ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ- ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ- ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τίτλος Εργασίας: Επίπεδα προϊόντων προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs) στον ορό ασθενών με νόσο του Crohn

Διπλωματική Εργασία

Όνομα φοιτητή: Νικόλαος Καλάκος

Αθήνα, 2020

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ- ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ- ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Παπανικολάου (Επιβλέπων)
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ανδριάνα Καλιώρα
Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Μπάμιας
Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ο Νικόλαος Καλάκος

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Γεώργιο Παπανικολάου και την καθηγήτρια κυρία Ανδριάνα Καλιώρα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην συγκεκριμένη μελέτη και για την άψογη συνεργασία μας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Χαραλαμπία Αμερικάνου για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε, τόσο στο θεωρητικό, όσο και στο ερευνητικό τμήμα της διατριβής και την άμεση απόκριση σε οποιαδήποτε απορία παρουσιάστηκε στην πορεία για την διεκπεραίωση της.

Εν κτακλείδι, δεν θα ήθελα να παραλείψω την σύζυγό μου για την βοήθειά της στη διαμόρφωση της εργασίας και τους γονείς μου για την συνεχή τους υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....σ. 8
Περίληψη στα Αγγλικά.....σ. 10
Κατάλογος Εικόνων.....σ. 12
Κατάλογος Πινάκων.....σ. 13
Συντομογραφίες.....σ. 14
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος
Κεφάλαιο 1: Η νόσος του Crohn (NC).....σ. 17
1.1. Ο ορισμός της NC .....σ. 17
1.2. Η επιδημιολογία της NC.....σ.17
1.3. Η παθογένεια της NC.....σ. 18
1.3.1. Γενετική και NC.....σ. 20
1.3.2. Ανοσολογικοί παράγοντες και NC.....σ.20
1.3.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και NC.....σ. 21
1.3.4. Οξειδωτικό στρες και NC.....σ. 23
1.4. Η κλινική εικόνα της NC.....σ. 27
1.5. Η διάγνωση της NC.....σ. 28
1.6. Αξιολόγηση της ενεργότητας της NC.....σ. 29
1.7. Η θεραπεία της NC.....σ. 30
Κεφάλαιο 2: Προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs).....σ. 31
2.1. Ο ορισμός των AOPPs.....σ. 31
2.2. Ο σχηματισμός των AOPPs.....σ.31
2.3. Ο ρόλος των AOPPs.....σ. 34
2.3.1. Μηχανισμοί δράσης των AOPPs.....σ. 34
2.3.2. Μηχανισμοί δράσης των AOPPs στη NC.....σ. 38
2.4. Η κλινική σημασία των AOPPs.....σ. 40
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος
Κεφάλαιο 3: Ερευνητικό πρωτόκολλο.....σ.42
3.1. Ο σκοπός της έρευνας.....σ. 42
3.2. Ο σχεδιασμός της έρευνας.....σ. 42
3.3. Κριτήρια ένταξης/ αποκλεισμού.....σ.43
3.4. Η αξιολόγηση των ασθενών.....σ. 44
3.5. Η αρχή της μεθόδου ELISA.....σ.46
3.5.1. Ανταγωνιστικού τύπου ELISA.....σ. 46
3.6. Το πρωτόκολλο ELISA.....σ.47
3.6.1. Αναλυτική περιγραφή πειράματος.....σ. 49

3.7. Στατιστική ανάλυση.....σ. 50

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα- Συζήτηση.....σ. 51

Βιβλιογραφία.....σ. 68

Περίληψη

Η νόσος του Crohn (NC), η οποία ανήκει στα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, αποτελεί μία άγνωστης αιτιολογίας, πολυπαραγοντική, φλεγμονώδη νόσο του γαστρεντερικού συστήματος με εξάρσεις και υφέσεις. Μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε σημείο του γαστρεντερικού σωλήνα, από τη στοματική κοιλότητα έως τον πρωκτό και χαρακτηρίζεται από τη διατοιχωματική βλάβη του τοιχώματος του εντέρου με διαστήματα υγιούς ιστού, εξωεντερικές εκδηλώσεις και σοβαρές επιπλοκές.

Μεταξύ των πιθανών μηχανισμών που συμβάλλουν στην παθογένεια της NC περιλαμβάνεται το οξειδωτικό στρες. Τα προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs) αποτελούν προϊόντα της οξείδωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος από την επίδραση του υποχλωριώδους οξέος της μυελοπεροξειδάσης των μακροφάγων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Έχουν συσχετισθεί με φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η χρόνια νεφρική νόσος και η καρδιαγγειακή νόσος και χαρακτηρίζονται από προφλεγμονώδεις ιδιότητες οδηγώντας σε ιστικές βλάβες, φλεγμονή των ιστών και επιδείνωση του οξειδωτικού στρες.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των επιπέδων των AOPPs στον ορό των ασθενών με NC με τη μέθοδο της ανταγωνιστικού τύπου δοκιμασίας ενζυμο-συζευγμένης ανοσοπροσρόφησης και η διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων τους με άλλους παράγοντες, όπως το φύλο, την ηλικία, την ενεργότητα και την εντόπιση της νόσου, το κάπνισμα, τους δείκτες οξείδωσης και φλεγμονής.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν, ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών με NC σε έξαρση και σε ύφεση με τους υγιείς εθελοντές. Τα επίπεδα των AOPPs του ορού φαίνεται να σχετίζονται με την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού ($r=0.369$, $p=0.008$) και την LDH (-0.322, $p=0.027$) των ασθενών με NC, το HBI ($r=0.420$, $p=0.037$) και την αντιοξειδωτική ικανότητα ($r=0.547$, $p=0.007$) του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση και οι σχέσεις αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές, όταν περιγράφτηκαν με μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης ($p<0.05$). Τα επιπέδα των AOPPs του ορού συσχετίσθηκαν με την IL-6 ($r=-0.277$, $p=0.047$) και τη CRP ($r=-0.311$, $p=0.026$) των ασθενών με NC, με τον ΔΜΣ ($r=-0.391$, $p=0.044$) των ασθενών με NC σε έξαρση και με το IBDQ ($r=-0.397$, $p=0.049$) των ασθενών με NC σε

ύφεση. Ωστόσο, έπειτα από εφαρμογή μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης οι παραπάνω σχέσεις χάθηκαν.

Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των AOPPS στον ορό των ασθενών με NC. Η συσχέτιση των AOPPs του ορού των ασθενών με NC με το χρόνο αντίστασης του ορού, είναι πιθανό να αντανακλά την αυξημένη προσπάθεια του οργανισμού των ασθενών με NC να αυξήσει την αντιοξειδωτική του ικανότητα, ενώ, παράλληλα, μπορεί να οφείλεται στη δράση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στα μακροφάγα και πιο συγκεκριμένα, στο μεταγραφικό παράγοντα NF-Κβ. Η σχέση των AOPPs του ορού με τον δείκτη HBI και την LDH αφορά την ενεργότητα της νόσου και την ιστική βλάβη. Η αδυναμία συσχέτισης των AOPPs του ορού των ασθενών με NC με άλλες μεταβλητές, καθιστά αναγκαία την διενέργεια περισσότερων μελετών για την ερμηνεία του ρόλου των AOPPs τους στη NC.

Λέξεις κλειδιά: ΙΦΝΕ, νόσος Crohn, προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs), οξειδωτικό στρες

Abstract

Crohn's disease (CD) is a type of inflammatory bowel disease (IBD) with unknown etiology. CD is also a multifactorial inflammatory disease of the intestines that is marked by remission and relapses. In CD any part of the digestive tract can be affected (from the oral cavity to the anus). CD is characterized by transmural inflammation of the gastrointestinal tract, skip lesions, extraintestinal manifestations and severe complications.

Oxidative stress is one of the possible factors that contributes to the pathogenesis of the CD. Advanced oxidation protein products (AOPPs) are products of oxidation of plasma proteins that derive from the interaction of hypochlorous acid of macrophages' myeloperoxidase, under oxidative stress conditions. AOPPs have been related with inflammatory conditions such as chronic renal disease and cardiovascular disease. AOPPs are characterized by proinflammatory properties and contribute to tissue damage, tissue inflammation and progression of oxidative stress.

The aim of this study is the evaluation of AOPPs levels in the serum of CD patients, using competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay and to investigate its relationship with other factors such as gender, age, disease activity, disease location, smoking, oxidation indexes and inflammatory indexes.

The results of the study showed that there are no statistically significant differences of AOPPs levels in the serum of CD patients with relapse, CD patients with remission and healthy people. AOPPs levels in the serum are related with total antioxidant capacity of serum (LagTime) ($r=0.369$, $p=0.008$) and LDH (-0.322, $p=0.027$) in CD patients, HBI ($r=0.420$, $p=0.037$) and LagTime ($r=0.547$, $p=0.007$) in CD patients with remission. These relations remained statistically significant after the application of regression analysis models ($p<0.05$). AOPPs levels in the serum were related with IL-6 ($r=-0.277$, $p=0.047$) and CRP (r—0.311, $p=0.026$) in CD patients, with BMI ($r=-0.391$, $p=0.044$) in CD patients with relapse and with IBDQ ($r=-0.397$, $p=0.049$) in CD patients with remission. Although after the application of regression analysis models, these relations were not statistically significant.

In conclusion, in this study, we didn't find increased AOPPs levels in the serum of CD patients. The relation of AOPPs levels in the serum of CD patients with LagTime possibly reflects the increased effort of CD patients to increase the antioxidant capacity of the serum. Moreover, this relation could

be explained from the inhibitory activity of oxidative LDL in the transcription factor NF-κB of macrophages. The relations of AOPPs in the serum of CD patients with HBI and LDH, perhaps concerns the role of AOPPs in CD activity and tissue damage. The lack of relation of AOPPs levels in CD patients with other variables, leads to the need for future research.

Keywords: IBD, Crohn disease, Advanced oxidation protein products (AOPPs), oxidative stress

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ. 1: Τα ΙΦΝΕ ως πολυπαραγοντική διαταραχή…….....σ. 19

Εικ. 2: Σχηματική απεικόνιση της ανταγωνιστικού τύπου ELISA…….....σ. 48

Εικ. 3: Πρότυπη καμπύλη λογαριθμικής συγκέντρωσης ανθρώπινων AOPPs…….....σ. 49

Εικ. 4: Διάγραμμα ροής του πληθυσμού της μελέτης ..... σ. 51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν. 1: Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού στη μελέτη.....σ. 44

Πίν. 2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....σ. 52

Πίν. 3: Εργαστηριακά και βιοχημικά αποτελέσματα του πληθυσμού της μελέτης.....σ. 53

Πίν. 4: Αποτελέσματα δεικτών φλεγμονής ορού και κοπράνων του πληθυσμού της μελέτης....σ. 54

Πίν. 5: Αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες του πληθυσμού της μελέτης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.....σ. 54

Πίν. 6*:* Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με NC και των υγιών εθελοντών. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.....σ. 56

Πίν. 7: Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με NC σε ύφεση και έξαρση. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.....σ. 56

Πίν. 8: Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με NC σε ύφεση και έξαρση και των υγιών εθελοντών. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.....σ. 56

Πίν. 9: Συσχέτιση των επιπέδων AOPPs του ορού ασθενών με NC με τις μεταβλητές της μελέτης.....σ. 58

Πίν. 10: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με την IL-6, την CRP, την LDH και τον Lagtime σε ασθενείς με NC.....σ. 59

Πίν. 11: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με τον ΔΜΣ σε ασθενείς με NC σε έξαρση.....σ. 59

Πίν. 12: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με την IL-22, την CRP, το IBDQ, τον HBI και το Lagtime σε ασθενείς με NC σε ύφεση.....σ. 59

Πίν. 13: Συσχέτιση των επιπέδων CRP του ορού των ασθενών με NC σε έξαρση με την IL-6, το Ινωδογόνο, το δείκτη HBI, τη λακτοφερίνη και την καλπροτεκτίνη κοπράνων.....σ. 63

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθή φλεγμονώδη Νοσήματα του εντέρου
NC	Νόσος του Crohn
ΕΚ	Ελκώδης Κολίτιδα
AOPPs	Προϊόντα Προχωρημένης Οξείδωσης Πρωτεϊνών
ER	ενδοπλασματικό δίκτυο
ΜΣΑΦ	μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
Th	T helper cells, T βοηθητικά λεμφοκύτταρα
IFN-γ	ιντερφερόνη γ
TNF	παράγοντας νέκρωσης όγκων
NF-κB	πυρηνικός παράγοντας Κβ
IL	Ιντερλευκίνη
ICAM-1	μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης- 1
CSF-1	διεγερτικός παράγοντας αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων- 1
MCP-1	χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοπύρηνων-1
VCAM-1	αγγειακό μόριο προσκόλλησης- 1
PUFA	ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
APCs	αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
CMC	καρβοξυμεθυλ-κυτταρουλόζη
P80	πολυσορβικό 80
NO_2	Διοξείδιο του αζώτου
SO_2	Διοξείδιο του θείου
ROS	δραστικές μορφές οξυγόνου
O_2^-	ανιόν υπεροξειδίου
HO^-	ρίζα υδροξυλίου
$^1O_2$	οξυγόνο απλής κατάστασης
$RCOO^-$	ρίζα του οργανικού υπεροξειδίου
RNHCl	χλωραμίνες
OHCl	υποχλωριώδες οξύ
O_3	όζον
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
RNS	δραστικές μορφές αζώτου
NO	μονοξείδιο του αζώτου
$ONOO^-$	υπεροξυνιτρώδες ανιόν
NADPH οξειδάσες ή NOX	οξειδάσες του νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικού-δινουκλεοτιδίου
MPO	μυελοπεροξειδάση
COX	κυκλοξυγενάση
LOX	λιποξυγενάση

XO	οξειδάση της ξανθίνης
MAO	μονοαμινοξειδάση
NOS	συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
SOD	υπεροξειδικές δισμουτάσες
CAT	καταλάσες
GPXs	υπεροξειδάσες της γλουταθειονίνης
ROOH	Οργανικά υδροϋπεροξείδια
GSH	ανηγμένη γλουταθειονίνη
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ASK1	Κινάση ρύθμισης της απόπτωσης 1
MKK7	κινάση 7 της MAP κινάσης
JNK2	c-jun N- terminal κινάση-2
IKK	IκB κινάση
TKE	ταχύτητας καθίζησης των ερυθροκυττάρων
CRP	C αντιδρώσα πρωτείνη
CDAI	Δείκτης Ενεργότητας της NC
HBI	Δείκτης ενεργότητας Harvey & Bradshaw
IBDQ	Ερωτηματολόγιο των ΙΦΝΕ
PRO	Δείκτης εκτίμησης αποτελεσμάτων αναφερομένων από τον ασθενή
SES-CD	Απλό Ενδοσκοπικό σκορ της NC
CDEIS	Ενδοσκοπικός δείκτης σοβαρότητας της NC
anti-TNF παράγοντες	αντισώματα έναντι του παράγοντα νέκρωσης των όγκων
HOCl	υποχλωριώδες οξύ
XNN	χρόνια νεφρική νόσο
HSA	Αλβουμίνη ορού ανθρώπων
AOPP-HSA	AOPPs σχηματισμένα απο in vitro έκθεση της HSA σε HOCl
KAN	καρδιαγγειακή νόσος
MTs	πρωτεϊνική υπεροικογένεια των ματαλλοθειονινών
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
MAPK	MAP κινάσης
RSA	αλβουμίνη ορού ποντικών
AOPP-RSA	AOPPs σχηματισμένα απο in vitro έκθεση της RSA σε HOCl
TGF-β1	Παράγοντας αύξησης όγκων β1
EMT	επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση
AGEs	προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης
RAGE	υποδοχείς των προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C

AIF	κυτταρική απόπτωση
CKI	Αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LDH	Γαλακτική αφυδρογονάση
SGOT	Γλουταμική οξαλοξική τρανσαμινάση
SGPT	Γλουταμική πυροσταφυλική τρανσαμινάση
γ-GT	Γ-γλουταμυλοτρανσφεράση
ELISA	Δοκιμασία της Ενζυμο-συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης
CAL	Καλπροτεκτίνη
LYS	Λυσοζύμη
DEF	Ντιφενσίνη
LAC	Λακτοφερίνη
TMB	υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης
HRP	Υπεροξειδάση του φυτού Αρμοράκια
PBS	φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
LOGAOPPs	λογάριθμος των AOPPs
NK T κύτταρα	Τ κύτταρα φυσικοί φονείς
NADH	νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
$CuSO_4$	θειϊκός χαλκός
oxLDL	Οξειδωμένη LDL
GM-CSF	παράγοντας διέγερσης των μακροφάγων/ κοκκιοκυττάρων
rAOPPs	σχετικά AOPPs

ΜΕΡΟΣ Α': ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN (NC)

1.1 Ο ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ NC:

Τα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελούν μία κατάσταση χρόνιας φλεγμονής του εντέρου ιδιοπαθούς αιτιολογίας με εξάρσεις και υφέσεις, και περιλαμβάνουν δύο κύρια νοσήματα: τη νόσο του Crohn (NC) και την ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ) (Bernstein *et al.*, 2016). Η NC και η ΕΚ έχουν παρόμοια παθογένεια, κλινικά, ενδοσκοπικά, ακτινολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά, ωστόσο σημειώνονται σημαντικές διαφορές όσον αφορά την εντόπιση και την έκταση της φλεγμονής στη γαστρεντερική οδό (Gomollón *et al.*, 2017; Magro *et al.*, 2017). Η NC αποτελεί μία χρόνια ανοσο-μεσολαβούμενη φλεγμονώδης κατάσταση του εντέρου και μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε σημείο της γαστρεντερικής οδού, από την στοματική κοιλότητα έως τον πρωκτό, αλλά συνήθως εντοπίζεται στον τελικό ειλεό, στο κόλον ή και στα δύο τμήματα του εντέρου (ειλεοκολίτιδα) (GESA, 2018). Η φλεγμονή αφορά όλες τις στιβάδες του τοιχώματος του εντέρου (διατοιχωματική φλεγμονή), ενώ, αντίθετα με την ΕΚ, μεσολαβείται από τμήματα εντέρου που δεν φλεγμαίνουν (skip lesion) (Gomollón *et al.*, 2017; Magro *et al.*, 2017). 5-15% των ασθενών με ΙΦΝΕ του παχέος εντέρου έχουν χαρακτηριστικά και των δύο νοσημάτων (Mowat *et al.*, 2011). Όταν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σαφής διάκριση μεταξύ των δύο κύριων τύπων ΙΦΝΕ ή κολίτιδας άλλης αιτιολογίας, τότε η νόσος χαρακτηρίζεται ως αταξινόμητη ΙΦΝΕ (Magro *et al.*, 2017).

1.2 Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ NC

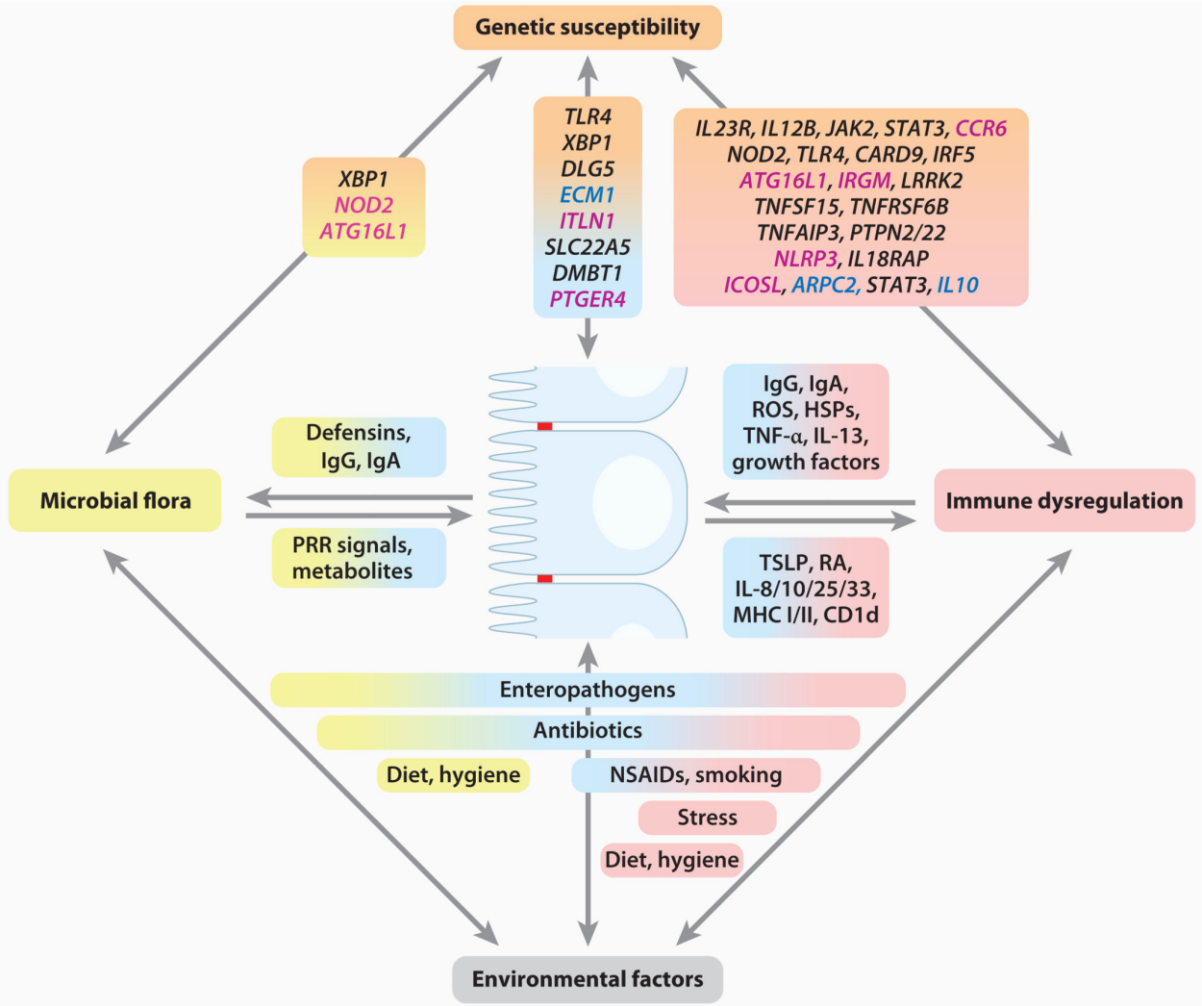
Τα ΙΦΝΕ μπορούν να διαγνωσθούν σε οποιαδήποτε ηλικία, ωστόσο τυπικά εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσής τους αποτελούν η τρίτη και η τέταρτη δεκαετία της ζωή (GESA, 2018). Ενώ, η επίπτωση της NC μειώνεται μετά την τρίτη δεκαετία της ζωής, η επίπτωση της ΕΚ είναι σταθερή μεταξύ της τρίτης και έκτης δεκαετίας (Bernstein *et al.*, 2016) και παρουσιάζει μια μικρή αύξηση την έκτη με έβδομη δεκαετία (Loftus, 2004). Η κατανομή των ΙΦΝΕ μεταξύ των φύλων είναι ίση για την ΕΚ, ωστόσο, παρατηρούνται περισσότερες γυναίκες με NC με τάση για εξίσωση της κατανομής μεταξύ των φύλων με την πάροδο των χρόνων (Bernstein *et al.*, 2016).

Ο επιπολασμός και η επίπτωση των ΙΦΝΕ φαίνεται να είναι υψηλότερα σε αστικές περιοχές των ανεπτυγμένων χωρών του Δυτικού κόσμου, μεταξύ των καυκάσιων και μεταξύ ατόμων εβραϊκής καταγωγής (Loftus, 2004; Bernstein *et al.*, 2016). Μάλιστα, παρατηρείται αύξηση της επίπτωσης των ΙΦΝΕ σε μετανάστες που προέρχονται από πληθυσμούς με χαμηλή επίπτωση, μετά την εγκατάστασή τους σε χώρες με αυξημένη επίπτωση των νοσημάτων (Bernstein *et al.*, 2016). Συστηματική ανασκόπηση του 2018 αναφέρει ότι ο επιπολασμός της NC στην Βόρεια Αμερική, στην Νότια Αμερική στην Βόρεια, Δυτική, Ανατολική και Νότια Ευρώπη, στην Ανατολική, Νότιο-ανατολική, Νότια και Δυτική Ασία και στην Αφρική κυμαίνεται 96,3-318,5/ 100.000 πληθυσμού, 0,9-41,4/ 100.000 πληθυσμού, 24-262/ 100.000 πληθυσμού, 28,2-322/ 100.000 πληθυσμού, 1,51-200/ 100.000 πληθυσμού, 4,5-137,17/ 100.000 πληθυσμού, 1,05-18,6/ 100.000 πληθυσμού, 2,17/ 100.000 πληθυσμού, 1,2/ 100.000 πληθυσμού, 50,6-53,1/ 100.000 πληθυσμού, και 19/ 100.000 πληθυσμού αντίστοιχα (Ng *et al.*, 2017). Τέλος, η επίπτωση της NC στις παραπάνω περιοχές είναι 6,3-23,82/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 3,5/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 11,4/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 1,85-10,5/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 0,4-14,6/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 0,95-15,4/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 3,2/ 100.000 ανθρωπο-έτη,, 0,14-0,41/ 100.000 ανθρωπο-έτη, 0,09-3,91/ 100.000 ανθρωπο-έτη,0,094-8,4/ 100.000 ανθρωπο-έτη και 5,87/ 100.000 ανθρωπο-έτη αντίστοιχα (Ng *et al.*, 2017). Ωστόσο, η πλειοψηφία των μελετών για την NC και την ΕΚ στην Β. Αμερική και στην Ευρώπη σημειώνει ότι η ετήσια επίπτωση των νοσημάτων παραμένει σταθερή ή μειώνεται από το 1900 έως το 2016 (Ng *et al.*, 2017). Αντίθετα, μελέτες από νέες βιομηχανοποιημένες χώρες της Ασίας της Αφρικής και της Ν. Αμερικής σημειώνουν αύξηση της ετήσιας επίπτωσης των νοσημάτων (από +4 έως +11,1% για την NC) (Ng *et al.*, 2017).

1.3 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ NC

Η αιτιολογία των ΙΦΝΕ παραμένει άγνωστη (Bernstein *et al.*, 2016), ωστόσο, γενετικοί, περιβαλλοντικοί, μικροβιακοί και ανοσολογικοί παράγοντες φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεια της ΕΚ και της NC (Bernstein *et al.*, 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα ΙΦΝΕ αποτελούν την ανώμαλη ανοσιακή απάντηση του τοιχώματος του εντέρου στο εντερικό μικροβίωμα σε γενετικά προδιαθετιμένα άτομα, η οποία βρίσκεται υπό την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως το κάπνισμα, η έκθεση σε εντεροπαθογόνα, η σκωληκοειδεκτομή, η χρήση αντιβιοτικών, η λήψη αντισυλληπτικών δισκίων, η λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ), οι

διατροφικές συνήθειες και το οξειδωτικό στρες (εικόνα 1) (Strober, Fuss and Blumberg, 2002; Loftus, 2004; Tuvlin *et al.*, 2007; Kaser, Zeissig and Blumberg, 2010; Matsuoka *et al.*, 2018). Επίσης,



Εικόνα 1: Τα ΙΦΝΕ ως πολυπαραγοντική διαταραχή, τα οποία σχετίζονται με την παθολογική ανοσιακή απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου στην μικροχλωρίδα, η οποία βρίσκεται υπό την επίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που εμλέκονται μόνο στη NC και με μπλε χρώμα σημειώνονται τα γονίδια, τα οποία σχετίζονται μόνο μόνο με την ΕΚ.

το γεγονός ότι τα ΙΦΝΕ αφορούν κυρίως τις δυτικές κοινωνίες και η αύξηση της συχνότητας τους παρατηρείται σε νέες βιομηχανοποιημένες χώρες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υποδηλώνει ότι η αστικοποίηση, η βιομηχανοποίηση των κοινωνιών και ο δυτικός τρόπος ζωής πιθανόν συμβάλλουν στην εκδήλωση των νοσημάτων (Kaplan and Ng, 2016, 2017; Benchimol *et al.*, 2017).

1.3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΝC

Εκτιμάται ότι 10-30% των ασθενών με ΙΦΝΕ έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό ΕΚ ή ΝC. (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Ωστόσο, ο ρόλος της γενετικής στην εμφάνιση των ΙΦΝΕ φαίνεται να είναι μικρός, καθώς μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους σημειώνουν ποσοστό συμπτωματικότητας για θετικούς στην ΝC περίπου 50% (Podolsky, 2002; Duerr *et al.*, 2006). Πλέον, έχουν προσδιοριστεί μεταλλάξεις σε 240 γονίδια, τα οποία σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης των ΙΦΝΕ (De Lange *et al.*, 2017). Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται σε ανοσογενετικά μονοπάτια και η απορρύθμισή τους σχετίζεται με: α) διαταραχές στην έμφυτη ανοσία και ακατάλληλη βακτηριακή αναγνώριση και κάθαρση από τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας (π. χ. NOD2, CARD9), β) διαταραχές στην επίκτητη ανοσία και αστάθεια της ισορροπίας μεταξύ των κυττάρων που ενεργοποιούν και καταστέλλουν-ρυθμίζουν την φλεγμονή (π.χ. IL23R, JAK2, STAT3, PTPN2, IL10), γ) διαταραχές στην προσέλκυση των λευκοκυττάρων και στην παραγωγή και στην ανταπόκριση κυτταροκινών (π.χ. MST1, CCR6), δ) διαταραχές στην αναγνώριση των βακτηρίων από τα φαγοκύτταρα και προβλήματα τόσο στην φαγοκυττάρωση όσο και στη λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου και της εντερικής διαπερατότητας (π.χ. XBP1, ORMDL3, ATG16L1, IRGM), ε) διαταραχές του ενεργειακού μεταβολισμού των υπερμεταβολικών κυττάρων (π.χ. SLC22A5) και τέλος, στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ σε ηλικία μικρότερη των 10 ετών, λόγω απορρυθμισμένης φλεγμονώδους απάντησης (π.χ. IL10RA, TTC7A) (Kaser, Zeissig and Blumberg, 2010; Graham and Xavier, 2020). Ωστόσο, μεμονωμένες μεταλλάξεις δεν φαίνεται να αρκούν για την εκδήλωση των ΙΦΝΕ, καθώς η εξάλειψη του NOD2/CARD15 στο χρωμόσωμα 16, το οποίο αποτελεί τον ισχυρότερο γενετικό παράγοντα κινδύνου σε ποντικούς για την εμφάνιση της ΝC, δεν οδηγεί σε φλεγμονή, γεγονός που αναδεικνύει την σημασία της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εμφάνιση των ΙΦΝΕ (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015).

1.3.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΝC

Όπως, ήδη αναφέρθηκε στην παθογένεια των ΙΦΝΕ, στην ΕΚ και στην ΝC παρατηρείται παθολογική ανοσιακή απάντηση του τοιχώματος του εντέρου στην εντερική μικροχλωρίδα, ενώ οι ανοσιακοί παράγοντες βρίσκονται υπό την επίδραση γενετικών παραγόντων (Kaser, Zeissig and Blumberg, 2010; Graham and Xavier, 2020). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ενεργοποίηση των

αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα -APCs) και των CD4+ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων (T helper cells- Th), καθώς, επίσης και αυξημένη έκκριση κυτταροκινών, τόσο από τα κύτταρα της ειδικής, όσο και της μη ειδικής ανοσίας (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Η NC θεωρείται μία Th1/Th17 ανοσομεσολαβούμενη αντίδραση, στην οποία παρατηρείται αυξημένη έκκριση ιντερλευκινών (IL-6, IL-12, IL-17, IL-23), ιντερφερόνης γ (IFN-γ) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) ως απάντηση στο εντερικό μικροβίωμα, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της φλεγμονής του εντέρου και στη βλάβη του εντερικού φραγμού και αποτελούν μόρια στα οποία στοχεύουν φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της νόσου (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Τόσο στα εντεροεπιθηλιακά κύτταρα φλεγμένοντος εντέρου ασθενών με ΙΦΝΕ, όσο και στα μακροφάγα του χορίου του εντερικού τοιχώματος, που συμμετέχουν στην φλεγμονή, έχει παρατηρηθεί ενεργοποιημένος πυρηνικός παράγοντας Κβ (NF-κB) (Rogler *et al.*, 1998). Ο NF-κB ενεργοποιείται από τον TNF-α και την IL1 (Grilli, Chiu and Lenardo, 1993; Baeuerle and Henkel, 1994) και συμβάλλει στην εξέλιξη της φλεγμονής ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τον TNF-α, την IL-1β, την IL-6, την IL-8, το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1), το διεγερτικό παράγοντα αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (CSF-1), τη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοπύρηνων 1 (MCP-1) και το αγγειακό μόριο προσκόλλησης 1 (VCAM-1) (Pullman *et al.*, no date; Dinarello, no date; Stevens *et al.*, 1992; Iademarco *et al.*, 1992; Neish *et al.*, 1992; Reinecker *et al.*, 1993; Youngman *et al.*, 1993; Müller, Ziegler-Heitbrock and Baeuerle, 1993; Baeuerle and Henkel, 1994; Baggiolini, Dewald and Moser, 1994; Beutler and Van Huffel, 1994; Kishimoto *et al.*, 1995; Kusugami *et al.*, 1995; MacDonald *et al.*, 2008).

1.3.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ NC

Πρόσφατη ανασκόπηση παραθέτει περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, που διαταράσουν την φυσιολογική μικροχλωρίδα (δυσβίωση), η οποία συμβάλλει στην διατήρηση της υγείας του εντέρου, αλλά και στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ (Ananthakrishnan *et al.*, 2018). Εκτός από την εύρεση των πολυμορφισμών rs1394174 (CNTN6), rs62171178 (UBR3), rs59846192 (DMRTB1) και rs28473221 (SALL3) οι οποίοι σχετίζονται με συγκεκριμένους πληθυσμούς μικροβιώματος, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβίωμα είναι: α) ο αποικισμός του εντέρου από εντεροπαθογόνα, τα οποία οδηγούν σε δυσβίωση και αλλαγές του μικροβιώματος σε περιοχές του

εντέρου που δεν φλεγμένουν, β) η λήψη αντιβιοτικών, η οποία συμβαίνει στα πρώτα στάδια της ζωής των παιδιών των αναπτυγμένων χωρών, ενώ η χρήση τους φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά στα αναπτυσσόμενα κράτη, οδηγεί σε μείωση της ποικιλίας του εντερικού μικροβιώματος (έως 1/3), η οποία διαρκεί έως και 6 μήνες από την λήψη τους και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΙΦΝΕ, γ) ο τρόπος του τοκετού, καθώς νεογνά, τα οποία γεννήθηκαν με καισαρική τομή, φαίνεται να εμφανίζουν καθυστερημένη διαφοροποίηση του μικροβιώματος του εντέρου τους και αυξημένους πληθυσμούς αναερόβιων μικροβίων στο έντερό τους (λόγω απουσίας της επαφής του νεογνού με το κολπικό μικροβίωμα της μητέρας, η οποία πραγματοποιείται στον φυσιολογικό τοκετό), χωρίς, ωστόσο, να υπάρχει μέχρι στιγμής συσχέτιση με την εκδήλωση των ΙΦΝΕ, δ) ο μητρικός θηλασμός, ο οποίος παρουσιάζει αντίστροφη συσχέτιση με την πρώιμη εμφάνιση της ΝC και της ΕΚ και με λιγότερο σοβαρή κλινική πορεία ασθενών με ΝC (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

Οι αλλαγές στην δίαιτα των δυτικών κοινωνιών μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές του μικροβιώματος του εντέρου, στην αυξημένη ανοσιακή απάντηση του τοιχώματος και τελικά, στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ (Devkota *et al.*, 2012; David *et al.*, 2014; Lewis and Abreu, 2017). Η μειωμένη κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και διαιτητικών ινών (κυρίως με τη μορφή των φρούτων και λιγότερο με τη μορφή των λαχανικών) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΝC, ενώ η μειωμένη κατανάλωση ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και η αυξημένη κατανάλωση ω-6 PUFA σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΕΚ (Ananthakrishnan *et al.*, 2018). Όσον αφορά τα μικροθρεπτικά συστατικά, η αυξημένη πρόσληψη ψευδαργύρου συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΝC και με λιγότερες επιπλοκές σε άτομα που νοσούν, ενώ, παράλληλα, αυξημένα επίπεδα βιταμίνης D πλάσματος συσχετίστηκαν με μειωμένη πιθανότητα εκδήλωσης ΝC (Ananthakrishnan *et al.*, 2018). Τέλος, προσθετικά τροφίμων, όπως η καρβοξυμεθυλ-κυτταρουλόζη (CMC) και το πολυσορβικό 80 (P80) αποτελούν γαλακτωματοποιητές, οι οποίοι αυξάνουν τα επίπεδα της βιοδραστικής φλαγγελίνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή του εντερικού μικροβιώματος και διαμόρφωση μιας προφλεγμονώδους κατάστασης με τελική συνέπεια την εμφάνιση κολίτιδας (Chassaing *et al.*, 2015, 2017).

Τέλος, η επίδραση του αστικού περιβάλλοντος στο εντερικό επιθήλιο, πιθανόν εξηγεί τον αυξημένο επιπολασμό των ΙΦΝΕ στις δυτικές κοινωνίες (Ananthakrishnan *et al.*, 2018). Μελέτη σε $IL10^{-/-}$ ποντικούς συσχετίζει την αυξημένη έκθεση σε αερομεταφερόμενα σωματίδια με την αυξημένη εντερική διαπερατότητα, την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο τοίχωμα του εντέρου

και αλλαγές του εντερικού μικροβιώματος (Kish *et al.*, 2013), ενώ επιδημιολογικές μελέτες ατόμων που κατοικούν σε περιοχές με αυξημένες συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικού διοξειδίου του αζώτου (NO_2) και διοξειδίου του θείου (SO_2), συσχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα διάγνωσης ΝC και ΕΚ αντίστοιχα (Kaplan *et al.*, 2010).

1.3.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΝC

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών προς όφελος των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και ρύθμιση ή/και μοριακές βλαβες (Jones, 2006). Μεταξύ των οξειδωτικών μορίων περιλαμβάνονται: α) οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως επί παραδείγματι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου (HO^-), το οξυγόνο απλής κατάστασης ($^1O_2$), τα υδροϋπεροξείδια λιπιδίων, η ρίζα του οργανικού υπεροξειδίου ($RCOO^-$) και τα μη ριζικά οξειδωτικά [οι χλωραμίνες (RNHCl), το υποχλωριώδες οξύ (OHCl), το όζον (O_3), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)] (Tian, Wang and Zhang, 2017), και β) οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), NO_2, το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$), και τα μη ριζικά οξειδωτικά (Bedard and Krause, 2007). Η ενδογενής παραγωγή των οξειδωτικών μορίων πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια (έως 90% των παραγόμενων ROS), στα υπεροξεισώματα, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων και στη μεσοκυττάρια ουσία (Tian, Wang and Zhang, 2017), ενώ τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν στην ενδογενή παραγωγή των ROS είναι: οι υπεροξειδάσες, οι οξειδάσες του νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικού-δινουκλεοτιδίου (NADPH οξειδάσες ή NOX, καταλύουν τον σχηματισμό O_2^- από O_2), η μυελοπεροξειδάση (MPO, καταλύει τον σχηματισμό HOCl από H_2O_2), η κυκλοοξυγενάση (COX, σχηματίζει λιπιδικά υπεροξείδια από αραχιδονικό οξύ), η λιποξυγενάση (LOX), η οξειδάση της ξανθίνης (XO, παράγει H_2O_2 από την πρωτεόλυση της αφυδρογονάσης της ξανθίνης), η μονοαμινοξειδάση (MAO, συμβάλει στο σχηματισμό H_2O_2 από την οξειδωτική αποικοδόμηση αμινών), η οξειδάση της γλυκόζης και η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS, συνθέτει NO από το αμινοξύ L-αργινίνη) (Kulkarni, Kuppusamy and Parinandi, 2007; Swindle and Metcalfe, 2007). Τα αντιοξειδωτικά μόρια προστατεύουν τα κύτταρα από προ-οξειδωτικά και ασταθή μόρια και διακρίνονται: α) στα ενδογενή αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα [υπεροξειδικές δισμουτάσες (SOD, μετατρέπουν το O_2^- σε H_2O_2 και O_2), καταλάσες (CAT, καταλύουν τη μετατροπή του H_2O_2 σε νερό), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειονίνης (GPXs,

καταλύουν την αναγωγή του H_2O_2 και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων (ROOH) σε νερό και την αντίστοιχη αλκοόλη, συνήθως με χρήση της ανηγμένης γλουταθειονίνης (GSH)] και β) στα ενδογενή μη ενζυμικά βιομόρια με αντιοξειδωτική δράση (η αλβουμίνη, η τρανσφερρίνη, οι μεταλλοθειονίνες, το ουρικό οξύ, το λιποϊκό οξύ, η γλουταθειονίνη, η χολερυθρίνη, η ουβικινόλη, η τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ) (Harwell, 2007; Rahman *et al.*, 2012).

Το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην παθογένεια των ΙΦΝΕ, μέσω της βλάβης του εντερικού βλεννογόνου, της διαταραχής του εντερικού φραγμού, την είσοδο των μικροβίων στο εντερικό τοίχωμα και την επιδείνωση της φλεγμονής (Grisham, 1994; Goyette *et al.*, 2007; Tian, Wang and Zhang, 2017). Το αρχικό ερέθισμα, που οδηγεί στην είσοδο των μακροφάγων στο βλεννογόνο του κόλου, που θα οδηγήσει στη φλεγμονή του κόλου, παραθέτει το 2005 η «Θεωρία της ριζικής ερμηνείας» (radical induction theory) σύμφωνα με την οποία, το H_2O_2, το οποίο αποτελεί το προϊόν του μεταβολισμού των κυττάρων του κόλου, εξέρχεται από τα κύτταρα και προκαλεί βλάβη του εντερικού φραγμού μέσω της παραγωγής HO^-, με συνέπεια, την μεταπήδηση των μικροβίων στον υποβλεννογόνιο χώρο και την πρόκληση φλεγμονής με την ενεργοποίηση και την προσέλκυση ανοσιακών κυττάρων, τα οποία παράγουν ROS (Pravda, 2005). Σε απόκριση των μολυσματικών παραγόντων, τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν το O_2 και παράγουν ROS και RNOS (αναπνευστική έκρηξη), τα οποία χρησιμεύουν στην διαδικασία της φαγοκυττάρωσης και της καταστροφής των μικροοργανισμών (Dahlgren and Karlsson, 1999). Στην περίπτωση των ΙΦΝΕ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα, που προσεγγίζουν τον βλεννογόνο παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^-, NO, $ONOO^-$ και HOCl (από την δράση της MPO), τα οποία επιδεινώνουν την φλεγμονή και την ιστική βλαβη (Roessner *et al.*, 2008; Zhu and Li, 2012), ενώ, ταυτόχρονα, παρατηρούνται μειωμένα τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων του πλάσματος σε ασθενείς με NC (Alzoghaibi, 2013). Βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων, δευτεροπαθώς από τα ROS, έχει παρατηρηθεί στο βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΝΕ (Lih-Brody *et al.*, 1996; Kruidenier, Kuiper, Lamers, *et al.*, 2003). Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος των NOX1, οι οποίες αφθονούν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, και παράγουν ROS ως απάντηση τους στη διέγερση από βακτηριακές ενδοτοξίνες, IL-1β, IL-18, IFN-γ, και TNF-α, οδηγώντας σε βλάβες του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) και την απόπτωση των κυττάρων (Rokutan *et al.*, 2008; Ramonaite *et al.*, 2013). Ωστόσο, εκτός από τον βλεννογόνο, αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών μορίων έχουν παρατηρηθεί στο πλάσμα, στον ορό, στο σίελο και στον εκπνεόμενο αέρα ασθενών με ΙΦΝΕ (Tüzün *et al.*, 2002;

Rezaie *et al.*, 2006). Αυξημένη παραγωγή του H_2O_2 (από την αυξημένη δραστηριότητα της SOD και μείωση της O_2^-) από ανοσιακά κύτταρα της περιφέρειας (λεμφοκύτταρα και μονοπύρηνα) έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ενεργό NC, η οποία συσχετίσθηκε με δείκτες της φλεγμονής (CRP και ινωδογόνο) (Beltŕan *et al.*, 2010). Τέλος, επιδημιολογική μελέτη σημείωσε μειωμένα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων (των SOD, των GPXs, και της CAT) στα κύτταρα του βλεννογόνου του κόλου υγιών ανθρώπων (Grisham, MacDermott and Deitch, 1990). Μάλιστα, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σημειώθηκαν μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών πλάσματος (καροτενοειδή, βιταμίνη Ε και Α) και μειωμένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (D'Odorico *et al.*, 2001; Koutroubakis *et al.*, 2004), αλλά και αυξημένα επίπεδα GPXs πλάσματος ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Tüzün *et al.*, 2002).

Πρόσφατη ανασκόπηση συνολικά 30 συγχρονικών και προοπτικών επιδημιολογικών μελετών ασθενών με ΙΦΝΕ, σημειώνει στατιστικά σημαντική μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (συνεκτιμώντας όλα τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος, των σωματικών υγρών και των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου μετά από βιοψία) σε 7 μελέτες παρατήρησης με 446 ασθενείς (Pereira *et al.*, 2015). Στην ίδια ανασκόπηση σημειώθηκε αυξημένη η δραστηριότητα της GPX στο πλάσμα ή στον εντερικό βλεννογόνο 444 ασθενών με ΙΦΝΕ σε 7 μελέτες παρατήρησης (Tüzün *et al.*, 2002; Kruidenier, Kuiper, Lamers, *et al.*, 2003; Kruidenier, Kuiper, van Duijn, Mieremet-Ooms, *et al.*, 2003; Dincer *et al.*, 2007; Maor *et al.*, 2008; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2010; Akman *et al.*, 2012), ενώ μία μελέτη 20 ασθενών με NC αναφέρει μειωμένη την δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου (Pinto *et al.*, 2013). Αυξημένα φαίνονται τα επίπεδα της SOD στο πλάσμα και στα κύτταρα του βλεννογόνου 138 ασθενών με ΙΦΝΕ σε 5 μελέτες παρατήρησης (Kruidenier, Kuiper, van Duijn, Marklund, *et al.*, 2003; Dincer *et al.*, 2007; Beltŕan *et al.*, 2010; Poulsen *et al.*, 2012; Iborra *et al.*, 2019), ωστόσο 2 επιδημιολογικές μελέτες με 187 ασθενείς με ΙΦΝΕ αναφέρουν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα της SOD στα κύτταρα του κόλου και στο πλάσμα (Lih-Brody *et al.*, 1996; Rana *et al.*, 2014). Αμφιλεγόμενα είναι τα αποτελέσματα και για την CAT, καθώς 2 μελέτες παρατήρησης σημειώνουν αυξημένη την δραστηριότητα του ενζύμου στους φλεγμαίνοντες ιστούς και στο πλάσμα 154 ασθενών με NC και ΕΚ (Kruidenier, Kuiper, van Duijn, Mieremet-Ooms, *et al.*, 2003; Rana *et al.*, 2014), ενώ 3 επιδημιολογικές μελέτες με 268 ασθενείς με ΙΦΝΕ αναφέρουν μειωμένη δραστηριότητα της CAT σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Beltŕan *et al.*, 2010; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2010; Iborra *et al.*, 2019). Ταυτόχρονα, σε 11 μελέτες με 744

ασθενείς με ΙΦΝΕ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων στο πλάσμα ή στον εντερικό βλεννογόνο σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό της ομάδας ελέγχου (Wendland *et al.*, 2001; Kruidenier, Kuiper, Lamers, *et al.*, 2003; Alzoghaibi, Al Mofleh and Al-Jebreen, 2007; Maor *et al.*, 2008; Beltŕan *et al.*, 2010; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2010; Akman *et al.*, 2012; Achitei *et al.*, 2013; Bouzid *et al.*, 2013; Ramonaite *et al.*, 2013; Rana *et al.*, 2014). Τέλος, αυξημένα επίπεδα της 8-υδρόξυ-2-δεοξυγουανοσιδης (προϊόν οξειδωτικής βλάβης του DNA (Mayne, 2003)) παρατηρήθηκαν στο πλάσμα και στα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου 272 ασθενών με ΙΦΝΕ (Lih-Brody *et al.*, 1996; D'Inca' *et al.*, 2000; D'Odorico *et al.*, 2001; Dincer *et al.*, 2007; Beltŕan *et al.*, 2010). Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να ερμηνευθεί αν το οξειδωτικό στρες συμβάλλει περισσότερο στην πυροδότηση ή στην επιδείνωση της φλεγμονής του εντερικού τοιχώματος των ασθενών με ΙΦΝΕ.

Μεταξύ των μηχανισμών που προσπαθούν να ερμηνεύσουν τον ρόλο των ROS στην ΙΦΝΕ, πρόσφατη ανασκόπηση εκτιμά την σημασία των προϊόντων του οξειδωτικού στρες σε ποντικούς με κολίτιδα προκαλούμενη από θειικό νάτριο δεξτράνης (Vargas-Robles *et al.*, 2019). Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα του κόλου η πρόκληση φλεγμονής συσχετίστηκε με αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (μέσω των διαύλων $Ca_v1.3$/TRPV6 της κυτταρικής μεμβράνης), το οποίο οδήγησε σε οξειδωτικό στρες των εντεροκυττάρων, μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα (προερχόμενων από το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια των εντεροκυττάρων), ενεργοποίηση της κινάσης ρύθμισης της απόπτωσης 1 (ASK1/ MAP3K5), η οποία οδήγησε στην ενεργοποίηση της κινάσης 7 της MAP κινάσης (MKK7) και στη συνέχεια της c-jun N- terminal κινάσης-2 (JNK2), η οποία φωσφορυλίωσε την cSrc κινάση με τελική συνέπεια τη φωσφορυλίωση και την διαταραχή της λειτουργίας των μορίων σύνδεσης μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού, τη διήθηση από ουδετερόφιλα και την φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου (Vargas-Robles *et al.*, 2019).

Εν κατακλείδι, μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων, στην ΙΦΝΕ ξεχωρίζουμε τον NF-κB. Ο NF-κB αποτελείται από τα ετεροδιμερή p50 και p65, τα οποία σε συνθήκες ηρεμίας παραμένουν προσδεμένα στο ανασταλτικό μόριο IκB. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί φωσφορυλίωση του IκB από την IκB κινάση (IKK) και αποδόμησή του, γεγονός που επιτρέπει στον απελευθερωμένο NF- κB να μετατοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου και να ξεκινήσει τη κB εξαρτώμενη μεταγραφή των

γονιδίων (Gordon, Shaw and Kirshenbaum, 2011). Ο NF-κB, ο οποίος συμμετέχει στην φλεγμονή μέσω της ενεργοποίησης του και της παραγωγής μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά και μέσω της αύξησης της γονιδιακής έκφρασης της NOS στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Andresen *et al.*, 2005), είναι ενεργοποιημένος στα επιθηλιακά κύτταρα και στα μακροφάγα ασθενών με ΙΦΝΕ (Rogler *et al.*, 1998). Μάλιστα, ο ενεργοποιημένος NF-κB φαίνεται να οδηγεί στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού επιθηλίου ασθενών με ΕΚ (Qiu *et al.*, 2011), πιθανόν, μέσω της ενεργοποίησής του από ROS (Xu *et al.*, 2017), προερχόμενων από την ενεργοποίηση της NOX από τον TNF-α (Kuwano *et al.*, 2008). Ο TNF-α, που αποτελεί προϊόν του ενεργοποιημένου NF-κB, συμβάλλει στην παραγωγή COX2 (Fitzpatrick, 2005), η οποία επιδεινώνει την φλεγμονώδη απόκριση, μέσω της παραγωγής προσταγλανδινών και NOS (Singer *et al.*, 1998; Ricciotti and Fitzgerald, 2011).

1.4 Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΝC

Τα ΙΦΝΕ προκαλούν φλεγμονή της γαστρεντερικής οδού, με συνέπεια τα κύρια συμπτώματα να είναι: η διάρροια (μπορεί να περιέχει αίμα ή βλέννη), η δυσκοιλιότητα (κυρίως στην ΕΚ περιορισμένη στο ορθό), ο πόνος και η αιμορραγία από τον πρωκτό, κατά την διέλευση των κοπράνων, ο τεινεσμός, η έπειξη προς αφόδευση, η ναυτία, ο έμετος (κυρίως στη ΝC), οι κοιλιακές κράμπες και το κοιλιακό άλγος (συνήθως εντοπισμένο στο δεξιό λαγόνιο βόθρο στη ΝC και περιομφαλικά ή στον αριστερό λαγόνιο βόθρο στην μέτρια-σοβαρή ΕΚ) (Bernstein *et al.*, 2016). Άλλα γενικότερα συμπτώματα των ΙΦΝΕ αποτελούν η απώλεια της όρεξης, το αίσθημα κόπωσης και η νυχτερινή εφίδρωση. Από την κλινική εξέταση παρατηρείται εμπύρετο (κατά την έξαρση της νόσου), μείωση του σωματικού βάρους, καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης και πρωτοπαθή αμηνόρροια (Bernstein *et al.*, 2016). Τα συμπτώματα μπορεί να είναι από ήπια έως πολύ σοβαρά με περιόδους εξάρσεων και περιόδους ύφεσης και σχετίζονται με τη θέση της φλεγμονής στον γαστρεντερικό σωλήνα (Bernstein *et al.*, 2016).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της κλινικής εικόνας της ΝC είναι οι εξωεντερικές εκδηλώσεις της νόσου. Μερικές από αυτές αποτελούν: η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, το χολαγγειοκαρκίνωμα, οι χολόλιθοι στα χοληφόρα, το οζώδες ερύθημα, το γαγγραινώδες πυόδερμα, τα αφθώδη έλκη του στόματος, την επισκληρίτιδα, την ιριδο/ραγοειδίτιδα, την

εντεροπαθητική αρθροπάθεια, την ιερολαγονίτιδα, την αγκυλοποιητική σπονδυλοαρθροπάθεια, την οστεοπόρωση και την θρομβοεμβολική νόσο (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015).

Το πρόβλημα στις ΙΦΝΕ αποτελούν οι επιπλοκές που καταλείπουν οι επαναλαμβανόμενες αναζωπυρώσεις. Μερικές από τις κυριότερες εντερικές επιπλοκές αποτελούν: η μαζική αιμορραγία από εξελκώσεις του εντέρου (κυρίως στην ΕΚ), οι εντερικές στενώσεις, αποφράξεις και η εντερική διάτρηση με διαμόρφωση κοιλιακών αποστημάτων (κυρίως στην ΝC), τα συρίγγια (περιπρωκτικά, κυστικά, κολπικά και εντερο- εντερικά που προκαλούν πνευματουρία και κοπρανουρία, αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά της ΝC), τα περιπρωκτικά αποστήματα (στη ΝC), το τοξικό μεγάκολο, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (συνήθως μετά από 8 χρόνια από την διάγνωση των ΙΦΝΕ), το αδενοκαρκίνωμα του λεπτού εντέρου (στη ΝC) και το χολαγγειοκαρκίνωμα σε ασθενείς με συνυπάρχουσα πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (Bernstein *et al.*, 2016). Παρατηρούνται, ωστόσο, και εξωεντερικές επιπλοκές, όπως επί παραδείγματι η αρθροπάθεια, το γλαύκωμα και ο καταρράκτης (από τη χρόνια λήψη κορτικοστεροειδών), η λιπώδης διήθηση του ήπατος, η φαρμακοεπαγώμενη διαμεσοσωληναριακή νεφρίτιδα, η αναιμία (λόγω δυσαπορρόφησης του σιδήρου ή/και της βιταμίνης Β12), η λευκοπενία (από την λήψη θειοπουρινών), ο μη-μελανωματικός καρκίνος του δέρματος και το ηπατοσπληνικό λέμφωμα από Τ λεμφοκύτταρα (από τη λήψη βιολογικών παραγόντων) και τέλος, οι αγχώδεις διαταραχές και οι διαταραχές της διάθεσης (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015; Bernstein *et al.*, 2016).

1.5 Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝC

Δυστυχώς, δεν υπάρχει συγκεκριμένη δοκιμασία η κλινικό εύρημα που να θέτει τη διάγνωση των ΙΦΝΕ. Η διάγνωση των ΙΦΝΕ και η διαφοροδιάγνωση μεταξύ της ΝC και της ΕΚ είναι κλινική και βασίζεται σε ευρήματα από την κλινική εξέταση, τον αποκλεισμό άλλων αιτιών εντερίτιδας ή κολίτιδας (π.χ. λοιμώδους αιτιολογίας κ.λ.π.), τα εργαστηριακά ευρήματα (αναιμία, λευκοκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση, αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ), αύξηση της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), υπολευκωματιναιμία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, έλλειψη βιταμίνης Β12 και του φυλλικού οξέος), την εξέταση των κοπράνων (αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, στεατόρροια, αύξηση της καλπροτεκτίνης και της λακτοφερίνης των κοπράνων), τον έλεγχο του ορού για συγκεκριμένα αντισώματα (ANCA, p-ANCA, ASCA, AMCA, ACCA, Omp-C, Cbir-1), τον απεικονιστικό έλεγχο για επιπλοκές των ΙΦΝΕ (ακτινογραφίες, υπέρηχος

αξονική/μαγνητική τομογραφία κοιλιάς, αξονική/μαγνητική εντερογραφία και βαριούχο υποκλυσμό) και τέλος, τις ενδοσκοπήσεις (σιγμοειδοσκόπηση, κολονοσκόπηση, ειλεοσκόπηση και ενδοσκόπηση με κάψουλα) και τη λήψη βιοψιών (ιστολογική μελέτη) (Bernstein *et al.*, 2016). Η επιλογή των εξετάσεων που θα εφαρμοστούν εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του εξοπλισμού του εκάστοτε διαγνωστικού κέντρου, από την κλινική εικόνα του ασθενή και την εμφάνιση επιπλοκών και μπορεί να διαρκέσει έως και 6 μήνες από την εκδήλωση της νόσου (Bernstein *et al.*, 2016).

1.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΝC

Η αξιολόγηση της ενεργότητας και της εντόπισης της ΝC (εκτός από τον εργαστηριακό, τον ενδοσκοπικό και τον απεικονιστικό έλεγχο που αναφέρθηκε παραπάνω) πραγματοποιείται, κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο: α) με ερωτηματολόγιο των ΙΦΝΕ (IBDQ), το οποίο εκτιμά την ποιότητα της ζωής των ασθενών με ΙΦΝΕ σύμφωνα με την συμπτωματολογία τους και την καθημερινή τους δραστηριότητα (όσο μεγαλύτερο το σκορ, τόσο υψηλότερο το επίπεδο ζωής) (Pallis, Mouzas and Vlachonikolis, 2004), β) με τον Δείκτη Ενεργότητας της ΝC (CDAI), ο οποίος λαμβάνοντας υπόψη την κλινική εικόνα και την τιμή του αιματοκρίτη του ασθενή και τις επιπλοκές της νόσου για 7 ημέρες, αξιολογεί την ΝC σε σοβαρή (σκορ>450), μέτρια (σκορ 220-450), ήπια (σκορ 150-220) και σε ύφεση (σκορ <150) (Gomollón *et al.*, 2017), γ) με τον δείκτη ενεργότητας Harvey & Bradshaw (HBI), ο οποίος εκτιμά 5 παραμέτρους του ασθενή (γενική κατάσταση, κοιλιακό άλγος, αριθμό διαρροϊκών κενώσεων, ψηλαφητή κοιλιακή μάζα και επιπλοκές) και αποτελεί απλό, αλλά, υποκειμενικό τρόπο εκτίμησης της ενεργότητας της ΝC (Lichtenstein et al., 2018), δ) τον δείκτη Lemann, ο οποίος συνδυάζει ενδοσκοπικά, απεικονιστικά και κλινικά ευρήματα και αξιολογεί τη συνολική βλάβη της νόσου στον εντερικό σωλήνα (Straksyte *et al.*, 2019), ε) τον δείκτη εκτίμησης αποτελεσμάτων αναφερομένων από τον ασθενή (PRO), ο οποίος λαμβάνει υπόψη την ποιότητα ζωής, την παραγωγικότητα και την εκδήλωση συμπτωμάτων κατάθλιψης του ασθενή και θα αντικαταστήσει τον CDAI στην εκτίμηση των ασθενών στις κλινικές δοκιμές (Lichtenstein *et al.*, 2018), στ) τα κριτήρια του Μόντρεαλ, τα οποία αξιολογούν την ηλικία διάγνωσης, τον εντοπισμό και το φαινότυπο της νόσου, ζ) το Απλό Ενδοσκοπικό σκορ της ΝC (SES-CD) και η) τον ενδοσκοπικό δείκτη σοβαρότητας της ΝC (CDEIS), οι οποίοι ταξινομούν τη σοβαρότητα της νόσου βάσει των ενδοσκοπικών ευρημάτων (Lichtenstein *et al.*, 2018).

1.7 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝC

Καθότι δεν υπάρχει θεραπεία που να οδηγεί στην ίαση των ΙΦΝΕ, στόχος των παρεμβάσεων είναι η εξάλειψη των συμπτωμάτων, η διατήρηση της ύφεσης της νόσου χωρίς την ανάγκη για συχνή λήψη κορτικοστεροειδών, η αποφυγή των ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων, η πρόληψη και η αντιμετώπιση των επιπλοκών, η αποφυγή των νοσηλειών και η βελτίωση της θρέψης και της ποιότητας της ζωής του ασθενή προσαρμόζοντας την παρέμβαση σύμφωνα πάντα με τις επιθυμίες και τις προσδοκίες του. Η θεραπευτική παρέμβαση βασίζεται στο φαινότυπο των ΙΦΝΕ (ΕΚ ή ΝC), στη σοβαρότητα και την εντόπιση της νόσου, την παρουσία επιπλοκών και την ύπαρξη συννοσηρότητας, την διαθεσιμότητα των φαρμακευτικών σκευασμάτων και την πορεία του ασθενή (Bernstein *et al.*, 2016).

Όσον αφορά την διατροφή κατά την περίοδο της αναζωπύρωσης των ΙΦΝΕ χρήσιμη είναι η μειωμένη πρόσληψη διαιτητικών ινών. Η δίαιτα χαμηλού υπολείμματος συμβάλλει στη μείωση της κινητικότητας του εντέρου, η υγρή δίαιτα ή η διακοπή της από του στόματος σίτισης ανακουφίζει από αποφρακτικού τύπου συμπτώματα, ενώ, αντίθετα η δίαιτα υψηλού υπολείμματος βοηθάει ασθενείς με ελκωτική πρωκτίτιδα (Bernstein *et al.*, 2016). Παράλληλα, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για την μείωση των συμπτωμάτων των ΙΦΝΕ με την μείωση της κατανάλωσης των ζυμώσιμων ολιγοσακχαριτών, δισακχαριτών, μονοσακχαριτών και των πολυολών (FODMAP) (Gearry *et al.*, 2009). Τέλος, η μείωση του άγχους και η διακοπή του καπνίσματος (στην ΝC μόνο, καθώς, η διακοπή του καπνίσματος σχετίζεται με αναζωπύρωση της ΕΚ) βοηθάει στην αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ (Bernstein *et al.*, 2016).

Μεταξύ των φαρμακευτικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση των αναζωπυρώσεων των ΙΦΝΕ και την διατήρησης της ύφεσής τους διακρίνουμε: α) το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ (μεσαλαζίνη και σουλφοσαλαζίνη), τα οποία δρουν αναστέλλοντας την φλεγμονώδη σηματοδότηση για την αντιμετώπιση της κολίτιδας, β) οι θειοπουρίνες (αζαθειοπρίνη και 6-μερκαπτοπουρίνη), τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, γ) τα αντισώματα έναντι του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (anti-TNF παράγοντες- ινφλιξιμάμπη, αδαλιμουμάμπη, σερτολιζουμάμπη πεγκόλ και γκολιζουμάμπη), δ) η βεδολιζουμάμπη, η οποία δρα έναντι της α4β7 ιντεγκρίνης αναστέλλοντας την προσέλκυση των Τ λεμφοκυττάρων στο εντερικό τοίχωμα και ε) ο ανοσοτροποποιητικός παράγοντας μεθοτρεξάτη (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Η φαρμακευτική αγωγή που προτιμάται στην οξεία φάση της ΝC ή σε σοβαρή νόσο είναι τα

κορτικοστεροειδή (τα οποία χαρακτηρίζονται από σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την χρόνια χορήγησή τους) και η κυκλοσπορίνη (μόνο στην ΕΚ), η οποία αποτελεί αναστολέα της καλσινευρίνης (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Τέλος, η χορήγηση αντιβιοτικής αγωγής χρησιμεύει κυρίως στην αντιμετώπιση των επιπλοκών της ΝC.

Εν κατακλείδι, παρά την ποικιλία των σκευασμάτων για την συντηρητική αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ εκτιμάται, ότι περίπου το 75% τον ασθενών με ΝC θα χρειαστεί να χειρουργηθούν τουλάχιστον μία φορά στη ζωή τους λόγω επιπλοκών της νόσου. Το αντίστοιχο ποσοστό στην ΕΚ είναι 25-45%, λαμβάνοντας, όμως, υπόψη ότι η χειρουργική θεραπεία στην ΕΚ είναι πιθανό να οδηγήσει στην ίαση της νόσου (ολική κολεκτομή) (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (AOPPs)

2.1 Ο ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ AOPPs

Τα AOPPs αποτελούν πρωτεϊνικά προϊόντα, τα οποία περιέχουν δισουλφιδικές γέφυρες, καρβονυλικές ομάδες, πεντοσιδίνες και άφθονες διτυροσίνες, που επιτρέπουν πρωτεϊνικές διασυνδέσεις και προέρχονται από την επίδραση του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) και των χλωραμινών στις πρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως αλβουμίνη), σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Witko-Sarsat *et al.*, 1996, 1998; Capeillère-Blandin *et al.*, 2004a). Τα αυξημένα επίπεδα των AOPPs υποδηλώνουν την αυξημένη οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών (Witko-Sarsat *et al.*, 1996, 1998).

2.2 Ο ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ AOPPs

Τα AOPPs εντοπίστηκαν πρώτη φορά το 1996 στο πλάσμα ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ) και συσχετίστηκαν με τα επίπεδα καταλοίπων διτυροσίνης (βασικό γνώρισμα των οξειδωμένων πρωτεϊνών) και με τα επίπεδα πεντοσιδίνης (δείκτης γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών), τα οποία σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Witko-Sarsat *et al.*, 1996). Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες παράγονται οξειδωτικά μόρια, όπως O_2^- και HOCl από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα μέσω της αυξημένης δραστηριότητας των NOX και της MPO αντίστοιχα, τα οποία προκαλούν οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες οδηγώντας σε αλλαγές στην δομή και στην λειτουργία τους (Sies, 1991; Grisham, 1994; Dean *et al.*, 1997; Halliwell and Whiteman, 2004; Davies, 2005). Τα

AOPPs του πλάσματος αποτελούν προϊόντα της οξείδωσης της αλβουμίνης (η οποία αποτελεί την κύρια πηγή των AOPPs) από το HOCl, το οποίο παράγεται από την MPO των ουδετερόφιλων (Capeillère-Blandin *et al.*, 2004a). In vitro, τα AOPPs μπορούν να σχηματιστούν από την έκθεση της αλβουμίνης σε HOCl (Witko-Sarsat *et al.*, 1996). Η αλβουμίνη (HSA) αποτελεί την αφθονότερη πρωτεΐνη του πλάσματος και ο ρόλος της αφορά την ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του πλάσματος, την μεταφορά της χολερυθρίνης, των αμινοξέων, των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, των ορμονών, των μεταλλικών ιόντων και των φαρμάκων και τέλος, είναι το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό μόριο του πλάσματος (Halliwell, 1988; Hu *et al.*, 1993; Roche *et al.*, 2008; Selmeci, 2011). Οι λειτουργίες αυτές, ίσως επηρεαστούν μετά από την δομική αλλαγή της αλβουμίνης, από την επίδραση του οξειδωτικού στρες και τον σχηματισμό των AOPPs. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των AOPPs του πλάσματος είναι η φασματοφωτομετρία με μικροπλάκες στο μήκος κύματος 340nm (Witko, Nguyen and Descamps-Latscha, 1992; Witko-Sarsat *et al.*, 1996). Αναλόγως του μοριακού τους βάρους διακρίνονται δύο τύποι AOPPs: α) τα AOPPs χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία περιέχουν αλβουμίνη στη μονομερή της μορφή και β) τα AOPPs υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία αποτελούν συσσωματώματα αλβουμίνης, τα οποία ενώνονται μέσω δισουλφιδικών γεφυρών ή/και ομοιοπολικών διασυνδέσεων διτυροσινών και αποτελούν την πλειοψηφία των AOPPs (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Capeillère-Blandin *et al.*, 2004a; Selmeci, 2011).

Τα AOPPs είναι πιθανό να προέρχονται και από την γλυκοπρωτεΐνη ινωδογόνο (Shacter *et al.*, 1994), καθώς σε επιδημιολογική μελέτη ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο (ΚΑΝ) υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων AOPPs του πλάσματος και του ινωδογόνου του πλάσματος (και επιπλέον αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου συσχετίστηκαν με την αύξηση του λόγου AOPPs/ινωδογόνο) (Selmeci *et al.*, 2006), κάτι το οποίο, όμως, δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ΧΝΝ (Himmelfarb and McMonagle, 2001), ενώ σε μεταγενέστερες in vitro μελέτες σημειώθηκε ο σχηματισμός των AOPPs από την έκθεση του ινωδογόνου του πλάσματος σε υποχλωριώδες οξύ (Torbitz *et al.*, 2015). Το ινωδογόνο αποτελεί την τρίτη σε ποσότητα πρωτεΐνη του πλάσματος (μετά την αλβουμίνη και τις ανοσοσφαιρίνες) και καθιστά μία διαλυτή πρωτεΐνη του πλάσματος με σημαντικό ρόλο στην πήξη και την αιμόσταση (Collen *et al.*, 1972; Liu, Nossel and Kaplan, 1979). Η οξειδωτική βλάβη του ινωδογόνου από το υποχλωριώδες οξύ οδήγησε σε αλλαγές στην δομή της και στην αύξηση της ενεργότητάς της, με συνέπεια την πιθανή εμφάνιση

διαταραχών της πήξης του αίματος (Torbitz *et al.*, 2015). Τέλος, μεμονωμένες μελέτες συσχετίζουν την υπερχοληστερολαιμία (in vivo μελέτη σε λαγούς) (Liu, Nossel and Kaplan, 1979), το κολλαγόνο υπό την in vitro επίδραση του υποχλωρικού οξέος (Bochi *et al.*, 2016) και την in vitro επίδραση της αντίδρασης Fenton στην HSA (μέσω της παραγωγής υδροξυλικής ρίζας) (Bochi *et al.*, 2014) με τον σχηματισμό των AOPPs, το οποίο συνηγορεί υπέρ της δυνατότητας σχηματισμού των AOPPs από διαφορετικά μόρια.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην ΙΦΝΕ παρατηρείται διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών με όφελος των οξειδωτικών και σχηματισμό των ROS (Kruidenier, Kuiper, van Duijn, Mieremet-Ooms, *et al.*, 2003; Zhu and Li, 2012). Χαρακτηριστικό ιστολογικό γνώρισμα των ΙΦΝΕ είναι η μετακίνηση των φαγοκυττάρων και ο αποικισμός του τοιχώματος του εντέρου με ουδετερόφιλα (Schreiber *et al.*, 1992; Kucharzik *et al.*, 2001), τα οποία παράγουν οξειδωτικά μόρια μέσω του ενζύμου MPO, οδηγώντας στην οξείδωση των βιομορίων και στην ιστική βλάβη (Grisham and Granger, 1988; Grisham, 1994), όταν η συγκέντρωση των ROS τους υπερνικούν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Oshitani *et al.*, 1993; Prütz, 1996) όπως επί παραδείγματι το ενζυμικό αμυντικό σύστημα της GSH στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου (Morgenstern *et al.*, 2003), την πρωτεϊνική υπεροικογένεια των ματαλλοθειονινών (MTs) που συμβάλλουν στην μείωση των ROS (Roesijadi, 2000; Coyle *et al.*, 2002) και την γλυκοπρωτεΐνη τρανσφερίνη, η οποία αποτελεί αντιοξειδωτικό παράγοντα (Dhungana *et al.*, 2004). Από επιδημιολογικές μελέτες σε ασθενείς με ΕΚ παρατηρήθηκε αυξημένη η συγκέντρωση των AOPPs του πλάσματος των ασθενών, τα οποία συσχετίστηκαν με την αυξημένη δραστηριότητα της MPO (P=0.012) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Baskol *et al.*, 2008). Σε συγχρονική μελέτη παρατήρησης σε ασθενείς με ΕΚ παρατηρήθηκαν αυξημένα τα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος, μειωμένα τα επίπεδα της GSH του ορού (1.87 ± 0.02 μmol/L, $P < 0.05$) και αυξημένα επίπεδα των MTs του ορού (8.18 ± 0.35μg/mL, $P < 0.05$) των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (2.49 ± 0.10 μmol/L και 6.12 ± 0.25 μg/mL αντίστοιχα), ενώ παράλληλα σημειώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των AOPPs και των MTs ($r= 0.678$, $P < 0.001$) και αρνητική συσχέτιση των AOPPs με την GSH ($r = -0.385$, $P < 0.001$) (Hamouda *et al.*, 2011). Παράλληλα, σε προοπτική μελέτη ασθενών με ΕΚ παρατηρήθηκε μειωμένη η συγκέντρωση της τρανσφερίνης σε ασθενείς με ενεργό ΕΚ (242mg/dL (211–272), P=0.023) και ενεργό NC (223mg/dL (191–256), P=0.003) σε σχέση με άτομα με ανενεργό ΙΦΝΕ (σε ασθενείς με ανενεργό NC 263mg/dL (215–310), ασθενείς με ανενεργό ΕΚ 278mg/dL (260–295)) και την ομάδα ελέγχου (283mg/dL (266–

299)) και αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των AOPPs του πλάσματος και των επιπέδων τρανσφερρίνης μόνο για τους ασθενείς με NC (r= -0.35, p=0.022) και θετική συσχέτιση των AOPPs του πλάσματος και της υπεροξειδικής δισμουτάσης μόνο σε ασθενείς με ΕΚ (r= 0.29, p=0.018) (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Μάλιστα, στην ίδια μελέτη σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων αλβουμίνης του πλάσματος στους ασθενείς με NC (4.32g/dL (3.91–4.39), P<0.001) και ΕΚ (4.44g/dL (4.13–4.68), P<0.001) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (4.83g/dL (4.71–4.92)), γεγονός που συνηγορεί υπέρ του σχηματισμού των AOPPs από την επίδραση του υποχλωριώδους οξέος στην αλβουμίνη του πλάσματος σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008).

Όσον αφορά την ιστική εντόπιση των AOPPs σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, εκτός από την αυξημένη συγκέντρωση τους στο πλάσμα ασθενών με ΕΚ και NC, όπως μέχρι στιγμής αναφέρθηκε, 2 συγχρονικές επιδημιολογικές μελέτες με 49 ασθενείς με NC αναφέρουν αυξημένες τις συγκεντρώσεις των AOPPs (τριπλάσιες) στους βεβλαμένους ιστούς σε σχέση με τους υγιείς ιστούς των ασθενών μετά από εντερεκτομή και πιο συγκεκριμένα, η εντόπιση των AOPPs αφορούσε το κυτταρόπλασμα των εντεροεπιθηλιακών κυττάρων, τα κύτταρα φλεγμονής και το χόριο των βεβλαμένων ιστών, ενώ τα AOPPs συσχετίστηκαν με τον κυτταρικό θάνατο του πάσχοντος ιστού (Xie *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017). Τέλος, σε υγιείς ποντικούς παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση των AOPPs στο τυφλό σε σχέση με άλλα τμήματα του εντερικού σωλήνα, το οποίο αποτελεί και μία από τις συχνότερες εντοπίσεις της NC, όπως ήδη αναφέρθηκε, το οποίο καθιστά πιθανό τον ρόλο των AOPPs στην εκδήλωση της νόσου (Gyuraszova, Kovalcikova and Gardlik, 2017).

2.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ AOPPs

2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ AOPPs

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα AOPPs αποτελούν τα προϊόντα οξειδωτικής ανισορροπίας, τα οποία είναι πιθανό να έχουν προφλεγμονώδεις ιδιότητες, οδηγώντας σε περαιτέρω επιδείνωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής των ιστών (Witko-Sarsat and Descamps-Latscha, 1997; Witko-Sarsat, 1999). Από τις πρώτες μελέτες παρατήρησης του σχηματισμού των AOPPs σε ασθενείς με ΧΝΝ σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με το δείκτη ενεργοποίησης των μονοπύρηνων, την νεοπτερίνη (r=0.55, p<0.0001) και τον TNF-α (r=0.50, p=0.0001) και παράλληλα, η in vitro χορήγηση AOPPs, σχηματισμένων από την in

vitro έκθεση της HSA σε υποχλωριώδες οξύ (AOPP-HSA), σε μεμονωμένα ανθρώπινα μονοπύρηνα πυροδότησε την ενεργοποίησή τους, οδηγώντας μας στην υπόθεση, ότι, ίσως τα AOPPs είναι απαραίτητα στην πρόκληση αναπνευστικής έκρηξης (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). Λίγα χρόνια αργότερα η ίδια επιστημονική ομάδα παρατηρεί, ότι η in vitro χορήγηση AOPPs (προερχόμενων τόσο από την in vitro επίδραση του HOCl στην HSA, όσο και από το πλάσμα ασθενών με XNN) οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας της NADPH οξειδάσης (προς τον εξωκυττάριο σχηματισμό O_2^-) και της MPO των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των μονοπύρηνων (προς τον ενδοκυττάριο σχηματισμό HOCl), η οποία ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο παρουσία του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) (Witko-Sarsat *et al.*, 2003). Μελέτη σε κύτταρα ποντικών αναφέρει, ότι ο ενοφθαλμισμός των AOPPs σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα ποντικών οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης της p83 MAP κινάσης (MAPK) και τελικά, στη διέγερση της έκφρασης της πρωτεΐνης MCP-1, η οποία αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των λευκοκυττάρων, των επιθηλιακών και των ενδοθηλιακών κυττάρων και αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τα μονοπύρηνα και για τα Τ-λεμφοκύτταρα μνήμης, διαμορφώνοντας με αυτόν τον τρόπο έναν πιθανό μηχανισμό συμβολής των AOPPs στην εξέλιξη της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση (Faller, Douglas and Steven, 1995; Peng *et al.*, 2006). Μάλιστα, η in vivo χορήγηση AOPPs (προερχόμενη από αλβουμίνη λαγών) συσχετίστηκε με την αύξηση των επιπέδων TNF-α και αύξηση της διήθησης των μακροφάγων στις αθηρωματικές πλάκες υπερχοληστεριναιμικών ποντικών (Shang *et al.*, 2006). Παράλληλα, η in vivo χορήγηση AOPPs (προερχόμενη από την τροποποίηση της αλβουμίνης ποντικών (RSA), AOPP-RSA) συσχετίστηκε με τη διήθηση των νεφρών από μακροφάγα και αύξηση της συγκεντρωσης της MCP-1 και του παράγοντα αύξησης όγκων β1 (TGF-β1) στο νεφρικό φλοιό ποντικών (Hong *et al.*, 2007). Η in vitro χορήγηση AOPP-RSA σε καλλιέργειες λιποκυττάρων ποντικών συσχετίστηκε με αύξηση της φλεγμονώδους απάντησης των λιποκυττάρων και έκκριση TNF-α και IL-6 μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και ταυτόχρονα, με αύξηση της ινσουλινοαντίστασης των λιποκυττάρων και με τη βλάβη των κυττάρων, λόγω του οξειδωτικού στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, στο οποίο οδήγησε η παραγωγή των ROS από την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης (Q. G. Zhou *et al.*, 2010). Μάλιστα, μελέτη που συνδυάζει τους μηχανισμούς δράσης των AOPPs, που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής, σημειώνει, ότι η in vitro χορήγηση AOPPs (προερχόμενων από in vitro επεξεργασία βόειας αλβουμίνης) σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων εγγύς νεφρικών σωληναρίων προκαλεί

υπερτροφία των κυττάρων και επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) των κυττάρων μέσω της πρόκλησης στρες του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, από την αύξηση της δράσης της NADPH οξειδάσης και την παραγωγή των ROS (Tang *et al.*, 2015). Τέλος, τα AOPPs φαίνεται να προκαλούν διαταραχές του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων, καθώς τόσο η in vivo χορήγηση τους σε ποντικούς που υπέστη μερική ηπατεκτομή (φυσιολογικά μετά από ηπατεκτομή τα ηπατοκύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται (Kohjima *et al.*, 2013; Uriarte *et al.*, 2013)), όσο και η in vitro χορήγηση τους σε καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων οδήγησε στη διακοπή του κύκλου ζωής των αναγεννούμενων κυττάρων στην φάση S, μέσω της ενδοκυττάριας παραγωγής ROS (από την ενεργοποίηση των NOX1 και NOX4) και της επίδρασης τους στο μονοπάτι της β-κατενίνης και της κινάσης εξαρτώμενη από κυκλίνη (CDK2) (τα ROS προκάλεσαν μείωση της έκφρασης της β-κατενίνης και των συμπλόκων κυκλίνης A/CDK2) (Sun *et al.*, 2018).

Τα AOPPs φαίνεται να προκαλούν ιστικές βλάβες και φλεγμονή στους ιστούς, μέσω πρόσδεσής τους στους υποδοχείς των προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (RAGE), οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των επιθηλιακών, νευρικών, αγγειακών και φλεγμονωδών κυττάρων και η συγκέντρωση τους αυξάνεται σε συνθήκες φλεγμονής ή οξειδωτικού στρες (Guo *et al.*, 2008; Yan, Ramasamy and Schmidt, 2010). Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) αποτελούν μόρια υψηλής δραστικότητας, τα οποία σχηματίζονται από τη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων, με παρόμοια χαρακτηριστικά με τα AOPPs, όσον αφορά τον σχηματισμό τους και την βιολογική τους δράση (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Kalousová, Škrha and Zima, 2002), τα οποία μέσω της πρόσδεσης τους στους υποδοχείς RAGE της επιφάνειας των κυττάρων ενεργοποιούν μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και μέσω της ενεργοποίησης της MAPK, του NF-κB και της NADPH οξειδάσης, προκαλούν φλεγμονή και πυροδοτούν το ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες (Schmidt *et al.*, 1992, 1995; Lander *et al.*, 1997; Wautier *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003). Ο in vitro ενοφθαλμισμός AOPPs (σχηματισμένα in vitro από HSA ή προερχομένων από το πλάσμα ασθενών με XNN) σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας οδήγησε σε αύξηση των ενδοκυττάριων ROS προερχόμενων από την NADPH οξειδάση (NOX2, NOX4), μέσω της ενεργοποίησης των RAGE υποδοχέων και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και παράλληλα, η προσκόλληση των AOPPs στους υποδοχείς RAGE πυροδότησε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που περιλαμβάνουν την ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα κινάση 1/2 (ERK 1/2), την p38 MAPK και τον NF-κB και τελικά, την αύξηση της έκφρασης των VCAM-

1 και ICAM-1 (Guo *et al.*, 2008). Ακόμα, μια πιο πρόσφατη μελέτη σημειώνει, ότι τα AOPPs προκαλούν θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων ποντικών, μέσω πρόσδεσής τους στους RAGE και της δράσης στις πρωτεΐνες- συνδετήρες CIKS του γονιδίου TRAF3IP2 (Valente *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, AOPP-RSA χορηγούμενα in vitro στα μυοκαρδιακά κύτταρα ποντικών φαίνεται να προκαλούν οξειδωτικό στρες, μέσω της ενεργοποίησης της NOX2 και της παραγωγής οξειδωτικών μορίων (O_2^- και H_2O_2), τα οποία οδηγούν στην αύξηση της έκφρασης του TRAF3IP2 και την ενεργοποίηση της JNK, η οποία, πρώτον, θα οδηγήσει σε αποδέσμευση της Bax πρωτεΐνης (της οικογένειας bcl-2) από την 14-3-3 πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος και μετακίνηση της πρώτης στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο και δεύτερον, θα ενεργοποιήσει την c-jun πρωτεΐνη, η οποία με τον c-FOS σχηματίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (πρωτεΐνη ενεργοποίησης -1), η οποία οδηγεί στην κυτταρική απόπτωση (Nomura *et al.*, 2003; Tsuruta *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2013). Τα AOPPs στους νεφρούς (χορηγούμενα in vitro σε καλλιέργειες νεφρικών κυττάρων και in vivo σε ποντικούς) φαίνεται να προκαλούν καταστροφή των ποδοκυττάρων, μέσω της δράσης τους στους υποδοχείς RAGE, τόσο προκαλλώντας οξειδωτικό στρες με την ενεργοποίηση της PKCα και στη συνέχεια της NADPH οξειδάσης, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό των O_2^-, όσο και μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού κυτταρικής απόπτωσης p53/Bax/κασπάση-3 (Li Zhou *et al.*, 2009; Liu, 2009; Zhou *et al.*, 2012).

Τέλος, σημαντικός υποδοχέας των AOPPs αποτελεί η διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD36 των κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (Iwao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013). Η in vivo χορήγηση AOPPs σε ποντικούς και ο in vitro ενοφθαλμισμός AOPP-HSA συσχετίστηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάριων ROS, λόγω της αύξησης της δράσης της NADPH οξειδάσης, μεσολαβούμενη από την ενεργοποιημένη PKCα (Iwao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ενδοκυττάριων ROS συσχετίστηκαν αφενός, με την αύξηση της συγκέντρωσης του TGF-β1 (Iwao *et al.*, 2008) και αφετέρου, με την ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, μέσω της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AR-1 (Cao *et al.*, 2013).

2.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ AOPPs ΣΤΗ ΝC

Λαμβάνοντας υπόψη τους μηχανισμούς δράσης των AOPPs σε διάφορους ιστούς, το επόμενο ερώτημα, που ενδέχεται απάντηση, σχετίζεται με τη δράση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στο εντερικό τοίχωμα και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα οποία αποτελούν μία μονή στιβάδα κυττάρων, που συνδέονται με τα γειτονικά κύτταρα με τις στενές συνδέσεις (tight junctions) διαμορφώνοντας τον εντερικό φραγμό, ο οποίος εμποδίζει την είσοδο των μικροβίων και των τοξινών στο τοίχωμα του εντέρου και την κυκλοφορία (Marchiando *et al.*, 2011). Η χρόνια in vivo χορήγηση των AOPPs (σχηματισμένων in vitro από αλβουμίνη ποντικών) σε υγιείς ποντικούς συσχετίστηκε με αύξηση της εναπόθεσης των AOPPs στα λαχνωτά επιθηλιακά κύτταρα, στις κρύπτες και στα λεμφοκύτταρα του χορίου, κυρίως στην περιοχή του τελικού ειλεού και λιγότερο στο κόλον και οδήγησε σε φλεγμονώδεις αλλοιώσεις του τοιχώματος του εντέρου, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από βράχυνση των εντερικών λαχνών, διήθηση του εντερικού τοιχώματος από κύτταρα φλεγμονής και νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων (Xie *et al.*, 2014). Όσον αφορά τον μηχανισμό με τον οποίο τα AOPPs οδήγησαν στην νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων, στην ίδια μελέτη συσχετίστηκαν τα αυξημένα επίπεδα των εξωκυττάριων AOPPs (τόσο in vitro σε καλλιέργειες κυττάρων, όσο και in vivo) με την αύξηση των επιπέδων των ενδοκυττάριων ROS (προερχόμενα απο την αυξημένη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης), τα οποία πυροδότησαν την φωσφορυλίωση της JNK και στη συνέχεια την ενεργοποίηση της poly (ADP-ριβόζης) πολυμεράσης 1 (PARP-1) (Xie *et al.*, 2014), αλλά όχι της κασπάσης-3, όπως παρατηρήθηκε σε μελέτες παραπάνω. Το πυρηνικό ένζυμο PARP-1, ενώ σε συνθήκες ηρεμίας διευκολύνει την επιδιόρθωση του DNA, σε καταστάσεις φλεγμονής και οξειδωτικού στρες συμβάλλει, μέσω της παραγωγής H_2O_2, στην έκκριση του παράγοντα που προκαλεί την κυτταρική απόπτωση (AIF) από τα μιτοχόνδρια, ο οποίος δρά στον πυρήνα του κυττάρου, οδηγώντας το στον κυτταρικό θάνατο (Yu *et al.*, 2002).

Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) αντιπροσωπεύει την αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων προς κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου, η οποία παρατηρείται σε καταστάσεις φλεγμονής και επούλωσης των ιστών, μέσω της ενεργοποίησης των ινοβλαστών, αλλά μπορεί να οδηγήσει και στην ίνωση των ιστών (Kalluri and Weinberg, 2009). Η EMT σχετίζεται με επιπλοκές της NC, όπως την ίνωση του εντερικού τοιχώματος και τα συρίγγια (Botaille *et al.*, 2008; Rieder *et al.*, 2011). Πρόσφατη μελέτη συσχετίζει την παρουσία δεικτών EMT στον εντερικό ιστό

ασθενών με NC μετά από εντερεκτομή με τμήματα του εντέρου που έχουν υποστεί ίνωση (Xu *et al.*, 2017). Μάλιστα, αναφέρει θετική συσχέτιση των επιπέδων των εξωκυττάριων AOPPs με την έκφραση της βιμεντίνης (εκπρόσωπος των μεσεγχυματικών κυττάρων) και αρνητική συσχέτιση των AOPPs με την έκφραση της E-καντχερίνης (εκπρόσωπος των επιθηλιακών κυττάρων) στους ιστούς με αλλοιώσεις χαρακτηριστικές για την NC (Xu *et al.*, 2017). Για την διερεύνηση του τρόπου, με τον οποίο τα AOPPs συμβάλλουν στην EMT, η ίδια επιστημονική ομάδα, μετά από τον in vitro ενοφθαλμισμό της καλλιέργειας εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και την in vivo χορήγηση AOPP-RSA σε υγιείς ποντικούς για 12 εβδομάδες, σημειώνει την πρόκληση EMT των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB p65, από την αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάριων ROS, που προήλθαν από την αυξημένη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης, στην ενεργοποίηση της οποίας συνέβαλε η φωσφορυλίωση της PKC δ από τα AOPPs (Xu *et al.*, 2017).

Πολύ πρόσφατη μελέτη εμπλέκει τους υποδοχείς RAGE και CD36 της επιφάνειας των εντεροεπιθηλιακών κυττάρων με τα AOPPs και την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Shi *et al.*, 2019). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση των AOPP-RSA σε υγιείς ποντικούς και σε καλλιέργειες εντερικών επιθηλιακών κυττάρων ποντικών οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων RAGE και CD36 της επιφάνειας των κυττάρων, στην ενεργοποίηση της JNK, στην αύξηση της έκφρασης της p27kip1 πρωτεΐνης (ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKI) και αποτελεί αρνητικός ρυθμιστής της G1 προόδου του κυτταρικού κύκλου, μέσω της δέσμευσής της στην CDK (Polyak *et al.*, 1994)) και στη μείωση της έκφρασης των συμπλεγμάτων κυκλίνης E- CDK (προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) με τελικό αποτέλεσμα, την διακοπή του κυτταρικού κύκλου των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων στη φάση G1 (Shi *et al.*, 2019).

Τέλος, το 2016 ερευνητές προσπάθησαν να ερμηνεύσουν την εξωεντερική εκδήλωση της οστεοπόρωσης σε ασθενείς με ΙΦΝΕ χορηγώντας AOPP-RSA, σε καλλιέργειες Caco-2 ανθρώπινων κυττάρων παχέος εντέρου με αδενοκαρκίνωμα και in vivo σε υγιείς ποντικούς (Wu *et al.*, 2015). Παρατηρήθηκε, η μείωση της έκφρασης των διαύλων μεταφοράς ασβεστίου, τόσο στις καλλιέργειες των Caco-2 κυττάρων, όσο και στα κύτταρα του δωδεκαδακτύλου των ποντικών (χωρίς, ωστόσο να μειωθεί η συγκέντρωση του ασβεστίου του ορού, ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα της παραθορμόνης και της 1,25-(OH)2D3) μέσω της φωσφορυλίωσης της p42/44 MAPK, γεγονός

που οδηγεί στη μείωση του προσλαμβανόμενου ασβέστιου από το εντερικό τοίχωμα, μετά από την χορήγηση των AOPPs (Wu *et al.*, 2015).

Σε επιδημιολογική μελέτη ασθενών με ΙΦΝΕ, ο προφλεγμονώδης ρόλος των AOPPs φαίνεται από την θετική τους συσχέτιση με την ΤΚΕ (ασθενείς με NC: r=0.53, P<0.001, ασθενείς με ΕΚ: r=0.35, P=0.004), την IL6 (ασθενείς με NC: r=0.36, P=0.014, ασθενείς με ΕΚ: r=0.30, P=0.018), τα λευκοκύτταρα (μόνο ασθενείς με NC: r=0.33, P=0.024) και τα αιμοπετάλια (μόνο σε ασθενείς με NC: r=0.38, P=0.009) (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008).

2.4 Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ AOPPs

Αρχικά, τα αυξημένα επίπεδα των AOPPs παρατηρήθηκαν στο πλάσμα ασθενών με ΧΝΝ (Witko-Sarsat *et al.*, 1996, 1998; Šebeková *et al.*, 2012). Αυξημένα τα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος παρατηρούνται και σε άλλα νοσήματα, στα οποία παρατηρείται χρόνια φλεγμονή, όπως επί παραδείγματι σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και II (Kalousová, Škrha and Zima, 2002; Martín-Gallán *et al.*, 2003; Piwowar, Knapik-Kordecka and Warwas, 2009), σε παχύσαρκους (Atabek *et al.*, 2006), σε ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα (C Yazici *et al.*, 2004), σε ασθενείς με νόσο Behcet (C. Yazici *et al.*, 2004), σε άτομα με στεφανιαία νόσο (Kaneda *et al.*, 2002; Skvarilova *et al.*, 2005), σε ασθενείς με αναζωπύρωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (F. L. Zhou *et al.*, 2010), σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο (Chang *et al.*, 2008), χρόνια ηπατίτιδα C (Özenirler *et al.*, 2011) και σε ασθενείς με αποφρακτική άπνοια του ύπνου (Passali *et al.*, 2015).

Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν τα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος με την εκδήλωση των ΙΦΝΕ. Στην μοναδική μέχρι στιγμής προοπτική μελέτη παρατήρησης του 2008, παρατηρήθηκε αυξημένη η συγκέντρωση των AOPPs στο πλάσμα 68 ασθενών με ενεργή και ανενεργή ΕΚ (1.815 μmol/g, P=0.013 και 1.778 μmol/g, P=0.053 αντίστοιχα) και 38 ασθενών με ενεργή NC (1.847 μmol/g, P=0.003) χωρίς συννοσηρότητα σε σχέση με 45 υγιείς εθελοντές (1.367 μmol/g) (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Στην ίδια μελέτη συσχετίστηκαν τα αυξημένα επίπεδα των AOPPs στο πλάσμα των ασθενών με ΕΚ με αυξημένα επίπεδα ΤΚΕ και IL-6, με τα αυξημένα επίπεδα των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων των ασθενών με NC και με τους ασθενείς που λάμβαναν κορτικοστεροειδή σε σχέση με εκείνους που δεν έλαβαν θεραπεία (η λήψη των κορτικοστεροειδών συσχετίζεται με σοβαρή νόσο) (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Ωστόσο, σημειώθηκε μη στατιστικά

σημαντική αδύναμη θετική συσχέτιση μεταξύ των AOPPs και και της CRP, ενώ φαίνεται να είναι χαμηλότερη η διαγνωστική αξία των AOPPs σε σχέση με την διαγνωστική δύναμη της CRP στη διάκριση μεταξύ ασθενών με ΙΦΝΕ και της ομάδας ελέγχου (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Τρεις πρόσφατες συγχρονικές μελέτες παρατήρησης αναφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων AOPPs του πλάσματος σε 92 ασθενείς με σοβαρή NC, που ενδείκνυνται χειρουργική θεραπεία (2 (1.1-3.5) μmol/g, P<0.01, 11.25 (5.02-15.15) μmol/g, P<0.0001 και 3.25 (2-5.5) μmol/g, P<0.01 αντίστοιχα) σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό των ομάδων ελέγχου (1.35 (1-1.8), 1.36 (0.75–2.70) και 1.25(0.5-2) μmol/g αντίστοιχα) (Xu *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019). Ωστόσο, στην μελέτη της Luceri C. και συνεργατών δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με NC και του δείκτη ενεργότητας της NC (CDAI) και τα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με NC που λάμβαναν μεσαλαζίνη ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερα σε σχέση με εκείνων που δεν λάμβαναν μεσαλαζίνη (πιθανόν λόγω της αντιφλεγμονώδους και της αντιοξειδωτικής της δράσης (Reifen *et al.*, 2004)) (Luceri *et al.*, 2019). Όσον αφορά τα AOPPs σε ασθενείς με ΕΚ,ενώ δύο συγχρονικές μελέτες παρατήρησης αναφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων AOPPs στο πλάσμα 60 ασθενών με ΕΚ (287.0±119.6 μmol/L, p=0.004 και 145.94 ± 29.86 μmol/L, p<0.002 αντίστοιχα) σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (182.6±66.0 μmol/L και 128.95 ± 3.06 μmol/L αντίστοιχα) (Baskol *et al.*, 2008; Hamouda *et al.*, 2011), μια πρόσφατη συγχρονική μελέτη σημειώνει ότι μόνο 33 ασθενείς με ενεργό ΕΚ έχουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων AOPPs του πλάσματος (148.72±9.08 μmol/L, , p<0.05) σε σχέση με 26 ασθενείς με ανενεργό ΕΚ (74.48±7.06 μmol/L) και τον υγιή πληθυσμό της ομάδας ελέγχου (64.93±2.55 μmol/L) (Alagozlu *et al.*, 2013). Παρά το γεγονός ότι στη συγχρονική μελέτη του Baskol M. και των συνεργατών δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με ΕΚ και την σοβαρότητα και την έκταση της νόσου (Baskol *et al.*, 2008), στη μελέτη του Alagozlu H. και των συνεργατών σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των AOPPs του πλάσματος και του ενδοσκοπικού δείκτη ενεργότητας της νόσου (EAI) (Alagozlu *et al.*, 2013), ενώ, τέλος, στη μελέτη του Hamouda H.E. και των συνεργατών αναφέρονται στατιστικά σημαντικά υψηλότερα τα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος μεταξύ 15 ασθενών με ΕΚ και ήπια-μέτρια δυσπλασία παχέος εντέρου (192.21 ± 46.71 μmol/L, p<0.002) σε σχέση με 15 ασθενείς με ΕΚ χωρίς δυσπλασία (145.94 ± 29.86 μmol/L) (Hamouda *et al.*, 2011).

Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν, προκύπτουν κλινικά ερωτήματα σχετικά με την χρησιμότητα των επιπέδων AOPPs του πλάσματος ή/και των ιστών: α) στη διάγνωση ασθενών με ΙΦΝΕ σε σχέση με άλλους δείκτες, όπως η CRP, η καλπροτεκτίνη και η λακτοφερίνη, β) στην αναγνώριση αναζωπύρωσης ή/και ύφεσης της ΕΚ και της ΝC, γ) στον προσδιορισμό της έκτασης, δ) της εντόπισης στον εντερικό σωλήνα και ε) της σοβαρότητας των ΙΦΝΕ και στ) στην συσχέτιση με την φαρμακευτική αγωγή και την ιστική αποκατάσταση.

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

3.1 Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, τα AOPPs αποτελούν προϊόν του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΝC και παράλληλα συμβάλουν στην ιστική βλάβη του εντερικού βλεννογόνου μέσω της παραγωγής μορίων οξείδωσης και επιδείνωσης της φλεγμονής. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία τα επίπεδα των AOPPs στους ιστούς και στο πλάσμα πειραματόζωων και ασθενών με ΝC είναι αυξημένα και συσχετίστηκαν με την CRP, την IL-6 και με την σοβαρότητα της νόσου. Ωστόσο, μέχρι στιγμής η βιβλιογραφία περιλαμβάνει μικρό αριθμό ασθενών με ΝC, ενώ δεν έχουν εκτιμηθεί τα επίπεδα των AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC.

Ο σκοπός της διπλωματικής διατριβής είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων των AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC. Πιο συγκεκριμένα, ο στόχος της μελέτης είναι η μέτρηση των επιπέδων των AOPPs στον ορό ασθενών με ενεργό και ανενεργό ΝC και η συσχέτιση τους με δείκτες που σχετίζονται με τη νόσο, όπως δείκτες ενεργότητας, άλλους δείκτες οξείδωσης και δείκτες φλεγμονής.

3.2 Ο ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η έρευνα διεξήχθη από το Μάιο του 2016 έως τον Ιούνιο του 2017, μετά από την έγκριση του πρωτοκόλλου της μελέτης από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι (1975). Οι ασθενείς ενημερώθηκαν για την συμμετοχή τους

στην έρευνα και συμφώνησαν εγγράφως. Στην μελέτη στρατολογήθηκαν ασθενείς ηλικίας από 18 έως 65 ετών με διαγνωσμένη NC (επιβεβαιωμένη με ενδοσκόπηση και βιοψία) μετά από ανακοίνωση του συλλόγου ατόμων με NC.

3.3 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ/ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ

Η στρατολόγηση και η ενημέρωση των ασθενών με επιβεβαιωμένη NC σε έξαρση ή σε ύφεση, πραγματοποιήθηκε από ειδικούς γαστρεντερολόγους και επιστημονικά υπεύθυνους της έρευνας, οι οποίοι αξιολόγησαν την συμμετοχή των ασθενών στη μελέτη βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 1.

Κριτήρια Ένταξης	Κριτήρια Αποκλεισμού
Ηλικία: 18-65 ετών	Ενδοκοιλιακό απόστημα ή συρίγγιο με κλινική ή ακτινολογική ένδειξη αποστήματος
Διαγνωσμένη NC	Καλλιέργεια κοπράνων θετική σε εντερικά παθογόνα ή στην τοξίνη του Clostridium difficile
	Χειρουργική θεραπεία 3 μήνες ή λιγότερο πριν τη μελέτη
	Σύνδρομο βραχέος εντέρου
	Ειλεοστομία ή κολοστομία
	Εντερική ή παρεντερική διατροφή
	Κατάχρηση φαρμάκων
	Ψυχιατρικές Διαταραχές
	Χρήση κανναβινοειδών και μη ναρκωτικών ουσιών
	Κατάχρηση αλκοόλ
	Λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων

	Χρήση βιταμινούχων ή ανόργανων συμπληρωμάτων 6 μήνες ή λιγότερο πριν τη μελέτη
	Καρδιαγγειακά νοσήματα, Ιστορικό απόφραξης του μυοκαρδίου, Στηθάγχη
	Νεοπλασματική νόσος το προηγούμενο έτος
	Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
	Εγκυμοσύνη
	Θηλασμός
	Πεπτικό έλκος
	Χορτοφαγία ή μακροβιοτική δίαιτα 6 μήνες πριν ή λιγότερο και κατά την διάρκεια της μελέτης

Πίνακας 1: Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού στη μελέτη

3.4 Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η αξιολόγηση των ασθενών περιλάμβανε τα ακόλουθα:

1. Ενημέρωση των ασθενών για το στόχο και το είδος της μελέτης και λεπτομερή περιγραφή της πορείας του πρωτοκόλλου με ενυπόγραφη συγκατάθεση συμμετοχής στη μελέτη.
2. Λήψη ιατρικού ιστορικού από ειδικούς γαστρεντερολόγους της επιστημονικής ομάδας, το οποίο αφορούσε τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, την κλινική τους εικόνα (ατομικό και οικογενειακό ιστορικό), την ηλικία διάγνωσης, τη διάρκεια, την ενεργότητα και την εντόπιση της νόσου, τις επιπλοκές, τις εξωεντερικές εκδηλώσεις και τη θεραπεία της νόσου, τις καπνιστικές συνήθειες των εθελοντών και την κατανάλωση αλκοόλ.
3. Συμπλήρωση ερωτηματολογίων που αξιολογούν την ενεργότητα και τη σοβαρότητα της NC (HBI) και την ποιότητα της ζωής των ασθενών (IBDQ).
4. Τυπική αιμοληψία (20mL) των ασθενών με vacutainer με και χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα για την λήψη πλάσματος και ορού, αντίστοιχα και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για το διαχωρισμό του πλάσματος και του ορού και αφού παραλήφθηκαν με πιπέτα σε Eppendorf 1,5 mL τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική εκτέλεση των αναλύσεων.

5. Χρήση αυτόματου βιοχημικού αναλυτή (BS 200E, MINDRAY) για τη διεκπεραίωση εργαστηριακών αναλύσεων και την εκτίμηση των ακολούθων:
    i. Γενική εξέταση αίματος
    ii. Σίδηρο ορού (Fe)
    iii. Γλυκόζη ορού
    iv. Ολική χοληστερόλη
    v. Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL)
    vi. Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL)
    vii. Τριγλυκερίδια
    viii. Ινωδογόνο πλάσματος
6. Εργαστηριακές δοκιμασίες ρουτίνας για την εκτίμηση των ακολούθων:
    i. Αμυλάση ορού
    ii. Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)
    iii. Γλουταμινική οξαλοξεική τρανσαμινάση (SGOT)
    iv. Γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT)
    v. Γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT)
    vi. CRP
7. Εκτίμηση των επιπέδων ουρικού οξέος στον ορό με ενζυμική χρωματομετρική ανάλυση (uricase PAP, Biosis).
8. Ποσοτικοποίηση σε δείγματα κοπράνων με τη Δοκιμασία της Ενζυμο-συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (ELISA):
    i. Καλπροτεκτίνη (CAL)
    ii. Λυσοζύμη (LYS)
    iii. Ντιφενσίνη (DEF)
    iv. Λακτοφερίνη (LAC)
9. Μέτρηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IL-10 και IL-17) με τη μέθοδο ELISA.
10. Μέτρηση δεικτών οξείδωσης oxLDL, MPO με τη μέθοδο ELISA.
11. Μέτρηση των επιπέδων των AOPPs του ορού με την ανταγωνιστικού τύπου ELISA.

3.5 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μορίων σε βιολογικά υγρά μέσω της σχέσης πρόσδεσης αντιγόνων σε αντισώματα και την αλλαγή του χρώματος του προϊόντος, η οποία οφείλεται στην σύνδεση ενζύμου με υπόστρωμα (Hornbeck, 1992). Με την ELISA μπορούν να προσδιοριστούν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μορίων, όπως επί παραδείγματι πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, ορμονών, βιταμινών και φαρμάκων, καθώς τα μόρια παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα απέναντι στο αντίσωμα ή το αντιγόνο που σχηματίστηκε για αυτά (τα αντισώματα προσδένονται σε συγκεκριμένο αντιγόνο) (Hornbeck, 1992; Engvall, 2010). Η ELISA χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1971 από τους Engvall και Pelmann για την ποσοτική μέτρηση των IgG στον ορό πειραματόζωων και έκτοτε χρησιμοποιείται, τόσο για διαγνωστικούς λόγους στην κλινική πράξη, όσο και για ερευνητικούς λόγους (Lequin, 2005).

Διακρίνουμε 4 τύπους ELISA: α) την άμεση ELISA, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιγόνων υψηλού μοριακού βάρους, την έμμεση ELISA, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιγόνων, κυρίως στην ενδοκρινολογία, γ) τη sandwich ELISA, στην οποία το αντιγόνο που εκτιμάται πρέπει να έχει τουλάχιστον 2 θέσεις σύνδεσης (2 αντιγονικοί επίτοποι) με τα αντίστοιχα αντισώματα και έχει από 2 έως 5 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από τους άλλους τύπους και την ανταγωνιστικού τύπου ELISA (Aydin, 2015). Η μέτρηση των δεικτών φλεγμονής στο αίμα και στα κόπρανα των εθελοντών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική “sandwich” ELISA. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανταγωνιστικού τύπου ELISA για την εκτίμηση των επιπέδων των AOPPs στον ορό των εθελοντών.

3.5.1 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ELISA

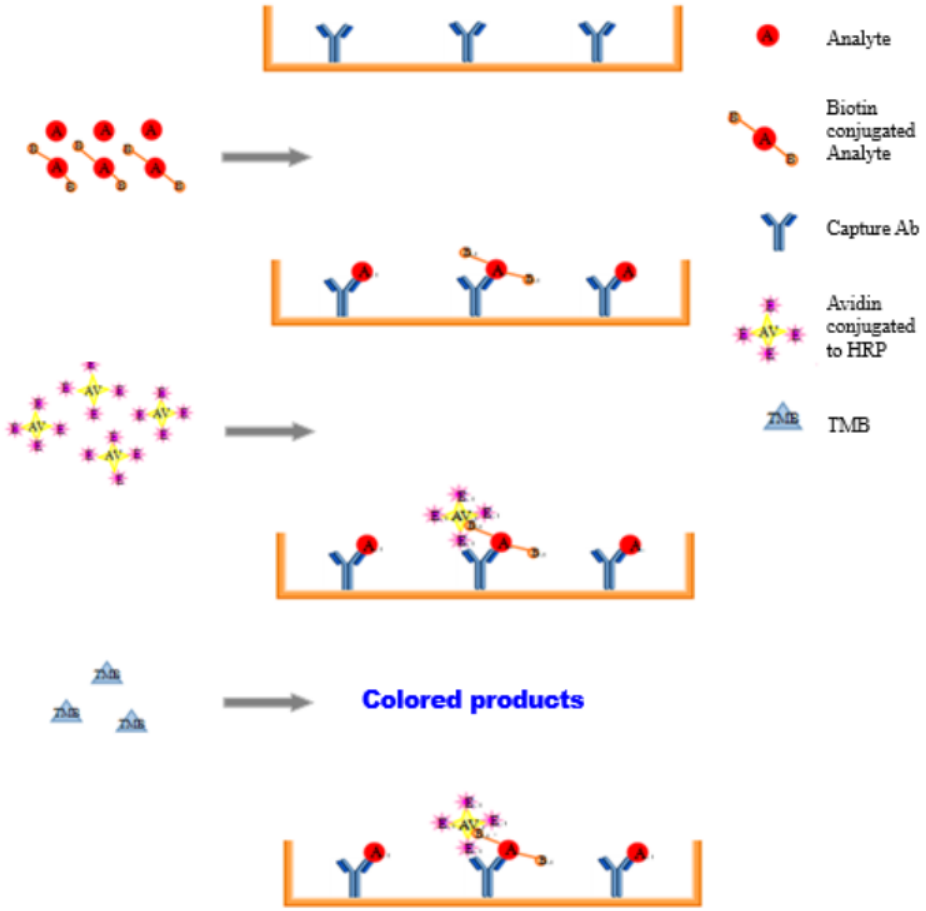
Η ανταγωνιστικού τύπου ELISA ανακαλύφθηκε το 1976 από την ερευνητική ομάδα του Yorde και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολύ μικρών πρωτεϊνικών μορίων με έναν αντιγονικό επίτοπο στο εκτιμώμενο δείγμα (Yorde *et al.*, 1976; Aydin, 2015). Στη συγκεκριμένη τεχνική οι πλάκες είναι επιστρωμένες με αντισώματα πρόσδεσης (capture antibodies) ειδικά για το αντιγόνο που πρόκειται να προσδιοριστεί. Το αντιγόνο του δείγματος, τη συγκέντρωση, του οποίου θέλουμε να προσδιορίσουμε και αντιγόνο σημασμένο με ένζυμο προστίθενται ταυτόχρονα στις πλάκες. Τα σημασμένα αντιγόνα ανταγωνίζονται τα μη σημασμένα αντιγόνα (του εκτιμώμενου δείγματος) κατά τη δέσμευσή τους στις ειδικές θέσεις των αντισωμάτων των πλακών και στη συνέχεια,

πραγματοποιείται επώαση και πλύση για την απομάκρυνση των μορίων που δεν δεσμεύτηκαν. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα, το οποίο πραγματοποιεί χρωματομετρική αντίδραση με το ένζυμο και ακολουθεί φασματοφωτομετρία στα 450nm . Η ένταση του χρωματισμένου προϊόντος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου του εκτιμώμενου δείγματος. Δηλαδή, όταν η συγκέντρωση του αντιγόνου του δείγματος είναι χαμηλή, τότε η συγκέντρωση του σημασμένου αντιγόνου είναι υψηλή, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εντονότερος χρωματισμός του δείγματος, υψηλή τιμή απορρόφησης και αντίστροφα (Aydin, 2015).

3.6 ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ELISA

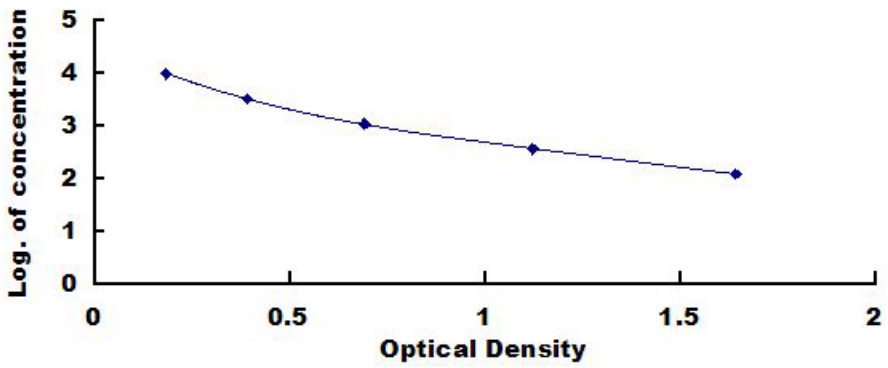
Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ELISA Kit for AOPPs της εταιρείας Cloud-Clone Corporation για τον ποσοτικό προσδιορισμό των AOPPs στον ορό ασθενών με NC. Επίσης, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των AOPPs σε μικρό δείγμα υγιών εθελοντών. Η αρχή της μεθόδου υπολογισμού της συγκέντρωσης των AOPPs με χρήση του συγκεκριμένου Kit περιλαμβάνει τη χρήση μικροπλακών (microwells), στα οποία έχει προηγηθεί προσκόλληση μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης ειδικών για τα AOPPs του ορού των ανθρώπων και των σημασμένων AOPPs (εικόνα 2). Στη συνέχεια, προστίθεται στις πλάκες ο ορός των εθελοντών (μη σημασμένα AOPPs, standards ή samples) και σημασμένα με βιοτίνη AOPPs (detection reagent A), τα οποία ανταγωνίζονται τη θέση πρόσδεσης στα αντισώματα των μικροπλακών. Ακολουθεί επώαση και πλύση των μικροπλακών και προσθήκη αβιδίνης συζευγμένη με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του φυτού Αρμοράκια (HRP) (detection reagent B), η οποία δεσμεύεται στη βιοτίνη των σημασμένων AOPPs. Συνεχίζουμε με επώαση και πλύση των μικροπλακών και προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB), με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου μπλε προϊόντος. Η ένταση του χρώματος, που παρατηρείται από την αντίδραση της HRP με το TMP είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης των AOPPs του δείγματος. Ακολουθεί τερματισμός της αντίδρασης με

την προσθήκη οξέος (Stop Solution) και αλλαγή του χρώματος του προϊόντος (κίτρινο) και μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm με το φωτόμετρο Biotek PowerWave XS2.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της ανταγωνιστικού τύπου ELISA.

Τέλος, προσδιορίζουμε τη λογαριθμική συγκέντρωση των AOPPs του δείγματος, αφού σχηματίσουμε την πρότυπη καμπύλη με γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των AOPPs βάσει της μέσης σχετικής απορρόφησης μετά από εκτίμηση 5 αραιωμένων πρότυπων δειγμάτων (standard AOPPs) (εικόνα 3).



Εικόνα 2: Πρότυπη καμπύλη λογαριθμικής συγκέντρωσης ανθρώπινων AOPPs.

3.6.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα είναι τα εξής: α) φωτόμετρο ELISA με φίλτρο 450 ±10 nm, β) αυτόματες μονοκάναλες και πολυκάναλες πιπέτες και tips, γ) vortex, δ) eppendorfs των 1,5 ml, ε) απιονισμένο νερό, στ) απορροφητικό χαρτί, ζ) φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) συγκέντρωσης 0,01mol/L, Ph 7.0-7.2, η) 1 θήκη 96 βοθρίων επικαλυμμένη με μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης, θ) 2 standard (πρότυπο), ι) standard διαλυτικό, ια) 120μL detection reagent A (βιοτίνη συζευγμένη με AOPPs), ιβ) 120μL detection reagent B (αβιδίνη συζευγμένη με HRP), ιγ) 9ml υπόστρωμα TMB, ιδ) 20ml buffer πλύσης, ιε) 12ml assay διαλυτικό A, ιστ) 12ml assay διαλυτικό B, ιζ) 6ml διαλύματος τερματισμού αντίδρασης και ιη) 4 συγκολλητικές ταινίες.

1. Αρχικά, πραγματοποιούμε την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, τα διαλύματα detection reagent A και B, το διάλυμα πλύσης και το διάλυμα του υποστρώματος σύμφωνα με της οδηγίες της εταιρείας.
2. Παράλληλα, πρέπει να παρασκευάσουμε τα δείγματα του ορού των εθελοντών με συγκέντρωση 1:5000. Αναμιγνύουμε 10μL ορού σε 490μL PBS με αποτέλεσμα την διαμόρφωση αραίωσης 1:50. Στη συνέχεια, τοποθετούμε 10μL διαλύματος αραίωσης 1:50 σε 990μL PBS και επιτυγχάνουμε αραίωση του δείγματος 1:5000.
3. Στη συνέχεια, τοποθετούμε 50μL από το κάθε πρότυπο (5 βοθρία), τυφλού (1 βοθρίο) και 50μL από το κάθε αραιωμένο δείγμα (77 βοθρία) στο πιάτο. Ακολουθεί, άμεσα ενοφθαλμισμός 50μL detection reagent A (βιοτίνη συζευγμένη με AOPPs) σε όλα τα βοθρία,

κάλυψη του πιάτου με συγκολλητικό χαρτί και ήπια ανάδευση και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.

4. Πλύσεις των βοθρίων με 350μL διαλύματος πλύσης (3 φορές).
5. Ακολουθεί ενοφθαλμισμός 100μL detection reagent B (αβιδίνη συζευγμένη με HRP) σε όλα τα βοθρία, κάλυψη με συγκολλητική ταινία, ήπια ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.
6. Επαναλαμβάνουμε πλύσεις των βοθρίων με 350μL διαλύματος πλύσης (5 φορές).
7. Προσθέτουμε σε κάθε βοθρίο 90μL υποστρώματος TMB (συμπεριλαμβανομένου του τυφλού), καλύπτουμε με συγκολλητική ταινία και χαρτί για προστασία από το έντονο φως και στη συνέχεια αναδεύουμε και επωάζουμε για περίπου 10-15 λεπτά στους 37°C, οπότε τα διαλύματα αποκτούν μπλε χρώση (παρατηρούμε κάθε 10 λεπτά και προχωράμε στο επόμενο βήμα όταν ο χρωματισμός είναι αρκετά έντονος).
8. Διακόπτουμε την παραπάνω αντίδραση με την προσθήκη 50μL διαλύματος τερματισμού αντίδρασης (stop solution) σε όλα τα βοθρία, οπότε το προϊόν χρωματίζεται κίτρινο.
9. Τελειώνουμε με μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο (ELISA reader) στα 490nm.

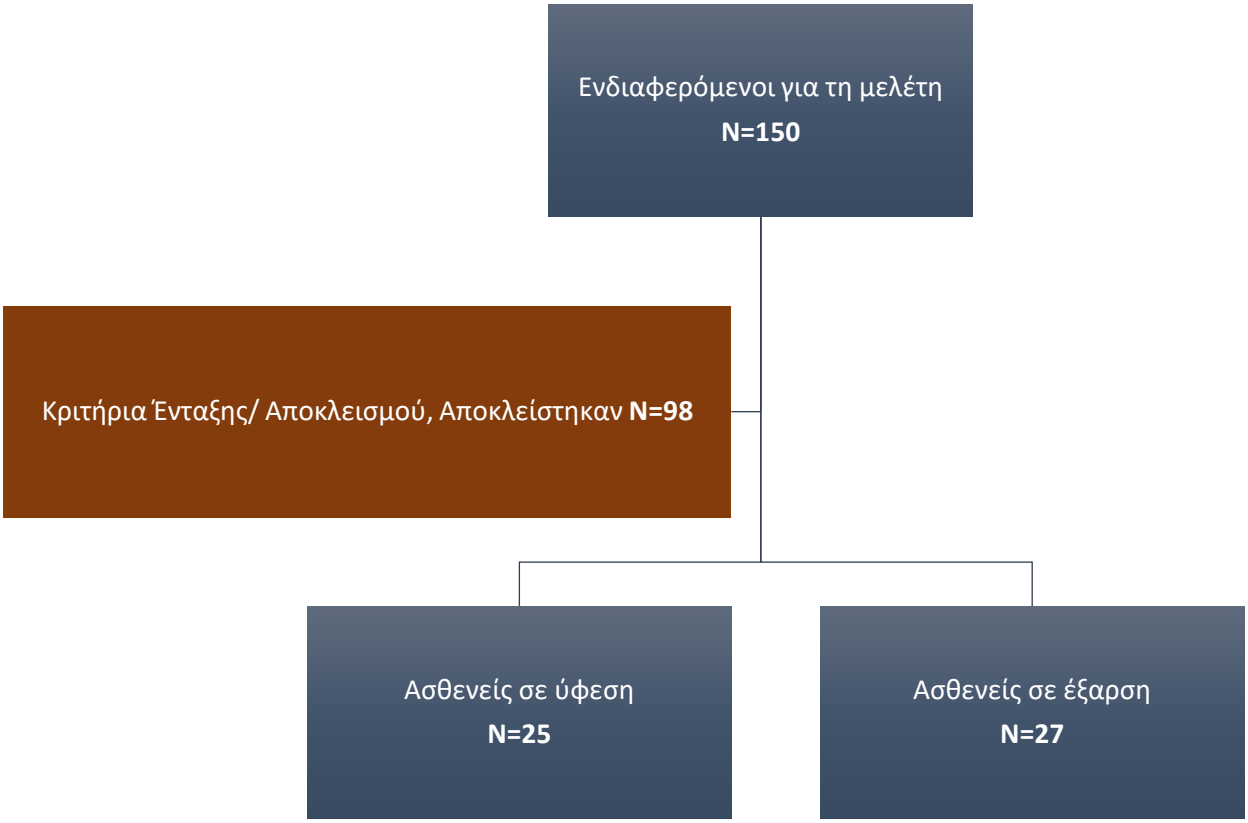
3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS (version 26.0) της εταιρείας IBM. Τα αποτελέσματα των ποσοτικών μεταβλητών παρατίθενται με τη μορφή του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης. Τα αποτελέσματα των ποιοτικών μεταβλητών παρουσιάζονται ως απόλυτες τιμές. Ορίστηκε, ως το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5% (Sig.=0,05). Ελέγχθηκε η κανονικότητα με τη μέθοδο Kolmogorov Smirnov και η σύγκριση των μέσων όρων για τις ποσοτικές παραμέτρους, που ακολουθούσαν κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε με το Independent Sample T-test. Η σύγκριση των μέσων όρων για τις ποσοτικές παραμέτρους, που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε με το Mann- Witney U test (σύγκριση μιας ποσοτικής μεταβλητής σε 2 κατηγορίες μιας ποιοτικής μεταβλητής) και με το Kruskall- Wallis (περισσότερες από 2 κατηγορίες ποιοτικής μεταβλητής). Ο έλεγχος της συσχέτισης των ποσοτικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Spearman και για όσες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατίθενται μοντέλα γραμμικής

παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό της σχέσης. Τέλος, το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης προσαρμόστηκε ως προς συγκεκριμένους συγχυτικούς παράγοντες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη προσκλήθηκαν 150 άτομα, και μετά από την αξιολόγησή τους, βάσει των κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού σχηματίστηκε το δείγμα προς μελέτη της διπλωματικής εργασίας, το οποίο αποτελείται από 52 ασθενείς με NC (27 ασθενείς σε έξαρση και 25 ασθενείς σε ύφεση της νόσου, διαγνωσμένοι με ενδοσκόπηση και βιοψίες) (εικόνα 4).



Εικόνα 3: Διάγραμμα ροής του πληθυσμού της μελέτης.

Στον πίνακα 2 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται οι μέσοι όροι της ηλικίας, του ΔΜΣ, της διάρκειας της νόσου, του IBDQ score και του HB score των ασθενών με NC αναλόγως της ενεργότητας της νόσου και οι μέσοι όροι της ηλικίας και του ΔΜΣ της ομάδας ελέγχου (πίνακας 2). Παράλληλα, σημειώνεται του φύλο, οι καπνιστικές συνήθειες και η εντόπιση της νόσου στο δείγμα της μελέτης (πίνακας 2).

Παράμετρος	Ασθενείς με Νόσο του Crohn		P
	Έξαρση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	**Ύφεση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση**	
Ηλικία (έτη)	40,2 ± 13,8	35 ± 10,9	0,180
ΔΜΣ (kg/m^2)	23,8 ± 5,7	24,9 ± 4,1	0,213
Διάρκεια Νόσου (έτη)	12,1 ± 9,3	9,3 ± 6,3	0,206
IBDQ	147,8 ± 22,7	176,2 ± 26,3	**<0.001***
HBI	7,4 ± 2,1	2,4 ± 1,3	**<0.001***
	N,(%)	**N,(%)**	
Φύλο: Γυναίκες	15 (55,6)	8 (32)	
Άνδρες	12 (44,4)	17 (68)	
Κάπνισμα: ΟΧΙ	16 (59,3)	18 (72)	
ΝΑΙ	11 (40,7)	7 (28)	
Εντόπιση της Νόσου:			
Κολίτιδα	-	1 (4)	
Ειλεοκολίτιδα	12 (44,4)	14 (56)	
Ειλεΐτιδα	11 (40,7)	5 (20)	
Αριστερού τύπου κολίτιδα	2 (7,4)	-	
Άλλη εντόπιση	2 (7,4)	5 (20)	
Λήψη Κορτιζόνης	13 (48,1)	7 (28)	

Πίνακας 2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι (Μ.Ο.) ± τυπική απόκλιση για τις συνεχείς μεταβλητές και απόλυτες και σχετικές συχνότητες για τις κατηγορικές μεταβλητές.

Παρατηρείται στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σκορ στο ερωτηματολογίου IBDQ των ασθενών με ΝC σε ύφεση (175,3 ± 27,9) σε σχέση με το σκορ των ασθενών με ΝC σε έξαρση (147,8 ± 22,7), το οποίο ερμηνεύεται από την χειρότερη ποιότητα ζωής των πρώτων. Σημειώθηκε υψηλότερη βαθμολογία του δείκτη ενεργότητας HBI μεταξύ των ασθενών με ΝC σε έξαρση (7,4 ± 2,1) σε σύγκριση με τη βαθμολογία των ασθενών με ΝC σε ύφεση (2,4 ± 1,3), το οποίο είναι αναμενόμενο, αφού HBI> 4 υποδηλώνει ενεργή νόσο.

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δεικτών, των δεικτών φλεγμονής και των δεικτών οξειδωτικού στρες του δείγματος μετά την αιμοληψία και την ανάλυση των κοπράνων απεικονίζονται στους πίνακες από 3 έως 5.

Παράμετρος	Ασθενείς με Έξαρση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	Ασθενείς με Ύφεση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	P
Αμυλάση (IU/L)	68 ± 19,3 (N=26)	77,6 ± 28,8 (N=25)	0,346
Σίδηρος (μg/dL)	53,8 ± 29,1 (N=26)	67,9 ± 32,2 (N=25)	0,103
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	0,3 ± 0,18 (N=26)	0,41 ± 0,18 (N=25)	**0,003***
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	0,14 ± 0,07 (N=26)	0,19 ± 0,08 (N=25)	**0,006***
SGOT (iu/L)	16,2 ± 9,7 (N=26)	19,7 ± 9,4 (N=25)	**0,031***
SGPT (iu/L)	19 ± 13 (N=26)	20 ± 8,9 (N=25)	0,364
γ-GT (iu/L)	19,8 ± 10,6 (N=26)	17 ± 8,9 (N=25)	0,345
Αλκαλική φωσφατάση (iu/L)	71,4 ± 24,8 (N=26)	63,2 ± 21,7 (N=25)	0,190
Γαλακτική αφυδρογονάση (iu/L)	145,2 ± 33,2 (N=26)	150,8 ± 31,2 (N=25)	0,537
Ουρία (mg/dL)	27,8 ± 8,4 (N=26)	32,2 ± 8,8 (N=25)	0,075
Ουρικό οξύ (mg/dL)	4,9 ± 1,8 (N=26)	5 ± 1,5 (N=24)	0,760
Γλυκόζη (mg/dL)	82,9 ± 12,7 (N=26)	89,4 ± 17,5 (N=25)	0,127
Χοληστερόλη (mg/dL)	177,2 ± 41.8 (N=26)	164,4 ± 35.9 (N=25)	0,246
HDL (mg/dL)	54 ± 13,9 (N=26)	50,7 ± 13 (N=25)	0,372
LDL (mg/dL)	97 ± 33.9 (N=26)	90,9 ± 33 (N=25)	0,522
TG (mg/dL)	130,8 ± 99,8 (N=26)	114,2 ± 67 (N=25)	0,291
Αλβουμίνη (g/dL)	3,7 ± 1,4 (N=22)	4,0 ± 1,1 (N=25)	0,183

Πίνακας 3: Εργαστηριακά και βιοχημικά αποτελέσματα του πληθυσμού της μελέτης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Δείκτες Φλεγμονής	Ασθενείς σε Έξαρση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	Ασθενείς σε Ύφεση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	P
IL-6 (pg/mL)	17,7 ± 15,9	5,3 ± 7,6	**<0,001***
IL-10 (pg/mL)	4,7 ± 1,5	5,7 ± 1,6	**0,007***
IL-17 (pg/mL)	21,7 ± 20,7	29,3 ± 21,8	0,161
CRP (mg/L)	8,6 ± 9,9	3,25 ± 4,8	**0,007***
Ινωδογόνο (mg/dL)	296,8 ± 78,9	240 ± 64,1	**0,009***
Δείκτες Φλεγμονής Κοπράνων			
Καλπροτεκτίνη (μg/g)	1348,5 ± 1300,5	601,6 ± 546,7	**0,023***
Λακτοφερίνη (μg/g)	127,8 ± 155,4	49,7 ± 74,3	**0,047***
Ντεφενσίνη (μg/g)	22,6 ± 27,8	12,5 ± 20,1	0,165
Λυσοζύμη (μg/g)	12,9 ± 9,2	11 ± 13	**0,020***

Πίνακας 4: Αποτελέσματα δεικτών φλεγμονής ορού και κοπράνων του πληθυσμού της μελέτης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Δείκτες Οξειδωτικού Στρες	Ασθενείς με Νόσο του Crohn		P
	Έξαρση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	Ύφεση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	
MPO (pg/mL)	80,3 ± 51,9	78,9 ±70,1	0,943
oxLDL (U/L)	149,4 ± 43,5	-	-
LAGTIME (sec)	3557,5 ± 1712,9	2391,4 ± 845,8	**<0,001***

Πίνακας 5: Αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες του πληθυσμού της μελέτης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 στους ασθενείς με NC σε έξαρση (17,7 ± 15,9 pg/mL) σε σχέση με αυτούς σε ύφεση (5,3 ± 7,6 pg/mL), η οποία ερμηνεύεται από την παθογένεια της νόσου (όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω) (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015), το οποίο συμφωνεί με παλαιότερη επιδημιολογική μελέτη (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008) (πίνακας 4). Μάλιστα, σημειώθηκαν υψηλότερα επίπεδα IL-10 μεταξύ των ασθενών με NC σε ύφεση σε σχέση με των ασθενών σε έξαρση (5,7 ± 1,6 pg/mL και 4,7 ± 1,5 pg/mL αντίστοιχα, p=0,007), το οποίο σχετίζεται με την αντιφλεγμονώδη δράση της κυτταροκίνης και το ρόλο της στην καταστολή της ανοσιακής απάντησης (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015) (πίνακας 4). Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης CRP και του ινωδογόνου στους ασθενείς με NC σε έξαρση (8,6 ± 9,9 mg/L και 296,8 ± 78,9 mg/dL αντίστοιχα) σε σχέση με τους ασθενείς σε ύφεση (3,25 ± 4,8 mg/L και 240 ± 64,2 mg/dL αντίστοιχα), το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς και τα δύο αποτελούν πρωτεΐνες οξείας φάσης, η τιμή των οποίων αυξάνεται

σε συνθήκες φλεγμονής (Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015; Bernstein *et al.*, 2016) και συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008; Beltŕan *et al.*, 2010) (πίνακας 4). Παράλληλα, σημειώνονται ελάχιστα υψηλότερες, αλλά στατιστικά σημαντικές τιμές της ολικής και της άμεσης χολερυθρίνης των ασθενών με NC σε ύφεση (0,41 ± 0,18 mg/dL και 0,19 ± 0,08 mg/dL αντίστοιχα) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των ασθενών σε έξαρση (0,3 ± 0,18 mg/dL και 0,14 ± 0,07 mg/dL αντίστοιχα) (πίνακας 3). Η διαφορά αυτή, πιθανόν, σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση της χολερυθρίνης στον οργανισμό (κυρίως έναντι του H_2O_2) (Harwell, 2007; Rahman *et al.*, 2012), ενώ η αντίστροφη συσχέτιση της τιμής της χολερυθρίνης του ορού των ασθενών με NC έχει επιβεβαιωθεί και σε πρόσφατες μελέτες (Leníček *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2019) (πίνακας 3) . Μικρή, αλλά, στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της SGOT μεταξύ των ασθενών με NC σε έξαρση (16,2 ± 9,7 iu/L) και σε ύφεση (19,7 ± 9,4 iu/L), κάτι, το οποίο, έχει παρατηρηθεί και σε παλαιότερες μελέτες ασθενών με ΙΦΝΕ (εκτιμάται ότι 11-49% ασθενών με ΙΦΝΕ έχουν αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών) (Heikius *et al.*, 1997; Mendes *et al.*, 2007; Cappello *et al.*, 2014) και, πιθανόν, σχετίζεται με τις ανεπιθύμητες ενέργειες της λαμβανόμενης φαρμακευτικής αγωγής (μικρότερη συσχέτιση με λήψη 5 αμινοσαλικυλικών και μεγαλύτερη συσχέτιση με τη λήψη θειοπουρινών) (Mendes *et al.*, 2007; Cappello *et al.*, 2014) και με εξωεντερικές εκδηλώσεις της NC (Heikius *et al.*, 1997; Danese *et al.*, 2005) (πίνακας 3). Όσον αφορά τους δείκτες φλεγμονής των κοπράνων, αποτελούν πιο ευαίσθητο δείκτη εντερικής φλεγμονής από την CRP και το ινωδογόνο (Mosli *et al.*, 2015) και στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρούνται αυξημένα τα επίπεδα καλπροτεκτίνης, λακτοφερίνης και λυσοζύμης στα κόπρανα ασθενών με NC σε έξαρση (1348,5 ± 1300,5 μg/g , 127,8 ± 155,4 μg/g και 12,9 ± 9,2 μg/g αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των ασθενών σε ύφεση (601,6 ± 546,7 μg/g , 49,7 ± 74,3 μg/g και 11 ± 13 μg/g, p=0,023, p= 0,047 και p= 0,020 αντίστοιχα), κάτι, το οποίο ερμηνεύεται από την ενεργή φλεγμονή του εντέρου στους πρώτους σε σχέση με τους δεύτερους και την αυξημένη δραστηριότητα των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων του εντερικού σωλήνα (van der Sluys Veer *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2016) (πίνακας 4). Τέλος, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του χρόνου αντίστασης του ορού (LagTime) μεταξύ των ασθενών με ενεργό και ανενεργό NC (3557,5 ± 1712,9 sec και 2391,4 ± 845,8 sec αντίστοιχα, p=0.007), (πίνακας 5).

Στη συνέχεια, προχωράμε στον προσδιορισμό των AOPPs στον ορό του πληθυσμού της μελέτης. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των AOPPs στον ορό των ασθενών

με ΝC σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (25,5 ± 33,5 μg/ml και 23,5 ± 25,9 μg/ml αντίστοιχα, p>0.05), (πίνακας 6). Το αποτέλεσμα αυτό, δε συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες, στις οποίες οι ασθενείς με ΝC έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα AOPPs στο πλάσμα σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές (Xu *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019). Ωστόσο, στις μελέτες αυτές, όλοι οι ασθενείς με ΝC, που συμπεριλήφθηκαν είχαν σοβαρή κλινική εικόνα (Shi *et al.*, 2019) ή ένδειξη για χειρουργική θεραπεία (Xu *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2019), ενώ στη συγκεκριμένη μελέτη 25 από τους 52 ασθενείς με ΝC ήταν σε ύφεση ή σε μετρίου βαθμού έξαρση όταν πραγματοποιήθηκε η αιμοληψία.

Συνεχίζουμε με τον προσδιορισμό των επιπέδων των AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC σε έξαρση και σε ύφεση (πίνακας 7), και μεταξύ των προηγούμενων ομάδων και των υγιών εθελοντών (πίνακας 8).

Παράμετρος	**Ασθενείς με Νόσο του Crohn**	**Υγιείς**	**P**
	Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	**Μ.Ο ± τυπική απόκλιση**	
AOPPs (μg/ml)	25,5 ± 33,5	23,5 ± 25,9	0,913

Πίνακας 6: Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC και των υγιών εθελοντών. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Παράμετρος	**Ασθενείς με ΝC σε έξαρση**	**Ασθενείς με ΝC σε ύφεση**	**P**
	Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	**Μ.Ο ± τυπική απόκλιση**	
AOPPs (μg/ml)	23,2 ± 33,4	28 ± 34,1	0,956

Πίνακας 7: Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC σε ύφεση και έξαρση. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Παράμετρος	**Ασθενείς με Νόσο του Crohn**		**Υγιείς**	**P**
	Έξαρση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση	**Ύφεση Μ.Ο ± τυπική απόκλιση**	**Μ.Ο ± τυπική απόκλιση**	
AOPPs (μg/ml)	23,2 ± 33,4	28 ± 34,1	23,5 ± 25,9	0,990

Πίνακας 8: Σύγκριση επιπέδων AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC σε ύφεση και έξαρση και των υγιών εθελοντών. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των AOPPs του ορού μεταξύ των ασθενών σε ύφεση σε σχέση με τους ασθενείς σε έξαρση και την ομάδα ελέγχου (πίνακας 7 και 8). Παλαιότερες μελέτες, αναφέρουν υψηλότερα επίπεδα των AOPPs του πλάσματος ασθενών με σοβαρή ΝC σε σχέση με υγιείς πληθυσμούς (Xu *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν εκτιμούν ασθενείς με ΝC σε ύφεση και έχουν πολύ μικρούς πληθυσμούς ασθενών και ομάδας ελέγχου (Xu *et al.*, 2017; Luceri *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019). Πιθανή ερμηνεία των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων αποτελεί το γεγονός ότι μεταξύ των ασθενών με ενεργή ΝC παρατηρήθηκε ήπια-μέτρια ενεργότητα της νόσου (ΜΟ±Τ.Α. HBI σκορ ασθενών με ΝC σε έξαρση 7,4 ± 2,1 και HBI σκορ ασθενών με ΝC σε ύφεση 2,3 ± 1,3). Άλλη πιθανή ερμηνεία αποτελεί το γεγονός της μειωμένης διαθεσιμότητας της αλβουμίνης στο πλάσμα των ασθενών με ενεργό ΝC (έως 80% των ασθενών με ΝC σε έξαρση), λόγω της αυξημένης ενεργειακής δαπάνης (ενεργή φλεγμονή), της μειωμένης ενεργειακής πρόσληψης (μειωμένη όρεξη, δυσαπορρόφηση, απώλεια θρεπτικών ουσιών), της δράσης της, ως αντιοξειδωτικό μόριο και την πιθανή συμβολή της φαμακευτικής αγωγής που λαμβάνει ο ασθενής (O'Sullivan and O'Morain, 2006; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκαν στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα αλβουμίνης στον ορό ασθενών με ΝC (3,9 ± 1,2) σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές (4,9 ± 0,3, $p<0,001$), χωρίς να διακρίνουμε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της αλβουμίνης στο πλάσμα ασθενών με ΝC σε έξαρση σε σχέση με τα επίπεδα των ασθενών σε ύφεση (πίνακας 3). Παλαιότερη μελέτη προσδιορίζει τον λόγο των AOPPs του πλάσματος ασθενών με ΝC προς τα επίπεδα της λευκωματίνης (rAOPPs) του πλάσματος, αξιολογώντας κατ' αυτό τον τρόπο την αναλογία των οξειδωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται, ότι μεταξύ των ασθενών με ΝC τα επίπεδα των rAOPPs του πλάσματος των ασθενών υπό φαρμακευτική αγωγή με κορτικοστεροειδή είχαν υψηλότερα επίπεδα rAOPPs πλάσματος σε σχέση με ασθενείς, που δεν λάμβαναν θεραπεία με κορτικοστεροειδή, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα μεταξύ ασθενών που λάμβαναν αζαθειοπρίνη. Τέλος, πιθανός περιορισμός είναι ο μικρός αριθμός υγιών εθελοντών της μελέτης για τη σύγκριση με τους ασθενείς. Επομένως, τα επίπεδα των AOPPs στον ορό ασθενών με ΝC δεν είναι πάντα αυξημένα. Παράλληλα, δεν αποκλείεται η λευκωματίνη του ορού να αποτελεί το κύριο υπόστρωμα του σχηματισμού των AOPPs.

Στη συνέχεια ελέγχουμε τη σχέση των επιπέδων των AOPPs των ασθενών με NC (πίνακας 9) ξεχωριστά, με τις μεταβλητές της μελέτης με τη χρήση της μεθόδου Spearman.

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn						
AOPPs	**Ηλικία**	**ΔΜΣ**	**Διάρκεια νόσου**	**Εντόπιση νόσου**	**Κάπνισμα**	**IBDQ**	**HBI**
Συντελεστής Συσχέτισης	0.018	-0.138	0.023	-0.134	0.030	-0.101	0.175
P	0.901	0.338	0.873	0.344	0.834	0.488	0.214

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn						
AOPPs	**IL-6**	**IL-10**	**IL-17**	**MPO**	**OXLDL**	**CRP**	**Ινωδογόνο**
Συντελεστής Συσχέτισης	**-0.277***	0.023	0.194	-0.187	0.071	**-0.311***	-0.176
P	0.047	0.87	0.217	0.219	0.755	0.026	0.213

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn								
AOPPs	**Σίδηρ.**	**Ολ. Χολ.**	**Άμ. Χολ.**	**Αμυλάση**	**SGOT**	**SGPT**	**γ-GT**	**ALP**	**LDH**
Συντελεστής Συσχέτισης	0.007	0.011	0.126	0.091	-0.046	-0.140	0.139	-0.083	**-0.322***
P	0.962	0.937	0.377	0.528	0.747	0.327	0.331	0.565	0.017

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn							
AOPPs	**Γλυκόζη**	**Ουρία**	**Ουρ. Οξύ**	**Χοληστερόλη**	**HDL**	**LDL**	**TG**	**Αλβουμίνη**
Συντελεστής Συσχέτισης	-0,073	0,022	0,168	-0,059	0,211	-0,098	0,005	0,110
P	0,611	0,880	0,245	0,682	0,137	0,494	0,972	0,460

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn				
AOPPs	**Καλπροτεκτίνη**	**Λακτοφερίνη**	**Λυσοζύμη**	**Ντεφεσίνη**	**Lagtime**
Συντελεστής Συσχέτισης	-0.067	-0.058	-0.081	0.330	**0.369***
P	0.642	0.691	0.575	0.065	0.008

Πίνακας 9: Συσχέτιση των επιπέδων AOPPs του ορού ασθενών με NC με τις μεταβλητές της μελέτης. *Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, p<0,05.

Όταν χωρίσαμε τον πληθυσμό βάσει της ενεργότητας της νόσου παρατηρήθηκε στατιτιστικά σημαντική, αρνητική, μέτρια συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του ορού ασθενών σε έξαρση με τον ΔΜΣ (r=-0.391, p=0.044). Όσον αφορά τα επίπεδα των AOPPs του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, αρνητική, μέτρια σχέση με τη βαθμολογία του IBDQ

(r=-0.397, p=0.049), στατιστικά σημαντική μέτρια σχέση με το δείκτη ενεργότητας HBI (r=0.420, p=0.037) και μέτρια προς ισχυρή συσχέτιση με τη μεταβλητή LagTime (r=0.547, p=0.007).

Τέλος, για να περιγράψουμε την σχέση των στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων που προηγήθηκαν εφαρμόστηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Επειδή τα επίπεδα των AOPPs δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, για τα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε ο λογάριθμος των AOPPs (LOGAOPPs).

Ασθενείς με Νόσο του Crohn						
	ΜΟΝΤΕΛΟ 1 **Μη προσαρμοσμένο μοντέλο**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 2** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 3** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία, κάπνισμα**	
	B	**p-value**	**B**	**p-value**	**B**	**p-value**
IL-6 (pg/ml)	-0.006	0.357	-0.007	0.320	-0.008	0.287
CRP (mg/ml)	-0.013	0.295	-0.014	0.239	-0.015	0.226
LDH (iu/L)	-0.006	**0.038**	-0,007	**0.031**	-0.007	**0.037**
Lagtime (sec)	0.000165	**0.012**	0.000161	**0.023**	0.000160	**0.029**

Πίνακας 10: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με την IL-6, την CRP, την LDH και τον Lagtime σε ασθενείς με NC.

Ασθενείς με Νόσο του Crohn ΈΞΑΡΣΗ						
	ΜΟΝΤΕΛΟ 1 **Μη προσαρμοσμένο μοντέλο**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 2** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 3** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία, κάπνισμα**	
	B	**p-value**	**B**	**p-value**	**B**	**p-value**
ΔΜΣ (kg/m^2)	-0,042	0,051	-0,042	0,059	-0,04	0,08

Πίνακας 11: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με τον ΔΜΣ σε ασθενείς με NC σε έξαρση.

Ασθενείς με Νόσο του Crohn ΎΦΕΣΗ						
	ΜΟΝΤΕΛΟ 1 **Μη προσαρμοσμένο μοντέλο**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 2** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία**		**ΜΟΝΤΕΛΟ 3** **Προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία, κάπνισμα**	
	B	**p-value**	**B**	**p-value**	**B**	**p-value**
IBDQ	-0.010	0.077	-0.011	0.079	-0.011	0.087
HBI	0.239	**0.045**	0.266	**0.041**	0.266	**0.047**
Lagtime (sec)	0.000493	**0.009**	0.001	**0.009**	0.001	**0.011**

Πίνακας 12: Μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την περιγραφή της σχέσης των LOGAOPPs του ορού με την CRP, το IBDQ, τον HBI και το Lagtime σε ασθενείς με NC σε ύφεση.

ΔΜΣ:

Αρχικά, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική, αρνητική, μέτρια συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του ορού ασθενών σε έξαρση με τον ΔΜΣ (r=-0.391, p=0.044), ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη σχέση μεταξύ των υπολοίπων ομάδων. Αυτό ερμηνεύεται από την μεγαλύτερη ενεργειακή δαπάνη και μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη (μειωμένη όρεξη και δυσαπορρόφηση), όσο μεγαλύτερη είναι η φλεγμονή και η παραγωγή των AOPPs (Capeillère-Blandin *et al.*, 2004b), με αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού βάρους και του ΔΜΣ των ασθενών με NC σε έξαρση (O'Sullivan and O'Morain, 2006).

Ωστόσο, παρατηρούμε ότι με τη χρήση της μεταβλητής LogAOPPs ως εξαρτημένη μεταβλητή μεταξύ των ασθενών με NC σε έξαρση και τη χρήση του ΔΜΣ ως ανεξάρτητη μεταβλητή, η σχέση των μεταβλητών δεν είναι στατιστικά σημαντική (πίνακας 11). Έτσι, η σχέση του ΔΜΣ με τα επίπεδα των AOPPs του ορού ασθενών με ενεργό NC χάνεται, τόσο στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο όσο και στα προσαρμοσμένα μοντέλα 2 και 3 (πίνακας 11).

IBDQ και HBI:

Όσον αφορά τους δείκτες ενεργότητας της NC παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, αρνητική μέτρια σχέση των επιπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση με τη βαθμολογία του IBDQ (r=-0.397, p=0.049), το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με NC σε έξαρση. Μάλιστα, όταν εφαρμόζουμε τα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης σε ασθενείς με NC σε ύφεση παρατηρούμε ότι η σχέση ανάμεσα στο IBDQ και τα LogAOPPs χάνεται (πίνακας 12).

Παράλληλα, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μέτρια σχέση του δείκτη ενεργότητας HBI με τα επίπεδα των AOPPs στον ορό των ασθενών με NC σε ύφεση (r=0.420, p=0.037), χωρίς να παρατηρείται αντίστοιχη συσχέτιση στους ασθενείς σε έξαρση. Περιγράφοντας τη σχέση των LogAOPPs με τον δείκτη ενεργότητας της νόσου HBI, στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο παρατηρείται, ότι για κάθε μονάδα αύξησης του δείκτη HBI τα επίπεδα των AOPPs αυξάνονται κατά 0,239. Η σχέση αυτή διατηρείται όταν προσθέτουμε τους συγχυτικούς παράγοντες του φύλου και της ηλικίας (μοντέλο 2) και το κάπνισμα (προσαρμοσμένο μοντέλο 3) και πλέον για κάθε μονάδα αύξησης του HBI τα επίπεδα των LogAOPPs του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση αυξάνονται κατά 0.266 μονάδες (πίνακας 12). Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με τον υψηλότερο δείκτη

ενεργότητας της νόσου σε άτομα με μεγαλύτερη συγκέντρωση AOPPs στον ορό ασθενών σε ύφεση και αντίστροφα, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με NC σε έξαρση.

Και τα δύο αποτελέσματα παραπέμπουν στα αποτελέσματα μελέτης που συσχετίζει τα υψηλότερα αποτελέσματα του CDAI, με χαμηλότερο επίπεδο ζωής μεταξύ των ασθενών με NC (Gavrilescu *et al.*, 2015). Παλαιότερη μελέτη αναφέρει στατιστικά σημαντική μέτρια σχέση του CDAI και των rAOPPs στο πλάσμα ασθενών με NC και των ασθενών με ενεργό NC, αλλά, όχι μεταξύ ασθενών με NC σε ύφεση (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Στη δική μας μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών των τριών ομάδων και τον δείκτη ενεργότητας HBI ή το ερωτηματολόγιο IBDQ, πιθανόν λόγω του μικρού αριθμού του δείγματος (IBDQ: N=25, HBI: N=25).

<u>IL-6:</u>

Η IL-6 είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, η οποία σχετίζεται με αυτοπεριοριζόμενες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και η συγκέντρωσή της είναι αυξημένη σε ασθενείς με ενεργό NC και σχετίζεται με την παθογένεια της νόσου (Reinisch *et al.*, 1999; Atreya and Neurath, 2005; Greenberger, Blumberg and Burakoff, 2015). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, αρνητική, αλλά ασθενής συσχέτιση, μεταξύ των επιπέδων των AOPPs και των επιπέδων της IL-6 ($r=-0.277$, $p=0.047$) στον ορό ασθενών με NC, ενώ όταν χωρίσαμε το δείγμα ανάλογα με την δραστηριότητα της νόσου η συσχέτιση δεν ήταν σημαντική (πίνακας 9). Μάλιστα, όταν φτιάξαμε μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης, η σχέση της IL-6 με την εξαρτημένη μεταβλητή LogAOPPs στους ασθενείς με NC χάνεται, τόσο στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο 1, όσο και στα προσαρμοσμένα μοντέλα 2 και 3 (πίνακας 10).

Παρά το γεγονός, ότι τα AOPPs σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό τμήμα της διατριβής, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα πιθανόν σχετίζεται με τη μη στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων των AOPPs στον ορό των ασθενών με NC σε έξαρση σε σχέση με αυτών σε ύφεση. Η μελέτη των Krzystek- Korpacka και συν. αναφέρει στατιστικά σημαντική μέτρια συσχέτιση των rAOPPs του πλάσματος των ασθενών με NC με τα επίπεδα της IL-6 (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008), κάτι, το οποίο δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας. Τέλος, στη μελέτη των Krzystek- Korpacka και συν. αναφέρεται αυξημένη η συγκέντρωση των rAOPPs στους ασθενείς με NC που λάμβαναν κορτικοστεροειδή (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Μάλιστα, σε

αντίθεση με τα 5- αμινοσαλικυλικά, τα κορτικοστεροειδή καταστέλλουν τη σύνθεση της IL-6 με διάφορους μηχανισμούς (Brattsand and Linden, 1996) και έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με NC (Gross *et al.*, 1992; Reinisch *et al.*, 1999). Επομένως, είναι πιθανότερο η αντίστροφη συσχέτιση της IL-6 του ορού με τα επίπεδα των AOPPs του ορού των ασθενών με NC να αποδίδεται στην λαμβανόμενη φαρμακευτική αγωγή.

CRP

Η CRP αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης και η αύξηση της συγκέντρωσής της σχετίζεται με φυσιολογικές (έμμηνος ρύση) και φλεγμονώδεις καταστάσεις (Mosli *et al.*, 2015). Η CRP συμβάλλει στη διάγνωση της NC και στην εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την ΕΚ και τη NC (ECCO) (Stange *et al.*, 2006). Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, θετική μέτρια σχέση της CRP με τη προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-6 και το ινωδογόνο, το οποίο αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης (πίνακας 13), κάτι, το οποίο είναι αναμενόμενο, αφού μελέτες συσχετίζουν την παραγωγή της CRP στο ήπαρ ως απάντηση στα αυξημένα επίπεδα της IL-6 (Szalai *et al.*, 1998; Boras *et al.*, 2014), ενώ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση της CRP με τους δείκτες ενεργότητας της NC (HBI, Λακτοφερίνη και Καλπροτεκτίνη κοπράνων), όπως φαίνεται στον πίνακα 13. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο μικρό δείγμα του πληθυσμού, το οποίο συνδύαζε τις μεταβλητές που εκτιμώνται στον πίνακα 13. Επίσης, σημειώθηκε αρνητική, ήπια προς μέτρια σχέση της CRP με τα AOPPs του ορού των ασθενών με NC ($r=-0.311$, $p=0.026$) (πίνακας 9), χωρίς να παραμένει στατιστικά σημαντική η σχέση όταν διαχωρίζουμε τους ασθενείς με NC ανάλογα με την ενεργότητα της νόσου. Μάλιστα, όταν εφαρμόσαμε μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης η συγκεκριμένη σχέση χάθηκε, τόσο στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο 1, όσο και στα προσαρμοσμένα για συγχυτικούς παράγοντες μοντέλα 2 και 3 (πίνακας 10).

Παλαιότερη μελέτη σε ασθενείς με NC αναφέρει μη στατιστικά σημαντική σχέση των rAOPPs του πλάσματος των ασθενών με NC (Krzystek-Korpacka *et al.*, 2008). Παράλληλα, μία ακόμα μελέτη σε ασθενείς με σοβαρή ΧΝΝ σημειώνει μη στατιστικά σημαντική, αρνητική σχέση των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με τα επίπεδα της CRP (Valli *et al.*, 2007). Συνεπώς, όσον αφορά τον προφλεγμονώδη ρόλο των AOPPs σε ασθενείς με NC, φαίνεται τα AOPPs να αποτελούν ένα μικρό τμήμα της φλεγμονώδους διαδικασίας, ενώ είναι πιθανότερο να αντανακλούν την γνωστή σχέση

της ενεργού φλεγμονής σε άτομα με NC, καθώς σημειώθηκε μη στατιστική διαφορά των AOPPs μεταξύ ασθενών με NC και υγιών ανθρώπων και ασθενών με ενεργό και ανενεργό νόσο (πίνακες 6 και 7). Αντίθετα, τα επίπεδα της CRP ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ενεργή NC σε σχέση με τους ασθενείς με ανενεργή NC (πίνακας 4). Παράλληλα, φαίνεται τα επίπεδα της CRP να σχετίζονται περισσότερο με την IL-6, παρά με τα επίπεδα των AOPPs του ορού των ασθενών με NC (πίνακας 13). Η ερμηνεία της αντίστροφης σχέσης της CRP με τα επίπεδα των AOPPs του ορού είναι πιθανό να αντανακλά τη σχέση της IL-6 με τα AOPPs, για την οποία έγινε λόγος παραπάνω. Επομένως, είναι πιθανό τα AOPPs να μην υποκαθιστούν τη χρησιμότητα της CRP στην εκτίμηση και την αξιολόγηση της ενεργού NC.

	Ασθενείς με Νόσο του Crohn σε ΈΞΑΡΣΗ				
CRP (N=24)	**IL-6**	**Ινωδογόνο**	**HBI**	**Λακτοφερίνη**	**Καλπροτεκτίνη**
Συντελεστής Συσχέτισης	**0.459***	**0.494***	0.072	0.327	0.387
P	0.018	0.01	0.728	0.119	0.061

Πίνακας 13: Συσχέτιση των επιπέδων CRP του ορού των ασθενών με NC σε έξαρση με την IL-6, το Ινωδογόνο, το δείκτη HBI, τη λακτοφερίνη και την καλπροτεκτίνη κοπράνων. *Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, p<0,05.

LDH

Η γαλακτική αφυδρογονάση αποτελεί ενδοκυττάριο ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό (και αντίστροφα) με σύγχρονη επανοξείδωση του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) (Holmes and Goldberg, 2009). Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των κυττάρων του οργανισμού με διαφορετικές μορφές (ισοένζυμα) και αφθονεί, κυρίως, στα κύτταρα του μυοκαρδίου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στα ηπατοκύτταρα, στα νεφρικά κύτταρα, στα κύτταρα των γραμμωτών μυών και των γονάδων (Holmes and Goldberg, 2009). Απελευθερώνεται στην κυκλοφορία σε συνθήκες ιστικής βλάβης και καταστροφής (Glick, 1969). Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα LDH στο κόλον και στον ορό ασθενών με ΕΚ (Lewis *et al.*, 1971; Pascarella *et al.*, 2007) και στον ορό ασθενών με ενεργό Crohn κολίτιδα και πρωκτίτιδα (Hove and Mortensen, 1995). Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική ασθενής προς μέτρια σχέση της LDH του ορού των ασθενών με NC με τα επίπεδα των AOPPs (r=-0.322, p=0.017) (πίνακας 9). Στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης, η σχέση της LDH με τα LogAOPPs του ορού των ασθενών με NC παραμένει στατιστικά σημαντική (πίνακας 10). Πιο

συγκεκριμένα στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο 1 παρατηρήθηκε, ότι για κάθε μονάδα αύξησης της LDH τα LogAOPPs μειώνονται κατά 0,006 μονάδες (πίνακας 10). Η σχέση της LDH με τα LogAOPPs διατηρείται στατιστικά σημαντική όταν προσθέτουμε τους συγχυτικούς παράγοντες φύλο, ηλικία (μοντέλο 2) και το κάπνισμα (Μοντέλο 3) (Πίνακας 10). Στη συγκεκριμένη μελέτη η αντίστροφη συσχέτιση των AOPPs με την πρόκληση ιστικής βλάβης, τόσο εντερικής, όσο και εξωεντερικής, είναι πιθανό να σχετίζεται με την αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού, όπως θα περιγράψουμε στη συνέχεια. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη μελέτη, όπως ήδη αναφέρθηκε στα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του δείγματος παρατηρήθηκε ηπια-μέτρια ενεργότητα της νόσου των ασθενών με NC, άρα περιορισμένη ιστική βλάβη.

LagTime

LagTime ή χρόνος λανθάνουσας φάσης (σε δευτερόλεπτα) αποτελεί το χρόνο αντίστασης του ορού στην οξείδωση, δηλαδή τον χρόνο που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά του ορού (Parthasarathy, Augé and Santanam, 1998). Πιο συγκεκριμένα, εκφράζει το χρόνο που χρειάζεται για να οξειδωθεί η LDL του ορού παρουσία θειικού χαλκού ($CuSO_4$) ex vivo και να παραχθούν λιποειδικά υπεροξείδια (τα οποία ανιχνεύονται ως συζυγή διένια, με φωτομέτρηση στα 245nm), ο οποίος εξαρτάται από το ενδογενές αντιοξειδωτικό περιεχόμενο (κυρίως την α-τοκοφερόλη) (Kleinveld *et al.*, 1993). Με αυτό τον τρόπο εκτιμάται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού. Η αύξηση του LagTime σχετίζεται με την αύξηση του περιεχομένου των αντιοξειδωτικών μορίων (π.χ. βιταμίνη Ε, ασκορβικό οξύ, καροτενοειδή, κατεχίνες, φυτικές φαινόλες, κουρκουμίνη, θειόλες, φυτοοιστρογόνα, ταμοξιφαίνη, καρβεδιλόλη, νιφεδιπίνη, διϋδροεπιανδροστερόνη κ.λ.π.), ενώ η μείωση του LagTime σχετίζεται με οξειδωτικούς, για την LDL, in vitro παράγοντες (HOCl, Χαλκός, σίδηρος, υπεριώδης ακτινοβολία, αίμη, λιποξυγονάσες, περοξειδάσες, οξειδάσες, σερουλοπλασμίνη κ.λ.π.) (Parthasarathy, Augé and Santanam, 1998). Εκτός από τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών και την παραγωγή ελεύθερων ριζών, πάνω από το 50% της φαινοτυπικής διακύμανσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας στους ανθρώπους έχει γενετικό υπόβαθρο, το οποίο οφείλεται στο ίδιο γονίδιο ή στην ίδια ομάδα γονιδίων και φαίνεται να εξαρτάται από την κατάσταση του καπνίσματος (Wang *et al.*, 2001). Άλλοι παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται με την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα είναι η ηλικία, το φύλο και η διατροφή σε μεταγευματικό έλεγχο (Wang *et al.*, 2001).

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, θετική, ασθενής προς μέτρια συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών με NC με τον χρόνο αντίστασης του ορού (r=0.369, p=0.008) (πίνακας 9) και στατιστικά σημαντική, μέτρια προς ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση με τη μεταβλητή LagTime (r=0.547, p=0.007). Μάλιστα, όταν προσπαθήσαμε να περιγράψουμε τις σχέσεις αυτές με μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης παρατηρήθηκε, ότι στους ασθενείς με NC στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο 1 παρατηρείται στατιστικά σημαντική σχέση των επιπέδων των LogAOPPs του ορού με τη μεταβλητή LagTime (B=0.000165 sec, p=0.012) και η σχέση αυτή επιβιώνει όταν προσθέτουμε τους συγχυτικούς παράγοντες φύλο και ηλικία (προσαρμοσμένο μοντέλο 2) και τους παράγοντες φύλο, ηλικία και κάπνισμα (μοντέλο 3) και πλέον για κάθε μονάδα αύξησης της μεταβλητής LagTime τα επίπεδα των LogAOPPs του ορού αυξάνονται κατά 0.00016 μονάδες (πίνακας 10). Περιγράφοντας τη σχέση του χρόνου αντίστασης του ορού με τα επίπεδα των LogAOPPs των ασθενών με NC σε ύφεση παρατηρούμε ότι, η σχέση είναι στατιστικά σημαντική στο μη προσαρμοσμένο μοντέλο 1 και στο προσαρμοσμένο μοντέλο 2 και 3, και για κάθε μονάδα αύξησης του χρόνου αντίστασης του ορού, τα επίπεδα των LogAOPPs αυξάνονται κατά 0,000493 μονάδες (μοντέλο 1) και 0,001 μονάδες (μοντέλα 2 και 3) (πίνακας 12).

Η θετική συσχέτιση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση με τα επίπεδα των AOPPs είναι πιθανό να ερμηνεύεται από τη προσπάθεια του οργανισμού των ασθενών με NC να αυξήσει την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε ασθενείς με NC θα περιμέναμε αύξημενα επίπεδα προϊόντων οξειδωτικού στρες. Στη δική μας μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων των AOPPs του ορού ασθενών με NC και υγιών εθελοντών. Μάλιστα, σημειώθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος χρόνος της αντίστασης του ορού των ασθενών με ενεργό NC σε σχέση τον χρόνο αντίστασης στην οξείδωση του ορού των ασθενών με NC σε ύφεση (πίνακας 5). Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος της διατριβής παλαιότερη ανασκόπηση του Pereira και συν. παραθέτει επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες σημειώνουν αυξημένη δραστηριότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων της GPX (7 μελέτες), της CAT (2 μελέτες) και της SOD (5 μελέτες) σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Pereira *et al.*, 2015). Επομένως, η συσχέτιση της μεταβλητής LagTime με τα επίπεδα των AOPPs των ασθενών με NC είναι πιθανό να αντανακλά την αυξημένη προσπάθεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού των ασθενών με NC να αντιρροπήσουν το οξειδωτικό στρες.

Η οξείδωση της LDL του ορού στις ΙΦΝΕ είναι αποτέλεσμα της φλεγμονής του εντέρου και της αλληλεπίδρασης της με ROS, προερχόμενα από τα κύτταρα της ανοσίας και φαίνεται να εξαρτάται από την ποσότητα του υποστρώματος (Grip, Janciauskiene and Lindgren, 2004; Boehm *et al.*, 2012; Grzybowska-Chlebowczyk *et al.*, 2018). Ανάμεσα στις ιδιότητες της οξειδωμένης LDL (oxLDL) είναι η δράση της στα μακροφάγα και πιο συγκεκριμένα η αρνητική της επίδραση στην ενεργοποίηση του NF-κB των μακροφάγων από τους LPS του βακτηρίων του εντέρου (μετά από in vitro ενοφθαλμισμό των μακροφάγων σε oxLDL) με αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του TNF-a και της IL-1b (Ohlsson *et al.*, 1996; Parthasarathy, Augé and Santanam, 1998; Sui *et al.*, 2014), τα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω συμβάλουν στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων μέσω της γονιδιακής έκφρασης της NOX στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Rogler *et al.*, 1998; Andresen *et al.*, 2005; Kuwano *et al.*, 2008) και της COX2 (Fitzpatrick, 2005), η οποία επιδεινώνει την φλεγμονώδη απόκριση, μέσω της παραγωγής προσταγλανδινών και NOS (Singer *et al.*, 1998; Ricciotti and Fitzgerald, 2011). Έτσι, η αύξηση του χρόνου αντίστασης, είναι πιθανό να σχετίζεται με τη καθυστερημένη παραγωγή της oxLDL, με αποτέλεσμα, την περιορισμένη επίδραση της oxLDL στον NF-Kβ των μακροφάγων, την αυξημένη δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα και την αυξημένη παραγωγή TNF-a, ο οποίος συμβάλει στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων από τα φαγοκύτταρα και τα εντεροεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους θα οδηγήσουν στην οξείδωση των πρωτεϊνών του ορού και την παραγωγή των AOPPs.

Η σημασία της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού σε συνθήκες φλεγμονής είναι αμφιλεγόμενη. Στη βιβλιογραφία διακρίνουμε μελέτες, στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού ασθενών, οι οποίοι νοσούσαν από διαβητική νευροπάθεια, νευρική ανορεξία, καρδιομυοπάθεια και εγκεφαλοπάθεια σχετιζόμενη με το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (Sofic *et al.*, 2002) και σε ασθενείς με ατομικό ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (Niculescu *et al.*, 2001). Αντίθετα, εντοπίζουμε μελέτες ασθενών με ασταθή ή σταθερή στηθάγχη, κρίσιμους χειρουργικούς ασθενείς με σηπτικό σοκ και μελέτη μη επιζώντων από πολυσυστηματικό φλεγμονώδες σύνδρομο, στις οποίες παρατηρήθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (Pascual *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2000; Niculescu *et al.*, 2001). Στη δική μας μελέτη, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των ασθενών με NC ήταν μειωμένη σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα της ομάδας ελέγχου (3021,1 ± 1490 sec και 5162,1 ± 1706,3 αντίστοιχα, p=0.002), η αντιοξειδωτική ικανότητα των ασθενών με NC σε έξαρση ήταν αυξημένη σε

σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού σε ύφεση (3557,5 ± 1712,9 sec και 2391,4 ± 845,8 αντίστοιχα, p=0.007). Έτσι, είναι αντικρουόμενα τα δεδομένα για την πραγματική αλλαγή στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού στη νόσο. Τέλος, πιθανή ερμηνεία αποτελεί η αύξηση αντιοξειδωτικών μορίων, όπως, επί παραδείγματι της αλβουμίνης, της χολερυθρίνης, του ουρικού οξέος, της μελατονίνης και του διϋδρολιποϊκού οξέος (το οποίο δρα εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες ή αναγεννώντας τη βιταμίνη C, τη βιταμίνη E και τη γλουταθειόνη) σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει προηγούμενη μελέτη που να συσχετίζει τα επίπεδα επίπεδα των AOPPs στο πλάσμα ή στον ορό ασθενών με NC με τις μεταβλητές που εκτιμήθηκαν. Μία μελέτη με μικρό δείγμα σημειώνει στατιστικά σημαντική ασθενή συσχέτιση των AOPPs στο πλάσμα ασθενών με EK με τα επίπεδα της MPO (Baskol *et al.*, 2008), η οποία εξηγείται από την αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της MPO των λευκοκυττάρων σε συνθήκες φλεγμονής και την παραγωγή οξειδωτικών μορίων που επιδρούν στις πρωτεΐνες του πλάσματος και συμβάλλουν στην παραγωγή των AOPPs (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Capeillère-Blandin *et al.*, 2004a), κάτι, το οποίο δεν παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, όπου τα επίπεδα της MPO δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με NC σε έξαρση και αυτών σε ύφεση, ενώ δεν εκτιμήθηκαν τα επίπεδα σε υγιείς εθελοντές (πίνακας 5). Ωστόσο, η μειωμένη συγκέντρωση των επιπέδων της λευκωματίνης του ορού των ασθενών με NC σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ίσως, μπορεί να υποστηρίξει τη δημιουργία των AOPPs του ορού από τη λευκωματίνη του πλάσματος υπό την επίδραση της MPO. Παράλληλα, στη μελέτη μας δεν συσχετίστηκαν τα AOPPs του ορού των ασθενών με το ινωδογόνο, κάτι, το οποίο μας απομακρύνει από την θεωρία της προέλευσης των AOPPs από το ινωδογόνο του ορού (Shacter *et al.*, 1994; Selmeci *et al.*, 2006). Μία μελέτη αναφέρει στατιστικά σημαντική ισχυρή συσχέτιση των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με EK (έξαρση και ύφεση) με τη βαθμολογία του ενδοσκοπικού δείκτη ενεργότητας της νόσου (Alagozlu *et al.*, 2013), ο οποίος δεν εκτιμήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του ορού των ασθενών με NC με την εντόπιση της νόσου.

Εν κατακλείδι, παρά το γεγονός, ότι τα AOPPs έχουν μελετηθεί ως προϊόν οξειδωτικού στρες με προφλεγμονώδη δράση, τα επίπεδα των AOPPs του ορού ασθενών με NC δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα επίπεδα στον υγιή πληθυσμό. Μάλιστα, τα επίπεδα των AOPPs του ορού μεταξύ των ασθενών με ανενεργό NC δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα εκείνων με ενεργό

ΝC. Παρατηρήθηκε μέτρια θετική συσχέτιση των επιπέδων των AOPPs του πλάσματος των ασθενών με ΝC με τη μεταβλητή Lagtime και αρνητική, ασθενή προς μέτρια συσχέτιση με την IL-6, την CRP και την LDH. Παράλληλα, σημειώθηκε αρνητική, μέτρια σχέση των επιπέδων των AOPPs του ορού ασθενών με ΝC σε έξαρση με το ΔΜΣ. Τέλος, παρατηρήθηκε αρνητική, μέτρια σχέση του IBDQ και θετική μέτρια σχέση του HBI και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού με τα επίπεδα των AOPPs του ορού των ασθενών με ανενεργό ΝC. Οι συσχετίσεις των AOPPs με την IL-6, την CRP, το IBDQ και το ΔΜΣ δεν ίσχυαν μετά από διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, τα AOPPs του ορού των ασθενών με ΝC δεν συσχετίστηκαν με τη διάρκεια και την εντόπιση της νόσου. Παρά το γεγονός, ότι η συγκεκριμένη έρευνα αποτελεί την πρώτη μελέτη, η οποία εκτιμά τη συγκέντρωση των επιπέδων των AOPPs στον ορό των ασθενών με ΝC, αποτελεί περιορισμός το μικρό δείγμα της μελέτης. Επίσης, το γεγονός, ότι τα AOPPs προέρχονται από την οξείδωση πρωτεϊνών του ορού των ασθενών με ΙΦΝΕ θέτει το ερώτημα της καλύτερης εκτίμησης τους σε σχέση με τις συνολικές πρωτεΐνες του ορού. Σε κάθε περίπτωση, χρειάζονται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα για να προσδιοριστούν οι μηχανισμοί, με τους οποίους οι παραπάνω παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα των AOPPs του ορού ασθενών με ΙΦΝΕ και για να εκτιμηθεί ο ρόλος των AOPPs στην κλινική πράξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Achitei, D. *et al.* (2013) 'Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients', *Digestive Diseases and Sciences*, 58(5), pp. 1244–1249. doi: 10.1007/s10620-012-2510-z.

Akman, T. *et al.* (2012) 'Erythrocyte deformability and oxidative stress in inflammatory bowel disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 57(2), pp. 458–464. doi: 10.1007/s10620-011-1882-9.

Alagozlu, H. *et al.* (2013) 'Increased plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPP) as a marker for oxidative stress in patients with active ulcerative colitis', *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 37(1), pp. 80–85. doi: 10.1016/j.clinre.2012.03.034.

Alzoghaibi, M. A. (2013) 'Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease', *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, pp. 6540–6547. doi: 10.3748/wjg.v19.i39.6540.

Alzoghaibi, M. A., Al Mofleh, I. A. and Al-Jebreen, A. M. (2007) 'Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease', *Saudi Journal of Gastroenterology*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd, 13(4), pp. 187–190. doi: 10.4103/1319-3767.36750.

Ananthakrishnan, A. N. *et al.* (2018) 'Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 39–49. doi: 10.1038/nrgastro.2017.136.

Andresen, L. *et al.* (2005) 'Activation of nuclear factor κB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis', *Gut*. BMJ Publishing Group, 54(4), pp. 503–509. doi: 10.1136/gut.2003.034165.

Atabek, M. E. *et al.* (2006) 'Protein oxidation in obesity and insulin resistance', *European Journal of Pediatrics*, 165(11), pp. 753–756. doi: 10.1007/s00431-006-0165-5.

Atreya, R. and Neurath, M. F. (2005) 'Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 28(3), pp. 187–195. doi: 10.1385/CRIAI:28:3:187.

Aydin, S. (2015) 'A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA', *Peptides*. Elsevier Inc., 72, pp. 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.

Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994) 'Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 12(1), pp. 141–179. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001041.

Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. (1994) 'Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines.', *Advances in immunology*, 55, pp. 97–179. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304236 (Accessed: 20 April 2020).

Baskol, M. *et al.* (2008) 'Advanced oxidation protein products: A novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(6), pp. 687–691. doi: 10.1097/MCG.0b013e318074f91f.

Bedard, K. and Krause, K. H. (2007) 'The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology', *Physiological Reviews*, pp. 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.

Beltŕan, B. *et al.* (2010) 'Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease', *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(1), pp. 76–86. doi: 10.1002/ibd.21027.

Benchimol, E. I. *et al.* (2017) 'Rural and Urban Residence during Early Life is Associated with a Lower Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Inception and Birth Cohort Study', *American Journal of Gastroenterology*. Nature Publishing Group, 112(9), pp. 1412–1422. doi: 10.1038/ajg.2017.208.

Bernstein, C. N. *et al.* (2016) 'World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease: Update August 2015', *Journal of clinical gastroenterology*, 50(10), pp. 803–818.

Beutler, B. and Van Huffel, C. (1994) 'An Evolutionary and Functional Approach to the TNF Receptor/Ligand Family', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 730(1), pp. 118–133. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb44244.x.

Bochi, G. V. *et al.* (2014) 'An alternative pathway through the fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators', *Inflammation*. Springer New York LLC, 37(2), pp. 512–521. doi: 10.1007/s10753-013-9765-1.

Bochi, G. V. *et al.* (2016) 'In Vitro Oxidation of Collagen Promotes the Formation of Advanced Oxidation Protein Products and the Activation of Human Neutrophils', *Inflammation*. Springer New York LLC, 39(2), pp. 916–927. doi: 10.1007/s10753-016-0325-3.

Boehm, D. *et al.* (2012) 'Lipid peroxidation markers in Crohn's disease: the associations and diagnostic value', *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 50(8), p. 1359—1366. doi: 10.1515/cclm-2011-0817.

Boras, E. *et al.* (2014) 'Monomeric C-reactive protein and Notch-3 co-operatively increase angiogenesis through PI3K signalling pathway.', *Cytokine*. England, 69(2), pp. 165–179. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.027.

Botaille, F. *et al.* (2008) 'Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease', *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(11), pp. 1514–1527. doi: 10.1002/ibd.20590.

Bouzid, D. *et al.* (2013) 'Oxidative stress markers in intestinal mucosa of Tunisian inflammatory bowel disease patients', *Saudi Journal of Gastroenterology*, 19(3), pp. 131–135. doi: 10.4103/1319-3767.111956.

Brattsand, R. and Linden, M. (1996) 'Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies.', *Alimentary pharmacology & therapeutics*. England, 10 Suppl 2, pp. 81–82. doi: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164025.x.

Cao, W. *et al.* (2013) 'Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway', *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc., 18(1), pp. 19–35. doi:

10.1089/ars.2012.4603.

Capeillère-Blandin, C. *et al.* (2004a) 'Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1689(2), pp. 91–102. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.02.008.

Capeillère-Blandin, C. *et al.* (2004b) 'Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1689(2), pp. 91–102. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.02.008.

Cappello, M. *et al.* (2014) 'Liver Function Test Abnormalities in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Hospital-based Survey.', *Clinical medicine insights. Gastroenterology*, 7, pp. 25–31. doi: 10.4137/CGast.S13125.

Chang, D. *et al.* (2008) 'Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients', *Biomedical and Environmental Sciences*. Zhongguo Yufang Yixue Kexueyuan (Chinese Academy of Preventive Medicine), 21(4), pp. 286–289. doi: 10.1016/S0895-3988(08)60043-4.

Chassaing, B. *et al.* (2015) 'Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome', *Nature*. Nature Publishing Group, 519(7541), pp. 92–96. doi: 10.1038/nature14232.

Chassaing, B. *et al.* (2017) 'Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation', *Gut*. BMJ Publishing Group, 66(8), pp. 1414–1427. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313099.

Collen, D. *et al.* (1972) 'Metabolism and Distribution of Fibrinogen. I. FIBRINOGEN TURNOVER IN PHYSIOLOGICAL CONDITIONS IN HUMANS', *British Journal of Haematology*, 22(6), pp. 681–700. doi: 10.1111/j.1365-2141.1972.tb05715.x.

Coyle, P. *et al.* (2002) 'Metallothionein: The multipurpose protein', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 627–647. doi: 10.1007/s00018-002-8454-2.

D'Inca', R. *et al.* (2000) 'Oxidative DNA damage in ulcerative colitis', *Gastroenterology*. Elsevier BV, 118(4), p. A1121. doi: 10.1016/s0016-5085(00)80292-9.

D'Odorico, A. *et al.* (2001) 'Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(12), pp. 1289–1294. doi: 10.1080/003655201317097146.

Dahlgren, C. and Karlsson, A. (1999) 'Respiratory burst in human neutrophils', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier, 232(1–2), pp. 3–14. doi: 10.1016/S0022-1759(99)00146-5.

Danese, S. *et al.* (2005) 'Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease.', *World journal of gastroenterology*, 11(46), pp. 7227–7236. doi: 10.3748/wjg.v11.i46.7227.

David, L. A. *et al.* (2014) 'Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome', *Nature*, 505(7484), pp. 559–563. doi: 10.1038/nature12820.

Davies, M. J. (2005) 'The oxidative environment and protein damage', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, pp. 93–109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007.

Dean, R. T. *et al.* (1997) 'Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation', *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, pp. 1–18. doi: 10.1042/bj3240001.

Devkota, S. *et al.* (2012) 'Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10-/- mice', *Nature*, pp. 104–108. doi: 10.1038/nature11225.

Dhungana, S. *et al.* (2004) 'Redox Properties of Human Transferrin Bound to Its Receptor', *Biochemistry*, 43(1), pp. 205–209. doi: 10.1021/bi0353631.

Dinarello, C. A. (no date) 'The biological properties of interleukin-1.', *European cytokine network*, 5(6), pp. 517–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727685 (Accessed: 20 April 2020).

Dincer, Y. *et al.* (2007) 'Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 52(7), pp. 1636–1641. doi: 10.1007/s10620-006-9386-8.

Duerr, R. H. *et al.* (2006) 'A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 314(5804), pp. 1461–1463. doi: 10.1126/science.1135245.

Engvall, E. (2010) 'The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Clinical Chemistry*. Oxford Academic, 56(2), pp. 319–320. doi: 10.1373/clinchem.2009.127803.

Faller, M., Douglas, V. and Steven, M. (1995) 'Monocyte and Macrophage Development and Function', in *Williams Hematology*. 5th edn. Churchill Livingstone Inc, pp. 751–762. Available at: https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1581&sectionid=108066052 (Accessed: 13 May 2020).

Fitzpatrick, F. (2005) 'Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function', *Current Pharmaceutical Design*. Bentham Science Publishers Ltd., 10(6), pp. 577–588. doi: 10.2174/1381612043453144.

Gavrilescu, O. *et al.* (2015) 'QUALITY OF LIFE IN CROHN'S DISEASE PATIENTS.', *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. Romania, 119(2), pp. 340–345.

Gearry, R. B. *et al.* (2009) 'Reduction of dietary poorly absorbed short-chain carbohydrates (FODMAPs) improves abdominal symptoms in patients with inflammatory bowel disease—a pilot study', *Journal of Crohn's and Colitis*, 3(1), pp. 8–14. doi: 10.1016/j.crohns.2008.09.004.

GESA (2018) *Clinical Update for General Practitioners and Physicians Inflammatory Bowel Disease Updated 2018*, *Gastroenterological Society of Australia (GESA)*. Available at: http://www.gesa.org.au (Accessed: 4 April 2020).

Glick, J. H. J. (1969) 'Serum lactate dehydrogenase isoenzyme and total lactate dehydrogenase values in health and disease, and clinical evaluation of these tests by means of discriminant analysis.', *American journal of clinical pathology*. England, 52(3), pp. 320–328. doi: 10.1093/ajcp/52.3.320.

Gomollón, F. *et al.* (2017) '3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management', *Journal of Crohn's and Colitis*. Oxford University Press, 11(1), pp. 3–25. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw168.

Gordon, J. W., Shaw, J. A. and Kirshenbaum, L. A. (2011) 'Multiple facets of NF-κB in the heart: To be or not to NF-κB', *Circulation Research*, pp. 1122–1132. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226928.

Goyette, P. *et al.* (2007) 'Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: Genotypes, phenotypes and personalized medicine', *Annals of Medicine*, pp. 177–199. doi: 10.1080/07853890701197615.

Graham, D. B. and Xavier, R. J. (2020) 'Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease', *Nature*. Nature Research, pp. 527–539. doi: 10.1038/s41586-020-2025-2.

Greenberger, N. J., Blumberg, R. S. (Richard S. and Burakoff, R. (2015) *CURRENT Diagnosis & Treatment: Gastroenterology, Hepatology, & Endoscopy*. 3rd edn. McGraw Hill Professional.

Grilli, M., Chiu, J. J. and Lenardo, M. J. (1993) 'NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system.', *International review of cytology*, 143, pp. 1–62. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61873-2.

Grip, O., Janciauskiene, S. and Lindgren, S. (2004) 'Circulating monocytes and plasma inflammatory biomarkers in active Crohn's disease: elevated oxidized low-density lipoprotein and the anti-inflammatory effect of atorvastatin.', *Inflammatory bowel diseases*. England, 10(3), pp. 193–200. doi: 10.1097/00054725-200405000-00003.

Grisham, M. B. (1994) 'Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease', *The Lancet*, 344(8926), pp. 859–861. doi: 10.1016/S0140-6736(94)92831-2.

Grisham, M. B. and Granger, D. N. (1988) 'Neutrophil-mediated mucosal injury - Role of reactive oxygen metabolites', *Digestive Diseases and Sciences*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 33(3 Supplement). doi: 10.1007/BF01538126.

Grisham, M. B., MacDermott, R. P. and Deitch, E. A. (1990) 'Oxidant defense mechanisms in the human colon', *Inflammation*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 14(6), pp. 669–680. doi: 10.1007/BF00916370.

Gross, V. *et al.* (1992) 'Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease.', *Gastroenterology*. United States, 102(2), pp. 514–519. doi: 10.1016/0016-5085(92)90098-j.

Grzybowska-Chlebowczyk, U. *et al.* (2018) 'Oxidative and Antioxidative Stress Status in Children with Inflammatory Bowel Disease as a Result of a Chronic Inflammatory Process.', *Mediators of inflammation*, 2018, p. 4120973. doi: 10.1155/2018/4120973.

Guo, Z. J. *et al.* (2008) 'Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway', *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc., 10(10), pp. 1699–1712. doi: 10.1089/ars.2007.1999.

Gyuraszova, M., Kovalcikova, A. and Gardlik, R. (2017) 'Association between oxidative status and the composition of intestinal microbiota along the gastrointestinal tract', *Medical Hypotheses*. Churchill Livingstone, 103, pp. 81–85. doi: 10.1016/j.mehy.2017.04.011.

Halliwell, B. (1988) 'Albumin-An important extracellular antioxidant?', *Biochemical Pharmacology*, 37(4), pp. 569–571. doi: 10.1016/0006-2952(88)90126-8.

Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004) 'Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?', *British Journal of Pharmacology*, pp. 231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.

Hamouda, H. E. *et al.* (2011) 'P53 antibodies, metallothioneins, and oxidative stress markers in chronic ulcerative colitis with dysplasia', *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 17(19), pp. 2417–2423. doi: 10.3748/wjg.v17.i19.2417.

Harwell, B. (2007) 'Biochemistry of oxidative stress', in *Biochemical Society Transactions*, pp. 1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147.

Heikius, B. *et al.* (1997) 'Hepatobiliary and Coexisting Pancreatic Duct Abnormalities in Patients with Inflammatory Bowel Disease', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Taylor & Francis, 32(2), pp. 153–161. doi: 10.3109/00365529709000186.

Himmelfarb, J. and McMonagle, E. (2001) 'Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia', *Kidney International*, 60(1), pp. 358–363. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00807.x.

Holmes, R. S. and Goldberg, E. (2009) 'Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: human, mouse, opossum and platypus LDHs.', *Computational biology and chemistry*, 33(5), pp. 379–385. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2009.07.006.

Hong, Y. L. *et al.* (2007) 'Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model', *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), pp. 528–538. doi: 10.1681/ASN.2006070781.

Hornbeck, P. (1992) 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assays', *Current Protocols in Immunology*. Wiley, 1(1), pp. 2.1.1-2.1.22. doi: 10.1002/0471142735.im0201s01.

Hove, H. and Mortensen, P. B. (1995) 'Influence of intestinal inflammation (IBD) and small and large bowel length on fecal short-chain fatty acids and lactate', *Digestive Diseases and Sciences*, 40(6), pp. 1372–1380. doi: 10.1007/BF02065554.

Hu, M. L. *et al.* (1993) 'Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma', *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 121(2), pp. 257–262. doi: 10.5555/uri:pii:002221439390154Q.

Iademarco, M. F. *et al.* (1992) 'Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)', *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), pp. 16323–16329.

Iborra, M. *et al.* (2019) 'Different genetic expression profiles of oxidative stress and apoptosis-related genes in Crohn's

disease', *Digestion*. S. Karger AG, 100(1), pp. 27–36. doi: 10.1159/000493726.

Iwao, Y. *et al.* (2008) 'CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. American Physiological Society, 295(6), pp. F1871–F1880. doi: 10.1152/ajprenal.00013.2008.

Jones, D. P. (2006) 'Redefining oxidative stress', *Antioxidants and Redox Signaling*, pp. 1865–1879. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865.

Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104.

Kalousová, M., Škrha, J. and Zima, T. (2002) 'Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus', *Physiological Research*, 51(6), pp. 597–604.

Kaneda, H. *et al.* (2002) 'Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease.', *Atherosclerosis*, 162(1), pp. 221–5. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00706-7.

Kaplan, G. G. *et al.* (2010) 'The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: A novel association', *American Journal of Gastroenterology*, 105(11), pp. 2412–2419. doi: 10.1038/ajg.2010.252.

Kaplan, G. G. and Ng, S. C. (2016) 'Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China', *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Ltd, pp. 307–316. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30077-2.

Kaplan, G. G. and Ng, S. C. (2017) 'Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 152(2), pp. 313-321.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.020.

Kaser, A., Zeissig, S. and Blumberg, R. S. (2010) 'Inflammatory Bowel Disease', *Annu Rev Immunol*, 28, pp. 573–621. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101225.

Kish, L. *et al.* (2013) 'Environmental Particulate Matter Induces Murine Intestinal Inflammatory Responses and Alters the Gut MicrobiomeOxidative Stress and Free-Radical Oxidation in BCG Granulomatosis Development', *PLoS One*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.006222010.1155/2013/452546.

Kishimoto, T. *et al.* (1995) 'Interleukin-6 family of cytokines and gp130', *Blood*, pp. 1243–1254. doi: 10.1182/blood.v86.4.1243.bloodjournal8641243.

Kleinveld, H. A. *et al.* (1993) 'Oxidation resistance, oxidation rate, and extent of oxidation of human low-density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid content to linoleic acid content: studies in vitamin E deficient subjects.', *Free radical biology & medicine*. United States, 15(3), pp. 273–280. doi: 10.1016/0891-5849(93)90074-5.

Kohjima, M. *et al.* (2013) 'Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice', *Journal of Hepatology*, 59(6), pp. 1246–1254. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.025.

Koutroubakis, I. E. *et al.* (2004) 'Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 49(9), pp. 1433–1437. doi: 10.1023/B:DDAS.0000042242.22898.d9.

Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Marklund, S. L., *et al.* (2003) 'Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease', *Journal of Pathology*, 201(1), pp. 7–16. doi: 10.1002/path.1407.

Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Mieremet-Ooms, M. A. C., *et al.* (2003) 'Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease', *Journal of Pathology*, 201(1), pp. 17–27. doi: 10.1002/path.1408.

Kruidenier, L., Kuiper, I., Lamers, C. B. H. W., *et al.* (2003) 'Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: Semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants', *Journal of Pathology*, 201(1), pp. 28–36. doi: 10.1002/path.1409.

Krzystek-Korpacka, M. *et al.* (2008) 'Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD', *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(6), pp. 794–802. doi: 10.1002/ibd.20383.

Krzystek-Korpacka, M. *et al.* (2010) 'Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: Impact of anemia and treatment', *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(9), pp. 1467–1475. doi: 10.1002/ibd.21234.

Kucharzik, T. *et al.* (2001) 'Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology Inc., 159(6), pp. 2001–2009. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63051-9.

Kulkarni, A. C., Kuppusamy, P. and Parinandi, N. (2007) 'Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: Enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy', *Antioxidants and Redox Signaling*, pp. 1717–1730. doi: 10.1089/ars.2007.1724.

Kusugami, K. *et al.* (1995) 'Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent', *Digestive Diseases and Sciences*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 40(5), pp. 949–959. doi: 10.1007/BF02064182.

Kuwano, Y. *et al.* (2008) 'Tumor necrosis factor α activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells', *Free Radical Biology and Medicine*, 45(12), pp. 1642–1652. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.033.

Lander, H. M. *et al.* (1997) 'Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress', *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), pp. 17810–17814. doi: 10.1074/jbc.272.28.17810.

De Lange, K. M. *et al.* (2017) 'Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 49(2), pp. 256–261. doi: 10.1038/ng.3760.

Leníček, M. *et al.* (2014) 'The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease.', *Inflammatory bowel diseases*. England, 20(3), pp. 481–487. doi: 10.1097/01.MIB.0000440817.84251.98.

Lequin, R. M. (2005) 'Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)', *Clinical Chemistry*. Clin Chem, 51(12), pp. 2415–2418. doi: 10.1373/clinchem.2005.051532.

Lewis, B. *et al.* (1971) 'Abnormal lactic dehydrogenase isoenzyme patterns in ulcerative colitis with precancerous change.', *Gut*, 12(1), pp. 16–19. doi: 10.1136/gut.12.1.16.

Lewis, J. D. and Abreu, M. T. (2017) 'Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 152(2), pp. 398-414.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.019.

Li Zhou, L. *et al.* (2009) 'Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms', *Kidney International*, 76(11), pp. 1148–1160. doi: 10.1038/ki.2009.322.

Lichtenstein, G. R. *et al.* (2018) 'ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults', *American Journal of Gastroenterology*. Nature Publishing Group, 113(4), pp. 481–517. doi: 10.1038/ajg.2018.27.

Lih-Brody, L. *et al.* (1996) 'Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10), pp. 2078–2086. doi: 10.1007/BF02093613.

Liu, C. Y., Nossel, H. L. and Kaplan, K. L. (1979) 'The binding of thrombin by fibrin', *Journal of Biological Chemistry*, 254(20), pp. 10421–10425. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/489603 (Accessed: 29 April 2020).

Liu, Y. (2009) 'Advanced oxidation protein products: A causative link between oxidative stress and podocyte depletion', *Kidney International*. Nature Publishing Group, pp. 1125–1127. doi: 10.1038/ki.2009.352.

Loftus, E. V. (2004) 'Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 126(6), pp. 1504–1517. doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.063.

Luceri, C. *et al.* (2019) 'Analysis of oxidative stress-related markers in Crohn's disease patients at surgery and correlations with clinical findings', *Antioxidants*. MDPI AG, 8(9). doi: 10.3390/antiox8090378.

MacDonald, T. T. *et al.* (2008) 'Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single

cell level in normal and inflamed human intestine', *Clinical & Experimental Immunology*. Wiley, 81(2), pp. 301–305. doi: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb03334.x.

Magro, F. *et al.* (2017) 'Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis.', *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(6), pp. 649–670. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx008.

Maor, I. *et al.* (2008) 'Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: Distinction between active and non-active disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 53(8), pp. 2208–2214. doi: 10.1007/s10620-007-0141-6.

Marchiando, A. M. *et al.* (2011) 'The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 140(4), pp. 1208-1218.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.004.

Martín-Gallán, P. *et al.* (2003) 'Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications.', *Free radical biology & medicine*, 34(12), pp. 1563–74. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00185-0.

Matsuoka, K. *et al.* (2018) 'Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease', *Journal of Gastroenterology*. Springer Japan, 53(3), pp. 305–353. doi: 10.1007/s00535-018-1439-1.

Mayne, S. T. (2003) 'Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research', *The Journal of Nutrition*. Oxford University Press (OUP), 133(3), pp. 933S-940S. doi: 10.1093/jn/133.3.933s.

Mendes, F. D. *et al.* (2007) 'Abnormal hepatic biochemistries in patients with inflammatory bowel disease.', *The American journal of gastroenterology*. United States, 102(2), pp. 344–350. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00947.x.

Morgenstern, I. *et al.* (2003) 'Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease.', *Digestive diseases and sciences*, 48(10), pp. 2083–90. doi: 10.1023/a:1026338812708.

Mosli, M. H. *et al.* (2015) 'C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis.', *The American journal of gastroenterology*. United States, 110(6), pp. 802–19; quiz 820. doi: 10.1038/ajg.2015.120.

Mowat, C. *et al.* (2011) 'Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults', *Gut*, pp. 571–607. doi: 10.1136/gut.2010.224154.

Müller, J. M., Ziegler-Heitbrock, H. W. L. and Baeuerle, P. A. (1993) 'Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects', *Immunobiology*, 187(3–5), pp. 233–256. doi: 10.1016/S0171-2985(11)80342-6.

Neish, A. S. *et al.* (1992) 'Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter', *Journal of Experimental Medicine*, 176(6), pp. 1583–1593. doi: 10.1084/jem.176.6.1583.

Ng, S. C. *et al.* (2017) 'Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 390(10114), pp. 2769–2778. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.

Niculescu, L. *et al.* (2001) 'The total peroxyl radical trapping potential in serum - an assay to define the stage of atherosclerosis.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(3), pp. 285–294. doi: 10.1111/j.1582-4934.2001.tb00162.x.

Nomura, M. *et al.* (2003) '14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax', *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), pp. 2058–2065. doi: 10.1074/jbc.M207880200.

O'Sullivan, M. and O'Morain, C. (2006) 'Nutrition in inflammatory bowel disease.', *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. Netherlands, 20(3), pp. 561–573. doi: 10.1016/j.bpg.2006.03.001.

Ohlsson, B. G. *et al.* (1996) 'Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear

factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages.', *The Journal of clinical investigation*, 98(1), pp. 78–89. doi: 10.1172/JCI118780.

Oshitani, N. *et al.* (1993) 'Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy', *Gut*. BMJ Publishing Group, 34(7), pp. 936–938. doi: 10.1136/gut.34.7.936.

Özenirler, S. *et al.* (2011) 'Serum levels of advanced oxidation protein products, malonyldialdehyde, and total radical trapping antioxidant parameter in patients with chronic hepatitis C', *Turkish Journal of Gastroenterology*, 22(1), pp. 47–53. doi: 10.4318/tjg.2011.0156.

Pallis, A. G., Mouzas, I. A. and Vlachonikolis, I. G. (2004) 'The inflammatory bowel disease questionnaire: a review of its national validation studies.', *Inflammatory bowel diseases*. England, 10(3), pp. 261–269. doi: 10.1097/00054725-200405000-00014.

Parthasarathy, S., Augé, N. and Santanam, N. (1998) 'Implications of Lag Time Concept in the Oxidation of LDL', *Free Radical Research*. Taylor & Francis, 28(6), pp. 583–591. doi: 10.3109/10715769809065814.

Pascarella, F. *et al.* (2007) 'Macro-creatine kinase and macro-lactate dehydrogenase in a girl with ulcerative colitis', *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 39, pp. 780–781. doi: 10.1016/j.dld.2006.09.005.

Pascual, C. *et al.* (1998) 'Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis.', *Critical care medicine*. United States, 26(4), pp. 705–709. doi: 10.1097/00003246-199804000-00019.

Passali, D. *et al.* (2015) 'Stress ossidativo nei pazienti con diagnosi di sindrome delle apnee ostruttive notturne', *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. Pacini Editore S.p.A., 35(6), pp. 420–425. doi: 10.14639/0392-100X-895.

Peng, K. F. *et al.* (2006) 'Advanced oxidation protein products induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells', *Chinese Medical Journal*, 119(13), pp. 1088–1093. doi: 10.1097/00029330-200607010-00005.

Pereira, C. *et al.* (2015) 'Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease', *Inflammatory Bowel Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins, 21(10), pp. 2403–2417. doi: 10.1097/MIB.0000000000000506.

Pinto, M. A. S. *et al.* (2013) 'Does active Crohn's disease have decreased intestinal antioxidant capacity?', *Journal of Crohn's and Colitis*. Oxford Academic, 7(9), pp. e358–e366. doi: 10.1016/j.crohns.2013.02.010.

Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M. and Warwas, M. (2009) 'Markers of oxidative protein damage in plasma and urine of type 2 diabetic patients', *British Journal of Biomedical Science*. Step Publishing Ltd., 66(4), pp. 194–199. doi: 10.1080/09674845.2009.11730273.

Podolsky, D. K. (2002) 'Inflammatory bowel disease', *New England Journal of Medicine*, pp. 417–429. doi: 10.1056/NEJMra020831.

Polyak, K. *et al.* (1994) 'p27(Kip1), a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-β and contact inhibition to cell cycle arrest', *Genes and Development*, 8(1), pp. 9–22. doi: 10.1101/gad.8.1.9.

Poulsen, N. A. *et al.* (2012) 'Comparative analysis of inflamed and non-inflamed colon biopsies reveals strong proteomic inflammation profile in patients with ulcerative colitis', *BMC Gastroenterology*, 12. doi: 10.1186/1471-230X-12-76.

Pravda, J. (2005) 'Radical induction theory of ulcerative colitis', *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press, pp. 2371–2384. doi: 10.3748/wjg.v11.i16.2371.

Prütz, W. A. (1996) 'Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc., 332(1), pp. 110–120. doi: 10.1006/abbi.1996.0322.

Pullman, W. E. *et al.* (no date) *Enhanced Mucosal Cytokine Production in Inflammatory Bowel Disease*.

Qiu, W. *et al.* (2011) 'PUMA-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice', *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), pp. 1722–1732. doi: 10.1172/JCI42917.

Rahman, T. *et al.* (2012) 'Oxidative stress and human health', *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(07), pp. 997–1019. doi: 10.4236/abb.2012.327123.

Ramonaite, R. *et al.* (2013) 'Influence of NADPH oxidase on inflammatory response in primary intestinal epithelial cells in patients with ulcerative colitis', *BMC Gastroenterology*, 13(1), p. 159. doi: 10.1186/1471-230X-13-159.

Rana, S. V. *et al.* (2014) 'Relationship of cytokines, oxidative stress and GI motility with bacterial overgrowth in ulcerative colitis patients', *Journal of Crohn's and Colitis*. Elsevier, 8(8), pp. 859–865. doi: 10.1016/j.crohns.2014.01.007.

Reifen, R. *et al.* (2004) '5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis', *Journal of Gastroenterology*. Springer Japan, 39(6), pp. 514–519. doi: 10.1007/s00535-003-1336-z.

Reinecker, H. C. *et al.* (1993) 'Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease.', *Clinical and experimental immunology*, 94(1), pp. 174–81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403503 (Accessed: 20 April 2020).

Reinisch, W. *et al.* (1999) 'Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse.', *The American journal of gastroenterology*. United States, 94(8), pp. 2156–2164. doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01288.x.

Rezaie, A. *et al.* (2006) 'Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-β1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., pp. 110–122. doi: 10.1196/annals.1378.060.

Ricciotti, E. and Fitzgerald, G. A. (2011) 'Prostaglandins and inflammation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), pp. 986–1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.

Rieder, F. *et al.* (2011) 'Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: A novel mechanism of intestinal fibrosis', *American Journal of Pathology*, 179(5), pp. 2660–2673. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.042.

Roche, M. *et al.* (2008) 'The antioxidant properties of serum albumin', *FEBS Letters*, pp. 1783–1787. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.057.

Roesijadi, G. (2000) 'Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification.', *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46(2), pp. 393–405. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774928 (Accessed: 1 May 2020).

Roessner, A. *et al.* (2008) 'Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis', *Pathology Research and Practice*, 204(7), pp. 511–524. doi: 10.1016/j.prp.2008.04.011.

Rogler, G. *et al.* (1998) 'Nuclear factor κB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 115(2), pp. 357–369. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70202-1.

Rokutan, K. *et al.* (2008) 'Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract', *Seminars in Immunopathology*, pp. 315–327. doi: 10.1007/s00281-008-0124-5.

Schmidt, A. M. *et al.* (1992) 'Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface', *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), pp. 14987–14997.

Schmidt, A. M. *et al.* (1995) 'Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 96(3), pp. 1395–1403. doi: 10.1172/JCI118175.

Schreiber, S. *et al.* (1992) 'The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology Clinics of North America*, pp. 451–502. doi: 10.1016/B978-012394330-9/50026-0.

Šebeková, K. *et al.* (2012) 'Advanced Oxidation Protein Products and Advanced Glycation End Products in Children and Adolescents With Chronic Renal Insufficiency', *Journal of Renal Nutrition*, 22(1), pp. 143–148. doi: 10.1053/j.jrn.2011.10.022.

Selmeci, L. *et al.* (2006) 'Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels', *Free Radical Research*, 40(9), pp. 952–958. doi: 10.1080/10715760600818789.

Selmeci, L. (2011) 'Advanced oxidation protein products (AOPP): Novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome?', *Free Radical Research*, pp. 1115–1123. doi: 10.3109/10715762.2011.602074.

Shacter, E. *et al.* (1994) 'Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay', *Free Radical Biology and Medicine*, 17(5), pp. 429–437. doi: 10.1016/0891-5849(94)90169-4.

Shang, X. L. *et al.* (2006) 'Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(5), pp. 1156–1162. doi: 10.1161/01.ATV.0000214960.85469.68.

Shi, J. *et al.* (2019) 'Advanced oxidation protein products induce G1 phase arrest in intestinal epithelial cells via a RAGE/CD36-JNK-p27kip1 mediated pathway', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 25, p. 101196. doi: 10.1016/j.redox.2019.101196.

Sies, H. (1991) 'Oxidative stress: From basic research to clinical application', *The American Journal of Medicine*, 91(3 SUPPL. 3), pp. S31–S38. doi: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.

Singer, I. I. *et al.* (1998) 'Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 115(2), pp. 297–306. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70196-9.

Skvarilova, M. *et al.* (2005) 'Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrom', *Biomedical Papers*, 149(1), pp. 83–87. doi: 10.5507/bp.2005.009.

van der Sluys Veer, A. *et al.* (1998) 'Fecal lysozyme in assessment of disease activity in inflammatory bowel disease.', *Digestive diseases and sciences*. United States, 43(3), pp. 590–595. doi: 10.1023/a:1018823426917.

Sofic, E. *et al.* (2002) 'Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy.', *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. Austria, 109(5–6), pp. 711–719. doi: 10.1007/s007020200059.

Stange, E. F. *et al.* (2006) 'European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis.', *Gut*, 55 Suppl 1(Suppl 1), pp. i1-15. doi: 10.1136/gut.2005.081950a.

Stevens, C. *et al.* (1992) 'Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease.', *Digestive diseases and sciences*, 37(6), pp. 818–26. doi: 10.1007/bf01300378.

Straksyte, V. *et al.* (2019) 'Lemann Index for Assessment of Crohn's Disease: Correlation with the Quality of Life, Endoscopic Disease activity, Magnetic Resonance Index of Activity and C- Reactive Protein', *Open Medicine*. Walter de Gruyter GmbH, 14(1), pp. 785–791. doi: 10.1515/med-2019-0092.

Strober, W., Fuss, I. J. and Blumberg, R. S. (2002) 'The Immunology of Mucosal Models of Inflammation', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 20(1), pp. 495–549. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816.

Sui, X. *et al.* (2014) 'Oxidized low-density lipoprotein suppresses expression of prostaglandin E receptor subtype EP3 in human THP-1 macrophages.', *PloS one*, 9(10), p. e110828. doi: 10.1371/journal.pone.0110828.

Sun, S. *et al.* (2018) 'Advanced oxidation protein products induce S-phase arrest of hepatocytes via the ROS-dependent, β-catenin-CDK2-mediated pathway', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 14, pp. 338–353. doi: 10.1016/j.redox.2017.09.011.

Swindle, E. J. and Metcalfe, D. D. (2007) 'The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes', *Immunological Reviews*, pp. 186–205. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00513.x.

Szalai, A. J. *et al.* (1998) 'Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 160(11), pp. 5294–5299.

Tang, X. *et al.* (2015) 'Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress', *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG, 35(2), pp. 816–828. doi: 10.1159/000369740.

Tian, T., Wang, Z. and Zhang, J. (2017) 'Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/4535194.

Torbitz, V. D. *et al.* (2015) 'In Vitro Oxidation of Fibrinogen Promotes Functional Alterations and Formation of Advanced Oxidation Protein Products, an Inflammation Mediator', *Inflammation*. Springer New York LLC, 38(3), pp. 1201–1206. doi: 10.1007/s10753-014-0085-x.

Tsai, K. *et al.* (2000) 'Is the endogenous peroxyl-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans?', *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), pp. 926–933. doi: https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00180-5.

Tsuruta, F. *et al.* (2004) 'JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins', *EMBO Journal*, 23(8), pp. 1889–1899. doi: 10.1038/sj.emboj.7600194.

Tuvlin, J. A. *et al.* (2007) 'Smoking and inflammatory bowel disease', *Inflammatory Bowel Diseases*. Oxford Academic, 13(5), pp. 573–579. doi: 10.1002/ibd.20043.

Tüzün, A. *et al.* (2002) 'Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease', *Clinical Biochemistry*, 35(7), pp. 569–572. doi: 10.1016/S0009-9120(02)00361-2.

Uriarte, I. *et al.* (2013) 'Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice', *Gut*, 62(6), pp. 899–910. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302945.

Valente, A. J. *et al.* (2013) 'Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling', *Free Radical Biology and Medicine*. NIH Public Access, 60, pp. 125–135. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.012.

Valli, A. *et al.* (2007) 'Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 379(1–2), p. 87—94. doi: 10.1016/j.cca.2006.12.026.

Vargas-Robles, H. *et al.* (2019) 'Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo', *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited, pp. 4181–4198. doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4181.

Wang, X. L. *et al.* (2001) 'Genetic contributions to plasma total antioxidant activity', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(7), pp. 1190–1195. doi: 10.1161/hq0701.092146.

Wautier, M. P. *et al.* (2001) 'Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280(5 43-5). doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.5.e685.

Wendland, B. E. *et al.* (2001) 'Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease.', *The American journal of clinical nutrition*, 74(2), pp. 259–64. doi: 10.1093/ajcn/74.2.259.

Witko-Sarsat, V. *et al.* (1996) 'Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia', *Kidney International*. Nature Publishing Group, 49(5), pp. 1304–1313. doi: 10.1038/ki.1996.186.

Witko-Sarsat, V. *et al.* (1998) 'Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(5), pp. 2524–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725252 (Accessed: 20 April 2020).

Witko-Sarsat, V. (1999) 'Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(90001), pp. 76–78. doi: 10.1093/ndt/14.suppl_1.76.

Witko-Sarsat, V. *et al.* (2003) 'AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: A potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients', *Kidney International*. Blackwell Publishing Inc., 64(1), pp. 82–91. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00044.x.

Witko-Sarsat, V. and Descamps-Latscha, B. (1997) 'Advanced oxidation protein products: Novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure?', *Nephrology Dialysis Transplantation*, pp. 1310–1312. doi: 10.1093/ndt/12.7.1310.

Witko, V., Nguyen, A. T. and Descamps-Latscha, B. (1992) 'Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines', *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 6(1), pp. 47–53. doi: 10.1002/jcla.1860060110.

Wu, P. *et al.* (2015) 'Advanced oxidation protein products decrease the expression of calcium transport channels in small intestinal epithelium via the p44/42 MAPK signaling pathway', *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH, 94(5), pp. 190–203. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.02.002.

Xie, F. *et al.* (2014) 'Advanced oxidation protein products induce intestine epithelial cell death through a redox-dependent, c-jun N-terminal kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated pathway.', *Cell death & disease*, 5. doi: 10.1038/cddis.2013.542.

Xu, X. *et al.* (2017) 'Advanced Oxidation Protein Products Induce Epithelial-Mesenchymal Transition of Intestinal Epithelial Cells via a PKC δ-Mediated, Redox-Dependent Signaling Pathway', *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc., 27(1), pp. 37–56. doi: 10.1089/ars.2015.6611.

Yan, S. F. *et al.* (2003) 'Glycation, Inflammation, and RAGE: A Scaffold for the Macrovascular Complications of Diabetes and Beyond', *Circulation Research*, pp. 1159–1169. doi: 10.1161/01.RES.0000103862.26506.3D.

Yan, S. F., Ramasamy, R. and Schmidt, A. M. (2010) 'Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., pp. 1379–1386. doi: 10.1016/j.bcp.2010.01.013.

Yazici, C. *et al.* (2004) 'Increased advanced oxidation protein products in Behçet's disease: A new activity marker?', *British Journal of Dermatology*, 151(1), pp. 105–111. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06003.x.

Yazici, C *et al.* (2004) 'Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis.', *Rheumatology (Oxford, England)*, 43(10), pp. 1235–9. doi: 10.1093/rheumatology/keh317.

Yorde, D. E. *et al.* (1976) 'Competitive enzyme-liked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin.', *Clinical chemistry*. England, 22(8), pp. 1372–1377.

Youngman, K. R. *et al.* (1993) 'Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells.', *Gastroenterology*, 104(3), pp. 749–58. doi: 10.1016/0016-5085(93)91010-f.

Yu, S. W. *et al.* (2002) 'Mediation of poty(ADP-ribose) polymerase-1 - Dependent cell death by apoptosis-inducing factor', *Science*, 297(5579), pp. 259–263. doi: 10.1126/science.1072221.

Zhao, X. *et al.* (2019) 'The Relationship between Serum Bilirubin and Inflammatory Bowel Disease.', *Mediators of inflammation*, 2019, p. 5256460. doi: 10.1155/2019/5256460.

Zhou, F. L. *et al.* (2010) 'Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(20), pp. 15010–15015. doi: 10.1074/jbc.M110.103713.

Zhou, L. L. *et al.* (2012) 'The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis', *Kidney International*. Nature Publishing Group, 82(7), pp. 759–770. doi: 10.1038/ki.2012.184.

Zhou, Q. G. *et al.* (2010) 'Advanced Oxidation Protein Products Induce Inflammatory Response and Insulin Resistance in Cultured Adipocytes via Induction of Endoplasmic Reticulum Stress', *Cellular Physiology and Biochemistry*. Cell Physiol Biochem Press, 26(4–5), pp. 775–786. doi: 10.1159/000322345.

Zhu, H. and Li, Y. R. (2012) 'Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: Updated experimental and clinical evidence', *Experimental Biology and Medicine*, pp. 474–480. doi: 10.1258/ebm.2011.011358.