



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA

**Stress ossidativo e capacità antiossidante nelle malattie
infiammatorie intestinali: risultati dello studio Ox-IBD**

**Oxidative stress and antioxidant capacity in inflammatory
bowel diseases: results of the Ox-IBD study**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Anna Tonnarelli

Relatore:

Prof.ssa Tiziana Galeazzi

Sessione straordinaria 2022

Anno Accademico 2020/2021

Indice

INTRODUZIONE	3
Capitolo primo: LO STRESS OSSIDATIVO	6
1.1 Le specie chimiche reattive	7
1.2 Gli antiossidanti	11
1.3 Biomarkers di stress ossidativo	13
1.4 Lo stress ossidativo nelle patologie	15
Capitolo secondo: LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (IBD)	16
2.1 Epidemiologia	18
2.2 Patogenesi	20
2.3 Diagnosi	22
2.4 Terapia	26
Capitolo terzo: LO STRESS OSSIDATIVO NELLE IBD	28
Capitolo quarto: SCOPO DELLA TESI	31
Capitolo quinto: MATERIALI E METODI	32
5.1 Determinazioni analitiche	35
5.1.1 Determinazione dei radicali reattivi dell'ossigeno (ROS)	35
5.1.2 Capacità antiossidante totale	36
5.1.3 Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS)	37
5.1.4 Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)	37
5.1.5 Proteine plasmatiche	38

5.2 Statistica	38
Capitolo sesto: RISULTATI	39
6.1 Caratteristiche cliniche dei gruppi di studio	39
6.2 Determinazioni analitiche del danno ossidativo e della risposta antiossidante	42
6.2.1 ROS	43
6.2.2 ORAC	44
6.2.3 FRAP	46
6.2.4 Perossidazione lipidica (TBARS)	47
6.2.5 Prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP)	48
6.2.6 Oxidative score	52
Capitolo settimo: DISCUSSIONE	53
Capitolo ottavo: CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD), inclusa la colite ulcerosa (UC) e il morbo di Crohn (CD), sono disturbi cronici recidivanti-remittenti, di eziologia multifattoriale, che colpiscono principalmente il tratto gastrointestinale (GI).

Le IBD sono il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici, funzionalità della barriera intestinale, risposta immunitaria innata ed adattativa, microbiota intestinale e fattori ambientali, come dieta, fumo, xenobiotici, etc.

La prevalenza e l'incidenza delle IBD sono in aumento negli ultimi anni, soprattutto nei paesi sviluppati. L'insorgenza di queste patologie in giovane età, la cronicità e le limitazioni che comportano alle normali attività quotidiane, nonché la possibile insorgenza di complicanze, determina una notevole riduzione della qualità della vita dei pazienti affetti, oltre ad avere un forte impatto sul sistema economico e socio-sanitario.

Un numero crescente di evidenze sperimentali mostra che l'esposizione costante del tratto gastrointestinale a fattori di rischio genera uno stress ossidativo (Ox-S), ovvero una sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e radicali liberi con conseguente insufficienza dei sistemi antiossidanti endogeni. Le interazioni innescate e mantenute dai ROS

sovraprodotti all'interno del microambiente pro-infiammatorio si traducono in un circolo vizioso che amplifica e sostiene l'infiammazione e favorisce la progressione della malattia.

La produzione endogena di antiossidanti è la prima linea di difesa contro i ROS, tuttavia in una condizione continua di insulto ossidativo, tali risorse sono insufficienti per neutralizzare l'azione delle specie reattive; i soggetti affetti di IBD, infatti, a fronte di una aumentata attività dei principali sistemi antiossidanti endogeni, mostrano una ridotta capacità antiossidante totale. Pertanto, si può supporre che l'interruzione del circolo vizioso produzione di ROS-infiammazione possa avere una forte rilevanza clinica per migliorare il microambiente pro-infiammatorio e promuovere la guarigione delle lesioni gastrointestinali.

Ad oggi sono ancora poco numerosi gli studi sul ruolo dello stress ossidativo condotti nei soggetti con malattia infiammatoria cronica intestinale, in particolare in pazienti pediatrici. Comprendere gli eventi precoci scatenati dall'insulto ossidativo e la risposta fisiologica a tale stress è di fondamentale importanza non solo per la comprensione della patogenesi delle IBD, ma anche per lo sviluppo di eventuali nuovi approcci terapeutici, in particolare per quanto riguarda l'impiego di composti antiossidanti naturali e sintetici.

Il presente lavoro si propone di quantificare lo stress ossidativo in pazienti adulti e pediatrici affetti da IBD, attraverso la misura di biomarkers circolanti specifici.

Capitolo primo

LO STRESS OSSIDATIVO

Il termine stress ossidativo identifica una modificazione della normale omeostasi intracellulare esistente tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente dalle cellule durante i processi metabolici, e l'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti [1,2].

Esiste in tutti gli organismi aerobi un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e il sistema di difesa antiossidante, che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto.

Lo stress ossidativo si verifica quando le sostanze ossidanti, prodotte da alterazioni a livello di tessuti, cellule e macromolecole biologiche, prevalgono e/o le sostanze antiossidanti si riducono (figura 1).

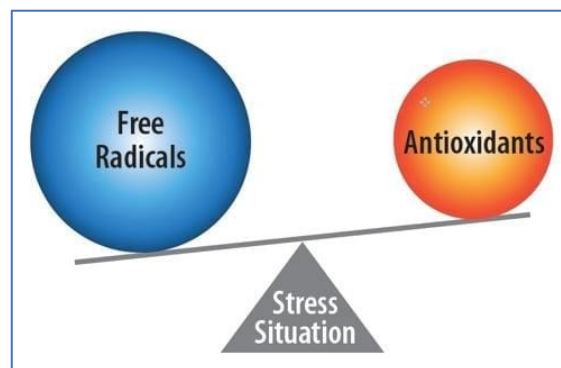


Figura 1: Sbilanciamento redox

In condizioni fisiologiche, la cellula è in grado di bloccare gli effetti dannosi dei radicali liberi grazie ad un insieme di sistemi antiossidanti. Le difese antiossidanti cellulari comprendono sia molecole a basso peso molecolare, che fungono da scavengers, sia enzimi antiossidanti, che collaborano fra loro come mostrato in figura 2.

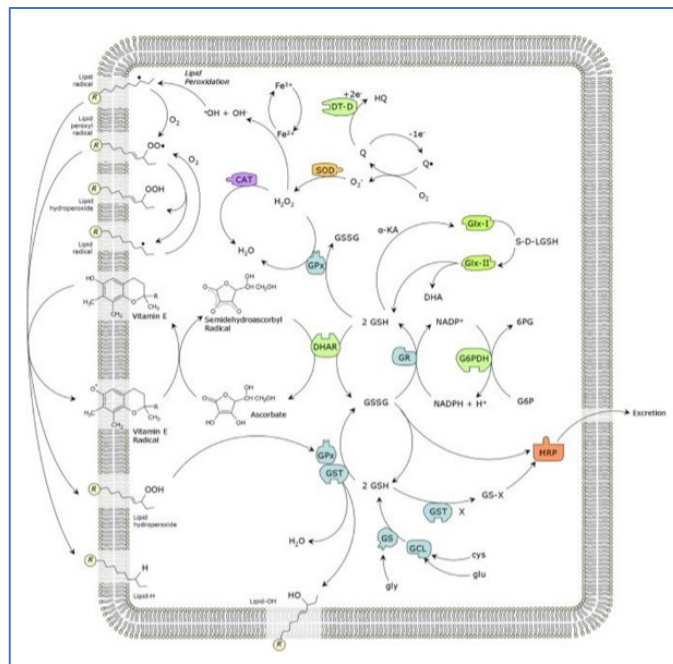


Figura 2: Pathway del bilanciamento redox intracellulare (da Regoli & Giuliani, 2014)

1.1 Le specie chimiche reattive

Le specie chimiche reattive (SCR), sono entità molecolari molto reattive che reagiscono, a seconda della loro natura e del mezzo in cui si trovano, con altre specie chimiche con cui entrano in contatto; tale meccanismo origina nuove molecole instabili ed innesca una reazione a catena che potrebbe danneggiare

le strutture cellulari. Se prodotte in eccesso, le specie radicaliche agiscono da agenti ossidanti inducendo danno ossidativo.

La produzione di radicali liberi è un evento fisiologico che si verifica normalmente nei processi biochimici cellulari, ad esempio nella catena di trasporto degli elettroni, ma anche in condizioni particolari come durante la fase infiammatoria (figura 3).

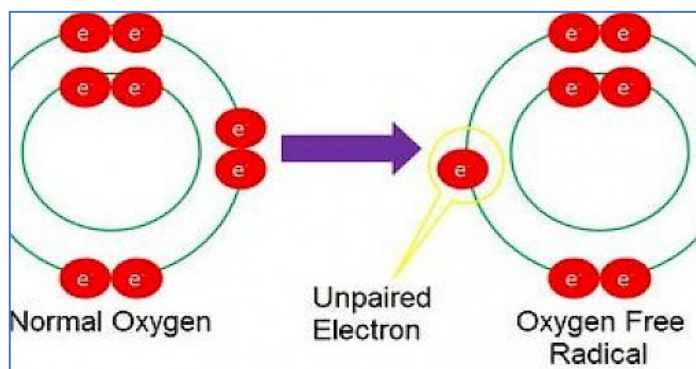


Figura 3: Radicale libero con elettroni spaiati

Alcuni fattori esterni come inquinamento, fumo e alcol, farmaci, sostanze tossiche presenti in natura o negli alimenti, stress psicofisico, radiazioni UV e ionizzanti possono portare ad uno sbilanciamento redox cellulare, dovuto ad una iperproduzione di radicali liberi e alla deplezione delle difese antiossidanti (figura 4).

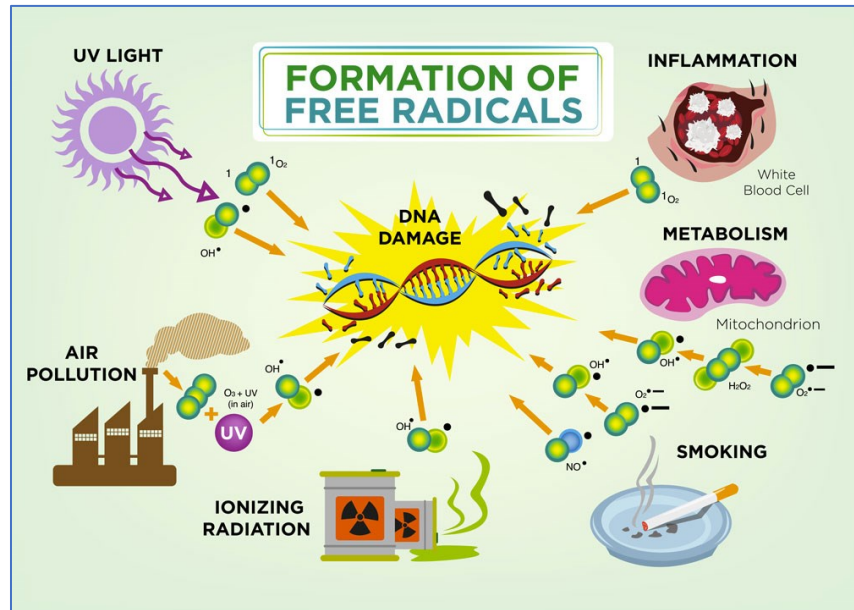


Figura 4: Formazione dei radicali liberi

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species) sono i radicali liberi a maggior diffusione. Le sostanze chimiche reattive più importanti sono l'anione superossido O_2^- , il perossido di idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $-OH$, mentre le specie reattive dell'azoto (RNS, Reactive Nitrogen Species) di maggior interesse sono l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito (ONOO) (figura 5) [3].

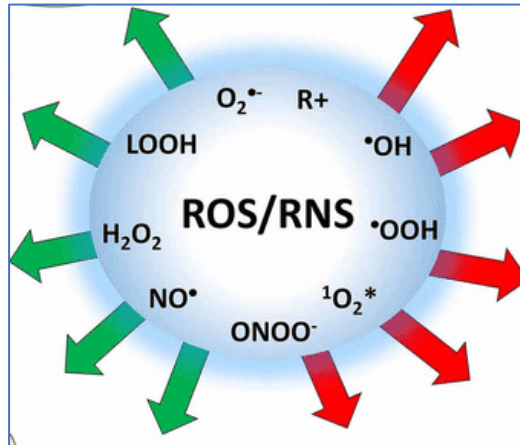


Figura 5: Specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS)

Queste sostanze sono responsabili del danno ossidativo a macromolecole biologiche, quali DNA, lipidi e proteine ma non sono solamente dannose: la produzione di ROS è, infatti, assai importante per il metabolismo, dunque un certo grado di stress ossidativo è richiesto per i normali processi fisiologici [4]. I ROS, infatti, a concentrazioni moderate, partecipano attivamente ad una vasta gamma di processi biologici complessi, tra cui il controllo dell'espressione genica, l'apoptosi, la trasduzione del segnale e la senescenza cellulare. Pertanto, un lieve squilibrio pro-ossidativo è fisiologico (figura 6a-6b) e non va corretto [5].

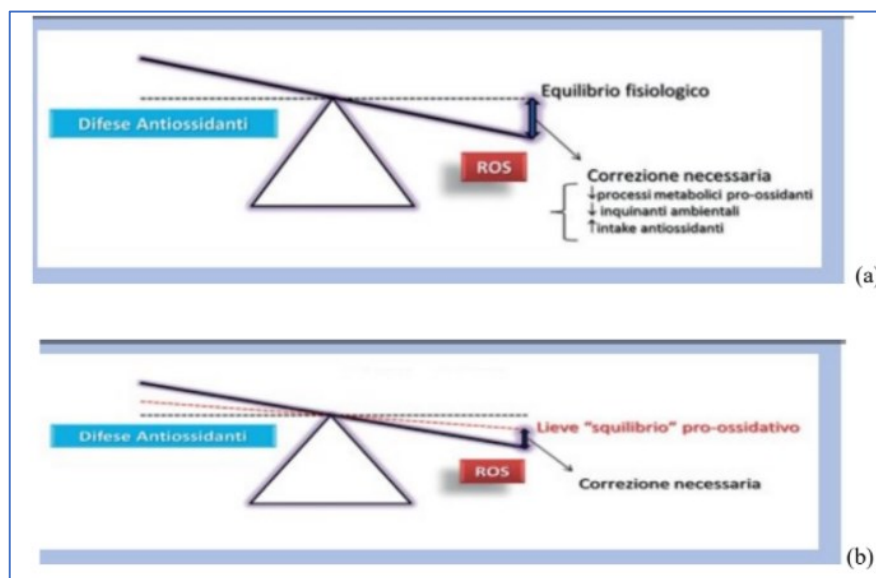


Figura 6a-6b: Modello rivisitato di stress ossidativo

Lo stress ossidativo e nitrosativo sono stati implicati in molteplici stati patologici comprese le condizioni che colpiscono il tratto gastrointestinale come le malattie infiammatorie croniche intestinali [6].

1.2 Gli antiossidanti

Con il termine “antiossidante” ci si riferisce a tutte quelle molecole capaci di stabilizzare o disattivare i radicali liberi prima che essi danneggino le cellule.

L’organismo dispone di una serie di meccanismi enzimatici o non-enzimatici per contrastare l’azione dei ROS (figura 7).



Figura 7: Sistemi enzimatici e non enzimatici di difesa antiossidante

Tra i meccanismi enzimatici, la superossido dismutasi (SOD) agisce come prima linea di difesa nei confronti delle molecole di ossigeno; la catalasi riduce l' H_2O_2 in acqua, mentre l'enzima glutazione perossidasi (GPX) riduce i lipidi perossidati utilizzando il glutatione (GSH) come donatore di elettroni (figura 8) [7,8].

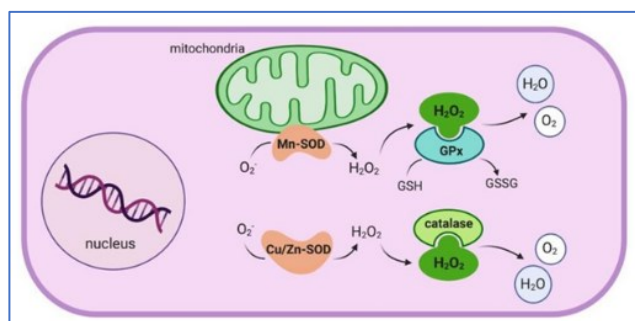


Figura 8: Meccanismo d'azione della SOD

Tra i sistemi non enzimatici, l'antiossidante più attivo è il glutatione, con funzione di scavenger per H_2O_2 , OH^+ e ossidanti clorinati. La vitamina E (tocoferolo) protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica formando un radicale a bassa reattività; la vitamina C (acido ascorbico) lega direttamente O_2^- e OH^- . Ferritina, transferrina e albumina sono proteine plasmatiche che esercitano un'azione antiossidante non enzimatica, legando ioni reattivi [9,10]. In particolare, i gruppi tiolici, ampiamente rappresentati nelle molecole di albumina, costituiscono il più importante sistema antiossidante nel plasma.

1.3 Biomarkers di stress ossidativo

Vista la minima quantità rilasciata in circolo e la breve emivita dei radicali liberi, i metodi per la valutazione del danno ossidativo e della risposta antiossidante si basano su:

- a) quantificazione diretta della produzione di specie chimiche reattive (ROS/RNS) che permette di valutare l'entità del danno ossidativo;
- b) quantificazione di specifici sottoprodotti o intermedi più stabili derivanti da processi ossidativi (prodotti di glicazione avanzata, prodotti dell'ossidazione di proteine e lipidi, derivati dell'ossidazione degli acidi nucleici) [11,12] (tabella 1);

c) quantificazione diretta dell'attività antiossidante enzimatica (superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPX) e misura della capacità antiossidante totale (TAC), data dal contributo di antiossidanti non enzimatici endogeni (glutazione, albumina, bilirubina, acido urico, etc) [13] e nutrizionali (tocoferoli, acido ascorbico carotenoidi e composti fenolici) [14] attraverso il dosaggio ORAC (oxygen radical absorbance capacity) e FRAP (ferric reducing ability of plasma) (tabella 1).

Markers of Oxidative Stress	Anti-Oxidants
Lipid Peroxidation	
Acroleyn	
Malonyldialdehyde	Enzymatic
4-Hydroxynonenal	Superoxide dismutase
F2-isoprostanes	Catalase
TBARS	Glutathione peroxidase
Advance Lipid oxidation products	
Oxidized LDL antibodies	Non-Enzymatic
	Glutathione
Protein Oxidation	Vitamin E
Advance oxidat protein products	Vitamin C
	Ferritin
Carbohydrate oxidation	Transferrin
AGE	Albumin
	Etc..
Nucleic Acid oxidation	
8-Hydroxy-2-deoxiguanosine	

Tabella 1: Marker di stress ossidativo e antiossidanti

1.4 Lo stress ossidativo nelle patologie

Condizioni di stress ossidativo, generate da fonti endogene ed esogene [15], sono note nella patogenesi di molteplici patologie quali: malattie neurodegenerative, cardio-metaboliche, malattie autoimmuni, neoplasie e stati infiammatori di diversa natura [16,17].

Alcune recenti evidenze sperimentali dimostrano una possibile correlazione tra malattia infiammatoria cronica intestinale e stress ossidativo [18]. Il danno dovuto allo stress ossidativo può manifestarsi a carico di organi e apparati diversi (figura 9) e la sua intensità dipende dalla concentrazione delle specie reattive generate.

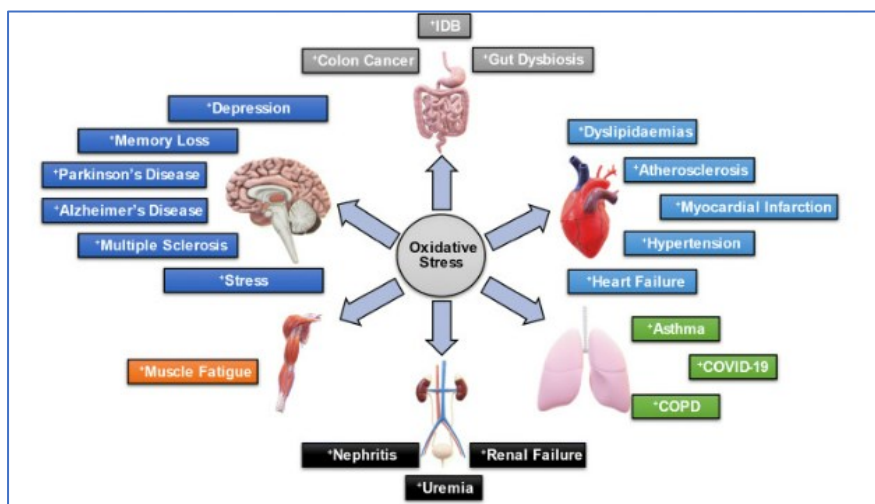


Figura 9: Malattie causate da stress ossidativo in diversi organi e sistemi

Capitolo secondo

LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (IBD)

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), che comprendono il morbo di Chron (CD) e la colite ulcerosa (UC), sono disturbi cronici, di eziologia multifattoriale, che colpiscono principalmente il tratto gastrointestinale (GI) e sono caratterizzate da un'inflammatione recidivante e remittente che interessa tutto l'intestino o parte di esso [19].

Ad oggi l'esatta eziologia delle IBD non è completamente nota, ma è ben noto che fattori ambientali, di predisposizione genetica, di disregolazione del sistema immunitario e del microbiota intestinale, in associazione con stimoli antigenici e ossidativi [20], sono contemporaneamente implicati nella patogenesi, inducendo lo sviluppo e il mantenimento dell'inflammatione cronica.

Sebbene condividano molte somiglianze nei fenotipi patologici e clinici poiché entrambe determinano un'inflammatione cronica del tratto digerente, severità e decorso variabile alternati a periodi di remissione [21], sintomi intestinali e talvolta manifestazioni extra-intestinali, CD e UC possono essere distinte sulla base della diversa localizzazione dell'inflammatione nel tratto

gastrointestinale, delle diverse caratteristiche immunologiche e istologiche e delle complicanze specifiche della malattia [22].

I sintomi più comuni all'esordio includono: dolore addominale, diarrea, ematochezia e anemia; a questi possono aggiungersi segni e sintomi di tipo sistemico come anoressia, ritardo di crescita, ritardo puberale, artralgie e osteoporosi (più tipici della CD).

Oltre alle caratteristiche comuni già citate (cronicità, remittenza, sintomatologia, patogenesi) esse tuttavia mostrano un diverso quadro anatomico-patologico e differenti caratteristiche di decorso clinico, che consentono una diagnosi differenziale nella quasi totalità dei casi [23,24].

La Malattia di Crohn (CD) è caratterizzata da un'inflammatione di tipo transmurale che, coinvolgendo in profondità la parete intestinale, può determinare la formazione di fistole e ascessi e può interessare ogni regione del tratto gastrointestinale, in modo segmentario (skip lesions); nella Colite Ulcerosa (UC) l'inflammatione è superficiale (interessa solo la mucosa e la lamina propria), limitata al colon e al retto e procede in maniera continua in senso caudo-craniale (figura 10).



Figura 10: Localizzazione dell'infiammazione nella CD e UC

Nei casi in cui la malattia coinvolga solo il colon e in cui siano presenti le alterazioni della mucosa caratteristiche sia di UC che di CD (5-10%), si parla di “colite indeterminata” (IBD-U).

2.1 Epidemiologia

Da inizio anni 2000, si rileva un significativo e costante incremento di prevalenza delle IBD non solo nelle aree geografiche storicamente associate a tali patologie, caratterizzate da elevata industrializzazione (Nord Europa, Regno Unito e America del Nord), ma anche in diverse aree geografiche di paesi emergenti (Sudamerica, Asia, Africa e Europa orientale), evidenziando una diffusione sempre più globale dello stato morboso e un ruolo critico nella patogenesi attribuito con maggiore forza ai trigger ambientali [25] (figura 11).



Figura 11: Prevalenza mondiale delle IBD

L'aumento dell'incidenza è marcato anche nei paesi mediterranei, probabilmente a causa del cambiamento delle abitudini alimentari; in Italia i dati relativi alla prevalenza delle IBD si attestano intorno alle 250mila persone affette, con un'incidenza di circa 10.5 nuovi casi/anno per 100.000 abitanti. Sono in aumento i casi in età pediatrica, circa il 20% di essi interessa bambini e adolescenti sotto i 20 anni di età [26,27], e in fasce di popolazioni prima interessate solo marginalmente, come nei soggetti con più di 60 anni.

Mentre la CD si manifesta nella popolazione in generale, più frequentemente nel genere femminile, la predominanza maschile è stata osservata nella fascia di età pediatrica [28]; al contrario, non esiste una sostanziale differenza di genere per la UC, sebbene in alcune popolazioni sia stata riscontrata una leggera predominanza nel genere maschile [29,30].

2.2 Patogenesi

Nonostante l'eziologia delle IBD non sia completamente chiarita, è stato dimostrato che nella patogenesi concorrono elementi di predisposizione genetica, di disregolazione del sistema immunitario e disbiosi intestinale, in associazione con stimoli antigenici e ossidativi [31] che agirebbero a livello gastrointestinale, determinando lo sviluppo dell'inflammatione cronica (figura 12).

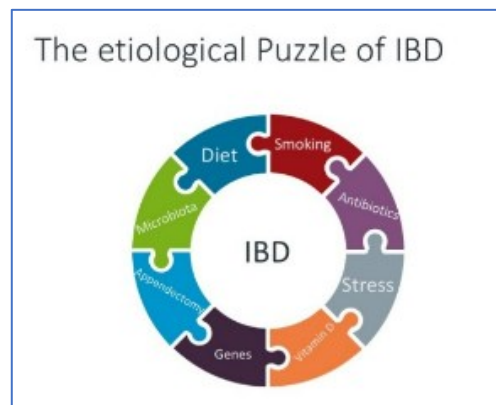


Figura 12: Fattori che contribuiscono alla eziologia delle IBD

- Dieta: l'associazione tra l'alimentazione e le IBD è stata ampiamente studiata [32]. E' stato dimostrato che i grassi alimentari svolgono un ruolo nella patogenesi. I pazienti occidentali presentano una più alta incidenza di IBD perché consumano più cibi fast-food e zuccheri nella dieta e assumono meno frutta, verdure e fibre. Anche gli additivi alimentari artificiali, prevalenti nelle

diete occidentali, possono promuovere l'infiammazione intestinale interferendo con la funzione di barriera nell'intestino [33].

- Predisposizione genetica: negli Stati Uniti si calcola una prevalenza che interessa maggiormente la popolazione afro-americana e caucasica, rispetto ad ispanici ed asiatici. Il rischio di sviluppare una IBD varia dal 7 al 30% per i membri di una stessa famiglia e una più alta incidenza della patologia viene osservata tra i gemelli omozigoti (58%), rispetto a quelli eterozigoti [34].

- Fattori ambientali: uno o più fattori ambientali sembrano essere in grado di rompere l'equilibrio tra il sistema immune mucosale e la flora batterica intestinale, in soggetti geneticamente predisposti. Vi sono fattori protettivi e fattori predisponenti che possono agire precocemente nell'infanzia: tra i primi si segnalano l'allattamento al seno (se prolungato oltre i 3 mesi) e l'appendicectomia precoce, tra i secondi le infezioni ricorrenti e l'uso dei farmaci antinfiammatori non-steroidi (FANS). Anche gli antibiotici possono dare effetti diffusi sulla flora intestinale e produrre una disbiosi che, a sua volta, promuove l'infiammazione intestinale. La composizione del microbiota nelle IBD, secondo dati clinici e sperimentali, è alterata rispetto a quella nei soggetti sani, con conseguente alterazione della funzionalità della barriera intestinale e del sistema immunitario ad essa associato.

Il fumo di sigaretta è un altro esempio di modificatore specifico di malattia che sembra peggiorare la CD pur essendo protettivo contro la colite ulcerosa [35,36].

- Stress: Non vi sono forti evidenze sulla relazione tra stress psicologico e IBD. Le perturbazioni legate allo stress sembrerebbero indurre alterazioni della permeabilità intestinale e del sistema immunitario intestinale conseguente all'attivazione dell'asse cervello-intestino [37].

- Stress ossidativo: sembrerebbe che lo stato infiammatorio cronico e l'iperattività del sistema immunitario, sollecitato dai diversi fattori sopra elencati, siano accompagnati da una elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e da una diminuzione delle difese antiossidanti; così anche il fenomeno dello stress ossidativo (Ox-S) è considerato un potenziale fattore eziologico per le IBD.

2.3 Diagnosi

La diagnosi di IBD viene posta sulla base di criteri clinici (anamnesi, esame obiettivo, marcatori sierologici), radiologici (imaging del piccolo intestino) ed endoscopici (esofagogastroduodenoscopia (EGDS), ileoscopia e esame istologico).

La classificazione di Parigi stratifica i pazienti in relazione all'età di esordio, alla localizzazione della malattia, all'evoluzione clinica e all'impatto della CD sulla crescita del bambino (tabella 2), mentre per la UC enfatizza l'estensione e la severità di malattia (tabella 3).

Classificazione per Malattia di Crohn	Montreal	Paris
Età della diagnosi	A1: < 16 anni A2: 17- 40 anni	A1a: 0-10 anni; A1b: 10-17 anni A2: 17-40 anni; A3: >40 anni
Localizzazione	L1: ileale L2: colon L3: ileo e colon L4: superiore	L1: 1/3 distale dell'ileo +/- cieco; L2: colon L3: ileo e colon; L4a: localizzazione alta (prossimale al Treitz); L4b: localizzazione alta (distale al Treitz ma prossimale al terzo distale dell'ileo)
Comportamento	B1: infiammatoria B2: stenotante B3: penetrante p: malattia perianale	B1: infiammatoria; B2: stenotante B3: penetrante; B2B3: stenotante e penetrante p: malattia perianale
Crescita	Nessuna indicazione	G0: nessuna evidenza di ritardo di crescita; G1: ritardo di crescita

Tabella 2: Classificazioni di Montreal e Parigi a confronto per CD

Classificazione Ulcerative Colitis	Montreal	Paris
Estensione	E1: proctite ulcerativa; E2: colon sinistro (distalmente a flessura splenica) E3: malattia estesa (prossimale alla flessura splenica)	E1: proctite ulcerativa; E2: colon sinistro (distalmente a flessura splenica) E3: malattia estesa (distalmente a flessura epatica) E4: pancolite (dal retto alla zona prossimale della flessura epatica)
Severità	S0: remissione clinica; S1: lieve S2: moderata; S3: grave	S0: non severo; S1: severo (PUCAI ≥ 65)

Tabella 3: Classificazioni di Montreal e Parigi a confronto per UC

Nel 2014 sono stati ridefiniti i cosiddetti “criteri di Porto” per la diagnosi delle IBD pediatriche, che hanno ulteriormente permesso di caratterizzare il fenotipo pediatrico da quello dell’adulto (figura 13) [38].

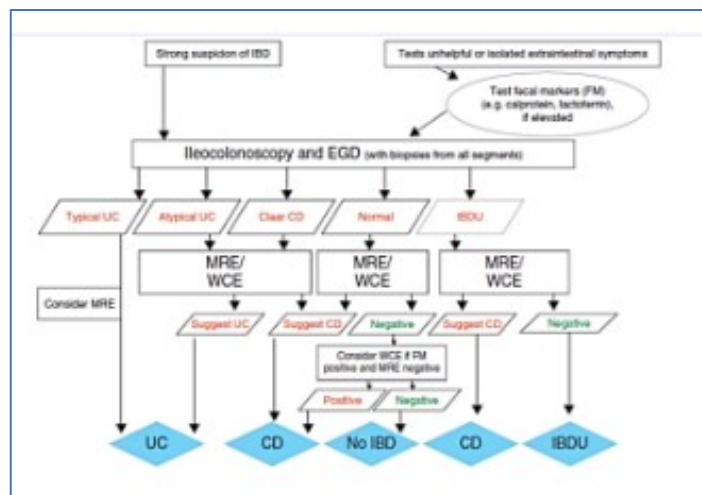


Figura 13: Algoritmo diagnostico per IBD in età pediatrica (secondo i Criteri di Porto)

In ambito pediatrico, il grado di attività della malattia all'esordio e nelle fasi successive di remissione e riacutizzazione viene valutato calcolando l'indice PCDAI (Pediatric Crohn Disease Activity Index) per il CD e l'indice PUCAI (Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index) per la UC (tabelle 4 e 5).

<ul style="list-style-type: none"> • dolore addominale • numero di evacuazioni al giorno • peso • crescita lineare • manifestazioni fisiche o dolore addominale o malattia perianale o manifestazioni extraintestinali • parametri di laboratorio o rapporto Hgb/Hct o VES o albumina • funzionalità e benessere generale (recall dopo una settimana) <p>Score ranges da 0 to 100</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0 – 10 inattiva • 10 – 30 lieve • >30 Moderata a severa 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Segni e sintomi</th> <th>Punti</th> <th>Segni e sintomi</th> <th>Punti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Dolore addominale</td> <td></td> <td>Numero delle evacuazioni giornaliere</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nessuno</td> <td>0</td> <td>0-2</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Può essere ignorato</td> <td>5</td> <td>3-5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Non può essere ignorato</td> <td>10</td> <td>6-8</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>> 8</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>Sanguinamento rettale</td> <td></td> <td>Evacuazioni notturne</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nessuno</td> <td>0</td> <td>N</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Piccole quantità in meno del 50% delle evacuazioni</td> <td>10</td> <td>o</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Piccole quantità nella maggior parte delle evacuazioni</td> <td>20</td> <td>S</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Abbondanti quantità (> 50% del contenuto fecale)</td> <td>30</td> <td>i</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Livello di attività</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Consistenza della maggior parte delle evacuazioni</td> <td></td> <td>Nessuna limitazione</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Formate</td> <td>0</td> <td>Occasionale</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Parzialmente formate</td> <td>5</td> <td>Limitazione Attività compromessa</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>formate Liquide</td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: center;">Somma totale 0-85</td> </tr> </tbody> </table>	Segni e sintomi	Punti	Segni e sintomi	Punti	Dolore addominale		Numero delle evacuazioni giornaliere		Nessuno	0	0-2	0	Può essere ignorato	5	3-5	5	Non può essere ignorato	10	6-8	10			> 8	15	Sanguinamento rettale		Evacuazioni notturne		Nessuno	0	N	0	Piccole quantità in meno del 50% delle evacuazioni	10	o	10	Piccole quantità nella maggior parte delle evacuazioni	20	S		Abbondanti quantità (> 50% del contenuto fecale)	30	i				Livello di attività		Consistenza della maggior parte delle evacuazioni		Nessuna limitazione	0	Formate	0	Occasionale	5	Parzialmente formate	5	Limitazione Attività compromessa	10	formate Liquide	10			Somma totale 0-85			
Segni e sintomi	Punti	Segni e sintomi	Punti																																																																		
Dolore addominale		Numero delle evacuazioni giornaliere																																																																			
Nessuno	0	0-2	0																																																																		
Può essere ignorato	5	3-5	5																																																																		
Non può essere ignorato	10	6-8	10																																																																		
		> 8	15																																																																		
Sanguinamento rettale		Evacuazioni notturne																																																																			
Nessuno	0	N	0																																																																		
Piccole quantità in meno del 50% delle evacuazioni	10	o	10																																																																		
Piccole quantità nella maggior parte delle evacuazioni	20	S																																																																			
Abbondanti quantità (> 50% del contenuto fecale)	30	i																																																																			
		Livello di attività																																																																			
Consistenza della maggior parte delle evacuazioni		Nessuna limitazione	0																																																																		
Formate	0	Occasionale	5																																																																		
Parzialmente formate	5	Limitazione Attività compromessa	10																																																																		
formate Liquide	10																																																																				
Somma totale 0-85																																																																					

(a)

(b)

Tabella 4 e 5: Indice PCDAI (a) e indice PUCAI (b)

Nell'adulto gli indici utilizzati per la stadiazione della malattia sono il Partial Mayo score per UC e l'Harvey-Bradshaw Index per CD (tabella 6).

Disease Activity	UC (Partial Mayo Score)	CD (Harvey-Bradshaw Index)
Remission	<2	<5
Mild Disease	2-4	5-7
Moderate Disease	5-7	8-16
Severe Disease	>7	>16

UC: Ulcerative Colitis; CD: Crohn's disease.

Mayo Score and Harvey-Bradshaw index classification.

Tabella 6: Classificazione Mayo Score e Harvey-Bradshaw

La definizione del punteggio nelle diverse fasi della malattia ha importanti implicazioni terapeutiche e prognostiche.

Non esiste alcun marcatore patognomonico di malattia dal momento che molti reperti clinici (ad esempio, granulomi in biopsie) possono essere osservati anche in altre condizioni cliniche [39].

Di seguito sono riportati gli esami clinici previsti dai protocolli nazionali nel sospetto diagnostico di IBD:

- endoscopia ed esame istologico delle biopsie intestinali;
- colonscopia con eventuale ileoscopia retrograda;
- ecografia addominale e dell'intestino con radiografia del tenue, tac o risonanza magnetica addominale;
- markers sierologici (emocromo e indici di flogosi, albumina, transferrina, etc) e delle feci (calprotectina, come marker non invasivo di infiammazione intestinale).

2.4 Terapia

L'attuale terapia per IBD ha l'obiettivo di down-regolare l'abnorme risposta immunitaria e di inibire la cascata infiammatoria e comprende la somministrazione di acido 5-aminosalicilico (5-ASA), corticosteroidi e agenti

immunosoppressivi (azatriopina; metotrexate) e la terapia biologica rappresentata dall'anticorpo monoclonale anti-TNF α (Infliximab o Adalimumab), citochina proinfiammatoria overespressa nei pazienti IBD. Tuttavia, il trattamento prolungato con questi farmaci è associato ad effetti avversi e l'alto tasso di recidive ne limita l'uso [40]. Queste considerazioni sottolineano la necessità di approcci farmacologici nuovi ed alternativi.

Capitolo terzo

LO STRESS OSSIDATIVO NELLE IBD

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi e nello sviluppo delle IBD perché l'infiammazione intestinale cronica e l'iper-attivazione del sistema immunitario sono associate alla sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed a una diminuzione delle difese antiossidanti. Tale condizione è considerata, con elevata probabilità, anche un meccanismo effettore chiave causa del danno cellulare e tissutale associato a tali patologie [41,43].

L'aumentata produzione di ROS, generata dal tessuto intestinale infiammato e dalle cellule infiammatorie, attiva una cascata patogena che esacerba ulteriormente l'infiammazione e porta ad un aumento del danno ossidativo a DNA, proteine e lipidi [44], promuovendo la mutagenesi [45] e aumentando il rischio di carcinogenesi [46].

Lo stress ossidativo porta al danneggiamento dello strato mucoso e all'invasione batterica, che a loro volta stimolano ulteriormente la risposta immunitaria e contribuiscono alla progressione della malattia [47].

Numerose sono le evidenze sperimentali che dimostrano in una varietà di sistemi biologici (mucosa del colon, plasma, siero, saliva) un aumento dei marker di stress ossidativo in soggetti IBD, in particolare dei livelli dei radicali liberi dell'ossigeno e perossidi lipidi, nonché una diminuzione delle difese antiossidanti [48], in altri studi invece non è stata osservata alcuna differenza [49,50]. Yuksel *et al.* [51] hanno recentemente evidenziato una correlazione positiva tra l'indice di stress ossidativo e i livelli di CRP (proteina C-reattiva), mostrando una possibile associazione tra livelli di stress ossidativo più elevati e aumento dell'infiammazione. Bourgonje *et al.* hanno riportato che i gruppi tiolici plasmatici (gruppi SH delle proteine e del GSH), che riflettono lo stress ossidativo sistemico, sono inversamente correlati con i biomarcatori dell'infiammazione e associati a esiti favorevoli per CD [52].

Nonostante la letteratura riporti in merito dati contrastanti, spesso a causa delle diverse metodologie applicate e condizioni operative, si ritiene tuttavia che lo studio dei marcatori di stress ossidativo sia uno strumento importante per la valutazione dello stato e della progressione di malattia, e per il monitoraggio clinico nelle patologie infiammatorie intestinali (figura 14).

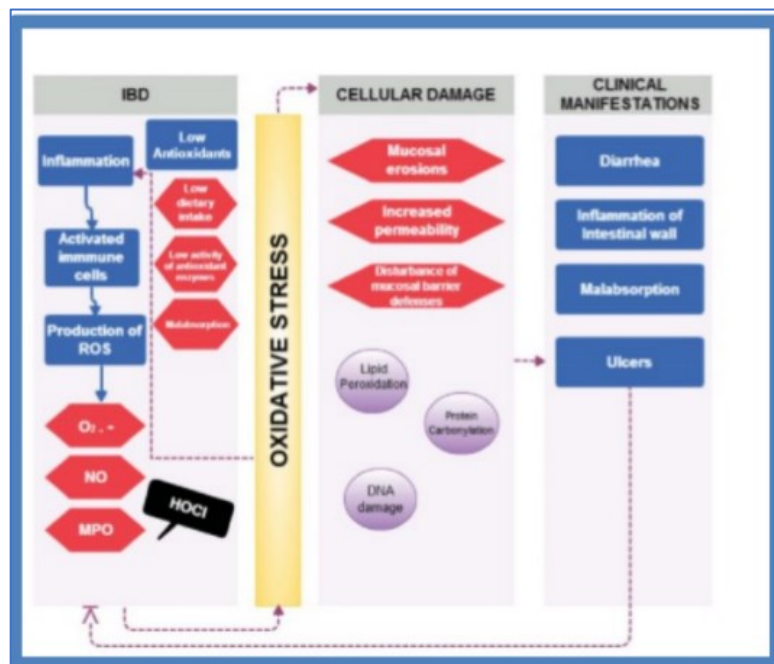


Figura 14: ROS e manifestazioni cliniche nelle IBD

Capitolo quarto

SCOPO DELLA TESI

L'ipotesi di lavoro consiste nel fatto che lo squilibrio redox, che conduce a condizioni di stress ossidativo, rappresenta una caratteristica chiave nell'insorgenza delle IBD e che il persistere di tale squilibrio possa portare allo sviluppo di complicanze e all'evoluzione della malattia.

Questo studio prospettico-osservazionale, parte di un progetto di ricerca finalizzato dal Ministero della Salute (2019) ha come obiettivo principale quello di valutare la condizione di stress ossidativo in adulti e bambini affetti da IBD attraverso il dosaggio di biomarcatori circolanti, quantificando sia il danno ossidativo che la capacità di risposta antiossidante.

L'end-point secondario dello studio è studiare la relazione tra i diversi biomarcatori dello stress ossidativo e le caratteristiche e le variabili cliniche delle IBD.

Capitolo quinto

MATERIALI E METODI

Nel periodo dicembre 2019-aprile 2022 sono stati arruolati, presso la Clinica Pediatrica e la Clinica di Gastroenterologia UNIVPM–AOU Ospedali Riuniti di Ancona, rispettivamente:

- **73 soggetti pediatrici**, di cui **44 IBD** e **29 controlli** sani di pari età e sesso
- **66 soggetti adulti**, di cui **30 IBD** e **36 controlli** sani di pari età e genere.

I criteri di inclusione e di esclusione allo studio comprendevano:

- **Criteri di inclusione:**

- 1) pazienti pediatrici (età compresa tra 6-18 anni) e adulti (>18 anni) con diagnosi di malattia infiammatoria cronica intestinale;
- 2) controlli sani non affetti da IBD pediatrici e adulti di pari età e genere rispetto ai pazienti IBD;
- 3) acquisizione del consenso informato in forma scritta.

- **Criteri di esclusione:** pazienti con una stomia permanente, neoplasie, malattie cardiovascolari e ischemiche, morbo di Alzheimer, diabete di tipo 2, altre condizioni che richiedono un trattamento dietetico specifico (malattia

celiaca, allergie alimentari conclamate, insufficienza renale cronica, malattie metaboliche congenite o condizioni acquisite come dislipidemie ed iperuricemia), gravidanza e allattamento.

Il gruppo dei controlli pediatrici è rappresentato da soggetti che eseguivano endoscopie per motivi diversi dalle IBD e dalla sorveglianza neoplastica, come per disturbi funzionali gastrointestinali, reflusso gastroesofageo, gastrite, diverticolite, poliposi benigna.

Sono stati esclusi dal gruppo di controllo i familiari di primo grado dei soggetti IBD.

Per ogni soggetto sono state raccolte le seguenti informazioni: età, etnia e genere, peso, altezza, terapie in corso, stato di fumatore.

Per ciascun paziente sono state raccolte le informazioni riguardanti lo stato di malattia: età alla diagnosi, tipo di malattia (**CD**, **UC** e **IBD-U**), estensione di malattia (classificazione **Paris** per bambini, classificazione **Montreal** per adulti), **attività clinica** di malattia (**PCDAI**, Pediatric Crohn's Disease Activity Index, e **PUCAI**, Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index per i bambini; **punteggio di Harvey-Bradshaw e Mayo** per gli adulti), terapia in corso (farmaci biologici, steroidi, immunomodulatori, aminosalicilati, etc), terapia nutrizionale (totale o parziale e il tipo di miscela utilizzata), eventuale

assunzione di integratori vitaminico-minerali (specificando il nome del prodotto e il dosaggio).

Sono stati inoltre rilevati i seguenti **parametri biochimici**: emocromo, VES, PCR, albumina, urea, creatinina, glicemia, ALT, AST, profilo lipidico, ferritina, livelli sierici di selenio, zinco, vitamina A, E, C, D e calprotectina fecale.

In tutti i soggetti arruolati (IBD e controlli) sono stati quantificati i seguenti **parametri indicativi di stress ossidativo**:

- livelli intracellulari di ROS;
- capacità antiossidante totale espressa come ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e FRAP (Ferric iron Reducing Antioxidant Power);
- sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (**TBARS**) come marker di perossidazione lipidica;
- prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (**AOPP**).

Sono stati inoltre misurati i livelli e le attività enzimatiche degli enzimi antiossidanti (GST, SOD, GPX e GR), i livelli di glutatione ridotto (GSH) e di glutatione ossidato (GSSG) ed il rapporto GSH/GSSG (dati non riportati).

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione Marche (CERM), Italia, 30 maggio 2019, protocollo n. 2019/174 e condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, come rivista nel 1983.

5.1 Determinazioni analitiche

I campioni di plasma, ottenuti da centrifugazione del prelievo venoso in eparina, sono stati conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'esame. Le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) sono state isolate per centrifugazione su gradiente di densità con sistema LeucoseptTM e conservate a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi.

5.1.1 Determinazione dei radicali reattivi dell'ossigeno (ROS)

I livelli intracellulari di ROS nelle PBMCs sono stati misurati mediante spettrofluorimetria a flusso, in presenza di carbossi-H₂DCFDA (InvitrogenTM) come sonda che viene convertita in un composto fluorescente (2',7'-diclorofluorescina, DCF) dopo l'idrolisi dei gruppi acetato ad opera della esterasi intracellulare e la successiva ossidazione indotta dalla presenza dei ROS; l'intensità di fluorescenza viene misurata al citofluorimetro (ex $\lambda=490\text{ nm}$, em $\lambda=520\text{ nm}$).

5.1.2 Capacità antiossidante totale

Per la determinazione della capacità antiossidante totale sono stati utilizzati:

- il test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) che si basa sull'ossidazione di una sonda fluorescente (fluorescina) da parte dei radicali. La capacità antiossidante del campione è correlata alla curva di decadimento della fluorescenza; l'attività antiossidante viene espressa come mM Trolox Equivalents, standard di riferimento per costruire la curva;
- la capacità ferro-riducente del plasma (ferric ion reducing antioxidant capacity, FRAP) che misura la capacità dei composti antiossidanti del plasma di ridurre il Fe^{3+} (ferrico) a Fe^{2+} (ferroso). Il complesso ridotto è colorato di blu intenso e la reazione può essere monitorata allo spettrofotometro con $\lambda=593$ nm. La curva di calibrazione viene costruita utilizzando una soluzione 2.0 mM di FeSO_4 a concentrazioni standard fino a 1.0 mM. Tutte le misurazioni sono state condotte in duplicato e le repliche tecniche sono state calcolate come media prima dell'analisi statistica.

5.1.3 Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS)

I livelli plasmatici delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) sono stati misurati utilizzando un ELISA TBARS Assay Kit (Cayman Chemical, USA), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Tutte le misurazioni sono state condotte in duplicato e le repliche tecniche sono state calcolate come media prima dell'analisi statistica.

5.1.4 Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)

La determinazione dei prodotti ossidati delle proteine (AOPP) è stata eseguita secondo la metodica descritta da Witko-Sarsat *et al.* [52]; brevemente, campioni di plasma diluiti 1:5 sono stati aggiunti a 50 μ L KI 1,16 M e 100 μ L CH₃COOH. L'assorbanza del mix di reazione è stata letta immediatamente a 340 nm usando Chloramine-T (Sigma-Aldrich, Italy) come standard per la curva di calibrazione. I valori di AOPP sono calcolati in base alla concentrazione delle proteine plasmatiche ed espressi in μ mol/mg di proteine. Tutte le misurazioni sono state condotte in duplicato e le repliche tecniche sono state calcolate come media prima dell'analisi statistica.

5.1.5 Proteine plasmatiche

Il dosaggio delle proteine plasmatiche è stato eseguito secondo il metodo colorimetrico descritto da Bradford [53], utilizzando il Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, USA).

Altri indici di laboratorio, come emocromo, formula leucocitaria, conta piastrinica (PLT), velocità di eritrosedimentazione (VES), proteina C-reattiva (PCR), aminotransferasi (ALT-AST), calprotectina fecale, glicemia, profilo lipidico etc., sono stati valutati con procedure automatiche di routine.

5.2 Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad 8.0.2 per Windows. I dati sono espressi come valori di mediana \pm scarto interquartile (IQR) o livelli minimi e massimi per ciascun tipo di analisi.

I test non parametrici di Mann-Whitney e Kruskal-Wallis sono stati applicati per confrontare i diversi gruppi di variabili non normalmente distribuite.

L'analisi di correlazione è stata condotta utilizzando il test di correlazione di Spearman.

Valori di $p < 0,05$ sono considerati statisticamente significativi.

Capitolo sesto

RISULTATI

Sono stati analizzati 66 soggetti affetti da IBD (di cui 43 pediatrici (IBDP) e 23 adulti (IBDA)) e 57 controlli sani (28 pediatrici (CSP) e 29 adulti (CSA)) di pari età e genere (Tabella 7).

	IBDP (n=43)	CSP (n=28)	IBDA (n=23)	CSA (n=29)
Età (mediana, IQR)	14.0 (3.6)	12.3 (4.4)	34.5 (22.0)	33.0 (16.0)
Maschi (%)	17 (40)	16 (57)	13 (56)	13 (45)

Tabella 7: Caratteristiche demografiche dei gruppi di studio

6.1 Caratteristiche cliniche dei gruppi di studio

Come riportato in tabella 8, all'interno del gruppo di pazienti pediatrici IBD, 23 (53%) soggetti erano affetti da morbo di Chron (CD), 18 (41%) da rettocolite ulcerosa (UC), 2 (5%) da IBD indeterminata (IBD-U). La diagnosi è stata posta circa 1,9 anni (IQR 3,1) prima dell'arruolamento e il 65% dei pazienti era in fase di remissione al momento del reclutamento. Dodici presentavano un'attività di malattia lieve e 2 un'attività moderata, mentre solo un paziente

affetto da CD aveva un PCDAI score > 57,7 (stato di malattia severo). Cinque (12%) pazienti presentavano un punteggio z-BMI < 2 DS (pazienti malnutriti), solo uno era obeso.

La terapia biologica era in atto nel 60% dei pazienti, il 40% dei pazienti era in terapia con 5-ASA, il 63% con farmaci immunomodulatori e solo il 5% (uno affetto da CD, uno da UC) era trattato con corticosteroidi. Sei pazienti (14%) erano in nutrizione enterale totale/parziale, 10 seguivano schemi nutrizionali specifici come la dieta priva di lattosio, di glutine e vegetariana. Ventidue bambini hanno ricevuto un'integrazione vitaminica, di cui 16 con vitamina D, altri 3 pazienti rispettivamente con vitamina C, vitamina B1 e acido folico e 3 con integratori multivitaminico-multiminerali.

Un solo paziente ha subito un intervento chirurgico prima del reclutamento e 3 hanno presentato manifestazioni extraintestinali di IBD.

Nel gruppo di pazienti IBD adulti, 11 (48%) soggetti erano affetti da morbo di Crohn (CD) e 12 (52%) da rettocolite ulcerosa (UC). La durata di malattia prima dell'arruolamento era di circa 8.5 anni (IQR 9.7) e il 61% dei pazienti risultava in fase di remissione al momento del reclutamento. Quattro presentavano un'attività di malattia lieve e 4 un'attività moderata, mentre solo un paziente affetto da CD mostrava un Harvey-Bradshav/Mayo score=6 (stato di malattia severo). Un solo paziente (5%) presentava un BMI<18,5

(lievemente malnutrito), 8 soggetti (38%) risultavano sovrappeso ($25 < \text{BMI} < 30$), nessuno era obeso ($\text{BMI} > 30$). La terapia biologica era seguita da tutti i pazienti tranne uno, il 55% era trattato con 5-ASA, il 9% con immunosoppressori e il 15% con corticosteroidi.

La maggior parte dei pazienti (86%) seguiva un regime dietetico libero, 2 soggetti seguivano una dieta priva di lattosio e solo un paziente era sottoposto a nutrizione artificiale. Sei pazienti ricevevano supplementazione vitaminica (5 con vitamina D, 1 con acido folico). Il trattamento chirurgico era stato eseguito prima dell'arruolamento per 5 pazienti (24%), di cui 4 per resezione intestinale, e 6 hanno presentato manifestazioni extra-intestinali (in 5 casi vi era coinvolgimento articolare, 2 presentavano dermatite e 1 riferiva uveite).

I gruppi IBD pediatrici e adulti erano comparabili per genere, tipo di malattia, numero di pazienti in remissione, prevalenza del livello di calprotectina > 250 mg/kg, terapia con ASA e uso di steroidi, terapia probiotica, integrazione vitaminica e manifestazioni extraintestinali. Nei casi pediatrici è stata adottata più frequentemente la terapia nutrizionale e la terapia immunomodulante. Chirurgia e terapia biologica, invece, erano più comuni tra i casi adulti (tabella 8).

	IBDP (n=43)	IBDA (n=23)	p value
Età (mediana, IQR)	14 (3.6)	34.5 (22)	
Maschi (n, %)	17 (40)	13 (56)	0,301
Malnutrizione (n, %)	5 (12)	1 (5)	0,153
Obesità (%)	1 (2,4)	0 (0)	>0,999
CD (n, %)	23 (53)	11 (48)	0,903
UC (n,%)	18 (42)	12 (52)	
IBD-U (n, %)	2 (5)	0 (0)	
Durata di malattia anni (mediana, IQR)	1.9 (3.1)	8.5 (9.7)	
Attività di malattia	28 (65)	14 (61)	0,99
Remissione (n,%)	12 (28)	4 (17)	
Lieve (n,%)	2 (5)	4 (17)	
Moderata (n,%)	1 (2)	1 (5)	
Severa (n,%)			
Calprotectina fecale >250 mg/Kg (n, %)	17 (42)	8 (36)	0,602
Terapia:			
5-ASA (n,%)	17 (40)	11 (55)	0,739
Immunosoppressori (n,%)	27 (63)	2 (9)	0,001
Corticosteroidi (n,%)	2 (5)	3 (15)	0,178
Farmaci biologici (n,%)	26 (60)	22 (93)	<0,0001
Terapia con probiotici (n,%)	2 (5)	2 (9)	0,341
Terapia nutrizionale			
EEN/PEN (n, %)	6 (14)	1 (5)	
Dieta libera (n, %)	27 (62)	19 (86)	
Lactose free (n, %)	2 (5)	2 (9)	
Altro (GF, vegan, etc) (n,%)	8 (19)	1 (5)	
Integratori (n, %)	22 (52)	6 (46)	0.104
Chirurgia (n, %)	1 (2)	5 (24)	0.0041
Manifestazioni extraintestinali (n, %)	3 (7)	6 (26)	0.110

Tabella 8: Caratteristiche cliniche dei pazienti IBD pediatrici ed adulti

6.2 Determinazioni analitiche del danno ossidativo e della risposta antiossidante

La tabella 9 riporta gli analiti che sono stati misurati per valutare l'attività antiossidante e i prodotti di ossidazione tra i due gruppi di studio (IBDP, IBDA) e i gruppi di controllo (CSP, CSA) e tra IBDP e IBDA.

	ROS <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>	FRAP <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>	TBARs <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>	AOPP <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>	ORAC <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>
IBDP (n=43)	35,3 (15-192)	202 (142-348)	8,8 (5,4-20,2)	6,5 (3,2-8,6)	14418 (3947-22843)
CSP (n=28)	39,6 (15-136)	239 (170-422)	8,4 (4,4-26,1)	5,4 (3,5-7,3)	4929 (2650-8385)
p value	0,638	0,0002	0,362	0,0017	<0,0001
IBDA (n=23)	47,0 (10-181)	267 (184-345)	10,1 (7,4-36,6)	5,2 (4,2-8,5)	6304 (996-18335)
CSA (n=29)	36,6 (15-97)	248 (160-411)	10,8 (5,1-20,7)	5,9 (3,5-8,1)	4515 (740-7427)
p value	0,0579	0,331	0,098	0,938	0,0039
IBDP (n=43)	35,3 (15-192)	202 (142-348)	8,8 (5,4-20,2)	6,5 (3,2-8,6)	14418 (3947-22843)
IBDA (n=23)	47,0 (10-181)	267 (184-345)	10,1 (7,4-36,6)	5,2 (4,2-8,5)	6304 (996-18335)
p value	0,878	<0,0001	0,0025	0,080	<0,0001

Tabella 9: Valori plasmatici dei biomarcatori di danno ossidativo e capacità antiossidante nei gruppi di studio (ROS: unità arbitrarie, FRAP: $\mu\text{mol/eq FeSO}_4$, TBARS: $\mu\text{mol/l MDA}$, AOPP: $\mu\text{mol/plasma prot}$, ORAC: $\mu\text{M Trolox eq/mL}$)

6.2.1 ROS

I livelli intracellulari di ROS erano comparabili nei soggetti IBD pediatrici e adulti rispetto ai controlli (tabella 9, figura 15); in entrambi i gruppi IBD non

risultavano correlati ad età, genere, attività di malattia e terapia biologica (tabella 9).

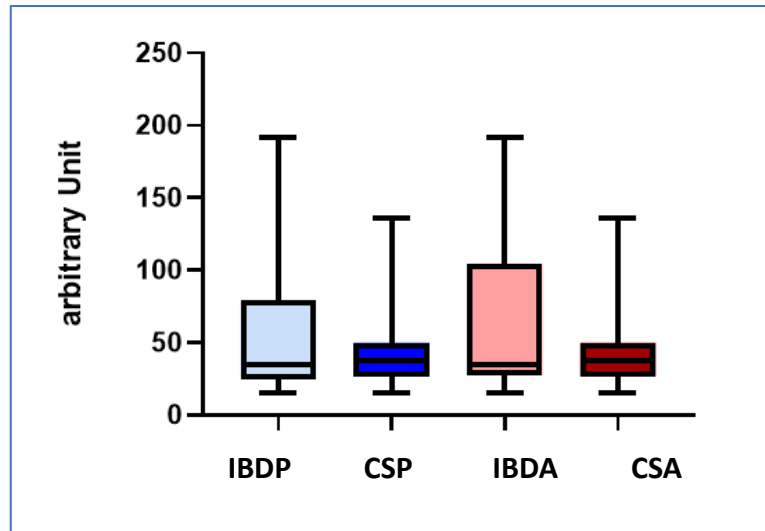


Figura 15: Valori di ROS in IBD vs CS

6.2.2 ORAC

I valori plasmatici di ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) risultavano molto più elevati in entrambi i gruppi IBD rispetto ai controlli, con una elevata significatività statistica ($p < 0,0001$ e $p = 0,0039$ rispettivamente per IBDP e IBDA vs controllo); ORAC risultava inoltre particolarmente elevato nei pazienti pediatrici rispetto ai pazienti adulti (14418 vs 6304, $p < 0,0001$) (tabella 9, figura 16).

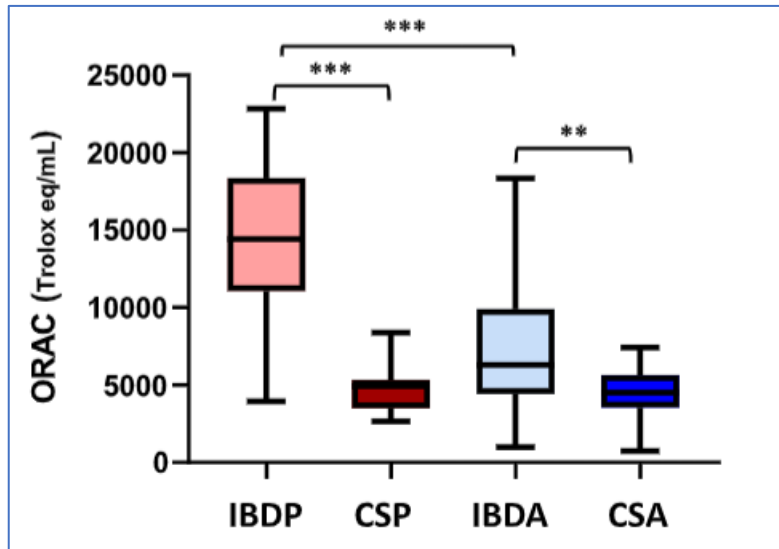


Figura 16: Valori di ORAC in IBD vs CS

Nei pazienti pediatrici (IBDP) i valori di ORAC correlavano inversamente con l'uso di farmaci biologici ($p=0,0397$), ma non con la durata della terapia ($r=0,2337$; $p=0,2974$) (tabella 10).

La curva ROC, che valutava l'accuratezza diagnostica del biomarker ORAC come predittore per IBD, mostrava un'area al di sotto della curva (AUC) di 0,980 (95% C.I. da 0,9464 a 1,0), con un valore di $p<0,0001$ (figura 17).

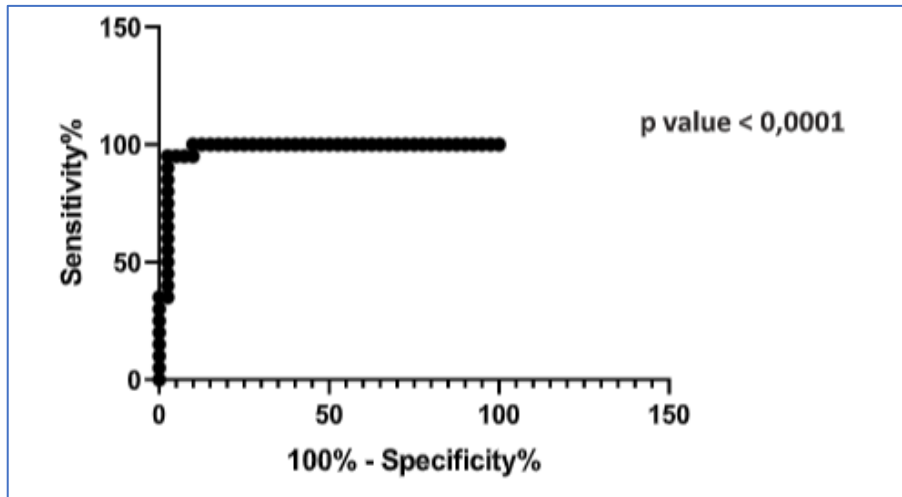


Figura 17: Curva ROC per ORAC

6.2.3 FRAP

La capacità ferro-riducente plasmatica (FRAP) risultava significativamente ridotta nel gruppo IBDP vs il gruppo controllo CSP (202 vs 239 $\mu\text{mol}/\text{eqFeSO}_4$, $p=0,0002$) e rispetto al gruppo IBD adulto (202 vs 267 $\text{mcmol}/\text{eqFeSO}_4$, $p<0,0001$); nessuna differenza statisticamente significativa è emersa tra il gruppo IBD adulti e controlli adulti (tabella 9, figura 18).

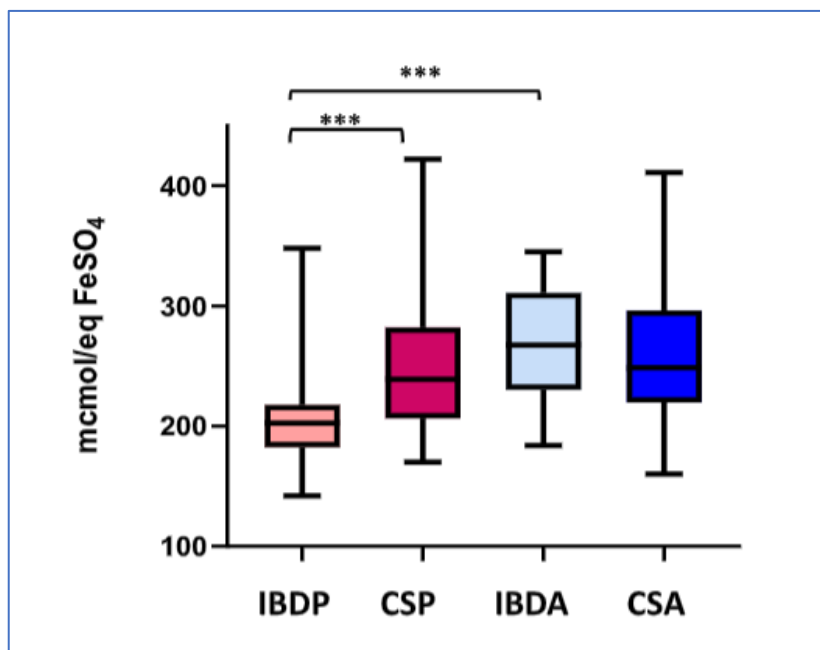


Figura 18: Valori di FRAP nei gruppi di studio

L'analisi della correlazione mostrava valori di FRAP più elevati per il genere maschile ($p=0,0236$), la terapia biologica ($p=0,0020$) e la durata della terapia biologica ($r=0,5873$; $p<0,0001$). Inoltre, l'età era correlata positivamente con i valori di FRAP e la significatività risulta elevata ($p<0,0001$) (tabella 10).

6.2.4 Perossidazione lipidica (TBARS)

Le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) non hanno mostrato differenze significative tra i valori ottenuti nel gruppo dei pazienti IBDP e IBDA verso i rispettivi gruppi di controllo, mentre risultavano essere

statisticamente più bassi nel gruppo IBD pediatrico rispetto al gruppo IBD adulto (8,8 vs 10,1; $p=0,0025$) (tabella 9, figura 19).

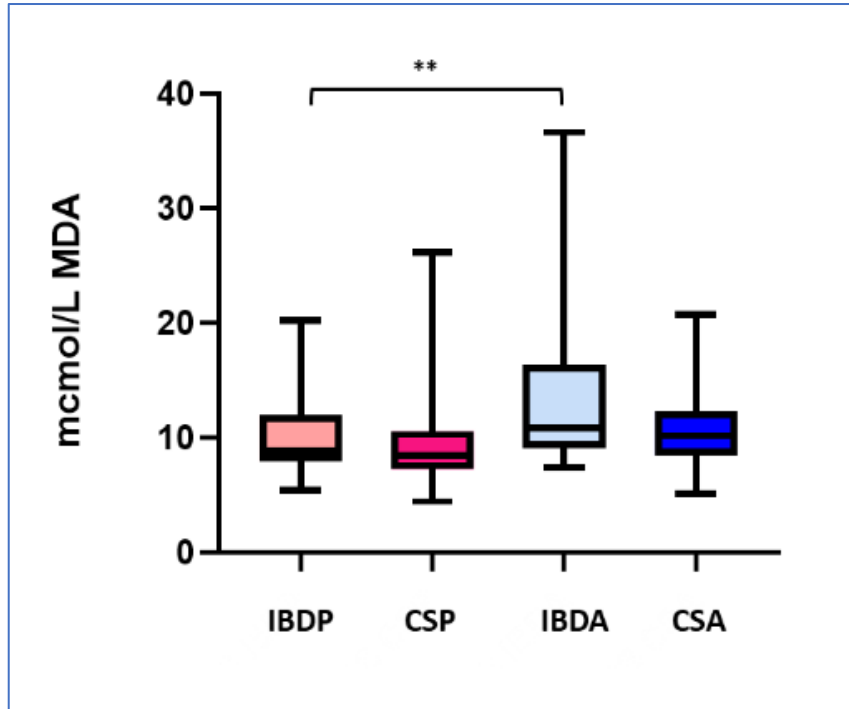


Figura 19: Sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) nei gruppi di studio

Non si evidenziavano correlazioni con i dati demografici, né con i parametri clinici di malattia (tabella 10).

6.2.5 Prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP)

I prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP) dei pazienti IBD pediatrici erano più elevati rispetto ai controlli CSP con buona significatività statistica,

come mostrato in figura 20 e in tabella 9. Non emergevano invece variazioni significative tra IBDA e controlli, né comparando i gruppi IBDP e IBDA.

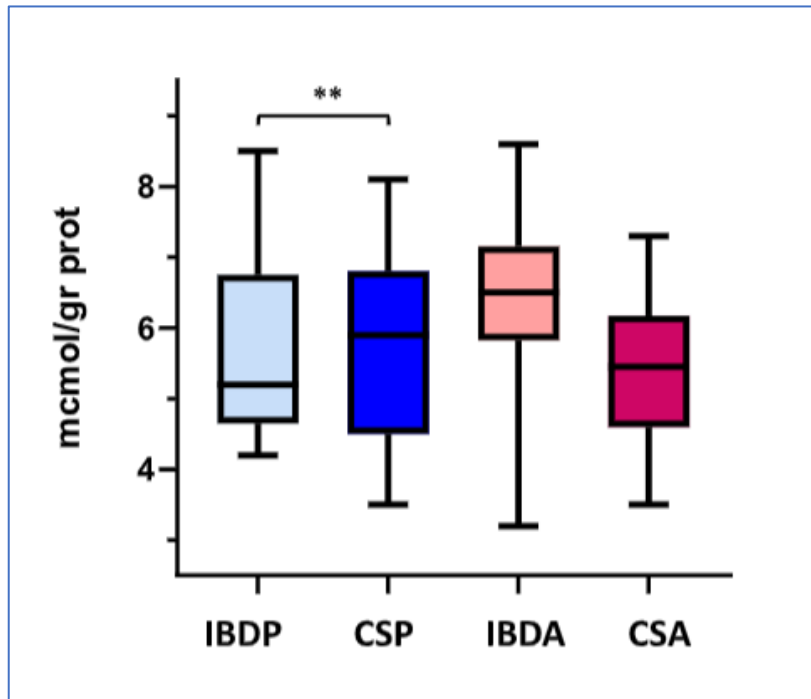


Figura 20: prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP) nei gruppi di studio

Nella popolazione pediatrica (IBD e controlli), è stato possibile ricavare i valori rAOPP (relative AOPP) normalizzando il dato alla concentrazione dell'albumina plasmatica; come mostrato nel grafico, vi era una differenza fortemente significativa tra i due gruppi, con valori mediani molto più elevati nei pazienti IBD rispetto ai controlli (10,7 vs 5,4; $p < 0,0001$) (figura 21).

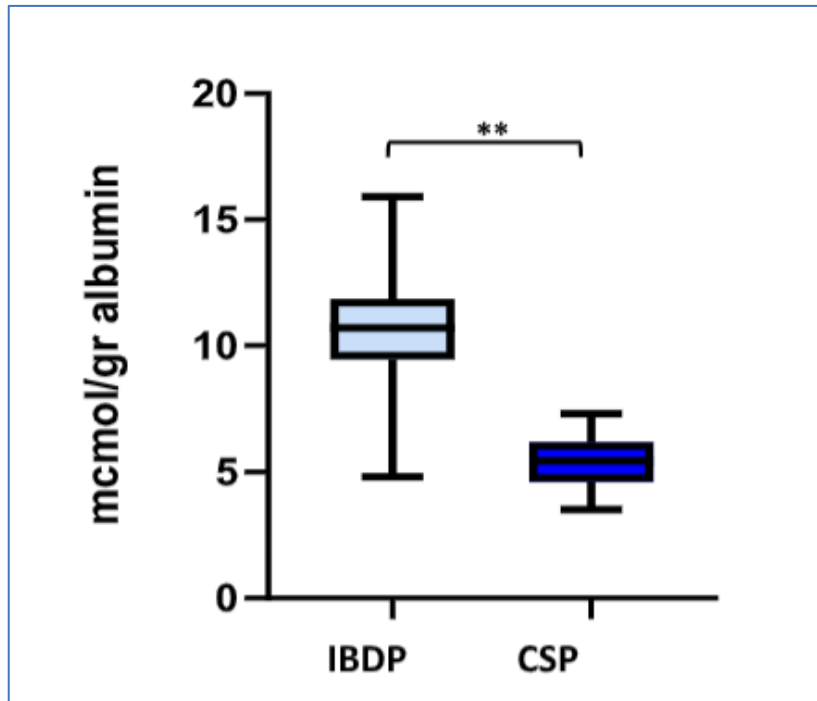


Figura 21: relative-AOPP in IBDP vs CSP

Livelli di AOPP maggiori erano presenti in pazienti con CD, rispetto a pazienti con UC ($p=0,0055$) (tabella 10).

La curva ROC per AOPP mostrava un'area (AUC) di 0,7167 (C.I. 95% da 0,5961 a 0,8373), con un valore $p=0,0020$ (figura 22).

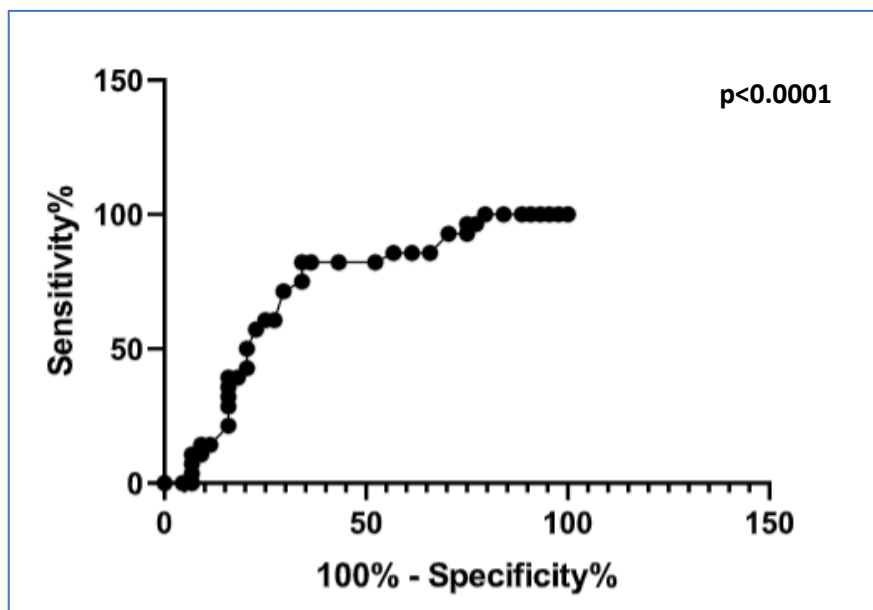


Figura 22: curva ROC per AOPP

	AGE	GENDER	DISEASE: CD-UC	DISEASE ACTIVITY	BIOLOGIC THERAPY	BIOLOGIC THERAPY LENGHT
FRAP	$r = -0,5718$ $p = < 0,0001$	$r = -0,2897$ $p = 0,0236$	$r = -0,04374$ $p = 0,7378$	$r = -0,02929$ $p = 0,8239$	$r = 0,3879$ $p = 0,0020$	$r = 0,5873$ $p = < 0,0001$
ROS	$r = -0,09084$ $p = 0,5055$	$r = 0,09101$ $p = 0,5047$	$r = -0,07988$ $p = 0,5584$	$r = -0,08784$ $p = 0,5198$	$r = -0,02781$ $p = 0,8388$	$r = -0,1638$ $p = 0,3001$
AOPP	$r = -0,07292$ $p = 0,5765$	$r = 0,1299$ $p = 0,3182$	$r = -0,3515$ $p = 0,0055$	$r = -0,09799$ $p = 0,4525$	$r = -0,06231$ $p = 0,6333$	$r = -0,2379$ $p = 0,1292$
TRABs	$r = 0,2081$ $p = 0,1076$	$r = 0,04782$ $p = 0,7144$	$r = 0,1037$ $p = 0,4266$	$r = -0,1047$ $p = 0,1327$	$r = -0,1954$ $p = 0,1313$	$r = 0,1415$ $p = 0,3714$
ORAC	$r = -0,01138$ $p = 0,9452$	$r = 0,1112$ $p = 0,5005$	$r = 0,1308$ $p = 0,4275$	$r = -0,2154$ $p = 0,1878$	$r = -0,3308$ $p = 0,0397$	$r = 0,2337$ $p = 0,2974$

Tabella 10: correlazioni tra marker di danno ossidativo e caratteristiche cliniche

6.2.6 Oxidative score

Per il solo gruppo IBD pediatrico è stato inoltre calcolato uno score ossidativo relativo ai valori dei biomarkers ORAC, FRAP, TBARS, e AOPP; 10 soggetti risultavano avere uno score lieve (punteggio 0-4), 24 uno score moderato (punteggio totale 5-8) e 5 uno score grave (punteggio totale 9-12) (figura 23).

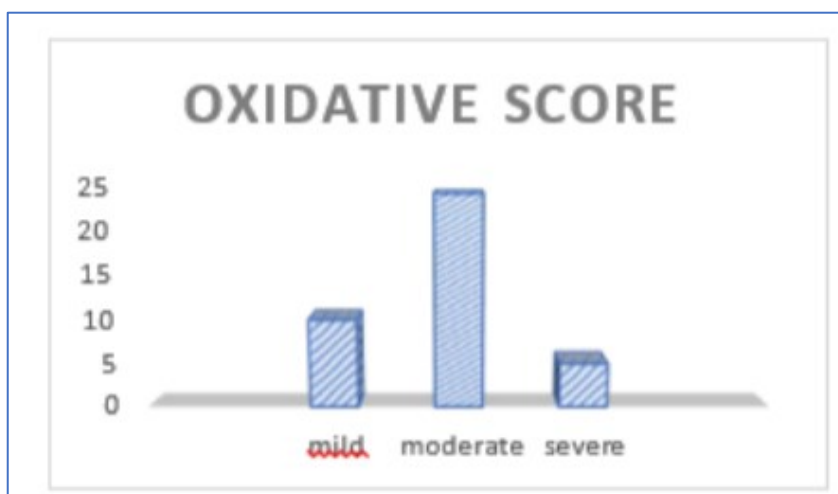


Figura 23: Distribuzione dei casi pediatrici IBD sulla base dell'oxidative score

All'analisi univariata l'oxidative score risultava maggiore per pazienti non trattati con terapia biologica ($p=0,0079$) e non era correlato con l'età, il tipo di malattia, l'attività di malattia, e con i livelli di calprotectina fecale (tabella 11).

	AGE	GENDER	DISEASE CD-UC	DISEASE ACTIVITY	BIOLOGIC THERAPY	CALPROTECTIN >250
OXIDATIVE SCORE	$r = -0,07752$ $p = 0,6390$	$r = -0,03349$ $p = 0,8871$	$r = -0,05851$ $p = 0,7235$	$r = -0,04752$ $p = 0,7740$	$r = -0,4195$ $p = 0,0079$	$r = 0,004345$ $p = 0,9796$

Tabella 11: Analisi di correlazione tra oxidative score e le caratteristiche cliniche nel gruppo IBDP

Capitolo settimo

DISCUSSIONE

Numerose evidenze sperimentali indicano che lo stress ossidativo non è solo una conseguenza dell'inflammatione cronica che caratterizza le malattie croniche intestinali (IBD), ma è un meccanismo precoce nello sviluppo dello stato infiammatorio e nel mantenimento dello stesso che contribuisce, di conseguenza, alla progressione della malattia [54].

Il tratto gastrointestinale, poiché continuamente esposto a stimoli multipli quali patogeni, antigeni alimentari, etc, è un locus importante di produzione di specie chimiche reattive. Studi clinici e su modelli animali evidenziano un aumento della produzione di specie altamente reattive (ROS, RNS) e una diminuzione di molecole antiossidanti; tuttavia, i risultati non sempre sono comparabili o sono addirittura contraddittori sia a causa dell'utilizzo di biomarcatori e modelli in-vivo differenti, sia per numerosità campionarie relativamente piccole, soprattutto in età pediatrica.

Questo studio ha valutato lo stress ossidativo in bambini e adulti con IBD rispetto a soggetti sani di controllo di pari età e genere, analizzando sia l'entità del danno ossidativo prodotto (livelli di ROS, prodotti di ossidazione delle

proteine e dei lipidi) sia la risposta antiossidante esogena ed endogena (ORAC, FRAP e attività dei principali enzimi antiossidanti SOD, CAT, GPX, GR).

Il principale risultato di questo studio riguarda il significativo aumento dei valori plasmatici di ORAC (capacità di assorbimento dei radicali liberi dell'ossigeno), che si osserva nei pazienti IBD pediatrici e adulti verso i rispettivi gruppi di controllo. Questi risultati sono originali per l'età pediatrica e in contrasto con quelli riportati da Kawakami *et al.* [55] che invece riferisce una riduzione di ORAC plasmatico negli adulti con UC rispetto ai controlli sani. Si può ipotizzare che un processo infiammatorio sistemico, generato e autoalimentato dalla produzione di ROS, stimoli l'attività degli enzimi antiossidanti e la sintesi di composti non enzimatici, determinando così un aumento dei livelli plasmatici di ORAC. Questo meccanismo di compensazione può perdere la sua efficacia nell'adulto, in relazione alla maggior durata della malattia. Si osservano infatti valori di ORAC più elevati nei pazienti pediatrici rispetto agli adulti ($p < 0.0001$). I valori di ORAC correlano solo con l'uso di farmaci biologici, ma non con l'attività di malattia, l'età o il genere. L'analisi ROC ha evidenziato, per questo biomarker di stress ossidativo, una buona capacità discriminante per IBD, anche se ad oggi, il suo valore prognostico è ancora da confermare.

Un altro dato di grande interesse è quello relativo ai valori plasmatici della capacità ferro-riducente (FRAP) che risulta notevolmente ridotta nei pazienti IBD pediatrici rispetto al gruppo di controllo e agli adulti IBD, in entrambi i casi con una elevata significatività statistica. Tale dato emerge per la prima volta in ambito pediatrico; infatti, la riduzione dell'attività antiossidante totale nelle IBD è descritta in letteratura, ma si riferisce a studi condotti su pazienti adulti [3,56,57]. L'ipotesi che si può avanzare in merito prende in considerazione la non completa maturità dei meccanismi di difesa antiossidanti nel soggetto pediatrico e la gravità di malattia, che è quasi sempre maggiore nelle forme ad esordio giovanile.

La mediana dei valori di FRAP del gruppo IBD adulti non differisce in maniera significativa rispetto al gruppo di controllo. Questo biomarker, come misura della capacità antiossidante totale, è la somma del contributo di antiossidanti endogeni (acido urico, bilirubina, albumina, etc) ed esogeni (farmaci e molecole di origine alimentare), quindi variabile rispetto alla complessità della malattia, ma anche rispetto al tipo di terapia, alle abitudini alimentari o all'uso di integratori [58].

Inoltre, la FRAP correla con l'età, il genere maschile e l'uso del farmaco biologico, ma non con il tipo di malattia, la durata della terapia biologica o l'attività della malattia, come riportato dalla letteratura [3,59].

I prodotti dell'ossidazione avanzata delle proteine (AOPP) sono significativamente aumentati nei bambini con IBD rispetto ai controlli con significatività statistica, in accordo con i dati di Krystek-Korpaka *et al.* [60]; negli adulti (IBDA vs CSA) non si riscontrano invece differenze. Anche in questo caso si potrebbe ipotizzare che l'aumento riscontrato nella popolazione pediatrica possa essere strettamente legato allo stato infiammatorio, maggiormente presente nelle forme ad esordio giovanile.

Infatti, essendo formati dalla reazione delle proteine plasmatiche, principalmente albumina, con i composti clorurati derivanti dall'attività della mieloperossidasi (MPO) [60,61], gli AOPP sono considerati anche mediatori dello stato infiammatorio. Inoltre, come riportato da Luceri *et al.* [58] e come emerge dall'analisi ROC, gli AOPP sembrano dimostrare una buona "capacità diagnostica" nel discriminare i soggetti affetti da malattia infiammatoria intestinale dai soggetti sani, soprattutto per la malattia di Crohn, in cui possono anche assumere un valore prognostico [58,62].

Anche i prodotti della perossidazione lipidica, come i TBARS, sembrerebbero implicati nella patogenesi delle IBD [60].

I dati ottenuti sui TBARS mostrano livelli poco superiori nei pazienti IBD rispetto ai controlli sia nel bambino che nell'adulto, in accordo con Achitei *et*

al. [61]. Tali dati si discostano da altri riportati in letteratura dove invece vengono riscontrati elevati livelli di perossidazione lipidica, in riferimento alla fase attiva di malattia [62].

Tuttavia la maggior parte dei pazienti IBD arruolati in questo studio era in fase di remissione di malattia (>60%) e tale condizione potrebbe spiegare i livelli circolanti di TBARS simili ai gruppi di controllo.

Nel contributo al danno ossidativo, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) non differisce in maniera significativa tra i pazienti pediatrici e adulti rispetto ai controlli, e non risulta correlata alle caratteristiche demografiche dei pazienti, né a quelle cliniche della malattia.

Tale dato, in contrasto con quanto riportato da Beltran *et al.* [63] che evidenzia un aumento significativo di ROS durante la fase attiva di malattia e un ritorno a valori normali in fase di remissione, potrebbe essere spiegato, come per i TBARS, dalla ridotta numerosità di pazienti in fase attiva di malattia. Infine, in modo simile a quanto descritto da Luceri *et al.* [58], a ciascun paziente del solo gruppo pediatrico è stato attribuito uno score ossidativo che considera complessivamente il bilancio redox; per la maggior parte dei pazienti si è ottenuto un punteggio moderato e tale score risulta negativamente correlato alla terapia biologica; ulteriori approfondimenti in merito permetteranno di chiarire

se i farmaci biologici utilizzati nelle IBD potranno avere un ruolo nel promuovere lo squilibrio redox.

Nella interpretazione dei dati esposti si deve tenere conto della ridotta numerosità campionaria del gruppo di controllo pediatrico e dei gruppi caso-controllo adulti, e dell'esiguo numero di soggetti con IBD all'esordio o in fase attiva di malattia (moderata/severa).

L'arruolamento di ulteriori casi e controlli (mancano ad oggi 12 controlli pediatrici, 17 casi adulti e 11 controlli adulti) è ancora in corso e permetterà di validare ulteriormente i dati finora ottenuti.

Capitolo ottavo

CONCLUSIONI

I dati ottenuti da questo studio dimostrano che la capacità antiossidante totale, il dosaggio AOPP, ORAC sono significativamente alterati nei bambini e negli adulti con malattia infiammatoria intestinale, ulteriore conferma del fatto che lo stress ossidativo è coinvolto nella patogenesi e nella progressione del processo infiammatorio sostenuto nelle IBD.

Inoltre, emerge l'ipotesi che lo squilibrio redox possa evolvere durante la malattia: è probabile che l'efficacia delle risorse antiossidanti, di minore efficacia nel bambino per la possibile immaturità dei meccanismi di difesa antiossidanti e per la gravità di malattia (generalmente maggiore rispetto alle forme dell'adulto), si esaurisca dall'età pediatrica a quella adulta, in proporzione alla durata della malattia.

Infine, la misurazione dei biomarkers come ORAC e AOPP, potrebbe essere utile nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con IBD.

Uno studio prospettico più ampio sulla popolazione pediatrica e adulta potrà chiarire il valore patogenetico e prognostico per un approccio clinico integrato.

BIBLIOGRAFIA

1. Lee SH, Oe T, Blair IA et al. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*. 2015;292(5524):2083-6.
2. Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM et al. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers. *PLoS One*. 2016;1(1):e0146129.
3. Szczeklik K, Krzyściak W, Cibor D et al. Evaluation of plasma concentrations of selected antioxidant parameters in patients with active Crohn's disease. *Folia Med Cracov*. 2018;58(2):119-130.
4. Ulrich K, Jakob U et al. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019;140:14-27.
5. Venturini D, Simão AN et al. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutr Res*. 2015;35(9):759-65.
6. Poljsak B, Suput D, Milisav I et al. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;vol 2013:pp11.
7. Nowotny K, Jung T, Höhn A et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194-222.
8. Matter B, Seiler CL, Murphy K, et al. Mapping oxidation products along DNA following exposure to three types of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2018;121:180-189.
9. Babiuch K, Bednarczyk A, Gawlik K et al. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia: a pilot study. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(6):408-418.
10. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014;94(2):329-54.
11. Bourgonje AR, von Martels JZH, Bulthuis MLC et al. Crohn's Disease in Clinical Remission Is Marked by Systemic Oxidative Stress. *Front Physiol*. 2019;10:499.
12. Benzie IFF, Strain JJ et al. The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.

13. Prior RL, Cao G et al. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med.* 1999;27:1173-1181.
14. Serafini M, Villano D, Spera G et al. Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr Cancer.* 2006;56(2):232-40.
15. Bourgonje AR, Feelisch M, Faber KN et al. Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends Mol. Med.* 2020;26:1034–1046.
16. Liguori I, Russo G, Curcio F et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* 2018;13:757–772.
17. Ahmed SMU, Luo L, Namani A et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017;1863:585–597.
18. Pereira C, Grácio D, Teixeira JP et al. Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2015;21(10):2403–2417.
19. Halpin SJ, Ford AC. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(10):1474-82.
20. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology.* 2010;28:573-621.
21. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3668-3672.
22. Oek CY, Kim EH, Choi DJ et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18:302–308.
23. Fuller MK. Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Special Considerations. *Surg Clin North Am.* 2019;99(6):1177-1183.
24. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis.* 2013 May;7(4):322-37.
25. Shouval DS, Rufo PA et al., The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: a review. *JAMA Pediatr.* 2017;171(10):999-1005.
26. Kuenzig ME, Fung SG, Marderfeld L et al., Twenty-first Century Trends in the Global Epidemiology of Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review. *Gastroenterology.* 2022;162(4):1147-1159.e4.

27. Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M. et al. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(25):2741-2763.
28. Gasparretto M, Guariso G. Highlights in IBD Epidemiology and Its Natural History in the Paediatric Age. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:829040.
29. Monteleone G, Fina D, Carusi R, Pallone F. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006;22(4):361-4.
30. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology.* 2010;28:573-621.
31. Hibi T, Ogata HJ et al. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2006;41(1):10-6.
32. Oliveira SB, Monteiro IM. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *BMJ.* 2017;31:357;j2083.
33. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut.* 2019;68(Suppl 3):s1-s106.
34. Shuk-Mei H, James DL et al. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(Suppl 2):S13–S23.
35. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA et al. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med.* 2005;143:895–904.
36. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:390-40.
37. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:531-542.
38. Levine A, Koletzko S, Turner D et al. JPGN 2014. ESPGHAN revise Porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J. Pediatric Gastroenterol Nutr.* 2014;58(6):795-806.
39. Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and Classification of Crohn's Disease. *Autoimmunity reviews* 2014;13(4-5):467-71.
40. Rutgeerts P, Vermeire S, VannAssche G. Biological therapies for inflammatory bowel disease, *Gastroenterology.* 2009;136(4):1182-97.
41. Moret-Tatay I, Iborra M, Cerrillo E et al., Possible Biomarkers in Blood for Crohn's Disease: Oxidative Stress and MicroRNAs-Current Evidences and Further Aspects to Unrave. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;232:51-62.

42. Moret, I, Cerrillo E, Navarro-Puche A et al. Oxidative stress in Crohn's disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2014;37:28–34.
43. Iborra M, Moret I, Rausell F et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical Society Transactions.* 2011;39(4):1102-1106.
44. Tsikas B et al. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: *Anal Biochem* 2017;524:13-30.
45. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res.* 2010;704:152-159.
46. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996;313 Pt 1:17-29.
47. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49:1304-1313.
48. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2003;201:17-27.
49. Durak I, Yasa MH, Bektas A et al. Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology.* 2000;47:1015-1017.
50. Tu"zu"n A, Erdil A, Inal V, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem.* 2002;35:569-572.
51. Yuksel M, Ates I, Kaplan M et al. Is Oxidative Stress Associated with Activation and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease? *J Med Biochem.* 2017;36:341-348.
52. Bourgonje AR, von Martels JZH, Bulthuis MLC et al. Crohn's Disease in Clinical Remission Is Marked by Systemic Oxidative Stress. *Front Physiol.* 2019;10:499.
53. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;7(72):248-54.
54. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017:4535194.
55. Kawakami Y, Okada, Murakami Y et al. Dietary intake, neutrophil fatty acid profile, serum antioxidant vitamins and oxygen radical absorbance capacity in patients with ulcerative colitis. *J Nutric Sci and Vitaminol.* 2007;57:153-159.
56. Koutroubakis E, Malliaraki N, Dimouliod PD et al. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2004;49(9):1433-7.
57. Aslan, Nazligul Y, Bolukbas C et al. Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121(7-8):223-9.

58. Luceri C, Bigagli E, Agostiniani S et al. Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn's Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings. *Antioxidants* 2019;8:378.
59. Neubauer K, Kempinski R, Matusiewicz M et al. Nonenzymatic Serum Antioxidant Capacity in IBD and Its Association with the Severity of Bowel Inflammation and Corticosteroids Treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(4):88.
60. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I et al. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:794-802.
61. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:169-176.
62. Xu X, Sun S, Xie F et al. Advanced oxidation protein products induce epithelial-mesenchymal transition of intestinal epithelial cells via a PKC δ -mediated, redox-dependent signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27:37-56.
63. Achitei D, Ciobica A, Balan G, et al. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci*. 2013;58:1244-1249.
64. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S. et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2007;52(7):1636-41.
65. Beltran B, Nos P, Dasí F et al. Mitochondrial Dysfunction, Persistent Oxidative Damage, and Catalase Inhibition in Immune Cells of Naïve and Treated Crohn's Disease; *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:76-86.