UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e applicata

Il ruolo della Vitamina D nelle malattie infiammatorie croniche intestinali

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Ilaria Ferrarotti

Correlatore:

Chiar.ma Prof.ssa Daniela Caccamo

Tesi Sperimentale di

Martina Manna

Matr. n°519788

Anno Accademico 2024-2025

Alla piccola Martina,

anima di sogni, forza e coraggio.

A tutto ciò che ha cambiato il ritmo del mio cammino,

alle lacrime custodite in silenzio,

a chi già c'era, a chi è arrivato e a chi è rimasto.

A Dio,

che ha concesso il desiderio del mio cuore,

che è stato con me e mi ha soccorso,

che mi ha fatto alzare in volo come l'aquila,

che ha mutato il mio dolore in danza,

e che, passato l'inverno e cessata la pioggia,

ha fatto apparire i fiori sulla terra

e sbocciare una rosa in questa primavera.

ABSTRACT

La vitamina D è un ormone pleiotropico che svolge un ruolo chiave non solo nell'omeostasi fosfo-calcica, ma anche nella modulazione della risposta immunitaria e nella regolazione dello stato redox. Negli ultimi anni, numerose evidenze hanno associato livelli ridotti di questa vitamina a una maggiore incidenza e severità delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD o MICI), suggerendo un suo coinvolgimento attivo nella patogenesi e nel mantenimento della flogosi mucosale. Alterazioni della barriera intestinale, disbiosi microbica e risposte immunitarie aberranti caratterizzano il Morbo di Crohn (MC) e la Rettocolite Ulcerosa (RCU), traducendosi in uno stato cronico pro-infiammatorio e pro-ossidativo.

L'obiettivo di questo studio è stato valutare i livelli sierici di vitamina D in una coorte di pazienti affetti da MICI, indagando il suo ruolo come immunomodulatore e potenziale fattore protettivo contro il danno cellulare ossidativo. Per questo scopo sono stati esaminati 110 pazienti (45 affetti da Morbo di Crohn, 47 da Rettocolite Ulcerosa e 18 da IBD indeterminata) in trattamento presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria "G. Martino" di Messina.

Sui campioni sierici dei pazienti sono stati analizzati i livelli di vitamina D mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). Lo studio è stato completato dalla valutazione dello stress ossidativo attraverso la determinazione dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), della concentrazione proteica totale (metodo di Bradford) e dall'analisi dei parametri ematochimici e infiammatori (emocromo, PCR, VES, profilo vitaminico e marziale) disponibili nel database del laboratorio. Le differenze tra i gruppi e le correlazioni tra le variabili sono state analizzate rispettivamente con i test di Mann-Whitney U e di Spearman.

L'analisi dei risultati ha evidenziato che, sebbene i livelli medi di vitamina D fossero sovrapponibili tra MC e RCU, il fenotipo infiammatorio e l'impatto dello stress ossidativo divergono in modo marcato tra le due patologie:

- Nei pazienti affetti da Morbo di Crohn, la carenza di vitamina D (< 20 ng/mL) si è associata in modo significativo a un profilo più infiammatorio caratterizzato dall'incremento di PCR, fibrinogeno e indici cellulari (NLR e PLR) e da un aumento del rapporto AOPP/Proteine, indice di un marcato stress ossidativo proteico.
- Nei pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa, l'ipovitaminosi D si è correlata a profonde alterazioni dell'assetto nutrizionale ed ematopoietico, con riduzione dei folati e tendenza alla macrocitosi, senza incremento significativo degli AOPP.

Nel complesso, i dati indicano che la vitamina D non rappresenti un semplice indicatore quantitativo, ma un modulatore biologico fenotipo-specifico nelle MICI, con un ruolo differenziale nella regolazione della risposta infiammatoria e dello stato redox. In particolare, l'associazione con gli AOPP nel Morbo di Crohn evidenzia un coinvolgimento diretto nel danno ossidativo proteico.

L'integrazione sistematica del monitoraggio della vitamina D, insieme a indici innovativi quali D/PCR e AOPP/Proteine, rappresenta un potenziale passo decisivo verso una gestione terapeutica più personalizzata e biologicamente mirata dei pazienti affetti da IBD.

INDICE

1 INTRODUZIONE 1
1.1 Ruolo fisiologico e metabolismo della vitamina D 1
1.1.1 Struttura chimica e forme 2
1.1.2 Metabolismo del colecalciferolo 4
1.1.3 Valutazione clinica dello stato di vitamina D 16
1.1.4 Biomarcatori emergenti dello status della vitamina D 27
1.1.5 Valori di riferimento per la vitamina D ematica 29
1.1.6 Recettore della vitamina D e Meccanismo d'Azione 30
1.2 Regolazioni e azioni biologiche della vitamina D attiva 34
1.2.1 Omeostasi del calcio e del fosfato (funzione endocrina classica) 34
1.2.2 Effetti pleiotropici della vitamina D (azioni extra-scheletriche) 38
1.3 Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) 61
1.3.1 Epidemiologia 62
1.3.2 Eziopatogenesi 63
1.3.3 Manifestazioni cliniche 66
1.3.4 Diagnosi 66
1.3.5 Approccio terapeutico 67
1.3.6 Il morbo di Crohn e la colite ulcerosa 67
1.4 Ruolo biologico della vitamina D nell'eziopatogenesi delle IBD 88
1.4.1 Stato della vitamina D nei pazienti con IBD 88
1.4.2 Ruolo della vitamina D nell'integrità della barriera epiteliale intestinale 90
1.4.3 Ruolo della vitamina D nella disbiosi microbica nelle IBD 91
1.4.4 Ruolo della vitamina D nel sistema immunitario nelle IBD 91
1.4.5 Supplementazione di vitamina D nei pazienti con IBD 92
2 SCOPO DELLA TESI 94
3 MATERIALI E METODI 95
3.1 Coorte di studio 95

3.2 Determinazione della concentrazione sierica della vitamina D mediante LC-MS 96
3.3 Determinazione dei livelli circolanti dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP) 97
3.4 Determinazione della concentrazione proteica totale mediante metodo di Bradford 98
3.5 Analisi Statistica 98
4 RISULTATI 100
4.1 Parametri biochimico-clinici dell'intera coorte di studio 100
4.1.1 Quadro Ematologico e Coagulativo 100
4.1.2 Vitamina D 102
4.1.3 Profilo Vitaminico B 102
4.1.4 Stato Marziale 103
4.1.5 Proteine Sieriche 103
4.1.6 Indici di Infiammazione e Stress Ossidativo 104
4.1.7 Profilo Funzionale Epato-Biliare e Renale 105
4.2 Confronto dei parametri biochimici e nutrizionali tra pazienti con Rettocolite Ulcerosa (RCU) e Morbo di Crohn (MC) 107
4.2.1 Stato della Vitamina D 107
4.2.2 Parametri nutrizionali e di assorbimento 108
4.2.3 Indici di infiammazione 109
4.2.4 Indici nutrizionali e di trasporto 110
4.2.5 Parametri enzimatici e metabolici 111
4.3 Valutazione della distribuzione del sesso e della vitamina D tramite test Chi-quadrato di Pearson 112
4.4 Analisi di correlazione 113
4.4.1 Correlazione tra i livelli sierici di Vitamina D e parametri clinico-laboratoristici 113
4.4.2 Correlazioni tra i principali biomarcatori ematochimici e indici di malattia 114
4.4.3 Analisi dello stress ossidativo: Prodotti Avanzati di Ossidazione Proteica (AOPP) 115
4.4.4 Correlazioni dei livelli sierici della vitamina D nel gruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn 115

4.4.5 Correlazioni nel gruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn 116
4.4.6 Correlazioni tra i livelli sierici della vitamina D nel gruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa 117
4.4.7 Correlazioni nel gruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa 118
4.4.8 Analisi stratificata per cut-off di Vitamina D nel Morbo di Crohn 119
4.4.9 Analisi stratificata per cut-off di Vitamina D nella Rettocolite Ulcerosa 120
4.4.10 Valutazione dello stress ossidativo (AOPP) in funzione del cut-off di Vitamina D 120
5 DISCUSSIONE 122
6 BIBLIOGRAFIA 128

1 INTRODUZIONE

La vitamina D, definita “la vitamina del sole”, è una molecola essenziale per l’organismo umano.[1] Oltre a essere nota per il suo ruolo tradizionale nella regolazione del metabolismo minerale osseo relativamente al calcio e al fosforo, è oggi considerata un vero e proprio ormone con funzioni pleiotropiche[2,3] e negli ultimi decenni, inoltre, si è rivelata essere coinvolta sia in processi endocrini e cardiovascolari sia nell’influenzare la risposta immunitaria modulando l’attività delle cellule dendritiche e dei linfociti T.[4,5] Infatti il recettore della vitamina D (VDR), che interagisce con la forma attiva della vitamina D, il calcitriolo o 1,25-diidrossicolecalciferolo ($1,25(OH)_2D_3$), è stato identificato in quasi tutte le cellule umane - anche in quelle che non svolgono un ruolo nel metabolismo del calcio - tra cui la pelle, il cervello, le cellule immunitarie, le cellule del cancro alla prostata e il pancreas; difatti molti studi preclinici, clinici ed epidemiologici hanno dimostrato un effetto benefico della vitamina D sulle malattie cardiovascolari,[6] sul diabete,[7] sul cancro[8], sulla depressione[9], sulla sclerosi multipla[10] e persino sull'incidenza delle cadute negli anziani.[11] Infine, ma non meno importante, nella recente pandemia di COVID-19 è emerso anche il suo effetto immunomodulante.[12] A causa della sua funzione immunoregolatrice si ipotizza che abbia un coinvolgimento nella patogenesi di malattie autoimmuni e infiammatorie croniche, tra cui le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD).[13,14]

1.1 Ruolo fisiologico e metabolismo della vitamina D

La scoperta della vitamina D ha avuto un importante impatto nella storia della biologia e della biochimica clinica. Il suo isolamento e la progressiva definizione delle sue funzioni fisiologiche hanno consentito di chiarire in modo definitivo l’eziologia del rachitismo, una patologia caratterizzata da difetti di mineralizzazione della matrice ossea che, fino ai primi decenni del XX secolo, costituiva una delle principali cause di morbilità infantile nei Paesi industrializzati. La prima descrizione del rachitismo, di Whistler,[15] risale al 1645, ma il rachitismo divenne un problema di salute pubblica nel corso della rivoluzione industriale, con la migrazione della popolazione dalle fattorie alle città. Il

rachitismo si osservava principalmente nelle città delle latitudini settentrionali e questo suggeriva che la mancanza di esposizione al sole fosse una delle possibili cause.[12] Solamente nei primi anni del Novecento si stabilì l'associazione tra rachitismo e carenza di una sostanza liposolubile. Infatti, all'inizio del XX secolo, furono effettuati una serie di esperimenti e di studi controllati che confermarono l'effetto curativo sia della luce solare sia dell'olio di fegato di merluzzo. In particolar modo nel 1919 il medico Edward Mellanby osservò che i cani alimentati con olio di fegato di merluzzo non sviluppavano rachitismo e suggerì l'esistenza di un fattore dietetico protettivo anche se non era in grado di identificarlo con precisione.[15] Da quel momento in poi si parlò della scoperta di una "vitamina che deposita il calcio." Tuttavia, solo nel 1922 Elmer McCollum e Marguerite Davis riuscirono a identificare sperimentalmente la sostanza antirachitica in oli di fegato trattati mediante la rimozione della vitamina A. L'esperimento consisteva nel trattare l'olio in modo da eliminare l'attività correlata alla vitamina A, mantenendo però l'effetto protettivo contro il rachitismo. Fu proprio McCollum che denominò quel nuovo fattore come "vitamina D".[16]

Nello stesso periodo, un altro contributo cruciale venne da Harry Steenbock, che nel 1924 dimostrò come l'irradiazione con luce ultravioletta di certi alimenti (o componenti lipidiche) aumentasse il loro contenuto di vitamina D, aprendo la strada all' integrazione alimentare (ad esempio del latte).[17] Infine, Askew et al. isolarono e determinarono la struttura della vitamina D (ergocalciferolo) da steroli vegetali irradiati (ergosterolo), e Windaus et al. determinarono le strutture e il percorso attraverso il quale il 7-deidrocolesterolo (7-DHC) nella pelle viene convertito in vitamina D_3 (colecalciferolo).[18]

1.1.1 Struttura chimica e forme

La vitamina D appartiene alla classe dei secosteroidi, composti liposolubili derivati dagli steroidi nei quali l'anello B del nucleo ciclopentano-peridofenantrenico è aperto in quanto presenta una rottura del legame tra il carbonio 9 e il carbonio 10. La presenza dell'anello B aperto conferisce alla molecola sia una particolare flessibilità, condizionandone l'attività biologica,[19] sia la capacità di essere fotoattivata dai raggi ultravioletti di tipo B (UVB).[2]

La vitamina D è costituita da un gruppo vitaminico di 5 pro-ormoni, denominati D_1, D_2, D_3, D_4 e D_5, che hanno come caratteristica comune il fatto di essere liposolubili, di attivarsi alla luce del sole e di avere analoghe funzioni nell'organismo, oltre a una struttura molecolare molto simile fra loro.

Dal punto di vista chimico, esistono 5 forme di vitamina D:

1. vitamina D_1 è un termine storico per identificare una miscela di D_2 (ergocalciferolo) con lumisterolo;[12]
2. vitamina D_2: ergocalciferolo;
3. vitamina D_3: colecalciferolo;
4. vitamina D_4: diidroergocalciferolo;
5. vitamina D_5: sitocalciferolo.

Le due forme biologicamente importanti di vitamina D sono:

A. La vitamina D_2 (ergocalciferolo) si ottiene dall'esposizione alla luce ultravioletta dell'ergosterolo, uno sterolo presente nei funghi (lieviti e macrofunghi), e non viene sintetizzata dall'organismo umano. Inoltre, diversi livelli di vitamina D_2 sono stati rilevati anche nelle alghe e piccole quantità possono essere riscontrate in alcune piante. In particolare, a causa della simbiosi tra funghi e alghe microscopiche, la vitamina D_2 può essere presente anche nei licheni.[12] Le principali fonti alimentari di vitamina D_2 sono rappresentate dai funghi esposti alla luce UV e dall'assunzione di integratori alimentari.[20]

B. La vitamina D_3 (colecalciferolo) è la principale forma di vitamina D negli esseri umani ed è di origine endogena (si stima che circa l'80-90% del fabbisogno di vitamina D sia soddisfatto dalla sintesi endogena della pelle)[12] e animale, infatti può essere assunta per mezzo della dieta tramite alcuni alimenti di origine animale tra cui pesci grassi (salmone, aringa, sgombro, sardine), oli di fegato di pesce (merluzzo) e alimenti fortificati (tuorli d'uovo, succo d'arancia, latte e cereali).[21,22] Dal punto di vista biochimico si comporta come un vero e proprio ormone steroideo liposolubile che viene prodotto nella cute a partire dal 7-deidrocolesterolo, precursore steroideo presente negli strati basali dell'epidermide, attraverso l'esposizione alla radiazione ultravioletta B (UVB 290-320nm). *(Figura 1)*

Entrambe le forme sono liposolubili e presentano attività biologica simili dopo la loro conversione metabolica alle forme idrossilate attive, anche se la vitamina D_3 risulta

generalmente più efficace nel mantenere livelli sierici adeguati di 25(OH)D rispetto alla D_2.[21]

Le due forme differiscono tra loro nella struttura della catena laterale, infatti nella vitamina D_2 ($C_{28}H_{44}O$) sono presenti un doppio legame tra il carbonio 22 e il carbonio 23 e un gruppo metilico sul carbonio 24, che sono invece assenti nella vitamina D_3 ($C_{27}H_{44}O$).[20] Queste differenze strutturali alterano il loro legame alla proteina trasportatrice, la proteina legante la vitamina D (DBP), e il loro metabolismo, ma in generale l'attività biologica dei loro metaboliti attivi è comparabile, per cui entrambe le versioni svolgono la stessa funzione come proormoni.[23]

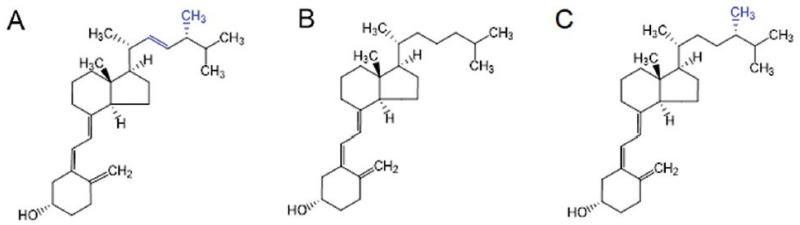


Figura 1 *- "Struttura chimica della vitamina D_2, D_3,D_4"*[12]

1.1.2 Metabolismo del colecalciferolo

Il metabolismo della vitamina D comprende una serie di processi che coinvolgono la cute, il fegato e il rene; il tutto è strettamente regolato dal sistema endocrino. L'obiettivo finale di tali processi è la produzione della forma metabolicamente attiva della vitamina D: 1,25-diidrossivitamina D [1,25$(OH)_2$D].

La regolazione della sintesi del metabolita attivo avviene principalmente a livello renale, dove diversi fattori — tra cui calcio, fosforo, ormone paratiroideo (PTH) e il fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF-23) — modulano la produzione di 1,25$(OH)_2$D.[24]

1.1.2.1 Sintesi cutanea della vitamina D

La vitamina D_3 viene prodotta a livello cutaneo a partire dal 7-deidrocolesterolo, o pro-vitamina D, un composto localizzato nella membrana plasmatica delle cellule

dell'epidermide e del derma. Durante l'esposizione alla luce solare, i raggi UVB (290–320 nm) penetrano nell'epidermide e l'energia assorbita induce la fotolisi dell'anello B del 7-deidrocolesterolo (presente nella membrana dei cheratinociti), con rottura del legame tra il carbonio 9 e il carbonio 10 e conseguente formazione della pre-vitamina D_3, un 9,10-seco-steroide che rappresenta il precursore immediato della vitamina D biologicamente attiva.

Holick e colleghi hanno dimostrato che la produzione di pre-vitamina D_3, in seguito a irradiazione solare o ultravioletta (UV), è un processo rapido, raggiungendo il picco nel giro di poche ore. Inoltre, un'esposizione prolungata ai raggi UV determina la fotoconversione della pre-vitamina D_3 in lumisterolo e tachisterolo, composti biologicamente inattivi.[25,26] Il lumisterolo si forma tramite isomerizzazione fotonica, è fotostabile e non può essere riconvertito direttamente in vitamina D_3; di conseguenza tende ad accumularsi in caso di eccessiva esposizione UV. Il tachisterolo, invece, deriva da una fotoconversione alternativa, è fotolabile e va incontro a degradazione progressiva, evitando così l'accumulo anche in presenza di irradiazione intensa.

La pelle dispone dunque di un meccanismo di autoregolazione, attraverso cui l'eccesso di irradiazione UVB non determina la produzione di quantità tossiche di vitamina D_3. Oltre alla fotoconversione della pre-vitamina D_3, anche la vitamina D_3 stessa può essere trasformata in suprasteroli I e II e in 5,6-trans-vitamina D_3, ulteriori prodotti biologicamente inattivi.[25] Questo sistema garantisce che la sintesi cutanea non superi livelli potenzialmente dannosi.

Sebbene la produzione di lumisterolo sia fotostabile, essa è termicamente reversibile: quando i livelli di pre-vitamina D_3 diminuiscono, il lumisterolo può riconvertirsi in pre-vitamina D_3. La conversione termica della pre-vitamina D_3 in vitamina D_3 è fortemente dipendente dalla temperatura: a circa 0°C essa non avviene, mentre a 37°C la trasformazione procede lentamente e in maniera continua. Per tale motivo, anche un'esposizione solare relativamente breve può garantire una sintesi prolungata di vitamina D_3 grazie ai successivi passaggi di conversione termica.

1.1.2.2 Conversione della pre-vitamina D_3 in vitamina D_3

La pre-vitamina D_3 è un secosteroide termodinamicamente instabile soggetto a tautomerizzazione termica spontanea che, nel giro di alcune ore, isomerizza determinando la formazione di colecalciferolo (vitamina D_3). Tale processo avviene per rotazione attorno al legame C5–C6, che consente il passaggio alla forma strutturalmente più stabile.[27]

È stato dimostrato che a 37°C circa l'80% della pre-vitamina D_3 viene isomerizzato in vitamina D_3 entro 8 ore.[12]

L'isomerizzazione modifica le interazioni idrofobiche e idrofile che ancorano la pre-vitamina D_3 alla membrana plasmatica, permettendo alla vitamina D_3 di essere rilasciata dalla membrana stessa nello spazio extracellulare e successivamente nella circolazione sistemica. Nel sangue, la vitamina D_3 si lega principalmente alla Vitamin D–Binding Protein (DBP), una proteina di trasporto affine all'albumina, presente nei capillari del derma.[27]

1.1.2.3 Assorbimento intestinale

Dopo l'ingestione di alimenti contenenti vitamina D (sia D_2 che D_3), essa è inizialmente inglobata nella matrice alimentare costituita da lipidi, proteine e componenti strutturali dell'alimento stesso. La sua liberazione avviene nello stomaco, dove la pepsina interviene separando la frazione proteica associata alla vitamina D. Successivamente la molecola raggiunge il duodeno dove proteasi, amilasi e lipasi completano il rilascio della vitamina dalla matrice alimentare.[12] Essendo una molecola liposolubile, il suo assorbimento avviene in associazione alla componente lipidica della dieta. In questa fase si ha l'intervento di sali biliari che emulsionano i lipidi alimentari aumentando la superficie di contatto per gli enzimi digestivi e favorendo la dispersione della vitamina D in piccole goccioline lipidiche facilmente accessibili agli enzimi digestivi.[22]

La presenza della bile e della componente lipidica nel lume intestinale favorisce la formazione di micelle miste (costituite da sali biliari, fosfolipidi, colesterolo e prodotti della digestione lipidica). Queste veicolano la vitamina D nel lume intestinale, un ambiente altrimenti sfavorevole alle molecole lipofile, e ne facilitano l'avvicinamento alla membrana degli enterociti del digiuno e del tratto prossimale dell'ileo, dove

l’assorbimento avviene prevalentemente per diffusione passiva grazie alla natura lipofila della molecola.[2] Alle concentrazioni tipiche della dieta, l’ingresso della vitamina nell’enterocita è mediato da specifiche proteine di trasporto localizzate sulla membrana apicale, tra cui il recettore scavenger di classe B di tipo 1 (SR-B1), il cluster di differenziazione 36 (CD36) e la proteina Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).[12]

A concentrazioni farmacologiche più elevate (>μM), invece, la vitamina D può attraversare la membrana anche per diffusione passiva. Studi in vitro su cellule Caco-2 derivate dal colon retto hanno inoltre suggerito l’esistenza di un meccanismo di efflusso attivo che potrebbe limitare l’accumulo intracellulare del composto.[12]

All’interno dell’enterocita, la vitamina D viene incorporata nei chilomicroni insieme ai lipidi ri-esterificati. I chilomicroni vengono successivamente secreti nei vasi chiliferi della mucosa intestinale, entrando così nel sistema linfatico e, attraverso il dotto toracico, nella circolazione sistemica.[28]

Una parte della vitamina D veicolata dai chilomicroni può essere immediatamente captata dal tessuto adiposo e muscolare grazie all’azione della lipoproteina lipasi, mentre la restante quota viene trasferita alla Vitamin D Binding Protein (DBP), che ne consente il trasporto plasmatico.[29]

Per quanto riguarda le forme idrossilate della vitamina D [come 25(OH)D e $1,25(OH)_2D$], che vengono somministrate come farmaci, il loro assorbimento segue una via distinta: non richiedono la formazione di micelle né l’incorporazione nei chilomicroni e vengono assorbite direttamente nella vena porta attraverso un meccanismo ancora non completamente chiarito.[12]

Diversi fattori possono influenzare la biodisponibilità della vitamina D, tra cui farmaci che riducono l’assorbimento dei lipidi (come l’orlistat usato nel trattamento dell’obesità), e i fitosteroli vegetali che competono con la vitamina D per l'incorporazione micellare e per l'assorbimento apicale nell'intestino.[12] Anche altre vitamine liposolubili come A, E e K possono competere con la vitamina D durante il processo di assorbimento. In particolare l'interazione tra l'assorbimento di vitamina D e vitamina K è stata confermata da Reboul et al.[30]

Poiché l’assorbimento della vitamina D coinvolge specifiche proteine di trasporto, anche varianti genetiche - come mutazioni nel promotore del gene o nella sequenza

amminoacidica - che alterano l'espressione o l'attività dei trasportatori intestinali possono modulare l'efficienza di questo processo.[12]

1.1.2.4 Trasporto

In seguito alla sintesi cutanea o all'assorbimento intestinale, la vitamina D viene immessa nel circolo ematico. La vitamina D assunta con la dieta viene lentamente trasferita dai chilomicroni alla DBP, mentre la vitamina D sintetizzata nella cute è quasi esclusivamente legata alla DBP.[12] Solo una quota minima dei metaboliti della vitamina D circola in forma libera: circa lo 0,03% della 25-idrossivitamina D [25(OH)D] e lo 0,4% della 1,25-diidrossivitamina D [$1,25(OH)_2D$].[31] La frazione prevalente è associata alla DBP, responsabile del trasporto di circa l'85% dei metaboliti; il restante 15% si lega, invece, all'albumina (ALB).[32]

La DBP è un membro della famiglia delle proteine del siero dell'albumina; in particolare l'albumina, l'α-fetoproteina e la DBP appartengono alla stessa famiglia genica per cui condividono un'origine evolutiva comune.

La proteina legante la vitamina D (DBP), precedentemente denominata Gc-globulina (group-specific component) o transcalciferina, è stata descritta nel 1959, ma la sua funzione di trasporto è stata scoperta nel 1975.[12] È una glicoproteina plasmatica multifunzionale da 52 a 58 kDa e costituita da 3 domini strutturali. (*Figura 2*) È composta da una singola catena polipeptidica di 458 amminoacidi ed è codificata dal gene *DBP*, localizzato sul cromosoma 4q12-q13.[33]

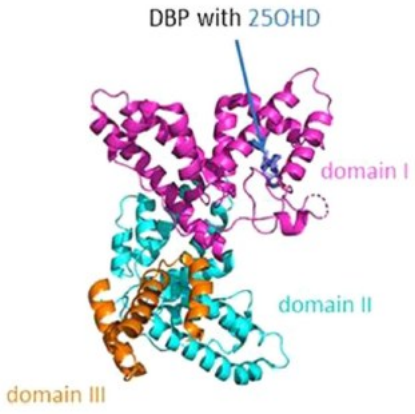


Figura 2 *- "I 3 domini della DBP"* [34]

La DBP è sintetizzata principalmente nel fegato, ma non esclusivamente; altre sedi includono reni, testicoli e tessuto adiposo. Le concentrazioni di DBP sono normalmente comprese tra 4 e 7 μM, concentrazioni molari circa venti volte superiori rispetto ai metaboliti della vitamina D, tanto che la DBP è satura solo per circa il 2%. Questa caratteristica conferisce alla DBP la funzione di ampio serbatoio circolante, contribuendo a stabilizzare nel tempo i livelli plasmatici della vitamina D e a prevenire situazioni carenziali in condizioni di ridotta disponibilità.

La DBP lega sia la D_2/D_3 non metabolizzata sia tutti i loro metaboliti, ma presenta una particolare affinità per 25(OH)D e 24,25$(OH)_2$D, superiore a quella osservata per la vitamina D non idrossilata o per 1,25$(OH)_2$D.[35] Come altre proteine leganti gli ormoni steroidei, i suoi livelli aumentano in condizioni di elevata esposizione estrogenica, ad esempio in gravidanza o durante l'assunzione di estrogeni orali. Al contrario, condizioni come malattie epatiche e sindrome nefrosica che comportano una riduzione dei livelli di DBP e albumina, determinano una riduzione dei livelli totali di 25(OH)D e 1,25$(OH)_2$D senza necessariamente influenzare le concentrazioni libere. Analogamente, i livelli di DBP si riducono durante le malattie acute e dopo traumi, il che può rendere difficile interpretare correttamente i livelli totali di 25(OH)D.[24]

La DBP ha un'emivita di 1,7 giorni, molto più breve di quella del 25(OH)D, il che indica che le molecole di 25(OH)D vengono intensamente riciclate durante la loro permanenza nell'organismo.[12]

Oltre al suo ruolo di proteina di trasporto, la DBP svolge una serie di funzioni indipendenti:[36]

- Funzione di deposito, grazie alla capacità di immagazzinare 25(OH)D e rilasciarla lentamente in base alle necessità fisiologiche;[37]
- Legame dell'actina rilasciata in circolo durante processi di morte cellulare, agendo come importante sistema di "scavenging";
- Attivazione dei macrofagi modulando le risposte immunitarie e infiammatorie;
- Attivazione degli osteoclasti partecipando al controllo dello sviluppo osseo.

La DBP, libera o carica di vitamina D o dei suoi metaboliti, viene rimossa dalla circolazione principalmente dal fegato e dai reni, sedi in cui i metaboliti della vitamina D legati alla DBP hanno accesso preferenziale per la metabolizzazione.[12]

Secondo la *free hormone hypothesis*, solo la frazione libera o debolmente legata all'albumina è in grado di diffondersi nei tessuti ed esercitare attività biologica. I metaboliti della vitamina D legati al DBP non sono generalmente disponibili per la maggior parte delle cellule. Tuttavia, il complesso 1,25$(OH)_2$D–DBP può entrare nelle cellule mediante proteine di membrana come caveolina, cubilina e megalina, oppure attraverso diffusione semplice.[35]

Un'importante eccezione alla regola della biodisponibilità della frazione libera si osserva nella placenta, nella parotide e nel tubulo prossimale renale, dove è espresso il recettore endocitico megalina/cubilina che consente l'endocitosi del complesso DBP–vitamina D, determinando l'ingresso della vitamina D legata e la sua successiva idrossilazione renale.[38] Questo meccanismo è fondamentale per prevenire la perdita renale dei metaboliti della vitamina e per garantire il corretto il trasporto dei metaboliti della vitamina D al feto, nonché la regolazione della secrezione di PTH.[24,33]

La 25(OH)D rappresenta il principale metabolita circolante della vitamina D ed è considerata il miglior indicatore dello stato vitaminico dell'organismo, poiché riflette le riserve derivanti dalla sintesi cutanea e dall'apporto dietetico. La sua emivita, compresa tra 12 e 18 giorni, rende necessaria una supplementazione periodica nei soggetti affetti da ipovitaminosi per mantenere livelli sierici adeguati.[29]

1.1.2.5 Idrossilazione epatica

La vitamina D, sia di origine cutanea e sia assunta con la dieta (ergocalciferolo e colecalciferolo), viene trasportata nel circolo sanguigno legata alla DBP sotto forma di complessi D_2-DBP e D_3-DBP, raggiungendo infine il fegato. Una volta internalizzata negli epatociti, la vitamina D subisce il processo di 25-idrossilazione da parte di una serie di enzimi microsomiali appartenenti alla famiglia dei citocromi P450, in particolare CYP2R1, oggi riconosciuto come la 25-idrossilasi più rilevante fisiologicamente nell'uomo.[32] Attraverso questo meccanismo, la D_3 viene idrossilata a 25-idrossivitamina D [25(OH)D], nota anche come calcidiolo, la principale forma circolante della vitamina D e il marker più affidabile dello stato vitaminico, grazie alla lunga emivita (2-3 settimane) e alla stabilità plasmatica.[2]

A differenza dell'idrossilazione renale, quella epatica in C-25 è poco regolata e non risponde direttamente a paratormone (PTH), calcio o fosfato. Tuttavia in alcune

condizioni patologiche quali steatosi epatica, obesità, epatopatie croniche e infiammazione cronica possono ridurre l'efficienza della 25-idrossidazione determinando una carenza funzionale della vitamina D. Questo fenomeno è particolarmente rilevante nelle IBD.

1.1.2.6 Idrossilazione renale e attivazione

Il calcidiolo [25(OH)D] legato alla DBP forma un complesso [DBP-25(OH)D] che, tramite il circolo sanguigno, raggiunge i reni dove viene internalizzato tramite endocitosi mediata da megalina e cubilina all'interno dei tubuli prossimali del rene.[2] All'interno delle cellule tubulari avviene la seconda idrossilazione, in cui la 25(OH)D viene convertita nella forma biologicamente attiva 1,25-diidrossivitamina D [1,25$(OH)_2$D], o calcitriolo, grazie all'enzima mitocondriale 1α-idrossilasi (CYP27B1), appartenente alla famiglia dei citocromi P450.[39] Il calcitriolo, caratterizzato da un'emivita breve (4–6 ore), esercita i suoi effetti legandosi al recettore della vitamina D (VDR), modulando l'espressione genica in numerosi tessuti.[40]

La conversione renale della 25(OH)D in 1,25$(OH)_2$D rappresenta un passaggio centrale nell'omeostasi del calcio e del fosforo.[39] La regolazione della CYP27B1 dipende dall'integrazione di segnali provenienti da PTH, FGF-23, CaSR e dai livelli sierici di calcio/fosforo.[39] In particolare, il calcio, il fosfato e l'FGF-23 stimolano l'attività dell'enzima CYP24A1, responsabile della degradazione dei metaboliti della vitamina D, mentre PTH e ipocalcemia ne inibiscono l'attività.

Il calcitriolo esercita numerosi effetti biologici, regolando l'attività dei canali del calcio e del cloro, l'attivazione e la distribuzione della proteina chinasi C e l'attività della fosfolipasi C in diverse cellule tra cui osteoblasti, fegato, muscoli e intestino.[12]

1.1.2.7 Sintesi extra-renale del calcitriolo

Sebbene il rene rappresenti il principale sito di produzione endocrina della 1,25-$(OH)_2$D, l'enzima CYP27B1 (1α-idrossilasi) è espresso anche in numerosi tessuti extra-renali, quali cellule endoteliali, cellule epiteliali, cellule del sistema immunitario (macrofagi e cellule dendritiche), placenta e nei tessuti della ghiandola parotidea. In questi tessuti,

quindi, la produzione di calcitriolo avviene con modalità autocrina o paracrina,[24] senza contribuire in modo significativo ai livelli sierici.[41,42]

La sintesi extra-renale di $1,25(OH)_2D$ è regolata dal PTH e da stimoli immunologici e infiammatori, come l'attivazione dei recettori Toll-Like (TLR) nei macrofagi. Il calcitriolo locale contribuisce alla modulazione della risposta immunitaria e ai processi di differenziazione cellulare.[39]

Alterazioni della sintesi o regolazione della $1,25(OH)_2D$ si osservano in varie condizioni patologiche:

- Insufficienza renale cronica, caratterizzata da ridotta attività della 1α-idrossilasi e accumulo di fosforo, che stimola FGF-23 e determina iperparatiroidismo secondario;[43]
- Osteomalacia ipofosfatemica da eccesso di FGF-23, in cui l'inibizione cronica di CYP27B1 riduce i livelli di calcitriolo;[44]
- Granulomatosi e linfomi, in cui l'eccessiva attività extra-renale di CYP27B1 causa ipercalcemia da iperproduzione di calcitriolo;[45]
- Deficit di vitamina D, che compromette la disponibilità di substrato per la sintesi renale di calcitriolo.[2]

Questi esempi mostrano l'importanza del delicato equilibrio tra vitamina D, PTH, FGF-23 e regolazione del metabolismo minerale.

1.1.2.8 Eliminazione

La via catabolica prevede una sequenza di idrossilazioni a carico del carbonio 24, avviata dall'enzima mitocondriale CYP24A1, che porta alla formazione dell'acido calcitroico, metabolita finale della degradazione della vitamina D successivamente escreto nella bile. L'enzima CYP24A1, codificato dal gene CYP24A1 sul cromosoma 20q13.2, mostra elevata affinità sia per $1,25(OH)_2D_3$ che converte in 1,24,25-triidrossi-vitamina D [$1,24,25\text{-}(OH)_3D_3$], sia per $25(OH)D_3$, trasformata in 24,25-diidrossi-vitamina D [$24,25\text{-}(OH)_2D_3$].[46]

Pur essendo un prodotto del catabolismo della vitamina D, la $24,25(OH)_2D_3$, mantiene una certa attività biologica. Tale attività si manifesta, ad esempio, nella modulazione della fisiologia dei condrociti e nella regolazione della funzione della ghiandola paratiroidea.[31] I metaboliti inattivi ($1,24,25\text{-}(OH)_3D_3$) e ($24,25(OH)_2D_3$) vengono convertiti in acido calcitroico che viene escreto prevalentemente attraverso la bile: i metaboliti coniugati

vengono secreti nel flusso biliare e successivamente eliminati con le feci, che rappresentano quindi la principale via di eliminazione. Una quota minore dei metaboliti più idrosolubili può essere eliminata anche a livello renale, escreta con le urine.[47]

Oltre a CYP24A1, sono stati descritti percorsi metabolici minori, in continuo studio. Tra questi vi è l'epimerizzazione in posizione C-3, catalizzata da enzimi 3-epimerasi, appartenenti al gruppo dei citocromi P450.[35] Questo processo, che si verifica nei tessuti extra-renali, consiste nell'isomerizzazione del gruppo idrossile sul C-3 dell'anello A dalla conformazione β a quella α, generando metaboliti epimerici che vengono successivamente metabolizzati attraverso la via di ossidazione in C-24.[48-49]

I principali metaboliti epimerici sono:

- 3-epi-25-idrossivitamina-D_3 (3-epi-25(OH)D_3);
- 3-epi-24,25-diidro-idrossivitamina-D_3 (3-epi-24,25$(OH)_2D_3$);
- 3-epi-1,25-idrossivitaminaD_3 (3-epi-1,25$(OH)_2D_3$).

Questi metaboliti sono abbondanti nei neonati e nei bambini piccoli, sebbene il significato fisiologico di questo percorso ridondante non sia ancora determinato.[39] I metaboliti di 3-epi-vitamina D hanno un'affinità inferiore per la DBP e il VDR rispetto alle rispettive forme non epimerizzate [25(OH)D_3 e 1,25$(OH)_2D_3$]. Il 3-epi-1,25$(OH)_2D_3$ possiede alcune attività anti-proliferative e di differenziazione e sopprime la secrezione di PTH, sebbene con efficacia inferiore rispetto al calcitriolo standard.[35]

In parte, alcuni metaboliti intermedi possono temporaneamente accumularsi nel tessuto adiposo e venire rilasciati gradualmente, contribuendo alla modulazione nel tempo della disponibilità complessiva di vitamina D. L'efficacia dei processi di eliminazione dipende dalla funzionalità epatica e renale, nonché dalla forma e quantità di vitamina D presenti nell'organismo.

1.1.2.9 Fattori che influenzano la sintesi e la carenza di vitamina D

Le carenze nutrizionali sono di solito il risultato di una inadeguatezza alimentare, un ridotto assorbimento e/o un aumento del fabbisogno o dell'escrezione. Una carenza di vitamina D può verificarsi quando:

- l'esposizione alla luce solare è limitata e di conseguenza si riduce la sintesi cutanea (causa principale);

- l’assunzione dietetica abituale è scarsa. Diete carenti di vitamina D sono associate ad allergia al latte, intolleranza al lattosio, ovovegetarianismo e veganismo;
- i reni non possono convertire la 25-idrossivitamina D nella sua forma attiva;
- l’assorbimento della vitamina D da parte del tratto digestivo è insufficiente.

La produzione cutanea di vitamina D_3 dipende da un insieme complesso di fattori ambientali, biologici e comportamentali:

1. Fattori ambientali che possono limitare l’esposizione al sole sono: la stagione, la latitudine, l’altitudine e l’orario del giorno. L’intensità dell’irradiazione UVB è un determinante primario della sintesi cutanea. La radiazione efficace per la fotoconversione del 7-deidrocolesterolo in pre-vitamina D_3 riguarda per lo più lunghezze d’onda comprese tra 290 e 315 nm. Di conseguenza, la variazione stagionale dell’irradiazione solare, direttamente connessa alla latitudine, esercita un forte impatto sui livelli circolanti di 25(OH)D. Studi osservazionali hanno confermato che nei mesi invernali, nelle aree temperate, la sintesi cutanea può essere assente o fortemente limitata (ad esempio, da novembre a marzo alla latitudine di 42° N).[26] Il risultato è una marcata variazione stagionale dei livelli sierici di 25(OH)D, più elevati in estate e più bassi in inverno, in modo proporzionale alla latitudine.[50] Ciò spiega perché: a Edmonton (52°N) la produzione di vitamina D_3 è pressoché nulla da metà ottobre a metà aprile, mentre a Boston (42°N) si osserva un periodo leggermente più ampio di sintesi inefficace; in contrasto, a Los Angeles (34°N) e a San Juan (18°N) dove la sintesi cutanea può avvenire durante tutto l’anno.[51] Tali risultati, ottenuti al livello del mare, indicano inoltre come l’altitudine rappresenti un fattore amplificante: a quote elevate, la minore densità atmosferica consente un passaggio più efficiente degli UVB, motivo per cui gli sciatori possono sintetizzare vitamina D anche durante giornate soleggiate d’inverno. Oltre i 40° di latitudine, la quota di fotoni UVB che raggiungono la superficie cutanea si riducono dell’oltre 80% nei mesi invernali (ottobre-marzo nell’emisfero settentrionale; aprile-settembre nell’emisfero meridionale.[12] L’orario del giorno influenza notevolmente la produzione cutanea: la sintesi raggiunge il picco intorno al mezzogiorno, quando l’angolo di incidenza dei raggi UVB è più favorevole. Durante l’estate, una porzione più ampia della giornata (10:00–15:00) comporta livelli sufficienti di UVB per avviare la fotoconversione, mentre in inverno tale finestra si restringe fino a scomparire alle

latitudini più elevate. Un'esposizione di 20 minuti di tutto il corpo al sole estivo è in grado di produrre fino a 250 µg di vitamina D_3, che determina la concentrazione sierica raccomandata (>30 ng/mL) del suo metabolita e indicatore sistemico, la 25-idrossivitamina D [25(OH)D].[12] Anche la durata dell'esposizione e l'estensione della superficie corporea scoperta influenzano direttamente la quantità totale di vitamina D prodotta.

2. Fattori biologici: la melanina epidermica che, competendo con il 7-deidrocolesterolo per l'assorbimento dei raggi UVB, riduce l'efficienza della sintesi cutanea di vitamina D_3. Tale meccanismo contribuisce a spiegare i livelli più bassi di 25(OH)D osservati in molte persone di etnia nera e ispanica residenti in regioni temperate.[52] L'età è uno dei principali fattori: con l'invecchiamento, la concentrazione cutanea di 7-deidrocolesterolo diminuisce, riducendo l'efficienza della fotoconversione. L'impatto dell'esposizione al sole sui livelli di vitamina D nei neonati e negli anziani è molto importante e quindi l'assunzione di questa vitamina da fonti alimentari o integratori è molto rilevante per questi soggetti.[12] Anche lo spessore dello strato corneo, le condizioni dermatologiche che alterano la struttura cutanea e alcuni farmaci (ad esempio glucocorticoidi e antiepilettici) possono ridurre la produzione cutanea o accelerare la degradazione della vitamina D. Persino il fototipo gioca un ruolo complesso, in quanto una maggiore pigmentazione fornisce protezione naturale contro i danni da UV, ma riduce la quantità di radiazione disponibile per la sintesi. Inoltre durante la gravidanza la vitamina D viene trasportata al feto attraverso la placenta perciò è necessaria un'integrazione di vitamina D per prevenirne la carenza sia nella madre che nel feto.

3. Fattori comportamentali come l'abbigliamento e l'uso di creme solari possono limitare drasticamente la sintesi cutanea. L'abbigliamento costituisce una barriera quasi completa ai raggi UVB, [53] mentre le creme solari– soprattutto quelle con elevati SPF (fattore di protezione solare) – riducono significativamente la produzione di vitamina D_3, pur non azzerandola completamente con i prodotti più moderni.[50] Questi elementi sono determinanti in particolari contesti culturali: ad esempio, l'aumento della prevalenza di rachitismo e osteomalacia osservata nei beduini mediorientali, che indossano abiti coprenti, rispetto agli ebrei israeliani, con esposizione solare simile, rappresenta un caso emblematico.[31]

4. Condizioni patologiche: allergie alimentari, celiachia, colestasi, stenosi biliare, sindrome infiammatoria intestinale e fibrosi cistica possono determinare una carenza di vitamina D. È stato inoltre dimostrato che i pazienti sottoposti a gastrectomia possono presentare una carenza di vitamina D a causa della perdita di acidità e del malfunzionamento della parte prossimale dell'intestino tenue.[12] Malattie renali croniche sono associate a un basso tasso di attivazione della vitamina D a causa della perdita di CYP27B1 e della soppressione di questo enzima come conseguenza dell'iperfostatemia. I pazienti con sindrome nefrosica possono sviluppare questa carenza a causa della perdita di 25(OH)D legata alla DBP nelle urine. Mutazioni genetiche degli enzimi responsabili del metabolismo della vitamina D possono causare una carenza di vitamina a causa di una ridotta sintesi o ad un eccessivo catabolismo dei metaboliti attivi. Esempi sono le mutazioni e le forme tumorali che producono FGF-23 e possono causare l'insufficienza di vitamina D.

5. Fattori atmosferici quali inquinamento, nuvolosità e presenza di ozono possono attenuare significativamente la quota di UVB che raggiunge la superficie terrestre. L'inquinamento urbano, in particolare, può ridurre l'esposizione effettiva agli UVB anche del 50–60% in aree che presentano elevati livelli di smog, costituendo un ulteriore determinante di ipovitaminosi D nelle popolazioni urbane.

1.1.3 Valutazione clinica dello stato di vitamina D

La misurazione dei livelli di vitamina D nel sangue rappresenta uno strumento essenziale per valutare lo stato nutrizionale di un individuo, per diagnosticare carenze e per monitorare l'efficacia della supplementazione o il rischio di tossicità da sovradosaggio.[40]

Sebbene la ricerca abbia identificato una vasta gamma di metaboliti (mono-, di- e tri-idrossilati, epimeri, lattoni e solfati), la pratica clinica routinaria si concentra su un numero limitato di composti:[12]

- 25(OH)D_3 e 25(OH)D_2, misurabili anche in saliva, urina, liquido cerebrospinale, latte e tessuti, ma normalmente valutate solo nel sangue;
- metaboliti meno frequenti ma di crescente interesse:

- l’epimero C3 della 25(OH)D [3-epi-25(OH)D)]
- la frazione libera di 25(OH)D nel plasma
- il rapporto tra 24,25$(OH)_2D$ e 25(OH)D totale noto come Vitamin D Metabolite Ratio (VMR).

Nonostante il calcitriolo [1,25$(OH)_2D_3$] sia il metabolita attivo della vitamina D, non è raccomandato il suo impiego come biomarcatore perché:[12]

1. la sua concentrazione nel siero/plasma è notevolmente inferiore rispetto alla 25(OH)D;
2. la sua concentrazione sierica non riflette lo status vitaminico globale, essendo strettamente regolata dall'asse PTH-calcio-fosforo;
3. non sono disponibili né materiali di riferimento né una procedura di misura di riferimento.

1.1.3.1 Metodi di determinazione della vitamina D

Il primo metodo di determinazione della 1,25$(OH)_2D$, sviluppato nel 1974, si basava su un saggio di legame radio-recettoriale, mentre negli anni successivi furono introdotte altre tecniche analitiche, tra cui cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), saggi immunoenzimatici (EIA), gascromatografia-spettrometria di massa e, più recentemente, cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). Lo sviluppo di metodi immunometrici automatizzati ha portato innovazione rendendo disponibile in molti laboratori clinici la determinazione dell’analita. I dati più recenti dei programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) indicano che attualmente il 75% dei laboratori utilizza metodi automatizzati, il 15% metodi manuali e solo il 9% si affida alla LC-MS/MS. A differenza della 25(OH)D, per la 1,25$(OH)_2D$ non sono stati definiti livelli decisionali condivisi e gli intervalli di riferimento risultano variabili in relazione al metodo analitico impiegato. Sebbene la determinazione della 1,25$(OH)_2D$ non sia raccomandata per lo screening della popolazione generale, essa riveste un ruolo cruciale in specifiche condizioni patologiche. Secondo le recenti raccomandazioni della *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC, 2021) e le evidenze pubblicate da Herrmann e Giustina et al. (2022), il dosaggio del calcitriolo è indicato nei seguenti contesti clinici:[54]

- disturbi del metabolismo minerale: ipercalcemie di natura inspiegabile, iperparatiroidismo primario e valutazione del rachitismo calciopenico o osteomalacia;
- malattie granulomatose: sarcoidosi e altre patologie che comportano una produzione extra-renale incontrollata di $1,25(OH)_2D$;
- patologie genetiche e rare: difetti della 1α -idrossilasi (rachitismo vitamina D-dipendente tipo 1, con livelli inferiori a 59 pmol/L); resistenza ereditaria alla vitamina D (mutazioni del recettore VDR); ipofosfatemia X-linked e sindromi mediate da FGF-23; sindrome di McCune-Albright e osteomalacia indotta da tumori.[55]

Si ritengono necessari ulteriori studi per assicurare lo sviluppo di un metodo di riferimento, la standardizzazione dei metodi attualmente disponibili e l'identificazione di appropriati valori di riferimento.[54] A tal proposito è stato concordato che lo studio dello status vitaminico D debba essere effettuato attraverso la forma biologica 25-idrossilata (25-(OH)D) per tre motivi:

1. la 25(OH)D ha un'emivita sufficientemente lunga da consentire la determinazione della quota stabile nel sangue, rendendola un indicatore affidabile dello status vitaminico;[54]
2. la concentrazione nel sangue è circa1000 volte superiore a quella della forma di-idrossilata [$1\alpha,25(OH)_2D$] permettendo l'impiego di metodi analitici con adeguata sensibilità analitica;[54]
3. la 25(OH)D riflette le variazioni derivanti sia dall'assunzione alimentare che dalla sintesi endogena, per cui è considerata un buon biomarcatore per monitorare lo stato della vitamina D negli adulti e nei bambini.[54]

Nella pratica clinica, la concentrazione di 25(OH)D viene generalmente espressa come somma delle frazioni $25(OH)D_2$ e $25(OH)D_3$, indicata come 25(OH)D totale.[12]

La determinazione della vitamina D nella routine clinica presenta numerose problematiche analitiche dovute a:

- concentrazioni molto basse nei fluidi biologici;[12]
- breve emivita biologica nel sangue;[12]
- forte legame con la DBP;[54]
- necessità di determinare in forma equimolare le frazioni $25(OH)D_2$ e $25(OH)D_3$;[54]

- presenza di numerose sostanze con simile composizione chimica che possono provocare cross-link e interferenze;[54]
- instabilità chimica verso luce, ossigeno e temperatura.[12]

Le metodiche analitiche più utilizzate nei laboratori clinici vengono distinte in due categorie:

1. metodi immunoenzimatici e radioimmunologici quali il test di legame proteico competitivo (CPBA), il radio-immunoassay (RIA), l'immunoassay a chemiluminescenza (CLIA) e l'immunoassay enzimatico (ELISA), che utilizzano anticorpi specifici per la 25(OH)D. Questi metodi consentono una quantificazione rapida, ma possono essere soggetti a fenomeni di cross-reattività che determinano sovrastime o sottostime dei risultati;[54]

2. metodi cromatografici che prevedono la rimozione completa di proteine e lipidi durante la fase pre-analitica mediante solventi organici. Tra questi rientrano: la cromatografia liquida (LC) con rilevazione UV, la LC con rilevazione tramite spettrometria di massa (LC-MS), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (spettrometria di massa tandem) (LC-MS/MS). Tali tecniche offrono un'elevata precisione e accuratezza, specialmente per distinguere le diverse forme di vitamina D, a fronte di costi più elevati e maggiore complessità strumentale.[2]

Metodi immunochimici

Il CPBA (*Competitive Protein-Binding Assay*), introdotto nel 1971, è stata la prima metodica ampiamente diffusa per la quantificazione della 25(OH)D. Nello specifico il metodo originale era di tipo competitivo e utilizzava siero di ratto rachitico come fonte della proteina legante.[54] Il CPBA si basa sulla competizione tra la vitamina D presente nel campione del paziente e una quantità nota di vitamina D marcata solitamente con l'isotopo radioattivo del trizio (^3H) per i siti di legame della DBP. Sebbene fondamentale per la ricerca storica, il CPBA ha presentato diversi inconvenienti tra cui:

- complessità operativa e necessità di elaborazione manuale;
- frequente cross-reattività con altri metaboliti della vitamina D;

- obbligo di estrazione con solventi organici per liberare l'analita dalla DBP endogena e rimuovere i lipidi interferenti;
- elevata variabilità inter-laboratorio dei risultati.[12]

La RIA (*Radio Immunoassay),* introdotta nel 1985, sfrutta la specificità della reazione antigene-anticorpo e isotopi radioattivi (tipicamente lo iodio-125, ^{125}I) per quantificare la vitamina D totale nel sangue. Nella metodica RIA, la 25(OH)D viene separata dalla DBP mediante un solvente organico (tipicamente acetonitrile) e si verifica la competizione tra la vitamina D presente nel campione del paziente e una quantità nota di vitamina D marcata solitamente con ^{125}I per i siti di legame della DBP. Dopo i processi di lavaggio e separazione, il complesso antigene-anticorpo rimane e la concentrazione dell'analita viene calcolata dal grafico standard misurando l'irradianza di I^{125} con il contatore GAMMA. La concentrazione di analita (antigene non marcato) è inversamente proporzionale al segnale di irradiazione.[56] Questa metodica è stata commercializzata da diverse aziende tra cui DiaSorin (Italia), Tecan (Svizzera), IBL America (USA) e Demeditec (Germania). Nonostante la buona sensibilità, la RIA è stata progressivamente abbandonata nella routine clinica a causa delle problematiche legate alla gestione dei rifiuti radioattivi e alla complessità dell'automazione.[12]

La CLIA (*Chemiluminescence Immunoassay*) rappresenta l'evoluzione moderna e automatizzata delle tecniche competitive. A differenza della RIA, non si utilizza un tracciante radioattivo ma un fluorocromo (come gli esteri di acridinio o i complessi di rutenio). Il principio rimane quello del dosaggio competitivo: la 25(OH)D presente nel siero compete con il coniugato marcato per il legame con lo "specificatore" (*binder*) che può essere: un anticorpo monoclonale specifico (come nei sistemi Abbott, Siemens o IDS) o la stessa VDBP ricombinante (come nel sistema Roche Elecsys), solitamente ancorata a microparticelle magnetiche. Dopo l'incubazione e i cicli di lavaggio, si innesca la reazione di chemiluminescenza in cui l'intensità del segnale luminoso prodotto, rilevata con un luminometro, è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25(OH)D nel campione.[56] Attualmente, diversi kit CLIA commerciali sono forniti da produttori globali come Immunodiagnostic Systems (Regno Unito, Germania), Abbott (USA), Siemens Healthineers (Germania), Tosoh (India), Roche (Germania), Fujirebio (Giappone) e Bio-Ras Laboratories (USA) che si differenziano tra loro per la diversa natura chimica dei reagenti utilizzati. Questa diversità rappresenta un fattore critico per l'accuratezza e

standardizzazione del dosaggio perché non consente di rilevare in modo equimolare le frazioni D_2 e D_3 e da cross-reattività con il metabolita 3-epi-25(OH)D.[12]

L'ECLIA (*Elettrochemiluminescence Immunoassay*) utilizza marcatori elettrochemiluminescenti (es. rutenio), la cui energia deriva dalle reazioni sugli elettrodi. Il metodo impiega biglie magnetiche come fase solida; i marcatori non legati vengono rimossi tramite lavaggio, mentre le biglie rimangono sull'elettrodo. Il marcatore legato reagisce producendo emissione luminosa, misurata da un fotomoltiplicatore. Questo metodo è altamente sensibile, lineare e facilmente applicabile ad autoanalizzatori. Dal 2001 sono disponibili sistemi ECLIA completamente automatizzato per la misurazione della vitamina D, in cui il siero o il plasma non estratti vengono miscelati direttamente con DBP umano, anti-DBP marcato con estere di acridinio e particelle magnetiche rivestite con 25(OH)D_3.[56]

L'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) è una tecnica immunoenzimatica basata sul principio competitivo. La 25(OH)D endogena viene dissociata dalla DBP per essere resa analiticamente disponibile. Il saggio utilizza piastre per microtitolazione i cui pozzetti sono rivestiti con anticorpi monoclonali specifici anti-25(OH)D. All'interno dei pozzetti, l'analita estratto dal campione del paziente compete con una quantità fissa di biotina-25(OH)D per i siti di legame con gli anticorpi fissati sulla fase solida. Dopo la fase di incubazione e di lavaggio, si aggiunge il complesso streptavidina-perossidasi di rafano (HRP) che si lega selettivamente alla quota di vitamina D biotinilata rimasta sulla piastra. L'aggiunta di un substrato cromogeno innesca la reazione enzimatica che produce una variazione di colore, la cui intensità viene misurata mediante spettrofotometria. In questo sistema competitivo, la concentrazione di 25(OH)D nel campione è inversamente proporzionale allo sviluppo del colore: un segnale ottico più debole indica una maggiore concentrazione di vitamina D nel siero del paziente, poiché l'analita endogeno ha occupato i siti anticorpali a scapito del tracciante marcato. Attualmente, sono stati definiti due diversi metodi ELISA:

- uno utilizza l'anticorpo 25(OH)D marcato con biotina, senza necessità di pretrattamento sui campioni
- uno utilizza gli anticorpi contro la DBP sierica e prevede un'unica fase di estrazione in cui campioni, calibratori e controlli vengono inclusi prima dell'analisi.[56]

Metodi cromatografici e spettrometria di massa

La cromatografia è una tecnica di separazione degli analiti disciolti in un campione basata sulle loro diverse affinità chimico-fisiche tra una fase mobile (liquida o gassosa) e una fase stazionaria (solida o liquida). Quando la fase mobile attraversa la fase stazionaria, le molecole disciolte vengono distribuite tra le due fasi: quelle con bassa affinità per la fase stazionaria rimangono prevalentemente nella fase mobile, mentre quelle con alta affinità per la fase stazionaria vengono trattenute, consentendo la separazione.

Se la fase mobile è un gas, si parla di gascromatografia (GC), se è un liquido di cromatografia liquida (LC). Quando la fase stazionaria in LC è composta da particelle di piccolo diametro, si parla di cromatografia liquida ad alte prestazioni o pressioni (HPLC). Questo metodo è il più utilizzato per la determinazione della 25(OH)D.

Un tipico sistema HPLC è costituito dai seguenti componenti:

- serbatoio della fase mobile;
- pompa: aspira la fase mobile dal serbatoio e la fa circolare attraverso il sistema cromatografico;
- iniettore: consente al campione di miscelarsi con la fase mobile prima di entrare nella colonna;
- colonna: funge da fase stazionaria per la separazione degli analiti;
- rivelatore: funge da cella di flusso attraverso la quale l'eluato in uscita dalla colonna passa nella fase mobile. Gli analiti separati vengono misurati in base alla funzione del rivelatore utilizzata (fotometro UV, spettrofotometro, rivelatori elettrochimici);
- computer: controlla il funzionamento del sistema, genera picchi cromatografici registrando i segnali provenienti dal rivelatore. La quantità di analita viene calcolata dalla curva di calibrazione in base all'altezza e all'area di questi picchi.

L'HPLC, introdotto nel 1977, è stato a lungo considerato il gold standard per la determinazione dei livelli circolanti di 25(OH)D. Storicamente, il sistema si è evoluto dall'uso di colonne di silice a fase normale verso le attuali colonne C18 a fase inversa, che offrono una migliore riproducibilità e stabilità. La fase mobile è solitamente costituita da miscele di acetonitrile e metanolo, talvolta combinate con un tampone fosfato, ed è utilizzata generalmente in eluizione isocratica. La rivelazione avviene mediante

assorbimento UV: se in passato si utilizzava una lunghezza d'onda di 254 nm, attualmente si preferiscono i 265 nm.

La preparazione del campione è una fase fondamentale ma critica nell'analisi HPLC che comprende diverse fasi: purificazione, concentrazione e, talvolta derivatizzazione. Tuttavia, gli analiti della 25(OH)D sono estremamente sensibili: vengono degradati rapidamente dalla luce solare diretta, da temperature superiori a 35°C e dall'esposizione prolungata all'azoto. Per questo motivo, i volumi di calibratori e controlli devono essere identici a quelli dei campioni clinici.

Il vantaggio principale dell'HPLC risiede nella capacità di distinguere e quantificare separatamente la 25(OH)D_2 e la 25(OH)D_3, rimuovendo lipidi interferenti. Tuttavia, la tecnica presenta limiti significativi: richiede elevati volumi di campione, strumenti costose, tempi lunghi e personale altamente specializzato. Inoltre, in questo tipo di analisi, la selettività dipende esclusivamente dalla separazione fisica in colonna, poiché il rivelatore UV non distingue i composti con spettri di assorbimento simili, rendendo il metodo suscettibile a interferenze da parte di epimeri o metaboliti co-eluiti.[56] Tuttavia, un'adeguata ottimizzazione delle condizioni cromatografiche permette di separare correttamente la vitamina D_2 e D_3, i loro metaboliti 25-idrossilati e i metaboliti diidrossilati[12] Ancora, con questo metodo, possono verificarsi falsi picchi non correlati alla 25(OH)D_2 e il personale di laboratorio inesperto può interpretare questi picchi come 25(OH)D_2, con conseguenti misurazioni falsamente elevate. Di conseguenza, l'esperienza del personale che esegue l'analisi è fondamentale per giungere a una conclusione accurata.

I metodi cromatografici possono essere combinati con la spettrometria di massa (MS) che li rende la scelta preferita per i laboratori di riferimento. La MS misura le particelle cariche in base al rapporto massa/carica (m/z) e consente sia la quantificazione che la determinazione della struttura molecolare.[56]

I principali componenti della spettrometria di massa sono:

1. sorgente ionica: dove avviene la ionizzazione del campione [tramite tecniche come l'elettrospray (ESI) o la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)];
2. sistema a vuoto: il vuoto viene utilizzato per evitare collisioni tra gli ioni generati all'interno del sistema;
3. analizzatore di massa: separa gli ioni in base al loro rapporto m/z, consentendo loro di raggiungere il rivelatore. Sono disponibili diversi analizzatori di massa [analizzatori a

settore magnetico, analizzatori a "trappola ionica quadrupolare", analizzatori a tempo di volo (TOF)];

4. rivelatore: converte l'intensità degli ioni in un segnale elettronico che viene registrato sotto forma di picco.

L'analisi MS confronta lo spettro dei frammenti con quelli di riferimento; la quantificazione avviene tramite tempo di ritenzione e altezza dei picchi. Gli isotopi stabili (SIL-IS) vengono utilizzati come standard interno per correggere perdite e interferenze della matrice, garantendo precisione anche a livelli nanogrammi o picogrammi, sebbene siano costosi. Negli ultimi anni, per superare i limiti della rilevazione UV, è stato sviluppato il metodo di cromatografia liquida e spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), che combina la separazione cromatografica con l'elevata capacità identificativa della spettrometria di massa. Grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, questa tecnica oggi è considerata il metodo di riferimento (gold standard) per la quantificazione della vitamina D e dei suoi metaboliti nei campioni biologici. L' elevata selettività del metodo deriva dall'utilizzo della modalità Select Reaction Monitoring (tecnica SRM), che prevede il monitoraggio di specifiche transizioni tra uno ione precursore e due ioni prodotto caratteristici. Questo approccio consente di distinguere con precisione le diverse forme di vitamina D, riducendo le interferenze e i cross-link tipici degli immunodosaggi.[12]

La vitamina D e i suoi metaboliti sono molecole lipofile e scarsamente protonabili, la ionizzazione (ESI, APCI) può essere inefficiente. Per migliorarne la sensibilità si utilizzano:

- derivatizzazione di Diels-Alder: l'uso di reagenti di tipo Cookson, come il PTAD (4-fenil-1,2,4-triazolina-3,5-dione) o il DAPTAD [4-(4-dimetilamminofenil) -1,2,4-triazolina-3,5-dione], consente di introdurre un gruppo polare ionizzabile nella struttura della vitamina D, migliorando l'efficienza di ionizzazione e riducendo il rumore chimico. Tuttavia, questa procedura è laboriosa e può generare epimeri aggiuntivi con possibile perdita di segnale;
- fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI): questa tecnica ha dimostrato di aumentare significativamente la sensibilità rispetto all'APCI, anche se sono necessari ulteriori studi per una piena validazione nella routine clinica.[12]

Una delle principali criticità dell'analisi mediante LC-MS/MS è rappresentata dalla presenza di composti isobari (stessa massa) o isomeri che condividono lo stesso schema di frammentazione del target. Tra le interferenze più rilevanti:

- epimero C3: la 3-epi-25(OH)D_3 è presente in tutti i campioni, con concentrazioni particolarmente elevate nei neonati (8,7–61,1% del totale). In assenza di separazione cromatografica, può determinare una sovrastima sistematica della 25(OH)D;
- interferenze isobariche: il composto farmaceutico esogeno D_3-calcitriolo e il precursore degli acidi biliari (7a-OH-4-colestene-3-one) sono due noti fattori di interferenza isobarica del 25(OH)D_3.[34]

Per evitare sovrastime analitiche è quindi necessaria una separazione cromatografica basale adeguata. A tal fine vengono impiegate colonne con fasi stazionarie specifiche, come pentafluorofenile (PFP) o cianopropile, in grado di garantire una migliore risoluzione delle forme epimeriche e isobariche. Le colonne C18 standard vengono invece utilizzate quando tali interferenze non sono oggetto di monitoraggio. Anche il C12, il C8, e il PFP-propile forniscono una selettività diversa rispetto alle sostanze chimiche precedentemente menzionate, ma non sono comunemente utilizzati.[12]

Un'alternativa emergente è la cromatografia a fluido supercritico (SFC), che permette di distinguere tutte le forme e gli epimeri in tempi molto brevi grazie all'uso di anidride carbonica non polare compressa come componente principale della fase mobile, solitamente con l'aggiunta di un modificatore organico polare che influenza le proprietà fisiche e chimiche della fase mobile, la solubilità degli analiti e la selettività della separazione.[34]

Un problema frequente nei metodi LC-MS/MS è la soppressione ionica, fenomeno che si verifica quando sostanze della matrice (lipidi, fosfolipidi e sali) eluiscono con l'analita e ne riducono l'efficienza di ionizzazione. Per minimizzare questo fenomeno, è fondamentale la preparazione del campione, che può includere:

- precipitazione proteica (PP) utilizzando solventi organici quali acetonitrile, metanolo ed etanolo;
- estrazione selettiva liquido-liquido (LLE) o estrazione liquida supportata (SLE) o estrazione in fase solida (SPE).[56]

Infine, per la quantificazione della vitamina D mediante LC-MS, è necessario utilizzare uno standard interno marcato con isotopi stabili (SIL-IS), come la vitamina D

deuterata. Esso permette di compensare le eventuali perdite durante la fase di preparazione del campione, correggere gli errori sistematici legati all'effetto matrice e aumentare la selettività del metodo. Tuttavia, è necessario sottolineare che i SIL-IS sono molto costosi e alcuni non sono disponibili in commercio.

1.1.3.2 Programmi di standardizzazione

Storicamente, il coefficiente di variazione interlaboratorio (CV%) per la determinazione della 25(OH)D era elevato principalmente perché ogni laboratorio preparava internamente i propri standard di calibrazione. Per garantire l'affidabilità e la comparabilità dei risultati, i laboratori partecipano a programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ). Nel 1989 è stato istituito il Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) con l'obiettivo di ridurre le differenze tra laboratori e migliorare le prestazioni dei dosaggi di 25(OH)D utilizzati nei laboratori clinici e di ricerca.[34] DEQAS fornisce campioni di siero con valori noti, permettendo ai laboratori di confrontare i propri risultati con quelli di riferimento e con altri laboratori a livello internazionale.[54] A complemento del DEQAS, nel 2009 è stato avviato il Vitamin D Standardization Program (VDSP), frutto della collaborazione tra l'US Nutritional Health and Nutrition Examination Survey, l'UK Food Standard Agency (FSA), il National Institutes of Health (NIH), il National Institute of Standards and Technology (NIST), i Centers for Disease Control and Prevention (CDC), l' Università di Ghent (Belgio), l'American Association for Clinical Chemistry (AACC) e la IFCC. Il VDSP ha sviluppato protocolli per standardizzare le procedure di misurazione della 25(OH)D nelle indagini nazionali su salute e nutrizione, al fine di promuovere misurazioni della 25(OH)D accurate e comparabili nel tempo e nei laboratori e migliorare la base di dati per le misure di salute pubblica.

Questa standardizzazione si basa su materiali di riferimento certificati (SRM 972a, SRM 973, SRM 2972a) contenenti concentrazioni note di 25(OH)D_2 e 25(OH)D_3 e su procedure di metodi di riferimento (RMP), contribuendo in modo significativo all'aumento dell'accuratezza e della comparabilità dei risultati tra laboratori.[56]

Grazie a quest'iniziativa, LC-MS/MS è stato definito l'approccio gold standard[34] e ad oggi sono disponibili tre procedure di misura di riferimento (RMP) basate sulla ID-LC-MS/MS e riconosciute dal Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine

(JCTLM): ciò che è dovuto all'alta sensibilità, ripetibilità e accuratezza di LC-MS/MS, che consente di distinguere 25(OH)D_2 e 25(OH)D_3, nonché le loro varianti epimeriche e di consentire la misurazione contemporanea di numerosi metaboliti della vitamina D.[18]

Tuttavia, ciascun laboratorio clinico ha la possibilità di scelta fra un metodo immunometrico automatizzato e un metodo in LC-MS/MS. La scelta dipende da vari fattori quali la numerosità delle richieste, la disponibilità di personale qualificato in tecniche di spettrometria di massa e della strumentazione specifica. I dati più recenti dimostrano che solo il 20% dei laboratori partecipanti a programmi di VEQ utilizza metodi in LC-MS/MS, sottolineando che i metodi immunometrici automatizzati sono ancora i più utilizzati.[54]

1.1.4 Biomarcatori emergenti dello status della vitamina D

Rapporto metabolico della vitamina D (VMR)

Herrmann et al. hanno proposto il rapporto metabolico della vitamina D (VMR), calcolato come rapporto tra 25(OH)D e il suo principale catabolita 24,25-diidrossivitamina D [24,25$(OH)_2$D]. Il VMR riflette l'attività della 24-idrossilasi, che aumenta per prevenire la sovrapproduzione di 1,25$(OH)_2$D, ad esempio dopo l'integrazione di vitamina D. È stato dimostrato che è indipendente dalla VDBP e può servire come un miglior indicatore dello stato della vitamina D in gruppi di pazienti con una più ampia varietà di concentrazioni di DBP.[55] Questo marker consentirebbe una miglior identificazione dei soggetti con carenza vitaminica, anche perché si associa a valori significativamente più elevati di PTH, accelerato metabolismo osseo e mortalità. Questi dati, di indubbio interesse, necessitano di ulteriori conferme in studi clinici condotti utilizzando appropriati protocolli sperimentali.[54]

Vitamina D biodisponibile (BAVD)

Oltre l'85% di 25(OH)D e 1,25$(OH)_2$D è legato alla DBP, mentre la maggior parte del restante è legata all'albumina e libera (circa lo 0,03%). La 25(OH)D biodisponibile calcolata o la 25(OH)D libera possano essere un biomarcatore più rilevante dello stato della vitamina D, soprattutto nei soggetti con un diverso genotipo di DBP. Tuttavia, diversi studi hanno successivamente determinato che riflettono solo la 25(OH) totale e

offrono utilità clinica limitata, poiché la 25(OH)D è un proormone non regolato da feedback.[55] Il dosaggio della frazione libera può essere considerato solo in condizioni cliniche che alterano significativamente la concentrazione o affinità della proteina legante (cirrosi, gravidanza, infiammazione acuta).[54]

Epimero C3 della 25(OH)D

L'epimero C3 differisce dalla 25(OH)D nativa per l'orientamento del gruppo ossidrilico sul carbonio 3. Ha ridotta affinità per il recettore VDR e minore attività biologica.[12] Concentrazioni elevate sono comuni nei neonati, causando sovrastima dei livelli di 25(OH)D se non rilevati separatamente.[57] I comuni test immunometrici (CLIA, ELISA) presentano cross-reattività quasi totale; solo LC-MS/MS con colonne specifiche (PFP) può discriminare l'epimero.[58] Il dosaggio dell'epimero C3 non è considerato necessario nella routine clinica dell'adulto, ma è raccomandato dal Programma di Standardizzazione della vitamina D (VDSP) per una corretta interpretazione dello stato vitaminico in ambito pediatrico e neonatologico, al fine di evitare diagnosi errate di sufficienza in soggetti tecnicamente carenti.[57]

24,25-diidrossivitamina D [24,25(OH)$_2$D]

La 24,25 (OH)$_2$D è il principale catabolita della vitamina D, prodotto dall'enzima 24-idrossilasi (CYP24A1), fondamentale per prevenire eccesso di calcitriolo e tossicità calcica. Nei soggetti sani, il suo rapporto con la 25(OH)D totale è costante.[41] L'interesse clinico per questo metabolita è cresciuto grazie alla sua capacità di identificare disordini genetici e funzionali. In particolare, concentrazioni estremamente basse o non rilevabili di 24,25 (OH)$_2$D, associate a ipercalcemia e soppressione del PTH, sono indicative della Ipercalcemia Infantile Idiomatica (IIH), una patologia causata da mutazioni inattivanti del gene CYP24A1. In questi pazienti, l'incapacità di catabolizzare la vitamina D porta a un accumulo patologico di forme attive.[46]

Dal punto di vista analitico, la determinazione della 24,25 (OH)$_2$D è complessa a causa delle basse concentrazioni sieriche e richiede l'impiego della LC-MS/MS.[59]

1.1.5 Valori di riferimento per la vitamina D ematica

Una volta ottenuti i livelli sierici di 25-idrossivitamina D [25(OH)D], l'interpretazione clinica del dato richiede il riferimento a cut-off rigorosi, espressi in nanogrammi per millilitro (ng/mL) o in nanomoli per litro (nmol/L). Il fattore di conversione standard è pari a 2,5: infatti 1ng/mL=2,5nmol/L

• ng/mL → nmol/L = moltiplicare per 2,5

• nmol/L → ng/mL = dividere per 2,5

Parallelamente, l'attività biologica della vitamina D viene quantificata in Unità Internazionali (UI), dove 1μg colecalciferolo corrisponde a 40 Unità Internazionali.

Nonostante la rilevanza clinica, la definizione dei *cut-off* di normalità rimane oggetto di un dibattito. Storicamente, i criteri di riferimento hanno subito una progressiva evoluzione. Nel 2011, l'Endocrine Society ha stabilito soglie più rigorose rispetto al passato, definendo:

- deficienza per valori < 20 ng/mL
- insufficienza tra 20 e 30 ng/mL
- sufficienza per intervalli compresi tra 30 e 100 ng/mL.[42]

Tale innalzamento delle soglie rifletteva la volontà di ottimizzare non solo la salute ossea ma anche i potenziali benefici pleiotropici della vitamina.

Tuttavia, il dibattito ha subito un aggiornamento con le nuove Linee Guida dell'Endocrine Society (2024/2025). Il recente consenso scientifico suggerisce di superare la pratica dello screening routinario nella popolazione adulta sana, promuovendo un approccio stratificato in base al profilo di rischio del paziente:

- popolazione adulta sana (<75 anni): livelli >20 ng/mL non mostrano benefici clinici aggiuntivi; lo screening routinario non è raccomandato;
- pazienti fragili o a rischio: per i soggetti affetti da osteoporosi, iperparatiroidismo secondario, o in età avanzata (>75 anni), la soglia di sufficienza rimane fissata a 30 ng/mL (75 nmol/L), al fine di garantire un'adeguata mineralizzazione ossea e una riduzione del rischio di cadute;
- effetti extra-scheletrici: la ricerca contemporanea sottolinea come il mantenimento di livelli nel range 30-50 ng/mL possa esercitare un ruolo protettivo specifico, riducendo

del 15% il rischio di progressione verso il diabete di tipo 2 in soggetti pre-diabetici e migliorando la modulazione immunitaria.[60]

1.1.6 Recettore della vitamina D e Meccanismo d'Azione

Il recettore della vitamina D (VDR) appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari degli ormoni steroidei, un gruppo di fattori di trascrizione ligando-dipendenti coinvolti nella regolazione di numerosi processi metabolici, endocrini e immunitari.[61]

Maestro et al. hanno riportato che il recettore della vitamina D (VDR) è presente nella maggior parte dei tessuti umani e ha più di 1000 geni target.[35]

L'1,25-diidrossivitamina D_3 [$1,25(OH)_2D_3$], forma attiva della vitamina D, esercita le proprie funzioni attraverso meccanismi sia genomici sia non genomici, coordinati rispettivamente dal VDR nucleare (nVDR) e dal recettore di membrana 1,25-MARRS/ERp57(mVDR).

1.1.6.1 Azioni genomiche

Le azioni genomiche dipendono dal recettore nucleare VDR (nVDR). Il VDR è ampiamente distribuito e non è limitato ai tessuti target classici della vitamina D. Appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari, agisce come un fattore di trascrizione attivatore, regolando l'espressione di geni che mediano la sua attività biologica. Le risposte genomiche dipendenti da $1,25(OH)_2D$ nel nucleo risultano dall'attivazione dei fattori di trascrizione legati al ligando e sono relativamente lente (possono richiedere da diverse ore a giorni),[35] poiché implicano l'assemblaggio dei complessi trascrizionali e la sintesi proteica.

Nell'uomo, il VDR è codificato da un gene lungo (>100 kb), che si trova sul braccio lungo del cromosoma 12q12. Ha una struttura complessa di introni/esoni ed è composto da due regioni promoter, otto esoni codificanti e sei esoni non tradotti. Gli esoni 1a-1f codificano per la regione non tradotta 5' (UTR) dell'mRNA del VDR e sono sottoposti a splicing alternativo. Gli esoni 2 e 3 codificano per il sito di inizio della traduzione e comprendono il dominio di legame al DNA. Gli esoni da 4 a 9 codificano per il dominio di legame al ligando (LBD) sovrapposto.

Come ogni recettore nucleare, il VDR presenta una struttura modulare composta da tre domini principali:

- dominio N-terminale di legame al DNA (DBD): contiene due motivi a "dita di zinco" che riconoscono sequenze regolatorie specifiche chiamate VDRE (Vitamin D Response Elements), situate nei promotori o nelle regioni enhancer dei geni bersaglio.[62] Questo dominio è altamente conservato, a testimonianza della sua importanza funzionale;
- dominio C-terminale di legame al ligando (LBD). La cristallografia a raggi X ha mostrato che il LBD è organizzato in 12 α-eliche;[61]
- regione di giunzione: collega il DBD al LBD e conferisce flessibilità strutturale al recettore, facilitando le interazioni dinamiche con coattivatori e corepressori.

La forma ormonale della vitamina D entra nella cellula bersaglio dal circolo ematico e si lega al recettore della vitamina D (VDR) nel *ligand-binding pocket* (LBP) del dominio di legame del ligando, situato nel citoplasma. Ciò induce un cambiamento conformazionale chiave nel recettore: l'elica 12 si riposiziona, chiudendo il *pocket* e formando la superficie AF-2, necessaria per il reclutamento dei coattivatori contenenti motivi LXXLL (come SRC-1, SRC-2, SRC-3, p300/CBP e DRIP205/MED1), trasformando così il VDR in una forma trascrizionalmente attiva.[62]

Il complesso attivato migra quindi nel nucleo, dove VDR si eterodimerizza con il recettore del retinoide X (RXR)[63] e si lega agli elementi di risposta alla vitamina D (VDRE) presenti sul DNA, tipicamente costituiti da ripetizioni dirette di esanucleotidi separate da tre nucleotidi (motivo DR3), modulando l'espressione genica.[64]

Una volta legato al VDRE, il complesso VDR-RXR recluta coregolatori specifici per gene e tipo cellulare, tra cui:

- coattivatori con attività istone-acetiltransferasica (SRC-1, SRC-2, SRC-3);[62]
- corepressori con attività deacetilasica (SMRT, NCoR);
- proteine con attività metiltransferasica o demetilasica;
- complessi di rimodellamento della cromatina, come Mediator.[63]

L'effetto finale sull'espressione genica dipende dal bilanciamento dinamico tra coattivatori e corepressori, ed è ulteriormente modulato da fosforilazioni indotte da chinasi intracellulari quali Protein Kinase C (PKC) e le Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK).

Dal punto di vista evolutivo, il VDR si è inizialmente specializzato nel metabolismo energetico, acquisendo successivamente ruoli nella modulazione immunitaria e, circa 400 milioni di anni fa, nell'omeostasi del calcio.[63] La coevoluzione con enzimi metabolici (CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1, DBP) evidenzia la necessità di un controllo preciso dei livelli di ligando, mentre il VDR resta l'unico recettore in grado di riconoscere selettivamente basse concentrazioni dell'ormone attivo.[19]

Il gene VDR è frequentemente suscettibile a polimorfismi.[35] I dati di ricerca indicano che i polimorfismi del gene VDR sono associati al diabete, ai tumori del colon e della prostata, ai disturbi autoimmuni come il morbo di Crohn, la malattia di Graves e la sclerosi multipla, alle malattie renali e a varie malattie neurodegenerative come la schizofrenia;[35] inoltre mutazioni inattivanti a carico del gene che codifica per il VDR sono responsabili del rachitismo ereditario vitamina D resistente (HVDRR), una rara malattia genetica autosomica recessiva caratterizzata da ipocalcemia, iperparatiroidismo, insorgenza precoce di rachitismo ed alopecia.[65] Le azioni di 1,25-$(OH)_2D_3$ sono molto probabilmente dovute agli effetti combinati sia delle risposte genomiche che non genomiche.[35]

1.1.6.2 Azioni non genomiche

Le azioni non genomiche della vitamina D sono caratterizzate da una risposta rapida che si manifesta nell'arco di secondi-minuti, e che non coinvolge direttamente la modulazione della trascrizione genica. Questa risposta è mediata dall'interazione del ligando 1,25$(OH)_2D_3$ con specifici siti di legame localizzati sulla membrana plasmatica e sulle membrane vescicolari delle cellule bersaglio, indicati come VDR di membrana (mVDR).

Gli mVDR sono anche noti come proteine steroidee leganti 1,25-membrana associate a risposta rapida (1,25-MARRS), membro 3 della famiglia della proteina isomerasi disolfuro (Pdia3), proteine del reticolo endoplasmatico 57 e 60 (ERp57, ERp60) e proteina regolata dal glucosio 58 (GRP58). Si ritiene che questi complessi siano VDR modificati e sono proteine chaperon e accoppiate ai meccanismi di trasduzione del segnale.[62] Gli mVDR sono associati a proteine di scaffolding della membrana (come la caveolina), localizzate nei microdomini lipidici della membrana plasmatica. Queste

strutture, ricche di colesterolo e sfingolipidi, sono coinvolte nella formazione delle caveole in numerosi tipi cellulari.

Il legame del calcitriolo con questi recettori di membrana determina l'attivazione di vie di segnalazione intracellulari rapide, responsabili di numerosi effetti biologici. Studi condotti negli ultimi decenni hanno dimostrato che l'attivazione del recettore 1,25-MARRS è coinvolta in diversi pathway intracellulari, tra cui quello responsabile dell'aumento rapido dell'assorbimento intestinale di calcio, noto come transcaltachia. Questo processo risulta dipendente dall'attivazione della Protein Kinase C (PKC) e dal coinvolgimento dei canali del calcio di tipo L.[66]

Le principali vie di segnalazione attivate da 1,25-MARRS sono:

- attivazione di PKC, mediata dalla produzione di acido arachidonico e diacilglicerolo (DAG) attraverso l'attivazione delle fosfolipasi A_2 e C;
- aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, mediato dal rilascio di calcio dalle riserve intracellulari tramite inositolo trifosfato (IP_3);
- modulazione della via delle MAPK, in particolare di ERK1 e ERK2;
- attivazione di altri pathway intracellulari tra cui: PKA/cAMP, Akt/PKB, e Ca^{2+}/calmodulina-dipendente protein chinasi (CaMK).[63]

Queste vie partecipano al cross-talk con la regolazione genomica, poiché le chinasi attivate possono fosforilare coattivatori, corepressori o lo stesso VDR nucleare, modulandone l'attività trascrizionale.[63]

Ciò che emerge dagli studi è che il calcitriolo si lega a un recettore di membrana che determina l'attivazione di una proteina G, ciò attiva la fosfolipasi C (PLC) che idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2) in inositolo trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG), agendo da secondi messaggeri. L'IP_3 promuove il rilascio di calcio dalle riserve intracellulari tramite il recettore IP_3 del reticolo endoplasmatico, mentre il DAG contribuisce all'attivazione della proteina chinasi C (PKC). Sia l'aumento della concentrazione di calcio e sia l'attivazione della PKC possono modulare ulteriormente l'afflusso di calcio attraverso la membrana plasmatica mediante vari canali calcio (inclusi i canali del calcio di tipo L) determinando un aumento dei livelli di calcio intracellulare.[12]

1.2 Regolazioni e azioni biologiche della vitamina D attiva

1.2.1 Omeostasi del calcio e del fosfato (funzione endocrina classica)

Il calcitriolo è essenziale per il mantenimento di concentrazioni plasmatiche stabili di calcio (2,2–2,6 mMol/L) e fosfato (0,8–1,45 mMol/L), fondamentali per numerosi processi biologici, tra cui l'omeostasi minerale tra sangue e tessuto osseo, la funzione neuromuscolare e immunitaria e la salute cardiovascolare.

Le concentrazioni plasmatiche di Ca^{2+} e PO_4 sono garantite da un sistema regolatorio che prevede l'interazione integrata tra vitamina D attiva, ormone paratiroideo (PTH), calcitonina.[35]

1.2.1.1 Regolazione endocrina della calcemia: azione del PTH

Il calcio plasmatico viene rilevato dal recettore sensibile al calcio (CaSR) espresso nelle cellule principali delle paratiroidi. In condizioni di ipocalcemia, la ridotta attivazione del CaSR determina un aumento della secrezione di PTH,[2] che esercita effetti su:

• ossa: stimola la mobilizzazione del calcio dalle ossa tramite l'attivazione degli osteoblasti e, indirettamente, degli osteoclasti[3] determinando il riassorbimento osseo e il rilascio di calcio in circolo;

• rene: riduce l'escrezione renale di calcio a livello dei tubuli prossimali e il suo riassorbimento;[15]

• metabolismo della vitamina D: aumenta l'espressione renale dell'enzima CYP27B1, responsabile della conversione di 25(OH)D in $1,25(OH)_2D$.[15]

1.2.1.2 Assorbimento intestinale e riassorbimento renale del calcio

Il calcitriolo prodotto a livello renale incrementa del 30-40%[12] l'assorbimento intestinale del calcio. Tale processo si svolge principalmente a livello dell'intestino tenue distale, dove sono espressi il recettore della vitamina D (VDR) e i principali mediatori del trasporto transcellulare del calcio. I principali effetti esercitati dal calcitriolo sono:

la sintesi del canale Vanilloide a potenziale recettoriale transitorio (TRPV6), un canale del calcio situato sulla membrana apicale dell'enterocita e responsabile dell'ingresso del Ca^{2+} nel citoplasma.[12]

- la sintesi della calbindina-D9k (CaBP-D9k) una proteina citosolica che lega il calcio e ne facilita il trasporto intracellulare verso la membrana basolaterale e ne riduce la citotossicità.[12]
- l'attivazione dell'isoforma intestinale della Ca^{2+}-ATPasi di membrana plasmatica (PMCA1b), una pompa di membrana basolaterale deputata all'estrusione del calcio attraverso la membrana basolaterale nella circolazione sanguigna.[12]

Dopo l'ingresso apicale mediato da TRPV6, il calcio raggiunge la regione dei microvilli, dove si lega alla calmodulina (CaM). La CaM è associata alla miosina-1 dell'orletto a spazzola (BBM1), una proteina motoria che contribuisce al trasferimento del complesso Ca^{2+}/CaM verso la rete terminale sottostante. In quest'area, il calcio viene catturato dalla calbindina-D9k, che ne permette il trasporto intracitoplasmatico e può convogliarlo anche in vescicole endocitiche, mantenendo un gradiente intracellulare sicuro ed efficiente.[24]

Raggiunta la membrana basolaterale, il calcio viene infine trasferito nel compartimento extracellulare tramite la Ca^{2+}-ATPasi PMCA1b, la cui espressione è anch'essa aumentata dal calcitriolo.[24]

In sintesi, il calcitriolo potenzia l'espressione di TRPV6, calbindina-D9k e PMCA1b e aumenta la disponibilità di calmodulina associata alla BBM1 nell'orletto a spazzola, garantendo così un assorbimento efficace e regolato del calcio.

Nel rene, il calcitriolo:

- stimola il riassorbimento del calcio nel tubulo distale attraverso l'aumento dell'espressione del canale del calcio apicale TRPV5 e della proteina calbindina-D28k;[11]
- modula l'espressione degli enzimi della vitamina D (CYP27B1 e CYP24A1) in coordinamento con PTH, CaSR e FGF-23.[11]

Quando l'aumento dell'assorbimento intestinale e del riassorbimento renale non è sufficiente a garantire l'omeostasi del calcio, la preservazione della calcemia diventa prioritaria rispetto all'integrità scheletrica. In tali condizioni, il calcitriolo sovraregola il recettore attivatore del fattore nucleare κB (NF-κB) nelle cellule osteoblastiche, aumentando l'osteoclastogenesi e promuovendo il rilascio di calcio dalle ossa.[11]

1.2.1.3 Regolazione dell'omeostasi fosfatica e meccanismi di feedback

La regolazione del fosfato è mediata dal fattore di crescita dei fibroblasti-23 (FGF-23), prodotto prevalentemente dagli osteociti, rappresenta un regolatore chiave dell'omeostasi del fosforo e un potente modulatore negativo dell'attivazione della vitamina D.[43,44] L'iperfosfatemia e l'aumento dei livelli di calcitriolo stimolano la secrezione di FGF-23 che esercita suoi effetti principali attraverso:

- l'inibizione della CYP27B1 renale, riducendo la conversione del 25(OH)D in $1,25(OH)_2D_3$;
- stimolazione della CYP24A1, accelerando la degradazione dei metaboliti attivi della vitamina D;[67]
- riduzione del riassorbimento renale del fosforo tramite la down-regulation dei trasportatori NaPi a livello del tubulo prossimale.[68]

Il calcitriolo stesso regola finemente la propria biosintesi tramite un meccanismo di feedback negativo in cui inibisce e stimola a livelli sierici superiori al fisiologico, prevenendo l'eccessiva attivazione. Il calcitriolo regola finemente la propria biosintesi tramite un meccanismo di feedback negativo. In presenza di concentrazioni sieriche superiori ai livelli fisiologici, il calcitriolo inibisce l'espressione renale di CYP27B1 e stimola l'attivazione di CYP24A1, accelerandone la degradazione.[69] Questo feedback mantiene stabile l'omeostasi calcio-fosforo e previene un'eccessiva attivazione della vitamina D.[39]

L'ipercalcemia riduce la secrezione di PTH tramite l'attivazione del CaSR,[3] mentre l'iperfosfatemia stimola il rilascio di FGF-23, che sopprime CYP27B1 e stimola CYP24A1.[68]

Fattori steroidei, citochine e condizioni sistemiche possono modulare indirettamente l'attività di CYP27B1 e CYP24A1, influenzando la produzione e la degradazione del calcitriolo in risposta a condizioni sistemiche particolari.[43]

Questa rete complessa mantiene stabile l'omeostasi calcio–fosforo e costituisce il presupposto fisiologico essenziale per comprendere gli effetti extra-scheletrici della vitamina D, inclusi quelli sul sistema immunitario e, come vedremo nei capitoli successivi, nella patogenesi e modulazione delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD).

1.2.1.4 Ruolo del calcitriolo nel metabolismo osseo

La vitamina D esercita un ruolo centrale nel metabolismo osseo agendo a livello degli osteoblasti attivando l'osteoclastogenesi e il riassorbimento osseo. Questo meccanismo è essenziale per mantenere l'omeostasi del calcio e del fosfato plasmatico, fattori fondamentali per garantire un'adeguata mineralizzazione ossea.[24]

La 1,25-diidrossivitamina D si lega al VDR presente sugli osteoblasti, aumentando l'espressione del RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). Il RANKL, espresso sulla superficie degli osteoblasti, si lega al RANK espresso sulla superficie delle cellule progenitrici degli osteoclasti, promuovendo la differenziazione degli osteoclasti e potenziando l'attività di riassorbimento osseo.[70] In questo modo, la vitamina D regola non solo il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti, ma anche la formazione di nuovo osso da parte degli osteoblasti, contribuendo al mantenimento dell'integrità strutturale dell'osso.[62]

Livelli adeguati di vitamina D sono essenziali per mantenere ottimali i livelli di calcio e fosfato nei liquidi extracellulari, condizioni necessarie per una corretta mineralizzazione ossea. La carenza di vitamina D comporta diverse implicazioni cliniche a livello osseo:

1. riduzione della massa ossea: la carenza di vitamina D accelera il turnover osseo e impedisce una corretta mineralizzazione dell'osteoide, indebolendo la struttura ossea;[70]
2. aumento del rischio di fratture, in particolare femorali;
3. sviluppo dell'osteoporosi: la carenza riduce l'assorbimento di calcio intestinale, determinando un abbassamento della densità minerale ossea (BMD). Studi recenti suggeriscono che per prevenire l'osteoporosi e migliorare la BMD, è fondamentale mantenere livelli sierici di 25-idrossivitamina D superiori a 30 ng/ml, poiché questo contribuisce a ridurre il rischio di fratture e a migliorare la salute ossea complessiva;[71]
4. osteomalacia e rachitismo: la carenza cronica di vitamina D è una delle principali cause di osteomalacia negli adulti (alterazione della mineralizzazione ossea) e di rachitismo nei bambini (deformità delle ossa che può essere trattata efficacemente ripristinando l'omeostasi di calcio e fosfato).[70]

1.2.2 Effetti pleiotropici della vitamina D (azioni extra-scheletriche)

Sono in atto diversi studi a riguardo che attestano l'importanza degli effetti extra-renali e extra-scheletrici della vitamina D,[12] in quanto sia il VDR che il CYP27B1 sono presenti in un ampio numero di cellule e tessuti non correlati ai classici tessuti bersaglio della vitamina D (come reni, intestino e ossa).[72]

Il VDR e l'enzima 1α-idrossilasi (CYP27B1) sono ampiamente espressi anche nei principali organi riproduttivi (tessuto ovarico/testicolare, endometrio, miometrio e placenta). Questa espressione consente la produzione locale del calcitriolo, essenziale per la regolazione di specifiche funzioni.

Effetti sulle barriere epiteliali

Il calcitriolo partecipa attivamente alla regolazione dei geni che codificano per le proteine necessarie alle giunzioni occludenti (*tight junction*), comunicanti (*gap junction*) e aderenti situate nelle cellule epiteliali della pelle, dell'intestino, del tratto respiratorio, del tratto urinario potenziando così la loro funzione di barriera.[12] Questa azione contribuisce al mantenimento dell'integrità epiteliale e alla protezione contro agenti patogeni e stimoli infiammatori.

Tessuto muscolare scheletrico

La vitamina D contribuisce alla regolazione del trofismo muscolare attraverso il controllo del calcio intracellulare, la modulazione della contrazione muscolare e il supporto alla sintesi proteica.[73]

In particolar modo influenza la contrattilità modulando l'ingresso rapido di calcio tramite attivazione non genomica di PKC e regolazione dei canali voltaggio-dipendenti. Parallelamente, agisce sul metabolismo mitocondriale modulando PGC-1α, OXPHOS e la biogenesi mitocondriale, riducendo la produzione di ROS e migliorando l'efficienza muscolare.[12]

L'espressione dei VDR presenti sulle cellule muscolari tende a diminuire con l'avanzare dell'età.[70] È noto da tempo che la vitamina D è in grado di stimolare la produzione di proteine muscolari, ma soprattutto di attivare alcuni meccanismi di trasporto del calcio a livello del reticolo sarcoplasmatico, che sono essenziali nella

contrazione muscolare. In condizioni di ipovitaminosi D sono stati spesso descritti quadri di miopatia dei muscoli prossimali degli arti, di sarcopenia, sindrome miopatiche e di riduzione della forza muscolare, con disturbi dell'equilibrio e con conseguente aumento del rischio di cadute e quindi di fratture, specie in età senile.[12]

Sistema cardiovascolare

Da recenti studi è emersa la correlazione tra lo stato della vitamina D e l'insorgenza di patologie cardiovascolari (CV). In particolare, si è osservata una relazione con la formazione della placca ateromatosa e la sua calcificazione, correlabile ai vari fattori di rischio quali l'ipertensione, l'anomala concentrazione lipidica e la sindrome metabolica.[74] Un meccanismo centrale dell'azione protettiva della vitamina D sul sistema vascolare è la sua capacità di modulare l'asse Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS). La vitamina D esercita un controllo sulla pressione arteriosa inibendo la sintesi della renina attraverso la soppressione della trascrizione del gene *REN*. Ciò si realizza legando un elemento di risposta alla vitamina D negativo (VDRE) localizzato sul promotore del gene stesso.

Queste evidenze sono rafforzate da studi sull'ipertensione che hanno mostrato una relazione inversa tra i livelli di 25(OH)D e il rischio di ipertensione. Il fatto che la maggiore incidenza di ipertensione essenziale (IE) si verifichi nei mesi invernali e alle più alte latitudini suggerisce che una ridotta produzione cutanea di vitamina D possa contribuire all'aumento della prevalenza di tale patologia.[74]

L'azione cardioprotettiva è supportata anche da:

1. l'espressione dell'enzima 1α-idrossilasi (CYP27B1) nelle cellule endoteliali dell'aorta, i cardiomiociti e i fibroblasti, conferendo a questi tessuti la capacità di convertire localmente il 25(OH)D in 1,25$(OH)_2$D (Calcitriolo);

2. la presenza dei recettori VDR nell'endotelio sulla muscolatura liscia e sui cardiomiociti che interagendo con il calcitriolo svolgono un effetto protettivo, infatti:

- modula le vie anti-infiammatorie inibendo NF-kB;
- capta le LDL;
- limita la proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali (VSMC) attraverso la down-regolazione di cyclin D1 e dell'attività di ERK1/2, quindi esercita effetti

antinfiammatori e antiproliferativi contribuendo alla regolazione della funzione vascolare; [75]

- riduce l'espressione di molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1) e citochine pro-infiammatorie.

Studi osservazionali mostrano che bassi livelli di 25(OH)D sono associati a maggior rischio di ipertensione, eventi cardiovascolari e mortalità.[76] Sebbene il meccanismo d'azione complessivo non sia ancora completamente elucidato, è dimostrato che la vitamina D agisce sul miocardio sia direttamente che indirettamente.

Tra le azioni dirette associate vi sono:

• la regolazione del flusso di calcio intracellulare;

• il blocco del sistema RAAS (il sistema renina-angiotensina-aldosterone);[77]

Le azioni indirette che può dare invece sono:

• l'annullamento dei processi immunologici ed infiammatori;

• la prevenzione delle infezioni e dell'iperparatiroidismo secondario;

• potenziamento degli effetti antipertensivi ed anti-aterosclerotici.[77]

Polmone

Sono stati individuati VDR nei pneumociti epiteliali di tipo II, dove il calcitriolo stimola la loro maturazione, incluso l'aumento della produzione di fosfolipidi e il rilascio di tensioattivo. Inoltre, il calcitriolo stimola la risposta immunitaria innata nelle cellule epiteliali bronchiali e può fornire protezione nei pazienti con fibrosi cistica con infezioni polmonari ricorrenti.[24]

Mammella

Il seno contiene VDR e la vitamina D svolge un ruolo nel suo normale sviluppo. Inoltre, anche le cellule tumorali mammarie contengono VDR ed è stato riscontrato che l'1,25(OH)D e i suoi analoghi ne riducono la proliferazione in vivo e in vitro, difatti ciò ha evidenti implicazioni cliniche per il trattamento del cancro al seno.[24]

Metabolismo glucidico

La vitamina D esercita una significativa modulazione sull'omeostasi del glucosio, intervenendo sia sulla secrezione che sull'azione dell'insulina, nonché sull'infiammazione

correlata all'insulino-resistenza.[74] Ciò è permesso dalla presenza del VDR nelle cellule β del pancreas e nei tessuti insulin-sensibili. Le cellule β, deputate alla produzione di insulina, oltre a presentare VDR, possiedono anche l'enzima 1α-idrossilasi (CYP27B1) che consente la conversione del 25(OH)D nel metabolita attivo 1α,25$(OH)_2$D. Questo consente un importante effetto paracrino/autocrino locale.

L'azione della vitamina D sulla secrezione di insulina è calcio-dipendente e si realizza attraverso due vie principali:

1. regola la concentrazione del Ca extracellulare e il suo flusso attraverso le cellule β, potenziando così il segnale Ca^{2+} necessario per l'esocitosi dell'insulina;
2. riduce l'apoptosi β-cellulare, un fattore chiave nella progressione del diabete di tipo 2.[12]

Nei tessuti insulino-sensibili, la vitamina D agisce migliorando la risposta all'ormone e contrastando l'insulino-resistenza:

1. il calcitriolo [1α,25$(OH)_2$D] può entrare nelle cellule che rispondono all'insulina, aumentando la presenza dei recettori per l'insulina stessa, ma senza alterarne la sensibilità[74]
2. il calcitriolo aumenta la sensibilità insulinica riducendo l'infiammazione a livello del tessuto adiposo tramite soppressione di TNF-α e IL-6 e migliorando la funzione mitocondriale negli adipociti;[12]
3. il calcitriolo inibisce l'attivazione del fattore nucleare NF-κB con conseguente riduzione dell'espressione di varie citochine nocive per le cellule β.[74]

Coerentemente con i meccanismi cellulari, anche studi osservazionali, come quello di Pittas et al., suggeriscono una possibile associazione tra i livelli subottimali di vitamina D e un aumentato rischio di diabete di tipo 2 e di insulino-resistenza.[60]

Sistema nervoso

La review di Eyles et al. mostra che la vitamina D svolge un ruolo importante anche nello sviluppo e nella funzione cerebrale, grazie alla presenza del VDR nei neuroni e nelle cellule gliali di varie aree cerebrali, quali ippocampo, cervelletto e corteccia prefrontale.[78]

Un elemento fondamentale è la capacità della vitamina D di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) e raggiungere il fluido cerebrospinale. A questa proprietà, si aggiunge anche la capacità delle cellule cerebrali di convertire autonomamente il

25(OH)D nel suo metabolita attivo, 1α,25$(OH)_2$D , grazie alla presenza dei due enzimi responsabili della trasformazione, la 25-idrossilasi e 1α-idossilasi.[74] Tale meccanismo consente un'azione autocrina/paracrina mirata all'interno del SNC. Il calcitriolo quindi svolge diverse funzioni neuroprotettive essenziali per la salute neuronale:

1. riduce lo stress ossidativo;
2. modula l'attivazione delle microglia (le cellule immunitarie residenti del SNC);
3. regola la sintesi di fattori neurotrofici: Nerve Growth Factor (NGF) e Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), che controllano il differenziamento neuronale, la sopravvivenza e la plasticità neuronale;
4. modula l'infiammazione nel sistema nervoso;
5. regola l'espressione genica di vari neurotrasmettitori quali la dopamina, l'acetilcolina, la serotonina e l'acido γ-aminobutirrico (GABA).

La conoscenza di queste proprietà, unite all'attività antiossidante propria della vitamina D, ha spinto a valutarne l'attività in ambito clinico nei confronti di varie patologie neurologiche, anche in considerazione del fatto che, con l'avanzare dell'età, sempre più frequentemente si riscontrano deficienze di vitamina D. In tal senso, dati osservazionali indicano un possibile legame tra ipovitaminosi D e disturbi dell'umore, declino cognitivo e aumentato rischio di malattie neurodegenerative in quanto influenza la trasmissione dopaminergica e serotoninergica.[12]

Cheratinociti

Secondo Rybchyn et al, la vitamina D e i suoi analoghi regolano in modo diretto la proliferazione e differenziazione dei cheratinociti.[79] Studi sui cheratinociti indicano che 1,25-diidrossivitamina D determina una marcata diminuzione della loro proliferazione e un aumento della differenziazione.[70] Nei cheratinociti, è stato dimostrato che l'1,25(OH)D promuove la riparazione del danno al DNA indotto dalle radiazioni ultraviolette (UVR), riduce l'apoptosi aumentando la sopravvivenza dopo UVR e aumenta p53.[24] L'attivazione del VDR contribuisce anche alla risposta immunitaria cutanea e alla mediazione dei processi infiammatori. Per tali ragioni, gli analoghi topici della vitamina D (ad es. calcitriolo) sono impiegati nel trattamento della psoriasi e altre dermatosi caratterizzate da iper-proliferazione.[79]

Endometrio

Nell'endometrio, il tessuto che riveste l'utero, la vitamina D è fondamentale per i processi legati all'impianto e al mantenimento della gravidanza:

- modula l'espressione di geni e citochine cruciali per l'endometrio-ricettività. A livello molecolare, aumenta l'espressione del gene HOXA10 (*Homeobox A10*), un gene essenziale per la plasticità e la differenziazione dell'endometrio, e modula la sintesi di citochine pro-impianto come LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*);
- promuove la differenziazione delle cellule stromali endometriali in cellule deciduali (decidualizzazione), indispensabile per l'impianto e lo sviluppo placentare. Ciò si realizza amplificando gli effetti del progesterone e aumentando l'espressione dei recettori del progesterone (PR);
- contribuisce a creare un ambiente immuno-tollerante nell'utero materno, essenziale per prevenire il rigetto dell'embrione. Ciò avviene riducendo l'attività delle cellule Natural Killer (NK) uterine e aumentando la produzione di citochine anti-infiammatorie.

L'endometriosi è una condizione patologica caratterizzata dalla presenza di tessuto endometriale, ghiandole e stroma funzionalmente attivi in siti ectopici. La sua reale prevalenza nella popolazione femminile è sconosciuta principalmente a causa di diagnosi trascurate e tardive, ma è stato riportato che colpisce circa il 5-10% delle donne in età riproduttiva.[80] Diverse teorie sono state proposte per la sua eziopatogenesi, ma ancora ad oggi nessuna è stata confermata. L'endometrio delle donne con endometriosi presenta, rispetto a quello delle donne senza malattie, anomalie strutturali e funzionali che influenzano la capacità proliferativa, la presenza di componenti immunitarie, l'espressione delle molecole di adesione, la produzione di steroidi e citochine. Inoltre, l'endometriosi possiede caratteristiche simili a una neoplasia maligna e soddisfa diversi criteri di una malattia autoimmune. La vitamina D è un noto agente antiproliferativo, antinfiammatorio e persino immunomodulatore. Pertanto, l'associazione tra endometriosi e vitamina D è stata oggetto di alcune indagini. Sfortunatamente, i dati che collegano l'azione della vitamina D e l'endometriosi a livello molecolare sono ancora scarsi, sia in termini di potenziale ruolo nella patogenesi che di terapia.

Il cancro dell'endometrio è la patologia maligna ginecologica femminile più comune nei paesi sviluppati e la sua incidenza è in aumento. Una recente revisione sistematica

della letteratura ha scoperto un ruolo cruciale della vitamina D nei tumori poiché alti livelli circolanti di vitamina D sono associati a un rischio ridotto di sviluppare alcuni tipi di cancro (seno, colon-retto, gastrico, ematologico, testa e collo, rene, polmone, ovaio, pancreas, fegato, prostata e cancro della pelle). Tuttavia, l'associazione tra vitamina D e rischio di cancro dell'endometrio è attualmente controversa. Pertanto, una migliore indagine sui potenziali meccanismi molecolari alla base dell'azione locale del vitamina D nel cancro dell'endometrio potrebbe essere utile.[80]

Placenta

La placenta è un organo endocrino che regola attivamente la vitamina D, esprimendo sia CYP27B1 sia VDR. Infatti la placenta produce e risponde alla vitamina D, dove la vitamina D agisce come modulatore dell'impianto, della produzione di citochine e della risposta immunitaria alle infezioni, E ciò va a supporto sia del feto che della madre. Il calcitriolo:

- regola l'espressione di proteine coinvolte nel trasporto attivo del calcio dalla madre al feto attraverso il sinciziotrofoblasto;[81]
- esercita un effetto protettivo sulla vascolarizzazione placentare per prevenire complicanze come la preeclampsia. A livello molecolare, sopprime l'espressione di fattori anti-angiogenici (come sFlt-1) e può modulare positivamente fattori pro-angiogenici (come VEGF), sebbene questo equilibrio sia complesso;[81]
- riduce lo stress ossidativo placentare agendo come antiossidante, riducendo i danni e l'infiammazione della placenta e contribuendo alla riduzione del rischio di parto pretermine.[81]

Un adeguato apporto di vitamina D è essenziale per la salute materna e fetale durante la gravidanza e dati epidemiologici indicano che molte donne in gravidanza presentano livelli di vitamina D subottimali. In particolare, la carenza di vitamina D è correlata a preeclampsia, diabete mellito gestazionale e vaginosi batterica e a un aumentato rischio di parto cesareo.[81]

Studi hanno dimostrato che nelle ovaie sono presenti il VDR (nelle cellule della granulosa, dove l'azione è strettamente legata alla regolazione ormonale), la 25-idrossilasi e la 1α-idrossilasi determinando la sintesi della vitamina D che modula l'espressione degli

enzimi chiave della steroidogenesi, influenzando la sintesi di progesterone e, in minor misura, degli estrogeni, agendo sulla maturazione degli ovociti.[82]

La carenza di vitamina D è frequentemente riscontrata nelle donne con Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS).

La sindrome dell'ovaio policistico è un disturbo endocrino comune nelle donne in età riproduttiva e la resistenza all'insulina è una delle principali cause fisiopatologiche di questa sindrome. La resistenza all'insulina aumenta il rischio di diabete di tipo 2 (T2DM); pertanto, potrebbe rappresentare il collegamento comune tra PCOS e T2DM.[83]

Si ipotizza che la supplementazione possa migliorare la sensibilità insulinica e ridurre l'iperandrogenismo associato alla sindrome attraverso due meccanismi molecolari:

1. aumenta l'espressione del trasportatore di glucosio GLUT4 nelle cellule insulino-sensibili, migliorando l'uptake del glucosio e riducendo l'insulino-resistenza;[84]
2. sopprime l'attività del fattore NF-κB (fattore nucleare kappa-B), riducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF-α e IL-6).

Testicoli

VDR ed enzimi necessari per il metabolismo della vitamina D sono stati trovati anche nei testicoli maschili (nelle cellule di Sertoli e nelle cellule germinali), negli spermatozoi maturi e nel tratto eiaculatorio, suggerendo un ruolo importante di questa vitamina nella fertilità maschile: interviene infatti nella regolazione della spermatogenesi e della maturazione epididimale.[85]

Il calcitriolo modula l'espressione di canali del calcio specifici (ad esempio CatSper) nella membrana dello spermatozoo. Questi canali sono essenziali per l'iperattivazione dello spermatozoo (un prerequisito per la fecondazione) e per la reazione acrosomiale.

Il calcitriolo agisce a livello trascrizionale nelle cellule di Sertoli, supportando l'ambiente nutrizionale e ormonale necessario per una spermatogenesi efficiente.

Livelli ottimali di vitamina D sono correlati a una migliore motilità e morfologia degli spermatozoi, suggerendo un ruolo nella protezione contro i danni al DNA spermatico. Studi suggeriscono una correlazione positiva tra livelli sierici di vitamina D e migliori parametri seminali; altri studi dimostrano invece che la riduzione della fertilità può essere ripristinata con l'integrazione di vitamina D.[85]

Inoltre, la vitamina D influisce indirettamente anche sulla funzione delle cellule di Leydig e sulla produzione di testosterone.

Salute orale e dentale

La vitamina D svolge un ruolo fondamentale e sempre più riconosciuto nel mantenimento della salute orale e dentale, influenzando lo sviluppo dei denti, l'integrità dello smalto, la salute parodontale e la risposta immunitaria locale proprio per il suo impatto sul metabolismo osseo, del calcio e del fosfato, essenziali per la mineralizzazione dell'osso alveolare e della dentina.

Il calcitriolo assicura l'adeguato assorbimento intestinale di calcio e fosfato. Questo è cruciale durante la formazione e l'eruzione dei denti, poiché garantisce la corretta deposizione di minerali nella dentina e nello smalto, influenzando la loro resistenza.

Come per le altre ossa, attraverso l'azione del VDR e la regolazione del PTH e di FGF-23, la vitamina D assicura una densità minerale ossea adeguata, mantenendo l'osso alveolare, che supporta i denti, forte e resistente. Il rachitismo è, infatti, anche associato a difetti nella struttura dentale, che includono ipoplasia dello smalto e della dentina, che rendono i denti più suscettibili alla carie e all'usura.[86]

Il calcitriolo modula specificamente la differenziazione degli ameloblasti (responsabili della formazione dello smalto) e degli odontoblasti (responsabili della formazione della dentina). Questo processo è strettamente mediato dal recettore della vitamina D (VDR) espresso in queste cellule.

Il VDR è espresso nelle cellule dell'osso alveolare, del legamento parodontale e nelle cellule immunitarie presenti nel solco gengivale. Questa espressione consente un'azione diretta sui tessuti che supportano il dente, influenzando la salute parodontale:

- il calcitriolo modula il rimodellamento osseo, essenziale per il supporto del dente;
- regola l'attività degli osteoblasti (formazione ossea) e degli osteoclasti (riassorbimento osseo) nel processo di mantenimento dell'osso alveolare;
- esercita una significativa azione antinfiammatoria nel parodonto. La parodontite è una malattia infiammatoria cronica causata da infezione batterica. Il calcitriolo agisce riducendo la risposta infiammatoria eccessiva:

- citochine: sopprime la produzione di citochine pro-infiammatorie (es. IL-1β, TNF- α) da parte delle cellule immunitarie residenti;[87]
- MMP: inibisce l'espressione di alcune metalloproteinasi della matrice (MMPs) che contribuiscono alla distruzione del tessuto connettivo e dell'osso parodontale.[87]

Sebbene il ruolo della vitamina D nella prevenzione diretta della carie non sia completamente chiaro, esistono forti evidenze che suggeriscono un'azione protettiva:

- la vitamina D è un potente immunomodulatore. Stimola la produzione di peptidi antimicrobici endogeni, come la catelicidina e le defensine, da parte delle cellule epiteliali orali. Questi peptidi sono in grado di contrastare attivamente la proliferazione dei batteri cariogeni (come *Streptococcus mutans*) nel biofilm orale;[87]
- una carenza di vitamina D può compromettere la mineralizzazione dello smalto durante l'amelogenesi, rendendo la struttura dentale più suscettibile agli attacchi acidi batterici.[87]

Studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione inversa tra i livelli sierici di vitamina D e la prevalenza e la gravità sia della carie dentale che della malattia parodontale. Livelli subottimali di vitamina D sono associati a un rischio aumentato di carie dentale nei bambini e a una maggiore perdita di attacco e riassorbimento osseo negli adulti affetti da parodontite.[88]

La vitamina D è indagata anche in relazione a condizioni patologiche orali più complesse:

- Lichen Planus Orale (OLP): è una condizione mucocutanea cronica che colpisce fino al 2% della popolazione generale e si presenta tipicamente con lesioni di lunga durata e non responsive, con episodi di esacerbazione e remissione. L'eziopatogenesi dell'OLP è ancora poco chiara, sebbene sia stato ipotizzato che si tratti molto probabilmente di una condizione mediata dai linfociti T e causata da un antigene sconosciuto. Il trattamento rimane ancora oggi un'incognita, ma la vitamina D, per le sue proprietà antinfiammatorie e immunomodulatorie e per il suo effetto regolatore sulla proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti, è oggetto di ricerca per una sua supplementazione come potenziale terapia aggiuntiva per l'OLP;[89]

- Cancro Orale: è una neoplasia maligna che si sviluppa sul labbro o nella cavità orale . Il carcinoma squamocellulare orale (OSCC) è un tumore importante che coinvolge oltre il 90% di tutti i tumori orali. Il ruolo antiproliferativo della vitamina D è oggetto di ricerca per l'ipotesi che livelli adeguati possano avere un effetto protettivo contro lo sviluppo di neoplasie del cavo orale.[90]

Tessuto adiposo e obesità

La vitamina D esercita un ruolo significativo nel tessuto adiposo dato che il VDR è ampiamente espresso negli adipociti e nelle cellule immunitarie infiltranti. Il calcitriolo agisce direttamente sulla morfologia e sulla funzione degli adipociti modulando differenziazione dei pre-adipociti in adipociti maturi (adipogenesi) tramite il complesso VDR/calcitriolo che modula l'espressione di fattori di trascrizione chiave per l'adipogenesi, come PPARɣ e C/EBPα. Studi in vitro indicano che il calcitriolo può inibire la proliferazione e la differenziazione degli adipociti, limitando l'espansione del tessuto adiposo, in particolare quello viscerale.[91]

Sempre più studi dimostrano l'esistenza di una relazione tra la vitamina D e il peso corporeo e hanno dimostrato come la presenza di massa grassa sia inversamente correlata ai livelli sierici di idrossi-vitamina D [25(OH)D]; soggetti obesi, infatti, hanno una bassa concentrazione sierica di 25(OH)D rispetto ai non obesi, ma anche nei soggetti non obesi l'adiposità è inversamente correlata con i livelli di vitamina D, suggerendo un'interazione bidirezionale: la carenza contribuisce alla disfunzione metabolica e l'eccesso di tessuto adiposo ne causa la sequestrazione.[92]

Inoltre, nel tessuto adiposo obeso si instaura uno stato di infiammazione cronica di basso grado in cui la vitamina D, essendo un agente antinfiammatorio, modula l'espressione di adipochine infiammatorie in due modi:

1. sopprimendo l'attivazione del fattore nucleare NF-κB che riduce la produzione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie (come TNF-α e IL-6) da parte degli adipociti e dei macrofagi infiltranti;[93]
2. aumentando l'espressione di adipochine con effetti benefici come l'adiponectina, che è una molecola anti-infiammatoria e insulino-sensibilizzante; difatti la vitamina D ne aumenta la sintesi proprio tramite il legame del VDR al promotore del gene dell'adiponectina.[93]

Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione fra deficit di vitamina D e sviluppo della sindrome metabolica (SM), infatti alcuni studi mostrano una associazione inversa tra livelli sierici di 25(OH)D e insulino-resistenza.[94]

Oltre alla modulazione infiammatoria e alla differenziazione, la vitamina D nel tessuto adiposo contribuisce alla salute metabolica attraverso meccanismi già descritti: migliorando l'uptake del glucosio (aumentando l'espressione di GLUT4) e ottimizzando la funzione mitocondriale negli adipociti.[84]

1.2.2.1 Sistema immunitario

Il legame tra $1,25(OH)_2D_3$ e il VDR costituisce il presupposto molecolare alla base della funzione immunomodulante di questo ormone steroideo. In particolar modo, l'interazione tra la vitamina D e VDRE consente alla vitamina D di modulare il fenotipo e l'attività delle cellule presentanti l'antigene (APC), incluse le cellule dendritiche (DC), e di esercitare un controllo anche sulle funzioni dei linfociti T (helper e citotossici), linfociti B, neutrofili e macrofagi.[95]

Il potenziale ruolo della vitamina D nella risposta immunitaria è stato identificato sulla base di tre osservazioni fondamentali:

1. la presenza del VDR nelle cellule infiammatorie umane attivate;
2. la capacità di $1,25(OH)_2D_3$ di inibire la proliferazione dei linfociti T;
3. la capacità dei macrofagi attivati di esprimere CYP27B1 e quindi di produrre localmente $1,25(OH)_2D_3$.[96]

Nel suo insieme, la vitamina D non agisce esclusivamente come modulatore dell'immunità, ma rappresenta un vero e proprio elemento funzionale di integrazione tra immunità innata e adattativa.

1.2.2.1.1 Azione su immunità innata

Le prime evidenze storiche che collegano la vitamina D all'immunità innata risalgono alla metà del XIX secolo e all'inizio del XX secolo, prima dell'introduzione degli antibiotici, quando l'olio di fegato di merluzzo, ricco di vitamina D_3, e l'esposizione alla luce solare venivano utilizzati nel trattamento della tubercolosi.[97]

L’immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell’organismo ed è caratterizzata dall’attivazione dei recettori Toll like (Toll-like receptors, TLR) espressi nelle cellule polimorfonucleate (PMN), nei monociti, nei macrofagi e in diverse cellule epiteliali quali cellule dell’epidermide, della gengiva, dell’intestino, dei polmoni, della vescica e della vagina.[24]

I TLR costituiscono una famiglia di recettori transmembrana non catalitici deputati al riconoscimento di pattern molecolari di membrana associati ai patogeni (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP). Nelle cellule umane sono stati identificati 10 TLR funzionali, distinti in base alla loro capacità di riconoscere ligandi batterici, virali o fungini. In particolare, i TLR 1/2, 4, 5 e 2/6 rispondono prevalentemente a segnali batterici, mentre i TLR 3, 7 e 8 sono specifici per i ligandi virali; il TLR 4 è in grado di mediare segnali sia batterici che virali.

Il legame tra un TRL ed il rispettivo PAMP attiva una cascata di segnali che scatenano la risposta immunitaria. Il segnale trasmesso dai TLR utilizza diverse molecole adattatrici, come il fattore di differenziazione mieloide 88 (MyD88), che è coinvolto nella segnalazione dei TLR 2, 4, 5, 7 e 9 e l’adattatore contenente il dominio TIR (TRIF) che, invece, è specifico per i TLR 3 e 4. La via di segnalazione di MyD88 determina la traslocazione del fattore di trascrizione NF-κB nel nucleo della cellula, con conseguente produzione e rilascio di citochine infiammatorie, che amplificano la risposta immunitaria; TRIF, invece attiva il fattore regolatore dell'interferone-3 (IRF-3), determinando la produzione di interferoni di tipo I, come l'IFN-β. L'attivazione dei TLR determina, inoltre, la produzione di citochine, peptidi antimicrobici (Antimicrobial Peptides, AMP) e specie reattive dell'ossigeno, che agiscono contro gli agenti patogeni.

I peptidi antimicrobici esercitano la loro azione distruggendo le membrane cellulari di batteri e virus o attivando specifiche vie di segnalazione nelle cellule infettate. Il fattore di trascrizione NF-κB è richiesto per l'espressione di DEFB4, il gene che codifica per la β-defensina 2, e la 1,25-diidrossivitamina D è in grado di influenzare l'attivazione di NF-κB. L’1,25 diidrossivitamina D induce l'espressione del dominio di oligomerizzazione legante il nucleotide 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2, NOD2), un patogeno intracellulare che riconosce il dipeptide muramilico, un componente del peptidoglicano batterico, promuovendo la trascrizione di DEFB4 attraverso NF-κB. L' $1,25(OH)_2D_3$ ha dimostrato di indurre la trascrizione delle proteine associate all'autofagia

come Atg-5 e Beclin-1, favorendo l'eliminazione dei patogeni intracellulari tramite l'induzione della catelicidina e dei suoi mediatori a valle (p38, ERK e C/EBPβ).

Tra gli AMP più prodotti nell'uomo emergono la catelicidina, le α-defensine e le β -defensine.

La catelicidina è prodotta come una proteina precursore, hCAP18, che deve essere scissa nel suo peptide attivo, LL-37. Oltre alle sue proprietà antimicrobiche, la catelicidina:

- stimola la produzione di citochine come IL-6, IL-10 e IL-18, attivando le vie di segnalazione ERK/p38, determinando il differenziamento dei linfociti T helper di tipo 2;
- promuove la chemiotassi di cellule immunitarie come neutrofili, monociti, macrofagi e linfociti T;
- attiva il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), inducendo l'attivazione di STAT-1 e STAT-3 e favorendo la proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti, con un ruolo rilevante nella guarigione delle ferite;
- funge da ponte tra l'immunità innata adattativa facendo in modo che l'organismo inneschi risposte specifiche in base all'agente infettivo con cui entra in contatto.

L'espressione della catelicidina è indotta da $1,25(OH)_2D_3$, che stimola la sua produzione sia nelle cellule mieloidi che nelle cellule epiteliali. La vitamina D induce anche l'espressione del corecettore CD14, fondamentale per la segnalazione mediata dai TLR. In particolare, la stimolazione del TLR2 da parte di patogeni come *Mycobacterium tuberculosis* nei macrofagi o da lesioni cutanee nei cheratinociti aumenta l'espressione dell'enzima CYP27B1, che converte la vitamina D in $1,25(OH)_2D_3$ e conseguentemente la produzione di catelicidina. Tuttavia, la carenza di vitamina D o di CYP27B1 può compromettere la risposta immunitaria innata, riducendo la capacità delle cellule di produrre catelicidina e/o CD14.[24]

La vitamina D funge da ponte di collegamento tra l'attivazione dei TLR e la produzione di catelicidina.

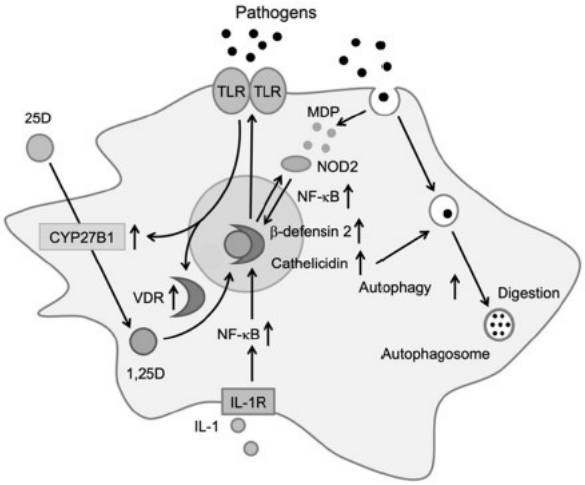


Figura 3 *"Effetti della vitamina D sulle cellule del sistema immunitario"*[98]

Effetti sulle barriere epiteliali e autofagia

Oltre alla produzione di peptidi antimicrobici (AMP), un aspetto cruciale regolato dall' $1,25(OH)_2D_3$ è il mantenimento dell'integrità delle barriere epiteliali e dell'omeostasi tra l'ospite e il microbiota. È stato dimostrato che la segnalazione della vitamina D agisce su più livelli per preservare la funzione di barriera della mucosa:

- stimola l'espressione delle proteine delle giunzioni serrate (*tight junctions*), quali occludina, claudina e zonula occludens-1 (ZO-1). Questo meccanismo è essenziale per preservare la barriera fisica a livello intestinale, polmonare e cutaneo, riducendo la permeabilità d'organo e impedendo la traslocazione di patogeni e tossine nell'interstizio;
- aumenta la vitalità delle cellule epiteliali intestinali e ne protegge l'integrità dai danni indotti da agenti citotossici, come il lipopolisaccaride (LPS) batterico;
- promuove la funzione di barriera della mucosa migliorando l'espressione delle proteine di riconoscimento dei patogeni intracellulari;
- induce la produzione e la secrezione di peptidi antimicrobici da parte delle cellule epiteliali intestinali, delle cellule di Paneth e dei linfociti intraepiteliali;
- regola l'autofagia intestinale attraverso la modulazione di ATG16L1, un gene chiave per la clearance dei patogeni intracellulari e per la funzione delle cellule di Paneth. La disfunzione di questo pathway è associata a ridotta produzione di peptidi antimicrobici e maggiore suscettibilità all'infiammazione intestinale, come osservato nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD);[99]

- influenza l’espressione di NOD2, recettore intracellulare coinvolto nel riconoscimento microbico e nella regolazione dell’autofagia. La segnalazione VDR potenzia la funzione NOD2-ATG16L1, migliorando la clearance batterica e contribuendo all’omeostasi mucosale.[100]

L'insieme di queste azioni limita la traslocazione batterica e mantiene l'equilibrio del microambiente intestinale. Al contrario, un deficit di vitamina D compromette tale stabilità, contribuendo alla patogenesi di molteplici disturbi autoinfiammatori, metabolici e alla suscettibilità alle infezioni sistemiche.[101]

Effetti su macrofagi e monociti

I macrofagi e i monociti rappresentano i principali effettori della risposta innata, responsabili della fagocitosi e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) per l'eliminazione dei patogeni. In queste cellule, l’attivazione dei TLR induce l'espressione di CYP27B1, permettendo la produzione locale di $1,25(OH)_2D$.

La vitamina D potenzia le attività antimicrobiche dei macrofagi e dei monociti attraverso meccanismi autocrini tramite la via di segnalazione VDR-RXR che, a sua volta, induce l’espressione di diversi peptidi antimicrobici, tra cui catelicidina e β-defensina 2, molecole coinvolte nella risposta immunitaria innata contro numerosi patogeni. Inoltre, regola la programmazione epigenetica dei monociti e dei macrofagi durante le sfide immunitarie e, quindi, influenza la memoria immunologica e la differenziazione del sottotipo delle cellule immunitarie. Oltre al meccanismo autocrino, l’$1,25(OH)_2D_3$, esercita un’azione paracrina stimolando i macrofagi adiacenti che, una volta rilasciati nel flusso sanguigno, possono raggiungere concentrazioni sieriche di circa 30ng/mL. Questo processo può provocare ipercalcemia, una condizione spesso considerata anche un indicatore di infezione in corso.[97]

Effetti su APC e sulle cellule dendritiche

L’azione della vitamina D sulle APC svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della tolleranza immunitaria, regolando finemente l’espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) e molecole costimolatorie (CD40, CD80, CD86).[97]

Le cellule dendritiche costituiscono il ponte principale tra immunità innata e adattativa e determinano la natura della risposta linfocitaria attraverso il loro stato di maturazione. Le DC sono cellule presentanti l'antigene per cui sono altamente specializzate per la sua cattura, elaborazione e presentazione ai linfociti T presenti nel timo e nei linfonodi periferici. Le DC immature catturano l'antigene e vanno in contro a un processo di maturazione indotto da segnali del microambiente in cui si trovano.[96]

La vitamina D blocca il processo di maturazione delle DC attraverso l'inibizione di NF-κB, riducendo l'espressione di complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) e di molecole costimolatorie quali CD40, CD80 e CD86, con conseguente diminuzione della capacità di attivare linfociti T. La vitamina D modifica inoltre il profilo citochimico delle DC riducendo IL-12 (che influenza la differenziazione dei linfociti T helper in linfociti Th1) e IL-23 (che influenza la differenziazione dei linfociti T helper in linfociti Th17), e aumentando invece la produzione di IL-10 (citochina antinfiammatoria) favorendo così la generazione di linfociti T regolatori (Treg) e uno stato di tolleranza immunologica.[98]

Effetti sulle Natural Killer

Le cellule Natural Killer (NK) rappresentano un elemento di congiunzione tra immunità innata e adattativa. Sono specializzate nel riconoscimento e nella lisi di cellule infettate da virus o trasformate in cellule tumorali. La vitamina D esercita su di esse un'azione prevalentemente immunomodulante. Pur non compromettendo la loro capacità di sorveglianza, l'$1,25(OH)_2D_3$ riduce la loro produzione di interferone-ɣ. Poiché l'IFN-ɣ è un potente promotore della risposta di tipo Th1, la sua riduzione contribuisce a limitare un'infiammazione eccessiva e a prevenire il danno tissutale immunomediato, senza compromettere drasticamente la sorveglianza immunitaria. Nonostante i dati disponibili siano ancora eterogenei, alcuni studi suggeriscono che il $1,25(OH)_2D_3$ possa anche influenzare positivamente l'attivazione e la funzionalità delle cellule NK in specifici contesti immunologici. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base di tali effetti non sono ancora completamente chiariti.[91]

1.2.2.1.2 Immunità adattativa

Mentre l'immunità innata agisce come barriera immediata e aspecifica, l'immunità adattativa rappresenta il sistema di difesa specializzato dell'organismo, capace di riconoscere antigeni specifici e di generare una memoria immunologica duratura. L'attivazione dei linfociti T e B avviene solitamente in tessuti secondari distanti dal sito primario di esposizione ed è caratterizzata da una proliferazione clonale accompagnata da modificazioni post-traduzionali e dalla produzione di immunoglobuline specifiche.[97]

In questo contesto, la vitamina D agisce come un immunomodulatore. L'$1,25(OH)_2D_3$ esercita infatti un'azione prevalentemente inibitoria sul sistema adattativo, volta a limitare le risposte infiammatorie eccessive e a prevenire la perdita della tolleranza verso il self.[102]

Tale regolazione avviene attraverso il controllo diretto della proliferazione cellulare, la modulazione del profilo citochinico e l'induzione di fenotipi regolatori, garantendo una risposta efficace contro i patogeni ma non deleteria per i tessuti dell'ospite.[103]

Effetti sui linfociti T

L'attivazione dei linfociti T e B avviene in tessuti lontani dal sito di esposizione alla sostanza antigenica ed è caratterizzata dalla proliferazione di queste cellule che è accompagnata da modificazioni post-traduzionali della produzione di immunoglobuline che consentono la risposta cellulare di adattarsi specificatamente all'antigene presentato.[24]

Le cellule T interagiscono con le cellule dendritiche presentanti l'antigene per indurre una risposta immunitaria antigene-specifica. Esse esprimono sia il VDR che il CYP27B1. Le cellule T naïve esprimono un basso livello di VDR, che aumenta gradualmente con l'attivazione.[98] La vitamina D esercita un'azione inibitoria sul sistema immunitario adattativo.

Infatti, le cellule T, soprattutto dopo attivazione, mostrano una sensibilità particolarmente elevata alla vitamina D. L'$1,25(OH)_2D$:

- modula la proliferazione e la produzione di citochine dei linfociti $CD4^+$;[5]
- inibisce la polarizzazione Th1 riducendo IFN-γ e IL-2;
- promuove la differenziazione di tipo Th2 aumentando IL-4, IL-5 e IL-10;[3]

- sopprime le risposte Th17 attraverso il controllo di specifici fattori di trascrizione e citochine (IL-17, IFN-γ, IL-21 e IL-22) regolando negativamente il recettore orfano C legato al RAR e il recettore degli idrocarburi arilici, che sono regolatori principali del differenziamento di tipo Th17;
- promuove la differenziazione delle cellule T regolatrici, prevenendo un aumento della risposta autoimmune, inducendo la citochina antinfiammatoria IL-10 e il fattore di trascrizione FoxP3.

La vitamina D influisce anche sulla migrazione dei linfociti, modulando l'espressione di recettori per chemochine e regolando il loro traffico verso tessuti periferici o siti di infiammazione.

Effetti sui linfociti B

I linfociti B sono responsabili dell'immunità umorale attraverso la produzione di anticorpi. In condizioni patologiche, possono differenziarsi in plasmacellule che producono autoanticorpi o citochine che alimentano il processo infiammatorio.

I linfociti B inattivi non hanno VDR, e solo quando vengono attivati da mitogeni aumentano l'espressione del VDR ed esprimono anche CYP27B1, per cui risultano sensibili all'azione della vitamina D che:

- riduce proliferazione, maturazione delle plasmacellule e produzione anticorpale;
- inibisce l'attivazione delle cellule B mediata dalle citochine agendo sui linfociti T Helper;
- promuove direttamente la produzione di citochine antinfiammatoria delle cellule B (IL-10 e CCR10);
- favorisce l'apoptosi e contribuisce a ridurre la produzione di autoanticorpi, limitando le risposte autoimmuni e iperreattive.[24]

Studi precedenti hanno indicato che la differenziazione delle cellule B, la proliferazione e la produzione di anticorpi sono soppresse dai linfociti T helper trattati con 1,25D. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che la stessa 1,25D sopprime la differenziazione delle cellule B naïve o la maturazione in cellule B e plasmatiche di memoria.[98]

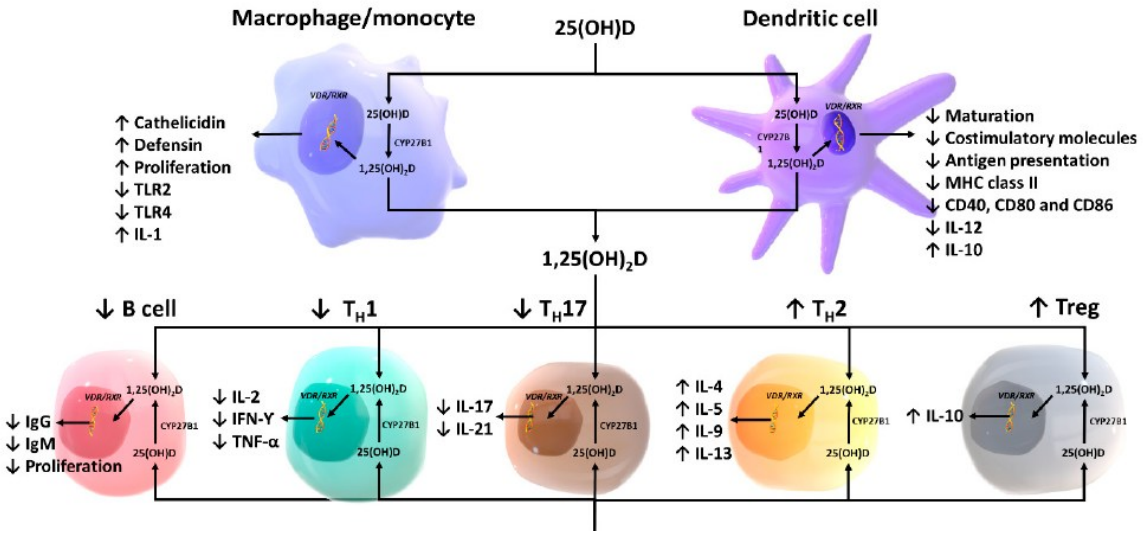


Figura 4 "Vitamina D e sistema immunitario"[102]

Effetti sul network citochinico e regolazione di NF-κB

La vitamina D esercita effetti diretti e indiretti sulla regolazione di diverse citochine coinvolte nella risposta immunitaria. Essa inibisce l'attivazione di NF-κB (fattore nucleare kappa B) attraverso l'aumento dell'espressione di IκBα (inibitore di kappa B α), impedendo così il legame di NF-κB con i suoi elementi di risposta nei geni bersaglio come IL-8 e IL-12 che essa regola. È stato inoltre dimostrato che l'1,25(OH)$_2$D$_3$ è in grado di veicolare un complesso inibitore, contenente l'istone deacetilasi 3 (HDAC3), al promotore di RelB (subunità RelB del fattore nucleare kappa B), uno dei membri della famiglia NF-κB, sopprimendo così l'espressione genica. Di conseguenza, l'asse TNF/NF-B risulta significativamente compromesso dall'azione della vitamina D a più livelli molecolari. Evidenze sperimentali mostrano, infatti, che nei fibroblasti privi di VDR l'attività di NF-κB appare costitutivamente aumentata. Inoltre, l'1,25(OH)$_2$D$_3$ sopprime l'espressione di IFN-γ, tramite l'identificazione di un VDRE negativo (nVDRE) nel promotore del relativo gene. Analogamente inibisce il GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi) che è regolato da monomeri del VDR che si legano a un complesso repressivo nel promotore di questo gene, competendo con il NFAT1 (fattore nucleare delle cellule T attivate 1) per il sito di legame. L'1,25(OH)$_2$D$_3$ promuove inoltre

l’espressione dell’IL-10 (Citochina antinfiammatoria fondamentale per la tolleranza immunitaria), riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie e aterogeniche coinvolte nell’iperattivazione immunitaria come IL-6 e IL-7 e stimola la prostaglandina E2 (PGE2), mediatore lipidico che esercita un'ulteriore azione inibente sulla risposta flogistica. La capacità della $1,25(OH)_2D_3$ di sopprimere il sistema immunitario adattativo sembra essere benefica in caso di autoimmunità.[24]

1.2.2.2 L'asse intestinale

Alla luce degli effetti immunomodulatori della vitamina D sui pathway infiammatori sistemici risulta di particolare interesse analizzare il suo ruolo anche a livello della mucosa intestinale, dove interagisce con il microbiota residente.

L’epitelio intestinale è in stretto contatto con la comunità microbica residente, configurando un’interazione dinamica di tipo commensale e mutualistico fondamentale per l’omeostasi dell’ospite. Il termine “microbiota” indica l’insieme delle comunità microbiche (batteri, virus, funghi e lieviti), mentre “microbioma” si riferisce al patrimonio genetico complessivo di tali microrganismi, che codifica circa tre milioni di geni, un numero stimato superiore di oltre cento volte rispetto al genoma umano.[104] Il microbiota intestinale svolge infatti funzioni metaboliche, immunologiche e protettive essenziali: è in grado di degradare componenti alimentari altrimenti indigeribili, detossificare sostanze potenzialmente nocive e sintetizzare numerosi metaboliti, tra cui vitamine (in particolare vitamina K e vitamine del gruppo B come niacina, biotina e acido folico), amminoacidi e acidi grassi a catena corta (short-chain fatty acids, SCFA) quali butirrato, acetato e propionato, che rappresentano una fonte energetica primaria per gli enterociti e contribuiscono al mantenimento dell’integrità della barriera mucosale. Inoltre, il microbiota partecipa al metabolismo degli acidi biliari attraverso il ciclo enteroepatico e svolge un ruolo chiave nella modulazione dell’immunità intestinale, interagendo con le risposte immunitarie innate e adattative mediante la produzione di pattern molecolari associati ai microrganismi (MAMPs). Parallelamente, esercita un’importante funzione protettiva nei confronti dei patogeni attraverso meccanismi di competizione per nutrienti e siti di adesione, produzione di sostanze antimicrobiche e resistenza alla colonizzazione.[105]

Il microbiota gastrointestinale è costituito prevalentemente da batteri appartenenti ai phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria e comprende complessivamente oltre 10^{14} microrganismi. La sua composizione varia lungo i diversi tratti del tratto gastrointestinale, con la massima densità nel colon. La colonizzazione microbica ha probabilmente inizio già durante la vita fetale e subisce profonde modificazioni nei primi anni di vita. Negli adulti, la popolazione di microbiota fecale di ciascun individuo è abbastanza stabile nel tempo, ma si verificano fluttuazioni in risposta a molteplici fattori, tra cui dieta, stile di vita, ambiente, attività fisica, uso di antibiotici o altri farmaci e condizioni patologiche. L'equilibrio microbico contribuisce al mantenimento della funzione della barriera intestinale, preservando l'integrità della barriera epiteliale attraverso la regolazione delle proteine delle tight junction, alla regolazione delle funzioni endocrine e neuroimmuni e alla protezione dall'infiammazione; al contrario, condizioni di disbiosi possono determinare una perdita dell'azione immunoregolatrice mucosale e favorire l'insorgenza di patologie infiammatorie e immunomediate, tra cui le malattie infiammatorie croniche intestinali, nonché patologie sistemiche come diabete, malattie cardiovascolari e tumori. In questo contesto, la vitamina D emerge come un importante modulatore della composizione del microbiota intestinale: livelli adeguati sono stati associati a una maggiore presenza di specie batteriche benefiche e a una riduzione di microrganismi potenzialmente patogeni.

Poiché il gene del recettore della vitamina D (VDR) non è espresso nei batteri, gli effetti della vitamina D sul microbiota e sulle malattie infiammatorie intestinali risultano verosimilmente mediati dalla segnalazione VDR nelle cellule immunitarie e nelle cellule epiteliali intestinali, suggerendo un ruolo cruciale di questo asse nella regolazione dell'immunità e nel mantenimento della salute dell'ospite.[104]

Tumori

Nei pazienti oncologici, la 1,25-diidrossivitamina D può essere prodotta localmente dai tessuti tumorali e, in questo contesto, non svolge un ruolo rilevante nell'omeostasi del calcio. Tuttavia, può modulare la proliferazione e la differenziazione cellulare, influenzare le interazioni con il microambiente tumorale, e contribuire alla protezione del DNA tramite effetti antinfiammatori e antiossidanti, potenzialmente influenzando la genesi tumorale e la progressione metastatica.[74] La presenza dell'enzima 1α-idrossilasi (CYP27B1) su diverse cellule sembrerebbe invece implicata nei meccanismi di regolazione della crescita tumorale[70] e nel promuovere il differenziamento cellulare. In dettaglio, l'attività dell'$1,25(OH)_2D$ è associata a diversi effetti:

- regolazione del ciclo cellulare: stimola l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare (p21 e p27) inducendo l'arresto della proliferazione;
- differenziamento e adesione cellulare: promuove l'espressione della molecola di adesione cellulare E-caderina, inibendo contemporaneamente l'attività trascrizionale della β -catenina,[24] contrastando il processo di transizione epitelio-mesenchimale spesso associato alla metastasi;
- azione antinfiammatoria: inibisce la sintesi delle prostaglandine (PGs) grazie alla soppressione dell'espressione della cicloossigenasi-2 (COX-2) e all'inibizione dell'espressione dei recettori per le PGs;
- modulazione dell'infiammazione cronica: contrasta l'infiammazione cronica che contribuisce all'insorgenza alla tumorigenesi; ciò mediante l'inibizione sia del fattore p38MAPK sia del fattore nucleare NF-κB, riducendo di conseguenza la produzione di numerose citochine proinfiammatorie (TNF-α, IL-6, IL-10) e realizzando un effetto anti-infiammatorio nel microambiente tumorale.

In particolare, in un modello animale la vitamina D ha mostrato un effetto soppressivo sulla crescita delle cellule tumorali della pelle, del colon, della mammella e della prostata.[12]

1.3 Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI o IBD dall'acrostico "Inflammatory bowel diseases") sono patologie immuno-mediate caratterizzate da un'infiammazione cronica, recidivante e potenzialmente distruttiva del tratto gastrointestinale.[106] Sono patologie multifattoriali derivanti da una complessa interazione tra predisposizione genetica, disregolazione del sistema immunitario, fattori ambientali e alterazioni del microbiota intestinale. Tra i fattori ambientali attualmente oggetto di studio, lo stato della vitamina D ha assunto particolare rilevanza nel contesto delle IBD. La carenza di vitamina D nei pazienti affetti da IBD non influisce solamente sulla salute ossea, ma può aggravare l'attività e la gravità della malattia, suggerendo il suo ruolo sia come fattore di rischio modificabile sia come possibile bersaglio terapeutico. Livelli sierici ridotti di vitamina D sono frequentemente osservati nei soggetti con IBD, anche se non è ancora chiaro se la carenza rappresenti una causa primaria della malattia o una conseguenza dell'infiammazione intestinale cronica e del malassorbimento. Un numero crescente di evidenze suggerisce che livelli inadeguati di vitamina D possano essere associati a esiti clinici sfavorevoli nei pazienti affetti da IBD quali:

- maggiore attività di malattia e infiammazione mucosale;
- ridotta risposta alle terapie convenzionali e biologiche;
- incremento del rischio di complicanze quali stenosi, fistole e ospedalizzazioni;
- peggioramento della qualità di vita, affaticamento e aumento delle comorbidità come osteoporosi e infezioni.[107]

Questi dati supportano l'ipotesi che la vitamina D non sia solo un marcatore di gravità della malattia, ma un fattore modificabile che potrebbe modulare l'andamento clinico e migliorare il benessere del paziente. Studi recenti suggeriscono anche un ruolo immunomodulante della vitamina D con effetti sul profilo dei linfociti T e sulla produzione di citochine pro-infiammatorie.[106]

Le principali forme di IBD comprendono:

- morbo di Crohn (MC)
- colite ulcerosa (CU)
- colite indeterminata (CI)
- colite non classificata (IBD-U)

Queste condizioni condividono alcune caratteristiche cliniche istopatologiche, pur differendo per sede anatomica, profondità dell'infiammazione ed evoluzione. Possono manifestarsi sia nei bambini che negli adulti, con distribuzione pressoché sovrapponibile tra i due sessi.

Le IBD sono caratterizzate da un decorso cronico-recidivante, con potenziale evoluzione verso complicanze invalidanti. Riacutizzazioni frequenti, necessità di ospedalizzazioni e interventi chirurgici incidono significativamente sulla qualità di vita, con ripercussioni in ambito scolastico, lavorativo, sociale e familiare. A differenza di altre malattie infiammatorie, le IBD non possono essere controllate facilmente, poiché la risposta immunitaria rimane attiva e provoca danni alla mucosa intestinale con sintomi quali dolore addominale, diarrea, sanguinamento rettale e perdita di peso.[108]

1.3.1 Epidemiologia

Le IBD rappresentano un crescente problema di salute pubblica a livello globale. La loro distribuzione geografica è eterogenea e correlata al grado di industrializzazione dei vari paesi. La prevalenza stimata è di circa 230 casi ogni 100.000 abitanti a livello globale, con valori più elevati in Nord America, Europa occidentale e Oceania, e più bassi in Asia, Africa e America Latina, sebbene in aumento negli ultimi due decenni. In Italia, pur in assenza di un registro nazionale specifico, si stima che circa 250.000 persone siano affette da IBD.[109] La prevalenza complessiva è maggiore nei paesi industrializzati, con valori elevati in Nord America, Europa occidentale e Oceania, mentre Asia, Africa e America Latina mostrano storicamente valori inferiori, sebbene in aumento negli ultimi 20 anni. Questo trend riflette un modello di transizione epidemiologica correlato a industrializzazione, urbanizzazione e cambiamenti dello stile di vita. Sebbene non esista in Italia un registro nazionale specifico di patologia, si stima che queste patologie interessino circa 250.000 persone su tutto il territorio nazionale. L'evoluzione della malattia infiammatoria intestinale (IBD) è classificata in quattro fasi epidemiologiche:

1. emergenza;
2. accelerazione dell'incidenza;
3. prevalenza crescente;
4. equilibrio di prevalenza.[110]

Nei paesi occidentali la maggior parte delle regioni si trova nella fase di prevalenza crescente, caratterizzata da un'incidenza stabile o in calo e da un aumento della prevalenza. Studi recenti in Canada e nei paesi nordici confermano questo trend, con stabilizzazione dell'incidenza ma incremento della prevalenza, anche nelle popolazioni pediatriche e anziane. Le IBD insorgono frequentemente in età giovanile-adulta, con un secondo picco in età più avanzata. L'impatto socio-economico è rilevante, sia in termini di costi sanitari diretti (terapie biologiche, ospedalizzazioni, chirurgia) sia indiretti (riduzione della produttività lavorativa, assenteismo). In particolare, l'aumento di incidenza negli anziani rappresenta una sfida significativa per i sistemi sanitari, a causa della maggiore suscettibilità a comorbidità e complicanze legate alle terapie immunosoppressive.[110]

Nei paesi in via di industrializzazione come Cina, Asia e America Latina, l'urbanizzazione, la crescita economica e l'adozione di stili di vita occidentali hanno determinato un rapido aumento dell'incidenza delle IBD. Studi locali in Cina hanno rilevato variazioni regionali significative, con un gradiente sud-nord della malattia, e un recente studio nazionale conferma un'incidenza in aumento, ancora inferiore rispetto ai paesi occidentali ma destinata a crescere.[111]

1.3.2 Eziopatogenesi

Sebbene la patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali rimanga sconosciuta, si ritiene che sia multifattoriale, con il coinvolgimento di fattori sia genetici che ambientali che contribuiscono all'insorgenza e alla progressione di questa malattia. Sono stati identificati diversi fattori di rischio:

- fattori demografici come età giovane (10-40 anni) e razza caucasica sono associati a un rischio maggiore di sviluppo delle IBD: si è osservato infatti che esistono 163 alleli di rischio associati alle malattie infiammatorie intestinali (IBD) nelle popolazioni bianche;
- predisposizione genetica: circa il 10–25% dei pazienti presenta un parente di primo grado affetto da IBD. Negli ultimi vent'anni, gli studi di associazione genomica (GWAS) hanno profondamente ampliato la nostra comprensione delle basi genetiche delle malattie infiammatorie intestinali identificando numerosi loci genetici (oltre 320) associati alla

suscettibilità genetica. Nonostante l'impatto genetico delle IBD sia simile tra le popolazioni europee e asiatiche, alcune differenze emergono nello specifico dei geni di suscettibilità. Nelle popolazioni europee i geni principali sono NOD2 e ATG16L1, mentre nelle popolazioni dell'Asia orientale prevale TNFSF15;[110]

- microbiota e disbiosi: il microbiota intestinale svolge un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Nei pazienti con IBD si osserva una riduzione della biodiversità microbica, con diminuzione di batteri produttori di acidi grassi a corta catena e incremento di specie potenzialmente pro-infiammatorie. La disbiosi contribuisce alla perpetuazione dell'infiammazione attraverso:
  - ridotta produzione di metaboliti anti-infiammatori;
  - attivazione persistente dei pattern recognition receptors;
  - aumento della permeabilità intestinale;
  - squilibrio tra linfociti T effettrici e linfociti T regolatori.

Rimane tuttavia oggetto di dibattito se la disbiosi rappresenti una causa primaria o una conseguenza dell'infiammazione cronica.[112]

- fattori ambientali correlati ad aumentato rischio di IBD:
- residenza in aree urbane o in paesi ad alto reddito;
- esposizione precoce ad antibiotici;
- infezioni gastro-intestinali acute, che possono aumentare il rischio di IBD, come dimostrato da studi che riportano un incremento del rischio di IBD nei pazienti con gastroenterite acuta (OR 1,4, IC 95% 1,2–1,7) e in chi ha precedentemente avuto la sindrome dell'intestino irritabile (rischio circa cinque volte maggiore). I patogeni che causano infezioni gastro-intestinali associate alle IBD sono: Salmonella, Shigella, Yersinia, Aeromonas, Clostridium difficile, Escherichia coli, la tubercolosi, Amoeba/Entamoeba histolytica, Toxoplasma gondii[108,113] A differenza dell'Helicobacter pylori, specie di Schistosoma e Necator americanus che invece sono stati associati a un rischio ridotto di IBD.
- fumo di sigaretta: può aumentare il numero di linfociti T CD4+ aumentando il rilascio dell'INF-ɣ. Da molti studi emerge come i fumatori abbiano il doppio delle probabilità di essere colpiti dall'IBD rispetto ai non fumatori, in quando INF-ɣ è una proteina infiammatoria;[108]

- appendicectomia: l'appendice produce antigeni che possono contribuire all'aumento dell'immunità del corpo contro le malattie. L'appendicite si verifica generalmente a seguito dell'ostruzione del lume intestinale, che favorisce la proliferazione dei batteri intestinali e lo sviluppo di infezioni. [108] Un certo numero di studi ha suggerito che l'appendicectomia possa essere un fattore protettivo per lo sviluppo di UC, sebbene non ne sia noto il meccanismo. Una delle ipotesi suggerite è che le alterazioni nella risposta immunitaria mucosale che portano all'appendicite o che risultano prodotte dall'appendicectomia possano influenzare negativamente i meccanismi patogenetici della IBD;[114]
- uso di contraccettivi orali (OCP), che aumenta il rischio di IBD del 30%;[113]
- consumo di bevande analcoliche;
- dieta ricca di grassi saturi e acidi grassi omega-6 aumentano notevolmente la prevalenza delle IBD a differenza del consumo di acidi grassi omega-3 (olio di pesce) che, influendo sulle molecole proteiche solubili in acqua (citochine e leucotrieni) diminuisce significativamente i segni clinici dell'IBD;[108]
- obesità e psoriasi;
- fattori psico-sociali come stress, ansia, depressione;
- esposizione ai pesticidi e inquinanti ambientali è stata associata a un aumento del rischio di IBD, probabilmente attraverso l'infiammazione sistemica, alterazioni della barriera intestinale e modificazioni del microbiota;
- le microplastiche, ormai diffuse in alimenti e acqua potabile, sono presenti in concentrazioni significativamente più elevate nelle feci dei pazienti con IBD rispetto agli individui sani e la loro quantità è correlata alla gravità della malattia.

Esistono numerose ipotesi che suggeriscono come le esposizioni avvenute durante il periodo prenatale e fino ai cinque anni di età — definito come "prima infanzia" — rappresentino una fase di particolare suscettibilità durante la quale determinati eventi possono aumentare il rischio di sviluppare una malattia infiammatoria intestinale (IBD). In particolare, l'esposizione del neonato nel suo primo anno di vita ad antibiotici, fumo passivo e otite media sono associati a un rischio maggiore di sviluppare IBD, a differenza dell'allattamento al seno che esercita un effetto protettivo nei confronti delle IBD.

Addirittura emerge una relazione dose-dipendente in cui vi è una protezione maggiore se l'allattamento dura almeno 12 mesi.[113]

Inoltre, nelle meta-analisi sono stati identificati anche diversi fattori protettivi delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) come l'esercizio fisico, il consumo di tè, alti livelli di folato e alti livelli di vitamina D.

1.3.3 Manifestazioni cliniche

Il quadro clinico è eterogeneo e variabile per severità. I sintomi intestinali più frequenti comprendono:

- diarrea persistente;
- dolore addominale;
- rettorragia;
- tenesmo rettale;
- calo ponderale;
- astenia.

Le IBD sono inoltre caratterizzate da un andamento cronico-recidivante, con alternanza di fasi di riacutizzazione e periodi di remissione clinica.

Sono possibili manifestazioni extra-intestinali, che possono coinvolgere:

- apparato muscolo-scheletrico: artralgie, spondiloartriti;
- cute e mucose: eritema nodoso, pioderma gangrenoso;
- occhio: uveite;
- fegato e vie biliari.

1.3.4 Diagnosi

La diagnosi di IBD si basa su un approccio integrato comprendente:

- esami ematochimici: emocromo completo, proteina C-reattiva (PCR), velocità di eritrosedimentazione (VES);
- calprotectina fecale;
- esame endoscopico con relativa biopsia, che viene considerato il gold standard e consente di valutare direttamente la mucosa intestinale e di avere la conferma istologica;

- tecniche di imaging (ecografia intestinale, risonanza magnetica, tomografia computerizzata) che consentono la valutazione dell'estensione e delle eventuali complicanze.[110]

1.3.5 Approccio terapeutico

L'obiettivo terapeutico moderno non si limita al controllo sintomatologico, ma mira al raggiungimento della remissione clinica, biologica ed endoscopica ("treat-to-target"). [110]

Negli ultimi anni lo sviluppo di farmaci biologici e molecole target-specifiche ha profondamente modificato l'approccio terapeutico, consentendo strategie personalizzate basate sul profilo clinico e molecolare del paziente. [110]

Parallelamente, l'integrazione di dati genomici, trascrittomici, proteomici e metagenomici, supportata da strumenti di intelligenza artificiale, sta aprendo nuove prospettive nella medicina di precisione applicata alle IBD.[115] L'obiettivo futuro è identificare biomarcatori predittivi di risposta terapeutica e di progressione di malattia.

1.3.6 Il morbo di Crohn e la colite ulcerosa

Per tanto tempo è stato difficile distinguere nettamente le due patologie poiché condividono caratteristiche patologiche e cliniche comuni ma allo stesso tempo ne presentano di differenti e, infatti, attualmente esistono definizioni cliniche precise per entrambe.

1.3.6.1 Morbo di Crohn (MC)

Il morbo di Crohn è stato descritto per la prima volta nel 1932 da Burrill B. Crohn, Leon Ginzburg e Gordon Oppenheimer come "ileite regionale."[116]

È una malattia infiammatoria cronica intestinale, recidivante.[117] Il morbo di Crohn è caratterizzato da infiammazione transmurale che interessa l'intero tratto gastro-intestinale, dalla cavità orale alla regione perianale, sebbene abbia un'incidenza maggiore nell'ileo terminale e nel colon prossimale. Studi basati sulla popolazione provenienti dall'Europa settentrionale e dal Minnesota riportano un coinvolgimento ileale, ileocolonico e del colon in proporzioni pressoché uguali, con una migrazione della malattia che si verifica solo nel 6-14% dei pazienti. La patologia limitata al tratto

gastrointestinale superiore, all'ileo o alla regione ileocolonica è associata a un rischio maggiore di complicanze restringenti e fistolizzate rispetto al coinvolgimento isolato del colon. I dati del Minnesota indicano che il 19% dei pazienti presenta malattia restringente o fistolizzante entro 90 giorni dalla diagnosi e circa il 50% sviluppa complicanze come fistole, flemmoni, stenosi o ascessi entro 20 anni.[118]

1.3.6.1.1 Epidemiologia

L'incidenza e la prevalenza del morbo di Crohn variano a seconda delle regioni geografiche, con frequenze più elevate nei paesi sviluppati e nei contesti urbani; tuttavia esso non è una malattia esclusiva di una specifica popolazione. Si registra una maggior incidenza in Europa (Nord Europa 11.4 su 100.000 abitanti all'anno; 322 ogni 100.000 in Germania), Oceania (>300/100.000 persone-anno in Australia), e Stati Uniti d' America (~0,5% della popolazione, oltre 2 milioni di casi).[117] Inoltre, le analisi delle tendenze temporali dimostrano che i paesi di recente industrializzazione in Asia, Africa e Sud America stanno affrontando un'incidenza crescente, evidenziando la sfida globale posta dal MC.[117] La condizione presenta una distribuzione bimodale per età, con un picco di insorgenza tra i 15 e i 30 anni e tra i 40 e i 60 anni. L'incidenza è più elevata nelle popolazioni urbane rispetto a quelle rurali ed è particolarmente elevata tra gli individui di origine nordeuropea o ebraica, con tassi di incidenza che in genere vanno da circa 5 a oltre 12 ogni 100.000 persone-anno in questi gruppi.[118]

In Italia l'incidenza è di 6.9 casi per 100.000 abitanti/anno e la prevalenza è di 100 casi per 100.000 abitanti senza differenze significative tra i generi.

La malattia può manifestarsi a qualsiasi età, ma si presenta più frequentemente tra i 15 e i 35 anni e tra i 50 e i 70 anni; a differenza della CU, mostra inoltre un'elevata incidenza in età pediatrica.[108]

Il morbo di Crohn presenta differenze cliniche significative tra pazienti pediatrici e adulti. Nei bambini, l'esordio è spesso più aggressivo rispetto agli adulti, con una maggiore probabilità di coinvolgimento ileocolico e di forme estensive o complicate fin dai primi anni di malattia. Inoltre, i bambini presentano più frequentemente manifestazioni extra-intestinali tra cui artrite, dermatite e complicanze epatobiliare, che possono influenzare in modo rilevante la qualità di vita. La necessità di un intervento

terapeutico precoce e intensivo, includendo corticosteroidi e farmaci biologici, è più marcata nei pazienti pediatrici, sia per controllare l'infiammazione attiva sia per ridurre il rischio di ritardo della crescita e sviluppo puberale.

Negli adulti, la malattia tende ad avere un decorso più lento, spesso caratterizzato da fasi di remissione alternate a ricadute, con un maggior rischio di sviluppare stenosi, fistole e complicanze chirurgiche nel lungo termine. Sebbene le manifestazioni extra-intestinali siano presenti, la loro frequenza è generalmente inferiore rispetto ai bambini. Queste differenze suggeriscono che la strategia terapeutica e la gestione clinica della malattia di Crohn debbano essere adattate all'età del paziente, tenendo conto del fenotipo, del rischio di complicanze e delle esigenze specifiche di crescita e sviluppo nei pazienti pediatrici. Una comprensione approfondita delle variazioni fenotipiche tra le due popolazioni è essenziale per ottimizzare il trattamento, migliorare la prognosi a lungo termine e ridurre l'impatto della malattia sulla qualità di vita.[119]

1.3.6.1.2 Eziopatogenesi

L'eziologia precisa delle malattie infiammatorie intestinali non è definita. Le evidenze indicano che il morbo di Crohn deriva da una risposta immunitaria inappropriata ad antigeni ambientali inclusi farmaci, tossine, infezioni e microbi intestinali in individui geneticamente predisposti.[118]

Il Morbo di Crohn presenta fattori di rischio più specifici rispetto alle altre IBD, tra cui:

- predisposizione genetica più marcata rispetto alla colite ulcerosa, con una maggiore concordanza nei gemelli monozigoti e un forte legame con varianti genetiche legate alla risposta immunitaria. Negli ultimi decenni è stata riconosciuta l'ereditarietà delle malattie infiammatorie intestinali (IBD): nel 2001 è stato scoperto il primo gene correlato alla malattia di Crohn.[109] Studi di associazione genomica su larga scala hanno identificato oltre 71 loci di suscettibilità al morbo di Crohn. Alcune varianti genetiche, come le mutazioni in NOD2/CARD15, sono associate a fenotipi specifici, tra cui localizzazione ileale, esordio precoce e maggiore gravità della malattia, spesso con necessità di intervento chirurgico;

- fumo di sigaretta: aumenta significativamente il rischio di insorgenza e favorisce un decorso più severo;
- appendicectomia: in soggetti che hanno subito un'appendicectomia, è stato dimostrato un ritardo diagnostico del MC e che il rischio relativo di sviluppare MC entro il primo anno dall'intervento è pari a 6.5. Studi dimostrano un aumento del rischio di sviluppare MC dopo un'appendicectomia;[113]
- tonsillectomia: una meta-analisi su 17 studi ha inoltre mostrato un aumento del rischio di MC dopo tonsillectomia;[113]
- dieta occidentale ricca di grassi saturi e zuccheri, cibi ultraprocessati, cibi dei fast food, diete povere in fibre sono associate a un maggior rischio di IBD. A differenza dell' incremento dell'assunzione di fibre che ha mostrato un effetto protettivo nel MC (si riduce il rischio del 13%);[113]
- uso prolungato di antibiotici e FANS;[120]
- uso di contraccettivi orali (OCP): aumenta il rischio di MC del 24%. Esposizioni più prolungate agli OCP aumentano ulteriormente il rischio: ogni mese aggiuntivo aumenta il rischio di MC del 6,4%. Le pillole contenenti solo progesterone non sembrano aumentare il rischio di MC.[113]

In pazienti con MC in fase iniziale, ad esempio, si registra una riduzione di batteri produttori di acidi grassi a catena corta. Studi longitudinali su parenti sani di pazienti con Crohn hanno dimostrato alterazioni della composizione microbica fino a cinque anni prima della comparsa della malattia, evidenziando il legame tra microbiota e sviluppo futuro della patologia.

Sebbene siano stati identificati numerosi fattori di rischio, l'eziopatogenesi del morbo di Crohn (MC) non è ancora completamente chiarita. L'ipotesi attualmente più accreditata propone che la malattia derivi da una risposta immunitaria aberrante nei confronti del microbioma intestinale in soggetti geneticamente predisposti. Tale risposta è prevalentemente di tipo cellulo-mediato ed è sostenuta dall'attivazione dei linfociti T-helper di tipo 1 (Th1), con conseguente rilascio di mediatori infiammatori a livello della mucosa intestinale, tra cui interleuchina-12 (IL-12), IL-18, IL-21, interferone-γ (IFN-γ) e TNF-α.[121]

Nei soggetti predisposti sono stati identificati specifici alleli associati al MC, in particolare geni coinvolti nella risposta immunitaria innata, nella via dei linfociti Th17 o

nella funzione della barriera mucosa epiteliale. Tra i principali geni implicati figurano NOD2, ATG16L1, LRRK2, IRGM, IL-23R, HLA-DRB1*01 e 07*, STAT3 e JAK2. Un elemento chiave nella patogenesi è rappresentato dall'alterata processazione degli antigeni derivanti da componenti batteriche.[122]

Il primo locus di suscettibilità identificato per il Morbo di Crohn è stato quello contenente il gene NOD2 (CARD15), il cui prodotto riconosce componenti della parete batterica e regola la risposta immunitaria innata. Le varianti alleliche più frequenti nelle popolazioni europea e americana comprendono un'inserzione frameshift (Leu1007fsinsC), che determina la comparsa di un codone di stop prematuro, la sintesi di una proteina tronca e due mutazioni missenso (Arg702Trp e Gly908Arg). Il polimorfismo di NOD2/CARD15 è stato associato a un esordio precoce della malattia, con localizzazione ileale e fenotipo stenosante. La proteina codificata da NOD2/CARD15 svolge un ruolo citoplasmatico di sensore intracellulare della presenza batterica, legandosi al muramil-dipeptide, componente del peptidoglicano della parete batterica. Essa è espressa in diverse cellule, tra cui linfociti, macrofagi, fibroblasti e cellule di Paneth, responsabili della produzione di defensine. Le mutazioni di NOD2/CARD15 compromettono l'adeguata risposta immunitaria innata agli agenti batterici, favorendo una persistente attivazione dell'immunità adattativa mediata dai linfociti T.

Ulteriori alterazioni genetiche riguardano la via dell'autofagia cellulare. L'autofagia è un processo mediante il quale la cellula isola porzioni di citoplasma e le degrada attraverso i lisosomi; essa consente l'eliminazione di proteine mal ripiegate, aggregati proteici e corpi apoptotici. Inoltre, svolge un ruolo fondamentale nell'immunità innata, contribuendo all'eliminazione diretta dei patogeni, all'attivazione dei Toll-like receptors (TLR) e dei NOD-like receptors, e alla modulazione della produzione di citochine infiammatorie, tra cui IFN-γ. I principali geni coinvolti in questa via sono ATG16L1 e IRGM. Un ulteriore elemento di predisposizione genetica riguarda la via dell'interleuchina-23. L'IL-23 è una citochina infiammatoria prodotta prevalentemente da macrofagi e cellule dendritiche in risposta a stimoli microbici; essa promuove l'attivazione e la differenziazione dei linfociti Th17, produttori di IL-17. Alterazioni genetiche possono interessare non solo il gene IL-23R ma anche molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, quali STAT3 e JAK2, che mediano la risposta intracellulare a valle del recettore.[123]

Esistono inoltre forme monogeniche di malattia infiammatoria intestinale a esordio molto precoce (Very Early Onset IBD, VEO-IBD), definite da un'insorgenza prima dei 6 anni di età. Tali forme sono associate a mutazioni nei geni IL-10, IL-10R, della nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH ossidasi) e del fattore citosolico 2 dei neutrofili (NCF2). Le forme monogeniche devono essere sospettate in presenza di consanguineità familiare, resistenza alle terapie convenzionali, quadro clinico particolarmente severo o associazione con altre patologie autoimmuni.[124]

1.3.6.1.3 Fisiopatologia

Il morbo di Crohn è una condizione multifattoriale influenzata da fattori genetici, infettivi, immunologici, ambientali e dietetici. Le risposte immunitarie aberranti coinvolgono meccanismi innati e adattativi che coinvolgono macrofagi intestinali, neutrofili e linfociti T-helper, promuovendo mediatori proinfiammatori come il fattore di necrosi tumorale α (TNF-α). Le cellule T-helper 1 (Th1) e T-helper 17 (Th17) sono centrali nella cascata infiammatoria del morbo di Crohn. Le lesioni del colon presentano livelli elevati di citochine, tra cui interferone γ e interleuchine 2, 12 e 18.[118] Il morbo di Crohn è caratterizzato da un'infiammazione transmurale che può interessare l'intero tratto gastrointestinale, dalla cavità orale alla regione perianale. L'ileo terminale e il colon destro sono i più comunemente coinvolti. La lesione iniziale si manifesta come un infiltrato infiammatorio che circonda una cripta intestinale. Si sviluppa un'ulcerazione, inizialmente limitata alla mucosa superficiale, che successivamente si estende agli strati più profondi. L'infiammazione persistente può portare alla formazione di granulomi non caseosi, che si verifica fino al 33% dei pazienti. L'assenza di granulomi non esclude la diagnosi. [118] Cicli ricorrenti di infiammazione e cicatrici possono provocare la formazione di stenosi e ostruzione intestinale. L'estensione dell'infiammazione agli organi adiacenti può produrre fistole enterovescicolari, enteroenterali, enterocutanee o enterovaginali.[118]

1.3.6.1.4 Manifestazioni cliniche

Il morbo di Crohn si caratterizza per un andamento variabile e imprevedibile, con periodi di riacutizzazione alternati a fasi di remissione che possono durare settimane o mesi. La sintomatologia dipende dal tratto gastrointestinale coinvolto. Nelle fasi iniziali

i pazienti possono presentare disturbi aspecifici e intermittenti quali dolori addominali lievi e ricorrenti, diarrea, flatulenza e febbricola, intervallati da periodi asintomatici che durano settimane o mesi. Con il tempo e il ripetersi delle riacutizzazioni, il quadro clinico può diventare più severo e localizzato. Eventi di stress fisico o emotivo possono favorire la ricomparsa o il peggioramento dei sintomi. In alcuni casi è presente un'anamnesi familiare positiva per malattie infiammatorie intestinali.[118]

I pazienti con ileocolite riferiscono comunemente dolore ricorrente al quadrante posteriore destro e diarrea. Il dolore è spesso di tipo colico e può essere alleviato dalla defecazione. Il morbo di Crohn può simulare un'appendicite acuta, che si presenta anch'essa con dolore al quadrante inferiore destro, febbre e diarrea. In alcuni casi può essere palpabile una massa infiammatoria al quadrante inferiore destro. La perdita di peso si verifica frequentemente a causa della diarrea cronica e della ridotta assunzione di cibo per via orale.[118]

Dal punto di vista fenotipico, la malattia può presentarsi in tre forme principali:

- forma non stenosanti non penetranti (infiammatoria), caratterizzata dal quadro flogistico (ispessimento delle pareti) in assenza di stenosi, tramiti fistolosi, ulcere e in assenza di una mucosa con "aspetto a ciottoli";
- forma stenosante-ostruttiva: la flogosi della parete e la riparazione fibrotica delle ulcere conducono a una riduzione del calibro del lume, esitando in quadri stenotici. Le stenosi possono essere singole o multiple e sono associate alla dilatazione delle anse a monte del tratto stenotico;
- forma fistolizzante (penetrante): è caratterizzata dalla progressione delle fissurazioni in tramiti fistolosi tra le anse intestinali o con le strutture circostanti. Possono essere fistole entero-enteriche, entero-cutanee, entero-vescicali, entero-ureterali o entero-vaginali. È possibile che le fistole terminino a fondo cieco nel retroperitoneo o nel mesentere, portando alla formazione di raccolte ascessuali.

L'evoluzione clinica può condurre a diarrea cronica, dolore addominale persistente, perdita di peso e segni di malassorbimento. Il frequente coinvolgimento dell'intestino tenue, sede primaria dell'assorbimento dei nutrienti, può determinare malnutrizione, astenia e riduzione dell'appetito.

Il morbo di Crohn è spesso associato a manifestazioni extra-intestinali che interessano più organi e sistemi. Queste manifestazioni includono:

1. articolazioni (24%): artrite assiale (spondilite anchilosante) o periferica (ginocchia, caviglie, polsi, gomiti);
2. bocca: stomatite, ulcere aftose;
3. fegato: calcoli biliari, colangite, colangite sclerosante primitiva;
4. reni: nefrolitiasi, idronefrosi, infezioni del tratto urinario;
5. pelle: manifestazioni dermatologiche (35%) come il pioderma gangrenoso e l'eritema nodoso;
6. occhi (27%): episclerite, sclerite, uveite.[117]

Nei bambini affetti, possono verificarsi ritardi di crescita o sviluppo.

Il morbo di Crohn favorisce inoltre uno stato di ipercoagulabilità, aumentando il rischio di eventi tromboembolici. La mobilità ridotta, in particolare nei pazienti ospedalizzati, può predisporre alla trombosi venosa profonda, all'ictus o all'embolia polmonare.

Il morbo di Crohn, a causa dei ripetuti cicli di infiammazione intestinale caratterizzati dall'alternanza di fasi di remissione clinica e fasi di riacutizzazione, può evolvere in stenosi e complicazioni quali fistole, lesioni rettali con conseguente sanguinamento rettale, calcoli biliari e formazione di ascessi.

Oltre il 50% dei pazienti affetti da morbo di Crohn presenta carenze di acido folico e vitamina D.[108] La carenza è particolarmente marcata nel MC rispetto alla CU a causa del frequente interessamento dell'ileo terminale, sito principale per il riassorbimento dei sali biliari necessari alla solubilizzazione delle vitamine liposolubili.

1.3.6.1.5 Diagnosi

La diagnosi si basa sulla combinazione di esami strumentali, endoscopici e istologici, test di laboratorio ed esame obiettivo, il tutto rapportandolo all'anamnesi del paziente.

Esame obiettivo

Richiede un esame fisico approfondito, che includa una valutazione addominale dettagliata, è essenziale nei pazienti che presentano disturbi addominali. L'esame obiettivo generale può rivelare segni di malnutrizione, come pallore e basso peso corporeo. I parametri vitali possono mostrare febbre, tachicardia o ipotensione.

L'ispezione addominale può identificare fistole enterocutanee nei pazienti con malattia in fase avanzata. Rumori intestinali iperattivi possono indicare infiammazione o ostruzione, mentre l'assenza di rumori intestinali suggerisce ileo o grave infiammazione. La palpazione può suscitare dolorabilità corrispondente al segmento intestinale interessato. La difesa è indicativa di peritonite in caso di perforazione o ascesso intra-addominale. La malattia perianale in fase avanzata può manifestarsi con fistole perianali o emorroidi, giustificando un'esplorazione rettale digitale.

La cute, gli occhi, la cavità orale e le articolazioni devono essere esaminati per rilevare eventuali manifestazioni extra-intestinali del morbo di Crohn. Il coinvolgimento epatico può manifestarsi con dolorabilità al quadrante superiore destro e ittero. La patologia renale deve essere presa in considerazione nei pazienti con dolorabilità al fianco o anomalie genitourinarie, tra cui fistole genitali e fibromi perineali. Le pazienti di sesso femminile con disturbi ginecologici necessitano di un esame pelvico. Deficit neurologici possono derivare da carenze vitaminiche, manifestandosi come diminuzione della sensibilità, atrofia muscolare o anomalie dell'andatura.

Un esame fisico completo dei pazienti con morbo di Crohn consente di identificare un'infiammazione attiva e di valutare la gravità della malattia. L'esame aiuta anche a individuare eventuali complicanze e a orientare le successive decisioni diagnostiche e gestionali.

Test di Laboratorio

I test di laboratorio comprendono:

- su campione fecale:
  - coprocoltura, per escludere le infezioni si effettuano coltura, sensibilità e ricerca di uova, parassiti e tossine del *Clostridioides difficile;*
  - calprotectina fecale, una proteina che risiede principalmente nel citoplasma dei neutrofili, e il cui riscontro nelle feci è indicativo di un processo infiammatorio intestinale. Difatti viene usata sia come marker per valutare la forma attiva del morbo di Crohn sia per monitorare la risoluzione o riacutizzazione del processo infiammatorio. Bisogna attenzionare il fatto che non sia un marker specifico, in quanto un suo aumento di concentrazione si può riscontrare anche in seguito a processi infettivi, neoplasie, polipi o uso di farmaci antiinfiammatori non-steroidei (FANS);

- su sangue:
  - emocromo completo e pannello metabolico possono rivelare anemia secondaria a carenza di vitamina B12 o ferro e segni di malattia epatica. Squilibri elettrolitici possono derivare dalla diarrea. Creatinina elevata, azotemia o enzimi epatici possono indicare un coinvolgimento renale o epatico;
  - un aumento della proteina C-reattiva (PCR) o della velocità di eritrosedimentazione (VES) o del fibrinogeno può riflettere la gravità dell'infiammazione;
- su urine si può rilevare batteriuria o leucocituria. Carenze nutrizionali specifiche, come ferro e calcio, possono essere documentate con misurazioni sieriche quando i risultati guidano la correzione terapeutica;
- test sierologici speciali, inclusi gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili e gli anticorpi anti- *Saccharomyces cerevisiae*, non sono indicati di routine per distinguere il morbo di Crohn dalla colite ulcerosa.

Tecniche di imaging

Le Tecniche di imaging quali:

- ecografia addominale per valutare le riacutizzazioni o monitorare la risposta al trattamento;
- tomografia computerizzata (TC) addominale e pelvica, risonanza magnetica per immagini (RMI) o enterografia a risonanza magnetica che possono rilevare ascessi, stenosi e fistole. Queste tecniche di imaging forniscono una visualizzazione più chiara dei segmenti intestinali interessati. Tra tutte la RM offre un livello di dettaglio superiore per la valutazione della patologia fistolizzante e si predilige alla TC nella popolazione pediatrica a causa della minima esposizione alle radiazioni ionizzanti.

Per confermare la diagnosi e per valutare l'estensione dell'infiammazione si utilizzano tecniche endoscopiche quali gastroscopia e ileocolonscopia che consentono di effettuare anche le biopsie nelle regioni endoscopicamente infiammate e sospette. Vengono inoltre utilizzate per monitorare la risposta al trattamento.[118]

1.3.6.1.6 Classificazione

Il MC viene classificato utilizzando la classificazione di Montreal del 2005, che rappresenta l'evoluzione della classificazione di Vienna del 1998 che classifica il fenotipo del MC in base all'età alla diagnosi (<16, 17–40, >40 anni), alla localizzazione della malattia (ileale, colica, ileocolonica, superiore isolata) e al comportamento della malattia (non stenosanti/non penetranti (infiammatorie), fibrostenosanti o penetrante e perianale).

Negli anni 70 è stato sviluppato anche il Crohn Disease Activity Index (CDAI), un particolare strumento clinico utilizzato per valutare l'attività di malattia del Morbo di Crohn e per standardizzare i criteri di risposta nei trial clinici. Calcola un punteggio basandosi su 8 parametri:

1. numero medio giornaliero di scariche liquide o molli;
2. dolore addominale;
3. benessere generale;
4. presenza di complicanze extra-intestinali;
5. uso di farmaci antidiarroici o oppiacei;
6. presenza di massa addominale palpabile;
7. valore dell'ematocrito;
8. percentuale di deviazione dal peso standard.

Quest'indice viene spesso combinato con marker biologici per migliorarne la capacità di riflettere l'infiammazione endoscopica reale.[125]

1.3.6.1.7 Trattamento

La gestione terapeutica del morbo di Crohn si articola in una fase di induzione della remissione, finalizzata al controllo rapido dell'infiammazione (idealmente entro 8–12 settimane), e una fase di mantenimento, volta a prevenire le recidive e a ottenere la guarigione mucosale. La scelta del trattamento dipende dalla sede, dalla gravità e dal comportamento della malattia, nonché dal profilo di rischio del paziente.

Nelle forme lievi-moderate possono essere impiegati corticosteroidi sistemici per l'induzione della remissione. La mesalazina (5-ASA) ha un ruolo limitato nel morbo di Crohn rispetto alla colite ulcerosa e le evidenze non supportano un beneficio clinicamente significativo nella maggior parte dei pazienti con MC lieve. Gli immunomodulatori

(Azatioprina, 6-Mercaptopurina e Metotrexato) sono utilizzati principalmente come terapia di mantenimento "steroid-sparing", poiché presentano un'insorgenza d'azione ritardata (8–12 settimane) e non sono indicati per l'induzione in fase acuta.

Nelle forme moderate-severe o fistolizzanti, la terapia biologica rappresenta il cardine del trattamento. Gli agenti anti-TNF (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol) sono efficaci nell'indurre e mantenere la remissione, con beneficio clinico spesso osservabile entro poche settimane, e risultano particolarmente indicati nella malattia fistolizzante e nella prevenzione della recidiva post-operatoria. La combinazione con immunomodulatori può ridurre l'immunogenicità e aumentare l'efficacia terapeutica.

Gli inibitori dell'interleuchina 12/23 (Ustekinumab) e dell'IL-23 selettiva (Risankizumab) rappresentano opzioni efficaci nei pazienti con risposta inadeguata alle terapie convenzionali o anti-TNF. Più recentemente, gli inibitori della Janus chinasi (JAK), come Upadacitinib, hanno ampliato l'armamentario terapeutico nei pazienti refrattari, con rapido beneficio clinico ma necessità di attenta valutazione del rischio infettivo.

In caso di complicanze, tra cui stenosi fibrostenotiche con ostruzione intestinale, fistole refrattarie, ascessi ricorrenti, perforazione, displasia o neoplasia e in caso di malattia non responsiva alla terapia medica, si ricorre all'intervento chirurgico. Le principali opzioni comprendono resezione intestinale e stricturoplastica; le stenosi brevi possono essere trattate con dilatazione endoscopica. Nelle fistole semplici può essere eseguita fistulotomia, mentre le forme complesse possono richiedere setoni o approcci combinati medico-chirurgici.

Le raccomandazioni più recenti promuovono un approccio "treat-to-target", basato non solo sulla remissione clinica ma anche sulla normalizzazione dei biomarcatori (PCR sierica, calprotectina fecale) e sulla documentazione endoscopica della guarigione mucosale. Il monitoraggio periodico dei biomarcatori consente di guidare l'intensificazione terapeutica e ridurre il rischio di recidiva.

1.3.6.2 La colite ulcerosa (CU)

La colite ulcerosa (CU), insieme al morbo di Crohn, rappresenta una delle due principali forme di malattia infiammatoria cronica intestinale (Inflammatory Bowel Disease, IBD). Essa è caratterizzata da un processo infiammatorio cronico continuo che

interessa selettivamente la mucosa e la sottomucosa del colon, con coinvolgimento costante del retto ed estensione prossimale variabile fino al cieco. A differenza del morbo di Crohn, l'infiammazione nella colite ulcerosa presenta distribuzione continua, senza aree di mucosa sana interposta.[126]

I sintomi principali comprendono diarrea ematica, urgenza evacuativa, tenesmo rettale e dolore addominale crampiforme, spesso associati ai movimenti intestinali. Il sanguinamento rettale rappresenta uno dei segni clinici più caratteristici della patologia. Nei pazienti con malattia di lunga durata può svilupparsi anemia sideropenica secondaria alle perdite ematiche croniche e allo stato infiammatorio sistemico. Inoltre, una malattia estesa e persistente da oltre 8–10 anni è associata a un aumentato rischio di displasia e adenocarcinoma colorettale.[126]

1.3.6.2.1 Epidemiologia

L'incidenza della colite ulcerosa, così come il morbo di Crohn, è maggiore nei paesi industrializzati. Si stima un'incidenza compresa tra 9-20 casi ogni 100.000 persone all'anno e una prevalenza è tra 156-291 casi ogni 100.000 persone. [127] Dati recenti evidenziano in Europa occidentale prevalenze fino a 570 casi per 100.000 abitanti nel Regno Unito, 523 per 100.000 in Danimarca e circa 500 per 100.000 in Norvegia, mentre in Italia la prevalenza è stimata intorno a 121 casi per 100.000 abitanti. Negli ultimi decenni si è osservato un aumento dell'incidenza anche nei paesi in via di industrializzazione, probabilmente correlato a modificazioni ambientali e dello stile di vita.

Il picco principale di insorgenza si verifica tra i 20 e i 40 anni, con un secondo picco più modesto tra i 50 e i 70 anni. Non si osservano differenze significative tra i sessi, sebbene alcuni studi riportino una lieve predominanza maschile. Rispetto al morbo di Crohn, la colite ulcerosa risulta più frequente nella popolazione adulta e meno comune in età pediatrica.[127]

1.3.6.2.2 Eziopatogenesi

L'eziologia della colite ulcerosa non è completamente chiarita. La patogenesi appare multifattoriale e deriva dall'interazione tra predisposizione genetica, fattori ambientali,

alterazioni del microbiota intestinale e disfunzioni della risposta immunitaria mucosale in soggetti geneticamente suscettibili.

Sono stati proposti due principali meccanismi patogenetici:

- alterazioni della barriera mucosa che determinano un'aumentata esposizione del sistema immunitario agli antigeni del microbiota intestinale;
- modificazioni qualitative o quantitative della flora intestinale che inducono una risposta immunitaria patologica in una mucosa predisposta.

I principali fattori di rischio si distinguono in:

o predisposizione genetica: sebbene la componente genetica risulti meno marcata rispetto al morbo di Crohn, circa l'8–14% dei pazienti presenta familiarità per malattie infiammatorie intestinali. I parenti di primo grado mostrano un rischio circa quattro volte maggiore di sviluppare la patologia. Sono stati identificati numerosi loci genetici associati alla colite ulcerosa, molti dei quali condivisi con il morbo di Crohn, tra cui varianti nei geni coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria mucosale e nella funzione della barriera epiteliale (ad esempio IL23R e regioni del complesso maggiore di istocompatibilità HLA di classe II).[126]

L'incidenza risulta maggiore nelle popolazioni di origine ebraica rispetto ad altre etnie;[127]

o contraccettivi orali (OCP), associati a un aumento del rischio di circa il 30%. Esposizioni più prolungate agli OCP aumentano ulteriormente il rischio: ogni mese aggiuntivo aumenta il rischio di CU del 3,3%. Le pillole contenenti solo progesterone mostrano un'associazione modesta con la CU;[113]

o appendicectomia: sembra avere un effetto protettivo, con riduzione del rischio fino al 69%;[113]

o dieta: elevato consumo di bevande zuccherate è associato a maggior rischio, mentre consumo di frutta e verdura sembra avere effetto protettivo in quanto si ipotizza che, essendo ricche di fibre, micronutrienti (vitamina C, E, folati) e fitochimici, siano in grado di ridurre l'infiammazione mucosale e mantenere la funzionalità della barriera intestinale;[113]

o gastroenteriti batteriche: infezioni da Salmonella o Campylobacter sono state associate a un aumento del rischio di sviluppare IBD;[128]

- fumo di sigaretta: alcune prove suggeriscono che il fumo potrebbe avere un effetto protettivo, ma finora nessuno è stato in grado di confermare una relazione diretta tra fumo e tale effetto; ciò che è emerso è che la prevalenza della colite ulcerosa è maggiore nei non fumatori o in coloro che hanno smesso di fumare di recente. Inoltre, i fumatori a cui viene diagnosticata la colite ulcerosa tendono ad avere una forma più lieve, un minor numero di ricoveri ospedalieri e una minore necessità di farmaci.[127]
- farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) associati all'insorgenza o alla riacutizzazione della malattia.[126]

1.3.6.2.3 Fisiopatologia

La fisiopatologia della colite ulcerosa è il risultato di una complessa interazione tra difetti della barriera epiteliale intestinale, alterazioni del microbiota, predisposizione genetica e disregolazione della risposta immunitaria mucosale, con conseguente infiammazione cronica limitata prevalentemente alla mucosa del colon. Un ruolo centrale è attribuito alla compromissione della funzione di barriera dell'epitelio intestinale, determinata da alterazioni della produzione di mucina, delle giunzioni serrate (tight junctions) e dalla riduzione delle cellule caliciformi. Tali modificazioni comportano un aumento della permeabilità intestinale agli antigeni luminali e ai microrganismi, favorendo l'attivazione del sistema immunitario della lamina propria. Sono state inoltre descritte anomalie funzionali dei colonociti, tra cui una ridotta espressione del recettore gamma attivato dal proliferatore dei perossisomi (PPAR-γ), regolatore negativo dell'infiammazione mediata dal fattore di trascrizione NF-κB, e difetti della risposta allo stress del reticolo endoplasmatico associati al gene XBP1, che contribuiscono alla disfunzione epiteliale e alla suscettibilità all'infiammazione mucosale.

Nel compartimento dell'immunità innata si osserva un aumento delle cellule dendritiche attivate e dei macrofagi, con maggiore espressione dei recettori Toll-like (TLR), in particolare TLR2 e TLR4, che amplificano la risposta infiammatoria in seguito al contatto con antigeni microbici. I neutrofili attivati si accumulano nella mucosa intestinale e contribuiscono al danno tissutale mediante il rilascio di mediatori infiammatori e specie reattive dell'ossigeno. Le cellule linfoidi innate, in particolare il sottotipo ILC3, svolgono un ruolo rilevante nella perpetuazione dell'infiammazione

attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie quali interleuchina-17 (IL-17) e interleuchina-22 (IL-22).

Dal punto di vista dell'immunità adattativa, a differenza del morbo di Crohn caratterizzato prevalentemente da una risposta Th1/Th17, nella colite ulcerosa predomina una risposta immunitaria di tipo Th2-like. Le cellule della lamina propria producono elevate quantità di interleuchina-5 (IL-5) e interleuchina-13 (IL-13), spesso associate all'attivazione di cellule Natural killer T (NKT) non convenzionali. L'IL-13 rappresenta un mediatore chiave del danno epiteliale, contribuendo alla citotossicità dei colonociti e alla disfunzione della barriera mucosa. Studi più recenti hanno inoltre identificato una popolazione di linfociti T helper produttrici di interleuchina-9 (Th9) che attraverso l'IL-9 interferiscono con i processi di riparazione epiteliale e favoriscono il mantenimento dell'infiammazione cronica. Il Fattore Di Necrosi Tumorale α (TNF-α) costituisce un ulteriore mediatore centrale nella cascata infiammatoria ed è responsabile di numerosi effetti pro-infiammatori e citotossici sulla mucosa intestinale.

Il reclutamento leucocitario nella mucosa intestinale è facilitato dall'aumentata espressione della molecola di adesione MAdCAM-1 sull'endotelio vascolare intestinale e dall'interazione con l'integrina α4β7 espressa sui linfociti circolanti, meccanismo che rappresenta anche un importante target terapeutico. La produzione di chemochine, tra cui CXCL8 (IL-8), contribuisce ulteriormente al richiamo e all'attivazione delle cellule infiammatorie.

Un ulteriore elemento patogenetico è rappresentato dalla disbiosi intestinale. Nei pazienti con colite ulcerosa è stata descritta una riduzione della biodiversità microbica, con diminuzione dei batteri appartenenti al phylum Firmicutes e aumento dei Proteobacteria, inclusi Enterobacteriaceae e batteri solfito-riduttori. Tuttavia, non è ancora completamente chiarito se tali alterazioni rappresentino una causa primaria o una conseguenza dell'infiammazione mucosale. Nel complesso, le evidenze attuali suggeriscono che la colite ulcerosa derivi da una perdita dell'equilibrio tra fattori protettivi della barriera intestinale e risposte immunitarie pro-infiammatorie in soggetti geneticamente predisposti, con conseguente attivazione cronica dell'immunità mucosale e danno tissutale persistente.[127]

1.3.6.2.4 Manifestazioni cliniche

La colite ulcerosa è una malattia cronica che colpisce la mucosa del colon e si manifesta più comunemente con sangue nelle feci e diarrea, spesso associata a muco. Altri sintomi includono:

- tenesmo;
- incontinenza;
- rettorragia;
- defecazione notturna;
- dolore addominale crampiforme;
- urgenza evacuativa;
- malessere;
- perdita di peso;
- febbre, a seconda dell'estensione e della gravità della malattia.[126]

L'esordio è generalmente graduale, con alternanza di remissioni spontanee e riacutizzazioni. Le lesioni iniziano tipicamente dal retto (proctite) e si estendono prossimalmente in modo continuo.

Le manifestazioni extra-intestinali possono interessare diversi organi:

- oculari: episclerite, sclerite, uveite;
- articolari: artrite periferica (sembra essere la manifestazione extra-intestinale più comune), sacroileite, spondilite anchilosante;
- cutanee: eritema nodoso, pioderma gangrenoso;
- epatobiliari: colangite sclerosante primitiva.

La colangite sclerosante primaria e il pioderma gangrenoso sono più comuni nella colite ulcerosa che nel morbo di Crohn.[126]

Nelle forme croniche di lunga durata può svilupparsi displasia epiteliale, considerata lesione precancerosa.

Le principali complicanze conseguenziali alla colite ulcerosa includono:

- megacolon tossico: è definito come una dilatazione acuta non ostruttiva del colon associata a tossicità sistemica e viene diagnosticato quando il diametro del colon trasverso supera i 6 cm;[126]
- perforazione intestinale;

- emorragia massiva;
- carcinoma colorettale: il rischio aumenta con durata della malattia, estensione colica e presenza di colangite sclerosante primitiva;
- stenosi (rare rispetto al morbo di Crohn)

1.3.6.2.5 Diagnosi

La diagnosi si basa sull'integrazione di dati clinici, laboratoristici, endoscopici e istologici.

Esame obiettivo

L'esame fisico comprende la palpazione addominale e la valutazione della cornice colica, la ricerca di segni di anemia, malnutrizione, disidratazione, dolorabilità addominale, sangue all'esplorazione rettale e identificazione di eventuali manifestazioni extra-intestinali.[126]

Esami di laboratorio

Dai referti provenienti dalla medicina di laboratorio si riscontra:

- aumento degli indici di infiammazione (VES, PCR). Possono essere elevati (colite ulcerosa grave) o normali (malattia da lieve a moderata);[126]
- anemia sideropenica (dovuta alle perdite ematiche con le feci);
- ipoalbuminemia (per protido-dispersione intestinale);
- leucocitosi e piastrinosi;
- alcalosi metabolica;
- calprotectina fecale elevata: marker sensibile ma non specifico di infiammazione. È correlata all'aumento dei neutrofili nell'intestino, può essere utile per escludere la malattia infiammatoria intestinale poiché i pazienti con bassi livelli di calprotectina fecale hanno meno dell'1% di probabilità di essere affetti da malattia infiammatoria intestinale. Tuttavia, la calprotectina fecale non distingue tra le varie cause di infiammazione intestinale e quindi non può essere utilizzata come strumento diagnostico definitivo nella colite ulcerosa;[126]

- tutti i pazienti con possibile colite ulcerosa devono essere sottoposti a valutazione delle feci (coltura fecale e *test per Clostridium difficile*) per escludere infezioni enteriche sovrapposte;
- P-ANCA: gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili perinucleari possono essere elevati nella colite ulcerosa, ma sono aspecifici e hanno una bassa sensibilità (0,55%, IC al 95% 0,53-0,58), quindi non sono raccomandati come test diagnostico.[126]

Endoscopia

La colonscopia con biopsie rappresenta il gold standard diagnostico e consente anche il monitoraggio della malattia. A livello endoscopico si osserva:

- mucosa eritematosa;
- perdita del normale pattern vascolare;
- friabilità;
- erosioni ulcerazioni superficiali;
- sanguinamento spontaneo;
- pseudopolipi infiammatori.[126]

È necessario effettuare almeno due biopsie da sei aree diverse (ileo terminale, colon ascendente, trasverso, discendente, sigmoideo e retto), comprese le aree dall'aspetto normale, poiché i cambiamenti infiammatori potrebbero risultare evidenti al microscopio. I risultati istologici suggestivi includono la distorsione dell'architettura della cripta, l'accorciamento della cripta, l'aumento dei linfociti e delle plasmacellule nella lamina propria (plasmacitosi basale), la deplezione della mucina e la metaplasia delle cellule di Paneth.

L'infiammazione è limitata agli strati mucoso e sottomucoso, a differenza del morbo di Crohn che presenta coinvolgimento transmurale.

Nei pazienti con colite ulcerosa estesa la sorveglianza endoscopica per il carcinoma colorettale deve iniziare dopo 8–10 anni dall'esordio della malattia, mediante colonscopie periodiche con biopsie mirate o cromoendoscopia.[129]

Imaging

La tomografia computerizzata (TC) o la risonanza magnetica (RM) possono essere utilizzate per valutare complicanze o escludere diagnosi alternative. Nelle forme severe

la radiografia diretta dell'addome è fondamentale per escludere megacolon tossico o perforazione intestinale. [126]

1.3.6.2.6 Classificazione

La colite ulcerosa viene classificata sia utilizzando la classificazione di Montreal e sia utilizzando i criteri di Truelove e Witts.

Secondo la classificazione di Montreal viene distinta in:

- E1: proctite ulcerativa, limitata al retto, con estensione massima fino alla porzione distale della giunzione rettosigmoidea;
- E2: CU sinistra, con localizzazione retto-colica ed estensione massima fino alla flessura splenica;
- E3: pancolite, con estensione prossimale alla flessura splenica.[129]

I criteri di Truelove e Witts, invece, in base alla frequenza delle evacuazioni giornaliere, alla presenza di sangue nelle feci, alla febbre, alla tachicardia, all'anemia e alla VES, distinguono la malattia in 4 forme di gravità (S):

1. S0 (remissione): nessun sintomo;
2. S1 (lieve): quattro o meno evacuazioni al giorno (con o senza sangue), assenza di sintomi sistemici, marcatori infiammatori normali;
3. S2 (moderato): quattro evacuazioni al giorno, minimi segni di sintomi sistemici;
4. S3 (grave): sei o più perdite di sangue al giorno, frequenza cardiaca ≥90 battiti al minuto, temperatura ≥37,5°C, concentrazione di emoglobina <105 g/L, velocità di eritrosedimentazione ≥30 mm/h.[129]

Un ulteriore indice utilizzato nella pratica clinica è il Mayo Score che integra quattro parametri: frequenza delle evacuazioni, sanguinamento rettale, valutazione endoscopica della mucosa e valutazione globale del medico. Viene impiegato sia nella pratica clinica sia nei trial clinici per standardizzare la valutazione della risposta terapeutica e la definizione di remissione clinica ed endoscopica.[130]

1.3.6.2.7 Trattamento

La gestione terapeutica della colite ulcerosa prevede una fase di induzione della remissione e una fase di mantenimento, con scelta del trattamento basata sulla gravità e sull'estensione della malattia.

Nelle forme lievi-moderate la terapia di prima linea è rappresentata dai derivati dell'acido 5-aminosalicilico (5-ASA), somministrati per via orale e/o topica (mesalazina), particolarmente efficaci nelle forme distali.

I corticosteroidi sistemici o topici vengono utilizzati per l'induzione della remissione nelle riacutizzazioni moderate o severe, ma non sono indicati per il mantenimento a causa degli effetti collaterali.

Gli immunomodulatori (Azatioprina e 6-mercaptopurina) sono utilizzati come terapia di mantenimento nei pazienti steroidi-dipendenti o steroidi-resistenti.[126]

Nelle forme moderate-severe o refrattarie sono indicati i farmaci biologici:

- anticorpi anti-TNF (Infliximab, Adalimumab, Golimumab);
- anticorpi anti-integrina (Vedolizumab);
- anticorpi anti-IL-12/23 (Ustekinumab).

Più recentemente sono stati introdotti gli inibitori delle Janus chinasi (JAK), come Tofacitinib e Upadacitinib, efficaci nei pazienti con risposta inadeguata alle terapie convenzionali.[131]

L'intervento chirurgico è indicato nei casi di malattia refrattaria alla terapia medica, complicanze severe (megacolon tossico, perforazione, emorragia massiva) o displasia/neoplasia.

La proctocolectomia totale con anastomosi ileo-anale rappresenta un trattamento definitivo e potenzialmente curativo della colite ulcerosa.[126]

1.4 Ruolo biologico della vitamina D nell'eziopatogenesi delle IBD

1.4.1 Stato della vitamina D nei pazienti con IBD

1.4.1.1 Prevalenza e definizione di carenza

Nei pazienti con malattie infiammatorie intestinali (Inflammatory Bowel Diseases, IBD), comprendenti morbo di Crohn (MC) e colite ulcerosa (CU), la carenza di vitamina D è molto comune. Studi clinici stimano che una percentuale tra il 30% e il 70% dei pazienti presenti livelli sierici di 25-idrossivitamina D inferiori alla norma a seconda della popolazione, della localizzazione della malattia e dei criteri utilizzati per definire carenza, insufficienza o sufficienza vitaminica.[132]

Diversi studi evidenziano che i pazienti con IBD hanno una probabilità significativamente maggiore di presentare carenza di vitamina D rispetto ai controlli sani: negli adulti, il rischio di deficit è quasi raddoppiato, mentre nei pazienti pediatrici la probabilità di carenza è maggiore, sebbene non sempre statisticamente significativa.[133]

Recenti evidenze mostrano anche che l'apporto dietetico di vitamina D e vitamina K è spesso inadeguato nei pazienti con IBD. In uno studio su 193 pazienti (89 MC e 104 CU) e 199 controlli, l'apporto medio di vitamina D nei pazienti con IBD era di 8,3 ± 4,5 µg/die (53,1% della RDA) rispetto a 9,7 ± 5,9 µg/die (63,2% della RDA) nei controlli. L'apporto medio di vitamina K risultava inferiore ai livelli raccomandati nei pazienti con IBD (116,7 ± 116,3 µg/die, 78,7% della RDA), con carenze marcate nel 40% dei pazienti con CU e nel 49% di quelli con MC, soprattutto in donne e soggetti con malattia attiva.[134]

1.4.1.2 Fattori di rischio

Diversi meccanismi contribuiscono alla carenza di vitamina D nelle IBD. Tra i principali fattori fisiopatologici vi sono:

- malassorbimento intestinale, particolarmente nei pazienti con coinvolgimento ileale o resezioni intestinali;
- diarrea cronica e malassorbimento degli acidi biliari (diarrea coleretica);
- ridotta assunzione alimentare o perdita di appetito;
- limitata esposizione alla luce solare, spesso correlata a stile di vita o all'uso di farmaci fotosensibilizzanti come corticosteroidi e immunosoppressori;

- polimorfismi genetici del recettore della vitamina D (VDR), che influenzano i livelli circolanti e la risposta biologica alla vitamina D.[135]

Oltre ai fattori fisiopatologici diretti, numerosi studi epidemiologici hanno identificato determinanti clinici e demografici associati a un aumentato rischio di carenza di vitamina D nelle IBD. Una recente revisione sistematica e meta-analisi ha evidenziato che:

- l'etnia non caucasica rappresenta un fattore di rischio indipendente, probabilmente per la maggiore pigmentazione cutanea che riduce la sintesi cutanea della vitamina D indotta dai raggi UV;
- il sesso maschile è associato a un rischio maggiore in alcune analisi, anche se tale associazione dipende dai valori soglia utilizzati per definire la carenza;
- la stagionalità influisce sui livelli vitaminici, con valori più bassi osservati durante i mesi invernali per la ridotta esposizione solare;
- il morbo di Crohn risulta più frequentemente associato alla carenza di vitamina D rispetto alla colite ulcerosa, verosimilmente per il coinvolgimento dell'ileo terminale, principale sede di assorbimento della vitamina D, e per la maggiore frequenza di resezioni intestinali;
- l'attività di malattia e una storia di chirurgia intestinale, in particolare resezioni ileali o ileocecali, aumentano ulteriormente il rischio di deficit vitaminico;
- l'uso di corticosteroidi e farmaci biologici è stato associato a livelli più bassi di vitamina D, probabilmente come conseguenza indiretta della maggiore severità della malattia nei pazienti che richiedono tali trattamenti. Al contrario, l'associazione con immunomodulatori e 5-aminosalicilati non è risultata significativa in modo consistente tra gli studi. Anche fattori come il fumo e l'indice di massa corporea hanno mostrato risultati contrastanti e rimangono oggetto di ulteriori ricerche;
- un ulteriore elemento di interesse riguarda l'interazione tra vitamina D e suscettibilità genetica alla malattia. Alcuni geni associati al morbo di Crohn, come NOD2 e ATG16L1, risultano modulati dalla vitamina D, suggerendo un possibile legame tra stato vitaminico e meccanismi patogenetici della malattia. Rimane inoltre ancora controverso quale sia il valore soglia ottimale di 25-idrossivitamina D nei pazienti con IBD: il cutoff di 20 ng/mL è basato principalmente sulla salute ossea, mentre non è ancora definito un livello ottimale per la modulazione immunitaria.[135]

1.4.1.3 Correlazione con attività di malattia e marker infiammatori

Livelli più bassi di vitamina D sono associati a maggiore attività di malattia, con valori elevati di marker infiammatori sistemici e intestinali, tra cui proteina C-reattiva (PCR), velocità di eritrosedimentazione (VES) e calprotectina fecale. La carenza di vitamina D è inoltre correlata a un aumento della frequenza di recidive, maggior rischio di ospedalizzazione e interventi chirurgici, e a una risposta meno favorevole alle terapie biologiche.

La relazione tra vitamina D e IBD è bidirezionale: l'infiammazione cronica può ridurre i livelli vitaminici, mentre la carenza di vitamina D può contribuire alla patogenesi della malattia modulando il sistema immunitario, l'integrità della barriera intestinale e la composizione del microbiota. Una combinazione di segnalazione alterata della vitamina D, predisposizione genetica e fattori ambientali può contribuire allo sviluppo di autoimmunità.[132]

1.4.2 Ruolo della vitamina D nell'integrità della barriera epiteliale intestinale

La vitamina D mantiene l'integrità della barriera intestinale regolando l'espressione delle tight junctions, che comprendono proteine strutturali come claudine, occludine e zonula occludens (ZO), riducendo la permeabilità epiteliale e favorendo la sopravvivenza cellulare.

La vitamina D regola anche la zonulina, un modulatore della disgregazione delle giunzioni strette, inibendone il rilascio nei pazienti con IBD e rafforzando la coesione epiteliale. Inoltre, stimola la produzione di muco da parte delle cellule caliciformi (goblet cells), migliorando lo strato mucoso e prevenendo la traslocazione di antigeni microbici nella lamina propria.

La carenza di vitamina D o un segnalamento alterato tramite il VDR aumenta la permeabilità intestinale, favorendo l'infiammazione e contribuendo all'esordio o all'aggravamento delle IBD. L'espressione di claudina-2, stimolata da molecole proinfiammatorie come TNF-α e IL-13, aumenta la permeabilità para-cellulare ed è positivamente correlata con l'attività della malattia.[107]

1.4.3 Ruolo della vitamina D nella disbiosi microbica nelle IBD

Nei pazienti con IBD si osserva una riduzione di specie batteriche benefiche e anti-infiammatorie, come *Faecalibacterium prausnitzii* e *Lactobacillus*, e una crescita eccessiva di patobionti come *Enterobacteriaceae* e *Fusobacterium*.

La vitamina D modula la composizione del microbiota intestinale, promuovendo batteri commensali che producono acidi grassi a catena corta (SCFA), come il butirrato, rinforzando la barriera epiteliale e riducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie. Inoltre, potenzia l'espressione di peptidi antimicrobici, tra cui catelicidina e β-defensine.

Una carenza di VDR non causa necessariamente la disbiosi, ma rende l'ospite più vulnerabile a stimoli infiammatori o ambientali, in linea con il modello del "secondo colpo" (second hit).[107]

1.4.4 Ruolo della vitamina D nel sistema immunitario nelle IBD

La vitamina D modula il sistema immunitario, riducendo le risposte pro-infiammatorie Th1 e Th17 — potenziate nel MC — e favorendo i linfociti T regolatori (Treg) e un profilo citochinico anti-infiammatorio. Nelle CU, Th2 è più coinvolto.

Essa sopprime i mediatori chiave dell'infiammazione, come TNF-α, IL-6, IL-17 e IFN-γ, mentre aumenta l'espressione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e TGF-β. Il VDR, espresso in monociti, macrofagi, cellule dendritiche, linfociti T e B e nelle ILC3, regola negativamente l'attività delle ILC3 e la produzione di citochine pro-infiammatorie. La vitamina D ostacola la maturazione delle cellule dendritiche, la proliferazione e differenziazione dei linfociti T e B, riducendo Th17 e favorendo Treg. Polimorfismi del VDR (es. ApaI, BglI, TaqI) sono associati a ridotta efficacia della supplementazione e a maggiore rischio di complicanze nelle IBD. Studi murini hanno mostrato che topi privi di VDR sviluppano colite più grave, con aumento dell'apoptosi delle cellule epiteliali e risposta Th1/Th17 esagerata.[107]

1.4.5 Supplementazione di vitamina D nei pazienti con IBD

Alla luce dell'elevata prevalenza di carenza di vitamina D nei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali, la supplementazione vitaminica è stata oggetto di crescente interesse come possibile strategia terapeutica adiuvante. Diversi studi clinici e trial randomizzati hanno valutato gli effetti della supplementazione di vitamina D sull'attività di malattia, sull'infiammazione sistemica e sulla qualità di vita nei pazienti con IBD.[136]

L'integrazione di vitamina D si è dimostrata efficace nel correggere la carenza sierica e, in alcuni studi, è stata associata a:

- riduzione dell'attività clinica della malattia;
- diminuzione dei livelli di marcatori infiammatori come PCR e calprotectina fecale;
- miglioramento degli indici di qualità di vita.[137]

Tuttavia, le evidenze recenti suggeriscono che la supplementazione a dosi più basse ma di durata più lunga potrebbe produrre effetti migliori sui livelli sierici di vitamina D rispetto a interventi brevi ad alte dosi.[138]

Nei pazienti con MC, la supplementazione è stata correlata a una riduzione del rischio di recidiva clinica e a un prolungamento della remissione clinica. Tuttavia, i risultati disponibili in letteratura risultano eterogenei a causa delle differenze nei dosaggi utilizzati, nella durata degli studi e nelle caratteristiche delle popolazioni analizzate.[136]

I meccanismi attraverso cui la vitamina D potrebbe esercitare effetti benefici nelle IBD includono:

- modulazione della risposta immunitaria, con riduzione delle risposte pro-infiammatorie Th1 e Th17 e aumento dei linfociti T regolatori (Treg);
- miglioramento dell'integrità della barriera epiteliale intestinale;
- modulazione della composizione del microbiota intestinale;
- potenziale aumento della risposta alle terapie biologiche, anche se servono ulteriori studi per confermare questo effetto.[137]

Gli studi clinici hanno utilizzato dosaggi variabili, che spaziano da 400 IU/die fino a 10.000 IU/die, sia come somministrazione quotidiana che intermittente ad alte dosi. La

variabilità dei protocolli di supplementazione, unita alla differente durata degli studi e alle caratteristiche dei pazienti, rappresenta un limite nel confronto diretto dei risultati.[137]

Nonostante le evidenze promettenti, non esiste ancora un consenso definitivo sul dosaggio ottimale di vitamina D nei pazienti con IBD. Le linee guida cliniche raccomandano generalmente:

- monitoraggio periodico dei livelli sierici di 25-idrossivitamina D;
- supplementazione nei soggetti carenti, con l'obiettivo di raggiungere valori considerati sufficienti per la popolazione generale.

Nei pazienti con malassorbimento intestinale o con carenze gravi, possono essere necessari dosaggi più elevati rispetto alla popolazione sana. Nel complesso, la supplementazione di vitamina D rappresenta un approccio sicuro, economico e potenzialmente efficace come terapia di supporto nelle IBD.[136]

È importante sottolineare che una quota significativa di pazienti con IBD presenta anche carenza di vitamina K, principalmente dovuta a restrizioni alimentari su verdure a foglia verde. La correzione della carenza di vitamina K potrebbe migliorare il metabolismo osseo e la modulazione immunitaria.[134]

Sono necessari ulteriori trial randomizzati ben controllati e studi con campioni ampi e standardizzati per definire con precisione i protocolli terapeutici ottimali e chiarire il reale impatto clinico della vitamina D sulla progressione della malattia.

2 SCOPO DELLA TESI

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (Inflammatory Bowel Diseases, IBD o MICI) rappresentano patologie immuno-mediate a crescente incidenza nei Paesi Occidentali, con un significativo impatto sulla qualità di vita dei pazienti.

Negli ultimi anni, numerose evidenze scientifiche hanno suggerito un possibile ruolo della vitamina D nella modulazione della risposta immunitaria e dei processi infiammatori coinvolti nella patogenesi di tali condizioni.

Alla luce di queste premesse, il presente studio si pone l'obiettivo principale di valutare i livelli sierici di vitamina D in una coorte di pazienti affetti da MICI, indagandone il ruolo non solo come classico immunomodulatore, ma esplorando la sua azione come potenziale fattore protettivo contro il danno cellulare ossidativo.

L'originalità di questa ricerca risiede nell'analisi della correlazione multidimensionale tra lo stato vitaminico, le caratteristiche cliniche della malattia e specifici marcatori di stress ossidativo proteico, rappresentati dai prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP).

Nello specifico, lo studio si prefigge di:

- Indagare se l'impatto della vitamina D (sia sul decorso clinico che sullo stress ossidativo) differisca tra il Morbo di Crohn e la Rettocolite Ulcerosa, alla luce delle loro diverse caratteristiche fisiopatologiche e dei pattern di coinvolgimento tissutale (infiammazione transmurale vs. superficiale).
- Analizzare come un'eventuale carenza di vitamina D si rifletta su altri parametri ematochimici e vitaminici, per determinare un quadro sistemico più completo del paziente.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Coorte di studio

Lo studio ha coinvolto un totale di 110 (63 M, 47 F) pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) in trattamento presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria "G. Martino" di Messina. La popolazione dello studio comprendeva 45 pazienti con morbo di Crohn (MC) (29 M,16 F), 18 con IBD indeterminata (IBD-U) (12 M, 6 F) e 47 con rettocolite ulcerosa (RCU) (22 M, 25 F). Tra questi, 85 pazienti erano in cura presso il reparto di Gastroenterologia Pediatrica, mentre i restanti 25 erano seguiti nel reparto Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali.

I dati sono stati raccolti a partire dal 15 settembre 2025. I campioni analizzati sono arrivati al laboratorio dell'Unità Operativa Semplice Dipartimentale di Biochimica Clinica in provette con gel separatore, e sono stati centrifugati per 5 minuti a 3.650 × g per ottenere il siero, dal quale sono state preparate aliquote destinate alle varie analisi specialistiche.

Lo studio è di natura osservazionale retrospettiva, basato su dati raccolti nell'ambito della normale gestione clinica dei pazienti.

In particolare, i parametri clinici e laboratoristici, inclusi i livelli di vitamina D, sono stati ottenuti da richieste effettuate dai medici durante il percorso diagnostico-terapeutico routinario.

Inoltre, su campioni sierici residui, precedentemente raccolti per finalità cliniche e opportunamente conservati, sono state eseguite analisi biochimiche aggiuntive a scopo di ricerca, senza richiedere ulteriori prelievi ai pazienti.

Tutti i dati sono stati trattati in forma anonima, garantendo la riservatezza dei pazienti e il rispetto delle normative vigenti in materia di protezione dei dati personali.

I pazienti inclusi nello studio dovevano soddisfare i seguenti criteri:

- diagnosi confermata di IBD, secondo criteri clinico-endoscopici e laboratoristici standard;
- età pediatrica o adulta, in base al reparto di riferimento (Gastroenterologia Pediatrica o Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali);
- disponibilità di dati clinici e laboratoristici completi, raccolti a partire dal 15 settembre 2025.

I criteri di esclusione comprendevano:

- assenza di dati clinici o laboratoristici fondamentali per lo studio (emocromo, VES, PCR, protidogramma o parametri biochimici);
- presenza di comorbidità significative che potessero influenzare i livelli di vitamina D (ad esempio insufficienza renale grave, patologie epatiche croniche, malattie metaboliche del calcio);
- trattamento con supplementi di vitamina D non documentato nei registri clinici.

Tali criteri hanno permesso di selezionare una coorte omogenea, rappresentativa della popolazione con IBD trattata presso l'Azienda Ospedaliera G. Martino di Messina, assicurando l'affidabilità dei dati raccolti e la validità delle analisi successive.

3.2 Determinazione della concentrazione sierica della vitamina D mediante LC-MS

La procedura analitica prevede:

- ricostituire i calibratori (Cal 0,1,2,3) e controlli (K1 e K2) per garantire l'accuratezza e la precisione della misura;
- preparare una miscela (150 µl) costituita da Standard Interno (IS) e Precipitante (in rapporto stechiometrico 2:1);
- pipettare 150 µl in una provetta di preparazione del campione e aggiungere 50 µl di calibratore, campione (siero), controllo;
- agitare mediante vortex mix per 30 sec.;
- incubare per 10 minuti a 4°C;
- agitare mediante vortex mix per 10 sec;
- centrifugare per 10 minuti a 10.000 × g.;
- prelevare il surnatante e trasferirlo in vial, pronti per l'inserimento nell'autocampionatore dello strumento LC-MS da cui preleva tramite iniettore 40 µl.

3.3 Determinazione dei livelli circolanti dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)

La determinazione dei livelli circolanti dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) è stata effettuata sui campioni sierici residui, precedentemente raccolti nell'ambito della pratica clinica routinaria e successivamente utilizzati per analisi di ricerca, senza richiedere ulteriori prelievi ai pazienti, mediante metodo colorimetrico secondo metodica basata sulla cloramina-T, utilizzando kit commerciale (Recipe). Gli AOPP rappresentano marker di stress ossidativo e consentono di stimare la quantità di proteine che hanno subito modificazioni ossidative a livello di specifici residui amminoacidici ad opera di specie reattive dell'ossigeno.

Il principio del metodo si basa sulla capacità degli AOPP di ossidare lo ioduro di potassio (KI) in ambiente acido, con formazione di un prodotto colorato quantificabile spettrofotometricamente. La concentrazione degli AOPP nei campioni è stata determinata mediante confronto con una curva di calibrazione costruita utilizzando le soluzioni standard di cloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonamide sale disodico).

Sono state preparate soluzioni stock di ioduro di potassio (KI) 1,16 M e cloramina-T 1 mM in acqua distillata. A partire dalla soluzione madre di cloramina-T sono stati allestiti sette standard a concentrazione finale compresa tra 20 µM e 400 µM per la costruzione della curva di taratura.

Il saggio è stato eseguito utilizzando una micropiastra a 96 pozzetti. Per la curva di calibrazione sono stati dispensati 200 µl di ciascuno standard e 10 µl di KI; per il bianco sono stati aggiunti 200 µl di PBS 1X e 10 µl di KI. I campioni di siero, precedentemente diluiti 1:5 in PBS, sono stati distribuiti in volume di 200 µl per pozzetto con aggiunta di 10 µl di KI.

La micropiastra è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente; successivamente sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico glaciale in ciascun pozzetto per arrestare la reazione. La lettura spettrofotometrica è stata effettuata mediante lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 340 nm.

I risultati sono stati espressi come µmol/L equivalenti di cloramina-T.

3.4 Determinazione della concentrazione proteica totale mediante metodo di Bradford

La determinazione della concentrazione proteica totale è stata effettuata mediante metodo colorimetrico di Bradford, utilizzando il reagente commerciale a base di Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad). Tale metodica si basa sul legame del colorante alle proteine, principalmente attraverso interazioni con residui basici e aromatici, con conseguente variazione dello spettro di assorbimento.

In ambiente acido, il colorante Coomassie presenta un massimo di assorbanza a 465 nm; in seguito al legame con le proteine, si verifica uno spostamento dello spettro con un massimo a 595 nm, proporzionale alla concentrazione proteica presente nel campione.

Per la costruzione della curva di calibrazione è stata utilizzata albumina sierica bovina (BSA) come standard, preparata a partire da una soluzione stock di concentrazione pari a 1,4 mg/mL. Sono state ottenute diluizioni seriali 1:2 per preparare standard a concentrazione finale di 0,7; 0,35; 0,175 e 0,0875 mg/mL.

Il saggio è stato eseguito utilizzando una micropiastra a 96 pozzetti. In ciascun pozzetto sono stati distribuiti 10 µL di bianco, di ciascun standard e campione. Il bianco è stato preparato utilizzando acqua distillata. I campioni di siero sono stati opportunamente diluiti (1:500) in acqua distillata.

Successivamente, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µL di reagente Biorad ed è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a una lunghezza d'onda di 595 nm.

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante confronto con una curva di calibrazione costruita riportando in ascissa le concentrazioni degli standard e in ordinata le corrispondenti assorbanze. I risultati sono stati espressi in mg/mL.

3.5 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS. Le variabili continue sono state riportate come media ± deviazione standard a fini descrittivi, mentre le variabili categoriche sono state espresse come frequenze assolute e percentuali. Poiché la distribuzione dei dati non risultava normale nei sottogruppi analizzati, come valutato

mediante test di normalità e ispezione grafica, per le analisi inferenziali sono stati impiegati test non parametrici. Il confronto tra due gruppi indipendenti è stato effettuato mediante test U di Mann-Whitney per le variabili continue e mediante test del χ^2 di Pearson per le variabili categoriche, ove appropriato.

In particolare, è stato eseguito un confronto tra pazienti con livelli sierici di vitamina D < 20 ng/mL e pazienti con livelli ≥ 20 ng/mL.

Le correlazioni tra i livelli di vitamina D e i parametri clinico-biochimici sono state valutate mediante coefficiente di correlazione di Spearman. Tali analisi sono state condotte sia sull'intero campione sia separatamente nei sottogruppi di pazienti con Morbo di Crohn e Rettocolite Ulcerosa.

Per identificare eventuali associazioni indipendenti, è stata eseguita un'analisi di regressione lineare multipla, utilizzando come variabile dipendente i livelli sierici di vitamina D e come variabili indipendenti i principali parametri clinicamente rilevanti selezionati sulla base delle analisi univariate. La collinearità tra le variabili è stata valutata mediante calcolo del Variance Inflation Factor (VIF).

Tutti i test statistici sono stati a due code e un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4 RISULTATI

4.1 Parametri biochimico-clinici dell'intera coorte di studio

Al fine di delineare il fenotipo clinico di base dei pazienti affetti da Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI) inclusi nello studio, i dati biochimici ed ematologici dell'intera coorte sono stati analizzati e suddivisi in base al loro significato fisiopatologico.

4.1.1 Quadro Ematologico e Coagulativo

La valutazione dell'emocromo ha evidenziato un quadro ematologico complessivamente compensato, seppur caratterizzato da un'alta variabilità intrinseca legata allo stato di attività della malattia nei singoli soggetti.

I parametri relativi alla linea rossa, quali Globuli Rossi (RBC), Emoglobina (Hb) ed Ematocrito (HCT), si sono attestati entro i limiti della norma, pur posizionandosi in prossimità del limite inferiore del range di riferimento. L'analisi degli indici corpuscolari, in particolare del Volume Corpuscolare Medio (MCV) e dell'Emoglobina Corpuscolare Media (MCH), suggerisce una tendenza alla microcitosi e all'ipocromia in una parte del campione.

Per quanto riguarda la linea bianca, il conteggio dei Globuli Bianchi (WBC) e la relativa formula leucocitaria sono risultati nei limiti della norma, con una distribuzione fisiologica delle sottopopolazioni cellulari. Al contrario, i livelli medi delle Piastrine (PLT) sono risultati superiori al limite massimo di riferimento, evidenziando una piastrinosi reattiva che riflette il background infiammatorio sistemico e lo stato di attivazione immunologica caratteristico della coorte in esame. (*Tabella 1)*

Tabella 1 *- Esame emocromocitometrico dei pazienti reclutati per lo studio*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
RBC (cell x 10^6/mm^3)	4,88±0,65	4,5-5,5
WBC (cell x 10^3/mm^3)	8,6±3,8	4,5-9,0
HB (g/dl)	12,50±1,92	12,0-18,0
HB %	78,29±12,08	
VALORE GLOBULARE	0,80±0,11	
HCT (%)	38,20±5,08	38,0-46,0
MCV (fL)	79,10±8,84	80-100
MCH (pg)	25,74±3,39	25-34
MCHC (%)	32,34±1,49	32,00-37,00
NEUTROFILI (%)	62,58±11,67	60-70
EOSINOFILI (%)	3,02±2,15	1,00-4,00
BASOFILI (%)	0,02±0,19	0-2
LINFOCITI (%)	28,82±10,54	20-35
MONOCITI (%)	5,56±0,96	4,00-8,00
PLT (cell x 10^5/mm^3)	3,6±1,23	1,5-3,5

4.1.2 Vitamina D

La concentrazione media della vitamina D nell'intera coorte si attestava nel range di riferimento, quindi in uno stato di sufficienza clinica ma vicino al limite inferiore del range di normalità. *(Tabella 2)*

***Tabella 2** - Vitamina D nella coorte*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
VITAMINA D (ng/mL)	27,09±10,87	20-79

4.1.3 Profilo Vitaminico B

La concentrazione media di acido folico si è attestata entro il range di riferimento, pur posizionandosi in prossimità del limite inferiore di normalità. Per quanto riguarda la vitamina B12, i valori medi hanno evidenziato uno stato di piena sufficienza clinica, collocandosi stabilmente all'interno dell'intervallo di normalità. *(Tabella 3)*

***Tabella 3** - Profilo Vitaminico del gruppo B*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
ACIDO FOLICO (ng/mL)	5,47±4,55	5,13-24,3
VITAMINA B12 (pg/mL)	414,67±235,50	192,00-827,00

4.1.4 Stato Marziale

In merito al profilo marziale, la sideremia media della coorte si è attestata entro il range di riferimento, pur posizionandosi in prossimità del limite inferiore di normalità. Anche i livelli di ferritina sono risultati complessivamente entro lo stato di sufficienza clinica, sebbene i dati abbiano evidenziato un'estrema variabilità tra i soggetti del campione. Per quanto riguarda la transferrina, i valori medi sono risultati stabilmente inseriti all'interno dell'intervallo di normalità, riflettendo un quadro di sostanziale equilibrio nel trasporto del ferro. *(Tabella 4)*

***Tabella 4** - Stato marziale*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
FERRITINA (ng/mL)	61,50±92,06	13-400
FERRO (SIDEREMIA) (ug/dL)	58,82±38,19	40-160
TRANSFERRINA (mg/dL)	289,75±56,79	200-360

4.1.5 Proteine Sieriche

Le concentrazioni medie delle proteine totali si sono attestate stabilmente entro l'intervallo di riferimento, riflettendo un quadro di generale equilibrio proteico nella coorte. Per quanto riguarda la frazione percentuale dell'albumina elettroforetica si è mantenuta entro l'intervallo di riferimento, pur posizionandosi in prossimità del limite inferiore del range di normalità. *(Tabella 5)*

Tabella 5 *- Proteine Sieriche*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
PROTEINE TOTALI (g/dL)	7,05±0,88	6,00-8,2
ALBUMINA (%)	56,33±5,52	55,8-66,1

4.1.6 Indici di Infiammazione e Stress Ossidativo

I marcatori sierici hanno confermato la presenza di un background infiammatorio sistemico, tipico delle MICI:

- La Proteina C Reattiva (PCR) ha registrato una concentrazione media superiore al limite massimo di normalità, indicando uno stato di flogosi attiva.
- La Velocità di Eritrosedimentazione (VES), pur mantenendosi mediamente entro il range di riferimento, ha mostrato un'ampia variabilità individuale.

Per quanto riguarda gli indici derivati:

- Il rapporto Neutrofili/Linfociti (NLR) si è attestato in prossimità del limite superiore del range, riflettendo la persistenza di uno stimolo infiammatorio.
- La valutazione dello stress ossidativo tramite il dosaggio dei prodotti avanzati di ossidazione proteica (AOPP) ha evidenziato valori medi marcatamente superiori alla soglia di riferimento. Tale dato, unitamente al rapporto AOPP/Proteine, conferma un significativo coinvolgimento del danno ossidativo cellulare all'interno della coorte. *(Tabella 6)*

Tabella 6 *- Indici di Infiammazione e stress ossidativo*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
VES	14,79±13,41	0-20
P.C.R. (mg/dL)	0,83±1,56	0,00-0,50
NLR (N/L)	2,82±2,16	1,00-3,00
CAR (PCR/ALB)	0,013±0,021	
AOPP ng/mL	146,82±90,78	<100
AOPP/Proteine (ng/mg)	399,20±2170,39	

4.1.7 Profilo Funzionale Epato-Biliare e Renale

La funzionalità degli organi emuntori e il metabolismo glicidico non hanno mostrato alterazioni macroscopiche a livello di medie campionarie. I livelli delle transaminasi (GOT-AST e GPT-ALT), della Gamma-GT e della Bilirubina Totale sono risultati stabilmente all'interno del range di normalità, indicando un quadro di generale assenza di tossicità epatica marcata nella coorte. *(Tabella 7)*

***Tabella 7** - Profilo funzionale Epato-biliare*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
GOT-AST (U/L)	22,37±8,47	0-42
GPT-ALT (U/L)	20,81±14,16	0-50
GGT (U/L)	19,92±35,57	0-50
BILIRUBINA TOT (mg/dL)	0,51±0,51	0,0-1,2

Allo stesso modo, i valori di Creatinina e Azotemia depongono per una funzionalità renale e una filtrazione glomerulare conservata. Il metabolismo glucidico basale è risultato nella norma, con livelli di Glucosio coerenti con uno stato di eustasia. Infine, il profilo elettrolitico relativo a Sodio, Potassio, Cloro e Calcio non ha evidenziato squilibri rilevanti, confermando un sostanziale equilibrio idrosalino e minerale nel campione in esame. *(Tabella 8)*

Tabella 8 *- Profilo funzionale renale*

VARIABILI	MEDIA ± DS	INTERVALLO DI RIFERIMENTO
CREATININA (mg/dL)	0,67±0,82	0,5-1,2
AZOTEMIA (mg/dL)	29,57±13,16	10,00-50,00
GLUCOSIO (mg/dL)	83,93±14,34	65-110
SODIO (mmol/L)	138,75±2,13	134-145
POTASSIO (mmol/L)	4,35±0,44	3,5-5,2
CLORO (mg/dL)	102,08±2,59	98-110
CALCIO (mg/dL)	9,36±0,51	8,2-10,4

4.2 Confronto dei parametri biochimici e nutrizionali tra pazienti con Rettocolite Ulcerosa (RCU) e Morbo di Crohn (MC)

Al fine di indagare le differenze nei parametri nutrizionali, infiammatori e metabolici, la popolazione è stata successivamente suddivisa in due sottogruppi in base alla diagnosi clinica: pazienti con Rettocolite Ulcerosa (RCU, n = 47) e pazienti con Morbo di Crohn (MC, n = 45). Essendo la distribuzione delle variabili non normale, l'analisi inferenziale è stata condotta utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney e i risultati sono espressi prevalentemente come media e deviazione standard (SD).

4.2.1 Stato della Vitamina D

L'obiettivo primario dell'analisi era valutare lo stato della vitamina D nei due sottogruppi della coorte. Il confronto tra i pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa (RCU)

e quelli con Malattia di Crohn (MC) non ha mostrato differenze statisticamente significative nei livelli sierici della vitamina.

In entrambi i gruppi, i valori medi si sono attestati su livelli sovrapponibili, indicando che la tipologia di patologia infiammatoria intestinale non sembra influenzare in modo differente lo stato di sufficienza clinica della vitamina D nel campione esaminato. Il valore di p superiore alla soglia critica conferma l'assenza di una discrepanza rilevante tra le due sottopopolazioni. *(Tabella 9)*

***Tabella 9** - Confronto dello status della vitamina D tra RCU e MC*

VARIABILE	GRUPPO	N° PZ	MEDIA ± DS
Vitamina D (ng/mL)	RCU	47	28,4±11,83
Vitamina D (ng/mL)	Crohn	45	25,9±7,81

4.2.2 Parametri nutrizionali e di assorbimento

Per quanto concerne l'Acido Folico, l'analisi comparativa ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di studio. I pazienti affetti da Malattia di Crohn hanno presentato livelli medi sensibilmente inferiori rispetto ai soggetti con Rettocolite Ulcerosa.

Il valore di p ottenuto conferma che la riduzione dei livelli di folati nel gruppo Crohn non è ascrivibile al caso, suggerendo una maggiore suscettibilità a stati di carenza o malassorbimento in questo specifico sottogruppo di pazienti rispetto alla coorte RCU. *(Tabella 10)*

Tabella 10 *- Confronto dei parametri nutrizionali e di assorbimento tra RCU e MC*

VARIABILE	GRUPPO	N° PZ	MEDIA ± DS
Acido Folico (ng/mL)	RCU	42	5,94±5,46
Acido Folico (ng/mL)	Crohn	40	4,8±3,77

4.2.3 Indici di infiammazione

L'analisi dei marker sistemici di infiammazione ha evidenziato valori significativamente più elevati nel gruppo con Morbo di Crohn. Nello specifico, la Proteina C Reattiva (PCR) è risultata sensibilmente superiore nel gruppo MC, dato confermato da una differenza statisticamente significativa. Tale tendenza è corroborata dall'analisi elettroforetica, che ha mostrato livelli di β-2 Globuline significativamente maggiori nei pazienti con Crohn. Infine, anche gli indici derivati, come il rapporto PCR/Albumina (CAR), sono risultati significativamente maggiori nel gruppo MC al test di Mann-Whitney, consolidando l'ipotesi di un carico infiammatorio sistemico più severo in questa sottopopolazione rispetto ai soggetti con RCU. *(Tabella 11)*

Tabella 11 *- Confronto degli indici di infiammazione tra RCU e MC*

VARIABILE	GRUPPO	N° PZ	MEDIA ± DS
PCR (mg/dL)	RCU	46	0,85±2,05
PCR (mg/dL)	Crohn	43	0,9±1,13
β-2 Globuline (%)	RCU	47	5,03±0,88
β-2 Globuline (%)	Crohn	45	5,63±1,35
CAR (PCR/Albumina)	RCU	36	0,007±0,014
CAR (PCR/Albumina)	Crohn	32	0,019 ±0,026

4.2.4 Indici nutrizionali e di trasporto

L'analisi della Transferrina ha evidenziato livelli medi superiori nei pazienti affetti da Malattia di Crohn rispetto a quelli con Rettocolite Ulcerosa, suggerendo una differente modulazione del trasporto marziale tra le due condizioni.

Particolare rilevanza clinica ha assunto l'analisi del rapporto vitamina D/Proteina C Reattiva (D/PCR), che ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra le due coorti. Nello specifico, il gruppo con Malattia di Crohn ha registrato un rapporto marcatamente più basso rispetto ai pazienti con RCU; tale dato riflette la combinazione di una maggiore attività infiammatoria e di livelli di vitamina D tendenzialmente più contenuti nel sottogruppo MC. *(Tabella 12)*

***Tabella 12** - Confronto degli indici nutrizionali e di trasporto tra RCU e MC*

VARIABILE	GRUPPO	N° PZ	MEDIA ± DS
Transferrina (mg/dL)	RCU	34	272,17±50,53
Transferrina (mg/dL)	Crohn	33	302,69±65,11
Rapporto D/PCR	RCU	46	188,91±147,32
Rapporto D/PCR	Crohn	42	126,14±127,03

4.2.5 Parametri enzimatici e metabolici

L'analisi dei parametri enzimatici sierici e metabolici non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i due sottogruppi di malattia. I livelli di Colinesterasi, Amilasi Pancreatica e dell'enzima CK-MB sono risultati sovrapponibili tra i pazienti con Morbo di Crohn e quelli con Rettocolite Ulcerosa, confermando l'assenza di alterazioni enzimatiche specifiche legate al fenotipo clinico della IBD.

Analogamente, la valutazione della funzionalità renale tramite il dosaggio dell'Azotemia ha mostrato un andamento comparabile e privo di discrepanze rilevanti tra le due coorti. Tali evidenze indicano un profilo metabolico ed enzimatico basale conservato, che appare indipendente dalla specifica diagnosi e riflette una sostanziale stabilità funzionale degli organi emuntori e delle ghiandole annesse in entrambi i gruppi esaminati. *(Tabella 13)*

Tabella 13 *- Confronto dei parametri enzimatici e metabolici tra RCU e MC*

VARIABILE	GRUPPO	N° PZ	MEDIA ± DS
Colinesterasi (U/L)	RCU	44	7566,41±1881,94
Colinesterasi (U/L)	Crohn	42	9801,43±12636,1
CK-MB (U/L)	RCU	47	13,6±7
CK-MB (U/L)	Crohn	45	13,07±4,91
Amilasi Pancreatica (IU/L)	RCU	36	31,92±32,86
Amilasi Pancreatica (IU/L)	Crohn	33	27,39±11,05
Azotemia (mg/dL)	RCU	47	28,23±15,4
Azotemia (mg/dL)	Crohn	45	30,11±11,71

4.3 Valutazione della distribuzione del sesso e della vitamina D tramite test Chi-quadrato di Pearson

In merito alle caratteristiche demografiche del campione, è stata valutata la distribuzione per il sesso in relazione alla specifica patologia infiammatoria cronica intestinale (Rettocolite Ulcerosa vs Morbo di Crohn). Nel gruppo RCU si è osservata una lieve prevalenza femminile (25 femmine, 52,2%; 22 maschi, 47,8%), mentre il gruppo MC ha mostrato una maggioranza maschile (16 femmine, 35,6%; 29 maschi, 64,4%).

Il test statistico del Chi-quadrato di Pearson ha dimostrato che questa differenza nella distribuzione di genere non è risultata statisticamente significativa ($p = 0,110$). Pertanto, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nella ripartizione di genere tra le due coorti di malattia.

Per quanto riguarda lo stato della vitamina D i pazienti sono stati analizzati in base allo stato dei livelli sierici di vitamina D, categorizzati in base al cut-off 20 ng/mL e l'analisi non ha evidenziato alcuna associazione statisticamente significativa tra la specifica diagnosi di IBD e lo stato della vitamina D (p = 0,384).

4.4 Analisi di correlazione

4.4.1 Correlazione tra i livelli sierici di Vitamina D e parametri clinico-laboratoristici

Per valutare la relazione tra i livelli sierici di vitamina D (espressi in ng/mL) e gli indici ematologici, infiammatori e nutrizionali dei pazienti in esame, è stato utilizzato il test di correlazione per ranghi di Spearman.

L'analisi ha evidenziato una correlazione inversa e statisticamente significativa tra i livelli di vitamina D e diversi marker di infiammazione sistemica di derivazione cellulare. In particolare, è emersa una forte correlazione negativa con la conta piastrinica (PLT) (rho = -0,320; p = 0,001), suggerendo che a livelli inferiori di vitamina D si associ una tendenza alla trombocitosi. Coerentemente con questo dato, la vitamina D ha mostrato una correlazione negativa significativa anche con il numero totale di globuli bianchi (WBC) (rho = -0,226; p = 0,018).

Analizzando i rapporti tra le linee cellulari, considerati validi biomarcatori di flogosi sistemica nelle IBD, si è osservata una correlazione inversa significativa sia con il rapporto Piastrine/Linfociti (PLR) (rho = -0,221; p = 0,020), sia con il rapporto Piastrine/Neutrofili (rho = -0,269; p = 0,005). Al contrario, non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra i livelli di vitamina D e gli indici di flogosi della fase acuta, quali la Proteina C Reattiva (PCR) (rho = -0,097; p = 0,322) e la Velocità di Eritrosedimentazione (VES) (rho = -0,071; p = 0,459).

Per quanto concerne l'assetto nutrizionale e biochimico, i dati hanno rivelato una correlazione positiva altamente significativa tra i livelli di vitamina D e le concentrazioni sieriche di Acido Folico (rho = 0,289; p = 0,004). Infine, è stata riscontrata una debole correlazione positiva con la Bilirubina diretta (rho = 0,198; p = 0,038).

4.4.2 Correlazioni tra i principali biomarcatori ematochimici e indici di malattia

Per approfondire il quadro clinico sistemico dei pazienti in esame, l'analisi di correlazione per ranghi di Spearman è stata estesa ai principali biomarcatori dell'infiammazione e del metabolismo. Relativamente all'asse dell'infiammazione di fase acuta, i dati hanno confermato una marcata coerenza biologica. Si è osservata una correlazione positiva molto forte tra la Proteina C Reattiva (PCR) e il Fibrinogeno (rho = 0,734; $p < 0,001$). Entrambi i parametri hanno mostrato, inoltre, una forte correlazione positiva con la Velocità di Eritrosedimentazione (VES) (rispettivamente rho = 0,583 e rho = 0,632; $p < 0,001$). Coerentemente con il suo ruolo di proteina di fase acuta negativa, l'Albumina ha evidenziato una forte correlazione inversa sia con la PCR (rho = -0,630; $p < 0,001$) sia con la VES (rho = -0,588; $p < 0,001$). Al contrario, le α-1 Globuline, banda in cui migrano note proteine di fase acuta positiva, hanno correlato positivamente con la PCR (rho = 0,645; $p < 0,001$).

Analizzando l'assetto ematologico e il metabolismo marziale, i risultati hanno documentato le alterazioni tipicamente associate all'anemia da infiammazione cronica. Il ferro (sideremia) ha mostrato una forte correlazione positiva con l'Ematocrito (HCT) (rho = 0,558; $p < 0,001$) e l'Emoglobina (HB) (rho = 0,628; $p < 0,001$), indicando uno stretto legame tra ferro circolante e massa eritrocitaria, la quale a sua volta ha correlato positivamente con la Transferrina (rho = 0,312; $p = 0,004$). Risulta di particolare rilevanza clinica la correlazione negativa emersa tra il ferro (sideremia) e i marker di flogosi sistemica, specificamente PCR (rho = -0,447; $p < 0,001$) e VES (rho = -0,507; $p < 0,001$), a conferma del sequestro marziale indotto dallo stato infiammatorio.

Per quanto concerne l'asse infiammatorio cellulare, si è osservata una correlazione positiva tra la conta dei globuli bianchi (WBC) e le piastrine (PLT) (rho = 0,313; $p = 0,001$), suggestiva di una concomitante reattività midollare. All'interno della formula leucocitaria è emersa una significativa correlazione inversa tra i globuli bianchi totali e gli eosinofili (rho = -0,422; $p < 0,001$). Sul versante epatico e metabolico, sono state confermate le fisiologiche correlazioni positive tra gli indici di citolisi, GOT e GPT (rho = 0,505; $p < 0,001$), e tra gli indici di colestasi, GGT e ALP (rho = 0,361; $p < 0,001$). Inoltre, si è riscontrata una forte correlazione positiva tra l'Albumina e il Calcio sierico

(rho = 0,606; p < 0,001), in linea con la fisiologica quota di trasporto protidico di quest'ultimo.

4.4.3 Analisi dello stress ossidativo: Prodotti Avanzati di Ossidazione Proteica (AOPP)

Un'ulteriore sezione dell'analisi è stata dedicata alla valutazione dello stress ossidativo mediante il dosaggio sierico delle AOPP. In relazione all'obiettivo primario dello studio, non è emersa alcuna associazione statisticamente significativa tra i livelli di AOPP e la vitamina D (rho = -0,028; p = 0,773), suggerendo che l'ossidazione proteica nel plasma proceda in modo indipendente rispetto allo stato vitaminico. Si sono invece osservate correlazioni positive significative tra le AOPP e i principali bersagli dell'ossidazione plasmatica, ovvero l'Albumina sierica (rho = 0,273; p = 0,012) e le ɣ-Globuline (rho = 0,268; p = 0,005). Infine, i livelli di AOPP hanno mostrato una correlazione positiva con gli indici di massa eritrocitaria, quali i globuli rossi (RBC) (rho = 0,371; p < 0,001), l'Ematocrito (rho = 0,259; p = 0,006) e l'Emoglobina (rho = 0,225; p = 0,018), nonché con gli elettroliti sierici, in particolare Potassio (rho = 0,359; p < 0,001) e Calcio (rho = 0,344; p < 0,001).

4.4.4 Correlazioni dei livelli sierici della vitamina D nel gruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn

Per valutare la relazione tra i livelli sierici di vitamina D e i parametri clinico-laboratoristici nei pazienti affetti da Morbo di Crohn, è stata eseguita un'analisi di correlazione non parametrica utilizzando il coefficiente Rho di Spearman.

L'analisi ha evidenziato diverse associazioni statisticamente significative tra lo stato vitaminico D e i marcatori di infiammazione sistemica. In particolare, è emersa una correlazione inversa e significativa tra i livelli di vitamina D e la conta piastrinica (Rho = -0,386; p = 0,009). Tale associazione inversa è stata confermata in modo ancora più marcato nell'analisi dei rapporti cellulari infiammatori, mostrando una forte correlazione negativa con il rapporto Piastrine/Linfociti, o PLR (Rho = -0,412; p = 0,005) e con il parametro PNR (Rho = -0,313; p = 0,037). La correlazione diretta con i livelli assoluti di

Proteina C Reattiva (PCR) non ha raggiunto la significatività statistica, mostrando solo un trend (Rho = -0,281; p = 0,068).

Per quanto concerne il profilo protidico e lo stato nutrizionale, i livelli di vitamina D si sono correlati positivamente con la percentuale di Albumina sierica (Rho = 0,299; p = 0,046) e con il rapporto Albumina/Globuline (Rho = 0,298; p = 0,046). Coerentemente, è stata riscontrata una correlazione inversa tra vitamina D e la frazione delle α-1 Globuline (Rho = -0,303; p = 0,043).

Infine, l'analisi dei parametri metabolici ha mostrato correlazioni positive e significative tra i livelli di vitamina D e l'Azotemia (Rho = 0,423; p = 0,004), nonché con i livelli di Bilirubina Totale (Rho = 0,303; p = 0,043). Non sono emerse correlazioni significative con gli altri parametri esaminati, inclusi il calcio sierico, l'emoglobina e i restanti indici infiammatori come la VES (p = 0,369).

4.4.5 Correlazioni nel gruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn

Per caratterizzare in dettaglio il fenotipo clinico e laboratoristico del sottogruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn, è stata condotta un'analisi mirata delle correlazioni. I risultati hanno confermato la robusta concordanza della classica triade dell'infiammazione, evidenziando una forte correlazione positiva tra la Velocità di Eritrosedimentazione (VES) e la Proteina C Reattiva (PCR) (rho = 0,591; p < 0,001). Entrambi gli indici hanno mostrato un'associazione molto forte con il Fibrinogeno, sia per la VES (rho = 0,726; p < 0,001) sia per la PCR (rho = 0,714; p < 0,001). Parallelamente, i dati hanno restituito una chiara evidenza del fenomeno dell'anemia da malattia cronica, tipicamente indotta dal blocco dell'eritropoiesi in corso di grave flogosi. L'Emoglobina (HB) ha infatti mostrato una correlazione inversa fortissima con la VES (rho = -0,817; p < 0,001) e correlazioni inverse significative sia con il Fibrinogeno (rho = -0,569; p < 0,001) sia con la PCR (rho = -0,399; p = 0,008), confermando che all'aumentare del burden infiammatorio corrisponde un progressivo declino della massa eritrocitaria.

L'impatto dello stato infiammatorio sistemico si è riflesso coerentemente anche sul profilo proteico, confermando l'inversione della sintesi epatica tipica della fase acuta. Utilizzando la PCR come indice di riferimento per l'attività di malattia, è emersa una

significativa correlazione inversa con l'Albumina (rho = -0,590; p < 0,001), contrapposta a una forte correlazione positiva con le proteine di fase acuta, in particolare le α-1 Globuline (rho = 0,673; p < 0,001) e le α-2 Globuline (rho = 0,581; p < 0,001). Anche i più recenti biomarcatori cellulari hanno confermato la loro efficacia nel definire l'entità della flogosi in questo specifico sottogruppo. Il rapporto Piastrine/Linfociti (PLR) ha correlato positivamente in maniera forte con la VES (rho = 0,518; p < 0,001) e significativamente con la PCR (rho = 0,379; p < 0,05). In maniera del tutto analoga, il rapporto Neutrofili/Linfociti (NLR) ha mostrato un'associazione significativa sia con la VES (rho = 0,518; p < 0,001) sia con la PCR (rho = 0,391; p = 0,010).

Infine, l'analisi dello stress ossidativo, ristretta al gruppo dei pazienti con Morbo di Crohn, ha evidenziato peculiari associazioni tra i livelli sierici di Prodotti Avanzati di Ossidazione Proteica (AOPP), l'assetto coagulativo e le componenti proteiche. Nello specifico, le AOPP hanno mostrato una correlazione positiva molto significativa con i parametri della via intrinseca della coagulazione, in particolare con l'APTT valutato sia in secondi (rho = 0,408; p = 0,005) sia come ratio (rho = 0,411; p = 0,005). Coerentemente con la loro natura di marcatori di danno ossidativo a carico dei protidi, si è inoltre riscontrata una correlazione positiva molto significativa tra le concentrazioni di AOPP e le Proteine Totali (rho = 0,408; p = 0,005), nonché con la frazione elettroforetica delle ɣ-Globuline (rho = 0,373; p = 0,012).

4.4.6 Correlazioni tra i livelli sierici della vitamina D nel gruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa

Al fine di valutare la potenziale associazione tra lo stato vitaminico D e il profilo ematochimico nel sottogruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa (RCU), è stata condotta un'analisi bivariata. Per quanto concerne il quadro ematologico, i livelli sierici di vitamina D hanno mostrato una correlazione inversa e statisticamente significativa con gli indici eritrocitari, in particolare con il Volume Corpuscolare Medio (MCV) (rho = -0,379; p = 0,009), il Contenuto Corpuscolare Medio di Emoglobina (MCH) (rho = -0,347; p = 0,018) e il Valore Globulare (rho = -0,353; p = 0,016). Dal punto di vista nutrizionale e di assorbimento, è emersa una correlazione positiva significativa tra i livelli di vitamina D e la concentrazione sierica di Acido Folico (rho = 0,337; p = 0,029). Relativamente al

quadro proteico e infiammatorio, non sono state riscontrate associazioni significative con i marker classici quali VES (rho = -0,024; p = 0,875) e PCR (rho = 0,135; p = 0,371), sebbene si sia osservata una correlazione positiva significativa con la frazione delle α-2 Globuline (rho = 0,377; p = 0,010). Infine, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa con i livelli di calcemia (rho = -0,127; p = 0,400).

4.4.7 Correlazioni nel gruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa

Allargando l'analisi all'intero pannello infiammatorio e metabolico, i dati hanno confermato le marcate alterazioni associate alla risposta di fase acuta tipiche della flogosi severa. I principali marker sistemici hanno evidenziato una forte correlazione positiva tra loro, in particolare tra PCR e VES (rho = 0,585; p = 0,003) e tra PCR e Fibrinogeno (rho = 0,695; p < 0,001). Di contro, coerentemente con l'instaurarsi di una potenziale enteropatia protido-disperdente, l'Albumina sierica (proteina di fase acuta negativa) ha mostrato un calo significativo all'aumentare dell'infiammazione, correlando in modo fortemente inverso sia con la PCR (rho = -0,607; p < 0,001) sia con la VES (rho = -0,549; p < 0,001). Anche i biomarcatori cellulari emergenti hanno trovato riscontro clinico, con il rapporto Neutrofili/Linfociti (NLR) positivamente correlato alla PCR (rho = 0,386; p = 0,008). Sul versante del metabolismo marziale, specchio delle complicanze anemiche della malattia, si è documentata una correlazione inversa tra Ferritina e Transferrina (rho = -0,420; p = 0,013) e una correlazione positiva tra Emoglobina e Transferrina (rho = 0,525; p = 0,001). A ulteriore garanzia di coerenza biologica del dataset analizzato, sono state rilevate le fisiologiche correlazioni positive tra gli indici di funzionalità epatica (GOT e GPT: rho = 0,568; p < 0,001), pancreatica (Amilasi e Lipasi: rho = 0,633; p < 0,001) e renale (Azotemia e Creatinina: rho = 0,598; p < 0,001), oltre a una perfetta correlazione inversa tra Attività Protrombinica (PT) e INR (rho = -0,992; p < 0,001).

L'indagine sui Prodotti Avanzati di Ossidazione Proteica (AOPP) nel sottogruppo RCU ha rivelato un peculiare pattern associativo con lo stato nutrizionale ed emopoietico del paziente. È emersa una solida correlazione positiva tra gli AOPP e i parametri della serie rossa, segnatamente Ematocrito (rho = 0,495; p < 0,001), Emoglobina (rho = 0,477; p =

0,001) e conta eritrocitaria (rho = 0,452; p = 0,002), affiancata da una correlazione positiva con la sideremia (rho = 0,335; p = 0,032). Relativamente al profilo proteico e ionico, i livelli di AOPP hanno mostrato un'associazione positiva con le Proteine Totali (rho = 0,382; p = 0,010), l'Albumina (rho = 0,333; p = 0,047), la calcemia (rho = 0,537; p < 0,001) e la bilirubina totale (rho = 0,360; p = 0,014). Esaminando gli indici di flogosi sistemica, gli AOPP hanno mostrato una correlazione inversa e statisticamente significativa con la VES (rho = -0,365; p = 0,013), mentre non è stata riscontrata alcuna associazione di rilievo con la PCR (rho = 0,049; p = 0,747) o con i livelli sierici di vitamina D. Tali evidenze suggeriscono che la quantificazione assoluta degli AOPP sia strettamente dipendente dall'ampiezza del pool proteico circolante, che risulta fisiologicamente ridotto nei pazienti con maggiore attività di malattia a causa della deplezione del substrato ossidabile.

4.4.8 Analisi stratificata per cut-off di Vitamina D nel Morbo di Crohn

Per approfondire l'impatto clinico dell'ipovitaminosi, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base al cut-off diagnostico di carenza di vitamina D (< 20 ng/mL). L'analisi comparativa mediante test U di Mann-Whitney ha rivelato che, nella coorte con Morbo di Crohn, lo stato di carenza si associa in modo significativo a un profilo laboratoristico spiccatamente più infiammatorio. In particolare, nel gruppo carente si è osservato un aumento significativo della Proteina C Reattiva (1,56 vs 0,70 mg/dL; p = 0,019) e del Fibrinogeno funzionale (391,8 vs 324,7 mg/dL; p = 0,021), accompagnato da una speculare riduzione della frazione elettroforetica dell'Albumina sierica (51,3% vs 56,7%; p = 0,022) e da un incremento delle α-1 Globuline (5,71% vs 4,40%; p = 0,003). Anche gli indici derivati dalla formula leucocitaria hanno mostrato un burden flogistico superiore nei pazienti carenti, con valori significativamente più alti della percentuale di Neutrofili (66,3% vs 59,5%; p = 0,037), del rapporto Neutrofili/Linfociti (NLR: 3,00 vs 2,21; p = 0,040) e del rapporto Piastrine/Linfociti (PLR: 19042 vs 12137; p = 0,003).

4.4.9 Analisi stratificata per cut-off di Vitamina D nella Rettocolite Ulcerosa

L'applicazione del medesimo cut-off di carenza (< 20 ng/mL) al sottogruppo di pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa ha delineato un quadro clinico differente. A differenza di quanto osservato nel Morbo di Crohn, la stratificazione per vitamina D non ha rivelato un impatto statisticamente significativo sui classici indici di flogosi acuta, quali PCR e Fibrinogeno ($p > 0,05$). L'ipovitaminosi D si è invece associata a marcate alterazioni del profilo metabolico ed ematologico. I pazienti con RCU e carenza di vitamina D hanno presentato livelli sierici di Acido Folico drasticamente inferiori rispetto ai soggetti con livelli sufficienti (2,76 vs 6,46 ng/mL; $p = 0,044$). Dal punto di vista eritrocitario, il gruppo carente ha mostrato una chiara tendenza alla macrocitosi, documentata da incrementi statisticamente significativi del Volume Corpuscolare Medio (MCV: 85,6 vs 76,9 fL; $p = 0,003$), del Contenuto Emoglobinico Medio (MCH: 28,3 vs 24,9 pg; $p = 0,006$) e del Valore Globulare ($p = 0,005$).

4.4.10 Valutazione dello stress ossidativo (AOPP) in funzione del cut-off di Vitamina D

Per quanto riguarda i pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa, l'analisi dei marcatori di stress ossidativo è stata stratificata in base al cut-off diagnostico di carenza di vitamina D (< 20 ng/mL). I dati descrittivi non hanno evidenziato differenze di rilievo tra le due categorie: sia i livelli sierici assoluti di AOPP (144,57 ± 80,52 ng/mL nei carenti vs 140,98 ± 83,55 ng/mL nei sufficienti), sia il rapporto AOPP/Proteine (209,01 ± 243,29 nei carenti vs 171,14 ± 115,06 nei sufficienti) sono risultati sostanzialmente sovrapponibili.

A ulteriore conferma dell'indipendenza tra queste due variabili nel gruppo RCU, l'analisi di correlazione per ranghi di Spearman non ha rilevato alcuna associazione statisticamente significativa tra i livelli sierici continui di vitamina D e il rapporto AOPP/Proteine ($rho = 0,108$; $p = 0,480$).

Al contrario, nel gruppo di pazienti affetti da Morbo di Crohn, l'indagine ha rivelato un quadro differente e di significativa rilevanza per quanto concerne il danno ossidativo.

I pazienti che presentavano una carenza di vitamina D hanno mostrato valori medi del rapporto AOPP/Proteine marcatamente e significativamente più elevati rispetto ai pazienti con uno stato vitaminico sufficiente (271,31 ± 194,62 vs 159,43 ± 90,38; p = 0,043). Questa evidenza è stata pienamente confermata dall'analisi bivariata: il test di Spearman ha infatti documentato una correlazione inversa e statisticamente significativa tra i livelli di vitamina D e il rapporto AOPP/Proteine (rho = -0,306; p = 0,043). Tali risultati suggeriscono che, in modo specifico per il fenotipo del Morbo di Crohn, il decremento dei livelli sierici di vitamina D sia associato a un concomitante e significativo incremento dello stress ossidativo a carico del pool proteico circolante.

5 DISCUSSIONE

Le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI), comprendenti principalmente il Morbo di Crohn (MC) e la Rettocolite Ulcerosa (RCU), non vengono definite unicamente come patologie localizzate al tratto gastrointestinale, ma come patologie sistemiche complesse caratterizzate da una complessa interazione tra predisposizione genetica, disfunzione del sistema immunitario, alterazioni del microbiota intestinale e fattori ambientali.[110,123] Tale condizione si traduce in un cronico stato pro-infiammatorio e pro-ossidativo, associato a un profondo sovvertimento dell'assetto nutrizionale e metabolico del paziente.[106]

Negli ultimi anni, numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato come la vitamina D non svolga esclusivamente un ruolo nell'omeostasi fosfo-calcica, ma agisca come un vero e proprio ormone pleiotropico dotato di proprietà immunomodulanti, antinfiammatorie e regolatorie sul sistema immune innato e adattativo. In particolare, livelli ridotti di vitamina D sono stati associati a maggiore attività di malattia, aumentato rischio di recidiva e peggior prognosi clinica nei pazienti affetti da MICI, suggerendo un suo coinvolgimento attivo nella modulazione della flogosi intestinale.[132]

Alla luce di tali premesse, il presente studio si è proposto di valutare l'associazione tra lo stato vitaminico D e i principali parametri ematologici, nutrizionali, infiammatori e ossidativi in una coorte iniziale di 110 pazienti affetti da IBD. Ai fini dell'analisi comparativa tra i due principali fenotipi clinici, sono stati considerati 92 soggetti, suddivisi in 45 pazienti con Morbo di Crohn e 47 pazienti con Rettocolite Ulcerosa, escludendo i casi classificati come IBD-U.

Un primo dato metodologicamente rilevante riguarda l'omogeneità demografica del campione. L'assenza di una differenza statisticamente significativa nella distribuzione per sesso tra i pazienti con RCU e quelli con Morbo di Crohn conferma il bilanciamento delle due coorti. Sapendo che i fattori ormonali legati al sesso possono teoricamente influenzare il metabolismo osseo e vitaminico, questa omogeneità ci consente di affermare con maggiore sicurezza che le alterazioni dei livelli di vitamina D indagate siano da attribuire alle dinamiche fisiopatologiche della malattia stessa, piuttosto che a uno sbilanciamento legato al sesso.

Una valutazione iniziale dei parametri ematochimici nell'intera popolazione ha evidenziato un quadro complessivamente compensato, ma caratterizzato da segni compatibili con uno stato infiammatorio cronico di basso-moderato grado.

Sebbene i livelli medi di vitamina D rientrassero formalmente nel range di sufficienza clinica, essi risultavano prossimi al limite inferiore della norma, suggerendo una diffusa condizione di insufficienza subclinica nella popolazione studiata. Tale osservazione è coerente con quanto riportato in letteratura, dove l'ipovitaminosi D rappresenta una condizione estremamente frequente nei pazienti con MICI, indipendentemente dalla forma clinica.

Uno dei risultati centrali del presente lavoro è rappresentato dall'assenza di differenze statisticamente significative nei livelli assoluti di vitamina D tra i pazienti con MC e quelli con RCU ($p = 0,384$). Questo dato, apparentemente inatteso, considerando il maggiore rischio di malassorbimento ileale tipico del Morbo di Crohn, suggerisce che il deficit vitaminico nelle MICI non sia spiegabile esclusivamente con meccanismi di ridotto assorbimento intestinale, ma rappresenti piuttosto un tratto trasversale legato allo stato infiammatorio cronico sistemico. È plausibile che fattori condivisi, quali aumentato consumo periferico da parte delle cellule immunitarie attivate, alterata attivazione metabolica della vitamina e modificazioni del microbiota intestinale, contribuiscano in maniera sostanziale a tale fenomeno.[105]

Nonostante la sovrapponibilità dei livelli sierici assoluti di vitamina D, i due fenotipi di malattia hanno mostrato profili biologici profondamente differenti. Il Morbo di Crohn si è distinto per un fenotipo infiammatorio sistemicamente più aggressivo, caratterizzato da valori significativamente più elevati di PCR, β-2 globuline e CAR rispetto alla RCU. Tale risultato è coerente con la fisiopatologia del MC, nel quale l'infiammazione transmurale interessa l'intero spessore della parete intestinale, determinando una risposta sistemica più intensa rispetto alla flogosi superficiale tipica della Rettocolite Ulcerosa.[117]

Parallelamente, i pazienti con Morbo di Crohn hanno mostrato livelli significativamente inferiori di Acido Folico, dato interpretabile alla luce del frequente coinvolgimento dell'intestino tenue prossimale e del malassorbimento cronico tipico della patologia. Anche i livelli di Transferrina sono risultati significativamente superiori nel gruppo Crohn. Tale dato potrebbe riflettere una risposta compensatoria al disordine del metabolismo marziale, verosimilmente legata alla diversa entità delle perdite

ematiche intestinali e all'alterata regolazione delle proteine della fase acuta. I livelli medi di Colinesterasi, Amilasi Pancreatica e CK-MB sono risultati invece sovrapponibili nei due gruppi.

Di particolare interesse clinico è risultata la differenza osservata nel rapporto vitamina D/PCR (D/PCR), significativamente ridotto nel Morbo di Crohn rispetto alla RCU (126,14 vs 188,91). Questo indice appare particolarmente promettente, poiché integra in un unico parametro il bilanciamento tra un fattore immunomodulante e il principale marker di fase acuta. La sua riduzione nel MC suggerisce che, pur in presenza di livelli assoluti simili di vitamina D, in questa patologia l'equilibrio biologico risulti maggiormente sbilanciato verso la cascata pro-infiammatoria.

L'analisi delle correlazioni ha ulteriormente chiarito il significato biologico della vitamina D nei due sottogruppi.

Nel Morbo di Crohn, i livelli sierici di vitamina D hanno mostrato una correlazione inversa significativa con la conta piastrinica, i globuli bianchi e i rapporti PLR e PNR, confermando una stretta associazione tra ipovitaminosi D e attivazione cellulare infiammatoria. Tali risultati risultano coerenti con il ruolo immunoregolatore attribuito alla vitamina D, capace di modulare la proliferazione linfocitaria Th1/Th17, la produzione citochinica proinfiammatoria e l'attivazione immunitaria innata.[5]

Particolarmente rilevante è la dissociazione osservata tra i marker cellulari e quelli epatici della flogosi: la vitamina D correlava fortemente con gli indici cellulari, ma molto meno con PCR e VES, suggerendo che essa rifletta più fedelmente la componente immunologica cronica e persistente dell'infiammazione piuttosto che la sola fase acuta sistemica. La reale importanza di questo asse è emersa stratificando i pazienti per carenza vitaminica (< 20 ng/mL). Nei pazienti con MC carenti di vitamina D è stato osservato un incremento significativo della flogosi (PCR, fibrinogeno, α-1 globuline, neutrofili percentuali, NLR e PLR), accompagnato da una riduzione dell'albumina sierica. Tali evidenze delineano un quadro in cui l'ipovitaminosi D si associa chiaramente a maggiore severità infiammatoria. È plausibile ipotizzare un circolo vizioso patogenetico: l'infiammazione cronica determina malassorbimento e consumo delle riserve della vitamina D,[135] mentre la sua carenza riduce il controllo immunomodulante e amplifica la cascata citochinica.[107] Contestualmente, in questi pazienti si è assistito al tipico fenomeno dell'anemia da infiammazione cronica.[123]

Al contrario, l'applicazione del medesimo cut-off di carenza (< 20 ng/mL) nella RCU ha delineato un quadro differente. In questi pazienti, la carenza di vitamina D non si associa a un peggioramento significativo dei classici indici di fase acuta, ma si correla principalmente ad alterazioni nutrizionali ed ematopoietiche. In particolare, emerge una significativa associazione positiva tra vitamina D e Acido Folico, mentre i pazienti carenti mostrano livelli inferiori di folati e una marcata tendenza alla macrocitosi, documentata dall'incremento di MCV e MCH. Questo dato suggerisce che, nella RCU, la vitamina D rappresenti soprattutto un indicatore precoce di squilibrio nutrizionale piuttosto che un marker diretto di intensità flogistica.[134]

Uno degli aspetti più originali del presente studio riguarda l'analisi dello stress ossidativo mediante dosaggio dei prodotti proteici di ossidazione avanzata (AOPP). Nell'intera coorte, i livelli medi di AOPP risultavano superiori ai valori di riferimento, confermando la presenza di un significativo stress ossidativo proteico nelle MICI. Tuttavia, il dato più rilevante è emerso nella stratificazione per fenotipo: solo nel Morbo di Crohn è stata osservata una correlazione inversa significativa tra vitamina D e rapporto AOPP/Proteine, con valori marcatamente più elevati nei pazienti carenti.

Al contrario, tale fenomeno non è stato riscontrato nei pazienti con Rettocolite Ulcerosa, suggerendo un ruolo protettivo della vitamina D selettivamente più evidente nel Morbo di Crohn.

Questa divergenza può essere interpretata alla luce delle differenze fisiopatologiche: il Morbo di Crohn è caratterizzato da un'infiammazione transmurale che coinvolge l'intero spessore della parete intestinale e, frequentemente, l'ileo terminale. Poiché la vitamina D agisce non solo come immunomodulatore, ma anche come induttore di geni antiossidanti e regolatore dell'autofagia, la sua carenza nel Crohn potrebbe ridurre la capacità di difesa dei tessuti profondi contro il danno radicalico. A supporto di ciò, occorre considerare che nel Crohn il danno a carico dell'ileo terminale riduce drasticamente l'assorbimento non solo della vitamina D, ma dell'intero pool di antiossidanti liposolubili (come vitamina E e carotenoidi); pertanto, quando i livelli di vitamina D risultano deficitari, è probabile che l'intero sistema di difesa antiossidante sia compromesso. Al contrario, nella RCU l'assorbimento nell'intestino tenue è preservato, permettendo all'organismo di compensare la bassa vitamina D con altri antiossidanti e mantenendo così i livelli di AOPP più stabili.

La produzione di AOPP, mediata principalmente dall'attivazione dei neutrofili e dall'enzima mieloperossidasi (MPO), sembra quindi essere più sensibile allo stato vitaminico nel Crohn, dove il reclutamento cellulare e lo stress ossidativo sono più pervasivi e sistemici. Nella RCU, invece, l'infiammazione rimane confinata alla mucosa superficiale del colon. È ipotizzabile che in questo contesto i meccanismi di compenso antiossidante locali siano meno dipendenti dai livelli circolanti di vitamina D, o che il profilo citochinico (prevalentemente Th2-like rispetto al profilo Th1/Th17 del Crohn) generi un pathway di stress ossidativo proteico meno influenzato dall'asse della vitamina D.

Un ulteriore elemento interpretativo di grande interesse riguarda il comportamento apparentemente paradossale degli AOPP, risultati positivamente correlati con albumina, proteine totali e parametri della serie rossa, ma inversamente correlati con la VES nel gruppo RCU. Questo fenomeno trova spiegazione nella natura stessa del biomarcatore: gli AOPP misurano proteine circolanti ossidate. Nei pazienti con flogosi severa e ipoalbuminemia, il substrato proteico disponibile si riduce drasticamente; ne consegue che i valori assoluti di AOPP possono risultare falsamente bassi pur in presenza di elevato stress ossidativo. Ciò conferma l'utilità del rapporto AOPP/Proteine quale indice più affidabile del danno ossidativo reale.

In conclusione, questi dati suggeriscono che la vitamina D non agisca meramente come un marker passivo di infiammazione, ma come un modulatore attivo dello stato redox, particolarmente critico nel limitare il danno proteico tissutale nel Morbo di Crohn. Tale evidenza apre la strada a strategie terapeutiche di supplementazione mirate non solo al ripristino dell'omeostasi ossea, ma alla protezione diretta contro il danno cellulare ossidativo.

Nonostante i risultati significativi emersi dall'analisi, il presente studio presenta alcune limitazioni metodologiche che devono essere tenute in considerazione nell'interpretazione dei dati. In primo luogo, la natura retrospettiva e osservazionale dell'indagine non consente di stabilire con certezza un nesso di causalità definitivo tra le variabili esaminate. Risulta infatti impossibile stabilire se la carenza di vitamina D sia il fattore scatenante dell'infiammazione e dello stress ossidativo, o se, al contrario, sia una conseguenza del malassorbimento e dello stato infiammatorio cronico. In secondo luogo, sebbene la numerosità campionaria totale (110 pazienti) sia adeguata per un

inquadramento globale, la successiva stratificazione nei sottogruppi di malattia (RCU e MC) e la categorizzazione basata sui cut-off di sufficienza/carenza vitaminica hanno ridotto la potenza statistica di alcune analisi. Infine, l'assenza di dati anamnestico-nutrizionali strutturati (es. questionari alimentari) non ha permesso di valutare l'impatto quantitativo dell'introito dietetico di micronutrienti antiossidanti e di vitamina K, che avrebbero potuto fornire un quadro ancora più completo del network metabolico dei pazienti.

Tuttavia, pur al netto di queste limitazioni, le evidenze prodotte da questo lavoro di tesi confermano in modo convincente come la vitamina D rappresenti ben più di un semplice regolatore dell'omeostasi fosfo-calcica nelle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali. Il presente studio evidenzia come l'impatto della vitamina D vari in modo fenotipo-specifico: nel Morbo di Crohn, malattia ad impronta transmurale e sistemica, essa si comporta come un modulatore attivo e cruciale contro l'attivazione cellulare e lo stress ossidativo (come dimostrato dall'aumento degli AOPP nei soggetti carenti); nella Rettocolite Ulcerosa, patologia a prevalente interessamento mucosale, l'ipovitaminosi D si configura invece come un "marker spia" precoce di profondi squilibri nutrizionali ed ematopoietici, strettamente associata alla deplezione di folati e alla tendenza macrocitica.

In conclusione, la vitamina D non può essere considerata un semplice parametro accessorio nelle MICI, ma deve essere interpretata come biomarcatore integrato del network infiammatorio, nutrizionale e ossidativo del paziente. L'integrazione sistematica del suo monitoraggio, insieme a indici innovativi quali D/PCR e AOPP/Proteine, potrebbe rappresentare un passo decisivo verso una gestione terapeutica più personalizzata e biologicamente mirata dei pazienti affetti da IBD.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Russo, C., Santangelo, R., Malaguarnera, L. & Valle, M. S. The “Sunshine Vitamin” and Its Antioxidant Benefits for Enhancing Muscle Function. *Nutrients* **16**, 2195 (2024).
2. Holick, M. F. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* **357**, 266–281 (2007).
3. Bouillon, R. *et al.* Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr Rev* **29**, 726–776 (2008).
4. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T. R. & Amrein, K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* **5**, 2502–2521 (2013).
5. Cantorna, M. T., Snyder, L., Lin, Y.-D. & Yang, L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. *Nutrients* **7**, 3011–3021 (2015).
6. Judd, S. E. & Tangpricha, V. Vitamin D Deficiency and Risk for Cardiovascular Disease. *Am J Med Sci* **338**, 40–44 (2009).
7. von Hurst, P. R., Stonehouse, W. & Coad, J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient - a randomised, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* **103**, 549–555 (2010).
8. Garland, C. F. *et al.* The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* **96**, 252–261 (2006).
9. Jorde, R., Sneve, M., Figenschau, Y., Svartberg, J. & Waterloo, K. Effects of vitamin D supplementation on symptoms of depression in overweight and obese subjects: randomized double blind trial. *J Intern Med* **264**, 599–609 (2008).
10. Burton, J. M. *et al.* A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology* **74**, 1852–1859 (2010).

11. Bischoff-Ferrari, H. A. *et al.* Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* **291**, 1999–2006 (2004).
12. Janoušek, J. *et al.* Vitamin D: sources, physiological role, biokinetics, deficiency, therapeutic use, toxicity, and overview of analytical methods for detection of vitamin D and its metabolites. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **59**, 517–554 (2022).
13. Kabbani, T. A. *et al.* Association of Vitamin D Level With Clinical Status in Inflammatory Bowel Disease: A 5-Year Longitudinal Study. *Am J Gastroenterol* **111**, 712–719 (2016).
14. Fletcher, J., Cooper, S. C., Ghosh, S. & Hewison, M. The Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease: Mechanism to Management. *Nutrients* **11**, 1019 (2019).
15. DeLuca, H. F. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* **2**, 224–236 (1988).
16. Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 53:293-312, 1922. Studies of experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium depositor. *Nutr Rev* **33**, 48–50 (1975).
17. Jones, G. The discovery and synthesis of the nutritional factor vitamin D. *Int J Paleopathol* **23**, 96–99 (2018).
18. Ulviya Hajibala Azizova, Samira Arif Baghirova, Rana Rufat Rahimova, & Gulnara Sabir Dashdamirova. Vitamin D: Structure and mechanism of action. *World J. Bio. Pharm. Health Sci.* **9**, 036–041 (2022).
19. Zmijewski, M. A. & Carlberg, C. Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? *Experimental Dermatology* **29**, 876–884 (2020).

20. Norman, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* **88**, 491S-499S (2008).
21. Tripkovic, L. *et al.* Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **95**, 1357–1364 (2012).
22. Borel, P., Caillaud, D. & Cano, N. J. Vitamin D bioavailability: state of the art. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**, 1193–1205 (2015).
23. Holick, M. F. *et al.* Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* **210**, 203–205 (1980).
24. Bikle, D. D. Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanism of Action.
25. Holick, M. F. *et al.* Isolation and identification of previtamin D3 from the skin of rats exposed to ultraviolet irradiation. *Biochemistry* **18**, 1003–1008 (1979).
26. Engelsen, O., Brustad, M., Aksnes, L. & Lund, E. Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover, aerosols and cloud thickness. *Photochem Photobiol* **81**, 1287–1290 (2005).
27. Herrmann, M., Farrell, C.-J. L., Pusceddu, I., Fabregat-Cabello, N. & Cavalier, E. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* **55**, 3–26 (2017).
28. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. (National Academies Press (US), Washington (DC), 2011).
29. Chun, R. F. *et al.* Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol* **144 Pt A**, 132–137 (2014).

30. Reboul, E. *et al.* Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol Nutr Food Res* **55**, 691–702 (2011).
31. Saponaro, F., Saba, A. & Zucchi, R. An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci* **21**, 6573 (2020).
32. Giustina, A. *et al.* Consensus statement from 2nd International Conference on Controversies in Vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord* **21**, 89–116 (2020).
33. Nussey, S. & Whitehead, S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. (BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2001).
34. Alexandridou, A., Schorr, P., Stokes, C. S. & Volmer, D. A. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Recent progress regarding the "gold standard" method and integration into clinical practice. *Mass Spectrometry Reviews* **42**, 1647–1687 (2023).
35. Sirajudeen, S., Shah, I. & Al Menhali, A. A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *IJMS* **20**, 3832 (2019).
36. Nelson, C. D., Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Sacco, R. E. & Nonnecke, B. J. Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* **4**, 181–196 (2012).
37. Safadi, F. F. *et al.* Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* **103**, 239–251 (1999).
38. Kaseda, R., Hosojima, M., Sato, H. & Saito, A. Role of megalin and cubilin in the metabolism of vitamin D(3). *Ther Apher Dial* **15 Suppl 1**, 14–17 (2011).

39. Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L. & Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* **96**, 365–408 (2016).

40. Jones, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* **88**, 582S-586S (2008).

41. Jones, G., Prosser, D. E. & Kaufmann, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* **55**, 13–31 (2014).

42. Holick, M. F. Vitamin D: extraskeletal health. *Rheum Dis Clin North Am* **38**, 141–160 (2012).

43. Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F8-28 (2005).

44. Quarles, L. D. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E1-9 (2003).

45. Hewison, M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**, 365–379, table of contents (2010).

46. Schlingmann, K. P. *et al.* Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* **365**, 410–421 (2011).

47. Hanel, A. & Carlberg, C. Vitamin D and evolution: Pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* **173**, 113595 (2020).

48. Kamao, M. *et al.* C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers: 25-hydroxyvitamin D3 is metabolized to 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and subsequently metabolized through C-1alpha or C-24 hydroxylation. *J Biol Chem* **279**, 15897–15907 (2004).

49. Al-Zohily, B., Al-Menhali, A., Gariballa, S., Haq, A. & Shah, I. Epimers of Vitamin D: A Review. *Int J Mol Sci* **21**, 470 (2020).
50. Matsuoka, L. Y., Ide, L., Wortsman, J., MacLaughlin, J. A. & Holick, M. F. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* **64**, 1165–1168 (1987).
51. Webb, A. R., DeCosta, B. R. & Holick, M. F. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* **68**, 882–887 (1989).
52. Bell, N. H. *et al.* Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *J Clin Invest* **76**, 470–473 (1985).
53. Matsuoka, L. Y. *et al.* Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 1099–1103 (1992).
54. Plebani, M. *et al.* Determinazione e supplementazione della vitamina D: come, a chi e perché.
55. Dirks, N. F., Cavalier, E. & Heijboer, A. C. Vitamin D: marker, measurand & measurement. *Endocrine Connections* **12**, e220269 (2023).
56. Karagüzel, G. & Haspolat, Y. *VITAMIN D*. (2023).
57. Singh, R. J., Taylor, R. L., Reddy, G. S. & Grebe, S. K. G. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3055–3061 (2006).
58. Tai, S. S.-C., Bedner, M. & Phinney, K. W. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-

hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **82**, 1942–1948 (2010).

59. Jenkinson, C. *et al.* High throughput LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of multiple vitamin D analytes in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1014**, 56–63 (2016).
60. Pittas, A. G. *et al.* Vitamin D and Risk for Type 2 Diabetes in People With Prediabetes : A Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data From 3 Randomized Clinical Trials. *Ann Intern Med* **176**, 355–363 (2023).
61. Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B. & Moras, D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* **5**, 173–179 (2000).
62. Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M. & Norman, A. W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α,25(OH)$_2$vitamin D$_3$: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**, 543–559 (2011).
63. Mizwicki, M. T. & Norman, A. W. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* **2**, re4 (2009).
64. Kamen, D. L. & Tangpricha, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)* **88**, 441–450 (2010).
65. Vitamina D Lo stato dell'arte Graziella BORZÌ - Minerva Medica - Libri - Medicina - Endocrinologia. https://www.minervamedica.it/it/volumi/specialita-mediche/endocrinologia/scheda.php?cod=L10246.

66. Fleet, J. C. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr* **134**, 3215–3218 (2004).

67. Wolf, M. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* **82**, 737–747 (2012).

68. Martin, A., David, V. & Quarles, L. D. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev* **92**, 131–155 (2012).

69. Kato, S. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem* **127**, 717–722 (2000).

70. Brandi, M. L. & Michieli, R. Società italiana di Medicina Generale.

71. Wacker, M. & Holick, M. F. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* **5**, 111–148 (2013).

72. Hewison, M. *et al.* Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 316–321 (2007).

73. Stockton, K. A., Mengersen, K., Paratz, J. D., Kandiah, D. & Bennell, K. L. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* **22**, 859–871 (2011).

74. Molfetta, L. & Rosini, S. La vitamina D e le attività extraossee (narrative review). *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 123–136 (2023) doi:10.32050/0390-0134-N348.

75. Pilz, S., Verheyen, N., Grübler, M. R., Tomaschitz, A. & März, W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat Rev Cardiol* **13**, 404–417 (2016).

76. Wang, T. J. *et al.* Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* **117**, 503–511 (2008).

77. Pilz, S., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Dekker, J. M. & März, W. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res* **54**, 1103–1113 (2010).

78. Eyles, D. W., Burne, T. H. J. & McGrath, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* **34**, 47–64 (2013).

79. Rybchyn, M. S. *et al.* Enhanced Repair of UV-Induced DNA Damage by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Skin Is Linked to Pathways that Control Cellular Energy. *J Invest Dermatol* **138**, 1146–1156 (2018).

80. Cermisoni, G. C. *et al.* Vitamin D and Endometrium: A Systematic Review of a Neglected Area of Research. *Int J Mol Sci* **19**, 2320 (2018).

81. Shin, J. S., Choi, M. Y., Longtine, M. S. & Nelson, D. M. Vitamin D Effects on Pregnancy and the Placenta. *Placenta* **31**, 1027–1034 (2010).

82. Li, M., Hu, S., Sun, J. & Zhang, Y. The role of vitamin D3 in follicle development. *J Ovarian Res* **17**, 148 (2024).

83. Kim, J. J. *et al.* Vitamin D deficiency in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Reprod Med* **41**, 80–85 (2014).

84. Manna, P., Achari, A. E. & Jain, S. K. Vitamin D supplementation inhibits oxidative stress and upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 cascade in high glucose-treated 3T3L1 adipocytes and in adipose tissue of high fat diet-fed diabetic mice. *Arch Biochem Biophys* **615**, 22–34 (2017).

85. Sowell, K. D. *et al.* Vitamin D and Reproduction: From Gametes to Childhood. *Healthcare* **3**, 1097–1120 (2015).

86. Wagner, C. L., Greer, F. R., American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding, & American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition.

Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* **122**, 1142–1152 (2008).

87. Lu, E. M.-C. The role of vitamin D in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research* **58**, 213–224 (2023).
88. Mahmood, M. K. *et al.* Association between Vitamin D Levels and Dental Caries: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Cross-Sectional Studies. *Applied Sciences* **13**, (2023).
89. Saeed, S. *et al.* Vitamin D in the Treatment of Oral Lichen Planus: A Systematic Review. *Biomedicines* **10**, 2964 (2022).
90. Fathi, N. *et al.* Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**, 391–401 (2019).
91. Nimitphong, H., Park, E. & Lee, M.-J. Vitamin D regulation of adipogenesis and adipose tissue functions. *Nutr Res Pract* **14**, 553–567 (2020).
92. Botella-Carretero, J. I. *et al.* Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr* **26**, 573–580 (2007).
93. Nimitphong, H., Guo, W., Holick, M. F., Fried, S. K. & Lee, M.-J. Vitamin D Inhibits Adipokine Production and Inflammatory Signaling Through the Vitamin D Receptor in Human Adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* **29**, 562–568 (2021).
94. Pathania, M., Dhar, M., Kumar, A., Saha, S. & Malhotra, R. Association of Vitamin D Status With Metabolic Syndrome and Its Individual Risk Factors: A Cross-Sectional Study. *Cureus* **15**, e38344 (2023).
95. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C. & Mathieu, C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 482–496 (2010).

96. Bikle, D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 26–34 (2009).

97. Charoenngam, N. & Holick, M. F. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients* **12**, 2097 (2020).

98. Ao, T., Kikuta, J. & Ishii, M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules* **11**, 1624 (2021).

99. Sun, J. VDR/vitamin D receptor regulates autophagic activity through ATG16L1. *Autophagy* **12**, 1057–1058 (2016).

100. Wu, S. & Sun, J. Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Macroautophagy in Inflammation and Infection. *Discov Med* **11**, 325–335 (2011).

101. Martens, P.-J., Gysemans, C., Verstuyf, A. & Mathieu, C. Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients* **12**, 1248 (2020).

102. Hewison, M. An update on vitamin D and human immunity. *Clinical Endocrinology* **76**, 315–325 (2012).

103. Bouillon, R. *et al.* Skeletal and Extraskeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev* **40**, 1109–1151 (2018).

104. Bellerba, F. *et al.* The Association between Vitamin D and Gut Microbiota: A Systematic Review of Human Studies. *Nutrients* **13**, 3378 (2021).

105. Aggeletopoulou, I. *et al.* Vitamin D and Microbiome. *The American Journal of Pathology* **193**, 656–668 (2023).

106. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* **361**, 2066–2078 (2009).

107. Dell'Anna, G. *et al.* The Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Diseases: From Deficiency to Targeted Therapeutics and Precise Nutrition Strategies. *Nutrients* **17**, 2167 (2025).

108. Saeid Seyedian, S. *et al.* A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *JMedLife* **12**, 113–122 (2019).

109. Jian, M. *et al.* Umbrella review of risk factors for inflammatory bowel disease: a study protocol. *BMJ Open* **14**, e077267 (2024).

110. Wan, J. *et al.* Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment of inflammatory bowel disease: Insights from the past two years. *Chin Med J (Engl)* **138**, 763–776 (2025).

111. Chew, D. C. H. *et al.* A Systematic Review on the Increasing Incidence of Inflammatory Bowel Disease in Southeast Asia: Looking Beyond the Urbanization Phenomenon. *Inflamm Bowel Dis* **30**, 1566–1578 (2024).

112. Iliev, I. D., Ananthakrishnan, A. N. & Guo, C.-J. Microbiota in inflammatory bowel disease: mechanisms of disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Microbiol* **23**, 509–524 (2025).

113. Singh, N. & Bernstein, C. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *UEG Journal* **10**, 1047–1053 (2022).

114. Lopetuso, L. & Gasbarrini, A. IBD: colite ulcerosa. *Recenti Progressi in Medicina* **107**, 297–308 (2016).

115. Cannarozzi, A. L. *et al.* Inflammatory bowel disease genomics, transcriptomics, proteomics and metagenomics meet artificial intelligence. *United European Gastroenterol J* **12**, 1461–1480 (2024).

116. Malattia di Crohn: sintomi, fattori di rischio e molto altro. https://www.gi-point.it/ibd/scopri-ibd/malattia-crohn.

117. Cockburn, E. *et al.* Crohn's disease: an update. *Clin Med (Lond)* **23**, 549–557 (2023).

118. Tian, C., Ranasinghe, I. R. & Hsu, R. Crohn Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).

119. Viganò, C. *et al.* Extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease: a comparative review of pediatric and adult-onset disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **19**, 1133–1147 (2025).

120. McDowell, C., Farooq, U. & Haseeb, M. Inflammatory Bowel Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).

121. Peluso, I., Pallone, F. & Monteleone, G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: Pathogenetic relevance and therapeutic inplication. *World J Gastroenterol* **12**, 5606–5610 (2006).

122. Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119–124 (2012).

123. Guan, Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res* **2019**, 7247238 (2019).

124. Ouahed, J. D. Understanding inborn errors of immunity: A lens into the pathophysiology of monogenic inflammatory bowel disease. *Front Immunol* **13**, 1026511 (2022).

125. Hu, X. *et al.* Combined use of CDAI and blood indices for assessing endoscopic activity in ileocolic Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* **23**, 337 (2023).

126. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. & Colombel, J.-F. Ulcerative colitis. *Lancet* **389**, 1756–1770 (2017).

127. Lynch, W. D. & Hsu, R. Ulcerative Colitis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).

128. Axelrad, J. E. *et al.* Gastrointestinal Infection Increases Odds of Inflammatory Bowel Disease in a Nationwide Case–Control Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **17**, 1311-1322.e7 (2019).

129. Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Ulcerative colitis. *The Lancet* **380**, 1606–1619 (2012).

130. Shirouzu, Y. *et al.* Efficacy of Filgotinib in Moderate to Severe Ulcerative Colitis: A Prospective Study Using Partial Mayo Score, Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity, and Geboes Histopathology Score. *Crohns Colitis 360* **7**, otaf030 (2025).

131. Arai, K. Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease: A Challenging Field for Pediatric Gastroenterologists. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **23**, 411 (2020).

132. Topalova-Dimitrova, A., Dimitrov, I. V. & Nikolov, R. Lower vitamin D levels are associated with the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Medicine* **102**, e35505 (2023).

133. Del Pinto, R., Pietropaoli, D., Chandar, A. K., Ferri, C. & Cominelli, F. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 2708–2717 (2015).

134. Vernia, F. *et al.* Low Vitamin K and Vitamin D Dietary Intake in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients* **15**, 1678 (2023).

135. Shi, S., Feng, J., Zhou, L., Li, Y. & Shi, H. Risk Factors for Vitamin D Deficiency in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Turk J Gastroenterol* **32**, 508–518 (2021).

136. Mouli, V. P. & Ananthakrishnan, A. N. Review article: vitamin d and inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* **39**, 10.1111/apt.12553 (2014).

137. Valvano, M. *et al.* Effectiveness of Vitamin D Supplementation on Disease Course in Inflammatory Bowel Disease Patients: Systematic Review With Meta-Analysis. *Inflammatory Bowel Diseases* **30**, 281–291 (2024).

138. Ramezani, R. *et al.* Effects of Vitamin D Supplementation on Serum 25-Hydroxy Cholecalciferol in Inflammatory Bowel Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *International Journal of Preventive Medicine* **15**, (2024).

RINGRAZIAMENTI

*Ed eccoci al **The End** di questo ciclo di studi, e quale occasione migliore per ringraziare pubblicamente tutti coloro che hanno accompagnato il mio percorso universitario e colorato la mia vita.*

*Desidero innanzitutto ringraziare la **Prof.ssa Ilaria Ferrarotti** per la sua disponibilità e per avermi accolta come tesista, offrendomi l'opportunità di essere qui oggi.*

*Ringrazio la **Prof.ssa Daniela Caccamo**. È stata la mia scelta come relatrice per la laurea triennale, e non ho avuto neppure un istante di dubbio nel volerla accanto anche in questo traguardo. Grazie per avermi guidata ancora una volta nel mio percorso universitario e nella realizzazione di questa tesi. È stato un privilegio essere sua tesista e tirocinante.*

*Un grazie sincero a tutto lo **staff del Laboratorio di Biochimica Clinica** dell'A.O.U. G. Martino: grazie per avermi trasmesso il vostro sapere, la vostra dedizione e l'amore per questa professione. Grazie per aver creduto in me, per ogni insegnamento, ogni sorriso e ogni risata. Mi avete accolta come una di voi, e porterò sempre con me qualcosa di ciascuno.*

E ora, alle persone della mia vita.

*Grazie al mio **Dio** che ha reso tutto questo possibile secondo la Sua volontà e secondo il Suo tempo. Grazie perché ha permesso che l'AIG mi forgiasse e mi rendesse ciò che sono, ma anche perché ha posto un limite a ciò che potevo sopportare.*

*A **Mamma** e **Papà**, grazie per aver sostenuto e appoggiato la mia scelta di proseguire gli studi fuori sede. Grazie per avermi dato la possibilità di inseguire i miei sogni e per avermi tenuta per mano mentre imparavo a volare. **Mamma**, il mio sole ad est, grazie per essere sempre ciò di cui ho bisogno. **Papà**, grazie per il sostegno e per avermi supportato in questo percorso.*

*A **Marco**, mio fratello: Dio mi ha benedetta immensamente donandomi te. Sei metà del mio cuore, il mio bastone, il mio life coach e il mio compagno di studi. Oggi sei tu che mi incoroni, ma sappiamo bene che questa corona è condivisa e non vedo l'ora di vederti con la tua tra qualche mese. Sono immensamente fiera di te.*

*Ai miei **zii, vicini a** 7 km o lontani 1500 km, ma sempre vicini nel cuore: grazie per essermi stati accanto, per il bene che mi volete, per l'incoraggiamento costante e per aver creduto in me, esame dopo esame.*

*Alla mia grande **Ohana**: non condividiamo il DNA, ma siete famiglia nel senso più vero del termine. Siete parte della mia vita da sempre, e non saprei immaginare il mio mondo senza di voi.*

*A **Giorgina**: la cognatina fatta apposta per me. Grazie per aver alleggerito il mio studio matto e disperato e per ogni risata.*

*A **Davide**, amico fraterno: grazie per esserci sempre. Grazie perché quando cado, tu ci sei, prima per prendermi in giro e poi per rialzarmi.*

*A **Peppe**, grazie per essere la mia costante. Grazie perché per me ti sciogli sotto il sole dei 40 gradi e ti bagni sotto il diluvio. Grazie per essere il British che manca in me.*

*A **Filippo**: siamo cresciuti insieme, dal primo giorno della prima media fino a oggi. Grazie perché ci siamo sempre capiti anche senza dire una parola.*

*Ad **Alessio**, grazie per avere i miei stessi "problemi mentali" nel voler scegliere una facoltà "dietro l'angolo". È stato un bel viaggio — di studio e mezzi di trasporto — con te.*

*A **Luca**, anche quando sembra che non ci sei, in realtà ci sei. E chissà che un domani la strada dell'amicizia non si intrecci con quella da biologa e medico.*

*A **Fede**, la mia partner in crime: chi avrebbe mai detto che da un esame andato male nel lontano 2018 potesse nascere un legame così prezioso? Sei stata compagna di studio, compagna di esami e la mia complice in questo disordine, ma soprattutto da una semplice collega universitaria sei diventata una vera amica!*

*Ad **Alessia**, abbiamo da sempre lo Stretto che ci divide, eppure sei il mio appuntamento quotidiano. Grazie per tutto ciò che sei e fai!*

*A **Erika**, la catanese quasi infermiera. Sei entrata nella mia vita in punta di piedi, sei arrivata proprio quando non pensavo di poter affidare ancora il cuore e invece ti sei guadagnata tutta la mia fiducia. Grazie per avermi donato la tua, per le risate, per asciugare le mie lacrime, per aver creduto in me e per ricordarmi il mio valore anche quando il buio era troppo fitto. E grazie perché, da quando ci sei tu, i podcast su WhatsApp non sono più solo miei.*

*Alla mia **Present**, Antonella Mazzù, anni fa mi fece una promessa — "ti prendo per mano e non ti lascio" — e oggi mi commuovo davanti alla fedeltà di quella promessa. "Perché è un essere speciale, ed io avrò cura di lei…" proprio come lei fa con me.*

*A **Carletto** e **Mari** e **Lidia**, non esistono parole per esprimere il bene che vi voglio.*
*Sono felice di avere voi tre nella mia vita. **Carletto**, mi hai tenuta in braccio nei miei primi mesi di vita e oggi vedi laurearmi. Chi l'avrebbe mai detto? Eppure il piano di Dio è straordinario. Grazie per tutte le sfaccettature che ricopri nella mia vita! **Mari**, grazie per il tuo prezioso aiuto e per essere la mia serotonina. **Lidia**, grazie perché attraverso i tuoi modi di fare emerge quanto tu tenga a me e perché, per come sei e per chi sei, mi fai sentire meno la mancanza di mia **Nonna Teresa**.*

*Alla mia **Dibi** e a **Elisa**: non importa quanti chilometri o quanto tempo ci dividano, anni fa, tra le mura del Majorana, è nato un filo indissolubile.*

*A **Naomi**, amica in Dio e compagna di risate. A quelle due bimbe che all'asilo si tenevano per mano che adesso si sono ritrovate da adulte.*

*A **Ivan**, sei arrivato quando la maratona era già in corsa, eppure hai iniziato da subito a fare il tifo per me. Grazie per il supporto sproporzionato, per i consigli e per la tua presenza. Sei un vero amico e un vero intenditore di tutto.*

*Non sempre ho creduto di farcela, ma ho sempre saputo che non mi sarei mai fermata. Alla **mia testa dura** e alla mia capacità di **sorridere** nonostante tutto e attraverso tutto: grazie perché mi hanno portata fino a qui ed è proprio da qui che inizia la prossima avventura.*

"Sorridi ogni giorno, perché è proprio
nelle difficoltà che sbocciano i fiori più belli"