

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**DOTTORATO DI RICERCA
IN
MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA
*XIX CICLO***

Coordinatore Prof. Stefania Montagnani

**MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI:
EVOLUZIONE, PROGRESSIONE ED ASSOCIAZIONE
A LESIONI PRECANCEROSE E CANCRO.
STUDIO DEI FATTORI PREDITTIVI**

**Relatore
Chi.mo
Prof. Francesco Paolo D'Armiento**

**Candidato
Dott. Anniciello Anna Maria**

INDICE

INTRODUZIONE pag. 4
CAPITOLO 1: PAZIENTI E METODI pag. 13
1.1 SCHEDE TECNICHE E CARATTERISTICHE GENERALI DEGLI ANTICORPI IN STUDIO pag. 19
1.2 TECNICA WESTERN BLOT pag. 20
1.3 SCORE pag. 23
1.4 ANALISI STATISTICA pag. 24
CAPITOLO 2: RISULTATI	
2.1 SCORE DI RIMODELLAMENTO pag. 26
2.2 DAI SCORE pag. 30
2.3 RISULTATI MORFOLOGICI DALLO STUDIO DELLA DISPLASIA pag. 34

DISCUSSIONE pag. 42
CONCLUSIONI pag. 49
BIBLIOGRAFIA pag. 50

INTRODUZIONE

Le *Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali* (MICI) sono definite come “un gruppo di malattie caratterizzate da un quadro clinico, anatomico patologico specifico (macroscopico-microscopico), che sottende una discrasia immunologica del soggetto colpito”.

Con il termine MICI (IBD Inflammatory Bowel Disease) si intendono differenti condizioni morbose in funzione dell’aspetto clinico-microscopico quali:

- COLITE INDETERMINATA
- COLITE COLLAGENOSICA
- COLITE MICROSCOPICA
- RETTOCOLITE ULCERATIVA
- MORBO DI CROHN

Le MICI hanno un’incidenza epidemiologica considerevole che in Italia è di almeno 100.000 persone colpite; questo spiega l’interesse e l’attenzione della ricerca scientifica in tal senso che tende non solo a scoprire le molteplici cause della malattia ma anche a trovare farmaci in grado di alleviare la sintomatologia e ridurre le complicanze.

Il nostro lavoro è concentrato sulla più frequente malattia infiammatoria cronica intestinale, la **RETTOCOLITE ULCERATIVA**, con studio immunohistochimico e di biologia molecolare di fattori che regolano la maturazione e crescita cellulare. Tale lavoro tende a spiegare l'influenza di tali fattori sull'andamento della malattia tanto eterogeneo nei pazienti colpiti, infatti fattori di crescita come **Ki67** sembrano influenzare non solo il potenziale evolutivo della *displasia* ma anche l'estensione della malattia. Ciò è sostenuto anche dal comportamento della proteina **p53** che, essendo fattore pro-apoptotico e antiproliferativo, blocca la divisione cellulare qualora si verificano errori irreparabili nel DNA, mandando la cellula stessa incontro a "morte programmata". Tuttavia è descritto in letteratura (1) che un'intensa positività di p53 in colite ulcerativa è espressione di mutazioni di tale fattore e quindi espressione di prognosi sfavorevole. Inoltre in letteratura è segnalata una precoce mutazione di p53 già nelle displasie di grado lieve (1,2); questo dato comporta considerazioni sulle cancerogenesi in colite ulcerativa, che la differenzia sostanzialmente dalla sequenza adenoma-carcinoma (FAP) dove la p53 muta tardivamente nelle fasi già carcinomatose (3,4).

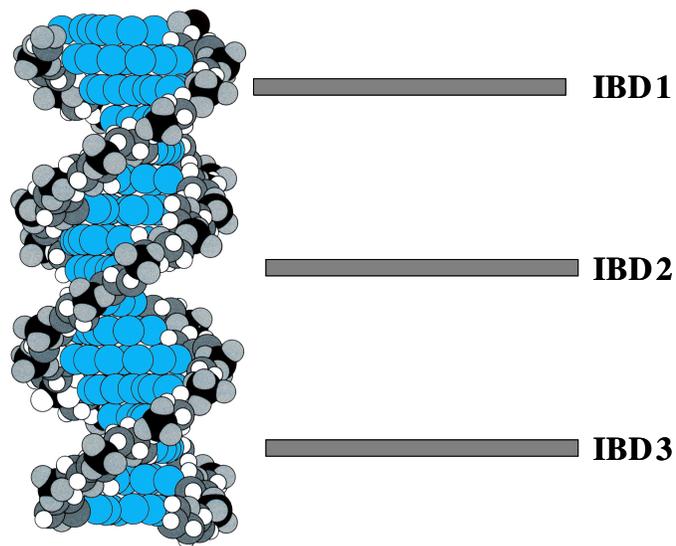
Prima di entrare nei dettagli del nostro studio ci è sembrato doveroso soffermarci brevemente sugli aspetti genetici e patogenetici di queste

malattie così simili da divenire in alcuni casi assolutamente indistinguibili.

Già nel 1996 il centro CEPH di Parigi e quello di Oxford hanno pubblicato i primi studi di analisi del genoma di famiglie affette da MICI (5,6) ed è apparso subito chiaro che queste malattie sono complesse da un punto di vista genetico.

La presenza di una suscettibilità genetica è stata d' altra parte comprovata da studi epidemiologici eseguiti su diverse etnie (la malattia è più frequente in alcune popolazioni ebraiche ed esiste un gradiente di prevalenza tra il sud ed il nord Europa) (7), da studi su gemelli omozigoti e dizigoti (con una concordanza rispettivamente di 37% e 7% per il Crohn e di 10% e 3% per la rettocolite ulcerativa) (8) e da studi di aggregazione familiare, dove è stato dimostrato che la malattia nei pazienti con una storia familiare si manifesta più precocemente (9,10). Per capire la complessità dei fattori genetici presenti nelle MICI è necessario chiarire che le malattie in esame sono poligeniche, che esistono geni comuni e geni differenti (propri per ciascuna malattia) e che tali geni possono variamente combinarsi tra di loro.

E' comunque interessante sapere che una serie di questi geni sono coinvolti in altre malattie tutte caratterizzate da alterazioni della risposta immune. Questo modello proposto prevede una gerarchia tra i geni coinvolti nei quali, alcuni, predispongono il soggetto ad una suscettibilità generica, mentre altri predispongono alla malattia; il gene implicato è anche coinvolto nel sito, nell' evoluzione e nella risposta alla terapia. I diversi quadri clinici sono causati da differenti mutazioni genetiche e tutti richiedono una interazione con specifici antigeni ambientali per divenire funzionalmente significativi (11). In particolare, i ricercatori hanno identificato quattro regioni situate rispettivamente sul cromosoma 16q (IBD1), sul cromosoma 12q (IBD2) (12), sul cromosoma 6p (IBD3) e sul



cromosoma 14 (4).

Figura 1

L'IBD3 appare conferire suscettibilità ad entrambe le malattie mentre IBD1 e IBD2 conferiscono suscettibilità specifica al Crohn ed alla Rettocolite ulcerativa rispettivamente (8). L'IBD3 è localizzato sul cromosoma 6 dove si trova il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) ed il ruolo di questo nella suscettibilità alla malattia è stato oggetto di studi già dal 1972 (13).

Attualmente si ritiene che il contributo dell'HLA al rischio genetico sia molto alto nella Rettocolite ulcerativa e nel Morbo di Crohn sia tra il 10-33%. (14,15).

Per quanto concerne l'IBD1 si conosce già da diversi anni la sua localizzazione nella regione pericentromerica del cromosoma 16 (16,17). Due équipe indipendenti di ricercatori, l'una negli USA, l'altra in Francia sono stati in grado di identificare la mutazione di un gene conosciuto come NOD2/CARD15, che avviene con il doppio della frequenza nei pazienti affetti da morbo di Crohn rispetto al resto della popolazione (18). Il NOD2 espresso dai monociti, codifica una proteina che aiuta il sistema immunitario innato, attraverso l'attivazione di fattori nucleari specifici (NFkB), a riconoscere e reagire nei confronti dei lipopolisaccaridi batterici (LPS) (18). Nella forma mutata la proteina risulta essere tronca, mancando a livello C-terminale di 33 amminoacidi (18).

L'incapacità dei monociti di riconoscere antigeni batterici potrebbe provocare una reazione infiammatoria anormale di un'altra parte del sistema immunitario conosciuto come sistema immunitario adattativo, il quale reagisce più lentamente ma produce reazioni più forti e più mirate nei confronti di invasori specifici. Altri studi hanno ipotizzato che la violazione di questa "prima linea di difesa" rivesta un ruolo importante nello sviluppo e nella perpetuazione dell'infiammazione; la forma mutata del NOD2/CARD15 potrebbe essere il legame per individuare altre "violazioni" o debolezze del sistema (18). D'altra parte questo gene spiega solo il 15% dell'ereditarietà della malattia di Crohn, e le mutazioni finora note sono state osservate solo nel 20% dei pazienti studiati. Benché molti geni rimangano ancora sconosciuti i dati emergenti suggeriscono che le IBD rappresentano una famiglia eterogenea di disordini infiammatori oligogenici nelle quali le specifiche manifestazioni cliniche sono certamente determinate dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali. Si pongono pertanto le basi per individuare i profili genetici che consentono di dividere i pazienti in sottogruppi e tentare di correlare l'aspetto genotipico a quello fenotipico che viene certamente influenzato da molteplici fattori ambientali (19,20). Tra i fattori patogenetici più importanti, ricordiamo il fumo che pare essere un fattore di rischio per il Morbo di Crohn mentre potrebbe rappresentare un fattore

protettivo nei confronti della rettocolite ulcerativa (21,22). *L'alimentazione* negli ultimi 25 anni ha subito soprattutto nei paesi industrializzati una sostanziale trasformazione con un considerevole aumento dei prodotti a base di carne e derivati del latte; nel medesimo periodo si è registrato un forte incremento di queste malattie. Da tali dati epidemiologici risulta che fattori dietetici giochino un ruolo essenziale nella patogenesi della malattia (23). Anche modificazioni funzionali dell'apparato gastro-intestinale sono state chiamate in causa nella patogenesi delle MICI.

La permeabilità intestinale, il cui aumento in passato si riteneva fosse una condizione necessaria per lo sviluppo della malattia, è stata attualmente ridimensionata e riconosciuta come un evento secondario all'infiammazione (23).

Il muco colonico rappresenta la maggiore difesa intestinale, per cui, tutte le modificazioni che interessano questa barriera, predispongono alla MICI in particolare alla UC (24).

Un discorso a parte merita il ruolo svolto da *agenti microbici* reputati in passato quali unici responsabili della malattie; attualmente si fa sempre più credibile l'ipotesi secondo la quale la flora batterica commensale promuova l'infiammazione in presenza di una barriera mucosale danneggiata (25).

Il ruolo svolto dal sistema immunologico, sia immuno che cellulo-mediato, è stato oggetto di un'infinità di lavori scientifici già dal lontano 1970 (26) tanto che attualmente l'ipereattività delle cellule T, che lavorano troppo e troppo a lungo, rappresenta un "dogma" nella patogenesi delle IBD (23). Autorevoli ricercatori sostengono l'ipotesi secondo la quale un ruolo predominante sarebbe esercitato anche da cellule non immuni come quelle epiteliali (24), mesenchimali (26), nervose (27), ed endoteliali (24). Infine sono stati oggetto di numerose ricerche una serie di mediatori dell'immunoregolazione e dell'infiammazione come l'interleuchina 12, l'interleuchina 1, l'interferone gamma (24) che hanno dato risultati interessanti sia per il loro ruolo nella patogenesi sia per il loro impiego in moderni approcci terapeutici.

Fiocchi in un recente articolo (23), definisce le MICI: "come complesse entità cliniche nelle quali fattori genetici, ambientali, immuni e non immuni interagiscono con conseguente produzione di sostanze (anticorpi, citochine, fattori di accrescimento, metaboliti dell'ossigeno e dell'acido nitrico enzimi proteolitici) che iniziano e sostengono l'infiammazione ed il danno tissutale".

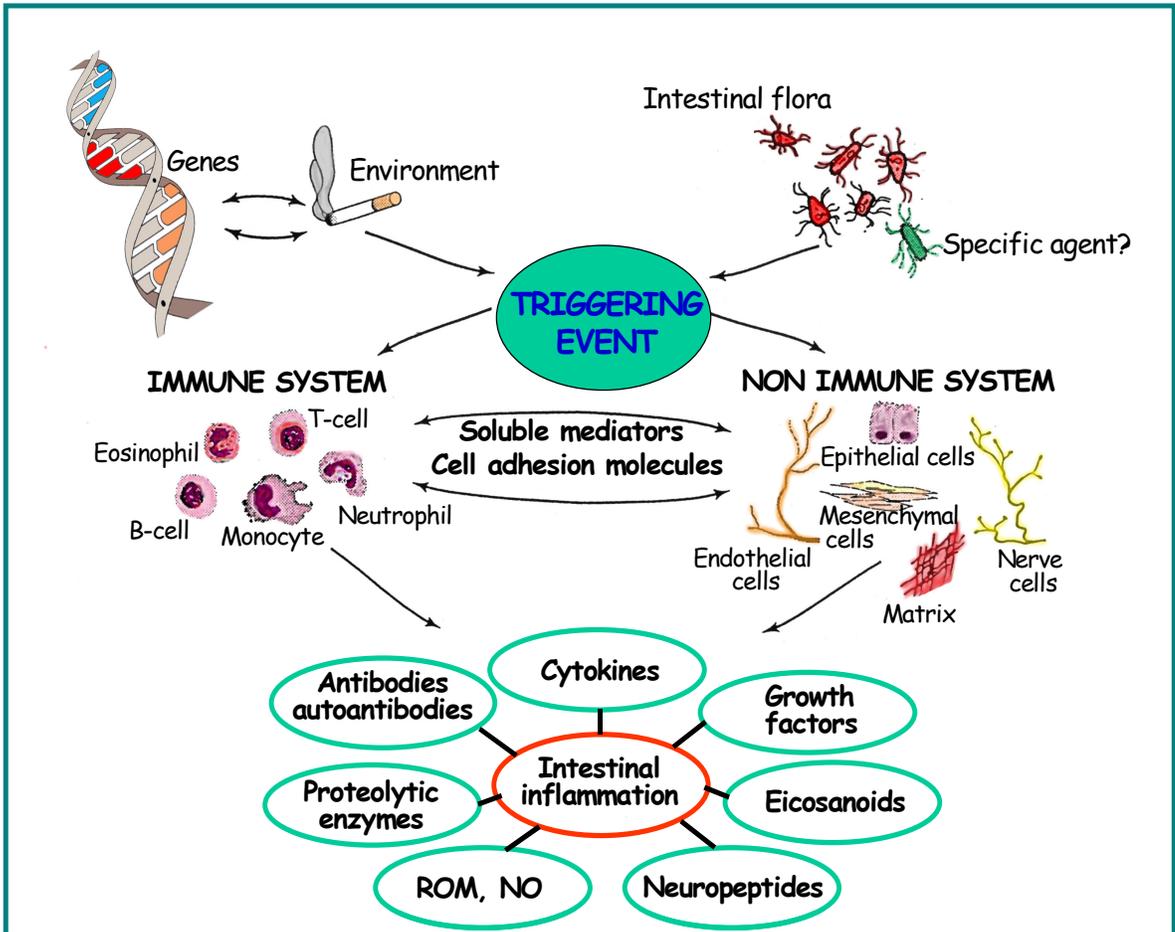


Figura 2

Meccanismi genetici e patogenetici delle IBD

CAPITOLO 1

PAZIENTI E METODI

Nel corso di questi tre anni di Dottorato di Ricerca lo studio da noi effettuato ha spaziato su tutti gli aspetti della malattia esaminandola di volta in volta sotto diverse prospettive: abbiamo preso in esame l'aspetto morfologico a noi tanto familiare correlandolo all'andamento clinico per tentare di prevedere la progressione, l'evoluzione e/o l'eventuale trasformazione neoplastica.

A questo scopo sono stati reclutati 31 pazienti (20 maschi e 11 femmine) con un follow up mediano di 8 anni (range tra 8 e 16 anni) di cui è stata raccolta un'accurata indagine anamnestica segnalando l'età, il periodo di insorgenza della malattia, la presenza di patologie correlate, eventuali interventi chirurgici subiti, terapie effettuate e notizie più generiche come il luogo di residenza, le abitudini alimentari, l'attività fisica, la stagionalità dei sintomi e così via, per valutare tutti gli aspetti e metterli in relazione tra di loro. Per ciascun paziente sono state praticate biopsie coloniche in corrispondenza dei segmenti colpiti; questi prelievi sono stati ripetuti a distanza di anni per valutare eventuali modificazioni avvenute nel tempo. Le biopsie all'esordio (T0) e quelle ripetute a distanza (T1) sono state sottoposte ad analisi morfometriche, ad indagini

immunoistochimiche ad analisi della apoptosi e a test di biologia molecolare per valutare le differenze avvenute in un lasso di tempo così ampio.

Lo score di rimodellamento effettuato su biopsie fissate in formalina e routinariamente processate è stato effettuato prendendo in considerazione i seguenti parametri: numero delle cripte, altezza delle cripte, angoli formati e numero delle cellule di Paneth presenti nelle cripte, come già realizzato in letteratura (28). E' evidente che tali misurazioni sono state effettuate solo sulle cripte ben orientate e delle quali era visibile chiaramente il lume e ad una sufficiente distanza dalla mucosa infiammata attraverso misurazioni con l'oculare micrometrico. Il numero delle cripte è stato calcolato considerando che in ogni centimetro di mucosa ci sono approssimativamente dalle 40 alle 50 cripte, i dati inerenti l'altezza e gli angoli formati, sono stati espressi come valori mediani, il numero delle cellule di Paneth è stato espresso per 100 (28).

Si è cercato inoltre di collegare il dato morfologico a quello clinico per valutare la correlazione esistente tra il danno, la rigenerazione epiteliale della mucosa e la sintomatologia del paziente con le sue fasi di attività e di remissione. E' stato pertanto valutato il D.A.I. score (Disease Activity Index) all'esordio e all'ultimo controllo medico disponibile secondo i parametri offertici dai clinici (29):

D.A.I. < 3 remissione

D.A.I. 3-6 malattia lieve

D.A.I. 7-10 malattia moderata

D.A.I. >10 malattia grave

Il D.A.I. score di basa su 4 parametri clinici (frequenze di scariche diarroiche, sanguinamento rettale, aspetto della mucosa e stima fisica della malattia) e per ciascuna di queste variabili esiste un range che va da una condizione di normalità (valutata 0) ad una condizione di massima severità (che corrisponde ad un punteggio 3).

Stool frequency (daily average)

normal.....	0
1-2 stools/day>normal.....	1
3-4 stools/day>normal.....	2
>4 stools/day>normal.....	3

Rectal bleeding

normal.....	0
obvious blood.....	1
mostly blood.....	2
mucosal appearance.....	3

Mucosal appearance

normal.....	0
mild friability.....	1
moderate friability.....	2
exudation, spontaneous bleeding.....	3

Physician's rating of disease activity

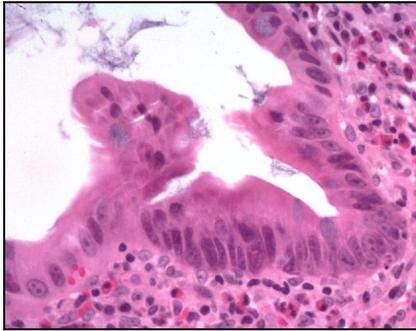
normal.....	0
mild.....	1
moderate.....	2
severe.....	3

Abbiamo valutato poi l'insorgenza della displasia e dei pazienti precedentemente selezionati solo 2 avevano sviluppato una displasia di alto grado quindi sempre in collaborazione con il Dipartimento di Gastroenterologia del nostro Ateneo abbiamo selezionato nel corso di 15 anni (dal 1992 al 2007) 17 pazienti con una storia di rettocolite ulcerativa che avevano sviluppato una displasia.

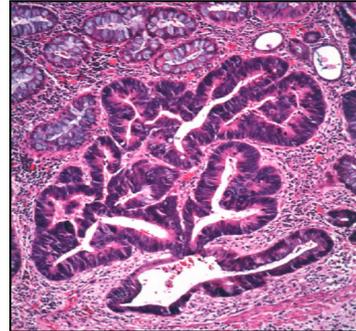
Il nostro lavoro dunque è stato rivolto allo studio della malattia ed alle cause che provocano l'eventuale trasformazione e non è partito invece dalla malattia già virata verso la neoplasia, è stato pertanto necessario seguire gli stessi pazienti in follow-up in uno studio in tandem nel quale i gastroenterologi valutavano l'aspetto clinico e farmacologico e i patologi quello morfologico e molecolare . Come riportato da Riddell (30), la displasia si distingue in 2 grossi gruppi:

1. **DISPLASIA DI BASSO GRADO**, che mostra ipercromasia nucleare, proliferazione, presenza di nucleoli e scarsa differenziazione citoplasmatica.
2. **DISPLASIA DI ALTO GRADO**, che non si discosta molto dal carcinoma intra-ghiandolare.

Displasia di basso grado



Displasia di alto grado



Un grosso problema è evitare falsi positivi, frequenti in presenza di flogosi attiva (che implica modificazioni cellulari ed atipie indeterminate); quindi abbiamo utilizzato dei marcatori immunohistochimici su fattori predittivi di displasia.

Tali fattori accanto alla classica analisi morfologica sono stati determinati immunohistochimicamente per valutare indici di proliferazione (Ki67) e presenza di p53 mutata. È noto che quest'ultimo fattore (pro-apoptotico) quando muta è uno dei più implicati nella cancerogenesi.

Per ogni campione sono stati saggiati quindi i seguenti anticorpi:

- **Ki67**
- **p53**
- **L'indagine per l'apoptosi è stata effettuata con il Tunel Test**
- **Il Ki67 e la p53 sono stati identificati con il Western blot**

1.1 SCHEDE TECNICHE E CARATTERISTICHE GENERALI DEGLI ANTICORPI IN STUDIO

Ki67:

Human Ki67, clone MM1, Ig Class IgG1

Casa produttrice: Novocastra

Mouse Monoclonal Antibody

Specificità: antigene nucleare espresso in tutte le cellule proliferanti durante le fasi G1, S, M e G2 del ciclo cellulare.

Smascheramento antigenico: forno a microonde

Diluizione: 1:100 con Dako Antibody Diluent

Incubazione anticorpo primario: 60 minuti

Tipo di segnale: nucleare

p53:

Human p53, clone BP53-12-1, Ig Class IgG2

Casa produttrice: BioGenex

Monoclonal Antibody to p53 Protein

Specificità: proteina antiproliferatrice, presente in bassa concentrazione in tutte le cellule normali, se in elevate concentrazioni è indice di crescita tumorale.

Smascheramento antigenico: forno a microonde

Diluizione: 1:100 con Dako Antibody Diluent

Incubazione anticorpo primario: 60 minuti

Tipo di segnale: nucleare

1.2 TUNEL E WESTERN BLOT

L'analisi della apoptosi è stata effettuata con il *tunel test* utilizzando il kit ApopTag®.

Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di SDS

(SDS PAGE)

La SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione di proteine in un campo elettrico in base al loro peso molecolare. I campioni sono stati preparati trattando le cellule con un tampone di lisi contenente: 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,1% CHAPS; 2 mM EDTA; 1 mM EDTA, pH 8; 0,5% NP-40; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF; inibitori di fosfatasi (20 mM 4-nitrofenil-fosfato; 1 mM sodio vanadato; 40 mM fluoruro di sodio; 1mM sodio pirofosfato) e un cocktail di inibitori di proteasi (Boehringer; Ingelheim). Dopo la determinazione della concentrazione proteica, all'omogenato cellulare (30-40 μ g proteine totali) è stato aggiunto il tampone di Laemmli (100 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,2% Blu di bromofenolo; 2% glicerolo; 200 mM DTT),

riscaldato per 5 min a 90-95°C e caricato sul gel *precast* al 12-15% (Invitrogen o Bio-Rad), corsi in tampone MOPS o MES.

Immunoblotting

Dopo la corsa elettroforetica le proteiche nel gel sono state trasferite su membrana di PVDF (polivinilidene fluoruro; Amersham-GE Healthcare) utilizzando un apparecchio idoneo (Trans-Blot Cell o X Cell II Blot Module commercializzate rispettivamente dalla Biorad e dalla Invitrogen) a cui è stata applicata una differenza di potenziale costante di 110 V. Il trasferimento è stato eseguito per 1 h in camera fredda a 4°C, oppure a temperatura ambiente con il Cell II Blot Module con un voltaggio costante di 30 V. Dopo il trasferimento, la membrana è stata lavata in T-TBS (0.1% Tween; 25 mM Tris pH 8; 137 mM NaCl; 2,69 mM KCl) per 5 min in agitazione. I siti di legame non specifici sulla membrana sono stati saturati mediante immersione della stessa in un tampone di “bloccaggio” (3% BSA in PBS o, in alternativa, *non-fat dry milk* 5% in T-TBS). E' stato eseguito, quindi, un lavaggio da 5 minuti in T-TBS per poi procedere all'incubazione del filtro con l'anticorpo primario per 16-18 h (*over-night*) a 4°C. Il giorno successivo, dopo una serie di lavaggi, è stato aggiunto l'anticorpo secondario (Amersham- GE Healthcare) coniugato alla perossidasi per 2 h prima di passare alla fase finale della rilevazione.

La rilevazione del segnale dell'anticorpo è stata effettuata mediante la tecnica della chemiluminescenza utilizzando il reagente ECL-Plus (Enhanced Chemio Luminescence; Amersham-GE Healthcare) o in alternativa il Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer). La perossidasi, coniugata all'anticorpo secondario, catalizza una reazione di ossido-riduzione in cui il substrato, solitamente il luminolo, viene eccitato e quando gli elettroni più esterni passano da un livello energetico più alto ad uno più basso emettono energia sotto forma di fotoni. La luce emessa è stata poi rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica, (Iperfilm ECL; Amersham-GE Healthcare) che poi è stata sviluppata. Il segnale che impressiona la lastra fotografica si trova in corrispondenza del sito di legame dell'anticorpo secondario, a sua volta legato al primario, specifico per la proteina di interesse ed è stato identificato mediante il *marker* di peso molecolare.

1.3 SCORE

Tutte le sezioni sono state osservate da 4 osservatori.

La stima di positività dei marcatori presi in esame è stata fatta come segue:

- a) suddividendo la ghiandola in due zone :”basal zone” (zona basale) e “top zone” (zona medio-alta) (Foto 1), come già riportato in letteratura (31,32,33);



Foto 1

b) assegnando a ciascun indice uno specifico metodo valutativo:

- per Ki67 conta del numero di cellule positive all'interno della ghiandola su 100 cellule;
- per p53 conta del numero di cellule positive all'interno della ghiandola su 100 cellule, più valutazione qualitativa di intensità della colorazione e diffusione citoplasmatica;

Le conte sono state fatte al microscopio ottico utilizzando un alto ingrandimento (250x).

1.3 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il test di normalità di Shapiro- Wilk. Essendo stata dimostrata una distribuzione non gaussiana dei dati, essi sono stati espressi come mediana e range interquartile (IQR). Inoltre, è stato applicato il Test Wilcoxon Signed Ranks per analizzare le variazioni di Ki67, p53 e tunel tra la prima (T0) e l'ultima (T1) osservazione ed il test Mann-Whitney U per analizzare le differenze tra diversi gruppi. Nell'ambito della valutazione morfologica la comparsa di

un gradiente di regressione lineare tra due gruppi è stata valutata attraverso il *test di student*; un dato $r > 0,4$ è un valore di P 0,05 è stato considerato significativo da un punto di vista statistico. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software SPSS, ver. 11.0.1. per Windows.

CAPITOLO 2

RISULTATI

2.1 SCORE DI RIMODELLAMENTO

La valutazione inerente i diversi parametri morfologici è stata effettuata al tempo T0 e al tempo T1 e un graduale decremento è chiaramente visibile sia per quanto riguarda il numero che l'altezza della cripte che l'angolo formato dalle stesse mentre si assiste ad un aumento del numero delle cellule di Paneth all'interno delle ghiandole

	T0	T1		
NUMERO CRIPTE / cm	40.31 ± 6.04	35.44 ± 5.66	y=57.0 – 2.5x	r ² =0.50
ALTEZZA CRIPTE / μm	421.25 ± 51.61	379.38 ± 70.94	y=546.1 – 18.5x	r ² =0.419
ANGOLO CRIPTE gradi	79.66 ± 4.51	75.69 ± 2.66	y=83.8 – 0.9x	r ² =0,585
NUMERO CELLULE DI PANETH / 100	1.35 ± 1.75	7.59 ± 9.58	y=1.0 – 1.1x	r ² =0.543

I risultati sono presentati come valori mediani ± la deviazione standard

Tabella 1
Rimodellamento morfologico in relazione alla variabile tempo

Al contempo i nostri risultati hanno dimostrato che i valori mediani di espressione di Ki67 e p53 e tunel sono significativamente diversi se valutati all'esordio di malattia o dopo un intervallo di tempo. Sussiste infatti un aumento significativo di tutti e tre i marcatori (Ki67 9 vs. 14; $P=0,031$), (p53 10 vs. 16; $P=0,046$) (tunel 12 vs 24; $P=0,015$).

	T0	T1	P*
KI67			
Mediana (IQR)	9 (14)	14 (22)	0,031
Range	3-44	0-44	
p53			
Mediana (IQR)	10 (10)	16 (27)	0,046
Tunel			
Mediana (IQR)	12 (10)	24 (12)	0,015
Range	6-34	4-64	

* P calcolato mediante il Wilcoxon Signed Ranks Test
IQR= Range Interquartile

Tabella 2

Valori di KI67, p53 e e tunel alla prima (T0) e all'ultima (T1) osservazione di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa.

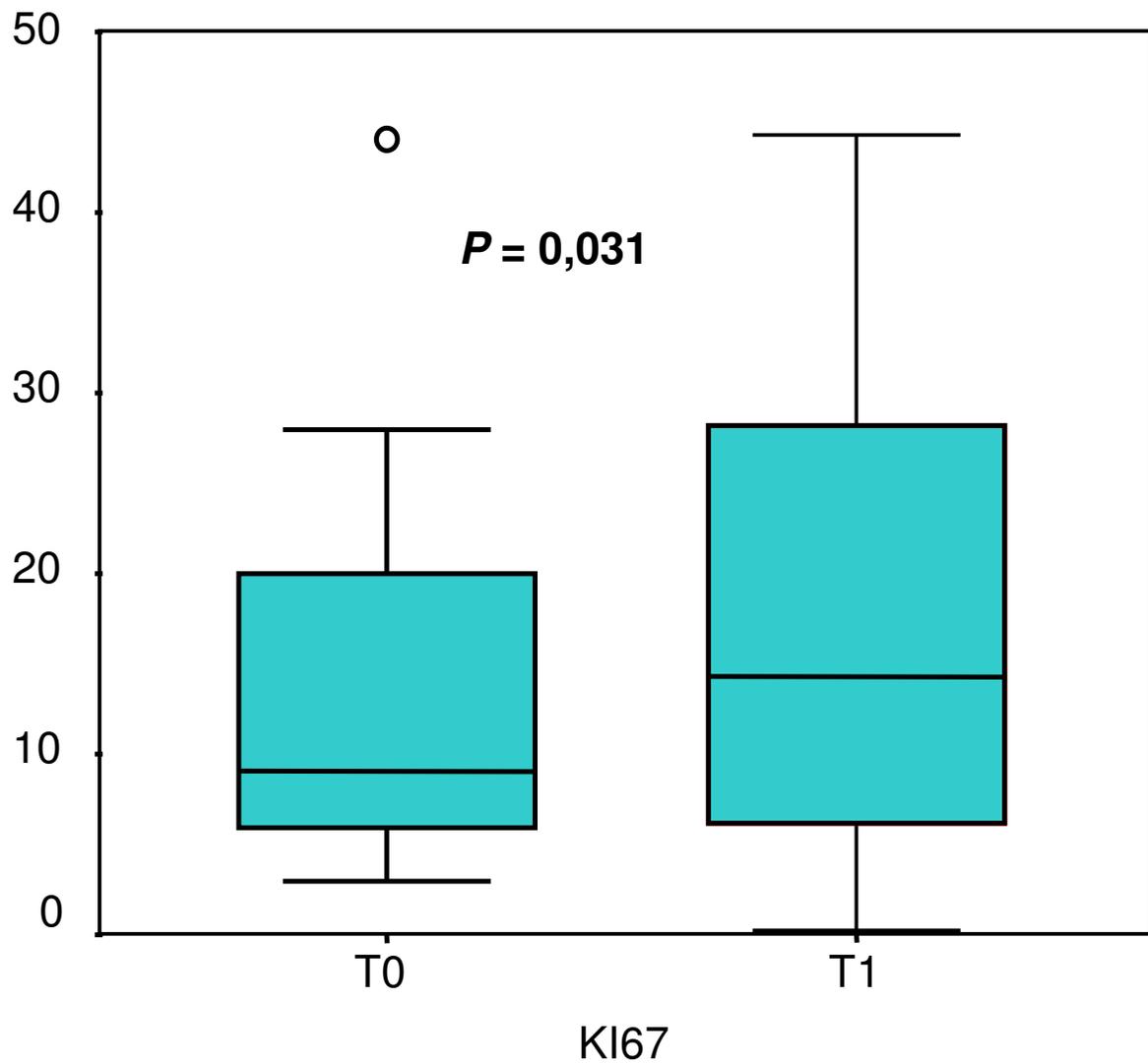


Figura 3

Boxplot di valori di KI67 della prima (T0) e dell'ultima (T1) osservazione di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa. Il boxplot definisce la mediana (linea scura), il 25° ed il 75° percentile, il valore minimo e quello massimo, e gli outlier della variabile esplorata.

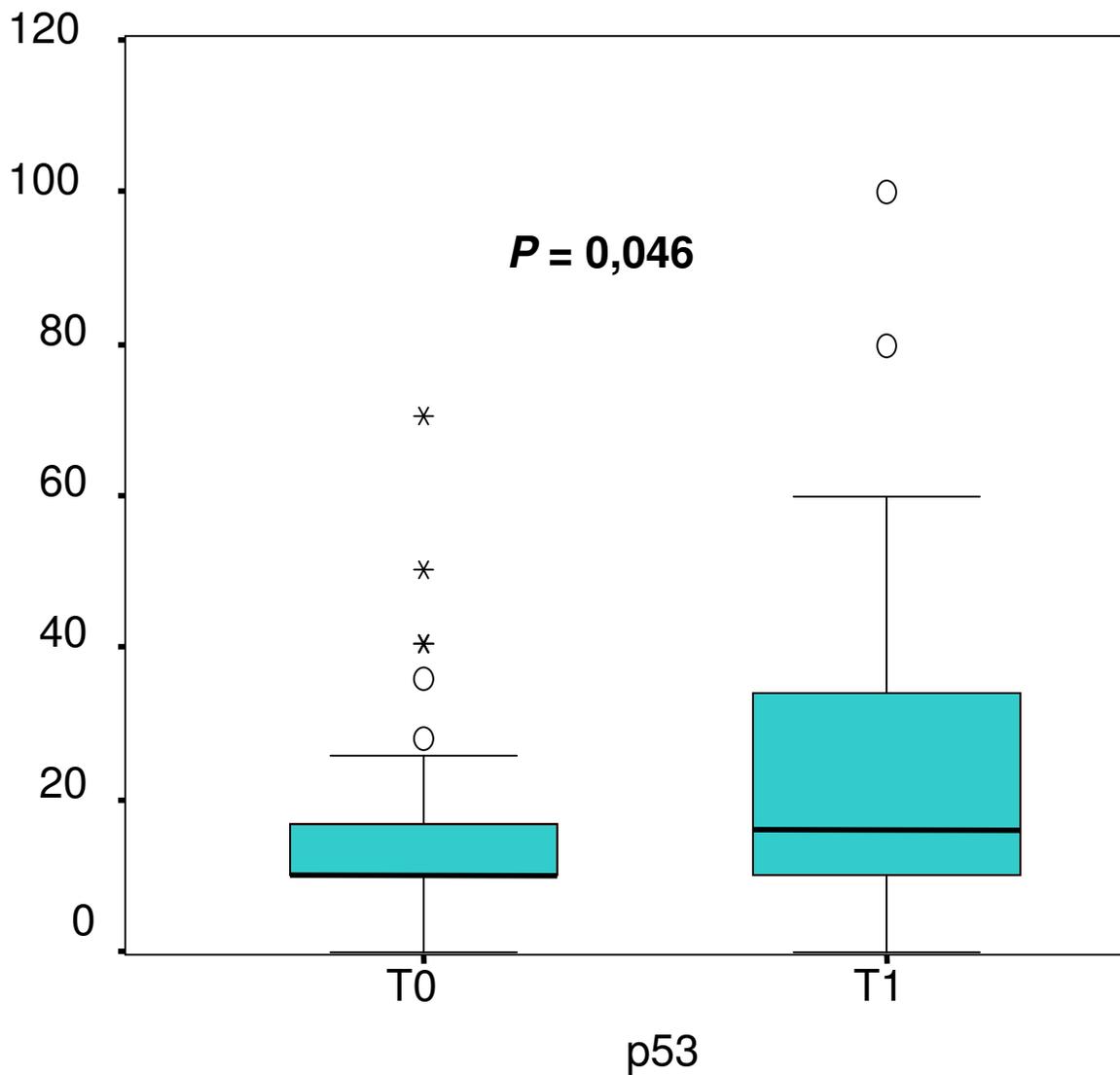


Figura 4

Boxplot di valori di p53 della prima (T0) e dell'ultima (T1) osservazione di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa. Il boxplot definisce la mediana (linea scura), il 25° ed il 75° percentile, il valore minimo e quello massimo, e gli outlier della variabile esplorata.

Anche i clinici hanno valutato il DAI score a T0 e a T1 che è risultato così distribuito

	T0	T1
< 3	8 (25%)	8 (25%)
3-6	18 (58%)	22 (70%)
7-10	5 (16%)	7 (21%)

Tabella 3

Esaminando l'estensione della malattia abbiamo osservato che a T0 erano presenti 8 proctiti, 12 proctosigmoiditi, 7 left colitis e 4 pancoliti; al tempo T1 sono state diagnosticate clinicamente con riscontro anatomico patologico: 4 proctiti, 14 proctosigmoiditi, 8 left coliti e 5 pancoliti ed è apparso chiaro che in ben 11 casi la malattia si è estesa a segmenti più prossimali dell'intestino.

	T0	T1
<i>Proctiti</i>	8	4
<i>Proctosigmoiditi</i>	12	14
<i>Left coliti</i>	7	8
<i>Pancoliti</i>	4	5

Tabella 4

In questa ottica abbiamo riesaminato il comportamento dei 3 marcatori nel tempo ed abbiamo osservato che un aumento di espressione dei 3 marcatori nel tempo in maniera proporzionale si è associato ad un comportamento stazionario della malattia (malattia confinata al retto o colite sinistra) confermato dal DAI score che negli stessi casi non ha subito variazioni tra l'esordio di malattia e la fine del follow-up; un decremento o una stazionarietà del ki67 con associati incremento dell'indice apoptotico e del p53 si associa invece ad una estensione della malattia (pancolite).

I dati ottenuti sono stati analizzati in funzione del sesso dei pazienti; come si evince dalla tabella 5 sussiste una prevalenza dei maschi rispetto alle femmine (34) mentre l'età media dei gruppi a confronto rivela una più precoce insorgenza nelle femmine (38 vs. 43); non emergono invece, differenze significative dal confronto dei marcatori esaminati.

	Maschi	Femmine	P
Pazienti (n.)	20	11	
Età al 1° prelievo (anni)	43.0 (23,5)	38.0 (40)	0,24
KI67	6.0 (13)	10.0 (16)	0,67
P53	10.0 (16)	10.0 (11)	0,83
Tunel	10.0 (17)	14.0 (20)	0,52
Età al 2° prelievo	55.0 (19)	46.5 (35,25)	0,19
KI67	15.0 (20)	12.0 (22,75)	0,94
P53	24.0 (24)	12.0 (33,50)	0,99
tunel	20.0 (25)	17.0 (27,85)	0,98

Tabella 5

Analisi in relazione all'età, del KI67 e del P53 nei pazienti esaminati nel primo e secondo prelievo bioptico e distinti in funzione del sesso.

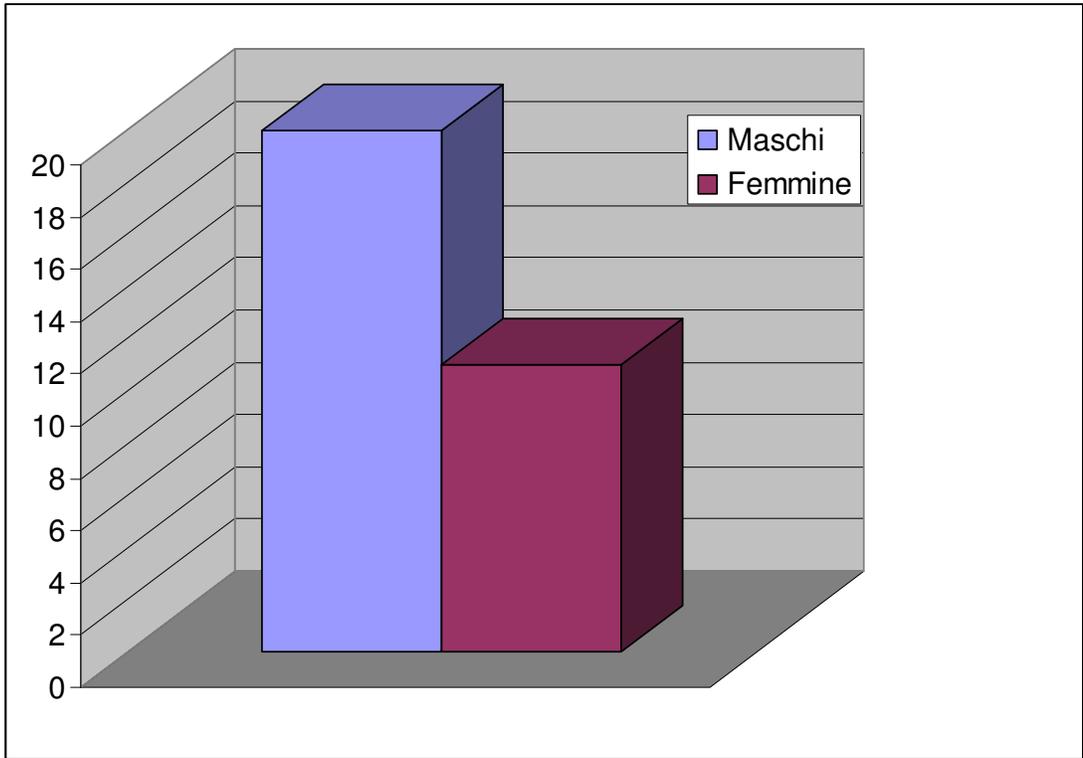


Figura 5

Nella tabella 6 i risultati dell'indagine sono stati esaminati in funzione dell'età dei pazienti con un limite di 40 anni. Dall'esame dei dati così ripartiti emerge che non sussistono differenze significative né per Ki67 e P53 né per apoptosi.

	Età < 40 anni	Età > 40 anni	P
Pazienti (n.)			
KI67	10.0 (19)	7.0 (12)	0,42
P53	10.0 (15)	10.0 (18,5)	0,44
tunel	11.0 (21)	9.0 (15)	0,22
KI67	10.0 (23,50)	17.0 (17,35)	0,51
P53	10.0 (20)	31.0 (37,50)	0,065
tunel	12.0 (25,50)	15.0 (13,15)	0,38

Tabella 6

Risultati ottenuti dallo studio dei casi di displasia

In letteratura analoghi studi effettuati sulla RCU hanno riportato risultati relativi alle variazioni dei marcatori, rapportando la malattia alle complicanze, con particolare riguardo alla displasia/neoplasia (31,32,33).

Altri studi esaminano l'evolutivezza di espressione di tali indici durante lo stato di malattia "non complicata" nel corso degli anni (35,36).

Il nostro lavoro valuta il grado di displasia rapportando criteri morfologici all'espressione dei fattori p53 e Ki67.

Nella tabella 7 sono riportati i risultati di tale studio con l'espressione di p53 sia nucleare che citoplasmatica (p53 mutata) e di Ki67.

La valutazione è stata effettuata con una scala di valori non parametrici assegnando un + ad una lieve positività, ++ ad una positività moderata, +++ ad una positività intensa.

Da tale tabella si evince che tale espressione risulta aumentata per entrambi i marcatori in 7 casi; in 2 casi è notevolmente espresso Ki67 e non p53; in 5 casi vi è un'espressione di grado moderato sia per p53 che Ki67; nei rimanenti 3 casi si è osservata un'espressione di grado lieve per entrambi i fattori.

<i>PROTOCOLLO</i>	<i>ANTICORPI</i>		
	P53 CITOPLASMATICO	P53 NUCLEARE	Ki67
93/7244	++	+++	+++
94/12244	++	+++	+++
96/3109	++	+++	+++
96/6584	++	+++	+++
96/6650 T1	+++	+++	+++
96/6650 T2	+++	+++	+++
96/8310	+++	+++	+++
97/5310			+++
99/4248			+++
99/4248 P	++	++	++
00/3700	++	++	++
07/5845 RE	++	++	++
07/5845 SI	++	++	++
07/6455		++	++
07/6708		+	+
07/7300		+	+
07/7294		+	+

Tabella 7

Attraverso il test statistico per valori non parametrici si è riscontrato una significatività statistica con $P < 0,05$ tra il gruppo ad elevata espressione contro i rimanenti (grafico 1). Così come si è osservata una significatività statistica con $P > 0,01$ (grafico 2) per il gruppo con negatività di p53, v.s. gli altri, in accordo con i dati riportati in letteratura (35).

Lo score da noi utilizzato per la valutazione immunohistochimica di tali fattori ha dimostrato per la p53 un primo gruppo negativo (2 casi), un secondo gruppo di positività nucleare (12 casi), comprendenti gli 8 casi di positività citoplasmatica (p53 mutata) e infine un terzo gruppo (3 casi) in cui la positività era intensa nel nucleo e nel citoplasma. Si è correlata la mutazione della p53 (positività citoplasmatica) con Ki67 quale marcatore di indice di proliferazione e si è osservata una netta corrispondenza su 7 casi di mutazioni della p53 ed aumento di indice di proliferazione (Ki67). L'incremento di positività è stata osservata sia nel fondo della cripta che nella zona di superficie.

Secondo il nostro score i 7 casi valutati su biopsia e positivi per entrambi i fattori sarebbero a rischio di neoplasia (Foto 2-3 -4).

Su questi casi è stato effettuato il Western Blot che ha confermato la presenza delle proteine in elevata quantità (foto 1).

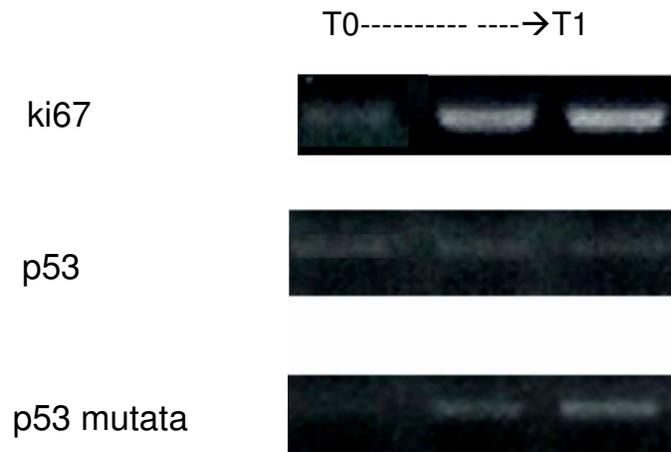


Foto 1

A questi si aggiungono i 2 casi in cui c'è alta espressione di indice di proliferazione (Ki67) e negatività di p53. Quest'ultimo dato verrà preso in considerazione perché possibile espressione di precancerosi non legata alla malattia ma espressione di malattia adenomatosa sporadica.

Le foto 3 e 4 mostrano alta espressione per Ki67 e p53. Le foto 5 e 6 mostrano alta espressione di Ki67 con negatività per p53.

**Confronto P53/Ki67 aumentati
vs
P53/Ki67 a lieve espressione**

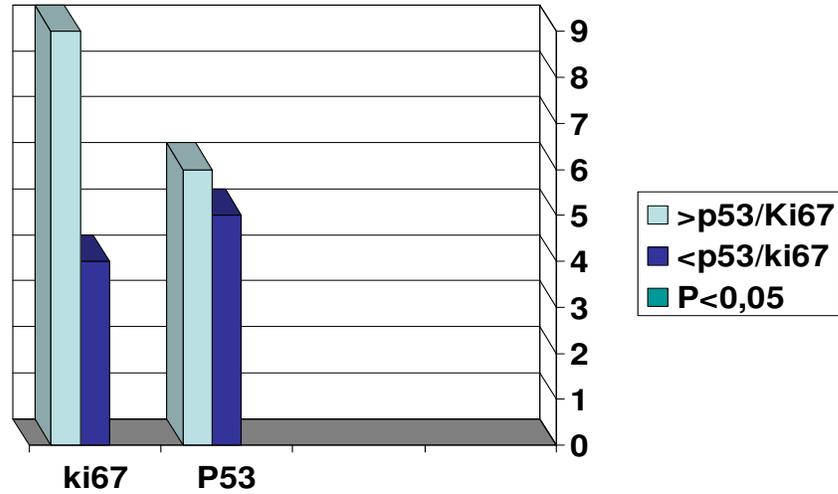


Grafico 1

Confronto P53 negativa vs P53 positiva

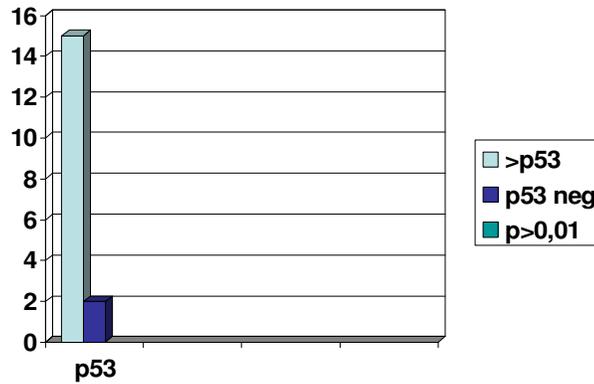
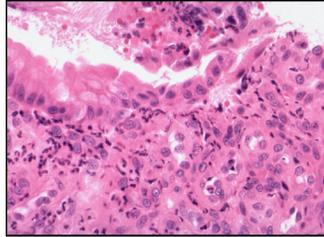


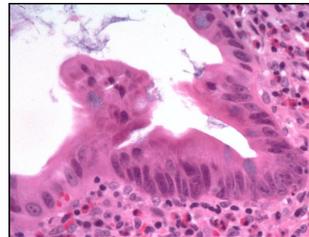
Grafico 2

Interpretazione della displasia

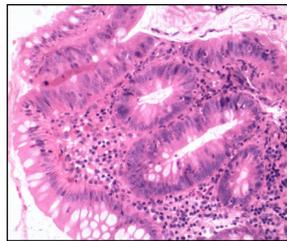
rigenerativa



di basso grado



indefinita



di alto grado

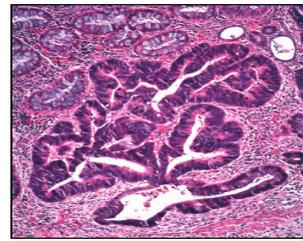
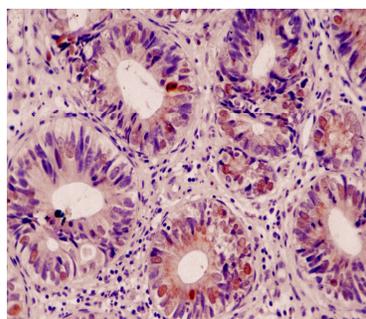
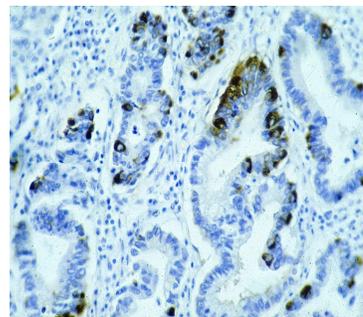


Foto 2

Alta espressione di P53/Ki67



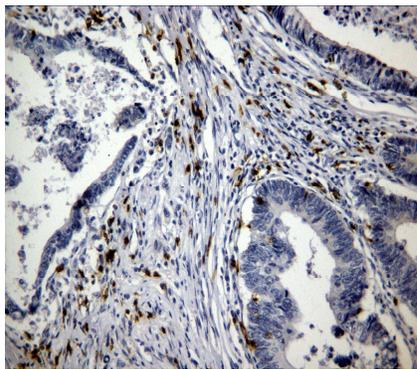
P53



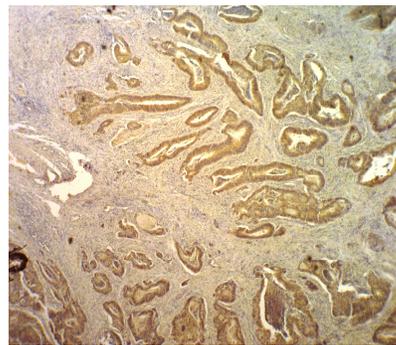
Ki67

Foto 3-4

Proliferazione adenomatosa sporadica



P53 negativa



Ki67
colorazione
positiva

Foto 5-6

DISCUSSIONE

Come sappiamo questo gruppo di malattie è altamente eterogeneo sia per l'aspetto clinico che patogenetico. Infatti molti studi sperimentali sono rivolti a comprendere le alterate reazioni da parte dei *monociti*, del *sistema immunitario*, l'*interazione antigenica*, la *barriera mucosale* ed altri studi epidemiologici come il *fumo* e l'*alimentazione*, come dimostrato dalla fig. 6.

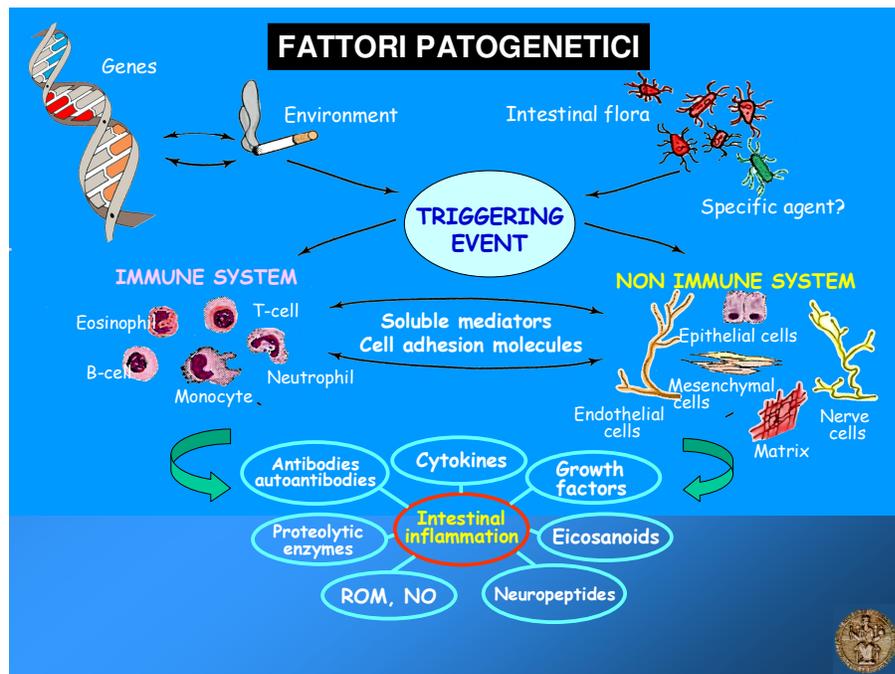


Figura 6

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il comportamento di **Ki67**, **p53** nella RCU nel tempo. I risultati hanno dimostrato che i valori

mediani di espressione di Ki67 e p53 sono significativamente diversi, se valutati all'esordio di malattia o dopo un intervallo di tempo.

Perché Ki67 e p53 aumentano nel tempo?

Tutti i fattori espressi nella regolazione del ciclo cellulare presentano molecole attivatrici ed inibitrici, spesso in feed-back tra di loro: la lunga durata di malattia determinerebbe, presumibilmente con un meccanismo di attivazione molecolare, un incremento di questi fattori, i quali agendo l'uno con un meccanismo di stimolazione alla rigenerazione (Ki67) e l'altro di inibizione (p53), si compensano per la conservazione del normale equilibrio omeostatico cellulare.

In termini morfologici, considerando l'assetto dell'epitelio della mucosa del colon, i parametri valutativi dello stato di malattia nella RCU sono:

- a) atrofia e distorsione ghiandolare,
- b) attività di rigenerazione epiteliale,
- c) attività infiammatoria.

L'incremento del valore mediano della positività dei markers Ki67 e p53, osservato tra T₀ e T₁, è stato riscontrato sia in un epitelio ghiandolare prevalentemente atrofico, che in un epitelio prevalentemente rigenerativo (stratificazione cellulare all'interno delle ghiandole, sovrapposizione dei nuclei, anziché monostrato cellulare).

Nell'ambito di un epitelio ghiandolare malato, ma non ancora andato incontro a complicità, è comunque presente una sorta di equilibrio tra la tendenza alla degenerazione atrofica (blocco della proliferazione p53 positivo) e la stimolazione alla rigenerazione cellulare (induzione alla iperplasia Ki67 positivo), equilibrio che inibirebbe l'insorgenza delle già citate complicanze.

Da quanto fin qui asserito scaturisce una importante considerazione: dalla rottura dell'equilibrio atrofia-rigenerazione o da un suo esaurimento funzionale potrebbe derivare l'insorgenza della complicità.

Detto in altre parole, ad un certo punto della storia naturale della RCU, la cellula della mucosa colonica non avendo più a disposizione i fisiologici meccanismi di difesa nei confronti dell'insulto flogistico va incontro ad un incremento di espressione di fattori pro-rigenerazione, come Ki67 (cui consegue un aumento dello stato proliferativo), non più coordinato e controbilanciato da fattori di inibizione, come p53, specie per una mutazione inattivante la stessa; si apre così la strada verso uno stato di moltiplicazione cellulare oramai privo di freni inibitori; da qui il passo è breve perché si verifichi la degenerazione displastica prima e neoplastica poi.

Questa considerazione, tuttavia, resta una speculazione che necessita di ulteriori riscontri sperimentali oggettivi.

Dal punto di vista prognostico, si deve aggiungere che la maggior durata della patologia è di per se un indice negativo: dopo 20 anni il rischio neoplastico per cancro del colon-retto è superiore del 20% nei pazienti portatori di RCU rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda il nostro lavoro, l'impegno di verificare la possibilità di displasia nella colite ulcerativa ha riflessi clinici molto importanti, infatti la maggior parte della letteratura (29,30,31) individua già la displasia lieve insorta su colite ulcerativa come precancerosi obbligata e quindi designa il paziente quale paziente chirurgico da sottoporre a colectomia.

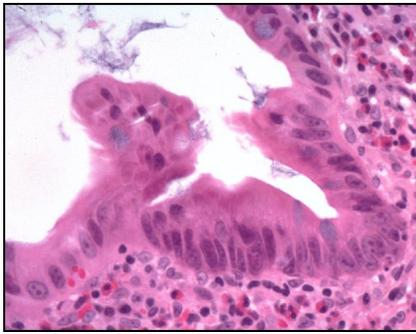
I criteri morfologici di displasia distinguono 2 grossi gruppi (30):

1. **DISPLASIA DI BASSO GRADO**, che mostra ipercromasia nucleare, proliferazione, presenza di nucleoli e scarsa differenziazione citoplasmatica.
2. **DISPLASIA DI ALTO GRADO**, che non si discosta molto dal carcinoma intra-ghiandolare.

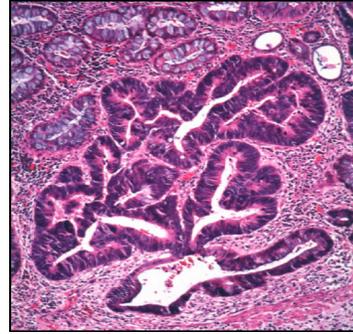
Oggettivamente la grossa difficoltà morfologica non è rappresentata dalle displasie di alto grado, quanto quelle di basso grado, in quanto quest'ultime presentano modificazioni cellulari spesso osservate in un epitelio normale ma sede di infiammazione. Per questo in letteratura

esiste la dizione di **DISPLASIA INDETERMINATA**, cioè quella **METAFLOGISTICA** (28), in cui non è possibile per il morfologo stabilire se le atipie osservate sono infiammatorie o espressione di una reale displasia (vedi foto 7).

Displasia di basso grado



Displasia di alto grado



Displasia indeterminata

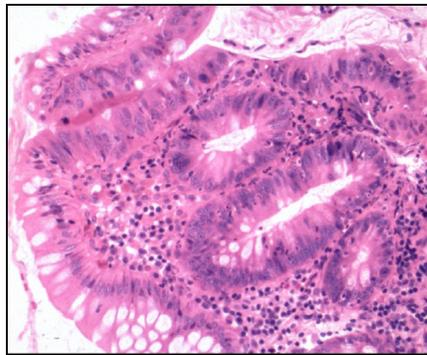


Foto 7

Interpretazione della displasia

Ciò ha creato una sottovalutazione della displasia di basso grado e una tendenza a definirla solo quando è di alto grado, determinando un trend sfavorevole alla prognosi, in quanto spesso si osservano carcinomi infiltranti su colite ulcerativa su pazienti biopsizzati nel tempo. Ciò è in contraddizione del lungo periodo di latenza (circa 20 anni) che consentirebbe sia all'endoscopista che al patologo il riconoscimento di precancerosi in fase precoce.

Lo scopo del nostro lavoro è appunto quello di applicazione delle metodiche immunoistochimiche in associazione alla diagnosi morfologica. Infatti se si adotta un marcatore di indice di proliferazione come Ki67, osservato in associazione al quadro morfologico (atipie), si potrebbe prospettare già una displasia. Tuttavia è noto che l'indice di proliferazione tende ad aumentare spontaneamente come stimolo rigenerativo/riparativo nelle condizioni di infiammazione acuta.

Per questo motivo l'associazione di un altro marcatore come la p53, specie se mutata (positività nucleare – positività citoplasmatica), può essere predittivo di displasia; ciò in considerazione che la p53 è uno dei fattori che muta più precocemente nelle condizioni di malattie infiammatorie croniche (35).

Quindi il nostro score, oltre a considerare la positività attesa a livello criptico e la positività meno attesa a livello del lume superficiale-

ghiandolare, valuta la displasia lieve dal punto di vista morfologico e l'associazione immunohistochimica p53-Ki67 quale fattore di conferma alla morfologia anche in presenza di flogosi.

Infatti, degli 11 casi su 17, la p53 si mostrava mutata con diffusione citoplasmatica e si aveva un riscontro netto con una positività in 7 casi di Ki67.

Ciò conferma la diagnosi certa di displasia in ben 7 casi e solo 1 caso in cui tali fattori offrivano una diagnosi di displasia indeterminata.

Il rischio di *adenoma* o di *displasia adenomatosa sporadica*, se presente in soggetti con colite ulcerativa ma non dipendente dalla stessa, è una eventualità segnalata in letteratura (31).

In questi casi non è richiesto l'intervento chirurgico operatorio ma una semplice scissione dell'adenoma.

Come descritto in letteratura la sequenza adenoma-carcinoma prevede una mutazione della p53 in una fase di cancerogenesi avanzata e non precoce.

Su 17 casi abbiamo infatti osservato 2 displasie gravi in cui il fattore prognostico espresso era Ki67 mentre p53 era assente una positività focale a livello nucleare . Tale aspetto discrimina questa displasia dalla displasia della colite ulcerativa, non tanto dal punto di vista morfologico quanto dal comportamento dei 2 fattori da noi studiati.

CONCLUSIONI

I risultati riportati suggeriscono la possibilità di utilizzo di marcatori molecolari nello studio della malattia nelle sue fasi di sviluppo ed evolutività.

L'obiettivo dello studio è stato quello di verificare i fattori maggiormente implicati nel meccanismo atrofia-rigenerazione attraverso l'analisi di p53 e Ki67 e le loro modificazioni presenti dopo un periodo di follow up medio di 8 anni.

Analogamente agli aspetti clinici, l'espressione dei fattori Ki67 e p53 mostra delle variazioni significative.

Da quanto emerge in questo studio, Ki67 e p53 nella RCU rientrano nei processi rigenerativi, displastici/neoplastici come riportato in letteratura.

Noi riteniamo che alle così differenti espressioni di tali fattori corrispondano altrettante differenti espressioni dell'entità clinica della malattia: estensione, risposta alla terapia, fasi di recrudescenza.

L'attività di Ki67 e p53 rientra nel normale equilibrio omeostatico della cellula e una diversa espressione a favore dell'uno o dell'altro nel tempo rappresenta, dunque, non solo una diversa espressione clinica (estensione della malattia), ma anche il preludio di quelle complicanze tanto studiate in letteratura: megacolon, displasia/carcinoma.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Li J., Lai, Huang Q. Alteration of p53 gene and microsatellite instability in ulcerative colitis and ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004 Mar; 33 (2): 108-14.
- 2) B. Ret, A. Lashner et al. Abnormal p53 immunohistochemistry is associated with an increased colorectal cancer-related mortality in patients with ulcerative colitis. *Am. J. Of Gastroenterology* 2003; 98: 1423-27.
- 3) Nossfinger A., Miller M., Cusi M. Fenoglio C. The pattern of cell proliferation in neoplastic and non-neoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer*, 1996, Vol. 78 No. 11: 2307-2312.
- 4) Wong N., Mayer N., Mackell S., Gilmour M., Harrison D.J. Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assist the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathology*, 2000; 37: 108-114.
- 5) Hugot J.P., Laurent-Puig P., Gower- Rousseau C., et al. Mapping of susceptibility locus for Crohn diseases on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-3.

- 6) Satsangi J., Parkes M., Louis E. et al. Two stage-genoma-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat. Genet.* 1996; *14*: 199-202.
- 7) Gagliardi M., Pignatiello A., Sibilio F. et al. Abitudini alimentari stato nutrizionale e composizione corporea in pazienti maschi affetti da rettocolite ulcerosa in fase di remissione e lieve e moderata attività clinica della malattia. *Quad. Med. Chir.* 1999; *15* (1).
- 8) Ahamad. T., Satsangi J., MCGovern D., Bunce M., Jewell D. *Review article: the genetic of inflammatory bowel disease.* *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001; *15*: 731-748.
- 9) Brant S., La Buda M., Lee S., et al. Younger age of diagnosis identifies families with greater linkage evidence for IBD Loci on Chromosome 1p, 3q, and 16. *Gastroenterology* 1999; *116*: A673 (*Abstract*).
- 10) Van Hell D., Satsangi J., Carey A., Jewell D. Chromosome 12 Linkage for inflammatory bowel disease is greater in families identified by early age of diagnosis . *Gut* 2000; *46 (suppl. 11)*: A6 (*Abstract*).
- 11) Satsangi J. et al. The genetics of inflammatory bowel disease: recent progress. In: McLeod R.S., Martin F., Sutherland L.R., Wallace J.L., Williams C.N., eds. *Inflammatory Bowel Disease*. Lancaster: Kluwer, Academic Publishers. 1997: 21-8.

- 12) Parkes M., Barmada M., Satsangi J., Weeks D., Jewell D., Duerr R. Linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn's at the IBD2 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 1605-10.
- 13) Gleeson M., Walker J., Wentzel J., Chapman J., Harris R. Human leucocyte antigens in Crohn, disease and ulcerative colitis. *Gut* 1972; 13: 438- 40.
- 14) Satsangi J., Wesh K.I., Bunce M., et al. Contribution of genes of major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 47: 1212-7.
- 15) Rish N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1987; 44: 519-26.
- 16) Hugot J.P. et al. Mapping of susceptibility locus for Crohn disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
- 17) Annese V. et al. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to IBD1 locus-a GISC study. *Eur. J. Human Genet.* 1999; 7: 567-573.
- 18) Cho J. The NOD 2 in Crohn disease: Implication for future research into the genetic and immunology of Crohn disease. *Inflammatory bowel disease.* 2001; 7 (3): 271-275.

- 19) Ahmad T., Marshall S., et al. Genotype-based phenotyping heralds a new taxonomy for inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2003 Jul; 19 (4): 327-35.

- 20) Mathew C.G. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum. Mol. Genet.* 2004 Apr; 13 Spec. no. 1: R 161-8.

- 21) Harries A.D., Baird A., Rhodes J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *BMJ* 1982; 284: 954-956.

- 22) Reif S., Klein I., Arber N., Gilat T. Lack of association between smoking and inflammatory disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology* 1995; 108: 1683- 1687.

- 23) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: dogmas and heresies. *Digest liver* 2002; 34: 306-311.

- 24) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and Pathogenesis *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.

- 25) Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Majett W., Ewe K., Busche-Felde K. H. Mz. Tolerance exists toward resident flora is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Exp. Immunol.* 1995; *102*: 448- 445.
- 26) Arend P., Martini G.A. Ulcerative colitis: Etiologic unity or polyetiologic syndrome? *A.M. J. Protocol* 1970 ; *21*: 331-6.
- 27) Stallamach A., Schuppan D., Riese H. H., Matthes H., Rieken E.O. Increased collagen type 3 synthesis by fibroblast isolated from strictures of patients with Crohn's disease . *Gastroenterology* 1992; *102*: 1920-1929.
- 28) Mitsuhashi J. et al. Significant correlation of morphological remodelling in ulcerative colitis with disease duration and between elevated p53 and p21 (WAF1) expression in rectal mucosa and neoplastic development. *Pathology Inter.* 2005; *55*: 113-121.
- 29) Sands B.E., Sandborn W.J., Wolf D.C., Katz S. et al. Pilot feasibility studies of leukocytapheresis with the Adacolumn Apheresis System in patients with active ulcerative colitis or Crohn disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006 Jul; *40*(6): 482-9.
- 30) Riddell R.H. et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical application. *Hum. Pathol.* 1983; *14*:931-968.

- 31) Nossfinger A., Miller M., Cusi M. Fenoglio C. The pattern of cell proliferation in neoplastic and non-neoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer* 1996; *Vol. 78* No. 11.
- 32) Skinozaki M., Toshiaki R. et al. High proliferative activity is associated with displasia in ulcerative colitis. *Dis. Colon Rectum* 2000; *Vol. 43* No. 10 (*Suppl.*).
- 33) Wong N., Mayer N., Mackell S., Gilmour M., Harrison D.J. Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assist the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopatology* 2000; *37*: 108-114.
- 34) D'Arienzo A., Manguso F. et al. Ulcerative colitis, sieronegative spondyloarthropathies and allergic diseases: the search for link. *Scand. J. Gastroenterol.* 2002; (10).
- 35) Lashner BA, Bauer WM, Rybicki LA, Goldblum JR. Abnormal p53 immunohistochemistry is associated with an increased colorectal cancer-related mortality in patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2003 Jun; *98* (6): 1423-7.
- 36) Gleeson M., Walker J., Wentzel J., Chapman J., Harris R. Human leucocyte antigens in Crohn, disease and ulcerative colitis. *Gut*, 1972; *13*: 438-40.