

***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**Dottorato di Ricerca:**

**“Cause e meccanismi dell’infiammazione nelle malattie  
dell’apparato digerente”**

*Settore Scientifico-disciplinare: MED/12*

*Ciclo: XX*

**Variazione dei markers di attivata coagulazione indotta  
dalla terapia infusioneale con Infliximab in pazienti affetti  
da malattie infiammatorie croniche intestinali**

Tesi presentata da: Dr.ssa **Luisa Spina**

Coordinatore del dottorato: Chiar.mo Prof. **MASSIMO CAMPIERI**

Relatore: Chiar.mo Prof. **MAURIZIO VECCHI**

Esame Finale Anno 2008

## INDICE

Indice.....	2
Introduzione.....	3
• Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD).....	3
• IBD e trombosi.....	10
• Infiammazione e coagulazione.....	16
• La terapia biologica.....	19
Scopo dello studio.....	21
Pazienti e Metodi.....	21
Risultati.....	23
Discussione.....	29
Bibliografia.....	32

## **INTRODUZIONE**

### **LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (IBD)**

Col termine di malattie infiammatorie croniche intestinali (più comunemente note con il termine IBD, acronimo dell'inglese Inflammatory Bowel Diseases) ci si riferisce a entità cliniche ad eziologia sconosciuta e patogenesi complessa che colpiscono, in diverso modo, il tratto gastrointestinale; le due più frequenti e note sono la rettocolite ulcerosa (RCU) e la malattia di Crohn (MdC).

La malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa interessano circa 2,2 milioni di persone in Europa (1); in Italia, l'incidenza stimata della rettocolite ulcerosa è di 5.2 casi su 100.000 abitanti per anno, con una prevalenza di circa 70-150 casi/100.000, e della malattia di Crohn di 2.3 casi su 100.000 abitanti per anno, con una prevalenza di 20-40 casi/100.000 (2, 3). Le IBD sono più frequenti nei paesi industrializzati e tra le popolazioni caucasiche che tra quelle africane od orientali, con un'incidenza più elevata (da 3 a 6 volte) tra gli ebrei. Recenti studi tuttavia, hanno dimostrato un incremento d'incidenza nei paesi del terzo mondo a fronte di un plateau negli altri (4, 5) e un livellamento tra i diversi gruppi etnici, probabilmente attribuibile alla tendenza in atto verso un progressivo uniformarsi delle abitudini di vita.

Tutti i gruppi d'età sono a rischio per le IBD anche se il riscontro di queste patologie in soggetti al di sotto dei 10 anni e al di sopra degli 80 anni è del tutto occasionale. Generalmente ne vengono colpiti i giovani adulti e il picco maggiore di esordio di queste due malattie si colloca tra 15 e 35 anni per

l'uomo e tra 20 e 40 anni per la donna, con un secondo picco comune tra i 50 e i 60 anni.

La malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa condividono molti aspetti clinici ed epidemiologici, suggerendo l'ipotesi che le due patologie possano condividere meccanismi fisiopatogenetici comuni, e non è infrequente incontrare casi in cui sia pressoché impossibile distinguere sul piano clinico, ma anche endoscopico ed istologico, la malattia di Crohn dalla rettocolite ulcerosa; in questi casi, circa il 10% delle IBD, si utilizza il termine di colite indeterminata. D'altra parte, la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa rimangono sindromi distinte, caratterizzate da modalità di distribuzione dell'infiammazione, prognosi e approcci terapeutici almeno in parte diversi. Dobbiamo a questo proposito ricordare che, essendo l'eziologia delle IBD non ancora chiarita e compresa, la terapia medica, per quanto spesso risulti efficace nell'alleviare o risolvere la sintomatologia, non ha possibilità curative.

La malattia di Crohn è una condizione di infiammazione cronica che può interessare tutto il tratto alimentare, dalla bocca all'ano, ma con una certa predilezione soprattutto per la porzione distale dell'intestino tenue e per il colon prossimale, mentre la rettocolite ulcerosa colpisce tipicamente il retto, interessando con un'estensione in senso prossimale diversi segmenti del solo colon. L'infiammazione nella malattia di Crohn presenta spesso una distribuzione endoscopica discontinua, ma coinvolge tipicamente tutti gli strati della parete intestinale, dalla mucosa alla sierosa; diversamente, nella colite ulcerosa il coinvolgimento infiammatorio presenta un pattern

endoscopico di continuità ed è limitato agli strati superficiali, solitamente non superando la mucosa.

Sono state proposte diverse aree di importanza eziologica alla base delle IBD; esse comprendono fattori genetici, ambientali, immunologici, infettivi e psicologici. Tra i vari fattori di rischio proposti per lo sviluppo di IBD, la familiarità è considerata oggi il più importante. E' noto da tempo che la prevalenza delle IBD è maggiore nei parenti, soprattutto di primo grado, dei pazienti affetti rispetto alla popolazione generale (6, 7). L'aggregazione familiare può derivare dalla condivisione di fattori genetici e/o ambientali; nel campo delle IBD alcune osservazioni fanno supporre un maggiore contributo da parte dei fattori genetici. Tra queste osservazioni ricordiamo: la maggiore frequenza osservata nei gemelli monozigoti rispetto a quelli eterozigoti, e questo vale soprattutto per la malattia di Crohn (8, 9), l'aumentata prevalenza in alcune etnie, quale quella ebraica (10) e l'anticipazione genetica, definita come l'esordio progressivamente più precoce nelle diverse generazioni (11). Gli studi sull'aggregazione familiare sembrano comunque escludere un'ereditarietà secondo le leggi mendeliane semplici (12) e suggerire piuttosto una trasmissione poligenica. Recentemente sono stati individuati numerosi *loci* cromosomici associati alle IBD, definiti per questo motivo "caldi" (13). Ancora più recentemente, sono state identificate delle mutazioni a carico di alcuni geni in grado di conferire suscettibilità allo sviluppo della malattia di Crohn. I dati più consistenti sono quelli relativi a tre polimorfismi a carico del gene CARD15 (14-16) che sono osservati complessivamente nel 30-40% dei pazienti affetti da malattia di

Crohn e nel 5-10% dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e dei soggetti sani.

Per quanto riguarda i fattori ambientali, occorre dire che nessuno è stato riconosciuto con certezza come possibile causa delle malattie infiammatorie intestinali. I dati più robusti riguardo ad una associazione tra fattori ambientali e IBD sono quelli relativi al fumo di sigaretta e all'appendicectomia. In particolare sembra che il fumo abbia un ruolo protettivo nei confronti della rettocolite ulcerosa e un effetto deleterio nei confronti della malattia di Crohn (17) e che l'appendicectomia, soprattutto se eseguita entro i 20 anni, possa proteggere dall'insorgenza della rettocolite ulcerosa (18).

Tra gli altri fattori che sono stati suggeriti essere potenzialmente associati alle IBD, con dati più o meno convincenti, ricordiamo l'uso di contraccettivi orali nelle donne, l'utilizzo di FANS, le infezioni virali, come il morbillo, nell'infanzia e alcuni costituenti della dieta, quali gli zuccheri raffinati e i grassi insaturi. Anche la ricerca di un possibile agente infettivo coinvolto nella eziopatogenesi delle IBD ha dato finora esito negativo, sebbene sia possibile ipotizzare un ruolo svolto dai micobatteri atipici nella malattia di Crohn (19, 20). E' però anche ipotizzabile che un qualche microrganismo, in sé non patogeno o normale costituente della flora batterica, possa risultare patogeno e/o scatenare un'alterata risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata in un ospite suscettibile (21).

Infine, lo stress psicologico è stato da sempre riportato come un elemento scatenante le IBD, magari attraverso un'alterazione della risposta immune (22). Sulla base delle attuali conoscenze, appare però più plausibile che

esso sia un fenomeno secondario all'essere affetti da una malattia cronica, ad eziologia ignota e anche potenzialmente invalidante, soprattutto in età giovanile.

In sintesi, tutti i dati esposti concorrono nel rendere a tutt'oggi più accreditata l'ipotesi secondo cui alla base delle malattie infiammatorie croniche intestinali ci sia una predisposizione genetica a sviluppare una risposta immunologica abnorme o inappropriata contro antigeni o agenti non patogeni, o addirittura del *self*, e che quindi i fattori ambientali rappresenterebbero l'elemento scatenante o modulatore di questa risposta. La clinica di queste patologie abbraccia sintomi più specificamente intestinali, complicanze locali ed extraintestinali.

Accanto a sintomi d'esordio eclatanti (diarrea, perdite ematiche con anemizzazione, calo ponderale), esistono quadri più subdoli caratterizzati da dolori addominali mal localizzabili, febbre, astenia.

Accanto alle principali manifestazioni appena ricordate, è frequente il verificarsi di complicanze locali quali fistole, ascessi, stenosi (quasi esclusive della malattia di Crohn), oppure perforazione, megacolon tossico e un'aumentata incidenza di carcinoma intestinale, correlata all'estensione del processo infiammatorio e alla durata dello stesso. Queste ultime complicanze sono più frequenti nella rettocolite ulcerosa.

### **Le complicanze extraintestinali delle malattie infiammatorie croniche intestinali**

Le complicanze extraintestinali delle IBD sono probabilmente dovute in parte a meccanismi autoimmuni o al deposito di immunocomplessi, in parte rappresentano la diretta conseguenza delle alterazioni delle porzioni di

intestino interessate dal processo flogistico; la loro eziologia, tuttavia, rimane per molti aspetti ancora oscura.

Complicanze epatobiliari: comprendono un ampio spettro di patologie con diversa gravità. Si può avere un semplice movimento delle transaminasi e della fosfatasi alcalina come espressione di una steatosi o di un'epatite focale aspecifica, piuttosto che un quadro di pericolangite o di colangite sclerosante vera e propria con la possibilità che quest'ultima evolva in cirrosi biliare secondaria; sempre a livello delle vie biliari è possibile riscontrare un'aumentata incidenza di colangiocarcinoma e di colelitiasi. Complicanze articolari: esistono sia forme periferiche (25%) sia assiali (10%). Le prime hanno generalmente le caratteristiche di artralgie oppure di mono o poliartrite migrante e colpiscono soprattutto polsi, caviglie, anche e ginocchia (ma qualsiasi altra articolazione ne può essere colpita); sono sieronegative, maggiormente associate ad un coinvolgimento colico esteso e strettamente correlate all'attività della malattia. Le forme assiali invece (Spondilite Anchilosante e Sacroileite), hanno decorso indipendente della patologia di base, possono precedere addirittura di anni la comparsa dei sintomi intestinali e persistere dopo la remissione, sono generalmente HLA-B27 positive e hanno esito invalidante.

Complicanze cutanee e mucose: presenti in circa il 15% dei pazienti, anch'esse sono più frequenti nelle localizzazioni coliche e correlano con le fasi di attività della malattia. La più frequente è l'Eritema Nodoso, una vasculite da immunocomplessi comune anche ad altre affezioni croniche. Esso si manifesta soprattutto alla superficie estensoria delle gambe e guarisce senza esiti cicatriziali. Il Pioderma Gangrenoso è una lesione



ulcerativa relativamente dolorosa con sede spesso al tronco, alla sua scomparsa lascia vistose cicatrici. Particolarmente associata al riacutizzarsi della malattia è la comparsa di Stomatite Aftosa, ulcere dolenti della mucosa orale che scompaiono spontaneamente senza bisogno di una terapia specifica e senza lasciare esiti.

Complicanze oculari: episclerite, irite ricorrente ed uveite compaiono in circa il 5% dei casi e sono considerate complicanze gravi la cui severità coincide con la gravità della malattia intestinale.

Complicanze nutrizionali e metaboliche: non di rado nei pazienti affetti da IBD si osserva un calo ponderale, associato nei casi più severi ad una diminuzione della massa muscolare e, qualora si tratti di un bambino, a ritardo della crescita; è possibile l'instaurarsi di un deficit elettrolitico (soprattutto  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ) come di un'ipoalbuminemia (sia per restrizione dietetica che per enteropatia protidodispersiva). Frequentemente le carenze alimentari dovute alla malattia si manifestano anche a livello della crasi ematica con anemia, che assumerà le caratteristiche normo-, micro- o macro-citiche a seconda che prevalga rispettivamente l'eziologia da malattia cronica, da deficit di ferro, oppure da carenza di folati e vitamina  $B_{12}$ . Caratteristico della malattia di Crohn a localizzazione ileale è il deficit di sali biliari cui possono far seguito steatorrea e deficit di vitamine liposolubili, un aumentato assorbimento colico di ossalati con conseguente iperossaluria e calcoli renali secondari, un maggiore potere litogeno della bile e successiva formazione di calcoli nella colecisti.

Miscellanea: sierositi, amiloidosi, nefropatie riportate in alcuni pazienti affetti da IBD.

## **IBD e TROMBOSI**

Tra le manifestazioni extraintestinali vengono inclusi anche i fenomeni tromboembolici che, sia per l'elevata mortalità e morbilità ad essi associate, sia per la giovane età dei soggetti colpiti, rivestono un ruolo importante (23-26). Essi possono coinvolgere il distretto venoso (trombosi venose profonde degli arti, trombosi delle vene polmonari) e il distretto arterioso (a livello cerebrale, retinico, mesenterico, cutaneo). Tuttavia, nonostante si sappia ormai da tempo che i soggetti affetti da IBD siano a maggior rischio trombotico rispetto alla popolazione generale, numerosi aspetti restano ancora da chiarire, come ad esempio l'esatta prevalenza dei fenomeni trombotici in corso di IBD (che varia tra l'1.0-6.7% degli studi clinici e il 39% degli studi autoptici) (23-25, 27) e gli esatti meccanismi della loro patogenesi, che sono a tutt'oggi sconosciuti. Il rischio di sviluppare TVP o EP tra i pazienti affetti da IBD é risultato da 3 a 10 volte superiore a quello della popolazione generale (28).

Per quanto i pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali possano talora essere esposti a importanti fattori di rischio per tromboembolie, quali il prolungato allettamento durante le fasi di massima acuzie, la possibilità di sepsi ed il frequente ricorso ad interventi chirurgici, nella maggior parte dei casi però essi non sembrano giocare un ruolo rilevante. Numerosi studi sono stati quindi indirizzati ad investigare i meccanismi coagulatori, evidenziando alterazioni qualitative e/o quantitative a carico delle piastrine, della cascata della coagulazione e della fibrinolisi, nonché un aumentata prevalenza di fattori di rischio per trombosi (quali iperomocisteinemia,

anticorpi antifosfolipidi). Proprio in ragione di queste numerose segnalazioni, i dati presenti in letteratura sono controversi se non apertamente contraddittori tra di loro. Resta da stabilire infine se le alterazioni riportate siano presenti solo nelle fasi di attività della malattia (data la stretta associazione esistente tra i mediatori della flogosi e i meccanismi della coagulazione) o anche durante le fasi di quiescenza e siano quindi una caratteristica “primitiva” delle IBD.

Occorre ricordare infine che la coagulazione del sangue, e più in generale l'emostasi, è assicurata da un sistema di meccanismi altamente integrati che assicurano un bilancio tra i fattori procoagulanti e quelli anticoagulanti; la trombosi è un evento complesso, in cui sono coinvolti più meccanismi e più fattori causali e, talvolta, le alterazioni osservate sono il risultato piuttosto che la causa delle trombosi stesse.

### **Stato di ipercoagulabilità, stato protrombotico**

Come abbiamo già detto, la patogenesi delle complicanze tromboemboliche rimane ancora sconosciuta, ma sembra ormai unanimemente riconosciuto che le malattie infiammatorie croniche intestinali siano caratterizzate da uno stato di ipercoagulabilità e/o da uno stato protrombotico.

Con il termine di stato di ipercoagulabilità si intende lo sbilanciamento della cascata coagulatoria a favore delle forze procoagulanti, dovuta ad un'eccessiva attivazione degli enzimi della coagulazione, senza segni clinici di trombosi .

Con il termine di stato protrombotico si intende invece quella condizione caratterizzata da un aumento dei fattori di rischio per trombosi e/o da una diminuzione dei naturali fattori anticoagulanti.

Passeremo ora brevemente in rassegna quali sono le alterazioni osservate nelle IBD a carico dei principali fattori implicati nella patogenesi delle trombosi.

### **Piastrine**

Le piastrine sembrano ricoprire un ruolo molto importante nei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali, sia per il loro utilizzo come indice infiammatorio indiretto, sia per la loro azione proinfiammatoria ed eventualmente protrombotica. Numerosi studi hanno dimostrato che nelle IBD le piastrine, oltre ad essere aumentate di numero, presentano alterazioni qualitative (29), una tendenza all'aggregazione spontanea (30) e un'aumentata sensibilità ad alcuni fattori proaggreganti (31, 32). Infine sono stati identificati anche aggregati piastrinici circolanti (31, 32) e a livello della mucosa rettale mediante biopsie (33).

### **Cascata della coagulazione**

Numerose segnalazioni di alterazioni sono state riportate a carico della cascata della coagulazione. Per la maggior parte riguardano incrementi del fattore V, del fattore VII:C, del fattore VIII e del fibrinogeno (23, 34) che sembrano essere correlati agli stati di attività della malattia.

Numerosi autori hanno inoltre dimostrato uno sbilanciamento della cascata coagulativa verso le forze procoagulanti attraverso lo studio di marcatori

che testimoniano la generazione di trombina. L'incremento del fibrinopeptide A (FpA), del frammento di protrombina 1 + 2 (F 1+2), del complesso trombina-antitrombina III (TAT) osservato nei pazienti affetti da IBD (35-37) è infatti compatibile con l'attivazione subclinica della coagulazione. L'attivazione della coagulazione è suggerita anche dalla diminuzione dei livelli circolanti di Fattore XIII (38, 39).

In letteratura esistono poi segnalazioni di una riduzione dei livelli degli anticoagulanti naturali in corso di IBD, in particolare di antitrombina III, proteina C e proteina S (36, 40); è evidente come una ridotta concentrazione di queste molecole comporti un aumentato rischio di sviluppare trombosi.

### **Fibrinolisi**

La fibrinolisi gioca un ruolo importante nella fisiologia dell'emostasi, rimuovendo i depositi di fibrina dai vasi e prevenendo la formazione dei coaguli all'interno dei vasi. Un aumento dell'attività fibrinolitica può determinare una tendenza emorragica, mentre una riduzione dell'attività fibrinolitica può predisporre allo sviluppo di trombosi.

In corso di IBD sono stati riportati dati a favore sia di una ipofibrinolisi, suggerita da ridotti livelli dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e/o da incrementati livelli del principale inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) (24, 41) sia di una iperfibrinolisi "reattiva", come conseguenza dell'attivazione della coagulazione, suggerita invece da elevati livelli di D-dimero, frammento derivante dalla degradazione della fibrina (42, 43).

## **Iperomocisteinemia**

L'omocisteina è un aminoacido solforato derivante dal metabolismo della metionina. E' ormai accertato che elevati livelli plasmatici di omocisteina sono associati ad aumentato rischio di trombosi arteriose e venose. Valori elevati di omocisteinemia possono essere determinati da deficit ereditari di enzimi coinvolti nelle vie metaboliche (es. cistationina-beta-sintetasi), dalla presenza di varianti enzimatiche meno attive (es. variante termolabile dell'enzima metilen-tetraidrofolato-reduttasi, MTHFR) o da deficienze acquisite di alcuni cofattori (acido folico, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>). Numerosi studi hanno riscontrato che l'iperomocisteinemia è di frequente riscontro nei pazienti affetti da IBD, con una prevalenza significativamente superiore dal punto di vista statistico rispetto alla popolazione generale (44-46). I maggiori determinanti di iperomocisteinemia in corso di IBD sembrano essere proprio i deficit vitaminici, frequentemente osservati in questo tipo di pazienti. Essi dipendono da diverse condizioni quali il ridotto introito dietetico, il malassorbimento (a sua volta conseguenza dell'inflammatione mucosa o degli interventi chirurgici di resezione), l'ipercatabolismo, l'interferenza con alcuni farmaci (come accade, ad esempio, con la salazopirina che può determinare un ridotto assorbimento di acido folico).

## **Anticorpi antifosfolipidi**

Gli anticorpi antifosfolipidi sono una famiglia eterogenea di immunoglobuline policlonali dirette contro fosfolipidi con carica negativa o neutra, la cui presenza è associata a trombosi arteriosa e venosa, aborti ricorrenti, trombocitopenia, emicrania e ad altre caratteristiche che costituiscono la

“sindrome da antifosfolipidi”. Essi includono gli anticorpi anticardiolipina (ACA) e l’anticoagulante del lupus (LAC) che sono stati identificati con maggiore prevalenza rispetto alla popolazione generale anche in pazienti con lupus eritematoso sistemico o condizioni “*lupus-like*” e in pazienti affetti da altre patologie, fra cui appunto le malattie infiammatorie croniche intestinali (47, 48), caratterizzate come sappiamo da un aumentato rischio trombotico e dalla presenza di un’ampia gamma di autoanticorpi circolanti.

Occorre infine ricordare che è stato suggerito da alcuni autori che lo stato protrombotico possa rappresentare un fattore eziologico nello sviluppo delle malattie infiammatorie croniche intestinali, alla base delle quali potrebbe esserci una sofferenza vascolare responsabile delle lesioni mucose intestinali (49, 50). In realtà, il coinvolgimento endoteliale, dimostrato dagli elevati livelli di fattore di von Willebrand e di trombomodulina (51, 52), sembra essere la conseguenza, e non la causa, dell’infiammazione, locale e sistemica.

### **Trombofilia ereditaria**

Poiché nella patogenesi delle IBD è implicato anche un certo grado di predisposizione genetica (53), molti autori hanno studiato il possibile ruolo nella genesi delle complicanze tromboemboliche dei principali fattori di rischio ereditari per trombosi, ossia il fattore V Leiden, la mutazione G20210A della protrombina e la variante termolabile dell’enzima MTHFR (metilentetraidrofolato reductasi). Dai numerosi studi presenti in letteratura sembra emergere che la prevalenza delle mutazioni genetiche non è

differente nei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa rispetto alla popolazione generale (54). Recentemente, un nostro studio (55), condotto su una popolazione di pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali e pregressa storia di trombosi (30 con rettocolite ulcerosa e 17 con malattia di Crohn), ha evidenziato che la prevalenza del fattore V Leiden e della mutazione G20210A della protrombina è in realtà minore rispetto ad una popolazione di controllo equilibrata per sesso, età, sede e tipo di trombosi. I nostri dati suggeriscono quindi che nell'ambito delle malattie infiammatorie croniche intestinali i fattori di rischio acquisiti giocano un ruolo principale nella genesi delle complicanze trombotiche.

## **INFIAMMAZIONE e COAGULAZIONE**

Tra i vari fattori acquisiti, l'attività di malattia (e quindi lo stato infiammatorio) sembra essere quello più verosimilmente implicato nella genesi delle complicanze trombotiche.

D'altra parte questa associazione è coerente con le recenti dimostrazioni della intima relazione biologica che esiste tra il sistema della flogosi e quello dell'emostasi. In particolare, è ormai accertato che l'attivazione della coagulazione agisce come un costituente della risposta infiammatoria mediando direttamente la risposta citochinica (56, 57) e che alcune citochine pro-infiammatorie (come IL-6 e TNF- $\alpha$ ) inducono l'attivazione della coagulazione (58, 59). Anche la fibrinolisi è strettamente collegata alla risposta infiammatoria; in particolare sembra che l'ipofibrinolisi, condizione notoriamente predisponente alla trombosi, rappresenti una caratteristica dello stato infiammatorio (60). Inoltre, lo stato infiammatorio può indurre una



riduzione dell'attività del principale sistema anticoagulante naturale, quello rappresentato dalla proteina C, dal suo cofattore proteina S e dai suoi recettori endoteliali EPCR (Endothelial Protein C Receptor) e trombomodulina (TM). E' stato infatti dimostrato che le citochine pro-infiammatorie determinano una down-regulation di EPCR e TM, con conseguente riduzione dell'attivazione della proteina C e quindi riduzione del potenziale antitrombotico a livello della superficie dei vasi (61).

Una conferma indiretta del possibile ruolo dell'infiammazione è fornita dall'osservazione che le trombosi che complicano il decorso delle malattie infiammatorie croniche intestinali nonché le alterazioni delle varie componenti del sistema dell'emostasi sembrano essere più frequenti durante le fasi di attività di queste malattie (55, 62, 63, 64, 65). L'infiammazione può aumentare il rischio di trombosi attraverso differenti meccanismi. Oltre ad attivare la cascata coagulatoria, a diminuire l'attività anticoagulante e quella fibrinolitica, come descritto sopra, essa può determinare uno stato ipercatabolico o una condizione di malassorbimento che possono determinare deficit vitaminici che, direttamente o tramite un aumento dei livelli circolanti di omocisteina, rappresentano una condizione protrombotica (66, 67).

In effetti, numerosi studi hanno dimostrato che nei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali la prevalenza di iperomocisteinemia è significativamente più elevata rispetto alla popolazione generale ed è verosimilmente dipendente dai ridotti livelli di acido folico, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> spesso osservati nei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e da malattia di Crohn (68-70). In questo senso uno

studio ha dimostrato che la supplementazione vitaminica è in grado di normalizzare i valori di omocisteinemia e quindi, verosimilmente, di ridurre il rischio trombotico associato ai suoi elevati livelli circolanti (68).

Una condizione infiammatoria, com'è noto, determina anche un incremento della conta piastrinica ed è in effetti noto da tempo che nelle malattie infiammatorie croniche intestinali le piastrine, oltre ad essere aumentate di numero, presentano alterazioni qualitative (71), una tendenza all'aggregazione spontanea (72), un'aumentata sensibilità ad alcuni fattori proaggreganti (73) e un profilo attivato, evidenziato dalla elevata espressione di *P-selettina* e *CD40 ligando* (CD40L) (74, 75). Appare quindi logico ipotizzare una loro possibile implicazione nelle manifestazioni trombotiche.

Recentemente, nel campo della patologia vascolare sono state meglio caratterizzate e descritte delle componenti cellulari dette "*microparticelle*". Esse sono vescicole di membrana rilasciate dalle cellule in fase di attivazione o durante apoptosi. La maggior parte delle *microparticelle* circolanti deriva dalle piastrine, ma esse possono derivare anche da leucociti, eritrociti e cellule endoteliali. Le *microparticelle* hanno caratteristiche procoagulanti ma sono in grado anche di intervenire nei processi infiammatori e di modulare le funzioni endoteliali (76). Un elevato numero di microparticelle è stato descritto in corso di patologie caratterizzate da coinvolgimento vascolare e infiammazione sistemica (sindromi coronariche acute, diabete mellito, DIC). Se da un lato l'effetto procoagulante sembra ben definito, resta ancora da stabilire se le *microparticelle* siano una causa o piuttosto una conseguenza dei processi

infiammatori e dei danni vascolari ad essi associati. Non sorprende comunque che un elevato numero di *microparticelle* derivate dalle piastrine sia stato osservato durante le fasi di attività della rettocolite ulcerosa (77).

L'attività di malattia sembra pertanto il principale fattore di rischio trombotico ma è possibile che altre caratteristiche cliniche possano agire in tal senso, come è stato ipotizzato per l'estensione di malattia (78, 69).

Tuttavia, è anche vero che le alterazioni del sistema dell'emostasi e gli eventi trombotici sono osservati anche durante le fasi di quiescenza clinica della rettocolite ulcerosa o addirittura prima della sua diagnosi (73, 79, 52, 80).

## **LA TERAPIA BIOLOGICA**

Con questo termine si intende il trattamento delle patologie attraverso materiali biologici o molecole in grado di modificare la risposta biologica, quali derivati ematici e vaccini, nonché anticorpi, peptidi, proteine ricombinanti, citochine, cellule e geni.

Esistono diverse strategie utilizzate per il trattamento delle IBD tramite terapia biologica e una di queste è il blocco della risposta infiammatoria tramite gli antagonisti del TNF- $\alpha$ .

Il Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) è una citochina proinfiammatoria che gioca un ruolo fondamentale nell'amplificazione dell'infiammazione a livello della mucosa intestinale dei pazienti affetti da malattia di Crohn. L'attività contro il TNF $\alpha$  può essere ottenuta attraverso anticorpi, proteine leganti o molecole antagoniste. Infliximab è un anticorpo chimerico monoclonale di classe IgG1, contenente il 75% di sequenze

umane e il 25% di sequenze murine. Infliximab si lega sia al TNF $\alpha$  circolante sia al TNF $\alpha$  legato alle membrane cellulari, neutralizzandone così gli effetti pro-infiammatori. E' stato inoltre dimostrato che esso può esercitare i suoi effetti anti-infiammatori attraverso due meccanismi aggiuntivi: l'induzione dell'apoptosi delle cellule T (81, 82) e l'inibizione della flogosi vascolare locale attraverso la *down-regulation* del sistema CD40-CD40L (83). Il farmaco viene somministrato per via endovenosa al dosaggio di 5mg/kg secondo lo schema di induzione a tempo 0 e a distanza di 2 e 6 settimane; nei pazienti che rispondono al trattamento è consigliata una terapia di mantenimento con un'infusione ogni 8 settimane.

I primi dati sull'utilizzo di infliximab nel trattamento della malattia di Crohn e sulla sua efficacia nella induzione della remissione clinica ed endoscopica risalgono alla metà degli anni Novanta dello scorso secolo (84).

Da allora infliximab ha dimostrato ottimi risultati sia in termini di risposta che di remissione clinica. Tali risultati sono stati ottenuti sia nella malattia di Crohn luminale che fistolizzante e più recentemente anche nella colite ulcerosa (85-89).

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Scopo del nostro studio è stato valutare le possibili variazioni di alcuni markers di attivazione della coagulazione, quali il frammento 1+2 della protrombina (F1+2) e il D-dimero, in associazione alla terapia infusioneale con anti-TNF $\alpha$  (infliximab) in pazienti affetti da IBD.

## **PAZIENTI E METODI**

### **Pazienti**

Sono stati arruolati nello studio, previo consenso informato scritto, 9 pazienti afferenti all'Unità di Gastroenterologia dell'Ospedale Policlinico di San Donato Milanese, che soddisfacevano i seguenti criteri di inclusione:

1. precedente diagnosi di malattia infiammatoria cronica intestinale posta mediante i criteri standard convenzionali, clinici, radiologici, endoscopici ed istologici indipendentemente dalla localizzazione e/o dall'estensione della malattia
2. età compresa tra i 18 e i 75 anni

Questi pazienti erano ulteriormente suddivisibili in due categorie:

Gruppo A (pazienti NAIVE): pazienti con malattia in fase di attività (CDAI > 150 o CAI > 4), non rispondente a terapia steroidea e/o ai farmaci immunosoppressori oppure pazienti in fase prolungata di "steroido-dipendenza" che intraprendevano terapia infusioneale con Infliximab.

Gruppo B (pazienti NON NAIVE): pazienti con malattia in fase di quiescenza o di attività, che avevano già iniziato la terapia infusioneale con Infliximab.

Sono stati quindi analizzati 48 campioni di plasma prelevati prima dell'infusione di infliximab (al dosaggio di 5 mg/kg) e a distanza di 1 ora dalla stessa.

Per ogni campione abbiamo misurato i livelli di F1+2 e D-dimero.

Il frammento F1+2 deriva dalla trasformazione della protrombina in trombina, per opera della protrombinasi ed è quindi un marker di attiva coagulazione. Il D-dimero deriva dalla azione litica della plasmina sulla fibrina stabilizzata dal fattore XIIIa ed è un marker di attivazione della cascata coagulatoria completa.

I dosaggi sono stati effettuati con metodica ELISA.

Nella tabella sottostante sono riportate le caratteristiche dei pazienti studiati.

M:F	5:4
malattia di Crohn	4
rettocolite ulcerosa	4
colite indeterminata	1
età media $\pm$ DS	47.6 $\pm$ 17.6 anni
pz naive	7
pz non naive	2

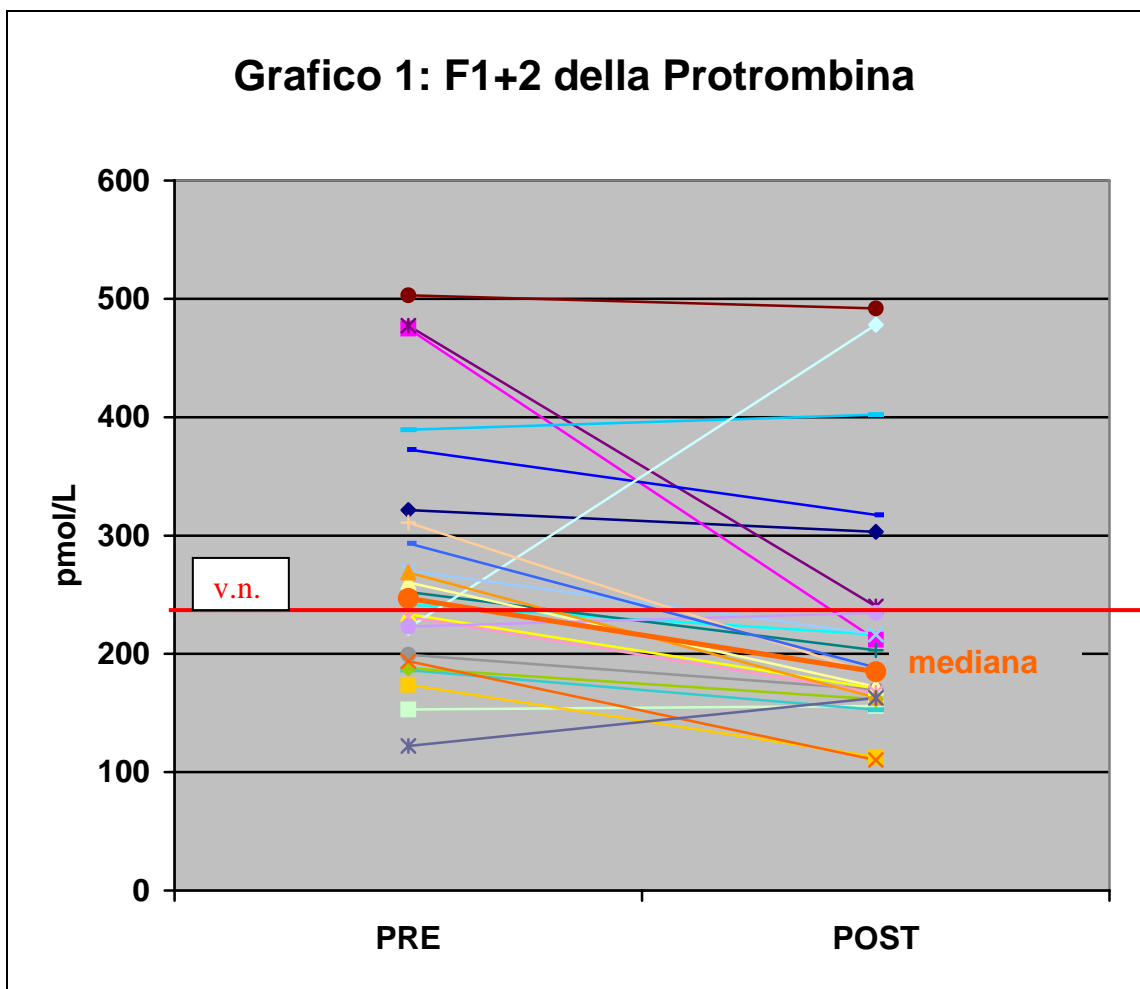
L'analisi statistica è stata condotta per mezzo del Wilcoxon matched paired test; il livello di significatività è stato considerato per  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

I livelli mediani del frammento F1+2 sono risultati significativamente ridotti un'ora dopo l'infusione di anti-TNF $\alpha$  (grafico 1):

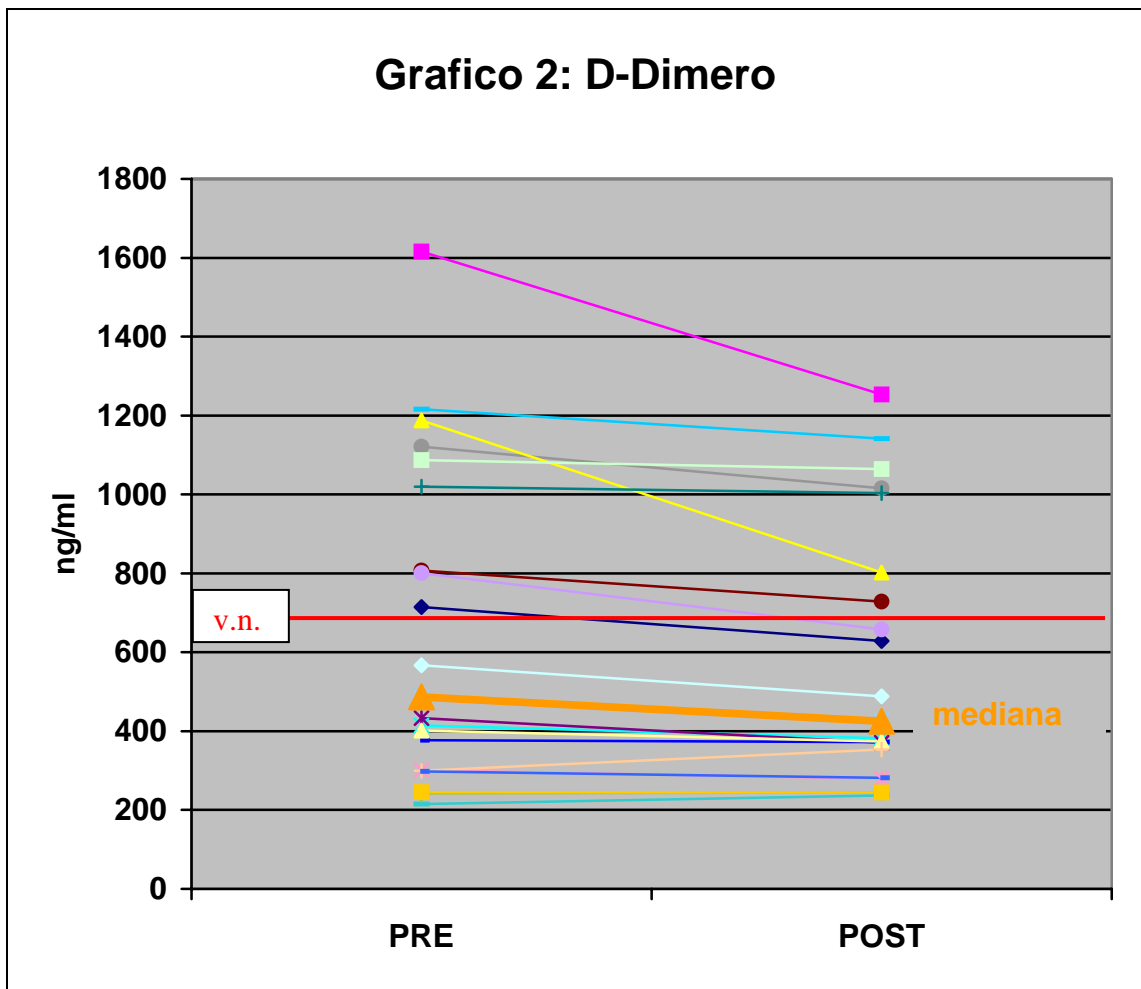
- livelli mediani pre-infusione: 247.0 pmol/l (range: 122.3-502.8)
- livelli mediani post-infusione: 185.3 pmol/l (range 110.4-491.8);  $p < 0.002$ .

In particolare i livelli mediani post-infusione sono rientrati nel range di normalità (69-229 pmol/L).



Lo stesso comportamento si è osservato per i livelli mediani di D-dimero (grafico 2):

- livelli mediani pre-infusione 485.2 ng/ml (range 215.0-1615.7)
- livelli mediani post-infusione 427.6 ng/ml (range: 237.1-1253.3);  
p<0.001.

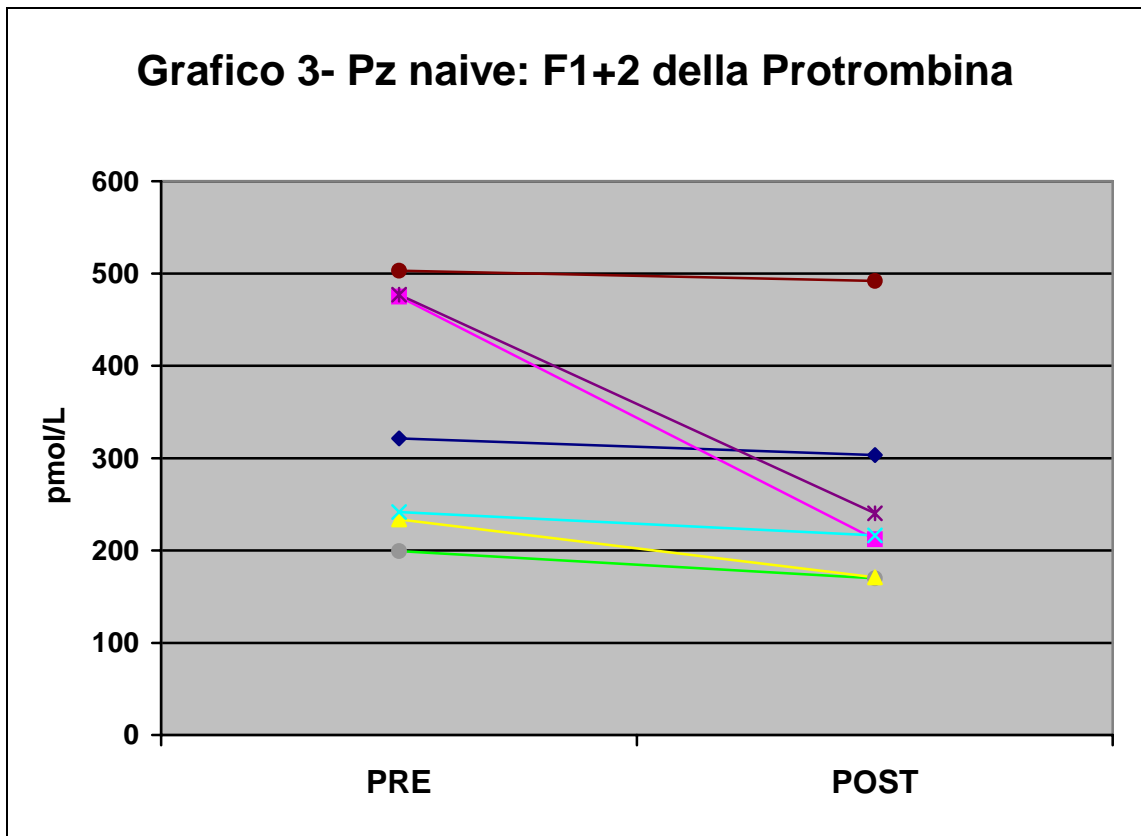




Stratificando i pazienti secondo il precedente uso o meno di terapia con infliximab si è osservato che le variazioni sono state maggiormente evidenti nei pazienti naive alla terapia con infliximab, e in particolare:

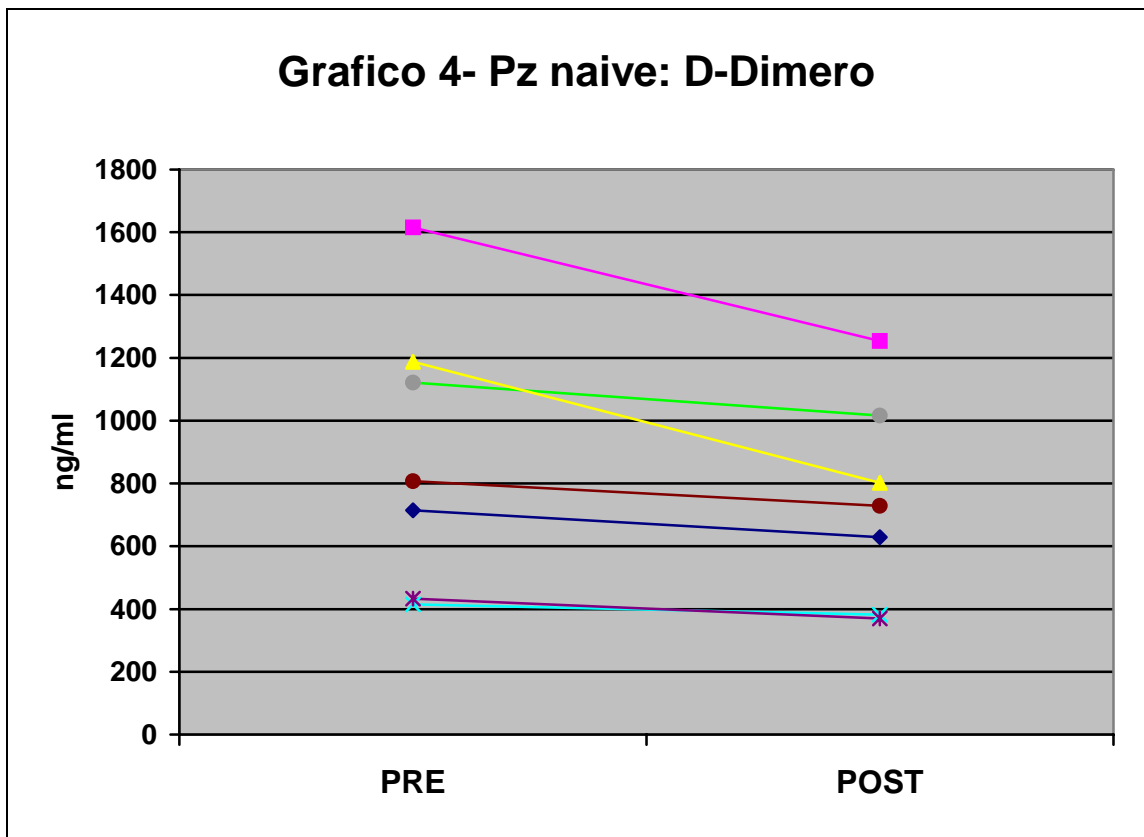
**Frammento F1+2:**

- pazienti naive (grafico 3):
  - livelli mediani pre-infusione: mediana 321.4 pmol/L (range: 199.3-502.8)
  - livelli mediani post-infusione: mediana 216.3 (range: 169.8-491.9);
  - p<0.02.
- pazienti non naive:
  - livelli mediani pre-infusione: mediana 231.3 pmol/L (range: 122.3-389.3)
  - livelli mediani post-infusione: mediana 172.3 pmol/L (range: 110.4-478.1); p<0.03.



### D-dimero:

- pazienti naive (grafico 4):
  - livelli mediani pre-infusione: 806.8 ng/ml (range: 414.6-1615.7)
  - livelli mediani post-infusione 728.6 ng/ml (range: 370.5-1253.3);  $p < 0.02$ .
- pazienti non naive:
  - livelli mediani pre-infusione: 389.2 ng/ml (range: 215.0-1215.7)
  - livelli mediani post-infusione 373.1 ng/ml (range: 237.1-1141.5);  $p < 0.04$ .



Stratificando poi i pazienti per il tipo di malattia si è osservato che le variazioni sono state maggiormente evidenti nei pazienti affetti da malattia di Crohn rispetto ai pazienti affetti da colite ulcerosa, e in particolare:

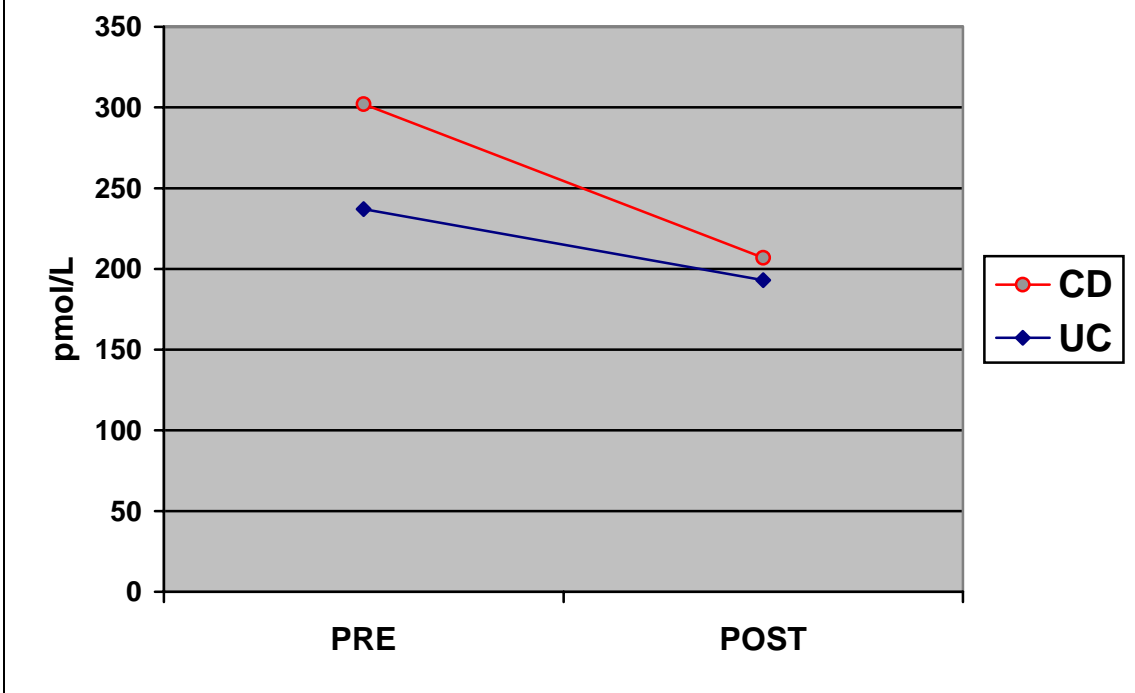
**Frammento F1+2** (grafico 5):

- pazienti affetti da malattia di Crohn:
  - livelli mediani pre-infusione 302.1 pmol/L (range: 245.0-380.5)
  - livelli mediani post-infusione 207.5 pmol/L (range: 185.7-319.8);  $p < 0.01$ .
- pazienti affetti da colite ulcerosa:
  - livelli mediani pre-infusione 237.7 pmol/L (range: 188.0-477.1)
  - livelli mediani post-infusione 193.6 pmol/L (range: 161.8-478.1);  $p = 0.19$ .

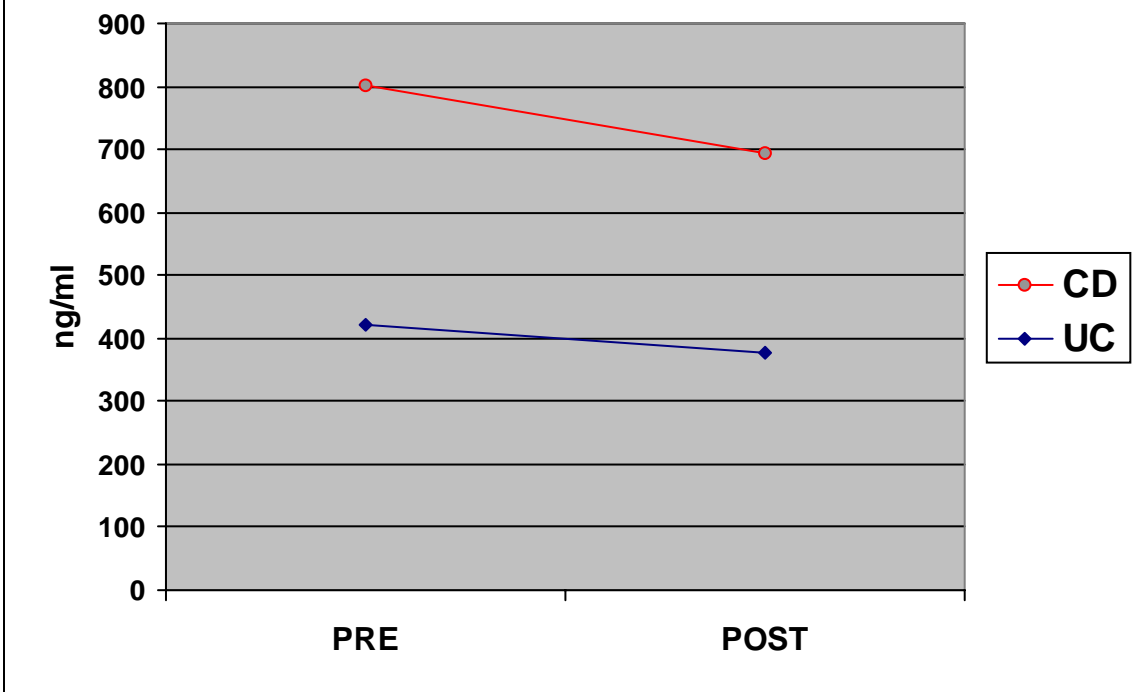
**D-dimero** (grafico 6):

- pazienti affetti da malattia di Crohn:
  - livelli mediani pre-infusione 803.7 ng/ml (range: 297.8-1615.7)
  - livelli mediani post-infusione 693.3 ng/ml (range: 281.7-1253.3);  $p < 0.007$ .
- pazienti affetti da colite ulcerosa:
  - livelli mediani pre-infusione 423.8 ng/ml (range: 242.5-1187.2)
  - livelli mediani post-infusione 376.2 ng/ml (range: 244.4-802.6);  $p < 0.03$ .

**Grafico 5: livelli mediani F1+2**



**Grafico 6: livelli mediani D-dimero**



## DISCUSSIONE

E' ormai noto che l'attivazione della coagulazione agisce come un costituente della risposta infiammatoria mediando direttamente la risposta citochinica (56, 57) e che alcune citochine pro-infiammatorie (come IL-6 e TNF- $\alpha$ ) inducono l'attivazione della coagulazione ad esempio inducendo l'espressione del fattore tissutale su cellule intravascolari, riducendo i livelli di trombomodulina e del recettore endoteliale per la proteina C (58, 59). Infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro il TNF $\alpha$ ; gli effetti anti-infiammatori di tale molecola si esplicano attraverso due meccanismi addizionali ad oggi dimostrati: l'induzione dell'apoptosi delle cellule T (81, 82) e l'inibizione della flogosi vascolare locale attraverso la *down-regulation* del sistema CD40-CD40L (83).

In questo studio preliminare abbiamo studiato l'effetto dell'infusione di infliximab su due parametri di attivazione della coagulazione: il frammento F1+2 della protrombina e il D-dimero. Il frammento F1+2 deriva dalla trasformazione della protrombina in trombina e rappresenta un marcatore di attiva coagulazione. Il D-dimero deriva invece dalla azione litica della plasmina sulla fibrina stabilizzata dal fattore XIIIa ed è un marcatore di attivazione della cascata coagulatoria completa.

Nel nostro studio abbiamo osservato che, immediatamente, dopo l'infusione di infliximab si assiste ad una rapida e significativa riduzione dei livelli mediani del frammento F1+2 della protrombina e del D-dimero. Questo risultato si ottiene sia nei pazienti mai esposti in precedenza a terapia con anti-TNF $\alpha$  sia nei pazienti già trattati; l'effetto sembra però essere più

evidente nella prima categoria di pazienti, dove peraltro i livelli basali dei due fattori sono più elevati.

Quando abbiamo stratificato i pazienti secondo la diagnosi, abbiamo osservato che la riduzione sia del frammento F1+2 della protrombina che del D-dimero è più marcata nei pazienti affetti da malattia di Crohn. Se consideriamo che i livelli basali del frammento F1+2 della protrombina e del D-dimero sono superiori nei pazienti affetti da malattia di Crohn rispetto a quelli affetti da colite ulcerosa si potrebbe ipotizzare che l'attivazione della coagulazione abbia intensità e significato differenti nelle due condizioni patologiche. Ricordiamo a questo proposito che in effetti, seppur spesso considerate insieme per le numerose analogie, le due patologie in realtà, rappresentano a tutt'oggi entità cliniche distinte, con caratteristiche fenotipiche, genetiche e verosimilmente patogenetiche, alquanto differenti.

Il dato più interessante che emerge dal nostro studio è probabilmente la rapidità con la quale si assiste alla riduzione dei livelli del frammento F1+2 della protrombina e del D-dimero. Questo ci consente di ipotizzare che essa sia la conseguenza di un meccanismo di azione diretto da parte di infliximab sull'espressione di questi fattori piuttosto che un effetto mediato da citochine pro-infiammatorie.

I nostri dati sono coerenti con altri studi che hanno dimostrato l'effetto diretto delle infusioni di infliximab su altre molecole della cascata coagulatoria e della fibrinolisi (90, 91).

Il nostro studio è stato condotto su un campione di pazienti relativamente esiguo. Le nostre osservazioni devono essere considerate quindi come preliminari e rappresentare la base su cui sviluppare altri studi da condurre

su casistiche di pazienti più ampie correlando le osservazioni sui parametri coagulanti con le caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti (ad esempio relazioni con la sede di malattia, con i valori degli indici di infiammazione, con gli indici di attività clinica). L'ulteriore scopo sarà quello di meglio comprendere la rilevanza clinica di queste modificazioni e infine le possibili ripercussioni sulla gestione dei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Edward V, Loftus JR. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence and Environmental Influences. *Gastroenterol* 2004; 126: 1504-17.
2. Tragnone A, Corrao G, Miglio F, Caprilli R, Lanfranchi GA. Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: a nationwide population-based study. *Int J Epidemiol* 1996; 25:1044-52.
3. Ranzi T, Bodini P, Zambelli A, Politi P, Lupinacci G, Campanini MC, Dal Lago AL, Lisciandrano D, Bianchi PA. Epidemiological aspects of inflammatory bowel disease in a north Italian population: a 4 year prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:657-61.
4. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. Review articles. *N Engl J Med* 1991; 325: 928-937.
5. Ekblom A, Helmic C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350.
6. Kirsner JB, Spencer JA. Family occurrence of ulcerative colitis, regional enteritis, and ileocolitis. *Ann Intern Med* 1963;59: 133-44.
7. Kirsner JB. Genetic aspects of inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 1973;2: 557-75.
8. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35: 1075-81.
9. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29: 990-96.
10. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34: 517-24.
11. Polito JM, Rees RC, Childs B, Mendeloff AI, Harris ML, Bayless TM. Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet* 1996;347: 798-00.



12. Mc Connel RB: Genetics of inflammatory bowel disease. In: Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Hawkins C eds. Inflammatory Bowel disease. New York: Curchill Livingstone 1983; 8-16.
13. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenomics of IBD. *Gastroenterol* 2004;126: 1533-1549.
14. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411: 599-603.
15. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Morn T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkr JP, Brnt SR, Byless TM, Kirschner BS, Hnauer SB, Nunez G, Cho JH. Frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411: 603-6
16. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM; Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357: 1925-28.
17. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking- a review. *Am J Gastroenterol* 1998;93: 144-49.
18. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001; 344:808-14.
19. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29:1073-79.
20. Thayer WR Jr, Coutu JA, Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS: Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterium antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29:1080-5.
21. Roke JK, Fiocchi C, Youngman K. Sensitization to epithelial antigens in chronic mucosal inflammatory disease. *J Clin Invest* 1985; 75:522-30.

22. Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 1993;55: 364-79.
23. Talbot RW, Heppell J, Dozois RR, Beart RW. Vascular complications of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1986; 61:140-5.
24. Gris JC, Schved JF, Raffanel C, Dubois A, Aguilar-Martinez P, Arnaud A, Sanchez N, Sarlat C, Balmès JL. Impaired fibrinolytic capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost* 1990;63: 472-75.
25. Sloan WP Jr, Bargaen JA, Getà RB. Life histories of patients with chronic ulcerative colitis: A review of 2.000 cases. *Gastroenterol* 1968;54 (suppl):819-22.
26. Jackson LM, O'Gorman PJ, O'Connell J, Cronin CC, Cotter KP, Shanahan F. Thrombosis in inflammatory bowel disease: Clinical setting, procoagulant profile and Factor V Leiden. *QJM* 1997; 90:183-8.
27. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, Osterode W, Tilinger W, Feichtenschletär T, Grisar J, Machold K, Scholz, Vogelsang H, Novacek G. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut* 2004;53: 542-48
28. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thromb Haemost* 2001;85: 430-434.
29. Koenigs KP, McPhedran P, Spiro HM. Thrombosis in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9:627.
30. E. Chiarantini, R.Valanzano, A.A. Liotta, A.P. Cellai, S. Fedi, I. Ilari, D. Prisco, F. Tonelli R Abbate. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Thromb Res* 1996;82:137-146.
31. Webberly MJ, Hart M, Melikian V. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut* 1993; 34:247-51.
32. Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1994; 106:840-45.
33. Dhillon AP, Anthony A, Sim R, Wakefield AJ, Stankey EA, Hudson M, Callison MC, Pounder RE. Mucosal capillary thrombi in rectal biopsies. *Histopathology* 1992;21:127-33.

34. Hudson M, Chitolie A, Hutton R, Smith MSH, Pounder RE, Wakefield AJ. Thrombotic vascular risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:733-737.
35. Hudson M, Hutton R, Wakefield A, Sawyerr A, Pounder RE. Evidence for activation of coagulation in Crohn's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992;3: 773-78.
36. Souto JC, Martinez E, Roca M, Mateo J, Pujol J, Gonzalez D, Fontcuberta J. Prothrombotic state and signs of endothelial lesion in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1995;40: 1883-89.
37. Chamouard P, Grunebaum L, Wiesel ML, Frey PL, Wittersheim C, Sapin R, Baumann R, Cazenave JP. Prothrombin fragment 1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex as markers of activation of blood coagulation in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995;7 (12):1183-8.
38. Stadnicki A, Kloczko J, Nowak A, Sierka E, Sliwinski Z. Factor XIII subunits in relation to some other haemostatic parameters in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1991;86:690-95.
39. Hudson M, Wakefield AJ, Hutton RA, Stankey EA, Dhillon AP, More L, Sim R, Pounder RE. Factor XIIIa subunit and Crohn's disease. *Gut* 1993;34:35-39.
40. Saibeni S, Vecchi M, Valsecchi C, Faioni EM, Razzari C, de Franchis R. Reduced free protein S levels in patients with inflammatory bowel disease. Prevalence, clinical relevance and role of anti-protein S antibodies. *Dig Dis Sci* 2001;46. 637-43.
41. De Jong E, Porte R.J., Knot E.A.R., Verheijen J.H. and Dees J. Disturbed fibrinolysis in patients with inflammatory bowel disease. A study in blood plasma, colon mucosa, and faeces. *Gut* 1989;30:188-194.
42. Kjeldsen J, Lassen JF, Brandslund I, Schaffalitzky de Muckadell OB. Markers of coagulation and fibrinolysis as measures of disease activity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 637-43.
43. Biancone L, Scopinaro F, Maletta M, Monteleone G, Luzzza F, Banci M, Mercantini P, Renda T, Pallone F. Circulating D dimer in inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol* 1994;26: 116-20.

44. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Saibeni S, Martinelli I, Omodei P, Mannucci PM, de Franchis R. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemost* 1998;80: 542-45.
45. Koutroubakis IE, Dilaverai E, Vlachonikolis IG, Vardas E, Vrentzos G, Ganotakis E, Mouzas IA, Gravanis A, Emmanoel D, Kouroumalis EA. Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000;45: 2347-51.
46. Oldenburg B, Fijnheer R, van den Griend R, van Berge-Henegouwen GP, Koningsberger JC. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 2825-30.
47. Chamouard P, Grunebaum L, Wiesel ML, Freyssinet JM, Duclos B, Cazenave JP, Baumann R. Prevalence and significance of anticardiolipin antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39:1501-4.
48. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht GA, Wenzl HH, Eherer AJ, Hinterleitner TA, Auer-Grumbach P, Kreis GJ. Anti-Cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1999;44: 852-56.
49. Hamilton MI, Dick R, Crawford L, Thompson NP, Pounder RE, Wakefield AJ. Is proximal demarcation of ulcerative colitis determined by the territory of the inferior mesenteric artery? *Lancet* 1995; 345:668-90.
50. Wakefield AJ, Sawyer A, Dhillon A, Pounder R. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 1989:1057-62.
51. Meucci G, Pareti F, Vecchi M, Saibeni S, Bressi C, de Franchis R. Serum von Willebrand Factor levels in patients with inflammatory bowel disease are related to systemic inflammation. *Scand J Gastroenterol* 1999;34: 287-90.
52. Boehme MW, Autschbach F, Zuna I, Scherbaum WA, Stange E, Raeth U, Sieg A, Stremmel W. Elevated serum levels and reduced immunohistochemical expression of thrombomodulin in active ulcerative colitis. *Gastroenterol* 1997;113: 107-17.
53. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29: 990-96.

54. Papa A, Danese S, Grillo A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: inherited thrombophilia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98: 1247-51.
55. Spina L, Saibeni S, Battaglioli T, Peyvandi F, de Franchis R, Vecchi M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: role of inherited thrombophilia. *Am J Gastroenterol*. 2005;100: 2036-41.
56. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340: 448-54.
57. McEver RP. Adhesive interactions of neutrophils, platelets and the vessel during haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86: 746-56.
58. Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP et al. Interleukin-6 stimulates coagulation not fibrinolysis in humans. *Thromb Haemost* 1996;76: 738-42.
59. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M. Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13: 105-16.
60. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-Reactive Protein increases Plasminogen Activator Inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003; 107: 398-04.
61. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124: 26S-32S.
62. Talbot RW, Heppell J, Dozois RR, Beart RW Jr. Vascular complications of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1986; 61:140-5.
63. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99: 97-101.
64. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, Osterode W, Tillinger W, Feichtenschlager T et al. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut* 2004;53: 542-48.
65. Hudson M, Chitolie A, Hutton R, Smith MS, Pounder RE, Wakefield AJ. Thrombotic vascular risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38: 733-737.

66. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998; 338: 1042-1050.
67. Cattaneo M, Martinelli I, Mannucci PM. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 335: 974-5.
68. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Saibeni S, Martinelli I, Omodei P et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemost* 1998;80:542-545.
69. Oldenburg B, Fijnheer R, van der Griend R, van-Berge-Henegouwen GP, Koningsberger JC. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? *Am J Gastroenterol* 2000;95: 2825-30.
70. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol* 2003;98: 112-17.
71. Koenigs KP, McPhedran P, Spiro HM. Thrombosis in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9:627.
72. Chiarantini E, Valanzano R, Liotta AA, Cellai AP, Fedi S, Ilari I et al. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Thromb Res* 1996;82:137-146.
73. Webberley MJ, Hart M, Melikian V. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut* 1993;34: 247-51.
74. Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1994; 106:840-45.
75. Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2003;52 :1435-41.
76. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004;34: 392-401.

77. Andoh A, Tsujikawa T, Hata K, Arabi Y, Kitoh K, Sasaki M et al. Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100: 2042-48.
78. Novotny DA, Rubin RJ, Slezak FA, Porter JA. Arterial thromboembolic complications of inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35: 193-96.
79. van Bodegraven AA, Schoorl M, Baak JP, Linskens RK, Bartels PC, Tuynman HA. Hemostatic imbalance in active and quiescent ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96: 487-93.
80. Jackson LM, O'Gorman PJ, O'Connell J, Cronin CC, Cotter KP et al. Thrombosis in inflammatory bowel disease: clinical setting, procogulant profile and factor V Leiden. *QJM* 1997;90: 183-88.
81. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase dependent pathway. *Gastroenterology* 2001; 121:1145-57
82. ten Hove T, van Montfrans C, Pepelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 206-11
83. Danese S, Sans M, Scaldaferrri F, Sgambato A, Rutella S, Cittadini A, Piqué JM, Panes J, Katz JA, Gasbarrini A, Fiocchi C. TNF-alpha blockade down-regulates the CD40/CD40L pathway in the mucosal microcirculation: a novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in Crohn's disease. *J Immunol.* 2006 Feb 15;176(4):2617-24
84. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.* 1997 Oct 9;337(15):1029-35.
85. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasilias E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1999 Oct;117(4):761-9.

86. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P; ACCENT I Study Group.
87. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002 May 4;359(9317):1541-9.
88. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2004 Feb 26;350(9):876-85.
89. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2462-76.
90. Hommes DW, van Dullemen HM, Levi M, et al.: Beneficial effect of treatment with a monoclonal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on markers of coagulation and fibrinolysis in patients with active Crohn's disease. *Haemostasis* 1997; 27(6): 269-77.
91. Agirbasli M, Inanc N, Baykan OA, Direskneli H. The effects of TNF alpha inhibition on plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatological disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (5): 580-3.