattutto giovani tra i 15 e 30 anni d'età e adulti tra i 55 e 65 anni.

L'incidenza della rettocolite ulcerosa è invece di 5-6 abitanti/100.000/anno con due picchi per età d'insorgenza: uno tra i 25-40 anni ed uno intorno ai 70 anni. La prevalenza è di 60-70/100.000 abitanti. Il rapporto tra maschi e femmine varia da 1,1 a 1,8 per morbo di Crohn ed è 1,1 a 1 per rettocolite ulcerosa[274].

Fisiopatologia

Alla base degli eventi fisiopatologici dell'infiammazione sembra essere presente un'inappropriata e persistente attivazione del sistema immunitario della mucosa verso antigeni luminali, chesi instaura in individui geneticamente predisposti, in presenza di una normale flora batterica intestinale[275].

Studi condotti al fine di ricercare i mediatori responsabili dell'infiammazione hanno dimostrato il ruolo chiave delle citochine nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali.

Queste includono citochine prodotte da linfociti Th1, quali IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IFN γ , TNF α e le più recenti scoperte IL-23, IL-32 e TL1A (appartenente alla superfamiglia di TNF), così come citochine antinfiammatorie prodotte da linfociti T di tipo 2, tra le quali citiamo IL-4, IL-10, IL-13 e TGF β . Un'alterata produzione di questi mediatori in risposta ad antigeni luminali sembra alla base del processo infiammatorio ed esistono evidenze che una deficiente, piuttosto che eccessiva risposta

immunitaria, costituisca il processo iniziatore che porta allo sviluppo di una cronica ed esagerata risposta infiammatoria.

Un'altra evidenza, oggi accettata, che descrive il ruolo centrale delle citochine nelle malattie infiammatorie croniche è legata alla polarizzazione Th1/Th2, in favore di una risposta di tipo Th1 nel morbo di Crohn e di tipo Th2 in rettocolite ulcerosa. Studi eseguiti su modelli animali e sull'uomo indicano un ruolo di citochine prevalentemente Th1-dipendenti nella patogenesi del Crohn, anche se è ormai stato accettato che citochine Th2 possono promuovere e mantenere la fase cronica della malattia indotta sperimentalmente. Allo stesso modo, sebbene rettocolite ulcerosa sia caratterizzata da un pattern citochinico di tipo Th2, l'importanza delle cellule Th1 è stata supportata dalla recente dimostrazione dell'efficacia di anticorpi anti-TNF α nel trattamento di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa[276].

Morbo di Crohn

Aumentata permeabilità dell'epitelio intestinale

Recenti studi hanno evidenziato come un' aumentata permeabilità intestinale giochi un ruolo importante in diversi aspetti del morbo di Crohn. Studi su modelli animali hanno infatti dimostrato che l'espressione di caderine transgeniche mutate (molecole coinvolte nell'interazione cellula-cellula) determina un'alterata interazione tra le cellule epiteliali intestinali, la morte apoptotica delle stesse e la formazione di "gap" nella barriera mucosa. In queste cavie lo sviluppo di un processo infiammatorio intestinale si verificava a breve termine.

Nei soggetti sani la barriera mucosa è costituita da un singolo strato di cellule connesse tra loro da giunzioni serrate, necessarie per separare l'ambiente luminale dall'interstizio, mantenere un'adeguata permeabilità di parete e selezionare quali molecole possono attraversarla per via paracellulare. Dette giunzioni sono composte da proteine appartenenti alla famiglia delle claudine e stabilizzate da filamenti intracellulari di actina-miosina. Studi recenti hanno avanzato l'ipotesi che

in soggetti affetti da morbo di Crohn si possa verificare in acuto un'alterazione a carico della permeabilità di barriera: primo motore di tale processo sembra essere il TNF α , in qualità di attivatore di una proteina chinasi della catena leggera della miosina (MLCK). MCLK, fosforilando catene miosiniche, determinerebbe la contrazione del complesso intracellulare actina-miosina, l'allargamento degli spazi paracellulari e l'aumento della permeabilità di parete.

Una seconda citochina sembra coinvolta nell'aumento della permeabilità di parete: IL-13 sembrerebbe svolgere un ruolo importante nel cambiamento di espressione di diverse isoforme di claudine e della loro distribuzione lungo il tratto gastroenterico. E' stato infatti osservato che in soggetti affetti da morbo di Crohn l'espressione di claudina2 è notevolmente aumentata, soprattutto a livello delle cripte, mentre risultano diminuite le isoforme 3, 5 e 8. Questi cambiamenti potrebbero essere coinvolti in un'alterazione della funzione di membrana, con meccanismi ad oggi sconosciuti[277].

L'effetto finale del difetto di barriera consiste in un'aumentata traslocazione di batteri dal lume all'interstizio con una persistente attivazione del processo immunitario ed infiammatorio.

Un ruolo centrale nell'infiammazione nel morbo di Crohn è svolto dai linfociti T CD4 del tipo Th1. L'importanza di queste cellule nel processo infiammatorio è stata suggerita a negli anni Ottanta, quando, in un individuo HIV positivo, fu osservata una prolungata remissione da morbo di Crohn coincidente con la diminuzione delle cellule CD4 [278].

Una delle citochine coinvolte nella differenziazione verso questo sottotipo è IL-12, un eterodimero costituito da una catena p35, subunità strutturale costantemente espressa, e da una subunità inducibile p40. La sua importanza nel mantenere l'infiammazione intestinale fu inizialmente dimostrata dalla capacità di anticorpi anti-IL-12 di abolire una colite in atto in topi da esperimento. (279) In effetti è stata poi riscontrata una maggiore presenza di IL-12 in macrofagi di soggetti affetti da morbo di Crohn rispetto a soggetti normali di controllo.

La risposta delle cellule Th1 dipende dall'espressione di un recettore ad alta affinità per IL-12, composto da due subunità (IL-12R β 1 e IL-12R β 2): entrambe sono necessarie per un'adeguata risposta ad IL-12 e ciò rende ragione della mancata risposta dei Th2 a questa citochina. Le cellule Th2 esprimono infatti la sola subunità IL-12R β 1 mentre la componente responsabile della trasduzione del segnale risiede in IL-12R β 2. Studi eseguiti su tessuto proveniente da soggetti affetti da morbo di Crohn hanno evidenziato una maggior espressione di IL-12R β 2 rispetto alla popolazione di controllo. IL-12R β 2 possiede residui tirosinici che le permettono di interagire con STAT4, appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione cellulari. Questo garantisce la trascrizione di elevati livelli del recettore stesso, mantenendo la polarizzazione Th1 e promuovendo la produzione di grandi quantità di INF γ da parte di queste cellule[280].

Anche IL-18, membro della famiglia delle IL-1, partecipa in sinergia con IL-12 alla mediazione della polarizzazione delle T cellule verso il tipo Th1; trascritti di questa citochina, infatti, sono stati dosati in quantità significativamente maggiore nei pazienti con morbo di Crohn rispetto a soggetti sani o affetti da rettocolite ulcerosa[281].

Toll- Like Receptor

Nei soggetti affetti da morbo di Crohn è stato riscontrato un fenomeno di up-regulation di TLR4 e MD-2 a livello della porzione apicale delle cellule epiteliali e dei macrofagi della lamina propria. INF γ , prodotto dalla popolazione di T linfociti di tipo 1, sembra essere il principale responsabile di tale processo che porta inevitabilmente ad una aumentata responsività immunologica nei confronti di lipopolisaccaridi batterici e ad una costante e persistente infiammazione attiva.

Proteine NOD

Come citato precedentemente NOD2 riconosce il muramildipeptide, molecola correlata con la struttura del peptidoglicano comune a batteri Gram positivi e Gram negativi. Tale proteina, espressa maggiormente da monociti, macrofagi, cellule dendritiche e polimorfonucleati ed identificata anche

in cellule di Paneth, è un recettore intracellulare associato ai TLRs [282]. NOD2 attiva NFκB e promuove processi di trascrizione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, enzimi dell'infiammazione e molecole di adesione[283].

NOD2/CARD15 sembra inoltre un promotore indiretto della produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-10 e TGFβ) indotta dal legame di antigeni con il recettore LTR [284].

La presenza di una proteina di membrana alterata in seguito a mutazioni geniche determina una minore attivazione di NFκB NOD2-dipendente e inadeguata risposta nei confronti di antigeni luminali [285]; Anche i meccanismi promossi indirettamente da NOD2, quali la produzione IL-10 e TGFβ, citochine coinvolte nella regolazione negativa della risposta immunitaria, risultano alterati[284].

E' stato inoltre riscontrato che, nonostante elevati livelli di TGFβ, le cellule T CD4 non vanno incontro ad apoptosi, come fisiologicamente avviene per regolare negativamente la risposta immune. La spiegazione di questo paradosso risiede nel fatto che la via di trasduzione del segnale mediata da Smad2 e 3 viene bloccata da una molecola inibitoria del segnale intracellulare, Smad7 che inibendo la fosforilazione di Smad2 e Smad3 da parte del dominio tirosino-chinasico del recettore per TGFβ, impedisce loro l'interazione con Smad4 e la traslocazione nel nucleo. In questo modo i meccanismi di attivazione della morte apoptotica risultano interrotti[286].

Rettocolite ulcerosa

Una delle caratteristiche istologiche della rettocolite ulcerosa è la massiva ed uniforme presenza di plasmacellule secernenti IgG distribuite nella mucosa intestinale, in contrasto con il morbo di Crohn, dove tali plasmacellule sono state prevalentemente riscontrate intorno alle lesioni ulcerose.

Attraverso metodiche immunoistochimiche è stata dimostrata la presenza di immunoglobuline G1 a livello della mucosa danneggiata. Questi depositi sono risultati co-localizzati con componenti del complemento (C1q, C3b e il complesso terminale d'attacco) a livello delle cellule epiteliali della

mucosa e sembrerebbero riconoscere la tropomiosina, proteina di 40 kD per la quale è stato supposto un ruolo di autoantigene nella rettocolite ulcerosa[287]. Tali evidenze hanno portato a ritenere che la presenza di plasmacellule, probabile conseguenza dell'inflammatione nel morbo di Crohn, potrebbe invece rappresentare il *primum movens* patogenetico nella rettocolite ulcerosa. Questo aspetto patogenetico che accomuna rettocolite ulcerosa a molte altre patologie mediate da autoanticorpi, ha fatto ipotizzare che si tratti di una malattia a patogenesi immunomediata.

Studi di analisi genica sono stati utilizzati al fine di investigare la distribuzione dei cloni di plasmacellule secernenti IgG e IgA nella mucosa e nel plasma. E' stato evidenziato che cloni plasmacellulari produttori IgG espressi a livello della mucosa di pazienti con rettocolite ulcerosa erano ugualmente distribuiti tanto a livello della mucosa stessa quanto all'interno del sangue periferico, in contrasto con quanto avviene nei soggetti sani[288].

Questa considerazione supporta l'idea che la rettocolite ulcerosa possa derivare da una risposta periferica Ig-mediata che risulta espansa a livello della mucosa colica.

Infine l'ipotesi di un coinvolgimento dei linfociti B nella patogenesi di questa malattia, fu avanzata osservando l'effetto protettivo dell'appendicectomia nello sviluppo e nel decorso della rettocolite ulcerosa.

L'appendicectomia prima dei vent'anni protegge dallo sviluppo della malattia ed è stata associata ad un miglioramento della sintomatologia in soggetti con malattia in corso[289].

In supporto a queste evidenze sono stati eseguiti studi in topi e conigli knock-out per il gene TCR α : tali animali sviluppano spontaneamente un'inflammatione intestinale molto simile alla rettocolite ulcerosa mentre l'appendicectomia preventiva riduce significativamente tale rischio. Nel coniglio è noto che l'appendice è sede di maturazione di un repertorio di cellule B e, pertanto, il riscontro che l'appendicectomia in età precocce sopprime lo sviluppo della malattia deve inevitabilmente prendere in considerazione le cellule B nella patogenesi della rettocolite ulcerosa, anche se i meccanismi restano ancora da chiarire[290].

Mentre la fase iniziale dello sviluppo del danno nelle malattie infiammatorie croniche intestinali è differente quella finale è probabilmente comune al morbo di Crohn e alla rettocolite ulcerosa e coinvolge mediatori quali ossido nitrico, prostaglandine, leucotrieni, proteasi rilasciate dai neutrofili e citochine infiammatorie quali TNF α e IL-1 β . Questi mediatori potenziano il processo infiammatorio nonché la distruzione tissutale mentre si verifica un continuo reclutamento di leucociti dal sangue alla sede dell'infiammazione, dipendente dall'espressione di molecole di adesione specifiche sui microvasi e dall'espressione di ligandi sulla superficie delle cellule linfocitarie.

La persistenza di uno stato infiammatorio, conferito dalla resistenza ai normali processi apoptotici innescati da regolatori negativi e dalla costante attivazione dell'NF κ B porta il soggetto allo sviluppo di malattia cronica[291].

1.7b - EZIOLOGIA

L'eziologia di morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa è tutt'oggi sconosciuta.

Fattori ambientali e un genotipo di suscettibilità interagirebbero con il sistema immunitario dell'individuo, generando così una risposta infiammatoria alterata che conduce a danno tissutale[292].

Fattori Ambientali

1) Agenti batterici

E' stato ormai chiarito che la flora intestinale svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo delle malattie infiammatorie croniche intestinali.

Le evidenze più convincenti sono state osservate in alcuni modelli animali: topi mantenuti in condizioni “germ-free” non sviluppavano malattia, mentre è stato rilevato che quest’ultima si ripresentava in seguito all’introduzione anche di un solo antigene batterico[293].

Un supporto a tali evidenze giunge dalla clinica: prima di tutto è stato osservato che le lesioni più frequenti si localizzano a livello di ileo e colon, laddove la carica batterica è maggiore; in secondo luogo si è dimostrata l’efficacia della terapia antibiotica nel trattamento e nella remissione della malattia; da ultimo è stato osservato che in soggetti con diversione del contenuto fecale o colostomia si verificava un notevole miglioramento delle lesioni a valle rispetto alla deviazione ed il numero delle ricadute andava riducendosi fino al ripristino della canalizzazione del contenuto fecale[294].

Inoltre studi condotti sulla popolazione batterica intestinale di soggetti sani e soggetti affetti da morbo di Crohn hanno rivelato una diversità nella quantità e nella qualità della flora popolazione microbica residente: nella mucosa infiammata non solo risiede una maggiore concentrazione microbica luminale, ma è stata rilevata anche la presenza di uno spesso strato batterico disposto sulla superficie epiteliale, tipicamente assente nei soggetti sani[295-296].

Diversi gruppi filogenetici sono stati riscontrati in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa rispetto alla popolazione sana: si tratta di batteri appartenenti ai phyla dei Bactroides e Proteobacteria, in contrasto con membri del phylum dei Firmicutes riscontrati all’interno della mucosa sana[297-298].

Numerosi microrganismi non appartenenti alla flora intestinale sono stati inoltre studiati come possibili responsabili dell’eziologia delle malattie infiammatorie croniche: *Mycobacterium Avium* subspecies *Paratuberculosis*, specie di *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Coxiella*, *Listeria Monocytogenes*, Streptococchi, *Escherichia Coli*, *Yersinia Pseudotuberculosis*, *Saccharomyces Cerevisiae* ma nessuno di essi ha dato esiti convincenti[299].

2) Fumo

Il fumo di sigaretta produce una grande quantità di sostanze, tra le quali si attribuisce alla nicotina il ruolo principale. Questa sostanza agisce provocando un' aumentata produzione di muco rettale e diminuendo la produzione di eicosanoidi e prostaglandina E2 [300], diminuendo l'attività delle cellule natural killer, riducendo la capacità di adesione e chemiotassi dei neutrofili e diminuendo la sintesi di citochine infiammatorie. La nicotina presenta infine effetti di riduzione del flusso ematico viscerale che potrebbe contribuire ad uno stato di ipercoagulabilità, con peggioramento dei fenomeni vasculitici a livello dei piccoli vasi[301].

Un recente studio di meta-analisi è stato eseguito al fine di stabilire una correlazione fumo-IBD: i dati sono stati consultati all'interno di database, includenti MEDLINE ed EMBASE, a partire dal gennaio 1980 fino al gennaio 2006. Sono stati considerati tredici studi sulla correlazione fumo-RCU e questi hanno confermato il ruolo protettivo del fumo nei confronti della patologia, tanto che lo stato di non fumatore costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di RCU (rischio relativo = 0,7); è stato inoltre rilevato un significativo aumento del rischio in soggetti ex fumatori, per i quali esiste una correlazione dose-risposta: più elevato è stato il consumo di nicotina in passato, maggiore sarebbe il rischio di sviluppare rettocolite ulcerosa da ex fumatore, rispetto a chi in passato non ha mai fumato[302-303].

Nove studi di correlazione fumo-morbo di Crohn hanno invece rivelato che il fumo di sigaretta raddoppia il rischio di sviluppare malattia, maggiore per chi fuma da più tempo e in chi consuma superiori quantità di nicotina; non esistono univoche indicazioni sulla persistenza dell'elevato rischio in soggetti ex fumatori anche se alcuni dati suggerirebbero l'omologazione del rischio con quello dei non fumatori in 2-4 anni.

Nei pazienti fumatori affetti da morbo di Crohn, diverse evidenze indicano come la persistenza dello status di fumatore si associ ad un decorso più severo di malattia, richiedendo un uso più

frequente di immunosoppressori e favorendo un elevato livello di recidiva e riacutizzazione; tale tendenza si inverte dopo la sospensione del fumo di sigaretta[304].

3) Appendicectomia

L'appendicectomia sembra costituire un fattore protettivo nei confronti della rettocolite ulcerosa mentre è ancora dubbio tale ruolo nel morbo di Crohn.

Un'anamnesi positiva per appendicectomia è rara in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa. Diversi studi hanno evidenziato che il rischio di sviluppare malattia in soggetti appendicectomizzati per appendicite acuta o per linfadenite mesenterica è notevolmente diminuito rispetto alla popolazione di controllo (Odd Ratio = 0,58); E' stata dimostrata inoltre una correlazione inversa tra l'età dell'intervento per appendicite acuta e il basso rischio di sviluppare malattia: l'effetto protettivo è conferito in modo evidente in soggetti appendicectomizzati prima dei vent'anni. Se l'appendicectomia è stata però eseguita per il trattamento di dolore addominale non specificato, il rischio rimane molto simile a quello della popolazione di controllo (Odd Ratio = 1,06) [305].

4) Farmaci

Il consumo di farmaci è stato spesso indicato come concausa di malattia infiammatoria cronica intestinale, o come responsabile di un peggioramento del decorso della stessa. Sono noti da alcuni anni casi di esordio di colite acuta o riattivazione in soggetti con malattia quiescente, in seguito all'assunzione di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS); il meccanismo con il quale questi farmaci determinano un'esacerbazione del processo infiammatorio in queste malattie è tutt'altro che chiarito, ma è stato ipotizzato che si venga a creare uno squilibrio tra citochine ed enzimi dell'infiammazione a causa dell'azione inibitoria dei FANS sulla ciclo-ossigenasi [306].

A conferma delle molte singole segnalazioni è sopraggiunto uno studio prospettico caso-controllo nel quale si associa una forte relazione tra consumo di FANS e ricoveri ospedalieri per riacutizzazione di preesistente malattia infiammatoria cronica. Il rischio di sviluppare malattia acuta è stato calcolato tra il doppio e il triplo rispetto ad una popolazione di controllo non in terapia con tali farmaci[307].

Uno studio di metanalisi basato sulla ricerca nel database MEDLINE dal 1975 all'ottobre 1993 è stato condotto al fine di correlare l'uso di contraccettivi orali con il rischio di sviluppare malattie infiammatorie croniche: i risultati provenienti da sette studi caso-controllo hanno evidenziato un rischio aumentato di sviluppo o di riacutizzazione di malattia in seguito a terapia con tali farmaci (Odd Ratio = 1,44 per MC e 1,29 per RCU). Tale evidenza è provata in particolare per il morbo di Crohn, mentre rimane dubbia per rettocolite ulcerosa [308].

5) Dieta

Nessuna chiarezza riguardo la correlazione tra dieta e malattie infiammatorie croniche è ancora stata fatta nonostante i numerosi studi effettuati.

L'aumento di malattie infiammatorie croniche segue un andamento simile all'aumentato consumo di acidi grassi; meriterebbe un cenno l'associazione non trascurabile tra morbo di Crohn e l'abitudine di nutrirsi con cibi da fast-food: tale abitudine voluttuaria si assocerebbe infatti ad un rischio più che triplicato di sviluppare malattie infiammatorie croniche. È stata avanzata l'ipotesi che l'eccessiva introduzione di acidi grassi mono- e poli-insaturi aumenti la disponibilità di acido arachidonico a livello delle membrane cellulari. Essendo quest'ultimo un'importante precursore per la sintesi di prostaglandine, potrebbe favorirne l'aumentata produzione ed amplificare il danno ossidativo a livello delle membrane mediato da queste sostanze[309].

Fattori Genetici

L'aggregazione familiare osservata nelle malattie infiammatorie croniche intestinali e studi su gemelli monozigoti e dizigoti ha fatto ipotizzare che queste siano il risultato di una predisposizione genetica[310].

Le malattie infiammatorie croniche intestinali non sottostanno ad una ereditarietà di tipo mendeliano, bensì ad un'interazione complessa da parte di molti fattori di rischio genetici, ciascuno dei quali comporta un modesto contributo individuale. Studi di linkage sull'intero genoma hanno identificato i possibili loci candidati, denominati loci "IBD" (da Inflammatory Bowel Disease), a cui è stata assegnata una numerazione progressiva. Tra i loci che fino ad oggi hanno ricevuto maggiori conferme rientrano il locus IBD1, corrispondente al gene NOD2/CARD15 sul braccio corto del cromosoma 16, il locus IBD5 contenente il gene OCTN, il locus IBD3, corrispondente alla regione HLA, e il locus IBD10, corrispondente al gene DLG5.

Il primo gene oggetto di studio è stato NOD2/CARD15, il cui ruolo è stato proposto nel 2001, quando Hugot et al. mostrarono la presenza di una correlazione significativa tra mutazioni a carico di tale gene e la suscettibilità allo sviluppo della malattia[311].

Studi di linkage sul genoma di famiglie con diversi soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali hanno messo in evidenza diversi loci di suscettibilità [312]; tra questi spicca il locus IBD1, localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma 16 e corrispondente al gene NOD2/CARD15 [311].

NOD2/CARD15, inizialmente denominato NOD2, perché analogo di NOD1, e successivamente riclassificato come CARD15, per la presenza nella proteina codificata di due gruppi CARD (caspase activity recruitment domain), è un membro della famiglia di geni APAF-1/CED-4^o codifica per una proteina citosolica costituita da tre regioni funzionali:

- la regione C-terminale, contenente un dominio ricco di leucine (Leucine Rich Repeat, LRR) che permette l'interazione tra proteine;

- la regione centrale, costituita da un Nucleotide-binding Oligomerisation Domain (NOD) coinvolto nell'auto oligomerizzazione della proteina;
- la regione N-terminale caratterizzata da due regioni CARD responsabili dell'attivazione di NFκB e dell'induzione dell'apoptosi.

Tale struttura accomuna la proteina NOD2/CARD15 con tutte le proteine CARD conosciute, coinvolte nell'interazione con agenti batterici estranei all'ospite[313].

In effetti tale proteina, espressa maggiormente da monociti, macrofagi, cellule dendritiche e polimorfonucleati ed identificata anche in cellule di Paneth, è un recettore intracellulare in grado di riconoscere muramildipeptide, frazione importante del peptidoglicano batterico[314] e di attivare NFκB promuovendo processi di trascrizione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, enzimi dell'infiammazione e molecole di adesione[315].

Indirettamente NOD2/CARD15 condurrebbe alla produzione di citochine anti-infiammatorie in seguito al legame di antigeni con il recettore LTR [284].

Tre maggiori mutazioni del gene NOD2/CARD15 sono state ritenute responsabili della suscettibilità verso le malattie infiammatorie croniche:

- 1) R702W è caratterizzata da una sostituzione dell'aminoacido Arginina con l'aminoacido Triptofano in posizione 702 della proteina, dovuta alla sostituzione di una citosina con una timina in posizione 2104 del gene;
- 2) G908R, nella quale è presente una sostituzione di una Glicina con Arginina in posizione 908 della proteina dovuta a sostituzione di una guanosina con citosina in posizione 2722 del gene;
- 3) 1007fs, inserzione di una citosina in posizione 3020 dell'esone 11 del gene, risultante in un frameshift nella sequenza di lettura del gene, che causa la formazione di un codone di stop prematuro e quindi una proteina tronca, mancante di almeno 33 aminoacidi [316].

Tali mutazioni provocano una perdita della funzione della proteina, con possibili conseguenze legate alla minore attivazione di NFκB e conseguente persistenza di batteri invasivi nel lume

intestinale (315) oltre ad un'alterata produzione di citochine anti-infiammatorie, quali IL-10 e TGF β , nel processo di regolazione negativa della risposta immunitaria [284].

È stata dimostrata in studi condotti sulla popolazione Caucasica una correlazione significativa tra la presenza di mutazioni di NOD2/CARD15 ed una maggiore suscettibilità ad ammalare di morbo di Crohn. Le tre mutazioni principali sono presenti nel 30-40% dei soggetti con morbo di Crohn e nel 10% o meno dei controlli. La presenza di una mutazione aumenta il rischio di malattia di 2-4 volte, mentre due mutazioni (in omozigosi o in eterozigosi) aumentano il rischio fino a 40 volte [316], ma tali mutazioni risultano praticamente assenti nelle popolazioni Asiatiche ed Africane [317].

Nella popolazione italiana è stata confermata una correlazione significativa tra succitate mutazioni di NOD2/CARD15 e morbo di Crohn, che genera un rischio di sviluppare malattia aumentato di 2-4 volte per i portatori eterozigoti e di 20-40 volte per gli omozigoti.

Nessuna correlazione significativa è stata dimostrata per quanto concerne la rettocolite ulcerosa: infatti tutti gli studi hanno trovato una frequenza delle mutazioni abbastanza simile a quella presente nei controlli escludendone la correlazione. Solo in una casistica italiana è emersa un'aumentata frequenza della mutazione 1007fs rispetto nei pazienti con rettocolite ulcerosa rispetto ai controlli ma con una significatività statistica assolutamente marginale [318-319].

Sono inoltre emerse evidenze che il riscontro di mutazioni di NOD2/CARD15 si associa a particolari caratteristiche cliniche della malattia di Crohn, quali la localizzazione ileale, la manifestazione in età precoce, la tendenza verso la forma stenotomizzante e la maggiore frequenza della necessità di ricorrere a interventi chirurgici addominali[320]. Ampie conferme scientifiche e pochissimi studi negativi, e evidenziano che i pazienti che presentano queste mutazioni hanno più spesso una malattia localizzata a livello dell'ileo. Uno studio di meta-analisi ha stimato per questa associazione un valore di Odd-Ratio di 2.9; tale informazione risulta utile nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie infiammatorie croniche, essendo l'ileo distale un'area ad elevata concentrazione di strutture linfatiche e di carica batterica.

Esistono inoltre sempre maggiori evidenze di un'associazione statisticamente significativa tra la presenza di mutazioni di NOD2/CARD15 e la manifestazione della malattia nella sua forma stenotante (O.R.=2.1) rispetto alle forme infiammatorie o fistolizzanti. Questa suddivisione risente però di alcune limitazioni, quali la difficoltà classificativa nella distinzione tra una forma e altra anche causata dalla modificazione nel tempo delle caratteristiche cliniche che spesso sfumano da una variante all'altra [321].

Uno studio multicentrico italiano, eseguito su casi di morbo di Crohn ad insorgenza sporadica o familiare, ha dimostrato l'associazione di almeno una delle mutazioni principali del gene con una serie di caratteristiche quali l'età d'insorgenza più precoce, un decorso clinico più severo, associato a patologia perianale, e un ricorso alla chirurgia per il trattamento di complicazioni più frequente rispetto a soggetti malati, ma senza le mutazioni in questione.

I valori più elevati di rischio si ottengono quando è presente la mutazione 1007fs o quando sono presenti due alleli in omozigosi di ciascuna delle tre mutazioni o una eterozigosi composta [320].

Lo stesso studio multicentrico ha rivelato che le mutazioni di NOD2/CARD15 sono presenti in una discreta percentuale di familiari sani, in misura significativamente maggiore rispetto ai controlli, ma avendo la malattia una penetranza inferiore al 1% risulta evidente come non tutti i soggetti di una famiglia portatori delle mutazioni sviluppano la patologia. Su circa 600 familiari di primo grado sani, una mutazione è risultata presente in 1/4 dei casi. La percentuale di familiari sani con due mutazioni invece non differisce significativamente rispetto alla popolazione di controllo.

Un secondo gene oggetto studiato si trova nel locus IBD3, nella regione HLA sul braccio corto del cromosoma 6. L'identificazione del gene/i specifico/i implicato nelle malattie infiammatorie croniche è stata frenata dall'elevata densità di polimorfismi nei geni immunoregolatori presenti in tale regione. È stato studiato in particolare l'allele DRB1*0103, riscontrato frequentemente in pazienti con rettocolite ulcerosa ed in particolare in soggetti con malattia più estesa, severa e che richiede maggiore ricorso alla colectomia; non sempre questa associazione è stata confermata in studi successivi [322]. Lo stesso allele è stato descritto con maggiore frequenza nei pazienti con

morbo di Crohn a localizzazione colica, con malattia perianale e manifestazioni extraintestinali. Riguardo alle patologie extraintestinali è stata dimostrata un'associazione tra l'allele DRB1*0103 e le manifestazioni articolari, ed oculari [333].

Va sottolineato però che molte di queste associazioni riportate per IBD3 non sono state replicate negli studi successivi, a dimostrazione della grande eterogeneità genetica sia nei pazienti sia nei controlli.

Un altro potenzialmente coinvolto con le malattie infiammatorie croniche intestinali è quello che codifica per il recettore di IL-1, per il quale alcuni studi hanno dimostrato un'associazione con rettocolite ulcerosa e con lo sviluppo di pouchite dopo interventi chirurgici [334].

E' stata studiata anche un'associazione tra il polimorfismo -308° del TNF α con una più intensa attività infiammatoria, con il rischio di artropatia e con malattia fistolizzante nei pazienti affetti da morbo di Crohn [335].

In conclusione, seppure il locus IBD3 abbia ricevuto numerose conferme della sua implicazione con le malattie infiammatorie croniche, non ci sono al momento dati conclusivi e significativi a causa dell'elevata eterogeneità di quest'area e la conseguente difficoltà di studio della stessa.

Il locus IBD5 sul braccio lungo del cromosoma 5, comprendente la regione cluster per le citochine, sembra più specifico per morbo di Crohn. All'interno di questa regione sono stati sequenziati 11 geni e 16 polimorfismi, nessuno però si è dimostrato un buon candidato dal punto di vista statistico. Alcuni dati preliminari della casistica italiana sembrano dimostrare un effetto sinergico di IBD5 e CARD15 nel morbo di Crohn e in rettocolite ulcerosa nel determinare una malattia più estesa e più aggressiva, ma queste informazioni necessitano di ulteriori conferme [336].

Nella stessa area del locus IBD5 è stato localizzato il gene OCTN, di cui sono note due varianti (OCTN1 e 2). Questo codifica per una proteina di trasporto cationico presente a livello dell'epitelio intestinale e la mutazione 503F ne riduce significativamente la funzione. I dati pubblicati mostrano un'associazione con il morbo di Crohn, con incremento del rischio in caso di omozigosi ed in caso di associazione con mutazioni di NOD2/CARD15 [337].

Un altro gene identificato è DLG5 (così nominato per l'omologia con Drosophila Discs Large Homolog 5) sul cromosoma 10; esso codifica per una guanilato ciclasi, responsabile della trasduzione di segnali intracellulari che esitano nel controllo dell'architettura e dell'integrità epiteliale; essa è espressa da intestino tenue, colon, placenta, muscolo, cuore, fegato e pancreas. Due aplotipi sono stati associati a morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa: SNPG113A e DLG5e26, entrambi determinanti una riduzione funzionale del gene stesso. Per questi geni non sono stati condotti studi di correlazione genotipo-fenotipo e sono necessari studi di conferma su casistiche indipendenti [338].

1.7c - ANATOMIA PATOLOGICA

Morbo di Crohn

Dal punto di vista anatomo-patologico il morbo di Crohn si contraddistingue per l'interessamento trasmurale di tutti gli strati della parete intestinale da parte del processo flogistico, delimitabile per altro in aree ben demarcate. Il processo infiammatorio è solitamente di tipo granulomatoso non-caseoso aspecifico.

Possono comparire granulomi in tutti gli strati della parete intestinale, della mucosa, della sierosa, talvolta reperibili, in corso di intervento chirurgico, come noduli miliari.

Sono inoltre riscontrabili granulomi non caseosi nei linfonodi, a livello mesenterico, peritoneale ed epatico, come conseguenza di una diffusione diretta della patologia, a partenza dall'intestino, per contiguità. Qualsiasi segmento, dalla bocca all'ano, può esserne colpito, ma la malattia interessa generalmente l'ileo terminale e/o il cieco.

Spesso l'aspetto della sierosa è granulare e il tessuto adiposo mesenterico tende di conseguenza ad "avvolgersi" attorno alla parete esterna dell'intestino (*creeping fat*). La parete intestinale appare gommosa ed ispessita in conseguenza dell'edema, della flogosi e della fibrosi, condizioni che possono provocare il restringimento del lume intestinale con la formazione di stenosi ed eventualmente ostruzioni.

Il morbo di Crohn è caratterizzato dalla presenza di *skip lesion*, cioè aree di mucosa coinvolte dal processo infiammatorio alternate a segmenti intestinali microscopicamente indenni. Nel morbo di Crohn compaiono due diversi tipi di ulcere: la prima è lineare o serpiginosa, e si estende lungo o attraverso la mucosa intestinale. Tali ulcere possono confluire tra di loro, circoscrivendo isole di mucosa "normale" e conferendo ad essa, in tal modo, il tipico aspetto ad "acciottolato", rilevabile radiologicamente e microscopicamente.

Il secondo tipo di ulcera è quella aftoide: ulcere di dimensioni inferiori (generalmente del diametro di 1-2mm), che si sviluppano al di sopra dei follicoli linfatici. Le ulcere aftoidi si manifestano come lesioni "a capocchia di spillo" nel contesto di un intestino apparentemente sano.

I pazienti affetti da morbo di Crohn sviluppano spesso delle fissurazioni della parete intestinale, delle lesioni penetranti che derivano probabilmente dalle ulcere aftoidi. Tali fissurazioni possono interessare l'intero spessore della parete intestinale e formare dei tragitti fistolosi con altre parti dell'intestino o di altri visceri (ad esempio la vescica, la vagina, gli ureteri o altri organi).

La lesione più precoce del morbo di Crohn è l'infiltrazione neutrofila focale dell'epitelio delle cripte, soprattutto in corrispondenza della mucosa sovrastante gli aggregati linfoidi, con la formazione concomitante di criptici e quella conseguente di ascessi criptici; con il passare del tempo, tale processo infiammatorio può evolvere fino a formare un'ulcera aftoide. Nella malattia conclamata è invece presente una flogosi transmurale, con evidenza di un danno infiammatorio cronico della mucosa, di atrofia e di modificazioni metaplastiche dell'epitelio (per esempio la metaplasia delle cellule di Paneth nell'intestino crasso).

Caratteristica della malattia di Crohn è la presenza di granulomi non caseosi nell'ambito della parete intestinale o dei linfonodi regionali.

L'esito finale del processo infiammatorio è costituito dalla flogosi transmurale che determina la fibrosi e la formazione di stenosi.

Rettocolite Ulcerosa

La rettocolite ulcerosa si caratterizza dal punto di vista anatomo-patologico per la presenza di una mucosa arrossata, granulare e friabile; nei casi severi possono essere presenti ulcerazioni estese confluenti.

La flogosi è confinata prevalentemente alla mucosa; la lamina propria diviene edematosa e i capillari, dilatati e congesti, presentano spesso stravasi ematici. È presente un infiltrato infiammatorio di neutrofili, plasmacellule, macrofagi e linfociti; nei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa sono inoltre presenti, in numero maggiormente elevato, eosinofili e mastociti. Nella malattia attiva in fase precoce, il rivestimento epiteliale delle cripte appare infiltrato da neutrofili che formano ascessi; queste criptici si associano al rilascio di muco da parte delle cellule caliciformi, e ad un incremento del turnover delle cellule epiteliali.

Istologicamente si osserva una riduzione nel numero delle cellule caliciformi, con un viraggio cellulare verso una colorazione maggiormente basofila, indice della presenza di cellule giovani e immature.

L'incremento delle plasmacellule a livello della lamina propria è seguito da modificazioni della distribuzione isotipica; predominano le cellule IgA, ma l'aumento più marcato riguarda le cellule IgG, e in modo minore le cellule IgM. L'incremento di IgG è fondamentalmente legato all'aumento delle IgG1 e 3, a differenza della malattia di Crohn dove si associa all'aumento delle IgG2. Molte

delle caratteristiche sopra menzionate sono aspecifiche, e il quadro può essere confuso con quello di una colite acuta auto-limitantesi.

Tra le caratteristiche specifiche che possono essere d'aiuto per diagnosticare la rettocolite ulcerosa vi sono la presenza di distorsione delle cripte, l'atrofia delle stesse, l'incremento dello spazio intercriptico a meno di 6 cripte/mm, l'irregolarità della superficie della mucosa, gli aggregati linfoidi basali e un'infiltrato infiammatorio cronico; tali caratteristiche sono diagnostiche di colite ulcerosa con una probabilità pari all'80%.

All'aumentare del grado di flogosi, le cellule dell'epitelio di superficie si appiattiscono, fino a formare delle ulcerazioni che possono divenire profonde e sottominare l'epitelio circostante. In questo stadio, vi è generalmente un certo grado di flogosi e di congestione vasale a livello della sottomucosa.

Nelle fasi di remissione della patologia l'aspetto istologico può essere del tutto normale, soprattutto in seguito ad un episodio di lieve entità. Vi è l'aspetto tipico di un'alterazione dell'architettura delle cripte, o di un'effettiva riduzione ghiandolare; tra le altre modificazioni, vi è la presenza di ghiandole bifide e accorciate che non arrivano alla muscolaris mucosa. È stato dimostrato che se, nonostante la presenza di una remissione clinica, esiste l'evidenza persistente di un quadro infiammatorio acuto, i soggetti sono a rischio elevato di recidiva di malattia. Tra le altre modificazioni istopatologiche osservate di frequente vi sono l'ipertrofia neuronale l'iperplasia fibro-muscolare della muscolaris mucosa.

Possono altresì formarsi degli pseudopolipi di tipo infiammatorio, lesioni che rappresentano delle proliferazioni di ghiandole distorte e di tessuto di granulazione infiammatorio su uno stroma connettivale sottomucoso. Nonostante la severità dell'infiammazione e delle ulcerazioni della mucosa, la muscolaris propria e la sierosa non sono interessate da alcun processo infiammatorio. Nella malattia di lunga durata, la mucosa appare atrofica con perdita e accorciamento delle cripte; generalmente si osserva una diminuzione del numero delle cellule caliciformi, mentre può essere

presente metaplasia delle cellule di Paneth. La muscolaris mucosa si ispessisce e la lamina propria contiene un numero elevato di cellule di tipo infiammatorio cronico, prevalentemente plasmacellule localizzate in prossimità della base della mucosa.

I pazienti con una rettocolite ulcerosa acuta, emorragica fulminante, possono sviluppare un megacolon tossico, condizione nella quale l'intestino crasso diventa congesto e atonico, portando ad una dilatazione massiva del colon che può determinarne la perforazione.

Se il colon viene asportato chirurgicamente, oltre alle lesioni della mucosa possono essere osservate alcune alterazioni infiammatorie a carico degli strati esterni dell'intestino [339].

1.7d - PRESENTAZIONE CLINICA

Morbo di Crohn

Le modalità di presentazione clinica dipendono dalla sede della malattia.

A) La sede più colpita è l'ileo terminale e i segni e sintomi associati a tale localizzazione sono:

- dolore in fossa iliaca destra, di tipo colico, esacerbato dalla palpazione ed alleviato dall'evacuazione;
- febbre; la febbre elevata suggerisce una riacutizzazione importante o la formazione di un ascesso intraddominale;
- massa infiammatoria palpabile in fossa iliaca destra, a volte tanto estesa da comprimere ureteri e vescica e generare disuria;
- diarrea cronica intermittente, con o senza sangue;
- rettorragie, in caso di lesioni di retto-sigma;
- astenia;

- può essere presente ostruzione intestinale, dovuta all'edema e allo spasmo della parete intestinale nelle fasi iniziali ed acute, alla riduzione progressiva del calibro luminale nelle fasi croniche.
- la formazione di fistole con visceri vicini (vescica, vagina, anse adiacenti) si manifesta con disuria, fecaluria, dispareunia, perdite vaginali fecaloidi; la fistole entero-cutanee seguono piani di minor resistenza e spesso si fanno strada attraverso le cicatrici chirurgiche addominali.

B) L'estensione della malattia alla sede digiunale si associa a perdita di parte della superficie assorbente e si manifesta con steatorrea e malassorbimento: ipoalbuminemia, ipocalcemia, ipomagnesemie, coagulopatie, deficit vitaminici sono una conseguenza di tali processi.

C) I pazienti con prevalente interessamento colico accusano febbre, diarrea, dolore addominale, ematochezia, raramente abbondante quanto nella rettocolite ulcerosa. E' possibile la formazione di stenosi del lume e un terzo dei pazienti presenta fistole e ascessi perianali e/o patologia emorroidaria,

D) Le ben più rare localizzazioni gastro-duodenali conducono a nausea, vomito ed epigastralgia. Nelle fasi più avanzate di malattia prevalgono sintomi da ostruzione gastrica cronica [340].

In relazione al prevalere di uno degli aspetti anatomico-patologici della malattia possiamo classificarla in tre forme cliniche:

- forma infiammatoria, caratterizzata da febbre, sintomi diarroici e legati al malassorbimento;
- forma stenotizzante, nella quale prevale una sintomatologia ostruttiva;
- forma fistolizzante, in cui predomina il quadro della patologia perianale e la fistolizzazione con visceri adiacenti e cute [274].

Rettocolite Ulcerosa

I principali sintomi della rettocolite ulcerosa sono:

- diarrea e proctorragia, caratterizzate dall'emissione di muco e sangue in quantità da moderate a gravi; nelle fasi più avanzate si può assistere all'emissione di pus. Le scariche si verificano più frequentemente di notte e dopo i pasti;
- tenesmo o urgenza con sensazione di evacuazione incompleta;
- dolore: descritto come vaga dolenzia ai quadranti addominali inferiori o come lieve dolore crampiforme ai quadranti centrali;
- altri sintomi nelle forma moderata-grave sono: anoressia, nausea, vomito, febbre, calo ponderale;
- i segni obiettivi sono proctalgia e sangue all'esplorazione rettale;
- la malattia complicata da megacolon tossico presenta un quadro di addome acuto e ipertimpanismo diffuso [340].

1.7e - MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI

Entrambe le forme di malattia infiammatoria cronica possono associarsi a manifestazioni extraintestinali ed è stata descritta un'ampia varietà di disturbi, relativi praticamente ad ogni apparato.

Le manifestazioni extraintestinali delle malattie infiammatorie croniche intestinali sono grossolanamente classificabili in tre gruppi: il primo comprende le alterazioni riguardanti la cute, gli occhi, le articolazioni e la bocca. Tali manifestazioni riguardano generalmente soggetti affetti da

patologia colica, e l'attività di tali disturbi segue di pari passo quella della patologia intestinale sottostante.

Il secondo gruppo comprende le manifestazioni secondarie alle complicanze o all'estensione diretta della patologia intestinale; si verificano solitamente nei soggetti affetti da morbo di Crohn, più che in quelli con rettocolite ulcerosa. Fanno parte di questo gruppo la litiasi renale, l'uropatia ostruttiva, il malassorbimento e la litiasi biliare.

Il terzo gruppo comprende quei disturbi non chiaramente categorizzabili nei due precedenti; tra tali manifestazioni extraintestinali aspecifiche vi sono l'osteoporosi, le epatopatie e l'amiloidosi. Appartengono verosimilmente a questo gruppo anche le complicanze relative ai sistemi vascolare, ematologico, polmonare, cardiaco e neurologico.

Manifestazioni muscolo-scheletriche

I disturbi muscolo-scheletrici comprendono le più comuni manifestazioni extraintestinali osservabili nei soggetti affetti da una malattia infiammatoria cronica intestinale. Tali anomalie sono grossolanamente classificabili in disturbi reumatologici e disturbi del metabolismo osseo.

Disturbi reumatologici

Le manifestazioni reumatologiche associate a malattie infiammatorie croniche intestinali comprendono le artropatie periferiche e quelle assiali. La patogenesi di tali manifestazioni è ignota, ma attualmente si ritiene che possano svolgere un ruolo: la presenza di batteri enterici e l'influenza di fattori genetici. A supporto dell'evidenza di tale ipotesi vi sono le osservazioni effettuate sui topi transgenici HLA-B27 e nei modelli di colite TCR- α mutante, nonché l'identificazione di una cross-reattività tra i batteri intestinali e la cartilagine nei soggetti affetti da morbo di Crohn e artrite.

L'artropatia periferica colpisce dal 5 al 20% dei soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali. Il rischio di sviluppare tale manifestazione aumenta con la gravità della patologia a livello colico e con la presenza di complicazioni quali ascessi, disturbi perineali, eritemi nodosi, stomatiti, uveiti, pioderma gangrenoso.

Le artropatie periferiche associate a malattie infiammatorie croniche intestinali sono state recentemente suddivise in due sottotipi distinti. Il tipo 1 è una artrite pauciarticolare (che colpisce meno di 5 articolazioni), riguardante tipicamente le grosse articolazioni (ginocchia, gomiti, caviglie). Si manifesta generalmente con episodi acuti e auto-limitanti della durata media di 5 settimane. Circa il 20-40% dei pazienti presenta più di un episodio artritico. Questo tipo di artropatia periferica segue generalmente l'attività della patologia intestinale di base ed è associata ad un'incidenza aumentata di eritemi nodosi e di uveiti. Per contro l'artropatia periferica di tipo 2 è poliarticolare (coinvolgendo 5 o più articolazioni) e colpisce generalmente le piccole articolazioni. Si presenta tipicamente con una sintomatologia persistente della durata media di 3 anni ed è generalmente indipendente dall'attività della patologia intestinale.

In generale, nessuno dei 2 tipi comporta deformità articolari permanenti ed entrambi risultano sieronegativi per il fattore reumatoide.

L'artropatia assiale è meno frequente di quella periferica e, a differenza di quest'ultima, non segue l'andamento dell'attività della patologia intestinale.

L'artropatia assiale associata a malattie infiammatorie croniche intestinali può essere distinta in spondilite e in sacro-ileite isolata.

La spondilite anchilosante si verifica nel 5-10% dei pazienti, la maggior parte dei quali è HLA-B27 positivo. La sintomatologia si caratterizza per il dolore in regione dorsale ad insorgenza acuta in giovane età, generalmente associato a rigidità mattutina, o esacerbato dai periodi di riposo. Il decorso è tipicamente progressivo, fino a determinare un danno scheletrico permanente e nelle

situazioni di patologia avanzata può essere rilevato uno squadramento dei corpi vertebrali, associato a proliferazioni ossee ed anchilosi, che prende il nome di “colonna a canna di bambù”.

Sia l’artropatia periferica che l’artropatia assiale rispondono solitamente al trattamento della colite, costituito da riposo, terapia fisica, steroidi, ma anche sulfasalazina, mesalazina, metotrexate, azatioprina [341-342].

Manifestazioni cutanee

Il pioderma gangrenoso è un’ulcerazione cutanea di origine idiopatica, colpisce soprattutto pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e con minore frequenza quelli affetti da morbo di Crohn. Queste lesioni insorgono solitamente a livello degli arti inferiori, spesso sede di un trauma pregresso, ma possono anche comparire sul viso, sul tronco e sugli arti superiori.

Un altro disturbo cutaneo associato a malattie infiammatorie croniche intestinali è l’eritema nodoso: le sue lesioni hanno aspetto di noduli rossi e soffici, che compaiono sulla superficie estensoria delle estremità inferiori. L’eritema nodoso correla bene con l’attività della malattia intestinale e si verifica spesso in associazione a una artrite periferica.

Le lesioni cutanee rispondono generalmente al trattamento della malattia intestinale sottostante.

Manifestazioni oculari

Queste comprendono uveiti, cheratiti, iridocicliti, episcleriti e scleriti.

L’uveite è una complicanza potenzialmente grave, che se non trattata può comportare la perdita del visus, e che spesso si presenta con fotofobia, cefalea, annebbiamento della vista. La sclerite e l’episclerite sono invece di gravità moderata e si presentano con bruciore e prurito oculare [342].

Manifestazioni ematologiche

In una percentuale inferiore all'1% dei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali si manifesta uno stato di ipercoagulabilità ematica con eventi tromboembolici associati.

Manifestazioni epatiche e delle vie biliari

La colangite sclerosante primaria colpisce fino al 7.5% dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, mentre è più rara nel morbo di Crohn. Il colangiocarcinoma si verifica con una frequenza 20-30 volte superiore nei soggetti affetti da rettocolite ulcerosa, rispetto alla popolazione generale, ed è solitamente associato alla colangite sclerosante primaria.

1.7f - DIAGNOSI

La diagnosi di morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa si basa tradizionalmente sulla combinazione di segni e sintomi clinici, avvalorati da indagini endoscopiche, istologiche, radiologiche e sierologiche.

Morbo di Crohn

Le principali alterazioni bioumorali sono l'aumento della VES, della PCR, delle mucoproteine e delle α_2 - e γ -globuline. Nella malattia grave si riscontrano ipoalbuminemia, anemia e leucocitosi. Sono spesso presenti anemia ipocromica o megaloblastica, iposideremia, alterazione dell'equilibrio idro-elettrolitico ed acido-base, aumento della fosfatasi alcalina e del CEA.

Test di malassorbimento e nutrizionali possono rendere conto della severità della patologia.

Gli aspetti endoscopici della malattia di Crohn comprendono assenza di lesione del retto, ulcere aftoidi, fistole, lesioni a salto (skip lesion). Con l'esame endoscopico è possibile prelevare campioni bioptici da una massa o in prossimità di una stenosi o valutare direttamente i difetti di riempimento visualizzati al clisma opaco. L'aspetto endoscopico è scarsamente correlato alla remissione clinica, per cui non è necessario eseguire ripetute colonscopie per monitorare l'attività della malattia [343].

Nel morbo di Crohn gli aspetti radiologici iniziali del piccolo intestino comprendono l'ispessimento delle pliche e le ulcere aftoidi. L'aspetto ad "acciottolato", determinato dalle ulcerazioni longitudinali e trasversali, interessa più frequentemente il piccolo intestino.

Nelle fasi più avanzate si possono riscontrare stenosi, fistole, masse infiammatorie e ascessi. Nelle localizzazioni coliche le caratteristiche macroscopiche iniziali sono rappresentate da piccole ulcere aftoidi, spesso multiple e intervallate da aree di mucosa indenne. Con il progredire della malattia, le ulcere aftoidi diventano più ampie, profonde e occasionalmente sono congiunte ad altre, formando ulcere lineari, serpiginoze e stellate. L'infiammazione trasmurale porta alla riduzione del lume e ad una ridotta distensibilità. Tipica è la tendenza alla formazione di fistole man mano che le ulcere diventano più profonde [344].

La natura segmentaria della malattia di Crohn si traduce nella presenza di ampie aree di intestino normale o dilatato tra i vari segmenti coinvolti.

Gli aspetti principali documentati dalla TAC sono l'ispessimento parietale superiore a 2 centimetri con densità omogenea, l'ispessimento murale del piccolo intestino, la proliferazione gassosa mesenterica, la malattia perianale e l'adenopatia. La TAC consente di evidenziare la presenza di raccolte ascessuali, fistole e tratti sinuosi.

La risonanza magnetica (RMN) può rivelarsi utile nel dimostrare lesioni pelviche ed ascessi ischio-rettali.

L'utilizzo della videocapsula endoscopica ha migliorato la diagnosi di morbo di Crohn per quanto riguarda le affezioni che interessano il solo tratto del piccolo intestino perché permettono di poter visualizzare un "black box" fino a poco tempo fa visibile solo in campo intraoperatorio. Questa

tecnica non è ancora considerata un gold standard, anche perché presenta diverse limitazioni tra le quali la possibilità che la capsula stessa possa rimanere intrappolata a livello di tratti stenotici del tenue mesenteriale [345].

Marker sierologici

Alcuni marker sierologici possono risultare utili nella diagnosi differenziale tra rettocolite ulcerosa e morbo di Crohn o come fattori predittivi del decorso della malattia. Nel siero dei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali possono essere presenti due tipi di anticorpi: gli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) e gli anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA). Un particolare tipo di ANCA con pattern di immunofluorescenza di tipo perinucleare (pANCA) si riscontra nella rettocolite ulcerosa. Gli antigeni diretti verso questi anticorpi non sono stati identificati, ma sono distinti da quelli associati alla vasculite e possono essere un marker di reazione a batteri enterici. La positività per i pANCA si riscontra in circa il 60-70% dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e nel 5-10% dei pazienti affetti da morbo di Crohn.

I pANCA possono consentire l'identificazione di specifici fenotipi di malattia. La sieropositività è spesso associata a pancolite, necessità di interventi chirurgici in fase precoce, pouchite e colangite sclerosante [346].

Gli ASCA riconoscono le sequenze di mannosio nella parete cellulare del Saccharomyces cerevisiae[347].

La positività per gli ASCA si riscontra nel 60-70% dei pazienti affetti da morbo di Crohn, nel 10-15% dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e in oltre il 5% dei controlli senza malattie infiammatorie croniche intestinali. Nella malattia di Crohn la presenza di ASCA si associa alla localizzazione nel piccolo intestino.

Tra gli altri marker sierologici vi sono auto-anticorpi anti-cellule caliciformi, auto-anticorpi pancreatici e un anticorpo contro l'isoforma 5 della tropomiosina riscontrato nelle cellule epiteliali

del colon. Gli anticorpi diretti verso gli antigeni di membrana dei globuli rossi che interagiscono con gli enteropatogeni, possono associarsi all'anemia emolitica nel morbo di Crohn. Nessuno di questi anticorpi è utile nella diagnosi e nel trattamento dei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali.

La calprotectina fecale, una proteina dell'infiammazione, e il suo correlato di ultima scoperta S100A12, sono ricercati sia nelle feci che nel siero di soggetti affetti da morbo di Crohn. In particolare il dosaggio di S100A12 è usato come marker di patologia con una sensibilità del 96% e una specificità del 92%. I suoi valori decrescono in modo concorde rispetto alla PCR in fase di remissione durante la terapia [348].

Gli anticorpi anti-calreticulina sono stati trovati nel siero di pazienti affetti da morbo di Crohn in titolo elevato rispetto alla popolazione sana di controllo. La calreticulina è una proteina solubile legante calcio normalmente legata al reticolo endoplasmatico contenuta in molti tipi di cellule [349].

Può risultare utile inoltre quantificare l'attività clinica e uno degli indici più utilizzati è il Crohn Disease Activity Index (CDAI) che assegna un punteggio a segni e sintomi quali:

- numero di scariche diarroiche giornaliere;
- sintomatologia dolorosa;
- massa addominale palpabile;
- patologie extraintestinali associate,
- anemia;
- peso corporeo;
- giudizio soggettivo delle condizioni generali di salute.

Retocolite Ulcerosa

La malattia in fase attiva è caratterizzata da un aumento degli indici di fase acuta (PCR), del numero delle piastrine e della velocità di eritrosedimentazione (VES), così come da una riduzione dei valori di emoglobina. Nelle forme gravi i livelli di albuminemia scendono piuttosto rapidamente. Può essere presente leucocitosi, ma questo non è un indice specifico di attività della malattia. La proctite o la proctosigmoidite raramente si associano ad un aumento della PCR.

La diagnosi si basa sull'anamnesi e sull'esame clinico del paziente; sono inoltre necessari indagini endoscopiche con valutazione istologica dei prelievi biotici rettali o colici.

La rettosigmoidoscopia va utilizzata per valutare l'attività della malattia e viene effettuata prima di iniziare il trattamento.

Nella rettocolite ulcerosa in fase acuta deve essere eseguito l'esame radiologico diretto dell'addome. Nella malattia grave il profilo colico appare edematoso ed irregolare; possono altresì evidenziarsi ispessimento e dilatazione. La prima variazione radiologica che si osserva all'esame contrastografico con bario nella rettocolite ulcerosa è rappresentata dall'aspetto finemente granuloso della mucosa. Nelle fasi più gravi la mucosa appare ispessita e si osservano ulcere superficiali. Le ulcere scavate possono assumere un aspetto a "bottone di camicia", indicativo di un interessamento più profondo della mucosa. Le austrature possono rimanere normali nella malattia di grado lieve, ma con il progredire dell'attività diventano edematose ed ispessite. La perdita della normale austratura è frequente in pazienti con lunga durata di malattia. Inoltre, il colon appare accorciato e ridotto di calibro. I polipi eventualmente presenti possono essere infiammatori, adenomatosi o carcinomatosi.

Nella rettocolite ulcerosa la TAC riveste un ruolo diagnostico meno importante rispetto all'endoscopia e al clisma opaco. Tuttavia, i reperti caratteristici sono: modesto ispessimento murale, disomogeneità della densità parietale, assenza di ispessimento del piccolo intestino,

proliferazione del grasso mesenterico perirettale e presacrale, aspetto tipico del retto e presenza di adenopatia.

Anche per rettocolite ulcerosa è stato proposto un indice di attività di malattia (Disease Activity Index, DAI) sulla base del numero di evacuazioni giornaliere, della presenza di sangue nelle feci, degli aspetti endoscopici, delle condizioni generali.

Esiste una valida classificazione della gravità secondo Treulove e Witts; che considera parametri quali la temperatura corporea, il numero di evacuazioni al giorno, la frequenza cardiaca, il valore di emoglobina ematica e la VES e che distingue tre gradi di malattia: lieve, moderata, severa [274].

1.7g - COMPLICAZIONI

Morbo di Crohn

Tra le complicazioni più frequenti è bene ricordare:

- ostruzione (40% dei casi di complicazione), risultato della fibrosi post-infiammatoria e dell'ipertrofia muscolare della parete. Ha suscitato particolare interesse la possibile correlazione tra polimorfismi di NOD2/CARD15 e manifestazione della malattia nella sua forma stenotica [350-351].
- emorragia massiva;
- malassorbimento;
- malattia perianale grave;
- peritonite da perforazione (rara) o da rottura di un ascesso intraddominale [340];
- Dati recenti indicano che nei pazienti affetti da morbo di Crohn vi è un'aumento di 2-3 volte del rischio di carcinoma colon-rettale.

L'evidenze suggeriscono che il rischio oncologico nella colite di Crohn diffusa è simile a quello dei soggetti affetti da rettocolite ulcerosa. La displasia del colon pare invece verificarsi con una frequenza inferiore nel morbo di Crohn rispetto a rettocolite ulcerosa. Pertanto, negli individui che hanno la malattia da lungo tempo è consigliato un programma di sorveglianza endoscopica, molto simile a quello attuato per i pazienti affetti da rettocolite ulcerosa [352].

Rettocolite Ulcerosa

- Ostruzione, secondaria alla presenza di stenosi post-infiammatoria.
- Megacolon tossico, definito tale quando il diametro luminale supera i 5-6 centimetri e si visualizza una perdita delle austrature.
- Perforazione: rappresenta una complicazione del megacolon tossico anche se è possibile lo sviluppo di colite tossica con ulcere tanto profonde da perforarsi in assenza di dilatazione.
- Emorragia massiva [340].
- Aumentato rischio di cancro colon-rettale.

Il rischio di sviluppare carcinoma del colon-retto è aumentato di 10-25 volte rispetto ai soggetti non affetti da rettocolite ulcerosa. La maggior parte degli studi ha indicato che tra i fattori di rischio per lo sviluppo di tale neoplasia rientrano in modo importante l'estensione della malattia (pancolite), la sua durata (>10 anni), l'età al momento della diagnosi (età giovanile), l'anamnesi familiare positiva per carcinoma del colon e la presenza di una colangite sclerosante primaria. I soggetti affetti da proctite non presentano un aumentato rischio di sviluppare carcinoma del colon-retto.

Le neoplasie vengono solitamente diagnosticate intorno ai 40-45 anni e non è stata dimostrata una prognosi peggiore per pazienti affetti da rettocolite ulcerosa rispetto alla popolazione sana.

Molti soggetti affetti da rettocolite ulcerosa sono stati pertanto inseriti in programmi di sorveglianza endoscopica che prevede l'effettuazione di colonscopie periodiche con biopsie multiple (almeno 32

effettuate a intervalli di 10cm lungo tutto il colon). La presenza di displasia si è rivelata utile marker pre-canceroso e rappresenta un'indicazione per l'intervento di colectomia.

L'intervallo ottimale tra una colonscopia di controllo e quella successiva non è stato ancora definito con certezza ma molti autori propongono una periodicità compresa tra uno e tre anni.

Nei soggetti affetti da rettocolite ulcerosa, il carcinoma del colon è spesso di difficile identificazione per la tendenza a manifestarsi con lesioni piane o a placca. La presenza di una stenosi in tali pazienti deve evocare il sospetto di neoplasia in quanto il 25% delle stenosi in rettocolite ulcerosa sono di natura neoplastica. Dal punto di vista istologico circa la metà dei casi di cancro colon-rettale è rappresentata dal carcinoma mucinoso, tumore secernente un'abbondante quantità di muco extracellulare che agevola la dissezione della lesione attraverso la muscolaris propria.

Si ritiene che la carcinogenesi del colon, nella colite ulcerosa, sia determinata da episodi sequenziali di mutazioni genetiche somatiche e dalla conseguente espansione clonale [353].

Una percentuale compresa tra il 40 e il 50% dei soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali presenta osteopenia o osteoporosi. Entrambi i disturbi sono stati osservati con maggior frequenza nei soggetti con morbo di Crohn, rispetto a quelli affetti da rettocolite ulcerosa, forse in relazione al malassorbimento di calcio e vitamina D a livello del tenue. Un'altra possibilità è data dal fatto che questi soggetti introducono cronicamente glucocorticoidi, metotrexate e ciclosporina, sostanze che conducono a riduzione della densità minerale ossea.

Uno studio caso-controllo ha rilevato la presenza di minime differenze in termini di massa ossea, presso qualunque sito di rilevazione, in 19 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e 61 con morbo di Crohn, seguiti per un periodo di 568 giorni. E' risultato chiaro come la densità di massa ossea costituisca, se bassa, un fattore di osteoporosi e di fratture, ma che anche soggetti affetti da una malattia infiammatoria cronica intestinale con una densità di massa ossea nella norma possano essere a rischio di frattura a causa di fattori di tipo diverso, se confrontati con un gruppo di controllo di individui sani con la stessa densità di massa ossea.

In entrambe le malattie infiammatorie croniche intestinali si può presentare nefrolitiasi, con una frequenza di compresa tra il 7% e il 10%. I due tipi più frequenti di calcoli sono quelli di acido urico e quelli di ossalato di calcio. Tra i molti fattori coinvolti nella patogenesi della litiasi renale vi sono le anomalie dell'escrezione degli urati, la riduzione dell'assorbimento intestinale di sodio ed acqua, l'ipercalcemia. I calcoli di ossalato di calcio sono conseguenti all'iperossaluria associata ad ileite terminale o ad una resezione ileale. Dal momento che l'assorbimento di ossalati legati al sodio si verifica a livello del colon, è presente un rischio aumentato della formazione di calcoli di ossalato di calcio in soggetti con colon integro. Per contro, soggetti sottoposti ad ileostomia sono maggiormente predisposti alla formazione di calcoli uratici per la frequente condizione di disidratazione.

L'amiloidosi secondaria sistemica è un'altra delle complicazioni delle malattie infiammatorie croniche intestinali presenti da lunga data e si verifica nello 0.9% dei soggetti affetti da morbo di Crohn e nello 0.07% di quelli affetti da rettocolite ulcerosa. In questi soggetti è frequente l'interessamento renale da parte della malattia, con manifestazioni quali proteinuria, seguita da sindrome nefrosica, fino all'insufficienza renale. E' possibile fare diagnosi con una biopsia renale, epatica o rettale, anche se il prelievo del grasso addominale rappresenta il test diagnostico più sensibile per l'identificazione di amiloidosi sistemica di questo tipo.

I pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali presentano frequentemente complicazioni genito-urinarie. L'ostruzione ureterale, solitamente a destra, si verifica prevalentemente nei pazienti con malattia di Crohn dell'ileo terminale, ma è possibile anche l'ostruzione dell'uretere sinistro, soprattutto nelle forme di morbo di Crohn a localizzazione digiunale. In questi soggetti può verificarsi la formazione di fistole tra l'intestino e il tratto genito-urinario a diversi livelli, tra i quali la vescica, l'uretra, la vagina.

Una litiasi biliare può verificarsi nel 34% dei pazienti affetti da morbo di Crohn ileale attivo o con una pregressa resezione ileale; in queste situazioni si assiste ad una riduzione del pool dei sali biliari

con sovra-saturazione del colesterolo; quest'ultimo precipita e consente la formazione di un nucleo colesterolico, con conseguente sviluppo di un calcolo.

L'anemia nei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali ha un'eziologia multifattoriale, potendo derivare ad esempio da perdite ematiche a livello del tratto gastrointestinale; la flogosi o una reazione ileale possono determinare il malassorbimento di vitamina B12, nei soggetti affetti da morbo di Crohn, mentre l'assorbimento del ferro può risultare alterato in quelli con uno stato di flogosi duodenale, e quello dei folati nella flogosi digiunale. Gli individui che presentano una stenosi o una resezione ileocolica sono invece possibili candidati ad una crescita batterica anomala, responsabile da un lato di bassi livelli sierici di vitamina B12, dall'altro di valori di folati nella norma o aumentati per il contributo dato da tali microrganismi nella produzione di folati.

1.7h - TERAPIA

Il trattamento medico delle malattie infiammatorie croniche deve presentare caratteristiche multidimensionali e tener conto della severità della malattia e della sede coinvolta.

I farmaci attualmente più utilizzati sono:

- composti a base di acido 5-aminosalicilico: agiscono bloccando la produzione di prostaglandine e leucotrieni, inibendo la chemiotassi neutrofila, eliminando radicali dell'ossigeno. Sembra siano anche in grado di interferire con l'attivazione di NFκB. Sono utilizzati nelle rettocoliti da lievi a moderate e nel morbo di Crohn.

La via di somministrazione è orale e forme farmaceutiche gastroprotette, incapaci di essere assorbite a livello del tenue, possono essere utili per malattia a localizzazione colica [354]:

- Corticosteroidi: rappresentano un'alternativa ai composti salicilati quando questi ultimi risultano inefficaci. Corticosteroidi topici vengono somministrati in soggetti affetti da

proctite ulcerativa o da rettocolite ulcerativa distale; prednisone o prednisolone per via orale risultano efficaci in forme moderatamente severe di rettocolite ulcerativa, mentre la via intravenosa resta riservata a pazienti ospedalizzati. La terapia con tali farmaci andrebbe condotta solo per il tempo necessario a controllare l'infiammazione in acuto e non oltre, visto il corredo di effetti collaterali legati alla somministrazione prolungata di corticosteroidi [355]

- Immunosoppressori: questi farmaci hanno un ruolo importante in soggetti nei quali non è possibile sospendere la terapia corticosterioidea.

Azatioprina e mercaptopurina, largamente utilizzate in terapia cronica, consentono una riduzione graduale del dosaggio di corticosteroidi e garantiscono remissioni prolungate. Poiché impiegano settimane, a volte qualche mese, prima di dare effetti benefici, non possono essere impiegate nel trattamento della fase acuta [356].

Il metotrexate risulta efficace nel trattamento di morbo di Crohn attivo steroide-dipendente; viene somministrato per via intramuscolare o sottocutanea e gli effetti benefici si manifestano nell'arco di qualche settimana [357]. Recentemente è stato introdotto il suo utilizzo ad alto dosaggio in associazione con terapia corticosterioidea nel trattamento della riacutizzazione del morbo di Crohn ed è stato notato un aumento delle percentuali di pazienti liberi da malattia rispetto a quelli trattati con placebo. Inoltre si è valutata la capacità del metotrexate a basse dosi, di mantenere lo stato di remissione, in confronto al trattamento corticosterioideo: studi eseguiti in tal senso hanno rilevato una riduzione delle recidive in soggetti che assumevano metotrexate a basse dosi rispetto all'uso prolungato di prednisone [358].

Ciclosporina viene utilizzata in pazienti ospedalizzati e che necessitano proctocolectomia urgente; può essere somministrata in aggiunta ad una terapia corticosterioidea eseguita da almeno 7-10 giorni [359].

- Terapie anti-TNF α . Il principale antagonista di tale citochina è l'infliximab, anticorpo monoclonale in grado di neutralizzare il TNF α e di indurre apoptosi in cellule T attivate

esprimenti TNF α di membrana[360]. I suoi effetti sono già stati approvati nel mantenere il paziente in remissione di malattia nei colon non precedentemente fistolizzati. Alcuni mini-trial short-term indicano che l'uso di infliximab può portare a chiusura le fistole coliche nell'arco di 12 settimane circa, senza il ricorso alla terapia chirurgica. Gli ultimi studi approvano il suo utilizzo nel mantenere la chiusura delle fistole per 54 settimane nei pazienti che hanno risposto precedentemente a questo farmaco e che lo hanno continuato ad assumere per le 8 settimane successive [361].

Tra gli antagonisti del TNF α sono in fase di studio anche piccole molecole, quali la talidomide e CNI-1493, le quali sono ancora in attesa di conferme per quanto riguarda l'efficacia [362].

- Antibiotici: si sono rivelati utili in pazienti affetti da morbo di Crohn ma non nella rettocolite ulcerosa. Un esempio è dato dal metronidazolo, efficace nel trattamento di pazienti con fistole perianali. Ciprofloxacina e claritromicina sono valide alternative al metronidazolo [358, 363].
- Natalizumab: è un anticorpo monoclonale anti- α 4-integrina, inibitore della migrazione e adesione dei leucociti presso la mucosa infiammata. Questo farmaco si è dimostrato efficace nella remissione del Crohn solo se somministrato per più di quattro settimane, anche se in una piccola percentuale (10% circa) di pazienti una terapia così prolungata porta a sviluppo di anticorpi anti-natalizumab [364].
- Il fattore stimolante la linea granulo-monocitaria, la sargramostina (GM-CSF), è una sostanza in grado di attivare il sistema dell'immunità innata intestinale con conseguente potenziamento dei meccanismi di difesa della mucosa intestinale. Essa agisce attraverso l'interazione con strutture recettoriali per GM-CSF espresse sulle cellule epiteliali intestinali e su cellule di Paneth. Studi effettuati al fine di rivelare l'efficacia di questo farmaco hanno evidenziato un miglioramento della difesa dell'ospite ed hanno perciò suggerito una capacità di indurre remissione, soprattutto in caso di malattia di Crohn attiva [365].

Vista l'alta incidenza di recidiva post-operatoria il trattamento chirurgico va riservato alle gravi complicazioni (occlusione, peritonite, perforazione, megacolon tossico,etc.) o qualora il trattamento medico non sia in grado di controllare i sintomi della patologia, che provocano un decadimento della qualità della vita [366].

2 - SCOPO DEL LAVORO

Diversi studi recenti sono diretti a chiarire le associazioni tra le patologie umane e i geni che a diverso titolo predispongono alla malattia, ovvero alterano il decorso della stessa. Spesso i geni, pur non essendo l'unica causa della patologia, la differenziano e ne possono determinare la severità.

La multifattorialità delle patologie pancreatiche e coliche richiede lo studio, oltre che di diversi fattori ambientali, anche di una serie piuttosto consistente di geni.

Questo lavoro si pone come scopo quello di valutare le eventuali associazioni tra alcuni geni coinvolti nella patogenesi delle malattie infiammatorie del pancreas e dell'intestino.

Per quanto concerne il pancreas si pone l'accento sul possibile coinvolgimento della proteina chemotattica per i monociti (MCP1) che, visti i suoi effetti pro infiammatori, pare essere associata al grado di severità di pancreatite acuta ma che potrebbe pure predisporre al ripetersi di eventi acuti, quindi alla pancreatite acuta ricorrente, e alla cronicizzazione della patologia esitando in pancreatite cronica.

Visti le recenti pubblicazioni riguardo la Glutatione-S-Transferasi Theta 1, lo studio ha voluto indagare la possibilità che il polimorfismo, che porta alla delezione del gene per tale proteina, possa essere coinvolto nella determinazione del grado di severità della pancreatite acuta.

L'attività pro infiammatoria di MCP1 ha portato ad ipotizzare che il polimorfismo -2518 A/G possa anche essere coinvolto nella eziopatogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali.

Inoltre la scarsità di studi sulla popolazione italiana per quanto concerne l'associazione, ormai definita, tra le mutazioni nel gene per NOD2/CARD15 e le malattie infiammatorie croniche intestinali, ha richiesto la valutazione della presenza di tali mutazioni anche nella popolazione oggetto dello studio allo scopo di meglio comprendere i meccanismi che determinano la patogenesi di tali malattie e la variabilità delle stesse in termini di: varianti, localizzazioni e severità.

3 – PAZIENTI E METODI

3.1 – PAZIENTI E CONTROLLI

Sono stati valutati, previa accettazione del consenso informato, quattrocentotrentuno pazienti consecutivi di origine caucasica con diagnosi di pancreatite acuta, pancreatite acuta ricorrente, pancreatite cronica, morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa afferiti presso gli ambulatori dipartimentali ed il reparto di degenza dell'Unità Operativa di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva di Parma dall'anno 2000 all'anno 2006.

3.1a - Pancreatite acuta

In centodiciotto pazienti la diagnosi di pancreatite acuta è stata definita sulla base di un aumento dei livelli sierici di amilasi e lipasi di almeno tre volte la norma, associato ad evidenza radiologica di malattia ottenuta tramite ecografia e TC con mezzo di contrasto. L'eziologia biliare è stata confermata in presenza di un riscontro radiologico (ecografia addominale e colangio-pancreato-RMN) di colelitiasi.

Il 76,7% dei pazienti presentava pancreatite litiasica mentre i pazienti affetti da pancreatite acuta correlata a cause virali e tumorali sono stati esclusi e nei restanti casi l'evento risultava idiopatico (16%).

La severità degli attacchi è stata definita secondo i criteri di Atlanta: ottantasei pancreatiti acute (72,9%) sono state classificate come lievi e trentadue (27,1%) come severe.

Come mostrato in tabella 8, dei centodiciotto pazienti affetti da pancreatite acuta sessantaquattro erano maschi (54,2%) e cinquantaquattro femmine (45,8%), con un'età media di $65,0 \pm 18,0$ anni.

L'età media di insorgenza della malattia era di $63,2 \pm 17,7$ anni.

Dei settantasette pazienti di cui è stato possibile raccogliere con precisione l'indice di massa corporea (BMI), quarantasette (61%) risultavano in sovrappeso od obesi ($BMI \geq 25$). L'indice medio di massa corporea è risultato di $26,8 \pm 5,0$.

Il 42,4% assumeva abitualmente alcol, con un introito medio di $36,1 \pm 47,4$ grammi/die.

Il 25,4% era fumatore, con un consumo, in media, di $21,9 \pm 9,1$ sigarette/die.

In due dei centodiciotto pazienti reclutati (1,7%) è stata individuata la variante anatomica definita come pancreas divisum.

L'1,7% dei pazienti presentava familiarità per cancro del pancreas, mentre non è stata riscontrata nessuna familiarità per pancreatite cronica. (vedi Tab.9)

3.1b - Pancreatite acuta ricorrente

Lo studio ha considerato sessantaquattro pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente; sono stati inclusi individui colpiti da almeno due episodi di pancreatite acuta, in cui però non erano presenti riscontri radiologici di pancreatite cronica.

Di essi, trentasette erano maschi (57,8%) e ventisette femmine (42,2%), con un'età media di $54,0 \pm 15$ anni ed un'età media alla diagnosi di $41,1 \pm 14,0$ anni.

Il 28,1% era dedito ad un consumo abituale di alcol, mediamente di $60,6 \pm 48,1$ grammi/die, mentre il 25% era fumatore ($24,5 \pm 13,3$ sigarette/die).

Il pancreas divisum è stato riscontrato in cinque dei sessantaquattro pazienti (7,8%).

Nessun paziente aveva invece familiarità per pancreatite cronica o cancro del pancreas.

Non è stato possibile risalire al BMI dei pazienti.

Le caratteristiche dei pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente sono riassunte nella tabella 10.

3.1c - Pancreatite cronica

Centoquarantadue pazienti afferiti al centro sono risultati affetti da pancreatite cronica.

La diagnosi di malattia è stata formulata sulla base dei criteri radiologici di pancreatite cronica (ecografia dell'addome, colangio-pancreato-RMN, TC, ecoendoscopia, ERCP) e dell'eventuale diagnosi istologica.

Seguendo la classificazione di TIGAR-O, i fattori associati alle pancreatiti croniche sono stati: nel 46% dei casi di origine tossica, nel 12% idiopatica, nel 13% genetica, nel 4% autoimmune, nel 10% da esiti di pancreatite acuta o di pancreatiti acute ricorrenti, nel 15% ostruttive.

Come indicato in tabella 11, novantasette pazienti erano maschi (68,3%) e quarantacinque femmine (31,4%), con un'età media di $59,9 \pm 14,8$ anni. L'età media alla diagnosi era di $52,5 \pm 16,6$ anni con una durata media di malattia di $7,4 \pm 15,7$ anni.

Eravamo a conoscenza del BMI di centodiciassette dei centoquarantadue pazienti che è risultato, in media pari a $23,3 \pm 3,2$ e raggiungeva o superava il valore di 25, indicando quindi uno stato di sovrappeso in trentacinque di essi (29,9%).

Il 38,7% dei pazienti assumeva abitualmente alcol, e l'introito medio è stato valutato pari a $89,1 \pm 74,3$ grammi/die. Mentre il 66,9% era fumatore, con consumo medio, di $23,2 \pm 13,9$ sigarette/die.

In sette pazienti (4,9%) è stato riscontrato il pancreas divisum.

Il 4,2% presentava familiarità per pancreatite cronica ed il 4,9% per cancro del pancreas.

3.1d – Morbo di Crohn

Sono stati valutati, previa quarantotto pazienti affetti da morbo di Crohn affetti da rettocolite La diagnosi di malattia è stata formulata attraverso almeno un'evidenza endoscopica ed istologica, eseguita su campioni biotici multipli, avvalorata inoltre dall'indagine radiologica, conseguita attraverso ecografia, tomografia assiale computerizzata (TAC), clisma del tenue. Come mostra la Tab.12 tra i pazienti affetti da morbo di Crohn trenta erano maschi (62,5%) e diciotto femmine (37,5%). L'età media dei pazienti era di $52,4 \pm 17,0$ anni, mentre l'età media di insorgenza della malattia era di $40,8 \pm 17,2$.

Il 12,5% presentava familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali, il 45,8% era fumatore.

Il 39,6% presentava una localizzazione ileale della malattia, il 12,5% una localizzazione colica, il 45,8% una localizzazione ileo-colica ed il 2,1% una localizzazione ileo-colon-rettale. Nessuno dei pazienti presentava localizzazioni in altre sedi del tratto gastroenterico.

Nel 35.4% dei pazienti era stata riscontrata una variante infiammatoria della malattia, nel 41.7% stenosante, nell'8.3% fistolizzante e nel 14.6% coesistevano le varianti stenosante e fistolizzante. Infine il 79.2% dei pazienti presentava risposta alla terapia medica.

Il 50.0% dei pazienti ha dovuto ricorrere a terapia chirurgica correlata alla malattia.

Inoltre il 12.5% presentava manifestazioni extraintestinali; in particolare 4 presentavano manifestazioni articolari, 1 presentava manifestazioni oculari (uveite) e 1 era affetto da eritema nodoso.

3.1d – Rettocolite ulcerosa

La Tab.13 mostra le caratteristiche dei cinquantanove pazienti affetti da rettocolite ulcerosa: di questi trentanove erano maschi (63.9%) e venti femmine (36.1%); l'età media era di 53.0 ± 16.9 anni mentre l'età media d'insorgenza della patologia era di 43.8 ± 14.8 .

Il 4.9% presentava una familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali mentre il 31.1% era fumatore.

Nel 24.6% era stata riscontrata una localizzazione colica della malattia, nel 54.1% una localizzazione a livello di sigma e retto, nel 6.6% nel retto e nel 13.1% in colon, sigma e retto contemporaneamente.

Il 95.1% rispondeva alla terapia medica e il 4.9% dei pazienti ha necessitato di intervento chirurgico correlato alla patologia.

Il 18.0% dei pazienti con RCU presentava manifestazioni extraintestinali e in particolare 6 presentavano manifestazioni articolari, 3 eritema nodoso e 1 cheratite.

3.1e - Popolazione di controllo

Sono stati valutati come popolazione di controllo per le patologie pancreatiche ottantotto volontari sani caucasici mentre per le malattie infiammatorie croniche intestinali ne sono stati valutati solo cinquantasette; in entrambi i casi i soggetti erano compatibili per sesso, età e caratteristiche con le popolazioni oggetto dello studio.

3.2 – MATERIALI E METODI

3.2a - Estrazione di DNA genomico

Circa 50 mg di DNA genomico sono stati estratti da 200 ml di sangue periferico trattato con EDTA, mediante utilizzo di kit commerciale (Generation Capture Column Kit, Genra Systems, Minneapolis, USA). Brevemente, dopo la reazione di lisi cellulare, il DNA veniva adsorbito ad una membrana di silice e successivamente eluito con soluzione di lavaggio mediante centrifugazione.

3.2b – Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione a catena della polimerasi è una metodica che permette di amplificare specifiche sequenze di DNA. Una reazione tipica include il DNA bersaglio, una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi), le due sequenze presenti a ciascuna estremità del frammento che deve essere copiato, definite primers, deossiribonucleosidi trifosfato (dNTPs); inoltre viene aggiunto un tampone per mantenere il pH della reazione ad un livello ottimale per il funzionamento dell'enzima e cloruro di magnesio (MgCl₂), in quanto in assenza di ioni Mg²⁺ la Taq risulta inattiva.

Le componenti della reazione sono poste in un termociclatore che ha la funzione di portare la reazione alle diverse temperature necessarie per l'amplificazione.

Nello studio in esame l'amplificazione del frammento di acido nucleico d'interesse è stata effettuata mediante una reazione di PCR in 25 µl di volume contenenti 500 ng di DNA genomico, 10 mmol/l di tampone Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mmol/l di MgCl₂, 200 mmol/l di ciascun deossinucleoside trifosfato, 0,5 U di DNA-polimerasi Taq (*Thermophilus aquaticus*).

I primers specifici utilizzati sono stati:

Per il polimorfismo di MCP1

- MCP417S 5'- TCTCTGACGCCAGCACTGACC-3' (primer forward),
- MCP650AS 5'- GAGTGTTACATAGGCTTCTG-3' (primer reverse),

alla concentrazione di 1mM.

La dimensione del frammento analizzato è di 234 paia di basi (bp).

Lo studio ha valutato, in posizione -2518 della regione regolatrice del promotore di MCP-1, la presenza di una guanina in sostituzione ad una adenina.

Le condizioni di reazione sono state: una pre-incubazione a 94°C per 5', seguita da 40 cicli di amplificazione di 1' a 94°C, 1' a 57°C, 1' e 30'' a 72°C, ed un passaggio finale di estensione a 72°C per 10'.

Per il polimorfismo di GSTT1

- GSTT1For 5'-TCTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' (primer forward)
- GSTT1Rev 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' (primer reverse)

alla concentrazione di 1mM.

Essendo il polimorfismo causato dalla delezione del gene l'amplificazione risultava efficace solo in presenza dello stesso e produceva un frammento di 480 paia di basi (bp).

Le condizioni di reazione sono state: una preincubazione a 95°C per 15 minuti, seguita da 40 cicli di amplificazione di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a

72°C ed un passaggio finale di estensione a 72°C per 10 minuti.

Per la mutazione R702W del gene di NOD2/CARD15

- R702WFor 5'-CGCACAAACCTTCAGATCACA-3' (primer forward)
- R702WRev5'-GGATGGAGTGAAGTGCTTG-3' (primer reverse)

alla concentrazione di 1mM.

La dimensione del frammento analizzato è di 165 paia di basi (bp).

Le reazioni di amplificazione si sono svolte in termociclatore con il seguente protocollo: 95°C per 5 minuti, 45 cicli di 95°C per 30 secondi, 59°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto seguiti da uno step finale di 72°C per 7 minuti.

Per la mutazione G908R del gene di NOD2/CARD15

- G908RFor 5'-AAGTCTGTAATGTAAAGCCAC-3' (primer forward)
- G908RRev 5'-CCCAGCTCCTCCCTCTTC-3' (primer reverse)

alla concentrazione di 1mM.

La dimensione del frammento analizzato è di 380 paia di basi (bp).

Le reazioni di polimerizzazione si sono svolte con il seguente protocollo: 95°C per 5 minuti, 45 cicli di 95°C per 1 minuto, 59°C per 1 minuto e 72°C per 2 minuti seguiti da uno step finale di 72°C per 7 minuti.

Per la mutazione 1007fs del gene di NOD2/CARD15

- 1007fsFor 5'-GGCAGAAGCCCTCCTGCAGGGCC-3' (primer forward)
- 1007fsRev 5'-CTTCAAATTCTGCCATTCC-3' (primer reverse)

alla concentrazione di 1mM.

La dimensione del frammento analizzato è di 380 paia di basi (bp).

Il protocollo di PCR era: 95°C per 5 minuti, 45 cicli di 95°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto seguiti da uno step finale di 72°C per 7 minuti.

3.2c – Analisi del polimorfismo del frammento di restrizione (RFLP)

La sostituzione dell'adenina in posizione -2518 del gene di MCP1 con una guanina genera un sito di restrizione per l'enzima PvuII (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), che divide il frammento di 234 bp, in 2 parti di 159 bp e di 75 bp. L'enzima PvuII è stato utilizzato alla concentrazione di 5 U/ml, in 1ml di soluzione tampone contenente 50 mM di NaCl, 10 mM di Tris-HCl, 10 mM di MgCl₂ e 1 mM DTT a pH 7.9.

Il taglio enzimatico è stato eseguito ad una temperatura d'incubazione di 37° C per 60'.

Per quanto concerne la mutazione R702W del gene NOD2/CARD15 il prodotto dell'amplificazione è stato digerito con l'endonucleasi *HpaII* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C per 4 ore. Il soggetto wild type presenta tre bande di 64 pb, 54 pb e 47 pb; il soggetto eterozigote presenta 4 bande di 118 pb, 64 pb e 54 pb e 47 pb ed infine il soggetto omozigote per la mutazione presenterà 2 bande di 118 pb e 47 pb.

Il taglio enzimatico per la mutazione G908R del gene NOD2/CARD15 è stato effettuato con l'endonucleasi *HhaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C per 4 ore. In questo caso il soggetto wild type presenta una banda di 380 pb; il soggetto eterozigote presenta 3 bande di 380 pb, 232 pb, 148 pb ed infine il soggetto omozigote per la mutazione presenta 2 bande di 232 pb e 148 pb.

Per il frame shift che si ha in posizione 3020 del gene NOD2/CARD15 che causa uno stop prematuro e quindi la proteina tronca la cui mutazione è definita 1007fs il prodotto dell'amplificazione è stato digerito con l'endonucleasi *HpaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C per 4 ore e il soggetto wild type presenta una banda di 151 pb; il soggetto eterozigote presenta 3 bande di 151 pb, 131 pb, 20 pb ed infine il soggetto omozigote per la mutazione presenta 2 bande di 131 pb e 20 pb.

Come indicato in precedenza la mutazione nel gene GSTT1 si esplica in una delezione del gene stesso pertanto in questo caso non è stato necessario effettuare un taglio enzimatico con

endonucleasi di restrizione in quanto la valutazione della presenza o assenza della mutazione è verificabile poiché se il gene è presente, risulterà presente anche il frammento di 480 paia di basi che altrimenti non verrà visualizzato.

Per la valutazione di tutti i geni si è poi effettuata una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide al 7%, con marcatura al bromuro di ertidio per la risoluzione delle bande. Come marker di riferimento è stato utilizzato il genoma del batteriofago Φ X174 digerito con l'enzima di restrizione HincII.

Quando il prodotto di PCR, per ciascuna mutazione in analisi, sottoposto a RFLP ha suggerito la presenza della mutazione è stata eseguita, ad ulteriore conferma, l'analisi al sequenziatore per la verifica della presenza di tale mutazione.

3.3 – ANALISI STATISTICA

Per verificare tutte le associazioni oggetto dello studio tra le mutazioni e i polimorfismi genetici e le malattie infiammatorie del pancreas e dell'intestino è stato utilizzato il test del χ^2 .

Una $p < 0,05$ è stata considerata significativa e in caso di significatività positiva sono stati calcolati odds ratio (OD) ed intervallo di confidenza (CI).

4 – RISULTATI

4.1 – MCP1 E PATOLOGIE PANCREATICHE

Nella popolazione di controllo, la distribuzione degli alleli A e G in posizione -2518 del gene di MCP-1 segue l'equilibrio di Hardy-Weinberg, come dimostrato dai valori non significativi scaturiti dal test del χ^2 (vedi tabella 14).

La frequenza dell'allele G nella popolazione di controllo è risultata del 21%, dato comparabile a quello riportato da precedenti studi effettuati sulla popolazione caucasica.

Il genotipo A/A è stato rilevato in cinquantasette degli ottantotto soggetti sani di controllo (64,8%), il genotipo A/G in venticinque (28,4%) ed il genotipo G/G in sei (6,8%) di essi.

Dato l'esiguo numero di individui portatori del genotipo omozigote G/G, si è deciso di raggruppare tali soggetti con gli eterozigoti A/G ai fini della valutazione dell'eventuale associazione tra il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 e le malattie infiammatorie del pancreas.

4.1a – PANCREATITE ACUTA

Dei centodiciotto pazienti affetti da pancreatite acuta, settantadue (61%) esprimevano il genotipo A/A, quarantadue (35,6%) il genotipo A/G e quattro (3,4%) il genotipo G/G.

Non è stata rilevata alcuna associazione tra il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 e la malattia; infatti l'allele G è stato osservato in quarantasei dei centodiciotto pazienti affetti da pancreatite acuta (39%) ed in trentuno degli ottantotto individui appartenenti alla popolazione di controllo (35,2%), valori che ad un controllo statistico non differiscono tra di loro in maniera significativa (vedi tabella 15).

Il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 non è risultato associato nemmeno alla severità della pancreatite acuta, poichè dei trentadue pazienti affetti dalla forma severa, undici sono risultati portatori del polimorfismo nella forma eterozigote (A/G) od omozigote (G/G), mentre, tra gli ottantasei pazienti con la forma lieve, trentacinque recavano l'allele G e anche in questo caso i dati non presentano alcuna differenza statisticamente significativa (vedi tabella 16).

Si sono volute valutare anche le eventuali associazioni fra il polimorfismo -2518A/G di MCP1 e la malattia in relazione alle abitudini dei pazienti e si è notato che dei trenta pazienti fumatori, ventuno (70%) erano portatori del genotipo A/A, otto (26,7%) del genotipo A/G ed uno soltanto (3,3%) del genotipo G/G, a fronte dei cinquantuno A/A (58%), dei trentaquattro A/G (38,6%) e dei tre G/G (3,4%) fra gli ottantotto pazienti non fumatori (vedi tabella 17).

Trentadue tra coloro che consumavano abitualmente alcol (cinquanta in totale) possedevano un genotipo A/A (64%), sedici un genotipo A/G (32%) e due un genotipo G/G (4%), mentre, tra i sessantotto soggetti non bevitori, quaranta (58,8%) esprimevano un genotipo A/A, ventisei (38,2%) un genotipo A/G e due (3%) un genotipo G/G (vedi tabella 18).

Entrambi i pazienti con diagnosi di pancreas divisum recavano il genotipo A/A. I genotipi dei centosedici pazienti che non erano affetti da alcuna malformazione anatomica, invece, risultavano per un 60,3% A/A (settanta su centosedici), per un 36,2% A/G (quarantadue su centosedici) e per un 3,5% G/G (quattro su centosedici) (vedi tabella 19).

I due pazienti con un'anamnesi familiare positiva per cancro del pancreas erano portatori del genotipo A/A, mentre settanta (60,3%) dei centosedici con familiarità negativa per tale patologia possedevano un genotipo A/A, quarantadue (36,2%) un genotipo A/G e quattro (3,5%) un genotipo G/G (vedi tabella 20).

Tra i trenta pazienti con un BMI inferiore a 25, si sono rilevati ventuno (70%) con il genotipo A/A, otto (26,7%) con il genotipo A/G ed uno (3,3%) con il genotipo G/G, a fronte di valori pari a, rispettivamente, ventisei (55,3%), diciannove (40,4%) e due (4,3%) rilevati tra i quarantasette individui con un BMI \geq 25 (vedi tabella 21).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra la prevalenza dell'allele G nei fumatori (pari al 30%) ed i non fumatori (pari al 42%) (vedi tabella 17), nei pazienti dediti al consumo di alcol (36%) ed i non bevitori (41,2%) (vedi tabella 18), nei pazienti che presentano pancreas divisum (pari a zero) e coloro che non erano portatori di alcuna malformazione anatomica (39,7%) (vedi tabella 19), nei pazienti con familiarità per il cancro del pancreas (pari a zero) ed in quelli con anamnesi familiare negativa per tale malattia (39,7%) (vedi tabella 20).

Il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 non è stato associato, infine, al riscontro di obesità o sovrappeso ($BMI \geq 25$).

Infatti l'espressione dell'allele G nei soggetti con un $BMI < 25$ è risultata del 30%, mentre in quelli con un $BMI \geq 25$ del 44,7%, valori che non differiscono tra di loro dal punto di vista statistico (vedi tabella 21).

4.1b – PANCREATITE ACUTA RICORRENTE

Per quanto riguarda i sessantaquattro pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente, in venticinque di essi (39,1%) è stato rilevato il genotipo A/A, in trentacinque (54,7%) il genotipo A/G ed in quattro (6,2%) il genotipo G/G.

E' stata riscontrata una associazione statisticamente significativa tra il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 e la pancreatite acuta ricorrente ($P=0,003$; O.R.=2,87; C.I. 1,47-5,58).

Infatti, l'espressione dell'allele G nel gruppo dei pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente è diversa, in termini statistici, rispetto a quella osservata nella popolazione di controllo: trentanove dei sessantaquattro pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente (60,9% dei soggetti) erano portatori del polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 nella forma eterozigote (A/G) od omozigote (G/G), mentre solo trentuno (35,2%) degli ottantotto soggetti sani di controllo presentavano un genotipo A/G o G/G (vedi tabella 22).

Dei sedici pazienti fumatori, sei (37,5%) esprimevano un genotipo A/A, otto (50%) un genotipo A/G e due (12,5%) un genotipo G/G, mentre, tra i quarantotto non fumatori, diciannove (39,6%) si caratterizzavano per un genotipo A/A, ventisette (56,2%) per un genotipo A/G e due (4,2%) per un genotipo G/G (vedi tabella 23).

Tra i diciotto pazienti che dichiaravano un consumo abituale ed di alcol, in sei (33,3%) è stato rilevato un genotipo A/A, in undici (61,1%) un genotipo A/G ed in uno (5,6%) il genotipo G/G, a fronte di valori pari rispettivamente al 41,3% (diciannove su quarantasei), 52,2% (ventiquattro su quarantasei) e al 6,5% (tre su quarantasei) riscontrati fra i non bevitori (vedi tabella 24).

Dei cinque pazienti che presentavano il pancreas divisum, uno (20%) era portatore del genotipo A/A, tre (60%) del genotipo A/G ed uno (20%) del genotipo G/G.

La frequenza dei tre genotipi nei cinquantanove pazienti non affetti da tale malformazione anatomica risultava rispettivamente del 40,7% (ventiquattro su cinquantanove), del 54,2% (trentadue su cinquantanove) e del 5,1% (tre su cinquantanove) (vedi tabella 25).

Il polimorfismo -2518 A/G di MCP-1 non è stato correlato al tabagismo, mancando infatti una differenza statisticamente significativa tra l'espressione dell'allele G nei fumatori, pari al 62,5%, e nei non fumatori, pari al 60,4% (vedi tabella 23).

Similmente, nessuna associazione è stata rilevata con il consumo di alcol (l'espressione dell'allele G tra i bevitori era del 66,7% e tra i non bevitori del 58,7%, numeri che non differiscono dal punto di vista statistico) (vedi tabella 24), e con la presenza di pancreas divisum, dal momento che l'espressione dell'allele G fra i portatori di tale malformazione, pari all'80%, non risultava statisticamente diversa rispetto a quella tra coloro che non lo erano (59,3%) (vedi tabella 25).

4.1c – PANCREATITE CRONICA

Dei centoquarantadue pazienti affetti da pancreatite cronica, settantacinque (52,8%) presentavano il genotipo A/A, sessanta (42,3%) il genotipo A/G e sette (4,9%) il genotipo G/G.

Non è stata osservata alcuna correlazione tra il polimorfismo -2518 di MCP-1 e la pancreatite cronica, anche se sembrerebbe essere presente un trend di associazione.

I pazienti affetti da pancreatite cronica recanti l'allele G risultavano infatti sessantasette su centoquarantadue (pari al 47,2%), rispetto ai trentuno (35,2%) degli ottantotto soggetti sani di controllo (vedi tabella 26).

Tra i novantacinque pazienti fumatori, cinquantadue (54,7%) esprimevano il genotipo A/A, quaranta (42,1%) il genotipo A/G e tre (3,2%) il genotipo G/G, mentre, dei quarantasette non fumatori, ventitré (48,9%) erano portatori del genotipo A/A, venti (42,6%) del genotipo A/G e quattro (8,5%) del genotipo G/G (vedi tabella 27).

Degli ottantasette pazienti bevitori, quarantasette (54,1%) erano caratterizzati dal genotipo A/A, trentasette (42,5%) dal genotipo A/G e tre (3,4%) dal genotipo G/G, a fronte, rispettivamente dei ventotto A/A (50,9%), dei ventitré A/G (41,8%) e dei quattro G/G (7,3%) tra i cinquantacinque soggetti che dichiaravano di non bere alcol (vedi tabella 28).

Dei sette pazienti con diagnosi di pancreas divisum, quattro (57,1%) erano portatori del genotipo A/A e tre (42,9%) del genotipo A/G, mentre, tra i centotrentacinque che non recavano tale malformazione, settantuno (52,6%) erano contraddistinti dal genotipo A/A, cinquantasette (42,2%) dal genotipo A/G e sette (5,2%) da quello G/G (vedi tabella 29).

Cinque dei sette pazienti con familiarità per cancro del pancreas presentavano il genotipo A/A (71,4%), e due il genotipo A/G (28,6%). Nei centotrentacinque pazienti con un'anamnesi familiare negativa per tale patologia sono stati riscontrati settanta A/A (51,9%), cinquantotto A/G (42,9%) e sette G/G (5,2%) (vedi tabella 30).

Dei sei pazienti con familiarità per pancreatite cronica, due recavano il genotipo A/A (33,3%) e quattro il genotipo A/G (66,7%), a fronte dei settantatre pazienti con genotipo A/A (53,7%), dei cinquantasei con genotipo A/G (41,2%) e dei sette con genotipo G/G (5,1%) tra coloro che avevano un'anamnesi familiare negativa per questa affezione (vedi tabella 31).

Per quanto concerne l'indice di massa corporea, infine, quaranta tra gli ottantadue che possedevano un BMI < 25 esprimevano un genotipo A/A (48,8%), trentasette un genotipo A/G (45,1%) e cinque un genotipo G/G (6,1%), a fronte dei ventisei A/A (74,3%), otto A/G (22,9%) ed un unico G/G(2,8%) tra i trentacinque pazienti in sovrappeso od obesi (BMI ≥ 25).

E' stata rilevata una associazione statisticamente significativa tra il polimorfismo -2518A/G di MCP-1 ed il riscontro di un BMI ≥ 25 nei pazienti affetti da pancreatite cronica (p=0,01; O.R.=0,33; I. C. 0,14-0,79).

Infatti, nove dei trentacinque (25,7%) individui in sovrappeso od obesi (BMI ≥ 25) recavano l'allele G, rispetto ai quarantadue (51,2%) degli ottantadue pazienti con un BMI < 25, valori che differiscono tra di loro in maniera statisticamente significativa (vedi tabella 32).

Non è stata individuata invece alcuna differenza statisticamente significativa tra l'espressione dell'allele G nei fumatori (45,3%) rispetto ai non fumatori (51,1%) (vedi tabella 27), nei bevitori (45,9%) ed in coloro che non consumavano alcol (49,1%) (vedi tabella 28), nei pazienti portatori di pancreas divisum (42,9%) ed in quelli che non recavano tale malformazione (47,4%) (vedi tabella 29), nei pazienti con familiarità per patologie pancreatiche quali la pancreatite cronica (66,7%) ed il cancro (28,6%) e coloro che possedevano invece un'anamnesi familiare muta per tali affezioni (46,3% e 48,1% rispettivamente) (vedi tabella 30 e 31).

4.2 – MCP1 E MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

4.2a – MCP1 E MORBO DI CROHN

Sono stati confrontati con ottantotto controlli sani, quarantacinque pazienti affetti da morbo di Crohn. I pazienti erano 25 (55,6%) maschi e 20 (44,4%) femmine, l'età media dei pazienti è risultata di $52,3 \pm 16,9$ anni e l'età media di insorgenza della patologia di $40,8 \pm 17,2$ anni. Dei pazienti analizzati 19 (42,2%) erano fumatori e 6 (13,3%) avevano una familiarità per una malattia infiammatoria cronica intestinale. Per quanto concerne la localizzazione di malattia, 18 (40,0%) avevano una localizzazione ileale, 5 (11,1%) avevano una localizzazione colica, 21 (46,7%) una localizzazione ileo-colica, (46,7%) e, infine, 1 (2,2%) aveva una localizzazione estesa a ileo, colon e retto contemporaneamente. Le varianti di malattia erano così distribuite: 15 (33,3%) infiammatorie, 20 (44,4%) stenosi, 4 (8,9%) fistolizzanti e infine 6 (13,3%) stenosi-fistolizzanti. L'11,1% aveva manifestazioni extraintestinali, il 31,1% dei pazienti è risultato non rispondere alla terapia steroidea e il 51,1% ha dovuto ricorrere alla chirurgia (Tab.12).

Dei pazienti studiati 28 (62,2%) sono risultati portatori del genotipo A/A, 15 (33,3%) del genotipo A/G e 2 (4,5%) del genotipo G/G e non è stata evidenziata nessuna differenza significativa per quanto riguarda l'associazione di MCP1 con la patologia (Tab.33). Non si è verificata alcuna associazione tra il polimorfismo e la localizzazione di malattia (Tab.34-37) e neppure di MCP1 con la variante di malattia (Tab.38-41).

Inoltre confrontando la familiarità positiva con MCP1 essa non è risultata associata alla mutazione (Tab.42). Non si è vista nella popolazione di studio nessuna associazione fra MCP1 e l'abitudine al fumo (Tab.43).

Per quanto concerne le manifestazioni extraintestinali non si è verificata nessuna associazione (Tab.44).

Infine per quanto concerne la resistenza alla terapia con corticosteroidi non si è verificata alcuna associazione (Tab.45) così come per la necessità di ricorrere alla chirurgia (Tab.46).

4.2b – MCP1 E RETTOCOLITE ULCEROSA

Per lo studio della rettocolite ulcerosa sono stati valutati quarantotto pazienti. Essi erano 37 (63,8%) maschi e 21 (36,2%) femmine, l'età media dei pazienti è risultata di $52,7 \pm 16,5$ anni e l'età media di insorgenza della patologia di $43,5 \pm 14,9$ anni. Dei pazienti analizzati 22 (37,9%) erano fumatori e 3 (5,2%) avevano una familiarità per una malattia infiammatoria cronica intestinale. Per quanto concerne la localizzazione di malattia, 15 (25,9%) avevano una localizzazione colica, 33 (56,9%) avevano una localizzazione contemporanea al sigma ed al retto, 3 (5,17%) una localizzazione esclusivamente rettale e, infine, 7 (12,1%) presentavano una localizzazione che comprendeva colon, retto e sigma contemporaneamente. Il 17,2% aveva manifestazioni extraintestinali, il 5,2% dei pazienti è risultato non responder alla terapia steroidea e il 5,2% ha dovuto ricorrere alla chirurgia (Tab.13).

33 (56,9%) pazienti oggetto dello studio sono risultati portatori del genotipo A/A, 18 (31,0%) del genotipo A/G e 7 (12,1%) del genotipo G/G e i risultati ottenuti non indicano alcuna differenza significativa nel confronto dei pazienti con il gruppo di controllo (Tab.47).

Non si è verificata alcuna associazione tra il polimorfismo -2518A/G di MCP1 e la localizzazione di malattia (Tab.48-51). Inoltre confrontando la familiarità positiva con MCP1 essa non è risultata associata alla mutazione (Tab.52). Non si è vista nella popolazione di studio nessuna associazione fra MCP1 e l'abitudine al fumo (Tab.53).

Per quanto concerne le manifestazioni extraintestinali non si è verificata nessuna associazione (Tab.54).

Infine per quanto concerne la resistenza alla terapia con corticosteroidi (Tab.55) non si è verificata alcuna associazione così come per la necessità di ricorrere alla chirurgia (Tab.56).

4.3 – GSTT1 E PATOLOGIE PANCREATICHE

Per quanto concerne il polimorfismo di GSTT1 è stato possibile analizzare solo ottantasei volontari del gruppo di controllo e, come evidenziato nella tabella 57, quarantacinque (52.3%) esprimevano il gene per GSTT1 (GSTT1*A), mentre quarantuno (47.7%) non lo esprimevano (GSTT1 null).

Considerando che non ci sono evidenze in letteratura per indicare un diverso comportamento, da un punto di vista della deplezione di glutatione, tra le pancreatiti acute ricorrenti e le pancreatiti croniche si sono analizzati tali pazienti in un unico gruppo la cui numerosità finale, a causa del fatto che non è stato possibile analizzare lo stesso numero di campioni studiato per MCP1, è stata di 172 soggetti. Di essi 92 (53.5%) esprimevano il gene per GSTT1 (GSTT1*A), 80 (46.5%) non lo esprimevano (GSTT1null). E' stata rilevata una associazione statisticamente significativa tra la presenza della proteina GSTT1 e queste due patologie ($p=0.03$; O.R.=1.8, C.I. [1.07- 3.04]).(tab57).

Una associazione scarsamente significativa ($p=0.048$; O.R.=0.52, C.I. [0.29- 0.96]).(tab57) è stata evidenziata mettendo a confronto il gruppo delle pancreatiti acute, costituito da 96 soggetti, di cui 65 (67.7%) avevano il gene per GSTT1 (GSTT1*A), 31(32.3%) non avevano il gene. Non è invece stata rilevata alcuna associazione tra il polimorfismo e la severità di malattia. Tuttavia è possibile che incrementando la numerosità del campione si possa verificare una più forte associazione con la malattia e pure un rapporto con la severità.

4.3 – NOD2/CARD15 E MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

4.3a – MORBO DI CROHN E MUTAZIONI DI NOD2/CARD15

E' stata eseguita un'analisi statistica al fine di comprendere se esiste una differenza significativa nell'espressione delle tre mutazioni maggiori di NOD2/CARD15 (R702W, G908R, 1007fs) tra soggetti affetti da morbo di Crohn e un gruppo di controllo costituito da individui sani. A questo scopo sono state messe a confronto una popolazione di pazienti affetti da morbo di Crohn, costituita da 48 soggetti, ed una popolazione di controllo composta da 57 individui sani.

E' stata rilevata un'associazione statisticamente significativa tra la presenza della mutazione 1007fs con la presenza di morbo di Crohn ($p=0.003$; O.R.=8.34; C.I.[0.97-71.95]). Nello stesso gruppo di pazienti, 7 (14,6%) esprimevano una mutazione in omozigosi o in eterozigosi per 1007fs, mentre 41 (85,4%) non esprimevano la mutazione in questione. Per contro nel gruppo di controllo, nessun soggetto esprimeva la mutazione 1007fs (Tab.58).

E' stata inoltre studiata la possibile associazione tra le tre mutazioni principali di NOD2/CARD15 con la sede d'insorgenza del morbo di Crohn ed è stata rilevata una correlazione statisticamente significativa tra la mutazione 1007fs e la localizzazione della malattia in sede ileale ($p=0.003$; O.R.=11.4; C.I. [1.10-117.59]): all'interno del gruppo di pazienti, costituito da 19 soggetti, 4 (21,0%) presentavano la mutazione 1007fs in omozigosi o in eterozigosi, 15 (79,0%) non esprimevano tale mutazione; per contro la popolazione di controllo, composta da 57 individui, non mostrava alcun soggetto esprimente mutazioni 1007fs (Tab.59).

La tabella 60 mostra che anche la correlazione tra 1007fs e la localizzazione in sede ileo-colica della malattia è risultata statisticamente significativa ($p=0.02$; O.R.=19.3; C.I.[1.98-188.6]): all'interno del gruppo dei pazienti, costituito da 22 soggetti, 3 (13,6%) presentavano la mutazione

1007fs e 19 (86.4%) non presentavano tale mutazione; nessun soggetto all'interno della popolazione controllo esprimeva la mutazione 1007fs.

E' risultata inoltre statisticamente significativa anche la correlazione tra 1007fs e la variante stenotante della malattia ($p=0.02$; O.R.=23.0; C.I.[1.13-467.13]: nel gruppo di 20 pazienti affetti da morbo di Crohn stenotante, 3 pazienti (15.0%) presentavano la mutazione 1007fs e 17 (85.0%) non presentavano tale mutazione; nessun soggetto all'interno della popolazione controllo esprimeva la mutazione 1007fs (Tab.61).

E' stata dimostrata infine una correlazione statisticamente significativa tra 1007fs e la variante stenotante-fistolizzante della malattia ($p=0.0008$; O.R.=28.5; C.I. [2.10-385.9]). All'interno del gruppo di pazienti, costituito da 7 soggetti, 3 (42.9%) esprimevano una mutazione in omozigosi o in eterozigoti per 1007fs, mentre 4 (57.1%) non esprimevano la mutazione in questione. Per contro nel gruppo di controllo, nessun soggetto esprimeva la mutazione 1007fs (Tab.62).

L'associazione tra R702W e morbo di Crohn non è risultata statisticamente significativa rispetto alla popolazione di controllo: la tabella 58 mostra che nel gruppo dei pazienti, 11 (23.0%) presentavano la mutazione R702W in omozigosi o in eterozigosi, mentre 37 (77.0%) non presentavano tale mutazione. All'interno del gruppo di controllo, 8 (14.0%) soggetti esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86.0%) non esprimevano tale mutazione.

Allo stesso modo la correlazione tra la mutazione G908 e morbo di Crohn non è risultata statisticamente significativa: all'interno del gruppo di pazienti affetti da morbo di Crohn, 1 (2.0%) esprimeva la mutazione in eterozigosi, 47 (98%) non esprimevano tale mutazione. All'interno del gruppo del gruppo di controllo, 1 (1.75%) presentava la mutazione G908R in omozigosi o eterozigosi, 56 (98.2%) non presentavano tale mutazione (Tab.58).

E' stata inoltre studiata la possibile associazione tra le tre mutazioni principali di NOD2/CARD15 con la sede d'insorgenza del morbo di Crohn.

Localizzazione ileale (Tab.59)

Sono state poste a confronto una popolazione di 19 pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione ileale ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione ileale della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 6 (31.6%) presentava una mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, mentre 13 (68.4%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8(14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49(86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn a localizzazione ileale: nessun paziente presentava la mutazione G908R, mentre 1(1.75%) paziente esprimeva tale mutazione all'interno del gruppo di controllo.

Dell'associazione tra localizzazione ileale e 1007fs si è parlato.

Localizzazione colica (Tab.63)

Sono state poste a confronto una popolazione di 6 pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione colica ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione colica della malattia ($p=1$): all'interno del gruppo di pazienti, 1 (16.7%) presentava una mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, mentre 5 (83.3%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn a localizzazione colica: nessun paziente presentava la mutazione G908R, mentre 1 (1.75%) paziente esprimeva tale mutazione all'interno del gruppo di controllo.

La correlazione tra la mutazione 1007fs e la localizzazione in sede colica della malattia non è risultata statisticamente significativa: nessun soggetto all'interno della popolazione di pazienti, né all'interno dei controlli esprimeva la mutazione 1007fs.

Localizzazione ileo-colica (Tab.60)

Anche in questo caso sono state poste a confronto una popolazione di 22 pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione ileo-colica ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione ileo-colica della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 4 (18.2%) presentavano una mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, mentre 18 (81.9%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn a localizzazione ileo-colica: 1 (4.5%) paziente presentava la mutazione G908R, 21(95.5%) pazienti non esprimevano tale mutazione; nella popolazione di controllo 1 (1.75%) soggetto esprimeva la mutazione G908R in eterozigosi, 56 (98.2%) non esprimevano tale mutazione. Dell'associazione tra localizzazione ileo-colica e 1007fs si è parlato all'inizio del capitolo.

E' stata presa in considerazione la possibile associazione tra le tre mutazioni principali di NOD2/CARD15 con le diverse varianti cliniche del morbo di Crohn.

Variante infiammatoria (Tab.64)

In questo caso sono state poste a confronto una popolazione di 17 pazienti affetti da morbo di Crohn con variante infiammatoria ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la variante infiammatoria della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 4 (23.5%) presentavano una mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, mentre 13 (76.5%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8(14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49(86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn nella variante infiammatoria: nessun paziente presentava la mutazione G908R, mentre nella popolazione di controllo 1(1.75%) soggetto esprimeva la mutazione G908R in eterozigosi.

Anche la correlazione tra 1007fs e la variante infiammatoria della malattia non è risultata statisticamente significativa: 1 paziente (5.9%) presentava la mutazione 1007fs e 16 (94.1%) non presentavano tale mutazione; nessun soggetto all'interno della popolazione controllo esprimeva la mutazione 1007fs.

Variante stenosante (Tab.61)

Sono state poste a confronto una popolazione di 20 pazienti affetti da morbo di Crohn con variante stenosante ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la variante stenosante della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 5 (25.0%) presentavano una mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, mentre 15 (75.0%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn nella variante stenosante(p=1): nessun paziente presentava la mutazione G908R, mentre nella popolazione di controllo 1 (1.75%) soggetto esprimeva la mutazione G908R in eterozigosi.

Variante fistolizzante (Tab.65)

Anche in questo caso sono state poste a confronto una popolazione di 4 pazienti affetti da morbo di Crohn con variante fistolizzante ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la variante fistolizzante della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 1 (25.0%) presentava una mutazione R702W in eterozigosi, mentre 3 (75.0%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn nella variante fistolizzante: 1 (25.0%) paziente presentava la mutazione G908R, 3 (75.0%) non presentavano tale mutazione; nella popolazione di controllo 1 (1.75%) soggetto esprimeva la mutazione G908R in eterozigosi.

Anche la correlazione tra 1007fs e la variante fistolizzante della malattia non è risultata statisticamente significativa: nessun soggetto all'interno della popolazione dei pazienti, né all'interno della popolazione di controllo presentava la mutazione 1007fs.

Varianti stenose e fistolizzanti associate (Tab.62)

Sono state poste a confronto una popolazione di 7 pazienti affetti da morbo di Crohn con variante stenose-fistolizzante ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la variante stenose-fistolizzante della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 1 (14.3%) presentava la mutazione R702W, mentre 6 (85.7%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) esprimevano la mutazione R702W in omozigosi o eterozigosi, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Non è risultata statisticamente significativa neppure la correlazione tra G908R e morbo di Crohn nella variante stenose-fistolizzante: nessun paziente presentava la mutazione G908R; nella popolazione di controllo 1 (1.75%) soggetto esprimeva la mutazione G908R in eterozigosi. Della correlazione tra la mutazione 1007fs e la variante stenose-fistolizzante si è già parlato in precedenza.

E' stata considerata anche la possibile associazione tra le tre mutazioni di NOD2/CARD15 e la familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali in pazienti affetti da morbo di Crohn. (Tab.66)

Sono stati confrontati 42 pazienti senza familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali, con 6 pazienti caratterizzati da familiarità positiva per tali malattie. All'interno del primo gruppo 8 (19.0%) pazienti presentavano una mutazione R702W, contro i 34 (81.0%) senza tale

mutazione; 1 paziente (2.4%) presentava una mutazione G908R, contro 41 (97.6%) non esprimenti la stessa; 6 (14.3%) presentavano la mutazione 1007fs, contro i restanti 36 (85.7%) privi di tale mutazione. Nel secondo gruppo 3 pazienti (50.0%) presentavano una mutazione R702W, contro i restanti 3 (50.0%) privi di tale mutazione; nessun paziente con anamnesi familiare positiva esprimeva la mutazione G908R; 1 (16.7%) esprimeva la mutazione 1007fs, contro 5 (83.3%) non presentanti tale mutazione.

Il confronto tra questi due gruppi non ha dimostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali e R702W, né con G908R, neppure con 1007fs.

Non è stata rivelata correlazione statisticamente significativa neppure tra fumo e le tre mutazioni maggiori di NOD2/CARD15 in pazienti affetti da morbo di Crohn (Tab.67); la popolazione di fumatori, costituita da 22 pazienti, è stata posta a confronto con la popolazione non fumatrice, composta da 26 pazienti.

Tra i fumatori, 4 (18.2%) presentavano una mutazione per R702W, 18 (81.8%) non esprimeva tale mutazione; nessun fumatore presentava la mutazione G908R; 4 pazienti (18.2%) presentavano la mutazione 1007fs, contro i restanti 18 (81.8%), non esprimenti tale mutazione.

All'interno della popolazione di non fumatori, 7 (26.9%) presentavano la mutazione R702W, contro i 19 (73.1%) non esprimenti la stessa; 1 paziente (3.8%) mostrava la mutazione G908R, contro i 25 (96.2%) privi di tale mutazione; 3 pazienti (11.5%) presentavano mutazione 1007fs, contro i restanti 23 (88.5%) non esprimenti la mutazione stessa.

E' stata considerata inoltre la possibile associazione tra le tre mutazioni di NOD2/CARD15 e il ricorso a chirurgia correlata a morbo di Crohn. (Tab.68)

Sono stati confrontati 24 pazienti che avevano affrontato la terapia chirurgica, con 24 pazienti senza precedente storia chirurgica. All'interno del primo gruppo 5 (20.8%) pazienti presentavano una mutazione R702W, contro i 19 (79.1%) senza tale mutazione; 1 paziente (4.1%) presentava una mutazione G908R, contro 23 (95.8%) non esprimenti la stessa; 5 (20.8%) presentavano la

mutazione 1007fs, contro i restanti 19 (79.1%) privi di tale mutazione. Nel secondo gruppo 6 pazienti (25.0%) presentavano una mutazione R702W, contro i restanti 18 (75.0%) privi di tale mutazione; nessun paziente con anamnesi chirurgica negativa esprimeva la mutazione G908R; 2 (9.5%) esprimevano la mutazione 1007fs, contro 22 (90.5%) non presentanti tale mutazione.

Il confronto tra questi due gruppi non ha dimostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra chirurgia per il trattamento di complicazioni del morbo di Crohn e R702W, né con G908R, neppure con 1007fs.

Uno studio di correlazione tra le mutazioni di NOD2/CARD15 e le manifestazioni extraintestinali del morbo di Crohn è stato eseguito confrontando 6 pazienti con manifestazioni extraintestinali e 42 pazienti senza tali manifestazioni (Tab.69). Nel primo gruppo 1 paziente (16.7%) presentava la mutazione R702W, contro 5 (83.3%) pazienti privi di tale mutazione; nessun paziente con manifestazioni extraintestinali esprimeva una mutazione G908R o 1007fs.

Nel secondo gruppo di pazienti 10 (23.8%) presentavano la mutazione R702W, contro i 32 (76.2%) senza tale mutazione; 1 (2.4%) paziente esprimeva la mutazione G908R, contro 41 (97.6%) non presentanti la stessa; 7 pazienti (16.7%) mostravano la mutazione 1007fs, contro i restanti 35 (83.3%) non presentanti tale mutazione.

Lo studio di queste frequenze non ha rivelato alcuna correlazione significativa tra manifestazioni extraintestinali e le mutazioni R702W, G908R e 1007fs.

E' stata infine valutata la possibile correlazione tra le mutazioni di NOD2/CARD15 e la condizione di resistenza alla terapia medica: sono state poste a confronto una popolazione di 14 pazienti, non responsivi alla terapia steroidea, con una popolazione di 34 pazienti responsivi alla stessa terapia; nel primo gruppo 5 (35.7%) soggetti presentavano la mutazione R702W, nessuno presentava una mutazione G908R, 3 (21.4%) presentavano la mutazione 1007fs. Nel secondo gruppo 6 pazienti (17.7%) esprimevano una mutazione R702W, 1 (2.9%) esprimeva una mutazione G908R, 4 (11.8%) esprimevano una mutazione 1007fs. L'analisi statistica di questi dati non ha rivelato alcuna correlazione significativa (Tab.70).

4.3b - RETTOCOLITE ULCEROSA E MUTAZIONI DI NOD2/CARD15

All'interno della popolazione di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa non sono stati riscontrati soggetti presentanti mutazioni G908R e 1007fs.

Per questo motivo l'analisi statistica è stata condotta valutando la sola mutazione R702W.

In primo luogo è stata studiata la possibile correlazione tra la mutazione R702W e rettocolite ulcerosa, mettendo a confronto una popolazione di pazienti affetti da questa patologia, costituita da 59 soggetti, ed una popolazione di controllo composta da 57 individui sani (Tab.71).

Tale correlazione non è risultata statisticamente significativa rispetto alla popolazione di controllo: nel gruppo dei pazienti 5 (23.0%) presentavano la mutazione R702W, mentre 54 (91.5%) non presentava tale mutazione. All'interno del gruppo di controllo, 8 soggetti (14.0%) esprimevano la mutazione R702W, 49 (86.0%) non esprimevano tale mutazione.

E' stata inoltre studiata la possibile associazione tra le tre mutazioni principali di NOD2/CARD15 con la sede d'insorgenza di rettocolite ulcerosa.

Localizzazione colica (Tab.72)

Sono state poste a confronto una popolazione di 15 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa con localizzazione colica ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione colica della malattia: all'interno del gruppo di pazienti, 2 (13.3%) presentavano una mutazione R702W, mentre 13 (86.7%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) soggetti esprimevano la mutazione R702W, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Localizzazione sigma-retto (Tab.73)

Anche in questo caso sono state poste a confronto una popolazione di 34 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa con localizzazione a livello di sigma-retto ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Non è stata rilevata una correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione sigmoideo-rettale della malattia: nel del gruppo di pazienti, 3 (8.8%) presentavano una mutazione R702W, mentre 31 (91.2%) non presentavano tale mutazione. Nella popolazione di controllo 8 (14.0%) soggetti esprimevano la mutazione R702W, 49 (86%) non esprimevano tale mutazione.

Localizzazione rettale (Tab.74)

Una popolazione di 3 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa con localizzazione a livello rettale è stata posta a confronto con una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra R702W e la localizzazione rettale della malattia: nel gruppo di pazienti, nessuno presentava la mutazione R702W, mentre nella popolazione di controllo 8 (14.0%) soggetti esprimevano tale mutazione, 49 (86%) ne erano privi.

Localizzazione colon-sigma-retto (Tab.75)

Sono state confrontate una popolazione di 34 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa con localizzazione a livello di sigma-retto ed una popolazione di controllo costituita da 57 soggetti sani.

Non si è riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa tra R702W e la localizzazione a livello di colon-sigma-retto della malattia: nessun paziente all'interno del gruppo considerato presentava la mutazione R702W; nella popolazione di controllo 8 soggetti (14.0%) esprimevano tale mutazione, 49 (86%) ne erano privi.

Anche per rettocolite ulcerosa è stata considerata la possibilità di un' associazione tra R702W e la familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali (Tab.76)

Sono stati confrontati 56 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa senza familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali, con 3 pazienti caratterizzati da familiarità positiva per tali malattie. All'interno del primo gruppo 5 (8.9%) pazienti presentavano una mutazione R702W, contro i 51 (91.1%) senza tale mutazione. Nel secondo gruppo nessun paziente presentava mutazione R702W. Il confronto tra questi due gruppi non ha dimostrato alcuna correlazione

statisticamente significativa tra familiarità positiva per malattie infiammatorie croniche intestinali e R702W.

Non è stata rivelata correlazione statisticamente significativa neppure tra fumo e R702W in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (Tab.77). La popolazione di fumatori, costituita da 22 pazienti, è stata posta a confronto con la popolazione non fumatrice, composta da 37 pazienti.

Tra i fumatori, 2 (9.1%) presentavano una mutazione per R702W, 20 (90.9%) non esprimevano tale mutazione. All'interno della popolazione di non fumatori, 3 (8.1%) presentavano la mutazione R702W, 34 (91.9%) non la esprimevano.

E' stata considerata inoltre la possibile associazione tra R702W ed il ricorso a chirurgia correlata alla malattia (Tab.78) Sono stati confrontati 3 pazienti che avevano affrontato la terapia chirurgica, con 56 pazienti senza precedente storia chirurgica. All'interno del primo gruppo 1 paziente (20.8%) presentava la mutazione R702W, contro i 2 restanti (79.1%) senza tale mutazione;. nel secondo gruppo 4 pazienti (7.7%) presentavano una mutazione R702W, contro i restanti 52 (92.3%) privi di tale mutazione. Il confronto tra questi due gruppi non ha dimostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra chirurgia per il trattamento di complicazioni di rettocolite ulcerosa e R702W.

Uno studio di correlazione tra la mutazione R702W e le manifestazioni extraintestinali di rettocolite ulcerosa è stato eseguito confrontando 10 pazienti con manifestazioni extraintestinali e 49 pazienti senza tali manifestazioni (Tab.79). Nel primo gruppo nessun paziente presentava la mutazione R702W, mentre nel secondo gruppo 5 pazienti (10.2%) esprimevano tale mutazione, 44 (89.8%) ne erano privi. Lo studio di queste frequenze non ha rivelato alcuna correlazione significativa tra manifestazioni extraintestinali e le mutazioni R702W.

E' stata infine valutata la possibile correlazione tra la mutazione R702W e la condizione di resistenza alla terapia medica:sono stati confrontati 3 pazienti non.responder alla terapia steroidea con 56 pazienti responsivi alla stessa. All'interno del primo gruppo 1 paziente (8.8%) presentava mutazione R702W, mentre nel secondo gruppo 1 paziente esprimeva tale mutazione. L'analisi

statistica di questi dati non ha dimostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra la condizione di steroido resistenza e la mutazione R702W in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (Tab.80).

5 – DISCUSSIONE

Il lavoro si è posto come obiettivo lo studio di eventuali associazioni fra le mutazioni e i polimorfismi di diversi geni e le patologie infiammatorie di pancreas e intestino.

5.1 – MALATTIE INFIAMMATORIE PANCREATICHE

I risultati hanno evidenziato come, nella popolazione italiana affetta patologie infiammatorie a carico del pancreas, vi sia un'associazione statisticamente significativa tra il polimorfismo -2618A/G e la pancreatite acuta ricorrente. Inoltre si è verificata un'associazione del medesimo polimorfismo in quei soggetti affetti da pancreatite cronica che presentavano un indice di massa corporea (BMI) uguale o superiore a 25. Più in generale è stato possibile rilevare un trend per l'associazione della forma del gene per MCP1, recante in posizione -2518 una guanina, con la pancreatite cronica.

Non è stata invece rilevata alcuna associazione del polimorfismo con la pancreatite acuta e neppure quando si mettevano a confronto pazienti affetti dalla malattia in forma lieve contro pazienti con una forma severa della stessa.

Per meglio comprendere i meccanismi alla base della patogenesi delle malattie infiammatorie pancreatiche è stata valutata anche l'associazione del polimorfismo di GSTT1 che porta alla delezione del gene e le pancreatiti si è rilevata un'associazione statisticamente significativa tra quei pazienti che presentavano il fenotipo coniugatore, quindi portatori del gene non deletato, affetti da pancreatite acuta ricorrente e da pancreatite cronica. Le due patologie sono state considerate insieme dato l'esiguo numero di pancreatiti acute ricorrenti che si sono potute studiare. Si è inoltre rilevata una significatività scarsamente positiva nel confronto tra i pazienti affetti da pancreatite

acuta rispetto alla popolazione di controllo. Nessuna significatività è stata invece trovata per quanto concerne la relazione con la severità di malattia.

Le malattie infiammatorie pancreatiche hanno un'eziologia multifattoriale in cui convergono cause ambientali e fattori predisponenti legati al genotipo dei pazienti; la patogenesi risulta dunque complessa e pertanto ad oggi non sono ancora completamente comprese. A complicare ancora le cose c'è la presentazione di tali patologie in tre diverse forme che sono: acuta, acuta ricorrente e cronica.

Essendo queste patologie di tipo infiammatorio da tempo si studiano i processi flogistici che sono alla base delle stesse e le eventuali alterazioni di tali processi che possono modificare il decorso e la presentazione della malattia.

Sulla base di diversi studi presenti in letteratura volti a valutare l'associazione fra i meccanismi dell'infiammazione e le patologie oggetto dello studio si è pensato di valutare gli effetti del polimorfismo -2518A/G che si trova nella regione regolatrice distale del promotore per il gene che codifica per la proteina chemotattica dei monociti (MCP1) e che incrementa la produzione della stessa. Tale incremento comporta un aumentato reclutamento di monociti nel sito della flogosi con conseguente aumento di produzione di chemochine, citochine e specie reattive dell'ossigeno e, pertanto, un potenziale aggravamento del danno tissutale [231].

MCP1 è espressa, oltre che dai monociti, anche da altri tipi cellulari[225, 227-228]. Nel pancreas essa è espressa dalle cellule acinari e dai miofibroblasti che sono la forma attivata delle cellule stellate pancreatiche (PSC). Oltre al reclutamento dei monociti in sede di flogosi MCP1 è anche deputata all'attivazione degli stessi a macrofagi con conseguente instaurazione e mantenimento del processo flogistico [87, 91, 226].

A differenza di quanto evidenziato da uno studio effettuato pochi anni fa sulla popolazione nordamericana ove si indicava un'associazione del polimorfismo con lo sviluppo di una forma severa di pancreatite acuta[237], nella popolazione da noi studiata tale effetto sulla severità non è stato individuato; è ipotizzabile che questo dipenda, almeno in parte, dalla dimensione maggiore del

campione da noi esaminato. Tuttavia anche la diversa origine dei campione può essere causa della discrepanza, infatti, un fattore endogeno come la calcolosi biliare, fortemente presente nella popolazione dello studio americano, potrebbe mascherare, con il danno meccanico, la predisposizione genetica.

Nello studio si è deciso di valutare anche i soggetti affetti da una forma ricorrente di pancreatite acuta, di solito essa si presenta in modo meno severo della forma acuta ad evento singolo ed raramente associata a patologia biliare; si tratta comunque di una patologia importante che spesso esita in una pancreatite cronica.

Nella nostra popolazione lo studio ha mostrato come il polimorfismo di MCP1 sia associato significativamente a questa particolare forma di pancreatite acuta.

Non è possibile ipotizzare che il polimorfismo sia la causa della patologia ma si può supporre che, in presenza di altri fattori endogeni od esogeni, l'incremento dei processi flogistici causato da MCP1 possa favorire quelle alterazioni che portano da un pancreas normale ad uno soggetto ad infiammazione.

Le pancreatiti che così si sviluppano possono pertanto essere più lievi ma l'incremento nelle concentrazioni di MCP1 comporterebbe un aumentato richiamo di monociti e l'istaurarsi di un processo flogistico automantenentesi che può portare ad eventi acuti ripetuti nel tempo. Considerando inoltre che spesso le pancreatiti acute ricorrenti esitano in una pancreatite cronica e che quest'ultima patologia è, tra quelle in analisi, la maggiormente multifattoriale, non stupisce che si sia individuato un trend di associazione tra tale malattia e MCP1. Infatti la quantità dei fattori eziopatogenici, esogeni ed endogeni, coinvolti lascia pensare che pure MCP1 possa partecipare nello sviluppo della patologia, ma che occorra una maggior numerosità del campione per ottenere risultati significativi.

Di notevole interesse è il fatto che risulti significativa l'associazione di MCP1 con quel sottogruppo di pazienti affetti da pancreatite cronica e che presentano un BMI \geq di 25 e che sono quindi in uno stato di sovrappeso o di obesità. È infatti noto da diversi studi come un incremento del BMI

corrisponda spesso ad aumentati livelli flogistici che sono probabilmente causati dalla produzione molecole ad effetto infiammatorio da parte degli adipociti. Non è pertanto da escludere che, se si aggiunge all'incremento dei processi flogistici causato dal aumento di peso, si aggiunge anche un polimorfismo che rende iperproduttori di una citochina proinfiammatoria questi due effetti si sommano nel favorire una flogosi cronica ed il danno tissutale ad essa connesso.

La significatività individuata per GSTT1 nel confronto tra il gruppo di pazienti affetti da pancreatite acuta e quello che comprende i pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente e pancreatite cronica, e il diverso livello di significatività dei due gruppi rispetto al gruppo di controllo porta ad alcune considerazioni sulla presenza di questo gene "facoltativo".

Come già detto nei capitoli precedenti le Glutathione transferasi hanno il compito di inattivare le specie reattive dell'ossigeno coniugandole con il glutathione ridotto, tuttavia l'effetto di GSTT1 in una prima fase è sicuramente benefico, ma sul lungo periodo risulta paradossalmente deleterio poiché esso richiede per la sua funzione di elevate quantità di glutathione che viene quindi consumato rapidamente.

Si può dunque supporre che la più rapida e assoluta deplezione di glutathione ridotto, che si presenta nei soggetti portatori del gene non deleto e quindi del fenotipo coniugatore, può contribuire a determinare un deficit nell'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno con conseguente cronicizzazione della flogosi. Considerando l'elevata espressione di GSTT1 a livello delle cellule acinose pancreatiche[247] e l'alto consumo di glutathione che tale proteina comporta è possibile pensare che, dopo un evento di pancreatite acuta causata da qualsiasi fattore esogeno od endogeno, il processo flogistico che si instaura non sia in grado di concludersi. Infatti il fenotipo coniugatore porterebbe, paradossalmente ad una presenza costante specie reattive dell'ossigeno a livello pancreatico provocando un insulto di entità non elevata ma continuativo. Tale insulto nel tempo potrebbe portare al ripetersi di eventi acuti e alla cronicizzazione della patologia.

5.2 – MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

Morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa sono patologie multifattoriali che presentano spesso un clustering familiare che porta a considerare la presenza, tra i vari fattori patogenetici, di importanti fattori genetici.

Il lavoro svolto ha evidenziato, confermando i dati presenti in letteratura, come vi sia un'associazione significativa tra la mutazione 1007fs del gene NOD2/CARD15 e il morbo di Crohn. Analizzando le potenziali associazioni con le abitudini voluttuarie dei pazienti, la familiarità, la localizzazione e le varianti di tale patologia si sono riscontrati risultati significativi per quanto riguarda la localizzazione ileale e d'ileo colica, e la variante stenotomizzante e stenotomizzante fistolizzante.

Il fatto che si siano evidenziate delle associazioni è abbastanza tipico per le malattie multifattoriali in cui alcuni geni possono avere un effetto predisponente ma non risultano determinati se non associati ad altri fattori di tipo ambientale, non si tratta insomma di patologie ad eredità mendeliana ma il fenotipo di malattia si ottiene dalla combinazione di determinate varianti geniche, come quelle oggetto dello studio, con altri geni, fattori di rischio addizionali e fattori ambientali.

Diversi geni sono stati individuati e, in parte, studiati per la loro associazione con le malattie infiammatorie croniche intestinali. Tra questi è stata posta particolare attenzione sul gene NOD2/CARD15 localizzato nel locus definito IBD1 sul braccio corto del cromosoma 16. Esso codifica per la proteina NOD2 che fa parte delle proteine deputate al riconoscimento, a livello gastroenterico delle componenti del lipopolisaccaride batterico.

Studi presenti in letteratura hanno evidenziato un'associazione delle mutazioni del gene NOD2/CARD15 con il morbo di Crohn ma non con la rettocolite ulcerosa; inoltre tali mutazioni risultano specifiche per la popolazione Caucasica in quanto non sono state individuate nelle popolazioni Asiatiche [313].

Come precedentemente indicato questo lavoro è in accordo con altri studi effettuati sulla popolazione italiana nell'individuare un'associazione tra la mutazione per frame shift definita 1007fs del gene NOD2/CARD15 e il morbo di Crohn oltre che per la localizzazione di tale patologia al colon o al colon e all'ileo contemporaneamente, e per la variante stenotica e stenotica fistolizzante [318, 320].

Gli intervalli di confidenza dei risultati ottenuti sono piuttosto ampi e questo può essere stato determinato dalla dimensione non eccessivamente grande del campione, tuttavia questo non inficia il risultato che va a corroborare quanto dimostrato negli studi precedenti.

Importanti nella determinazione di una patologia sono anche i rapporti che genotipo e ambiente possono avere nel modificare l'espressività della malattia. Non sono stati ottenuti in questo studio risultati significativi in rapporto alle mutazioni R702W, G908R e 1007fs di NOD2/CARD15 esaminate e fattori di rischio ambientali. Tuttavia la scarsa numerosità del campione potrebbe spiegare, almeno parzialmente, questi risultati.

Nessuna associazione significativa è stata individuata tra le tre mutazioni e la rettocolite ulcerosa.

Nell'ottica di una più ampia valutazione dei meccanismi patogenetici delle malattie infiammatorie croniche intestinali si è pensato di studiare anche gli effetti che alterazioni nell'attività di un'importante chemochina proinfiammatoria, quale è MCP1, possono avere sul fenotipo di tali patologie. MCP1 è espressa, come già detto, da diverse cellule dell'immunità e, considerando che l'epitelio intestinale è un'ampia superficie con, tra le altre, una funzione di tipo immunitario è stato possibile ipotizzare che il polimorfismo -2518A/G da noi studiato potesse contribuire al fenotipo di malattia in rettocolite ulcerosa e/o morbo di Crohn. Non sono però stati ottenuti risultati significativi e, a meno di non ipotizzare un effetto della scarsa numerosità campionaria, sembrerebbe che il polimorfismo studiato non influenzi la patologia.

5.3 – CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha evidenziato e confermato come nell'ambito di patologie multifattoriali quali le pancreatiti e le malattie infiammatorie croniche intestinali, causate da più fattori endogeni ed esogeni contemporaneamente la genetica possa giocare un ruolo importante nel determinare il fenotipo e la variabilità di tali affezioni.

Lo studio e l'identificazione di fattori genetici associati a diverse patologie può permettere di identificare gruppi di soggetti a rischio in modo da poter stabilire per essi variazioni "terapeutiche" di fattori di rischio ambientali modificabili (fumo, dieta, appendicectomia, farmaci, etc.) e un follow-up adeguato. Inoltre la valutazione di geni correlati a malattia, una volta studiati e chiariti i diversi meccanismi, potrebbe permettere di predire il decorso della patologia in funzione di una particolare localizzazione o variante e di stabilire su base genetica la risposta alla terapia.

TABELLE

Tabella 1: Cause di pancreatite acuta (Modificata da Forsmark CE, 2007)

- 1. Biliare** (calcoli, microlitiasi, fango biliare)
- 2. Alcol** (nell'estrinsecazione in acuto di un processo flogistico cronico)
- 3. Varianti anatomiche** (pancreas divisum, cisti del coledoco, duplicazione duodenale, diverticoli duodenali)
- 4. Ostruzione meccanica al deflusso del succo pancreatico**
 - a) **Ampullari** (tumori, disfunzioni e stenosi dello sfintere di Oddi)
 - b) **Duttali** (calcoli, stenosi, masse, muco, parassiti)
- 5. Metaboliche** (ipercalcemia, ipertrigliceridemia)
- 6. Farmaci**
- 7. Tossine**
- 8. Traumi** (contusivi, penetranti e iatrogeni)
- 9. Ischemia** (ipotensione, arteriti, embolia)
- 10. Ipotermia**
- 11. Infezioni**
 - a) **Virali** (virus della parotite, virus Coxackie, HIV)
 - b) **Batteriche** (Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma)
 - c) **Parassitarie** (Ascaridi)
- 12. Veleni** (aracnidi e rettili)
- 13. Autoimmune**
- 14. Genetica** (familiare, sporadica)
- 15. Idiomatica**

Tabella 2: Criteri di Ranson.

Le modifiche per la pancreatite acuta biliare sono riportate tra parentesi.

LDH: lattico deidrogenasi; AST: aspartato-amino trasferasi; Ht: ematocrito;

BUN: Blood urean nitrogen (Modificata da Forsmark CE, 2007) (51).

All'ingresso	Entro 48h
Età > 55 anni (> 70 anni)	Riduzione Ht > 10% (idem)
Conta leucocitaria > 16.000/ μ l (> 18.000/ μ l)	Sequestro di fluidi > 6l (>4l)
Glicemia > 200 mg/ml (> 220 mg/dl)	Calcemia < 8 mg/dl (idem)
LDH > 350 IU/l (> 400 IU/l)	PaO ₂ < 60 mmHg (assente)
AST > 250 IU/l (idem)	BUN > 5 mg/dl dopo somministrazione di fluidi ev (>2mg/dl)
	Deficit di basi > 4 mmol/l (>6)

Tabella 3: Criteri di Glasgow.

BUN: Blood urean nitrogen; LDH: lattico deidrogenasi (Modificata da Dionigi, 2002) (4).

Entro 48 h
Età > 55 anni
Conta leucocitaria > 15.000/ μ l
Glicemia > 180 mg/dl
BUN > 45 mg/dl
LDH > 600 IU/l
Albumina < 3,3 g/dl
Calcemia < 8mg/dl
PaO ₂ < 60 mmHg

Tabella 4: Elementi che possono predire la severità dell'attacco di pancreatite acuta entro 48 ore dal ricovero.

BMI: Body Mass Index; APACHE-II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation-II; PCR: proteina C reattiva (Modificata da UK Working Party on Acute pancreatitis, 2005).

Approccio iniziale	Severità clinica BMI > 30 Versamenti pleurici all' Rx torace APACHE-II score \geq 8
24 h dopo il ricovero Severità clinica	APACHE-II score \geq 8 Glasgow score \geq 3 Insufficienza d'organo persistente PCR > 150 mg/l
48 h dopo il ricovero Severità clinica	Glasgow score \geq 3 Insufficienza d'organo persistente per 48 h PCR > 150 mg/l Insufficienza d'organo multipla o progressiva

Tabella 5: Cause di pancreatite acuta ricorrente (Modificata da Levy, 2001) (114).

- 1. Litiasi biliare** (calcoli, microlitiasi, fango biliare)
- 2. Alcol** (nell'estrinsecazione in acuto di un processo flogistico cronico)
- 3. Malattie cistiche delle vie biliari** (coledocoele)
- 4. Malformazioni congenite** (pancreas divisum, pancreas anulare, anomalie della giunzione bilio-pancreatica)
- 5. Ostruzione duodenale** (atresia, diverticoli, morbo di Crohn)
- 6. Farmaci**
- 7. Genetica**
- 8. Infezioni:**
 - a) **Virali** (virus della Parotite, virus Coxackie, HIV)
 - b) **Batteriche** (Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma)
 - c) **Parassitarie** (Ascaridi)
- 9. Neoplasie** (benigne e maligne)
- 10. Idiopatica**

Tab 6 Classificazione Cambridge.

TC, US	
Normale	Dotto pancreatico principale < 2 mm Ghiandola normale per forma e dimensione Parenchima omogeneo
PC incerta	Solo uno dei seguenti segni: Dotto pancreatico principale tra 2 e 4 mm Volume del pancreas aumentato (<2x normale) Parenchima eterogeneo Piccole cisti < 10mm Dotto irregolare Pancreatite acuta focale Aumentata ecogenicità della parete duttale Contorni irregolari
PC lieve	Due o più dei suddetti segni
PC moderata	Due o più dei suddetti segni (non distinguibile della lieve)
PC severa	Come sopra con uno o più di: Grandi cisti (>10mm) Volume del pancreas aumentato (>2x normale) Difetti di riempimento intraduttali o calcoli Ostruzione o stenosi o grosse irregolarità del Wirsung Coinvolgimento degli organi circostanti

Tab7 Classificazione Cambridge. ERCP.

Terminologia	Dotto principale	Dotti secondari	Caratteristiche addizionali
Normale	Normale	Nessuno	
PC incerta	Normale	<3	
PC lieve	Normale	≥ 3	
PC moderata	Anormale	> 3	
PC grave	Anormale	> 3	Uno o più dei seguenti: Cisti >10mm Ostruzione Difetti di riempimento Dilatazione severa Irregolarità

Tab8**PROTEINE CODIFICATE DA GENI NF- κ B DIPENDENTI**

<u>Citochine pro- infiammatorie</u>	TNF- α
	IL-1 β
	IL-2
	IL-6
	GM-CSF
	M-CSF
	G-CSF
<u>Chemochine</u>	IL-8
	Esotassine
<u>Enzimi dell'infiammazione</u>	Ossido nitrico sintetasi
	Cicloossigenasi
	5-Lipossigenasi
	Fosfolipasi citosolica A2
<u>Molecole di adesione</u>	Molecola di adesione di tipo 1
	Molecola di adesione delle cellule vascolari
	E-selectina
<u>Recettori</u>	Recettore per Interleuchina-2
	Recettore T-cellulare

Tabella 9: Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da pancreatite acuta.

Pazienti affetti da pancreatite acuta(N.)	118
Pancreatiti acute lievi (%)	72,9
Pancreatiti acute severe (%)	27,1
Maschi (%)	54,2
Età media (anni; media \pm DS)	65,0 \pm 18,0
Età alla diagnosi (anni; media \pm DS)	63,2 \pm 17,7
BMI medio	26,8 \pm 5,0
BMI \geq 25 (%)	61
Familiarità per cancro pancreatico (%)	1,7
Familiarità per pancreatite cronica (%)	-
Consumo di Alcol (%)	42,4
Consumo di Alcol (g/die; media \pm DS)	36,1 \pm 47,4
Fumatori (%)	25,4
Consumo di sigarette (sig/die; media \pm DS)	21,9 \pm 9,1
Pancreas divisum (%)	1,7

Tabella 10: Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente.

Pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente (N.)	64
Maschi (%)	57,8
Età media (anni; media \pm DS)	54,0 \pm 15,0
Età alla diagnosi (anni; media \pm DS)	41,1 \pm 14,0
Familiarità per cancro pancreatico (%)	-
Familiarità per pancreatite cronica (%)	-
Consumo di Alcol (%)	28,1
Consumo di Alcol (g/die; media \pm DS)	60,6 \pm 48,1
Fumatori (%)	25
Consumo di sigarette (sig/die; media \pm DS)	24,5 \pm 13,3
Pancreas divisum(%)	7,8

Tabella 9: Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da pancreatite cronica

4,9

Pazienti affetti da pancreatite cronica (N.)	142
Maschi (%)	68,3
Età media	59,9 ± 14,8
Età alla diagnosi (anni; media ± DS)	52,5 ± 16,6
Durata della malattia	7,4 ± 15,7
BMI medio	23,3 ± 3,2
BMI ≥ 25 (%)	29,9
Familiarità per cancro pancreatico (%)	4,9
Familiarità per pancreatite cronica (%)	4,2
Consumo di Alcol (%)	38,7
Consumo di Alcol (g/die; media ± DS)	89,1 ± 74,3
Fumatori (%)	66,9
Consumo di sigarette (sig/die; media ± DS)	23,2 ± 13,9
Pancreas divisum (%)	4,9

Tab.12. Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da morbo di Crohn

Pazienti affetti da morbo di Crohn (N.)	48
Maschi (%)	62.5
Età (anni; media \pm DS)	52.4 \pm 17.0
Età alla diagnosi (anni; media \pm DS)	40.8 \pm 17.2
Familiarità (%)	12.5
Localizzazione ileale (%)	39.6
Localizzazione colica (%)	12.5
Localizzazione ileo-colon-rettale (%)	2.1
Localizzazione ileo-colica (%)	45.8
Variante infiammatoria (%)	35.4
Variante stenosante (%)	41.7
Variante fistolizzante (%)	8.3
Variante stenosante/fistolizzante (%)	14.6
Fumatori (%)	45.8
Risposta terapia medica (%)	79.2
Chirurgia (%)	50.0
Manifestazioni extraintestinali (%)	12.5

Tab.13. Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

Pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (N.)	59
Maschi (%)	63.9
Età (anni; media \pm DS)	49.5 \pm 13.2
Età alla diagnosi (anni; media \pm DS)	43.8 \pm 14.8
Familiarità (%)	4.9
Localizzazione colica (%)	24.6
Localizzazione sigma-retto(%)	54.1
Localizzazione rettale (%)	6.6
Localizzazione colon-sigma-retto (%)	13.1
Fumatori (%)	31.1
Risposta terapia medica (%)	95.1
Chirurgia (%)	4.9
Manifestazioni extraintestinali (%)	18.0

Tabella 14: Distribuzione genotipica del polimorfismo in posizione -2518 della regione regolatrice distale del gene di MCP-1 nella popolazione normale

	OSSERVATA % (N)	ATTESA % (N)	P
A/A	64,80 (57)	62,40 (55)	0,86
A/G	28,40 (25)	33,20 (29)	0,61
G/G	6,80 (6)	4,40 (4)	0,55

Tabella 15: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da pancreatite acuta (PA) e nei soggetti di controllo

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		PA (2N= 236)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79	187	79,2	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21	49	20,8	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		PA (N= 118)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	72	61,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	42	35,6	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	4	3,4	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	46	39,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di Confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 16: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da pancreatite acuta (PA) lieve e nei pazienti affetti da PA severa.

FREQUENZE ALLELICHE	PA LIEVI (2N= 172)		PA SEVERE (2N= 64)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	135	78,5	51	79,7	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21	13	20,3	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	PA LIEVI (N= 86)		PA SEVERE (N= 32)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	51	59,3	21	65,6	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	33	38,4	9	28,1	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	2,3	2	6,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	35	40,7	11	34,4	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di Confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 17: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti fumatori e nei non fumatori, affetti da pancreatite acuta.

FREQUENZE ALLELICHE	FUMATORI (2N= 60)		NON FUMATORI (2N= 176)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	50	83,3	136	77,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	10	16,7	40	22,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FUMATORI (N= 30)		NON FUMATORI (N= 88)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	21	70,0	51	58,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	8	26,7	34	38,6	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	1	3,3	3	3,4	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	9	30,0	37	42,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di Confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 18: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti bevitori e nei non bevitori, affetti da pancreatite acuta.

FREQUENZE ALLELICHE	BEVITORI (2N= 100)		NON BEVITORI (2N= 136)			O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	80	80	106	77,9	NS	NC	NC
MCP-1 G	20	20	30	22,1	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	BEVITORI (N= 50)		NON BEVITORI (N= 68)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	32	64,0	40	58,8	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	16	32,0	26	38,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	4,0	2	3,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	18	36,0	28	41,2	NS	NC	NC

Tabella 19: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti portatori (PD+) e non (PD-) di pancreas divisum, affetti da pancreatite acuta.

FREQUENZE ALLELICHE	PD + (2N= 4)		PD - (2N= 232)				
	n	%	n	%			
MCP-1 A	4	100	182	78,4	NS	NC	NC
MCP-1 G	0	0	50	21,6	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	PD+ (N= 2)		PD - (N= 116)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	2	100	70	60,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	0	0	42	36,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0	4	3,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	0	0	46	39,7	NS	NC	NC

Tabella 20: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti con familiarità (FAM. KP+) o meno (FAM. KP-) per il cancro del pancreas, affetti da pancreatite acuta.

FREQUENZE ALLELICHE	FAM. KP + (2N= 4)		FAM. KP - (2N= 232)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	4	100	182	78,4	NS	NC	NC
MCP-1 G	0	0	50	21,6	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FAM. KP + (N= 2)		FAM. KP - (N= 116)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	2	100	70	60,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	0	0	42	36,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0	4	3,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	0	0	46	39,7	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 21: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti con indice di massa corporea (BMI) < 25 e quelli con BMI≥25, affetti da pancreatite acuta.

FREQUENZE ALLELICHE	BMI<25 (2N= 60)		BMI≥25 (2N= 94)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	50	83,3	71	75,5	NS	NC	NC
MCP-1 G	10	16,7	23	24,5	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	BMI<25 (N= 30)		BMI≥25 (N= 47)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	21	70,0	26	55,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	8	26,7	19	40,4	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	1	3,3	2	4,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	9	30	21	44,7	NS	NC	NC

NS NC NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 22: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da pancreatite acuta ricorrente (PAR) e nei soggetti di controllo.

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N=176)		PAR (2N=128)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79	85	66,4	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21	43	33,6	0,02	1,9	1,13-3,18
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N=88)		PAR (N=64)		P	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	25	39,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	35	54,7	0,002	3,19	1,59-6,40
MCP-1 G/G	6	6,8	4	6,2	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	39	60,9	0,003	2,87	1,47-5,58

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 23: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti fumatori e nei non fumatori, affetti da pancreatite acuta ricorrente.

FREQUENZE ALLELICHE	FUMATORI (2N= 32)		NON FUMATORI (2N= 96)		P*	O.R	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	20	62,5	65	67,7	NS	NC	NC
MCP-1 G	12	37,5	31	32,3	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FUMATORI (N= 16)		NON FUMATORI (N= 48)		P*	O.R	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	6	37,5	19	39,6	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	8	50,0	27	56,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	12,5	2	4,2	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	10	62,5	29	60,4	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 24: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti bevitori e nei non bevitori, affetti da pancreatite acuta ricorrente.

FREQUENZE ALLELICHE	BEVITORI (2N= 36)		NON BEVITORI (2N= 92)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	23	63,9	62	67,4	NS	NC	NC
MCP-1 G	13	36,1	30	32,6	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	BEVITORI (N= 18)		NON BEVITORI (N= 46)		P*	O.R.	I.C. (95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	6	33,3	19	41,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	11	61,1	24	52,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	1	5,6	3	6,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	12	66,7	27	58,7	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 23: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti portatori (PD+) e non (PD-) di pancreas divisum, affetti da pancreatite acuta ricorrente.

FREQUENZE ALLELICHE	PD + (2N= 10)		PD - (2N= 118)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	5	50	80	67,8	NS	NC	NC
MCP-1 G	5	50	38	32,2	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	PD+ (N= 5)		PD - (N= 59)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	1	20,0	24	40,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	3	60,0	32	54,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	1	20,0	3	5,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	4	80,0	35	59,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test

Tabella 26: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da pancreatite cronica (PC) e nei soggetti di controllo.

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N=176)		PC (2N=284)		P	O.R	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79	210	73,9	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21	74	26,1	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N=88)		PC (N= 142)		P	O.R	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	75	52,8	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	60	42,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	7	4,9	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	67	47,2	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 27: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti fumatori e nei non fumatori, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	FUMATORI (2N= 190)		NON FUMATORI (2N= 94)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	144	75,8	66	70,2	NS	NC	NC
MCP-1 G	46	24,2	28	29,8	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FUMATORI (N= 95)		NON FUMATORI (N= 47)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	52	54,7	23	48,9	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	40	42,1	20	42,6	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	3	3,2	4	8,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	43	45,3	24	51,1	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 25: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti bevitori e nei non bevitori, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	BEVITORI (2N= 174)		NON BEVITORI (2N= 110)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	131	75,3	79	71,8	NS	NC	NC
MCP-1 G	43	24,7	31	28,2	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	BEVITORI (N= 87)		NON BEVITORI (N= 55)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	47	54,1	28	50,9	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	37	42,5	23	41,8	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	3	3,4	4	7,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	40	45,9	27	49,1	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 29: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti portatori (PD+) e non (PD-) di pancreas divisum, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	PD + (2N= 14)		PD - (2N= 270)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	11	78,6	199	73,7	NS	NC	NC
MCP-1 G	3	21,4	71	26,3	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	PD+ (N= 7)		PD - (N= 135)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	4	57,1	71	52,6	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	3	42,9	57	42,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0	7	5,2	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	3	42,9	64	47,4	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 30: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti con familiarità (FAM. KP+) o meno (FAM. KP-) per il cancro del pancreas, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	FAM. KP + (2N= 14)		FAM. KP - (2N= 270)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	12	85,7	198	73,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	2	14,3	72	26,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FAM. KP + (N= 7)		FAM. KP - (N= 135)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	5	71,4	70	51,9	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	2	28,6	58	42,9	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0	7	5,2	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	2	28,6	65	48,1	NS	NC	NC

NS NC NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 31: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti con familiarità (FAM. PC+) o meno (FAM. PC-) per pancreatite cronica, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	FAM. PC + (2N= 12)		FAM. PC - (2N= 272)			O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	8	66,7	202	74,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	4	33,3	70	25,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	FAM. PC + (N= 6)		FAM. PC - (N= 136)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	2	33,3	73	53,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	4	66,7	56	41,2	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0	7	5,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	4	66,7	63	46,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 32: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti con indice di massa corporea (BMI) < 25 e quelli con BMI≥25, affetti da pancreatite cronica.

FREQUENZE ALLELICHE	BMI<25 (2N= 164)		BMI≥25 (2N= 70)		P	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	117	71,3	60	85,7	NS	NC	NC
MCP-1 G	47	28,7	10	14,3	0,02	0.41	0,20-0,88
FREQUENZE GENOTIPICHE	BMI<25 (N= 82)		BMI≥25 (N= 35)		P	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	40	48,8	26	74,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	37	45,1	8	22,9	0,02	0,33	0,13-0,83
MCP-1 G/G	5	6,1	1	2,8	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	42	51,2	9	25,7	0,01	0,33	0,14-0,79

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 33: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 90)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	71	78,9	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	19	21,1	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 45)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	28	62,2	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	15	33,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	2	4,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	9	37,8	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 34: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione ileale

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 36)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	29	80,6	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	7	19,4	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 18)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	11	61,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	7	38,9	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	7	38,9	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 35: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione colica

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 10)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	8	80,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	2	20,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 5)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	4	80,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	1	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	1	20,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 36: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione ileo-colica

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 42)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	32	76,2	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	10	23,8	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 21)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	12	57,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	8	38,1	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	1	4,8	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	9	42,8	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 36: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con localizzazione ileo-colo-rettale

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 2)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	2	100,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	0	0,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 1)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	1	100,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	0	0,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 38: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn infiammatorio

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 30)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	21	70,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	9	30,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 15)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	8	53,4	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	5	33,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	2	13,3	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	7	46,6	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 39: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn stenosante

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 40)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	34	85,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	6	15,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 20)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	14	70,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	6	30,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	6	30,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 40: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn fistolizzante

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 8)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	6	75,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	2	25,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 4)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	2	50,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	2	50,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	2	50,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 41: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn stenosante-fistolizzante

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		Crohn (2N= 12)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	10	83,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	2	16,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		Crohn (N= 6)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	4	66,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	2	33,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	2	33,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 42: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con e senza familiarità per malattia infiammatoria cronica intestinale

FREQUENZE ALLELICHE	Fam no (2N= 82)		Fam si (2N= 8)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	63	76,8	8	100,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	19	23,2	0	0,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Fam no (N= 41)		Fam si (N= 4)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	24	58,5	4	100,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	15	36,6	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	4,9	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	17	41,5	2	0,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 43: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn fumatori e non fumatori

FREQUENZE ALLELICHE	Fumo no (2N= 48)		Fumo si (2N= 42)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	38	79,2	33	78,6	NS	NC	NC
MCP-1 G	10	20,8	9	21,4	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Fumo no (N= 24)		Fumo si (N=21)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	14	58,3	14	66,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	10	41,7	5	23,8	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0,0	2	9,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	10	41,7	7	33,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 44: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn con e senza manifestazioni extraintestinali

FREQUENZE ALLELICHE	Extra no (2N= 80)		Extra si (2N= 10)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	64	80,0	70	70,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	16	20,0	3	30,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Extra no (N= 40)		Extra si (N=5)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	25	62,5	3	60,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	14	35,0	1	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	1	2,5	1	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	15	37,5	2	40,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 45: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn resistenti alla terapia con corticosteroidi e responders

FREQUENZE ALLELICHE	Responders (2N= 62)		Non responders (2N= 28)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	49	79,0	22	78,6	NS	NC	NC
MCP-1 G	13	21,1	6	21,4	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Responders (N= 31)		Non responders (N=14)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	20	64,5	8	57,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	9	29,0	6	42,9	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	6,5	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	15	35,5	6	42,9	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 46: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da morbo di Crohn che hanno ricorso alla terapia chirurgica o meno

FREQUENZE ALLELICHE	Chirurgia no (2N= 46)		Chirurgia si (2N= 44)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	36	78,3	35	79,5	NS	NC	NC
MCP-1 G	10	21,7	6	20,5	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Responders (N= 23)		Non responders (N=22)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	15	65,2	13	59,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	6	26,1	9	40,9	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	2	8,7	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	8	34,8	9	40,9	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 47: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		RCU (2N= 116)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	84	72,4	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	32	27,6	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		RCU (N= 58)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	33	56,8	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	18	31,1	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	7	12,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	25	43,2	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

Tabella 48: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite ulcerosa con localizzazione colica

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		RCU (2N= 30)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	27	90,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	3	10,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		RCU (N= 15)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	12	80,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	3	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	3	20,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 49: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite ulcerosa con localizzazione rettale

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		RCU (2N= 6)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	5	83,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	1	16,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		RCU (N= 3)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	2	66,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	1	33,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	1	33,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 50: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite ulcerosa con localizzazione sigmoideo-rettale

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		RCU (2N= 66)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	43	65,2	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	23	34,8	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		RCU (N= 33)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	15	45,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	13	39,4	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	5	15,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	18	54,5	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 51: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite ulcerosa con localizzazione colico-sigmoido-rettale

FREQUENZE ALLELICHE	CONTROLLI (2N= 176)		RCU (2N= 14)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	139	79,0	9	64,3	NS	NC	NC
MCP-1 G	37	21,1	5	35,7	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	CONTROLLI (N= 88)		RCU (N= 7)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	57	64,8	4	57,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	25	28,4	1	14,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	6	6,8	2	28,6	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	31	35,2	3	42,9	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 52: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa con e senza familiarità per malattia infiammatoria cronica intestinale

FREQUENZE ALLELICHE	Fam no (2N= 106)		Fam si (2N= 6)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	75	70,8	8	100,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	31	29,2	0	0,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Fam no (N= 53)		Fam si (N= 3)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	29	54,7	2	66,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	17	32,1	1	33,3	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	7	13,2	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	24	45,3	1	33,3	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 53: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa fumatori o non fumatori

FREQUENZE ALLELICHE	Fumo no (2N= 72)		Fumo si (2N= 44)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	52	72,2	32	72,7	NS	NC	NC
MCP-1 G	20	27,8	12	27,3	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Fumo no (N= 36)		Fumo si (N= 22)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	21	58,3	12	54,5	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	10	27,8	8	36,4	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	5	13,9	2	9,1	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	15	41,7	10	45,5	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 54: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa con o senza manifestazioni extra intestinali

FREQUENZE ALLELICHE	Extra no (2N= 96)		Extra si (2N= 20)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	70	72,9	14	70,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	26	27,1	6	30,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Fumo no (N= 48)		Fumo si (N= 10)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	27	56,3	6	60,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	16	33,3	2	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	5	10,4	2	20,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	21	43,7	4	40,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 55: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa con o senza resistenza alla terapia con corticosteroidi

FREQUENZE ALLELICHE	Resistenti (2N= 6)		Non resistenti (2N= 110)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	5	83,3	79	71,8	NS	NC	NC
MCP-1 G	1	16,7	31	28,2	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Resistenti (N= 3)		Non resistenti (N= 55)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	2	66,7	31	56,4	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	1	33,3	17	30,9	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	0	0,0	7	12,7	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	1	33,3	24	43,6	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella 56: Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo A/G del gene di MCP-1 nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa che hanno dovuto ricorrere a chirurgia o meno

FREQUENZE ALLELICHE	Chirurgia no (2N= 108)		Chirurgia si (2N= 8)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A	78	72,2	6	75,0	NS	NC	NC
MCP-1 G	30	27,8	2	25,0	NS	NC	NC
FREQUENZE GENOTIPICHE	Chirurgia no (N= 54)		Chirurgia si (N= 4)		P*	O.R.	I.C.(95%)
	n	%	n	%			
MCP-1 A/A	31	57,4	2	50,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G	16	29,6	2	50,0	NS	NC	NC
MCP-1 G/G	7	13,0	0	0,0	NS	NC	NC
MCP-1 A/G+G/G	23	42,6	2	50,0	NS	NC	NC

O.R.= Odds Ratio

I.C.= Intervallo di confidenza

NS= Non Significativo

NC= Non Calcolato

P*= Test esatto di Fisher

Tabella.57 Frequenze alleliche di GSTT1 nella popolazione di controllo e nei soggetti con pancreatite acuta e cronica. Valori significativi per $p < 0.05$

	Numero tot.	GSTT1*A	GSTT1-null	p
Controlli	86	45 (52.3%)	41 (47.7%)	
PA	96	65 (67.7%)	31 (32.3%)	0.048.
PAR+PC	172	92 (53.5%)	80 (46.5%)	0.03

Tab.58 Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		MC (N= 48)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	37	77.1	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	11	22.9			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	47	98.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	1	2.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	41	85.4	0.003	8.34	0.97 – 71.95
	wt/mut	0	0.0	7	14.6			
	mut/mut							

MC = morbo di Crohn

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab59. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione ileale del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		MC ILEALE (N= 19)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	13	68.4	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	6	31.6			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	19	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	15	78.9	0.003	11.4	1.10 – 117.59
	wt/mut	0	0.0	4	21.1			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.60 Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione ileo-colica del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		MC ILEO-COL (N= 22)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	18	81.8	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	4	18.2			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	21	95.4	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	1	4.6			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	19	86.4	0.02	19.3	1.98-188.6
	wt/mut	0	0.0	3	13.6			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.61. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e variante stenotica del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		VAR STENOS (N= 20)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	15	75.0	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	5	25.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	20	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	17	85.0	0.02	23.0	1.13-467.15
	wt/mut	0	0.0	3	15.0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab 62. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e variante stenotante/fistolizzante del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		VAR ST./FIST. (N= 7)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	6	85.7	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	1	14.3			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	7	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	4	57.1	0.0008	28.5	2.10 – 385.9
	wt/mut	0	0.0	3	42.9			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.63. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione colica del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		MC COLICO (N= 6)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	5	83.3	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	1	16.7			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	6	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	6	100.0	NS	NC	NC
	wt/mut	0	0.0	0	0.0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.64. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e variante infiammatoria del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		VAR INFIAM (N= 17)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	13	76.5	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	4	23.5			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	17	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	16	94.1	NS	NC	NC
	wt/mut	0	0.0	1	5.9			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.65. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e variante fistolizzante del morbo di Crohn

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		VAR FISTOL (N= 4)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	3	75.0	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	1	25.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	3	75.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	1	25.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	4	100.0	NS	NC	NC
	wt/mut	0	0.0	0	0.0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.66. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e familiarità per IBD in pazienti affetti da morbo di Crohn

MUTAZIONI		FAM. NEG. (N= 42)		FAM.POS. (N= 6)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	34	81.0	3	50.0	NS	NC	NC
	R/W	8	19.0	3	50.0			
	W/W							
G908R	G/G	41	97.6	6	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	2.4	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	36	85.7	5	83.3	NS	NC	NC
	wt/ww	6	14.3	1	16.7			
	ww/ww							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.67. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e fumo in pazienti affetti da morbo di Crohn

MUTAZIONI		NON FUMAT. (N= 26)		FUMATORI (N= 22)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	19	73.1	18	81.8	NS	NC	NC
	R/W	7	26.9	4	18.2			
	W/W							
G908R	G/G	25	96.2	22	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	3.8	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	23	88.5	18	81.8	NS	NC	NC
	wt/mut	3	11.5	4	18.2			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.68. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e chirurgia per il trattamento di complicazioni in pazienti affetti da morbo di Crohn

MUTAZIONI		CHIRUR. NO (N= 24)		CHIRUR. SI (N= 24)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	18	75.0	19	79.2	NS	NC	NC
	R/W	6	25.0	5	20.8			
	W/W							
G908R	G/G	24	100.0	23	95.8	NS	NC	NC
	G/R	0	0.0	1	4.2			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	19	90.5	22	81.5	NS	NC	NC
	wt/mut	2	9.5	2	18.5			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.69. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e manifestazioni extraintestinali in pazienti affetti da morbo di Crohn

MUTAZIONI		EXTRA. NO (N= 42)		EXTRA. SI (N= 6)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	32	76.2	5	83.3	NS	NC	NC
	R/W	10	23.8	1	16.7			
	W/W							
G908R	G/G	41	97.6	6	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	2.4	0	0.0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	35	83.3	6	100.0	NS	NC	NC
	wtmut	7	16.7	0	0.0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.70. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e steroido-resistenza in pazienti affetti da morbo di Crohn

MUTAZIONI		STER-RES (N= 14)		NO STER-RES (N= 34)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	9	64.3	28	82.3	NS	NC	NC
	R/W	5	35.7	6	17.7			
	W/W							
G908R	G/G	14	100.0	33	97.1	NS	NC	NC
	G/R	0	0.0	1	2.9			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	11	78.6	30	88.2	NS	NC	NC
	wt/mut	3	21.4	4	11.8			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.71. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		RCU (N= 59)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	54	91.5	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	4	8.5			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	-	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	-	NC	NC
	wt/mut	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

RCU = rettocolite ulcerosa

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.72. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione colica della rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		LOC.COLICA (N= 15)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	13	86.7	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	2	13.3			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.73. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione a livello di sigma-retto della rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		LOC.SIG-RET (N= 34)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	31	91.2	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	3	8.8			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.74. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione rettale della rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		LOC.SIG-RET (N= 3)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	3	100.0	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	0	0.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.75. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e localizzazione a livello di colon-sigma-retto della rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CONTROLLI (N= 57)		LOC. C-S-R (N= 7)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	49	86.0	7	100.0	NS	NC	NC
	R/W	8	14.0	0	0.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.76. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e familiarità positiva per IBD in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		FAM.NEG. (N= 56)		FAM.POS. (N= 3)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	51	91.1	3	100.0	NS	NC	NC
	R/W	5	8.9	0	0.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.77. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e fumo in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		NON FUMAT. (N= 37)		FUMATORI (N= 22)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	34	91.9	20	90.9	NS	NC	NC
	R/W	3	8.1	2	9.1			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.78 Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e chirurgia per il trattamento di complicazioni in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		CHIR. NO (N= 56)		CHIR.SI (N= 3)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	52	92.3	2	66.7	NS	NC	NC
	R/W	4	7.4	1	33.3			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.79 Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e manifestazioni extraintestinali in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		EXTRA NO (N= 49)		EXTRA SI (N= 10)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	44	89.8	10	100.0	NS	NC	NC
	R/W	5	10.2	0	0.0			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

Tab.80. Correlazione statistica tra mutazioni di NOD2/CARD15 e steroido-resistenza in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa

MUTAZIONI		NO STER-RES (N= 56)		STER-RES (N= 3)		P	O.R.	C.I. (95%)
		n	%	n	%			
R702W	R/R	52	91.2	2	66.7	NS	NC	NC
	R/W	4	8.8	1	33.3			
	W/W							
G908R	G/G	56	98.2	59	100.0	NS	NC	NC
	G/R	1	1.8	0	0			
	R/R*							
1007fs	wt/wt	57	100.0	59	100.0	NS	NC	NC
	mut/wt	0	0.0	0	0			
	mut/mut							

O.R.= Odd Ratio

C.I.= Intervallo di Confidenza

BIBLIOGRAFIA

1. Cano DA, Hebrok M, Zencher M. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 745-762.
2. Spagnoli FM. From endoderm to pancreas: a multistep journey. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007; 64 (18): 2378-90 .
3. Stafford D, Hornbruch A et Al. A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev Genes Evol* 2004;214:432–441.
4. Dionigi R, Besozzi M, Carcano G. Pancreas. In: Dionigi R. *Chirurgia*. Milano: Masson 2002; pag 686-729.
5. Barbieri M, Carinci P. L'apparato digerente. In : *Embriologia*. Barbieri M, Carinci P. Casa Editrice Ambrosiana 1997: 263-284.
6. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997; 15: 106-110.
7. Sellick GS, Barker KT, Stolte-Dijkstra I, Fleischmann C, ColemanRJ, Garrett C, Gloyn AL, Edghill EL, Hattersley AT, Wellauer PK, Goodwin G, Houlston RS. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* 2004; 36: 1301-1305.
8. Rizzo R J, Szucs RA, Turner MA. Congenital abnormalities of the pancreas and biliary tree in adults. *Radiographics* 1995; 15 :49-68; 147-148.
9. Matos C, Metens T, Devière J, Delhaye M, MD, Le Moine O, Cremer M. Pancreas divisum: evaluation with secretin-enhanced magnetic resonance cholangiopancreatography. *Gastrointestinal Endoscopy* 2001; 53 (7): 728-733.
10. Kamisawa T, Egawa N, Tsuruta K, Okamoto A, Mtsukawa M. Pancreatitis associated with congenital abnormalities of the pancreaticobiliary system. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 223-229.
11. Varshney S, Johnson CD. Pancreas divisum. *Int J Pancreatol* 1999; 25: 135- 141.
12. Delhaye M, Engelholm L, Cremer M. Pancreas divisum: congenital anatomic variant or anomaly? Contribution of endoscopic retrograde dorsal pancreatography. *Gastroenterology* 1985; 89: 951-958.
13. Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Sugimoto Y, Kitagawa M, Suzuki T, Ogawa Y, Kato K, Katada N, Sano H. Pancreas divisum. A predisposing factor to pancreatitis? *Int J Pancreatol* 1989; 5: 317-326.
14. Eisenberger CF, Gocht A, Knoefel WT, Busch CB, Peiper M, Kutup A, Yekebas EF, Hosch SB, Lambrecht W, Izbicki JR. Heterotopic pancreas: clinical presentation and pathology with review of the literature. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 854-858.

15. Rubesin SE, Furth EE, Birnbaum BA, Rowling SE, Herlinger H. Ectopic pancreas complicated by pancreatitis and pseudocystformation mimicking jejunal diverticulitis. *Br J Radiol* 1997; 70: 311-313.
16. Emerson L, Layfield LJ, Rohr LR, Dayton MT. Adenocarcinoma arising in association with gastric heterotopic pancreas: a case report and review of the literature. *J Surg Oncol* 2004; 87: 53-57.
- 17 Bannister LH. Apparato digerente. In: Anatomia del Gray 4a edizione Vol 3 Bologna: Zanichelli 2001; pag 12.2-12.145.
18. Peracchi M, Corbetta S. Disordini del ricambio glucidico. In: Faglia G. Malattie del sistema endocrino e del metabolismo. McGraw-Hill 2002: 407- 462.
19. Young B, Heath JW. Fegato e pancreas. In: *Wheater. Istologia e anatomia microscopica*. Casa Editrice Ambrosiana 2001: 274-285.
20. Gratin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 504-510.
- 21 Colomb E Figarella C. Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1979;571:343–351.
- 22 Kutchai HC. Il sistema gastrointestinale. In: Berne RM, Levy MN. Fisiologia. Milano: Casa Editrice Ambrosiana 2000; pag. 621-711.
- 23 Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 1975;189:347–58.
- 24 Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006;38 1024–1030.
- 25 Huang AY, Castle AM et Al. Resting (basal) secretion of proteins is provided by the minor regulated and constitutive-like pathways and not granule exocytosis in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 2001;276 (25):22296–306.
- 26 Adler G, Beglinger C et Al. Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991;100:537–43.
- 27 McManaman JL, Reyland ME et Al. Secretion and Fluid Transport Mechanisms in the Mammary Gland: Comparisons with the Exocrine Pancreas and the Salivary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006 11:249–268.
28. Whitcomb DC, Gorry MC et Al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141–5.
29. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007 Apr;132 (4): 1557-73.

30. Moran LA, Scrimgeour KG, Horton HR, Ochs RS, Rawn JD. La digestione. In: *Biochimica*. McGraw Hill.1996: 497-521.
31. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1-17.
32. Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett A. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens: activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen 1. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988; 369 (Suppl): 293-8.
33. Etemad B, Withcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001 Feb;120 (3): 682-707.
34. Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology* 1981; 80: 461-473.
35. Appelt G, Schulze B, Rogos R, Kopperschlager G. Analysis of human exocrine pancreatic proteins by means of pore gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomed Biochim Acta* 1988; 47: 133-140.
- 36 Dervenis C, Johnson CD et Al. Diagnosis, objective assessment of severity and management of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;25:195-210.
- 37 Steinberg W, Tenner S. Acute Pancreatitis. *N Engl J Med* 1994;330:1198-210.
- 38 Kingsnorth A, O'Reilly D et Al. Acute Pancreatitis. *BJM* 2006;332:1072-1076.
- 39 Eland IA, Sturkenboom MJ et Al. Incidence and mortality of acute pancreatitis between 1985–1995. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1110–6.
- 40 Papachristou GI, Whitcomb DC. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2004;33:871-90.
- 41 Beckingham IJ, Bornman PC. Acute Pancreatitis. *BMJ* 2001;322:595-598.
- 42 Testoni PA, Ventrucchi M. Pancreatiti Acute. In: *Manuale di gastroenterologia Unigastro*. Roma: Editrice gastroenterologica italiana 2004; pag. 239-249.
- 43 Pandol SJ, Saluja AK et Al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007; 132(3): 1127-1151.
- 44 Robert JH, Frossard JI et Al. Early prediction of acute pancreatitis: prospective study comparing computed tomography scans, Ranson, Glasgow, Acute physiology And Chronic Health Evaluation-II scores, and various serum markers. *World J Surg* 2002;26:612-19.
- 45 Cavallini G, Frulloni L. A prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig Liver Dis* 2004;36(3):205-11.
- 46 Uomo G, Pezzilli R et Al. Diagnostic assesment and outcome of acute pancreatitis in Italy: results of a prospective multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007, doi:10.11016/j.dld.2007.05.009.

- 47 Sarles H. Proposal adopted unanimously by the participants of the Symposium, Marseilles 1963. *Bibl Gastroenterol* 1965;7:7-8.
- 48 Sarner M, Cotton PB. Classification of pancreatitis. *Gut* 1984;25:756-9.
- 49 Singer MV, Gyr KE et Al. Revised classification of pancreatitis: report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology* 1985;89:683-5.
- 50 Sarles H, Adler G et Al. The pancreatitis classification of Marseilles-Rome 1988. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:641-2.
- 51 Bradley EL III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta GA, September 11, through 13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128:586-590.
- 52 Ranson JHC, Rifkind KM et Al. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Gynaecol Obstet* 1974;139:69-81.
- 53 Knaus WA, Draper EA et Al. APACHE-II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829.
- 54 Mayerle J, Simon P et Al. Medical Treatment of acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2004; 33(4): 855-869.
- 55 Mitchell RMS, Byrne MF et Al. Pancreatitis. *Lancet* 2003;361:1447-55.
- 56 UK Working Party on Acute pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. *Gut* 2005;54(Suppl III):iii1-iii9.
- 57 Chwistek M, Roberts I et Al. Gallstone pancreatitis: a community teaching hospital experience. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:41-44.
- 58 Levy P, Boruchowicz A et Al. Diagnostic criteria in predicting a biliary origin of acute pancreatitis in the era of endoscopic ultrasounds: multicentre prospective evaluation of 312 patients. *Pancreatology* 2005;5:450-456.
- 59 Lee SP, Nicholls JF et Al. Nature and composition of biliary sludge *Gasroenterolgy* 1986;90:677-86.
- 60 Opie EL. The aetiology of acute haemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1901;12:182-188.
- 61 Voronina S, Longbottom R et Al. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J Physiol* 2002;540:49-55.
- 62 Mooren FC, Hlouschek T et Al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J biol Chem* 2003;278:9361-9369.
- 63 Pandol SJ, Gukovsky A et Al. Emerging concepts for the mechanism of alcoholic pancreatitis from experimental models. *J Gastroenterol* 2003;38:623-628.

- 64 Gullo L, Migliori M et Al. Alcoholic Pancreatitis: new insights into an old disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7(2):96-100.
- 65 Migliori M, Manca M et Al. Does acute alcoholic pancreatitis precede the chronic form or is the opposite true? A histological study. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:272-5.
- 66 Forsmark CE, Baillie J; AGA Institute Clinical Practice and Economics Committee; AGA Institute Governing Board. AGA Institute medical technical review on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132(5): 2022-2044.
- 67 Runzi M, Layer P. Drug-associated pancreatitis: facts and fiction. *Pancreas* 1996;13:100-109.
- 68 Cope O, Culver PJ et Al. Pancreatitis, a diagnostic clue to hyperparathyroidism. *Ann Surg* 1957;145:857-863.
- 69 Mithofer K, Fernandez-Del Castillo C et Al. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology* 1995;109:239-246.
- 70 Whitcomb DC. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;116:770-773.
- 71 Yadav D, Pithumoni CS. Issues in Hyperlipidemic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:54-62.
- 72 Parenti DM, Steinberg W et Al. Infectious causes of acute pancreatitis, *Pancreas* 1996;13:356-371.
- 73 Jerrel TR, Chapman N. Animal model of alcoholic pancreatitis: role of viral infection. *Pancreas* 2003;27(4):301-304.
- 74 Finkelberg DL, Sahani D et Al. Autoimmune pancreatitis *N Engl J Med* 2006;355:2670-6.
- 75 Bhatia M, Brady M et Al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190: 117-125.
- 76 Saluja AK, Saluja M et Al. Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzymes secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8968-71.
- 77 Saluja A, Hashimoto S et Al. Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during cerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1987;253:G508-G516.
- 78 Lerch MM, Halangk W et Al. The role of cysteine proteases in intracellular pancreatic serine protease activation. *Adv Exp Med Biol* 2000; 477: 403-411.
- 79 Whitcomb DC, Gorry MC et Al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141-5.
- 80 Naruse S. Molecular pathophysiology of pancreatitis. *Intern Med* 2003; 42: 288-289

- 81 Gucovskaya AS and Pandol SJ. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology* 2004;4:567-586.
- 82 Mareninova OA, Sung KF et Al. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem* 2006;281:3370-81.
- 83 Bhatia M, Ramnath RD et Al. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288: G1259–G1265.
- 84 Adams DH and Lloyd AR. Chemochines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997;349:490-5.
- 85 Gukovskaya AS, Gukovsky I et Al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997;100:1853–1862.
- 86 Hofbauer B, Saluja AK, et Al: Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1998;115:1238-1247.
- 87 Grady T, Liang P et Al. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells in an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1966-1975.
- 88 Brady M, Bathia M et Al. Expression of MCP-1/JE and Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;25(3):260-9.
- 89 Bathia M, Brady M, et Al. MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G77-G85.
- 90 Yang BM, Demaine AG et Al. Chemokines MCP-1 and RANTES in isolated rat pancreatic acinar cells treated with CCK and ethanol in vitro. *Pancreas* 2000;21:22-31.
- 91 Andoh A, Takaia H et Al. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1 and RANTES) gene expression in human pancreatic peri-acinar myofibroblast. *Gastroenterology* 2000;119:211-9.
- 92 Rau B, Baumgart K et Al. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patient with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003;29:622-9.
- 93 Testoni PA, Ventrucci M. Pancreatiti Acute. In: Manuale di gastroenterologia Unigastro. Roma: Editrice gastroenterologica italiana 2004; pag. 239-249.
- 94 Hruban RH, Wilentz RE. Il pancreas. In: Robbins e Cotran Le basi patologiche delle malattie. 7a edizione Elsevier Italia; pag. 939-953.
- 95 Whitcomb DC. Acute Pancreatits. *N Engl J Med* 2007;354:2142-50
- 96 Toouli J, Brooke-Smith M et Al. Guidelines for the managment of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:S15-39.
- 97 Papachristou GI, Clermont G et Al. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36:277-296.

- 98 Yadav D, Agarwai N et Al. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. *Am J gastroenterol* 2002;97:1309-18.
- 99 Banks PA. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:337- 386.
- 100 Johnson CD. ABC of the upper gastrointestinal tract. Upper abdominal pain: Gall Bladder. *BMJ* 2001;323:1170-3.
- 101 Chwistek M, Roberts I et Al. Gallstone pancreatitis: a community teaching hospital experience. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:41-44.
- 102 Romagnuolo J, Currie G et Al. Noninvasive vs. selective invasive biliary imaging for acute biliary pancreatitis:an economic evaluation by using decision tree analysis. *Gastrointest Endosc* 2005;61:86-97.
- 103 Ayub K, Imada R et Al. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in gallstone-associated acute pancreatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 3. Art. No.: CD003630.
- 104 Balthazar EJ, Robinson DL et Al. Acute pancreatitis:value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990 (174):331-336.
- 105 Hwang TL, Chang KI et Al. Contrast-enhanced dynamic computed tomography does not aggravate the clinical severity of patients with severe acute pancreatitis: reevaluation of the effect of intravenous contrast medium on the severity of acute pancreatitis. *Arch Surg* 2000;135:287-290.
- 106 Arvanitakis M, Delhaye M et Al. Computed tomography and magnetic resonance imaging in the assessment of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004;126:715-723.
- 107 Harrison DA, D'Amico G et Al. The Pancreatitis Outcome Prediction (POP) score: a new prognostic index for patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2007;35(7):1703-08.
- 108 Imrie CW, Benjamin IS et Al. A single center double blind trial of traslyol therapy in primary acute pancreatitis. *Br J Surg* 1978;65:337-341.
- 109 Le Gall JR, Lemeshow S et Al. A new simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957-63.
- 110 Chatzicostas C, Roussomoustakaki M et Al. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE-II and III scoring systems in predicting acute pancreatitis outcome. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:253-60.
- 111 Martinez J, Johnson CD et Al. Obesity a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis *Pancreatology* 2006(6):206-209.
- 112 Papachristou GI, Papachristou DJ et Al. Obesity increasis the severity of acute pancreatitis:performance of APACHE-0 score and correlation with the inflammatory response.*Pancreatology* 2006(6):279-285.
- 113 Johnson CD, Toh SK et Al. Combination of APACHE-II score and obesity score (APACHE-0) for the prediction of severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2004(4):1-6.

- 114 Buscher HC, Jacobs ML et Al. Beta cells function of the pancreas after necrotizing pancreatitis. *Dig Surg* 1999;16:496-500.
- 115 Bailille J. Pancreatic pseudocysts (part I) *Gastroinest Endosc* 2004;59:873-879.
- 116 Bailille J. Pancreatic pseudocysts (part II) *Gastroinest Endosc* 2004;60:105-113.
- 117 Bornman PC, Beckingham IJ. Chronic Pancreatitis. *BMJ* 2001;322:660-3.
- 118 Vitas GJ, Sarr MG. Selected management of pancreatic pseudocysts: operative versus expectant management. *Surgery* 1992;111:123-30.
- 119 Steer ML, Waxam I et Al. Chronic Pancreatitis *N Engl J Med* 1995;332:1482- 90.
- 120 Petrov MS, Kukosh MV et Al. A randomized controlled trial of enteral versus parenteral feeding in patients with predicted severe acute pancreatitis shows a significant reduction in mortality and in infected pancreatic complications with total enteral nutrition *Dig Surg* 2006;23:336-345.
- 121 Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis *Am J Gastroenterol* 2006;101:2379-2400.
- 122 Pederzoli P, Bassi C et Al. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem *Surg Gynecol Obstet* 1993;176:480-483.
- 123 Bassi C, Larvin M et Al. Antibiotic therapy for prophylaxis against infections of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD002941-CD002941.
- 124 Dellinger EP, Tellado JM et Al. Early Antibiotic Treatment for Severe Acute Necrotizing Pancreatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study *Ann Surg* 2006.
- 125 Andriulli A, Leandro G et Al. Meta-analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:237-245.
- 126 Audrezet MP, Chen JM et Al. Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2005;10:100-106.
- 127 Gullo L, Migliori M et Al. An update on recurrent acute pancreatitis :data from five Europeans countries *Am J Gastroenterol* 2002;97:1959-62.
- 128 Zhang W, Shan HC et Al. Recurrent acute pancreatitis and its relative factors. *World J Gastroenterol* 2005;11(19):3002-4.
- 129 Somogyi L, Martin SP et Al. Recurrent Acute Pancreatitis: an algorithmic approach to identification and elimination of inciting factors *Gastroenterology* 2001;120:708-717.

- 130 Lee SP, Nicholls JF et Al. Biliary sludge as a cause of acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1992;326:589-93.
- 131 Levy MJ, Geenen JE. Idiopathic acute recurrent pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96(9):2540-2555.
- 132 Cotton PB. Congenital anomaly of pancreas divisum as a cause of obstructive pain and pancreatitis. *Gut* 1980;21:105-114.
- 133 Jacob L, Geenen JE et Al. Clinical presentation and short-term outcome of endoscopic therapy of patients with symptomatic incomplete pancreas divisum. *Gastrointest Endosc* 1999;49:53-7.
- 134 Dray X, Fajac I et Al. Association of pancreas divisum and recurrent acute pancreatitis with the IVS8-5T-12TG allele of the CFTR gene and CFTR dysfunction. *Pancreas* 2007;35(1):90-93.
- 135 Gelrud A, Sheth S et Al. Analysis of cystic fibrosis gene product (CFTR) function in patients with pancreas divisum and recurrent acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1557-1562.
- 136 Douie WJ, Krige JE et Al. Annular pancreas in adults. A report of two cases and a review of the literature. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1716–1718.
- 137 Okada A, Higaki J et Al. Pancreatitis associated with choledochal cyst and other anomalies in childhood *Br J Surg* 1995;82:829-32.
- 138 Kochhar R, Nagi B et Al. The clinical spectrum of anomalous pancreaticobiliary junction. *Gastrointest Endosc* 1989;3:83-6.
- 139 Hogan WJ, Geenen JE et Al. Dysmotility disturbances of the biliary tract: classification, diagnosis, and treatment. *Semin Liver Dis* 1987;7:302-10.
- 140 Perrault J. Hereditary pancreatitis. *Gastroenterol. Clin North Am.* 1994;23:743- 52.
- 141 Sahin-Toth M, Toth M et Al. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance auto-activation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:286-9.
- 142 Teich N, Le Marechal C et Al. Interaction between trypsinogen isoforms in genetically determined pancreatitis: mutation E79K in cationic trypsin (PRSS1) causes increased transactivation of anionic trypsinogen (PRSS2). *Hum Mutat* 2004;23:22-31.
- 143 Nemoda Z, Sahin-Toth M et Al. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem* 2006;281:11879-886.
- 144 Le Marechal C, Masson E et Al. Hereditary pancreatitis caused by a triplication of the trypsinogen locus. *Nat Gen* 2006;38:1372-74.
- 145 Teich N, Ockenga J et Al. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 2000;119:461–465.
- 146 Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-33.

- 147 Rosestein BJ, Zeitlin PL et Al. Cystic fibrosis *Lancet* 1998;351:277-81.
- 148 Stafford RJ, Grand RJ. Hereditary disease of the exocrine pancreas. *Clin Gastroenterol* 1982;11:141-70.
- 149 Durie PR. Pancreatic aspects of cystic fibrosis and other inherited causes of pancreatic dysfunction. *Med Clin North Am* 2000;84:609-620.
- 150 Ahmed N, Corey M et Al. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut* 2003;52(8):1159-64.
- 151 Tzetzis M, Kaliakatsos M et Al. Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the cationic trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis. *Clin Genet* 2007;71:451-7.
- 152 Frulloni L, Castellani C et Al. Natural history of pancreatitis associated with cystic fibrosis gene mutations. *Digestive and Liver Disease* 2003;35:179-85.
152. Ahmed SA, Wray C, Rilo HL, Choe KA, Gelrud A, Howington JA, Lowy AM, Matthews JB. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. *Curr Probl Surg.* 2006 Mar; 43 (3): 127-238.
153. Banks P. Classification and diagnosis of chronic pancreatitis. *J Gastroenterology* 2007; 42 [Suppl XVII]: 148-151.
154. Kim KP, Kim MH, Song MH, Lee SS, Seo DW, Lee SK. Autoimmune chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1605-16.
155. Nahon Uzan K, Levy P, O'Toole D, et al. Is idiopathic chronic pancreatitis an autoimmune disease? *Clin GastroenteTrol Hepatol* 2005; 3: 903-9.
156. Tandon RK. Tropical pancreatitis. *J Gastroenterol* 2007; 42 [Suppl XVII]: 141-147.
157. Balaji LN, Tandon RK, Garg PK, Tandon RK, Tandon BN, Banks A. Prevalence and clinical features of chronic pancreatitis in southern India. *Int J Pancreatol* 1994; 15: 29-34.
158. Comfort MW, Gambill EE, Baggenstoss AH. Chronic relapsing pancreatitis. A study of twenty-nine cases without associated disease of the biliary or gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1946; 6: 239-85, 376-408.
159. Schneider A, Löhr JM, Singer MV. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol* 2007; 42 :101-119.
160. Ammann RW. Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge. *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 166-174.
161. Otsuki M. Symposium 3. Chronic pancreatitis: current problems of the diagnostic criteria.
162. Chari ST, Singer MV. The problem of classification and staging of chronic pancreatitis. Proposals based on current knowledge of its natural history. *Scan J Gastroenterol* 1994; 29: 949-60.

163. Ammann RW. A clinically based classification system for alcoholic chronic pancreatitis: summary of an international workshop on chronic pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14 (3): 215-21.
164. Uomo G. How far are we from the most accurate classification system for chronic pancreatitis? *JOP. J Pancreas (online)* 2002; 3 (3): 62-65.
165. Homma T, Harada H, Koizumi M. Diagnostic criteria for chronic pancreatitis by the Japan Pancreas Society. *Pancreas* 1997 Jul;15 (1): 14-5.
166. Ramesh H. Proposal for a new grading system for chronic pancreatitis: the ABC system. *J Clin Gastroenterol.* 2002 Jul; 35 (1): 67-70.
167. Bagul A, Siriwardena AK. Evaluation of the Manchester classification System for chronic pancreatitis. *JOP. J Pancreas (online)* 2006; 7 (4): 390-396.
168. Freedman SD, Sakamoto K, Venu RP. GP 2, the homologue to the renal cast protein uromodulin, is a major component of intraductal plugs in chronic pancreatitis. *J Clin Invest* 1993; 92: 83-90.
169. Cavallini G, Frulloni L. Autoimmunity and Chronic Pancreatitis: A Concealed Relationship. *JOP. Journal of the Pancreas (Online)* 2001; 2 (2): 61-68.
170. Ammann RW; Muellhaupt B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut* 1994; 35: 552-6.
171. Durbec J, Sarles H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic disease. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. *Digestion* 1978; 108: 297-99.
172. Haber P, Wilson J, Apte M, Korsten M, Pirola R. Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis: still an enigma. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 305-312.
173. Renner IG, Rinderknecht H, Valenzuela JE, Douglas AP. Studies of pure pancreatic secretions in chronic alcoholic subjects without pancreatic insufficiency. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 241-244.
174. Apte MV, Norton ID, Haber PS, et al. Both ethanol and protein deficiency increase messenger RNA levels for pancreatic lithostathine. *Life Sci* 1996; 58: 485-492.
175. Apte MV, Norton ID, Haber PS, et al. Chronic ethanol administration decreases rat pancreatic GP 2 content. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1336: 89- 98.
176. Werner J, Hackert T, Hartwig W, Gebhard MM, Buchler MW. Alcoholic pancreatitis: induction of microcirculatory disturbances and inflammatory cascade by chronic alcohol intake. *Pancreas* 2005; 31 (4): 479.
177. Werner J, Hackert T, Hartwig W, Gebhard MM, Buchler MW. Alcoholic pancreatitis; detailed characterisation of microcirculatory disturbances and leukocyte adhesion. *Pancreas* 2005; 31 (4): 479.

178. Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2256-2270.
179. Omary MB, Lugea A, Lowe AL, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117 (1): 50-59.
180. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat. Jpn* 1982; 58: 837-858.
181. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture. *Gut* 1998; 43:128-133.
182. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, et al. Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-32.
183. Yokota T et al. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *J. Surg. Res.* 2002; 104: 106-111.
184. Zimmermann A, et al. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut.* 2002; 51: 574-578.
185. Lugea A, et al. Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice. *Gastroenterology.* 2006; 131: 885- 899.
186. Talamini G, Bassi C, Falconi M, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, Bovo P, Rigo L, Castagnini A, Angelini G, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. Cigarette smoking: an independent risk factor in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 1996; 12: 131-137.
187. Talamini G, Bassi C, Falconi M, et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1303-11.
188. Chowdhury P, Rayford PL. Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 869-77.
189. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. *Pancreas* 2000; 21:109-114.
190. Maisonneuve P, Lowenfels AB, Mullhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L, Frulloni L, Ammann RW. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut.* 2005; (4): 510-4.
191. Tim Strate, Emre Yekebas, Wolfram T. Knoefel, Christian Bloechle and Jakob R. Izbicki. Pathogenesis and the natural course of chronic pancreatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2002, 14: 929-934.
192. Fortson MR, Freedman SN; Webster PD III. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2134-2139.

193. Mergener K, Baillie J. Chronic Pancreatitis. *Lancet* 1997; 340: 1379-1385.
194. Riinzi M, Layer P. Drug-Associated Pancreatitis: Facts and Fiction. *Pancreas*.1996; 13 (1): 100-109.
195. Lerch MM, Hoppe-Seyler P, Gerok W. Origin and development of exocrine pancreatic insufficiency in experimental renal failure. *Gut* 1994; 35 (3): 401-7.
196. Comfort M, Steinberg A. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952; 21: 54-63.
197. Cavestro GM et al. Genetics of chronic pancreatitis. *JOP. Journal of the pancreas (online)* 2005; 6 (1): 53-59.
198. Witt et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nature Genetic* 2006; 38 (6): 668-673.
199. Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis: a model for inflammatory diseases of the pancreas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; 16 (3): 347-363.
200. Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996; 110: 1975-80.
201. Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early-and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1481-1487.
- 202 Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339: 645-652.
203. Crawford JM, Cotran R. Il pancreas. In: Robbins. Le basi patologiche delle malattie. VI Edizione Piccinn 2000: 1055-1085.
204. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339: 653-8.
205. Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 117: 7-10.
206. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25: 213-6.
207. Pfutzer RH, Barmada MM, Brunskill APJ, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119: 615-623.
208. Tandon RK, Garg PK. Tropical pancreatitis. *Dig Dis* 2004; 22: 258-66

209. Garg PK, Tandon RK. Survey on chronic pancreatitis in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 998-1004.
210. Braganza JM. Pancreatic disease: a casualty of hepatic “detoxification”? *Lancet* 1983; 2: 1000-1002.
211. Braganza JM, Schofield D, Snehalatha C, Mohan V. Micronutrient antioxidant status in tropical compared with temperate zone chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 1098-104.
212. McCloy R. Chronic pancreatitis at Manchester, UK. Focus on antioxidant therapy. *Digestion* 1998; 59 Suppl 4: 36-48.
213. Braganza JM. A framework for the etiogenesis of chronic pancreatitis. *Digestion* 1998; 59 Suppl 4: 1-12.
214. Choudhary A, Garg PK, Tandon RK. The role of oxidative stress in tropical pancreatitis and effect of antioxidants supplementation on pain in patients with tropical pancreatitis (abstract). *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16 Suppl: A 132.
215. Hassan Z, Mohan V, McDermott MF, Ali L, Ogunkolade WB, Aganna E, et al. Pancreatitis in fibrocalculous pancreatic diabetes mellitus is not associated with common mutations in the trypsinogen gene. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16: 454-7.
216. Hassan Z, Mohan V, Ali L, Allotey R, Barakat K, Farugue MO, et al. *SPINK 1* is a susceptibility gene for fibrocalculous pancreatic diabetes in subjects from the Indian subcontinent. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 964-8.9.
217. Rossi L, Pfutzer RH, Parvin S, Ali L, Sattar S, Khan AK et al. *SPINK1/PSTI* mutations are associated with tropical pancreatitis in Bangladesh: a preliminary report. *Pancreatology* 2001; 1: 242-5.
217. Bhatia E, Choudhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, et al. Tropical calcific pancreatitis: strong association with *SPINK1* trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology* 2002; 123: 1020-5.9.
218. Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality: proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1561-8.
219. Ammann RW, Muellhaupt B, Zurich Pancreatitis Study Group. The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1999; 116: 1132-1140.
220. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Peros G. Mechanisms and Natural History of Pain in Chronic Pancreatitis A Surgical Perspective. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 689-699.
221. Fasanella KE, Davis B, Lyons G, Chen Z, Lee KK, Slivka A, Whitcomb DC. Pain in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36: 335-364.
222. Cavallini G, Vaona B. Pancreatite cronica. In: Unigastro. *Manuale di Gastroenterologia*. Editrice Gastroenterologica Italiana 2004-2006: 251-257.

223. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.
224. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. International Pancreatitis Study Group. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 1433-1437.
- 225 Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.
- 226 Rollins BJ, Walz A et Al. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 1991;78(4):1112-16.
- 227 Berliner JA, Valente AJ et Al. Monocyte chemotactic factors produced by endothelial cells are immunologically related to the factor produced by smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1989;9:697.
- 228 Mazzucchelli L, Hauser C et Al. Differential in situ expression of genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1996;178:201-6.
- 229 Ghosh S, May MJ et Al. NF-kappaB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260.
- 230 Ueda, A., Okuda, K et Al. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 1994;153:2052– 2063.
- 231 Rovin BH, Lu L et Al. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259:344-8.
- 232 Szalai C, Kozma GT et Al. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108: 375-381.
- 233 Aguilar F, Gonzalez-Escribano MF et Al. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2001;58: 335-8.
- 234 Szalai C, Duba J et Al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001;158: 233-239.
- 235 Herfart H, Goke M et Al. Polymorphism of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:401-5.
- 236 Muhlbauer M, Bosserhoff AK et Al. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003;125:1085-1093.
- 237 Papachristou GI, Sass DA et Al. Is the Monocyte Chemotactic Protein-1 -2518 G allele a risk factor for severe acute pancreatitis? *Clinic Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:475-481.
- 238 Kloppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993;8:659–670.

- 239 Marra F, de Franco R et Al. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998;152:423-30.
- 240 Gharaee-Kermani M, Denholm EM et Al. Costimulation of fibroblast collage and transforming growth factor beta 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996;27:17779-84.
- 241 Inoue M, Ino Y et Al. The role MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) in experimental chronic pancreatitis model induced by dibutyltin dichloride in rats. *Pancreas* 2002; 25:64-70.
- 242 Saurer L, Reber P et Al. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 356-67.
- 243 Zhao HF, Ito T et Al. Anti- monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy attenuates experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride in rats. *Gut* 2005; 54:1759-67.
- 244 Apte MV, Haber PS et Al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for fibrogenesis. *Gut* 1999;44:534-41.
- 242 Marra F. Renaming cytokines:MCP-1, major chemokine in pancreatitis. *Gut* 2005;54:1679-81.
- 243 Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14:145-54.
- 244 Sass, Papachristou et Al. The MCP-1 polymorphism is not a suscepibility factor for chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2006;6(4):297-300.
- 245 M.Coggan, L.Whitbread, A.Whittington, P.Board, Structure and organisation of the human Theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase complex, *Biochem-J*.1998,334,617-623.
- 246 S. Pemble, Human GSTT1: cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism, *Biochem. J.* (1994) 300, 271-276.
- 247 Sakhawat H, Rahman, Khadja Ibrahim, Michael Larvin, Andrei Kingsnorth, Michael J McMahon, Association of antioxidant enzyme gene polymorphism and Glutathione status with severe acute pancreatitis, *Gastroenterology* 2004;126:1312-1322.
- 248 Southgate DAT: Digestion and metabolism of sugars, *Am J Clin Nutr* 62:s203,1995.
- 249 Milliard ME, Stevens RB, Mann GE: Amino Acid transport by small intestinal, hepatic and pancreatic epithelia, *Gastroenterology* 108:888,1995.
- 250 Davidson NO: Intestinal lipid absorption.In Yamada T (a cura di: Textbook of gastroenterology,3°ed.,Philadelphia,1999,Lippincott Williams &Wilkins.
- 251 Allayee H, Lafitte BA, Louis AJ: An absorbing study of cholesterol, *Science* 290:1709,2000.
- 252 Rose RC, Intestinal absorption of water-soluble vitamins, *Annu Rev Nutr* 212:191,1996.

- 253 Wasserman et al., Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane, *J Nutr* 122:622,1992.
- 254 Ciacci C, Mazzacca G. Fisiopatologia dell'intestino tenue. In *Manuale di Gastroenterologia*. Casa Editrice Gastroenterologica Italiana 2004-2006;pag 411-416.
- 255 Medzhitov R , Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
- 256 Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50-3.
- 257 Elson OC. Gene, microbes and T cells- New therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med*, 2002; 346:614-616.
- 258 Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-6.
- 259 Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*1998;282:2085-8
- 260 Hiroaki Mitsuzawa, Chiaki Nishitani, Naoki Hyakushima, et al. Recombinant Soluble Forms of Extracellular TLR4 Domain and MD-2 Inhibit Lipopolysaccharide Binding on Cell Surface and Dampen Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Inflammation in Mice. *The Journal of Immunology*, 2006, 177:8133-8139.
- 261 Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Eng J* 2000; 343:338-344
- 262 Barton GM and Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003 300:1 524-1525.
- 263 Barnes PJ, Karin M. A pivotal transcription factor in Chronic inflammatory disease. *N Eng J* 1997; 336:1066-1071.
- 264 Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implication for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34:2052-9.
- 265 Kufer TA, Kremmer E, et al. Role for Erbin in Bacterial Activation of Nod2. *Infection and immunity* 2006; 74:3115-3124.
- 266 MC, Gong Y Zhang M, et al. Reciprocal Cross-talk between Nod2 and TAK1 Signaling Pathways. *J Biol* 2004, 279: 25876-25882.
- 267 Yan SR, Joseph RR, Wang J, et al. Differential Pattern of Inflammatory Molecule Regulation in Intestinal Epithelial Cells Stimulated with IL-1. *The Journal of Immunology* 2006, 177: 5604-5611
- 268 Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kB target genes. *Nature* 2001;414:313-317.
- 269 Van Kruiningen, H.J. et al 2002. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflamm. Bowel Dis.* 8:180-185) Peyer's patches and M cell as potential sites of the inflammatory bonset in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci.*2006;1072:218-32.

- 270 Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J et al. Apoptosis: one of the mechanism that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 2001;166(10):6399-403.
- 271 Monteleone G, Pallone F, Mac Donald TT. Smad7 in TGF-b-mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends in immunology* 2004; 25:514-517.
- 272 Perlman R, Schiemann PW, et al. TGF-b-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001;3:708-714
- 273 Edward V. Loftus, Jr. The New Epidemiology of IBD: A Unique Phenomenon or Part of a Global Trend? *Inflamm Bowel Dis & Volume 12, Supplement 3, October 2006.*
- 274 Tonelli F, Fazi M, Ficari F, Garcea A. Malattie infiammatorie croniche intestinali. In Dionigi R. *Chirurgia. generale. IV ed. Vol. 1. Masson, Milano 2002. pag. 800-813*
- 275 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *New Eng J Med* 2002;347:417-429.
- 276 Pizarro TT, Cominelli F. Cytokine Therapy for Crohn's Disease: Advances in Translational Research. *Annu Rev Med.* 2007 Feb 18;58:433-444.
- 277 Weber CR, Turner JR. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* 2007;56:6-8.
- 278 James SP. Remission of Crohn's disease after human immunodeficiency virus infection, *Gastroenterology* 1988; 95:1667-9.
- 279 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182:1281-90.
- 280 Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S. et al. Up-Regulation of the IL-12 Receptor b2 Chain in Crohn's Disease. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 7234-7239.
- 281 Pizarro T, Miette HM, Bentz JW, et al. IL-18, a Novel Immunoregulatory Cytokine, Is Up-Regulated in Crohn's Disease: Expression and Localization in Intestinal Mucosal Cells. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 6829-6835.
- 282 Girardin SR, Boneca IG, Viala J, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278:8869-72.
- 283 Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*.2003;124:140-6.
- 284 Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implication for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34:2052-9
- 285 Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124:140-6

- 286 Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-9.
- 287 Halstensen TS, Das KM, Brandtzaeg P, et al. Epithelial deposits of immunoglobulin G1 and activated complement colocalise with the M(r) 40 kD putative autoantigen in ulcerative colitis. *Gut* 1993;34:650-7.
- 288 Thoree VC, Golby SJC, Boursier L, et al. Related IgA1 and IgG producine. *Gut*, July 2002,51:44-50
- 289 Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, et al. Protective role of appendicectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51:808-13.
- 290 Pospisil R, mage RG. Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. *Curr. Top. Microbiol. Immonol.* 1998; 229:59-70.
- 291 Lindberg E, Tysk C, Andersson K, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1988; 29:352-357.
- 292 Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflammatory Bowel Disease* 2000 May;6:107-15
- 293 Strober W, FussIJ, Oshima S, et al. The immunological of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:495-549.
- 294 Harper PH, Lee EC, Kettlewel MG, et al. Role of the fecal stream in the manteinance of Crohn's colitis. *Gut* 1985;26:279-284
- 295 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44-54
- 296 Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:1034-41
- 297 Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55:205-11.
- 298 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52:237-42
- 299 Paul B. Eckburg1 and David A. Relman. The Role of Microbes in Crohn's Disease. *CID* 2007;44 (15 January) 256-262.
- 300 Cope GF, Heatley RV. Sigarette smoking and intestinal defeneces. *Gut* 1992;33:721-3.
- 301 Srivatava ED, Russel MA, Feyerrabend C, et al. Effect of ulcerativae colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut* 1990;31:1021-4
- 302 Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2006 Nov;81(11):1462-71.

- 303 Seidelin JB, Nielsen OH. Transdermal nicotine treatment of ulcerative colitis: a survey of a Cochrane review *Ugeskr Laeger*. 2006 Feb 13;168(7):674-7. Review. Danish
- 304 Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006 Nov;81(11):1462-71.
- 305 Andersson RE, Olaison G, Tysk C, et al. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Eng J* 2001; 344:808-814.
- 306 Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, Bjornsson E, Bjarnason I. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Feb;4(2):196-202
- 307 Evans JMM, McMahon AD, Murray FE, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40:619-22
- 308 Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, et al. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 1999;45:218-22.
- 309 Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3:47-52.
- 310 Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl Med* (1991);324:84-8
- 311 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Laesage S, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- 312 Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis. Rationale, methodology and present status of the field. *Inflammatory bowel disease* 2004;10:300-11.
- 313 Suzanne Lesage, Habib Zouali, Jean-Pierre Ce'zard and the EPWG-IBD group. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 70:845-857, 2002
- 314 Girardin SR, Boneca IG, Viala J, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278:8869-72
- 315 Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124:140-6.
- 316 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicola DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
- 317 Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, et al. Clinical relevance of advances genetics and pharmacogenetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;126:1533-49.

- 318 Annese V, Palmieri O, Latiano A, et al. Frequency of NOD2/CARD15 variants in both sporadic and familial cases of Crohn's disease across Italy. An Italian Group for Inflammatory Bowel Disease study. *Digestive and Liver Disease* 36 (2004) 121–124
- 319 Andriulli A, Annese V, Latiano A, et al. The frame-shift mutation of the NOD2/CARD15 gene is significantly increased in ulcerative colitis: an IG-IBD study. *Gastroenterology* 2004; 126:625-7.
- 320 Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:84-92
- 321 Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2393-404
- 322 Stokkers PC, Reitsma PH, Tygat GN, et al. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45:395-401
- 333 Silveberg MS, Mirea L, Bull SB, et al. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA-DQB1*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9:1-9
- 334 Carter MJ, Di Giovine FS, Jones S, et al. Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. *Gut* 2001;384:461-7.
- 335 Gonzales S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, et al. TNF- α -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- α production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:1101-6
- 336 Palmieri O, Latiano A, Ferraris A, et al. Interaction of IBD5 locus with CARD15 gene may influence some clinical features of IBD. *Gastroenterology* 2005; 128:abstract in press.
- 337 Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variations of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease. *Nat Genet* 2004;36:476-80.
- 338 Torok HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphism in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1421-7
- 339 Liu Chen, Crawford JM. Il tratto gastrointestinale. In Robbins. Le basi patologiche delle malattie, VII ed. 2006. Elsevier Italia; pag, 847-851
- 340 Friedman S, Blumberg RS. Malattie infiammatorie intestinali. In Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison: principi di medicina interna. Milano:McGraw-Hill 2005; pag.2003-2017
- 341 Orchard T, Holt H, Bradley L, et al. Prevalence of sacroileitis in Crohn's disease, and its correlation with clinical, radiologic, and genotypic parameters. *Gastroenterology* 2002; 122:W1298.
- 342 Orchard TR, Chua CN, Ahnad T, et al. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology* 2002; 123:714-8.

- 343 Edward V. Loftus Jr. Radiology, Serologic Markers, Wireless Capsule Endoscopy and Optical Coherence Tomography. *Inflamm Bowel Dis & Volume 12, Supplement 3, October 2006*
- 344 Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis. 2005 Aug;11(8):707-12*
- 345 Riemann JF, Rosenbaum A, Bowel imaging – capsule endoscopy. *Schweiz Rundsch Med Prax. 2006 Dec 13;95(50):1979-82*
- 346 Marla Dubinsky. Radiology, Serologic Markers, Wireless Capsule Endoscopy and Optical Coherence Tomography. *Inflamm Bowel Dis & Volume 12, Supplement 3, October 2006*
- 347 Themistocles Dassopoulos, MD, Constantine Frangakis, Marcia Cruz-Correa, MD, PhD, et al. Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in Crohn's Disease: Higher Titers Are Associated with a Greater Frequency of Mutant NOD2/CARD15 Alleles and with a Higher Probability of Complicated Disease. *Inflamm Bowel Dis . Volume 13, Number 2, February 2007*
- 348 De Jong NS, Leach ST, Day AS et al. Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis. 2006 Jul;12(7): 566-72*
- 349 Watanabe K, Ohira H, Orikasa H et al. Anti-calreticulin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Fukushima J Med Sci. 2006 Jun;52(1):1-11*
- 350 Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutation in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology 2002;123:679-88.*
- 351 Sorrentino D. Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol. 2006 Dec;101(12):2892-3*
- 352 Judge T, Lewis JD, Lichtenstein GR. Colonic dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am 2002; 12(3):495-523*
- 353 Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology. 2006;130:1030Y1038.*
- 354 Sutherland LR, Rothy DE, Beck PL. Alternatives to sulfasalazine: a meta-analysis of 5-ASA in the treatment of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis 1997;3:65-78.*
- 355 Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology 2001;121:255-60.*
- 356 Bouhnik Y, Lemann M, Mary JY, et al. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet 1996;347:215-9.*
- 357 Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med 1995;332:292-7.*
- 358 Feagan B G, Fedorak R N, Irvine E J, et al. A comparison of Methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. *N Engl J Med 2000;342:1627-32*

- 359 D'Haens G, Lemmens L, Geboes K, et al. Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001;120:1323-9
- 360 ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-11
- 361 Bruce E. Sands, M.D., Frank H. Anderson, M.D., Charles N. Bernstein, M.D. Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease *N Engl J Med* 2004;350:876-85
- 362 Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002;50:196-200.
- 363 Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, et al. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo controlled study. *Gastroenterology* 1998;115:1072-8.
- 364 William J. Sandborn, M.D., Jean Frédéric Colombel, M.D., Roberts Enns, M.D., et al. Natalizumab Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2005;353:1912-25
- 365 Joshua R. Korzenik, M.D., Brian K. Dieckgraefe, M.D., Ph.D., John F. Valentine, et al. Sargramostim for Active Crohn's Disease. *n engl j med* 352;21 may 26, 2005
- 366 Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut*. 2006;55:36Y58