



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata curriculum Scienze della Nutrizione**

**MARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO
NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI
DELL'ETÀ PEDIATRICA**

**OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN
PEDIATRIC INTESTINAL INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Camilla Ippoliti

Relatore:

Prof.ssa Tiziana Galeazzi

Correlatore:

Prof.ssa Tatiana Armeni

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

Introduzione.....	2
Capitolo I: Le malattie infiammatorie croniche intestinali.....	4
Capitolo II: Lo stress ossidativo.....	17
Capitolo III: Lo stress ossidativo nelle IBD.....	25
Capitolo IV: Scopo della tesi.....	35
Capitolo V: Materiali e metodi.....	36
Capitolo VI: Risultati.....	44
Capitolo VII: Discussione.....	57
Capitolo VIII Conclusioni.....	64
Bibliografia.....	65

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono un gruppo di malattie caratterizzate da una grave infiammazione cronica del tratto intestinale e dal conseguente danneggiamento della mucosa intestinale [1]; sebbene l'esatta eziologia risulti ancora sconosciuta, fattori ambientali, immunologici e predisposizione genetica, sembrano essere le principali cause eziopatogenetiche [2].

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 [1].

Un numero crescente di evidenze sperimentali mostra che lo stress ossidativo svolge un ruolo importante nella patogenesi e nello sviluppo di vari disturbi intestinali, incluse le IBD; infatti l'infiammazione intestinale cronica che caratterizza le IBD e l'iperattivazione del sistema immunitario che ne consegue, determinano una sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e una diminuzione delle difese antiossidanti.

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 [3].

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.

L'obiettivo primario di questa tesi di laurea è valutare lo stato redox di un gruppo di pazienti pediatrici affetti da IBD rispetto ad un gruppo di controllo, evidenziandone le correlazioni con le caratteristiche e le variabili cliniche della malattia; scopo secondario dello studio è valutare l'efficacia di un trattamento dietetico antiossidante in un sottogruppo di bambini con IBD.

LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (IBD)

1.1 Generalità

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD o MICI), classificate principalmente in due forme, la malattia di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), sono patologie ad andamento cronico-recidivante, di natura disimmunitaria e ad eziologia multifattoriale [1], che si caratterizzano per l'infiammazione cronica ed incontrollata della mucosa intestinale.

Le IBD presentano delle caratteristiche comuni, quali il decorso cronico ricorrente, sintomi intestinali e talvolta manifestazioni extraintestinali di severità e decorso variabile, alternati a periodi di remissione [4]. Sia nella malattia di Crohn che nella rettocolite ulcerosa è stato ampiamente riconosciuto il ruolo della disregolazione immunitaria, geneticamente determinata, nella induzione del danno tissutale [4].

Tuttavia, esse presentano un diverso quadro anatomo-patologico e differenti caratteristiche di decorso clinico che consentono una diagnosi differenziale nella quasi totalità dei casi [3,5].

La Malattia di Crohn è caratterizzata da un'infiammazione 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) [3]; nella Rettocolite Ulcerosa l'infiammazione è superficiale (interessa solo la mucosa e la lamina propria), è limitata al colon e al retto e procede in maniera continua in senso caudo-craniale (Figura 1).

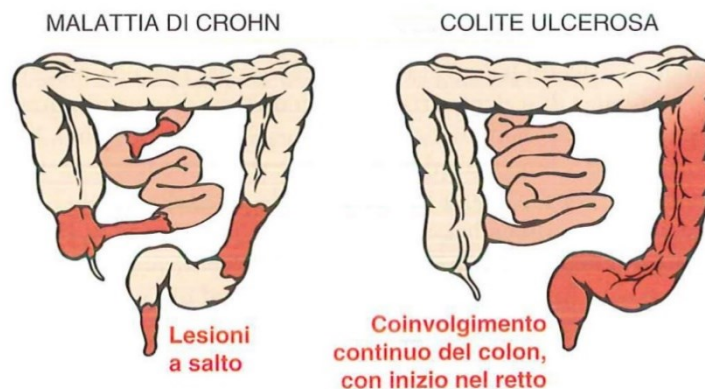


Figura 1: Differente localizzazione dell'infiammazione nelle due forme di IBD.

Nei casi in cui la malattia coinvolge solo il colon e in cui sono presenti le alterazioni della mucosa caratteristiche sia della UC che della CD (5-10%) non è possibile fare una diagnosi dirimente: tale forma prende il nome di "colite indeterminata" (IBD-U). I sintomi più comuni delle IBD 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, eritema nodoso e osteoporosi (più tipici della Malattia di Crohn) [6].

1.2 Epidemiologia

L'incidenza e la prevalenza delle IBD sono in costante aumento a livello globale (Figura 2), con 1,4 milioni di soggetti affetti negli Stati Uniti e tre milioni in Europa [7].

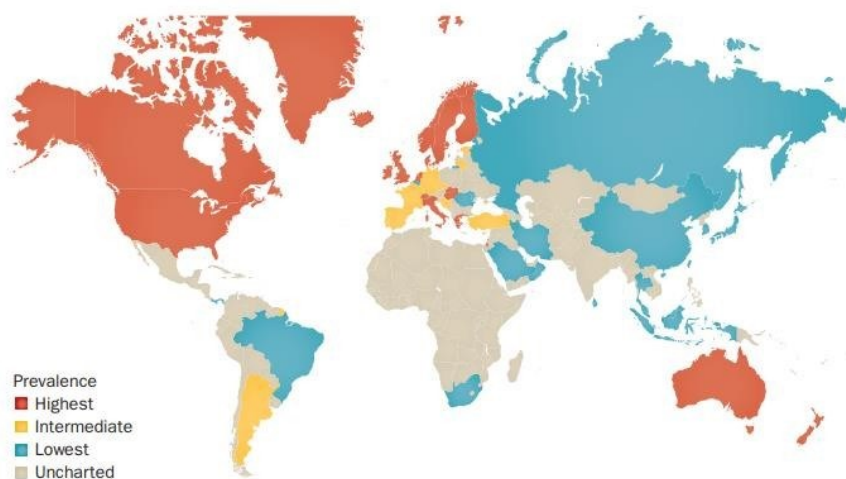


Figura 2: Prevalenza mondiale delle IBD.

L'aumento dei casi si riscontra sia nella popolazione adulta che in quella pediatrica, in particolare in età adolescenziale; è infatti stimato che le IBD si sviluppano durante l'infanzia o l'adolescenza in >25% dei casi [8], con un picco di incidenza a 12-15 anni. Di queste, il 20% esordisce a < 6 anni (early onset IBD) e il 2% <2 anni (very early onset IBD) [9]; le forme ad esordio precoce sono caratterizzate da un fenotipo più severo e da una difficile gestione diagnostico-terapeutica [10].

La maggior incidenza di IBD osservata nei paesi industrializzati e il drammatico aumento dei casi durante la seconda metà del XX secolo nelle regioni che una volta erano a bassa incidenza, supportano la teoria secondo cui l'insorgenza di tali patologie sia fortemente influenzata dall'ambiente [11].

Si ipotizza infatti che questo possa essere il risultato della "occidentalizzazione" dello stile di vita, che riguardano cambiamenti nello stile alimentare, l'abitudine al fumo, l'inquinamento ambientale, etc [12].

Il morbo di Crohn si manifesta più frequentemente nel genere femminile, in particolare nelle aree ad alta incidenza; al contrario, non esiste una sostanziale differenza di genere per la UC, sebbene in alcune popolazioni sia stata riscontrata una leggera predominanza di pazienti nel genere maschile [13,14].

1.3 Patogenesi

Sebbene l'esatta eziologia risulti ancora non completamente nota, è stato ampiamente dimostrato che nella patogenesi delle IBD sono contemporaneamente coinvolti elementi di predisposizione genetica, di disregolazione del sistema immunitario e disbiosi intestinale, fattori ambientali (alimentazione, fumo, stress), in associazione con stimoli antigenici e ossidativi (Figura 3) [15,16]. Tutti questi elementi interagiscono tra loro e inducono lo sviluppo dell'infiammazione cronica e del danno intestinale.

Predisposizione genetica: La predisposizione genetica, nella patogenesi delle IBD, è supportata dal fatto che una storia familiare positiva rappresenta il più importante fattore di rischio indipendente per lo sviluppo della malattia. 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%), piuttosto che tra quelli eterozigoti [17].



Figura 3: I principali fattori di rischio associati alle IBD

Lo studio dei geni e dei loci genetici hanno evidenziato come molti pathways implicati nella funzione barriera dell'epitelio intestinale e nei meccanismi dell'immunità innata e adattativa, e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) contribuiscano alla patogenesi delle IBD [18,19].

Fattori ambientali: La patogenesi delle IBD è condizionata anche dalla presenza di trigger ambientali [20]; in diversi studi una *dieta* moderna ricca di grassi (in particolare di origine animale, acidi grassi polinsaturi omega-6 e grassi del latte), zuccheri raffinati, proteine, additivi alimentari, e povera di frutta e verdura, è stata identificata come un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo delle IBD [21,22]; questo spiegherebbe il rapido incremento di incidenza di IBD nei Paesi in via di sviluppo e nella popolazione immigrata nei Paesi sviluppati [23].

La dieta sembra infatti influenzare il grado d'infiammazione intestinale attraverso la presentazione diretta di antigeni connessi alla dieta e l'alterazione del microbioma, della permeabilità intestinale e dell'equilibrio di alcuni mediatori come le prostaglandine [24,25]. Anche altri fattori ambientali, che intervengono durante la prima infanzia, come il parto cesareo, il mancato allattamento al seno e l'uso precoce di antibiotici nel primo anno di vita sono indicati dalla letteratura come fattori di rischio per le IBD; l'allattamento al seno, l'appendicectomia e il fumo di sigaretta (solo per l'UC) sono invece considerati fattori protettivi per l'insorgenza delle IBD [26].

Il *fumo* di sigaretta è un altro fattore ambientale che sembra peggiorare la CD pur essendo protettivo contro la colite ulcerosa [26, 27]. Il fumo di sigaretta contiene un'alta concentrazione di ROS e può quindi sensibilizzare l'intestino all'insulto ossidativo, amplificando il processo infiammatorio cronico [27, 28].

Difetti immunoregolatori: Si presume che una disregolazione nella reazione a stimoli endogeni ed esogeni, susciti una risposta immunitaria innata e adattativa inadeguata [29], in individui geneticamente predisposti. Resta ancora da chiarire come questo squilibrio contribuisca ad avviare e perpetuare l'infiammazione e il danno intestinale [30].

L'attivazione cronica delle cellule infiammatorie può provocare trasformazioni genetiche ed epigenetiche che possono favorire la carcinogenesi: è stato dimostrato che i pazienti con IBD hanno un rischio 2-3 volte maggiore nel corso della vita di sviluppare un carcinoma del colon-retto [31].

Stress ossidativo: L'iperattività del sistema immunitario sembrerebbe essere infine accompagnata da un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); è dimostrato, infatti, che lo squilibrio redox, che porta a condizioni di stress ossidativo (OS), è coinvolto nell'insorgenza e nell'evoluzione delle IBD, anche se l'esatto contributo alla patogenesi e allo sviluppo di complicanze non è ad oggi del tutto stato chiarito [32].

1.4 Diagnosi

La diagnosi di IBD ad esordio pediatrico si basa su una combinazione di anamnesi, reperti clinici, di laboratorio, radiologici, endoscopici ed istologici [33], come stabilito dai criteri ESPGHAN/revisione di Porto (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) (Figura 4) [34].

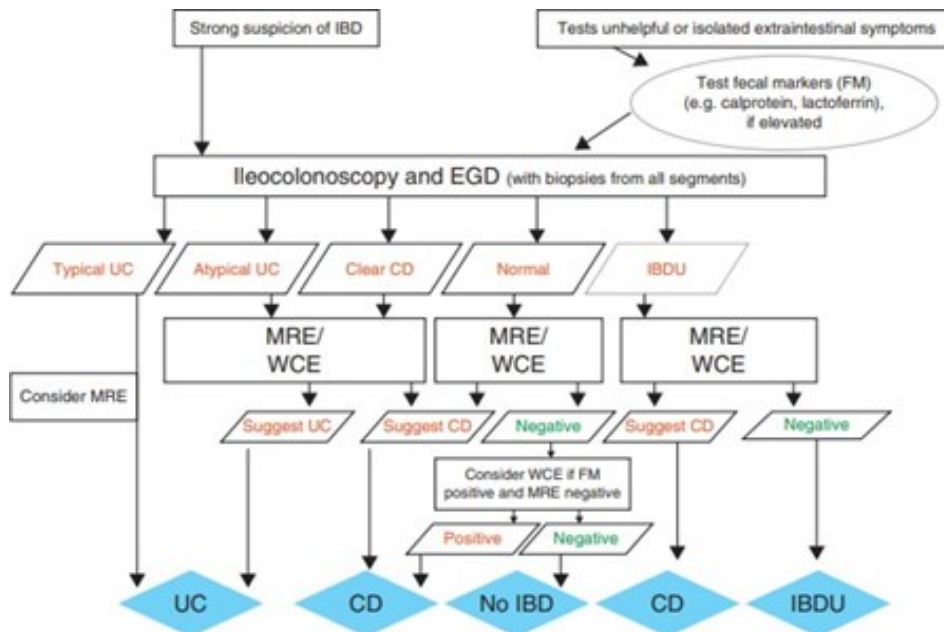


Figura 4: Valutazione di bambini/adolescenti con sintomi intestinali riconducibili ad IBD.

1.5 Classificazione di malattia: Montreal e Paris

La recente classificazione di riferimento per le IBD pediatriche è quella di Paris del 2009 che ha perfezionato la precedente classificazione di Montreal (2005).

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: stenosante B3: penetrante p: malattia perianale	B1: infiammatoria; B2: stenosante B3: penetrante; B2B3: stenosante e penetrante p: malattia perianale
Crescita	Nessuna indicazione	G0: nessuna evidenza di ritardo di crescita; G1: ritardo di crescita

Tabella 1: Classificazioni di Montreal e Parigi a confronto per CD.

Nella classificazione di Paris si enfatizzano le peculiarità della malattia pediatrica: stratifica i pazienti in relazione all'età di esordio, alla localizzazione della malattia, all'evoluzione clinica e all'impatto del CD sulla crescita del bambino [35].

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) (tabella 2).

Un *PCDAI* < 10 (range 0-100) distingue la remissione clinica dalla malattia attiva, mentre un punteggio >30 identifica una CD moderata-severa [36].

<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 extra-intestinali• parametri di laboratorio o rapporto Hgb /Hct o VES o albumina• funzionalità e benessere generale (recall dopo una settimana)
Score ranges da 0 to 100
<ul style="list-style-type: none">• 0 – 10 inattiva• 10 – 30 lieve• >30 Moderata a severa

Tabella 2: *PCDAI* (Pediatric Crohn Disease Activity Index)

L'uso sistemico del PCDAI è importante nel guidare le scelte terapeutiche nelle diverse fasi della malattia.

Uno degli aspetti che rendono grave la Rettocolite Ulcerosa è la sua estensione, valutata, anche qui, dalla classificazione di Montreal e Paris (tabella 3).

Classificazione Rettocolite Ulcerosa	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 CU.

L'attività clinica della UC viene generalmente classificata in remissione, lieve, moderata e grave, sulla base del numero di evacuazioni giornaliere, del grado di coinvolgimento sistemico (febbre, anemia, tachicardia) e dei parametri di laboratorio [37].

La stadiazione della gravità della malattia è di grande importanza all'esordio e nelle fasi successive di remissione e riacutizzazione. A questo scopo è stato validato il Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (*PUCAI*) che sulla base di un punteggio 0-85 (tabella 4) consente di classificare lo stato di malattia e di definire una riasacerbazione grave se il punteggio è maggiore di 65. La definizione del punteggio nelle diverse fasi della malattia ha importanti implicazioni terapeutiche e prognostiche.

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	No	0
Piccole quantità in meno del 50% delle evacuazioni	10	Si	10
Piccole quantità nella maggior parte delle evacuazioni	20		
Abbondanti quantità (> 50% del contenuto fecale)	30		
		Livello di attività	
Consistenza della maggior parte delle evacuazioni		Nessuna limitazione	0
Formate	0	Occasionale	5
Parzialmente formate	5	limitazione Attività compromessa	10
Liquide	10		

Tabella 4: Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)

1.6 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 (ASA), corticosteroidi e agenti immunosoppressivi, come l'azatiopina, e la terapia biologica rappresentata dall'anticorpo anti-TNF α (fattore di necrosi tumorale alfa) [38]. Tuttavia, il trattamento prolungato con questi farmaci è associato ad effetti avversi e l'alto tasso di recidive ne limita l'uso [38]. Inoltre, a lungo termine, se i trattamenti farmacologici non hanno successo e in caso di complicanze (es. fistole o stenosi), i pazienti con IBD richiederebbero un trattamento chirurgico [38]. Queste considerazioni sottolineano la necessità di approcci farmacologici nuovi e alternativi.

Capitolo II: LO STRESS OSSIDATIVO

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) [39], e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto.

Il termine “stress ossidativo” identifica una modificazione della normale omeostasi intracellulare esistente tra le sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente dalle cellule durante i processi metabolici, e l'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti (Figura 5) [40].

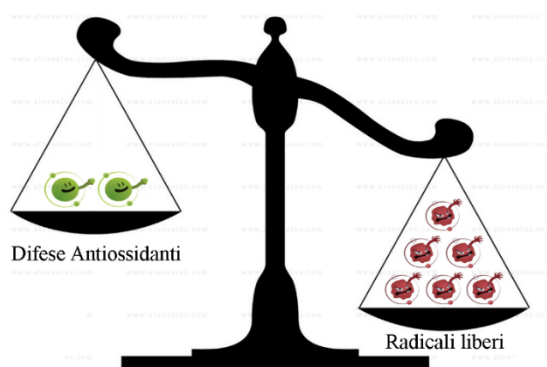


Figura 5: Sbilanciamento redox

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 [41].

2.1 Le specie chimiche reattive e radicali liberi

I radicali liberi (ROS, *Reactive Oxygen Species* e RNS, *Reactive Nitrogen Species*) sono piccole molecole diffusibili attraverso le membrane, con un singolo elettrone spaiato nell'orbitale atomico e/o molecolare più esterno, ciò conferisce loro la capacità più o meno spiccata di assumere o cedere un elettrone per raggiungere la stabilità elettronica. Tali molecole sono altamente reattive, instabili ed inclini ad avviare e partecipare a reazioni a catena con proteine, lipidi, carboidrati ed acidi nucleici nella matrice intracellulare [42].

Tra i radicali liberi, le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sono quelli a maggior diffusione, tra cui l'anione superossido (O_2^-), il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e il radicale ossidrilico (-OH), mentre le specie reattive dell'azoto (RNS) di maggior interesse sono l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito ($ONOO^-$); l'ossigeno molecolare (O_2) è il principale precursore per la formazione enzimatica e non enzimatica dei singoli ROS.

Le fonti principali di ROS includono l'attività della catena respiratoria mitocondriale e l'attività di diversi enzimi ossidativi a livello della mucosa intestinale: le NADPH ossidasi (enzimi NOX) e le doppie ossidasi (DUOX), che producono quantità eccessive di anione superossido e, in presenza di superossido dismutasi (SOD), perossido di idrogeno. Altri enzimi che

producono ROS sono: xantina ossidoriduttasi (XO), cicloossigenasi, mieloperossidasi, 5-lipossigenasi e citocromo P450 [43].

La produzione di ROS è parte essenziale del normale metabolismo cellulare e quindi, un certo grado di stress ossidativo è richiesto per i normali meccanismi fisiologici [44]. A concentrazioni moderate, infatti, i ROS partecipano attivamente a una varietà di processi biologici complessi, quali la trasduzione dei segnali, il controllo dell'espressione genica, l'apoptosi, la senescenza cellulare. Un lieve squilibrio pro-ossidativo è pertanto fisiologico e non va corretto (Figura 6 a,b) [45].

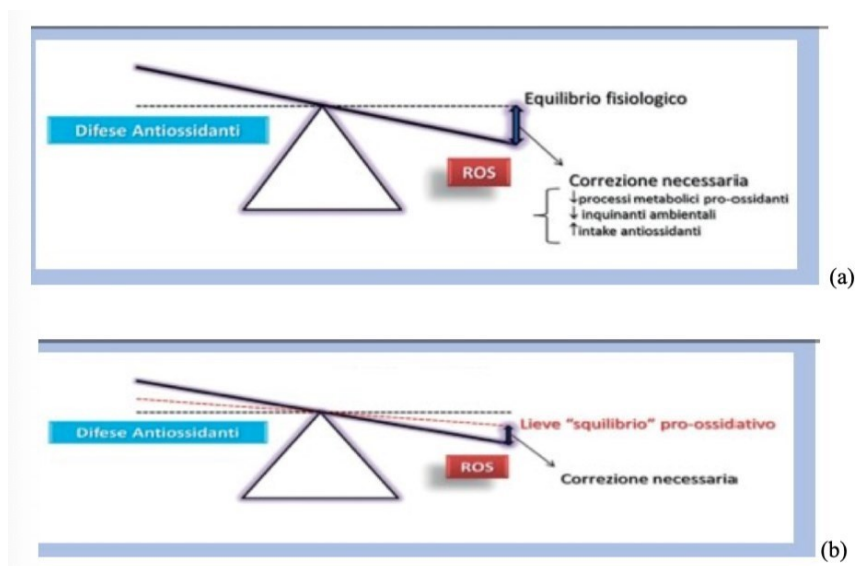


Figura 6a-6b: Modello rivisitato di stress ossidativo

L'aumento della produzione di ROS può essere promosso anche da fattori esogeni di carattere ambientale (inquinanti, fumo, radiazioni, alimenti, farmaci, xenobiotici etc.) (Figura 7) [46], da disordini metabolici o malattie ereditarie che colpiscono la catena di trasporto degli elettroni; nel contesto dell'infiammazione o dell'ipossia, eccessivi livelli di ROS possono causare danni a cellule e tessuti [3].

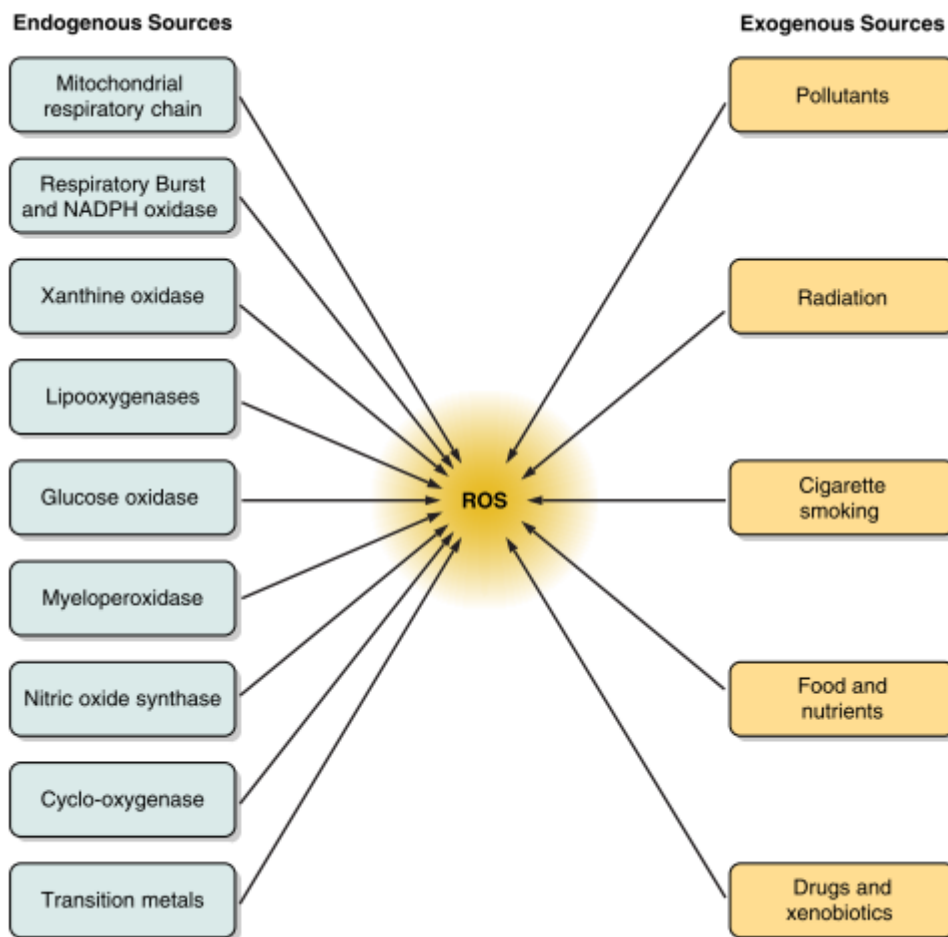


Figura 7: Fattori endogeni ed esogeni che portano alla formazione di ROS.

2.2 Difese Antiossidanti

Le reazioni di ossidazione sono cruciali per la vita aerobica, ma la generazione incontrollata di ROS è dannosa. Nonostante i radicali liberi vengano generati continuamente, il nostro corpo è attrezzato per difendersi dagli effetti dannosi dei ROS con l'aiuto degli antiossidanti chiamati collettivamente il sistema di difesa antiossidante.

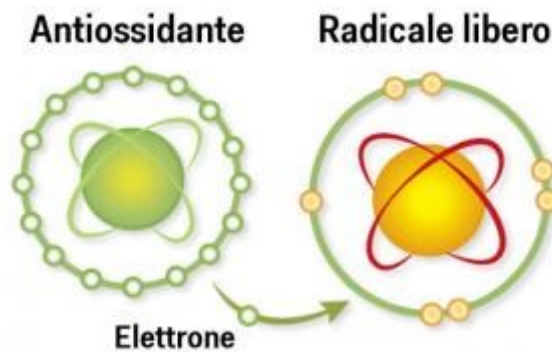


Figura 8: Meccanismo d'azione degli antiossidanti

Gli antiossidanti, deputati a neutralizzare l'eccessiva produzione di specie radicaliche facilitandone la rimozione e prevenendo o rallentando l'ossidazione di altre molecole (Figura 8), possono essere di origine endogena o assunti con la dieta [47].

I composti endogeni all'interno delle cellule possono essere di natura enzimatica, come la superossido dismutasi (SOD), il glutatione perossidasi (GPX), il glutatione reduttasi (GR) e la catalasi (CAT), o non enzimatici, come tocoferolo, glutatione (GSH) e acido ascorbico (Figura 9).

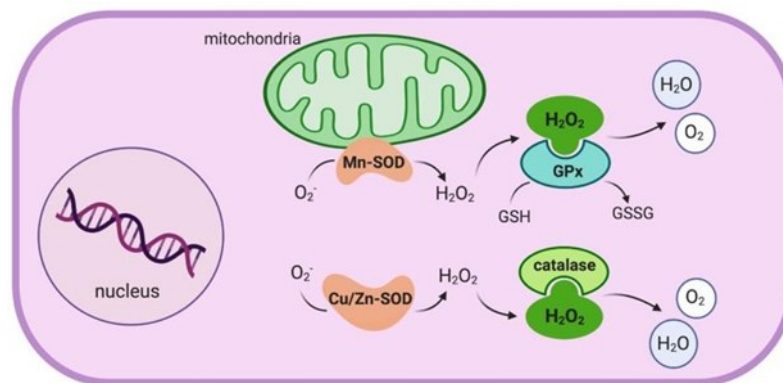


Figura 9: Enzimi antiossidanti intracellulari [48]

La *SOD* è un enzima antiossidante che catalizza la dismutazione dell'anione superossido altamente reattivo in O_2 e, nelle specie meno reattive, in H_2O_2 , motivo per cui svolge un ruolo cruciale nei meccanismi di difesa antiossidanti [49]; l'isoforma extracellulare (EC-SOD), rappresenta la maggior parte dell'attività della SOD nei fluidi biologici [50]. La quantità di SOD presente negli ambienti intra ed extracellulari è un buon indicatore di stress ossidativo [51].

CAT e *GPX* catalizzano la riduzione di H_2O_2 ad acqua. Nel corpo umano esistono otto isoforme di *GPX*. In particolare, l'isoforma *GPX2* viene espressa dal tratto gastrointestinale fornendo una prima linea di difesa contro i ROS derivati dall'infiammazione associata a batteri sia patogeni che non nell'intestino. Protegge inoltre l'intestino dall'assorbimento, attraverso la dieta, di idroperossidi [52,53]. Specifiche varianti polimorfiche sui geni degli enzimi antiossidanti sono state correlate ad alcune malattie con aumentata suscettibilità allo stress ossidativo [54].

Il *glutathione reduttasi* (GR) è una flavoproteina ossidoreduttasi che catalizza la riduzione, NADPH dipendente, del glutathione ossidato (GSSG) a GSH. Questo enzima è essenziale per il ciclo ossido-riduttivo del glutathione in quanto permette il mantenimento di livelli adeguati della sua forma ridotta [55]. Tra gli antiossidanti endogeni non enzimatici il *Glutathione* (GSH), generalmente presente nella sua forma ridotta, svolge il ruolo principale nella rimozione degli intermedi reattivi dell'ossigeno e dei radicali liberi prodotti dal metabolismo. Esso è infatti substrato per il glutathione transferasi (GST) nei meccanismi di detossificazione di xenobiotici ed altri composti, ed è allo stesso tempo un essenziale elettrone-donatore per il glutathione perossidasi (GPX) per la riduzione degli idroperossidi. È espresso ubiquitariamente ed insieme al GPX e GST formano il sistema del glutathione che funge da barriera antiossidante [56].

Anche gli antiossidanti esogeni assunti con la dieta svolgono un ruolo importante nella neutralizzazione dello squilibrio redox e la loro carenza è una delle cause di numerose patologie cronico-degenerative [57]. La *vitamina C* o acido ascorbico, dona elettroni ad altri composti prevenendo così la loro ossidazione. La *vitamina E* (tocoferolo) protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica convertendosi esso stesso in un radicale a bassa reattività.

Capitolo III: LO STRESS OSSIDATIVO NELLE IBD

3.1 Bilancio redox nelle IBD

Lo stress ossidativo è segnalato come un fattore chiave nella patogenesi delle IBD e potrebbe essere un meccanismo effettore chiave causa del danno cellulare/molecolare e tissutale [58-60].

L'aumentata produzione di ROS dovuta all'azione di molteplici fattori come composti ossidati della dieta, agenti patogeni, flora batterica intestinale, promuove l'infiammazione intestinale con produzione di citochine ed altri mediatori dell'infiammazione, perpetuando lo stato infiammatorio e il danno ossidativo a carico di cellule e tessuti (Figura 10) [61].

Livelli eccessivi di ROS danneggiano le proteine cellulari comprese le proteine del citoscheletro e, in definitiva, distruggono la barriera del tratto gastrointestinale andandone ad aumentare la permeabilità [62].

La perdita dell'integrità della barriera intestinale, accompagnata da un aumento della permeabilità intestinale, è un sintomo caratteristico della fisiopatologia dell'IBD [63], ed è dovuta alla distruzione delle proteine del citoscheletro e quindi delle giunzioni strette (TJ) [62,63].

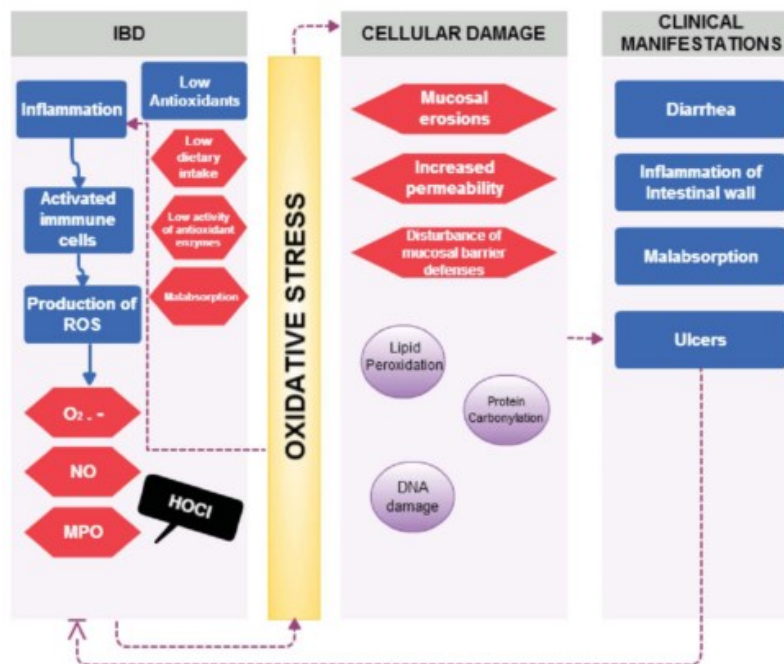


Figura 10: ROS e le manifestazioni cliniche nelle IBD

In pazienti con CD in fase attiva di malattia è stato segnalato un aumento dello stress ossidativo e dell'inflammatione, in combinazione con livelli ridotti di antiossidanti enzimatici e circolanti [64]. Tuttavia, con il miglioramento delle condizioni del paziente, questi parametri di stress ossidativo sembrerebbero tornare a livelli normali [65].

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 [66], in altri studi invece non è stata osservata alcuna differenza [67, 68].

Sotto l'aspetto clinico, Yuksel et al. [69] 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 i 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 [70].

I ROS possono reagire con varie componenti cellulari provocando perossidazione lipidica delle membrane con alterazioni delle interazioni transmembrana e di superficie tra lipidi-lipidi e lipidi-proteine [71], carbonilazione e idrossilazione delle proteine, con alterazione della struttura e perdita della funzionalità [72] e danno al DNA mitocondriale e nucleare [59], promuovendo la mutagenesi [73] e aumentando il rischio di carcinogenesi [74].

Nei pazienti con IBD, anche la capacità antiossidante circolante sembra essere correlata allo stato clinico [75]: alcuni dati della letteratura riportano aumentati livelli di SOD nel circolo e nelle cellule epiteliali intestinali di pazienti IBD [76], ipotizzando una over-produzione di enzima come meccanismo di

protezione dei tessuti intestinali dal danno ossidativo. Ad aumentati livelli di SOD (in risposta alla produzione di H₂O₂) sembrerebbe corrispondere un aumento di CAT e/o GPX [77,78]. Si è infatti ipotizzato che per fornire una protezione ottimale contro il danno mediato dai ROS, tutto il corredo enzimatico antiossidante si attivi in maniera coordinata [77,78].

Diversi autori hanno dimostrato che pazienti con CD possono avere una diminuzione dei livelli di enzimi antiossidanti nel tessuto intestinale, mentre i livelli degli enzimi nel plasma o nel siero sembrerebbero dipendere dalla gravità di CD [65, 79, 80].

Tuttavia, la letteratura riporta in merito dati contrastanti, spesso a causa delle diverse metodologie applicate e condizioni operative, ciò nonostante si ritiene che lo studio dei marcatori cellulari e plasmatici di stress ossidativo, sia uno strumento importante per la valutazione dello stato redox, la progressione della malattia e gli eventuali benefici degli antiossidanti nelle patologie infiammatorie intestinali.

3.2 Biomarcatori di stress ossidativo

I metodi per la valutazione del danno ossidativo si basano su:

- a) quantificazione diretta della produzione di specie chimiche reattive (ROS/RNS);
- b) quantificazione di specifici sottoprodotti o intermedi derivanti da processi ossidativi (TBARS, AOPP, AGEs, 8-OHdG).

I metodi per la valutazione della risposta antiossidante si basano su:

- a) quantificazione della capacità antiossidante di una matrice, riferita come capacità riducente nei confronti di uno specifico substrato o concentrazione di un marker antiossidante.

La **quantificazione diretta di ROS** [81] permette di valutare l'entità del danno ossidativo ma, data la minima quantità e la breve emivita dei radicali liberi, clinicamente la quantificazione dello stress ossidativo si avvale anche della misura di differenti sostanze più stabili prodotte dalle reazioni ossidative (prodotti dell'ossidazione di proteine e lipidi, prodotti di glicosilazione avanzata AGEs, derivati dell'ossidazione degli acidi nucleici) (tabella 5) [82].

Allo stesso modo possono essere quantificati gli enzimi antiossidanti Superossido dismutasi, Catalasi, Glutazione perossidasi e composti non enzimatici (glutazione, vitamina C, vitamina E, acido urico, bilirubina ect.) [83].

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 5: Biomarkes di stress ossidativo ed antiossidanti

Come frequentemente accade in medicina di laboratorio, nessuno dei biomarcatori attualmente disponibili risponde singolarmente ai criteri di idealità (stabilità, specificità d'organo o di patologia, sensibilità e specificità d'analisi, bassa variabilità biologica). Data la molteplicità dei bersagli dei radicali liberi ed il complesso metabolismo al quale vanno incontro i prodotti delle loro reazioni è però verosimile che l'insieme di più marcatori sia più informativo che uno solo, anche in virtù del fatto che ciascuno rispecchia una sfaccettatura dell'intero fenomeno [84].

La *valutazione dei prodotti di ossidazione* prevede principalmente: i prodotti di ossidazione lipidica, prodotti di ossidazione proteica e la valutazione del danno ossidativo del DNA.

- Prodotti di ossidazione lipidica: idroperossidi totali (LOOH), malondialdeide (MDA), sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) e isoprostani.

L'ossidazione lipidica comporta una reazione a catena autocatalitica innescata dai ROS, gli idroperossidi lipidici che originano da una prima reazione di riarrangiamento dei doppi legami, sono a loro volta specie reattive che possono ulteriormente reagire a formare perossidi ciclici ed aldeidi alfa-beta-insature come la malondialdeide (MDA), misurata come sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) (Figura 11) [85, 86].

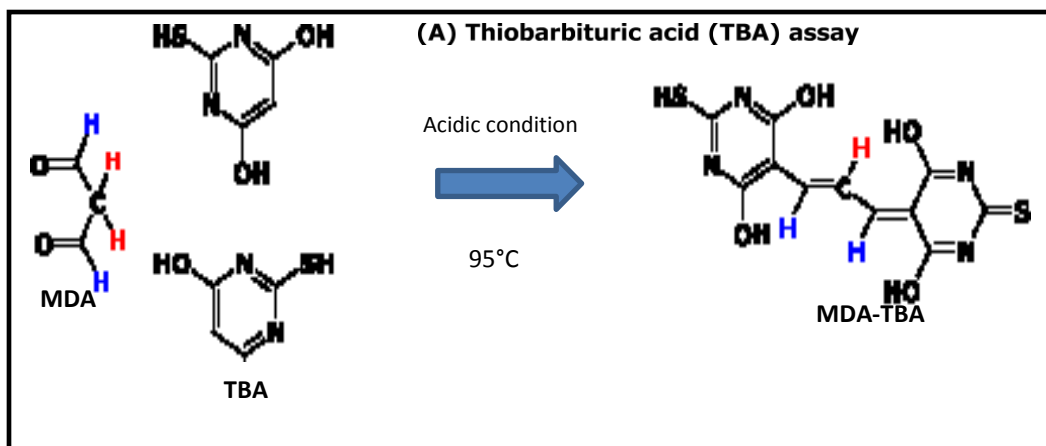


Figura 11: Sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico

Un'altra particolare classe di composti generati dalla lipoperossidazione a carico dell'acido arachidonico, sono gli isoprostani-F2 che, per effetto della loro stabilità ed indipendenza da fattori esogeni, sono stati proposti come marcatori di riferimento.

- Prodotti di ossidazione proteica: AOPP (Advanced oxidative protein product).

Le proteine rappresentano un ampio bersaglio per i ROS, infatti i meccanismi ossidativi a carico delle proteine sono molteplici e possono essere a carico sia dei residui amminoacidici laterali che sulla catena centrale con la formazione di nuovi gruppi funzionali che possono contribuire ad alterarne la funzione ed il metabolismo. I principali biomarcatori di ossidazione delle proteine sono le proteine carbonilate che si originano per ossidazione diretta dei residui della catena laterale o per formazione di addotti. I livelli di AOPP possono essere misurati mediante saggi spettrofotometrici [87].

- Un buon marcatore biologico di stress ossidativo a livello del DNA è rappresentato dall' 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG). Durante il processo di riparazione in vivo del DNA, e soprattutto in seguito alla degradazione degli acidi nucleici conseguente alla morte cellulare, la 8-OHdG viene liberata e secreta nelle urine, sia come base singola sia inclusa in oligomeri di DNA senza ulteriori modifiche.

Data la stabilità e la specificità, la concentrazione di 8-OHdG nelle urine è uno dei più affidabili marcatori per valutare il grado di stress ossidativo sistemico [85]. Il saggio più affidabile per la sua determinazione è rappresentato dalla cromatografia accoppiata alla spettroscopia di massa (HPLC/GS-MS) anche se sono disponibili numerosi saggi ELISA commerciali basati su anticorpi specifici [88].

Anche le componenti la cui deregolazione può provocare stress ossidativo come i *sistemi di difesa antiossidante* possono essere utilizzati per valutare lo stato redox dell'organismo. Come già accennato gli enzimi antiossidanti cellulari e plasmatici più rilevanti sono SOD, CAT e GPX, quantificabili attraverso l'attività enzimatica (metodi spettrofotometrici e fluorimetrici), il contenuto proteico (Western Blot) e l'espressione genica (RT-PCR) [89,90].

Un ulteriore metodo di valutazione dello stress ossidativo è la *misura della capacità antiossidante totale (TAC)*, data dal contributo di antiossidanti non enzimatici endogeni (come bilirubina e tioli) e nutrizionali (come tocoferoli, acido ascorbico, carotenoidi e composti fenolici) [91], attraverso il dosaggio **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity) che misura la capacità "scavenging" (cioè l'attività antiradicalica) degli antiossidanti di un campione alimentare o biologico verso i radicali perossilici (ROO·) [85], e mediante i metodi **FRAP** (ferric reducing ability of plasma) e/o **CUPRAC** (cupric

reducing antioxidant capacity) che misurano il potere riducente degli antiossidanti attraverso le reazioni redox rispettivamente con il ferro (FRAP) o rame (CUPRAC) [85].

Capitolo IV: SCOPO DELLA TESI

Sebbene l'esatta eziologia e patogenesi nell'IBD siano ancora sconosciute, studi recenti hanno dimostrato che lo squilibrio redox, che conduce ad una condizione di stress ossidativo, abbia un ruolo chiave nell'evoluzione della malattia e nello sviluppo di complicanze legate ad essa.

Il presente studio osservazionale prospettico, parte di un progetto di ricerca finalizzato dal Ministero della Salute (2019), ha come obiettivo primario quello di valutare il livello di squilibrio redox e la condizione di stress ossidativo in bambini affetti da IBD rispetto ad un gruppo di controllo, quantificando il danno ossidativo attraverso la misura di radicali liberi e prodotti di ossidazione, e la risposta antiossidante plasmatica e cellulare mediante la valutazione della capacità antiossidante totale e la misura delle attività enzimatiche specifiche.

End-point secondario dello studio è quello di studiare, nei pazienti IBD, l'associazione tra i diversi biomarcatori di stress ossidativo e le caratteristiche e le variabili cliniche della malattia.

Capitolo V: MATERIALI E METODI

5.1 Disegno dello studio

In questo studio sono stati arruolati 41 soggetti pediatrici di età compresa tra 6-18 anni con diagnosi di IBD secondo i criteri di Porto, e 22 soggetti sani di pari età e genere.

Sono stati esclusi dall'arruolamento: pazienti con enterostomia permanente, neoplasie in atto o storia di neoplasia nei 10 anni precedenti, malattie cardiovascolari e ischemie, ipertensione, diabete di tipo 2 e altre condizioni che richiedono un trattamento dietetico specifico (malattia celiaca, allergia alimentari conclamate, insufficienza renale cronica, malattie metaboliche congenite o condizioni acquisite come dislipidemie e iperuricemia), gravidanza e allattamento.

Sono stati arruolati come controlli soggetti che eseguivano endoscopie per motivi differenti dalle IBD e dalla sorveglianza neoplastica, come disturbi funzionali, reflusso gastro-esofageo, gastrite, diverticolite, poliposi benigna. Sono stati esclusi tra i controlli i familiari di primo grado dei soggetti IBD. Sono stati inclusi nello studio solo i soggetti IBD e i controlli per i quali è stato acquisito il consenso informato scritto.

Per ogni soggetto sono state raccolte le seguenti informazioni: età, etnia, genere, dati auxologici (peso, altezza, indice di massa corporea BMI), eventuali terapie in corso (medica e/o nutrizionale e/o con integratori).

Per ciascun paziente IBD inoltre sono state raccolte le seguenti informazioni riguardanti lo stato di malattia: età alla diagnosi, tipo di malattia (CD, UC e IBD-U), estensione della malattia (classificazione di Paris), attività clinica della malattia (PCDAI *Pediatric Crohn's Disease Activity Index* e PUCAI *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*), terapia in atto (farmaci biologici, steroidi, immunomodulatori, aminosalicilati e altro) specificando la data d'inizio della terapia; terapia nutrizionale enterale specificando la frequenza (totale o parziale) e il tipo di prodotto; assunzione di integratori o vitamine specificando il nome del prodotto e il dosaggio.

Nei pazienti del gruppo IBD sono stati inoltre rilevati i seguenti parametri ematochimici: emocromo, VES, PCR, albumina, urea, creatinina, glicemia, ALT, ferritina, assetto lipidico, livelli sierici di selenio, zinco, vitamina A, E, C, D e calprotectina fecale.

In tutti i soggetti arruolati (pazienti e gruppo di controllo) sono stati quantificati i seguenti parametri indicativi di stress ossidativo:

1. Livelli intracellulari di ROS
2. Capacità antiossidante totale (TAC)
3. Prodotti della perossidazione lipidica (TBARs) e della ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)
4. Attività enzimatica degli enzimi antiossidanti SOD, CAT, GPX e GR.
5. Livelli di glutatione ridotto (GSH)

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione Marche (CERM), Italia, 30/05/2019, protocollo n°2019/174 e condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, come rivista nel 1983.

5.2 Preparazione campioni

I campioni di plasma, ottenuti da centrifugazione di sangue intero in eparina, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'esame. Le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) sono state isolate per centrifugazione in gradiente di densità con sistema Leucosep™ e conservate a -80°C fino al momento dell'analisi.

5.3 Determinazione radicali reattivi dell'ossigeno (ROS)

I livelli intracellulari di ROS nelle PBMCs sono stati rilevati mediante citofluorimetria a flusso, utilizzando la carbossi-H₂DCFDA (C400), come sonda, secondo le istruzioni del produttore. All'interno delle cellule, la carbossi-H₂DCFDA, idrolizzata da esterasi, è ossidata dai ROS intracellulari per formare il composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), la cui emissione massima è a $\lambda=520$ nm. La fluorescenza della DCF è stata misurata mediante citofluorimetro (Guava Easy Cyteflow cytometer; Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

5.4 Capacità antiossidante totale plasmatica (TAC)

Per la valutazione della capacità antiossidante totale del plasma sono stati utilizzati due saggi: l'ORAC ed il FRAP.

Nel test **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity) la diminuzione della fluorescenza del marker fluoresceina (ex 485; em 530 nm), è inversamente proporzionale alla capacità antiossidante, espressa come μmol equivalenti di Trolox, analogo della vitamina E.

Nel saggio **FRAP** (ferric iron reducing antioxidant capacity) la reazione di riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} da parte dei composti antiossidanti del plasma in presenza di TPTZ (*2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine*, Sigma-Aldrich) produce

una colorazione blu intenso misurata a $\lambda=593$ nm [92]. La curva di calibrazione utilizza una soluzione di FeSO_4 a concentrazioni standard fino a 1.0 mM. Tutte le misurazioni sono state condotte in duplicato.

5.5 Sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs)

I livelli plasmatici delle sostanze reattive dell'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.

5.6 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 [93]; brevemente, campioni di plasma diluiti 1:5 sono stati aggiunti a 50 μL di KI 1,16 M e 100 μL di CH_3COOH . L'assorbanza del mix di reazione è stata letta immediatamente a 340 nm usando Chloramine-T (Sigma-Aldrich, Italy) come standard. I valori di AOPP sono stati calcolati in base alla concentrazione delle proteine plasmatiche ed espressi in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ di proteine. Tutte le misurazioni sono state condotte in duplicato.

5.7 Proteine plasmatiche

Il dosaggio delle proteine plasmatiche è stato eseguito secondo il metodo colorimetrico descritto da Bradford [94], utilizzando il Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, USA).

5.8 Determinazione delle difese antiossidanti

Le difese antiossidanti enzimatiche cellulari sono state valutate misurando i livelli di Superossido dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione Perossidasi (GPX) e Glutathione reduttasi (GR) attraverso la determinazione dell'attività enzimatica. Le difese antiossidanti non enzimatiche sono state valutate misurando i livelli di glutathione.

Sia l'attività enzimatica che i livelli di glutathione sono stati misurati nelle cellule PBMCs mediante analisi spettrofotometriche utilizzando kit ELISA specifici come riportato di seguito, secondo le istruzioni fornite dal produttore:

- SOD Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat. No. 706002)
- Catalase Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat. No. 707002)
- Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat. No. 703102)

- Glutathione Reductase Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat. No 703202)
- Glutathion Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat. No. 703002)

I marcatori di stress ossidativo sono stati correlati con i dati clinici, demografici ed alcuni parametri ematochimici.

5.9 Oxidative score

E' stato infine calcolato un punteggio ossidativo (**oxidative score**) dato dalla somma di score parziali per TBARS, AOPP, ORAC e FRAP, ottenuti nel seguente modo:

- per TBARS, AOPP e ORAC, ai valori $< 25^{\circ}$ pc sono stati assegnati 0 punti, 1 per quelli compresi tra 25° pc e mediana, 2 quelli tra mediana e 75° percentile e 3 punti per $> 75^{\circ}$ pc.
- per i valori FRAP, l'assegnazione dei punti era inversa ($0 < 25^{\circ}$ pc, 1 tra 25° - 50° pc, 2 tra 50 - 75° pc e 3 $> 75^{\circ}$ pc).

In base alla somma delle quattro componenti, i pazienti sono stati assegnati a tre categorie di punteggio ossidativo: basso (score totale 0-4), medio (score totale 5-8) e alto (score totale 9-12).

5.10 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad 9.1. I dati sono espressi come valori di mediana \pm IQR (per variabili non normalmente distribuite). Per il confronto tra le variabili continue o categoriali sono stati utilizzati test parametrici (test T di Student) per variabili normalmente distribuite e test non parametrici (Mann-Whitney test) per variabili non normalmente distribuite. L'analisi di correlazione è stata condotta utilizzando il test di Spearman.

Per alcuni biomarcatori di stress ossidativo è stata calcolata l'area sotto la curva (AUC, Area Under Curve) della **ROC** (Receiver Operating Characteristic) curve finalizzate a caratterizzare la loro utilità nel discriminare i pazienti con IBD da soggetti sani.

I valori sono stati considerati statisticamente significativi con un $p < 0,05$.

Capitolo VI: RISULTATI

Nel periodo dicembre 2019-agosto 2021 sono stati arruolati presso la Clinica Pediatrica UNIVPM AOU Ospedali Riuniti Ancona, 41 soggetti pediatrici affetti da IBD e 22 controlli sani, di pari età e genere (Tabella 7).

	IBD Pediatrici (41)	Controlli (22)	p value
Età (mediana, IQR)	12 (4)	12 (4)	0,57
Maschi (%)	17 (42%)	14 (61%)	0,19

Tabella 7: Caratteristiche demografiche dei pazienti

Nel gruppo di pazienti IBD, 22 (54%) soggetti erano affetti da morbo di Crohn (CD) e 19 (46%) da rettocolite ulcerosa (UC). La diagnosi è stata posta circa 1,7 anni (IQR 0,45) prima dell'arruolamento e il 63% 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 63% dei pazienti, il 56% dei pazienti era in terapia con ASA, il 59% con farmaci immunomodulatori e solo il 5% (uno affetto da CD, uno da UC) era trattato con corticosteroidi. Sedici pazienti (39%) hanno seguito una terapia nutrizionale: 5 erano in nutrizione enterale totale, 4 in nutrizione enterale parziale, 7 trattati con altre diete specifiche come la dieta priva di lattosio.

IBD pediatrici (41)	
Età (mediana, IQR)	12 (4)
Maschi (%)	17 (42%)
Malnutrizione (%)	5 (12%)
Obesità (%)	1 (2,4%)
CD (n, %)	22 (54%)
UC (n,%)	19 (46%)
Durata di malattia anni (median, IQR)	1,7 (0,45)
Attività di malattia	
Remissione (n,%)	26 (63%)
Lieve (n,%)	12 (29%)
Moderata (n,%)	2 (5%)
Severa (n,%)	1 (3%)
Calprotectina fecale >250 mg/Kg	17 (41,4%)
Terapia:	
ASA (n,%)	23 (56%)
Immunosoppressivi (n,%)	24 (59%)
Corticosteroidi (n,%)	2 (5%)
Farmaci biologici (n,%)	26 (63%)
Terapia con probiotici (n,%)	3 (7%)
Terapia nutrizionale (n,%)	10 (24%)
Supplementazioni vitamine (n,%)	19 (46%)
Vitamina D	16 (39%)
Vitamina C	1 (2,4%)
Acido folico	1 (2,4%)
Vitamina B1	1 (2,4%)
Chirurgia (n,%)	2 (5%)
Manifestazioni extraintestinali (n,%)	4 (9,8%)

Tabella 8: caratteristiche cliniche dei pazienti.

Diciannove bambini hanno ricevuto un'integrazione vitaminica: 16 con vitamina D, 3 pazienti rispettivamente con vitamina C, vitamina B1 e acido folico. Due erano i pazienti sottoposti a chirurgia prima del reclutamento e 4 hanno presentato manifestazioni extraintestinali di IBD (in due casi si trattava di manifestazioni oculari, in 1 un coinvolgimento articolare e un altro presentava una dermatite) (Tabella 8).

6.1 ROS

I livelli intracellulari di ROS risultano comparabili nei due gruppi di studio, il dato non assume significato statistico (Tabella 9, Figura 10).

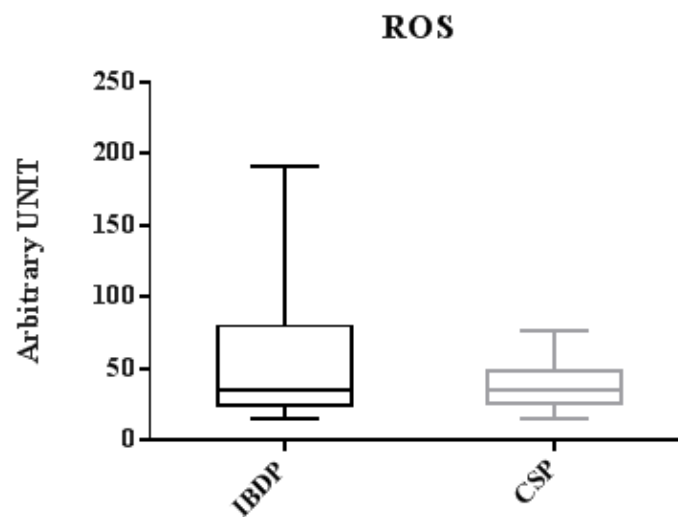


Figura 10: Livelli di ROS nei due gruppi

Nel gruppo IBD non è stata dimostrata alcuna correlazione tra i valori dei ROS ed età, genere, attività di malattia e uso della terapia biologica (Tabella 10).

6.2 FRAP

Come mostrato in Figura 11 ed in tabella 9, la capacità antiossidante totale plasmatica (TAC) espressa come capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) risulta ridotta nei pazienti IBD rispetto al gruppo di controllo, anche se non in maniera significativa (mediana= 202 vs 230 mcmol/eq FeSO₄, IQR 34,5 vs 58,8; p value >0,05).

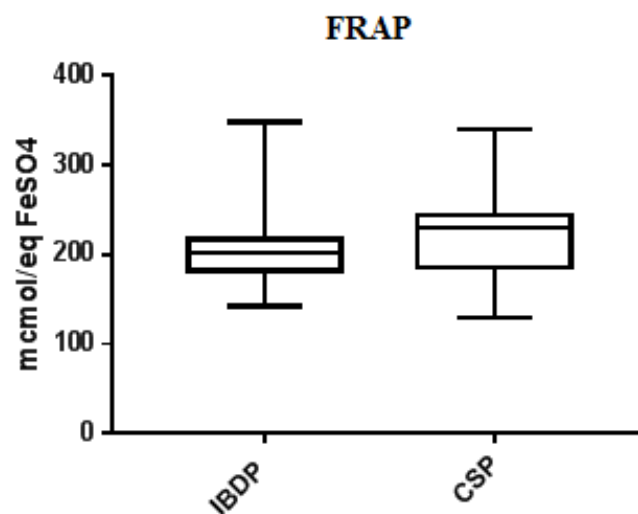


Figura 11: Capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) nei due gruppi di studio

I valori di FRAP correlano positivamente con il genere maschile ($p=0,0236$) e con l'uso di farmaci biologici ($p=0,0020$). I pazienti in terapia con farmaci biologici per un periodo più lungo mostrano valori di FRAP più alti ($r=0,5873$; $p<0,0001$). Inoltre, l'età è correlata positivamente con i valori di FRAP, con elevata significatività statistica ($p < 0,0001$) (Tabella 10).

6.3 ORAC

L'ORAC intracellulare è minore nel gruppo IBD vs controllo, con significatività elevata (p value 0,0016) come mostrato in figura 12 e tabella 9.

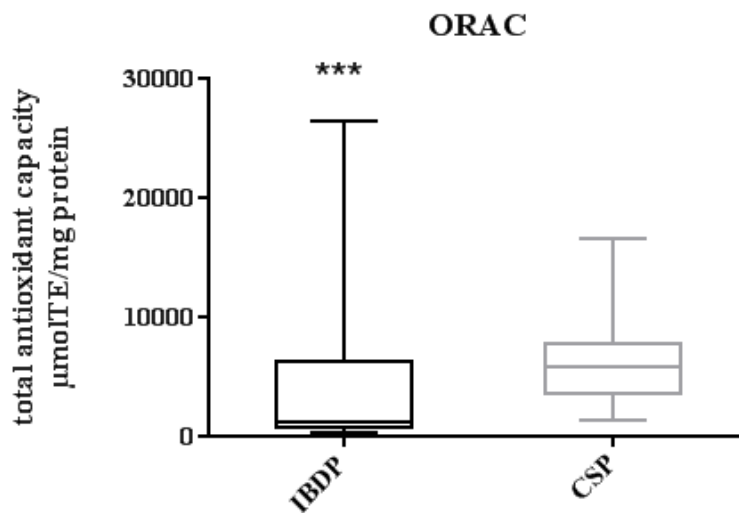


Figura 12: Capacità di assorbimento dei radicali liberi dell'ossigeno (ORAC) nei due gruppi

Tale valore è risultato essere inversamente correlato con l'uso di farmaci biologici (p value 0,0397), ma non correlato con la durata della terapia ($r=0,2337$; p valore 0,2974) (Tabella 10).

La curva ROC riferita a questo biomarcatore mostra un'area al di sotto della curva (AUC) di 0,7564 (95% intervallo di confidenza da 0,6343-0,8786), con un valore di $p=0,002$ (Figura 13).

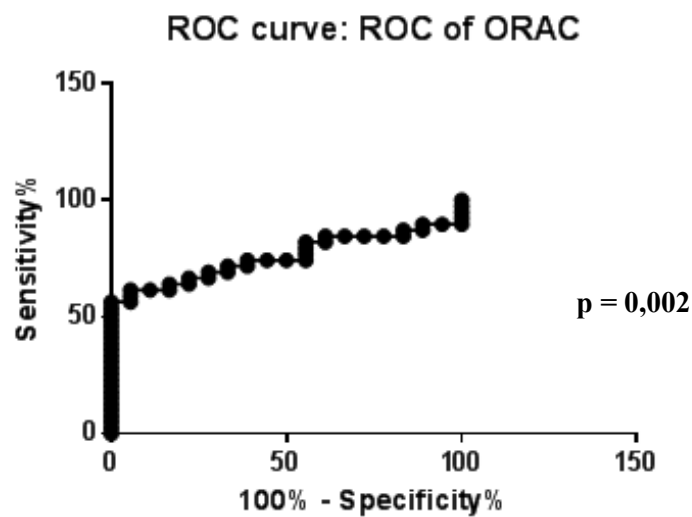


Figura 13: Curva ROC ORAC

6.4 Perossidazione lipidica (TBARs)

L'analisi dei dati relativi alle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) non mostrano differenze significative tra i valori ottenuti nel gruppo dei pazienti e nel gruppo di controllo (Tabella 9, Figura 14).

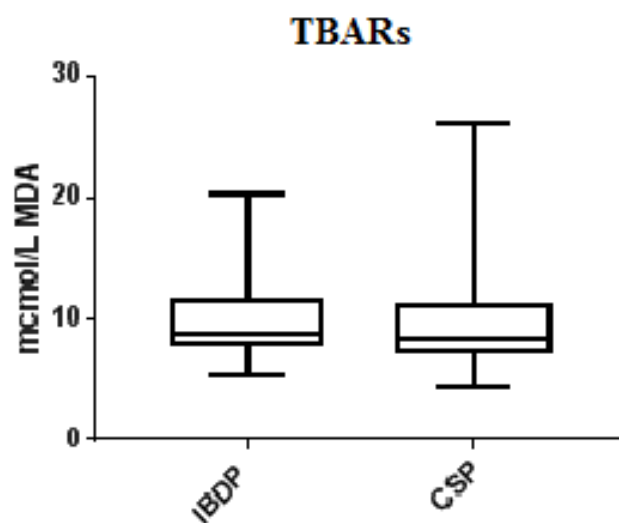


Figura 14: Sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) nei due gruppi

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

6.5 Prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP)

I prodotti di ossidazione proteica avanzata (AOPP) sono aumentati nel gruppo IBD rispetto ai controlli, con buona significatività statistica, come mostrato in Figura 15 e la Tabella 9.

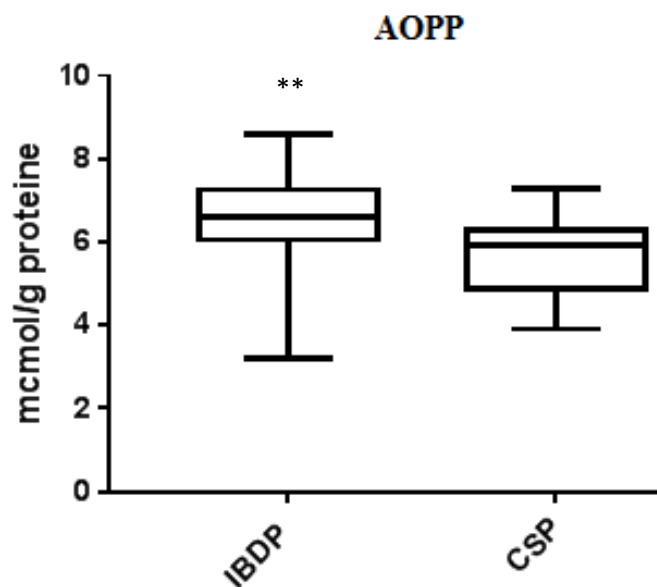


Figura 15: Livelli di AOPP (mcmol/gr di proteine) nei pediatrici e controlli.

La curva ROC per AOPP (AUC) mostra un'area di 0,6146 (intervallo di confidenza 95% 0,5079-0,7213), con un valore $p=0,0416$ (Figura 16).

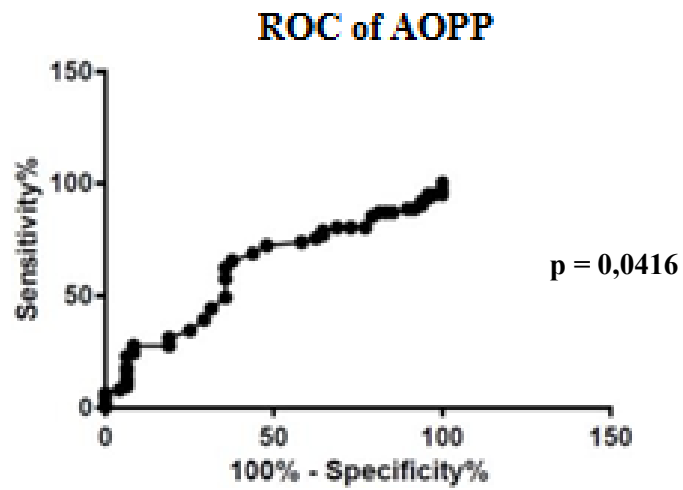


Figura 16: Curva ROC di AOPP.

	ROS (mediana, IQR)	FRAP (mediana IQR)	TBARs (mediana, IQR)	AOPP (mediana,IQR)	ORAC cell (mediana, IQR)
IBD (41)	35,2 (25-79,6)	202 (182-216)	8,8 (7,9-11,5)	6,6 (6,0-7,2)	1246 (828-6315)
Controlli (22)	37,5 (26,8-50,5)	230 (185,5-24.3)	8,35 (7,35-11)	5,9 (4,9-6,3)	5851 (3611-7886)
p value	0,6119	0,1433	0,4805	0,0049	0,0016

Tabella 9: valori di ROS, FRAP, TBARs, AOPP ed ORAC nei due gruppi di studio

	ETÀ	GENERE	CD-UC	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIA BIOLOGICA	DURATA TERAPIA BIOLOGICA
<i>FRAP</i>	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
<i>ROS</i>	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
<i>AOPP</i>	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
<i>TBARs</i>	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
<i>ORAC cell</i>	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: Analisi di correlazione: caratteristiche pazienti IBD e ROS, FRAP, AOPP e ORAC

6.6 Attività enzimi antiossidanti

L'attività di SOD, CAT, GPX e GR è stata valutata a livello intracellulare nei bambini con IBD e nei rispettivi controlli. Come mostrato dalla Figura 17 e in Tabella 11, nel gruppo IBD l'attività di CAT e GPX è risultata aumentata e statisticamente significativa (p value CAT= 0,0137; p value GPX=0,049). Al contrario nelle attività di SOD e GR non si rilevano differenze significative tra i due gruppi.

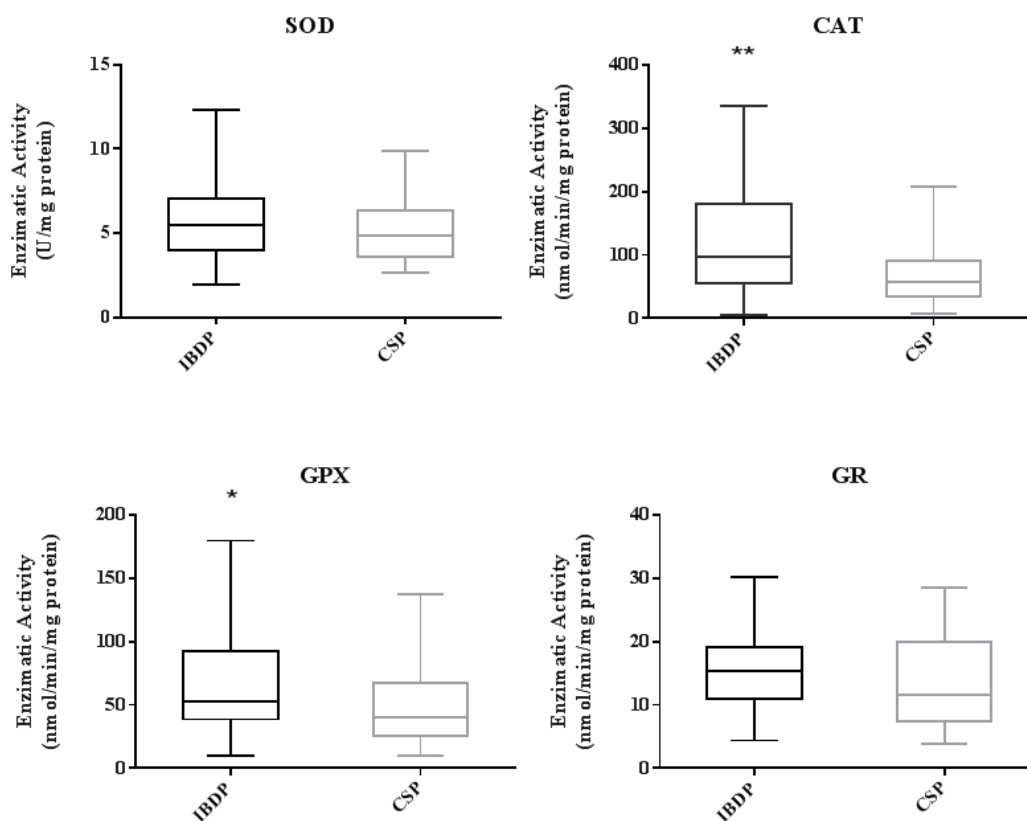


Figura 17: Attività degli enzimi antiossidanti intracellulari nei due gruppi.

	GR (mediana, IQR)	GPX (mediana, IQR)	SOD (mediana, IQR)	CAT (mediana, IQR)
IBD (41)	15,3 (10,9-19,1)	53,1 (38,5-91,9)	5,4 (3,9-6,9)	97,1 (55-181)
Controlli (22)	13,1 (7,4-21)	40,5 (25,2-67,5)	4,9 (3,6-6,3)	57,2 (34,9-90,9)
p value	0,38	0,049	0,34	0,013

Tabella 11: Attività enzimatica GR, GPX, SOD e CAT.

6.7 Livelli di GSH

Il GSH totale analizzato nella popolazione pediatrica non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i casi e controlli (mediana (IQR) 13,1 (8,4-15,8) vs 12,8 (7,6-20,6), $p=0.73$ (Figura 18).

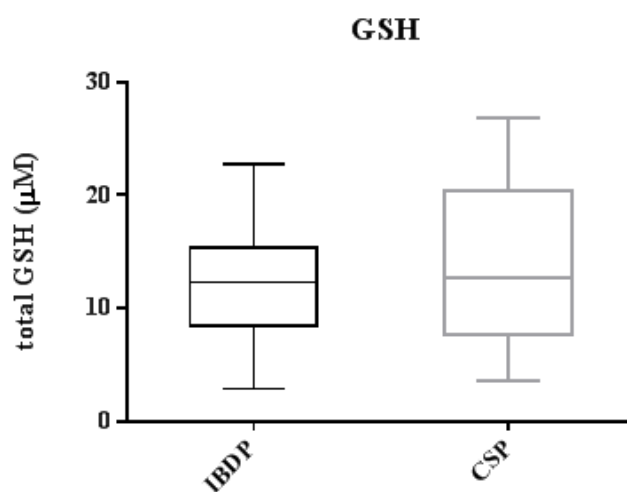


Figura 18: GSH totale nei casi e controlli

6.8 Oxidative score

E' stato inoltre calcolato uno score ossidativo per il gruppo IBD relativo ai valori plasmatici dei biomarkers TBARs, AOPP, ORAC e FRAP; 10 pazienti ottengono uno score lieve (punteggio 0-4), 24 uno score moderato (punteggio totale 5-8) e 5 uno score grave (punteggio totale 9-12) (Figura 19).

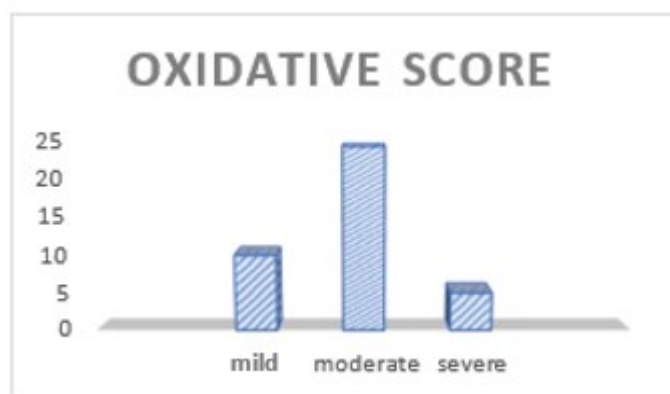


Figura 19: Distribuzione dei casi pediatrici IBD per oxidative score

All'analisi univariata l'oxidative score risulta maggiore nei pazienti non trattati con terapia biologica ($p= 0,0079$) e non si evidenziano correlazioni con l'età, il tipo di malattia, l'attività di malattia, e con i livelli di calprotectina fecale (tabella 12).

	ETÀ	GENERE	CD-UC	ATTIVITÀ DI MALATTIA	TERAPIA BIOLOGICA	CALPROTECTINA >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 12: Analisi di correlazione tra oxidative score e le caratteristiche cliniche nel gruppo *IBD*

Capitolo VII: DISCUSSIONE

Un numero crescente di evidenze sperimentali identificano lo stress ossidativo come un potenziale meccanismo patogenetico implicato nello sviluppo e nella progressione delle IBD; pertanto lo stress ossidativo, non è considerato solo una semplice conseguenza dell'infiammazione cronica, ma un potenziale fattore fondamentale per lo sviluppo ed il mantenimento dello stato infiammatorio e dell'abnorme risposta immunitaria che caratterizza le IBD.

Tra le caratteristiche delle IBD viene infatti spesso riportato uno squilibrio redox dovuto ad una maggiore produzione di specie reattive (ROS e RNS) e ad una riduzione della capacità antiossidante enzimatica e non enzimatica [64, 66]. Tuttavia, il numero di studi pediatrici in merito è esiguo e non sempre si riscontrano dati concordanti.

Il presente studio ha valutato il livello di squilibrio redox, misurato dalla determinazione della capacità antiossidante totale non enzimatica del plasma (TAC) e dai livelli di ROS, dai prodotti ossidazione lipidica e proteica (TBARs e AOPP) e dall'attività dei principali enzimi antiossidanti (SOD, CAT, GPX, GR), in bambini e adolescenti affetti da IBD, rispetto ad un gruppo di controllo.

Il principale risultato di questo studio è una significativa diminuzione della capacità antiossidante totale (TAC) determinata come capacità di assorbimento

dei radicali liberi dell'ossigeno (**ORAC**) nel gruppo dei pazienti IBD rispetto ai controlli. Kawakami *et al.* [95] hanno riportato una riduzione del dosaggio plasmatico di ORAC negli adulti UC rispetto a controlli sani, ma non sono presenti in letteratura dati relativi a ORAC intracellulare nelle IBD pediatriche.

Si può ipotizzare che a livello cellulare, la riduzione di ORAC nel gruppo IBD osservata possa rivelare un insulto ossidativo che supera la capacità antiossidante dei composti enzimatici e non enzimatici di difesa.

Inoltre, l'analisi ROC ha evidenziato, per questo biomarcatore di ossidazione, una buona capacità discriminante per IBD, tuttavia, il suo valore prognostico rimane ancora sconosciuto.

Anche la capacità antiossidante totale plasmatica (TAC) espressa come capacità ferro-riducente del plasma (**FRAP**) è risultata ridotta nei pazienti IBD rispetto al gruppo di controllo, anche se non in maniera significativa; 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 [96].

I valori di FRAP sono correlati 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 mostrato in altri studi [97,98].

Tale biomarker, misura della capacità antiossidante totale, è la somma del contributo di antiossidanti di natura idrofilica endogeni (es. acido urico, bilirubina, albumina, etc) ed esogeni (farmaci e di derivazione alimentare), quindi variabile rispetto alla complessità della malattia, ma anche rispetto al tipo di terapia, alle abitudini alimentari o all'uso di integratori [92]. Inoltre, la mancanza di significatività, pur essendoci la tendenza alla diminuzione, potrebbe esser dovuta alla diversa numerosità campionaria nel gruppo di controllo.

Nel contributo al danno ossidativo, la produzione di **ROS** è comparabile tra i due gruppi di studio e nel gruppo IBD, non correlata con le caratteristiche del paziente, il tipo e l'attività della malattia o la terapia. Lo studio di Beltran, *et al.* [99] riporta un aumento significativo di ROS in diversi tipi di cellule immunitarie periferiche durante il CD attivo e un ritorno ai livelli di controllo quando la malattia diventa inattiva. Ciò potrebbe giustificare i risultati ottenuti in quanto nel presente studio la maggior parte dei pazienti arruolati era in fase di remissione o in una condizione di malattia lieve.

Il secondo importante risultato emerso dallo studio è un significativo aumento dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (**AOPP**) nei pazienti con IBD rispetto ai controlli sani. Numerose sono le evidenze sperimentali che

confermano questo dato [100]. Gli AOPP sono considerati marcatori affidabili di danno ossidativo a carico delle proteine, ed essendo formati principalmente da proteine plasmatiche con composti clorurati derivanti dall'attività della mieloperossidasi (MPO), sono considerati anche mediatori dello stato infiammatorio [101].

Come precedentemente riportato da Luceri *et al.* [92] e come evidenziato dall'analisi ROC, gli AOPP potrebbero essere considerati buoni markers di malattia infiammatoria intestinale, soprattutto nei pazienti con CD, in cui possono assumere anche un valore prognostico [102].

La determinazione dei prodotti di perossidazione lipidica come sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (**TBARs**) non mostra differenze significative tra i valori ottenuti nel gruppo dei pazienti e nel gruppo di controllo. Tali dati si discostano da altri studi che riportano invece elevati livelli di perossidazione lipidica, in particolare in fase attiva della malattia [103]; tuttavia la maggior parte dei pazienti IBD arruolati nel nostro studio era in fase di remissione (63%) e tale condizione potrebbe spiegare, come per i ROS, i livelli circolanti ridotti di TBARs riscontrati.

Un ulteriore risultato emerso dal nostro studio è l'aumento statisticamente significativo dell'attività enzimatica di **CAT** e **GPX** nei pazienti IBD rispetto

ai controlli in accordo con Dincer *et al.* [104]. In letteratura i dati in merito sono contrastanti e per la maggior parte riferiti a soggetti adulti, come nello studio di Mrowicka *et al.* [105] che descrive una riduzione dell'attività della CAT nei pazienti IBD rispetto ai controlli e di Achitei *et al.* [103] che invece evidenziano un'attività di GPX aumentata in pazienti con malattia attiva e valori significativamente più bassi nei pazienti in remissione, rispetto al gruppo di controllo. Non sono disponibili invece dati per la popolazione IBD pediatrica.

L'attività della SOD risulta lievemente aumentata nei bambini IBD rispetto ai controlli, anche se tale dato non assume un significato statistico; la tendenza al lieve aumento osservata nel gruppo IBD potrebbe essere legata alla fase di remissione in cui si trovava maggior parte dei soggetti indagati. Alcuni studi riportano infatti un aumento dell'attività di SOD in pazienti con infiammazione intestinale attiva, a differenza dei pazienti IBD in remissione, che mostrano invece valori ridotti di attività enzimatica [105,106].

L'aumento significativo dell'attività enzimatica degli enzimi intracellulari, in particolare della CAT e di GPX, potrebbero suggerire dei meccanismi up-regolatori di difesa endogena antiossidante: le cellule aumenterebbero l'espressione di geni enzimatici antiossidanti e, di conseguenza, l'attività di tali enzimi antiossidanti intracellulari [77,78,107].

Occorre inoltre considerare come discusso da Pereira *C et al.* [108] che l'espressione degli enzimi è soggetta a variazione del polimorfismo e quindi livelli di attività potrebbero essere influenzati su base individuale. Ogni volta che sono coinvolte variazioni del genotipo, gli studi richiedono campioni numericamente importanti per ottenere evidenze statisticamente valide.

I livelli di GSH misurati nel gruppo IBD sono comparabili con quelli dei controlli sani, in contrasto con dati della letteratura che riportano livelli di GSH più elevati nelle IBD, sia negli adulti [109] che in ambito pediatrico [110]. Sido *et al.* [111] e Szczeklik *et al.* [97] hanno invece evidenziato una deplezione di GSH, rispettivamente nella mucosa intestinale e nel plasma di pazienti affetti da IBD.

Infine, in modo simile a quello descritto da Luceri *et al.* [92], è stato attribuito a ciascun paziente IBD un punteggio ossidativo che considera complessivamente lo stato ossidativo-antiossidante; per la maggior parte dei pazienti si è ottenuto un punteggio lieve e tale score risulta correlato all'assenza di terapia biologica. Questo dato potrebbe essere più preciso aggiungendo altri biomarcatori ossidativi nella valutazione del punteggio ossidativo totale.

Nell'interpretazione dei nostri dati vanno tenute in considerazione alcune limitazioni presenti nel nostro studio: la ridotta dimensione campionaria, riferita soprattutto al gruppo di controllo, e l'esiguo numero di misurazioni effettuate in pazienti in fase attiva (moderata/severa) di malattia e all'esordio, che sono necessarie per convalidare l'importanza dei marcatori di stress ossidativo in ambito clinico.

Una seconda fase di studio, attualmente in corso in un sottogruppo di pazienti IBD pediatrici, valuterà l'efficacia di un trattamento dietetico antiossidante di 12 settimane rispetto ad una dieta standard non solo sui biomarkers di stress ossidativo, ma anche sull'indice di attività della malattia.

Diversi studi scientifici hanno infatti dimostrato un miglioramento dello squilibrio redox dopo l'associazione di una dieta antiossidante alla terapia convenzionale [100].

Capitolo VIII: CONCLUSIONI

I dati preliminari ottenuti da questo studio mostrano che la capacità antiossidante totale, l'AOPP, il test ORAC e le attività degli enzimi antiossidanti sono significativamente alterati nei bambini con malattia infiammatoria intestinale, ulteriore conferma che lo stress ossidativo è coinvolto nella patogenesi e nella progressione del processo infiammatorio sostenuto nelle IBD.

La riduzione della capacità antiossidante totale (TAC) può essere una conseguenza dello stato infiammatorio determinato dalla malattia ma potrebbe anche essere interpretata come un fattore eziopatogenetico nello sviluppo delle IBD.

Inoltre, i parametri ossidativi, in particolare AOPP e ORAC, potrebbero essere utili biomarcatori per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con IBD.

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

BIBLIOGRAFIA

- [1] 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
- [2] Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 2009 19;361(21):2066-78.
- [3] Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*, 2014;94(2): 329–354..
- [4] Halme L, Paavola-Sakk P, Turunen et al., Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(23): 3668.
- [5] Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(8):942-51
- [6] Fuller MK. Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Special Considerations. *Surg Clin North Am.* 2019;99(6):1177-1183
- [7] 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.
- [8] Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1504-17.
- [9] 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.
- [10] Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE. et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1114-22.

- [11] Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, et al. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(12):2558-65.
- [12] Daiss W, Scheurlen M, Malchow H. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tübingen (West Germany). *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:39-43.
- [13] Langholz E, Munkholm P, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987. *Scand J Gastroenterology* 1991; 26(12), 1247–1256.
- [14] Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi AG, D' Albasio G, et al. A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol* 1996;31:892–9.
- [15] G. Monteleone, D. Fina, R. Caruso, and F. Pallone, New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease, *Current Opinion in Gastroenterology*, 2006;22(4):361-4.
- [16] A. Kaser, S. Zeissig, and R. S. Blumberg, “Inflammatory bowel disease,” *Annual Review of Immunology*, vol. 28, 2010.
- [17] Shuk-Mei H, James DL et al. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(Suppl 2): S13–S23
- [18] M. Mehta, S. Ahmed, and G. Dryden, Immunopathophysiology of inflammatory bowel disease: how genetics link barrier dysfunction and innate immunity to inflammation. *Innate Immunity*, 2017;23(6):497-505.
- [19] T. C. Liu and T. S. Stappenbeck, “Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease,” *Annual Review of Pathology*, vol. 11, 2016.
- [20] P. L. Lakatos, Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress?, *Dig Dis*. 2009;27(3):215-25.
- [21] Hibi T and Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2006;41(1):10-6.

- [22] Dolan KT and Chang EB. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017.
- [23] Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH. et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013;62(4):630-49.
- [24] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(33):14691-6.
- [25] Muegge B.D, Kuczynski J, Knights D. et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011;332(6032):970-4
- [26] Ho SM, Lewis JD, Mayer EA et al., Challenges in IBD research: environmental triggers. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(Suppl 2):S13-S23.
- [27] Guo X, Wang WP, Ko JK, and Cho CH, "Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats," *Gastroenterology* 1999;117(4):884-92.
- [28] Wang H, Yu M, Ochani M et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 2003.
- [29] Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G et al., The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol*. 2017;241(2):146-158.
- [30] Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:S3–S9.
- [31] Marusawa H, Jenkins BJ. Inflammation and gastrointestinal cancer: an overview. *Cancer Lett*. 2014; 345: 153–156
- [32] Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen species: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol* 2014;9:119-45.

- [33] Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE et al. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.
- [34] Levine A, Koletzko S, Turner D. et al. ESPGHAN revised Porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(6):795-806.
- [35] Levine A, Griffiths A, Markowitz J. et al. Pediatric modification of the Montreal classification of Inflammatory bowel disease: The Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1314-21.
- [36] Hyamas JS, Ferry GD, Mandel FS et al. Development and validation of pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991;12(4):439-47.
- [37] Macfarlane PI, Miller V, Wells F et al. Laboratory assessment of disease activity in childhood Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1986;5(1):93-6.
- [38] Rutgeerts P., Vermeire S., VannAssche G. Biological therapies for inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 2009; 136(4):1182-1197
- [39] Kulkarni AC, Kuppusamy P, Parinandi N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(10):1717-30.
- [40] Gospodaryov D, Lushchak V. Oxidative stress: cause and consequence of diseases. In: Lushchak DV, ed. *Oxidative Stress and Diseases.* InTech; 2012.
- [41] Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K et al. Lipid peroxidation markers in Crohn's disease: the associations and diagnostic value. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):1359-66.
- [42] Thomas AG, Miller V, Shenkin A et al. Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;19:213-9.

- [43] Bourgonje AR, Feelisch M, Faber KN Pasch A, Dijkstra G, van Goor H, Oxidative Stress and Redox- Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Mol Med* 2020; 26: 1034–1046
- [44] Ulrich K, Jakob U et al. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019; 140:14-27
- [45] Venturini D, Simão A.N. 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.
- [46] Yildirim A, Mavi A, Oktay M et al . Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argente a Des fex DC*), sage (*Salvia trilobal.*), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem*. 2000;48(10):5030-4.
- [47] Dryden GW Jr, Deaciuc I, Arteel G, et al. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr Gastroenterol Rep*. 2005;7(4):308-16.
- [48] Alemany-Cosme, E., Sáez-González E., Moret, I. et al. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Crohn’s Disease and the Interconnection with Immunological Response, Microbiota, External Environmental Factors, and Epigenetics. *Antioxidants* 2021, 10, 6438
- [49] Malstrom B, Andreasson L and Reinhammer B in “The Enzymes”. Boyer editor XIIB Academic Press, New York 533 (1975)
- [50] Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K et al. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*. 1994;269(29):19163-6.
- [51] Marklund S. Distribution of Cu-Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980;492:19-23.
- [52] Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1481–1495.
- [53] Wingler K, Muller C, Schmehl K et al. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology*. 2000;119(2):420-30.

- [54] Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene*. 2012;501: 89–103.
- [55] Carlberg I and Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90.
- [56] Arias IM, Jakoby WB. *Glutathione: Metabolism and function*. Raven Press, New York (1976).
- [57] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4: 89–96.
- [58] Moret-Tatay, I.; Iborra, M.; Cerrillo, E.; Tortosa, L.; Nos, P.; Beltrán, B. Possible Biomarkers in Blood for Crohn's Disease: Oxidative Stress and MicroRNAs-Current Evidences and Further Aspects to Unravel. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2016; 2016, 232:51-62
- [59] Moret, I.; Cerrillo, E.; Navarro-Puche, A. et al. Oxidative stress in Crohn's disease. *Gastroenterol. Hepatol*. 2014, 37, 28–34,
- [60] 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.
- [61] Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, et al. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1375-83.
- [62] Banan A, Choudhary S, Zhang Y et al. Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(3):1075-85.
- [63] Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(10):1226-35.

- [64] Balmus, I.; Ciobica, A.; Trifan, A.; Stanciu, C. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. *Saudi J. Gastroenterol.* 2016; 22: 3
- [65] Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A. Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci* 2008;53: 2208–2214.
- [66] Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2003;201:17–27.
- [67] Durak I, Yasa MH, Bektas A, et al. Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology.* 2000;47:1015–1017.
- [68] Tu"zu"n A, Erdil A, Inal V, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *ClinBiochem.* 2002;35:569–572.
- [69] 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
- [70] Bourgonje, A.R.; von Martels, J.Z.H.; Bulthuis, M.L.C et al. Crohn's Disease in Clinical Remission Is Marked by Systemic Oxidative Stress. *Front. Physiol.* 2019; 10: 499.
- [71] Catalá, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 2009; 157: 1–11
- [72] Dean, R.T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997; 324 Pt 1: 1–18
- [73] Sedelnikova, O.A.; Redon, C.E.; Dickey, J.S et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res.* 2010; 704: 152–159
- [74] 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
- [75] Wingler K, Muller C, Schmehl K et al. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology.* 2000;119(2):420-30.

- [76] Kruidenier, L.; Kuiper, I.; van Duijn, W.; Marklund, SL; van Hogezaand, RA; Lameri, CB; Verspaget, HW Espressione mucosale differenziale di tre isoforme del superossido dismutasi nella malattia infiammatoria intestinale. *J. Pathol.* 2003, 201.
- [77] Squadrito, G.L.; Pryor, W.A. The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 718–719.
- [78] Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int. J. Health Sci.* 2018, 12, 88–93.
- [79] Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2003;201:17–27.
- [80] Durak I, Yasa MH, Bektas A, et al. Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology.* 2000;47:1015–1017.
- [81] Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; vol. 39, no. 1: 44–84
- [82] Patel RP, McAndrew J, Sellak H, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1999.
- [83] Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987).
- [84] Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 298–306, 2011
- [85] Marrocco I, Altieri F and Peluso I Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046.
- [86] B. C. Sousa, A. R. Pitt, and C. M. Spickett, “Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds,” *Free Radical Biology & Medicine*, 2017, Epub ahead of print.

- [87] E. L. Taylor, K. R. Armstrong, D. Perrett, A. T. Hattersley, and P. G. Winyard, "Optimisation of an advanced oxidation protein products assay: its application to studies of oxidative stress in diabetes mellitus," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 496271, 2015.
- [88] C. M. Gedik, A. Collins, and Escodd, "Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 1, pp. 82–84, 2005.
- [89] C. Vives-Bauza, A. Starkov, and E. Garcia-Arumi, "Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase," *Methods in Cell Biology*, vol. 80, pp. 379–393, 2007.
- [90] L. Flohe and W. A. Gunzler, "Assays of glutathione peroxidase," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 114–121, 1984.
- [91] Serafini M, Villano D, Spera G, Pellegrini N Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr Cancer*. 2006;56(2):232-40.
- [92] Luceri C, Bigagli E, Agostiniani S et al. Analysis of oxidative stress-related marker in Crohn disease patients at surgery and correlations with clinical findings. *Antioxidant* 2019;8:378.
- [93] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998;161(5):2524– 2532.
- [94] Bradford M, *Anal Biochem* 1976;72:248]
- [95] Kawakami Y, Okada H, 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.
- [96] Koutroubakis I.E, Malliaraki N, Dimoulios P.D. et al. Decreased Total and Corrected Antioxidant Capacity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 49, 1433–1437 (2004);

- [97] Szczeklik K, Krzyściak W, Cibo 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
- [98] 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
- [99] Belen Beltr an, MD, PhD, Pilar Nos, MD, Francisco Dasi´, Marisa Iborra, MD, Guillermo Bastida, MD, Marcial Mart´inez, PhD,k Jose-Enrique O’Connor, PhD, Guillermo Saez, MD, PhD, In es Moret, and Julio Ponce, MD, Mitochondrial Dysfunction, Persistent Oxidative Damage, and Catalase Inhibition in Immune Cells of Nai`ve and Treated Crohn’s Disease; *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:76–86.
- [100] Koláček M, Muchová J, Dvořáková M. et al. Effect of natural polyphenols (Pycnogenol) on oxidative stress markers in children suffering from Crohn's disease--a pilot study. *Free Radic Res.* 2013 Aug;
- [101] Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I. et al. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Jun;
- [102] 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
- [103] Achitei D, Ciobica A, Balan G, et al. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and nonactive inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci.* 2013; 58: 1244–1249
- [104] 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
- [105] Mrowicka M. Mrowicki J. Milk M. et al Association between SDO1, CAT, GSHPX1 polymorphism and the risk of inflammatory bowel disease in the Polish population. *Oncotarget.* 2017

- [106] Krzystek-Korpacka M., Kempinski R, Bromke M.A. et al. Oxidative Stress Markers in Inflammatory Bowel Diseases: Systematic Review. *Diagnostics* 2020; 10: 6012],
- [107] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2003.
- [108] Cristiana Pereira, BSc, Daniela Grácio, MSc, João P. Teixeira, and Fernando Magro, MD, PhD. Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease, *Inflamm Bowel Dis* Volume 21, Number 10, October 2015
- [109] Tüzün A., Erdil A., Inal V. et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem.* 2002; 35(7):569-72
- [110] Pavlick K.P., Laroux S., Fuseler J. et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med.* 2002: 33(3):311-22
- [111] Sido B., Hack V., Hochlehnert A. et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998; 42: 485–495