



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in: Scienze chirurgiche e microbiologia applicata

Ciclo XXX

Valutazione globale dello stress ossidativo: analisi, cause ed effetti

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Francesco Ceccarelli

Tutor:
Chiar.mo Prof. Edoardo Raposio

Dottorando: Dott. Davide Gorni

2017

Mi permetto di scrivere queste poche righe di ringraziamento per ringraziare l'Università degli Studi di Parma e la ditta H&D srl, per l'opportunità concessami di poter partecipare al dottorato nella forma di dottorato industriale. Questa forma di dottorato è anche l'origine della particolare struttura che ho deciso di dare alla presente tesi. L'idea alla base di tutto il progetto è quella di unire armoniosamente il lavoro da me condotto nell'ambito del dottorato alle esperienze e al sapere accumulato, sotto forma di articoli e pubblicazioni prodotti e/o recepiti, nella decennale esperienza di ricerca di H&D srl. Il fine di questo lavoro è di avere in unico luogo tutte le conoscenze necessarie per comprendere il più approfonditamente possibile la tematica dello stress ossidativo arricchito dai miei personali contributi elaborati nel corso di questi tre anni.

Grazie mille dell'attenzione e buona lettura.

Dott. Davide Gorni

INDICE

1	Lo stress ossidativo	7
1.1	Le specie reattive	8
1.2	Origine dei ROS	11
1.2.1	Origine mitocondriale dei ROS	11
1.2.2	Reazione di Fenton	13
1.2.3	Risposta immunitaria	14
1.2.4	Origine metabolica dei ROS	15
1.3	La rete antiossidante	16
1.3.1	Antiossidanti enzimatici	17
1.3.2	Antiossidanti non enzimatici	19
1.4	Specie reattive e denaturazione delle macromolecole biologiche	22
1.4.1	Lipidi	22
1.4.2	Proteine	24
1.4.3	DNA	26
1.5	Cenni sullo stress nitrosativo	28
2	La determinazione analitica del bilancio redox	30
2.1	Determinazione diretta o indiretta mediante risonanza di spin elettronico	31
2.2	Determinazione di molecole derivanti da processi ossidativi	33
2.3	Determinazione di specie reattive mediante reazioni che coinvolgono reattivi fluorescenti o chemiluminescenti	38
2.4	Determinazione del potere antiossidante totale di un fluido o di un tessuto o di marker antiossidanti	39
2.5	Metodologie elettrochimiche per la determinazione del potere antiossidante totale o di analiti marker di stress ossidativo	46
2.6	Marker generici di stress : cortisolo	49
3	La determinazione dello stress ossidativo mediante i test di H&D	50
3.1	Il passato : d-ROMs e BAP	51
3.1.1	d-ROMs test	51
3.1.2	BAP	55
3.2	Il presente: d-ROMs fast, PAT e SAT	58
3.2.1	d-ROMS FAST test	58
3.2.2	PAT	61
3.2.3	SAT	62
3.3	d-ROMS e ceruloplasmina	67
3.4	Metodologia dei test descritti, campionamento, procedure e conservazione dei campioni	70
4	La valutazione dello stress ossidativo mediante i test di H&D	74
4.1	Valutazione dello stress ossidativo sistemico	74
4.2	OSI REDOX	79
4.3	OBRI (Oxidative Balance Risk Index)	82
4.4	Valutazione degli antiossidanti nella saliva	87
4.5	L'applicazione web "OB Manager Online"	88

5	I fattori di rischio per l'equilibrio redox	92
5.1	Abuso di alcolici	93
5.2	Esposizione al fumo di sigaretta	96
5.3	Errate abitudini alimentari	99
5.4	Età	101
5.5	BMI elevato	102
5.6	Dislipidemia	104
5.7	Iperglicemia	105
5.8	Contraccezione a base ormonale nelle donne	106
5.10	Esposizione a metalli pesanti o aumento della biodisponibilità dei metalli	108
5.11	Esposizione a pesticidi	110
5.12	Esposizione all'inquinamento dell'aria	112
5.13	Condizioni lavorative	114
5.14	Uso di stupefacenti	116
6	Implicazioni dello stress ossidativo in diversi ambiti medici	118
6.1	Neonatologia	119
6.2	Geriatrica	123
6.3	Patologie cardiovascolari	139
6.4	Ginecologia ed ostetricia	143
6.5	Oftalmologia	157
6.6	Diabete	170
6.7	Salute del cavo orale	186
6.8	Stress ossidativo e sport	195
6.9	Un esempio di applicazione innovativa: valutazione dello stress sistemico in una patologia localizzata	202
	Lista degli acronimi e dei simboli chimici	204

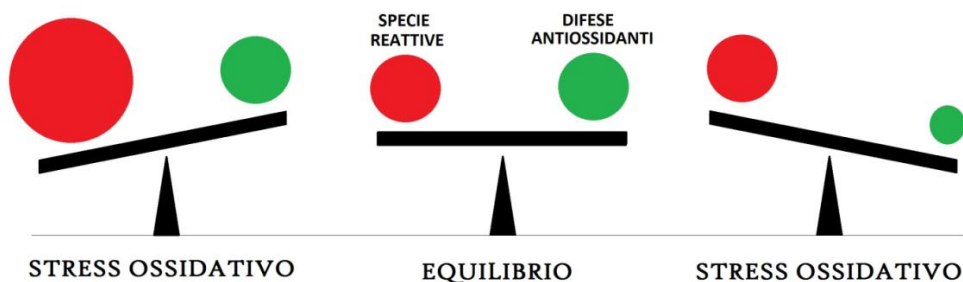
1

LO STRESS OSSIDATIVO

La tematica dello stress ossidativo non è moderna ma è stata approcciata, seppur non con questa terminologia, a partire dagli anni '50-'60 del secolo scorso, solo negli ultimi decenni si è però iniziato a indagarla veramente approfonditamente e più le nozioni si sono fatte approfondite e più importante è risultato il ruolo della gestione dello stress ossidativo in vari ambiti. Lo stress ossidativo è stato definito in molti modi ma quella che a mio avviso è la definizione migliore per chiarezza e sintesi è la seguente:

“ lo stress ossidativo è una perturbazione dell'equilibrio redox fisiologico non bilanciata da adeguate risposte adattative dell'organismo ”

Ogni istante le nostre cellule sono a contatto con sostanze endogene ed esogene di natura ossidante. Nella maggior parte dei casi la presenza di queste sostanze è fisiologica e in alcuni casi addirittura indispensabile per il corretto svolgimento delle funzioni cellulari, ma in determinate condizioni la forte reattività di queste sostanze le porta ad aggredire le macromolecole biologiche provocando danni anche gravi. Nel nostro organismo, come quello di ogni altro essere vivente esistono ,però, accurati sistemi di difesa per bilanciare queste nefaste conseguenze. Le specie aggressive sono solitamente denominate specie reattive mentre quelle facenti parte del sistema difensivo sono denominate antiossidanti. Il concetto chiave alla base di tutto è quello dell'equilibrio. In una situazione normale si avrà una produzione fisiologica di specie reattive e una produzione fisiologica di antiossidanti. In seguito alla perturbazione di questo equilibrio, solitamente con un aumento della componente ossidante ma non esclusivamente, in seguito a stimoli endogeni o esogeni l'organismo risponde mediante opportuni sistemi adattativi, e in capo ad un breve periodo la situazione torna all'equilibrio. Se però lo stimolo è eccessivo o perdura nel tempo, o i sistemi adattativi sono compromessi, non si ha più il ritorno allo stato di equilibrio ma si avrà una situazione sbilanciata in cui la componente ossidante è predominante sulla difesa antiossidante ed è denominata stress ossidativo. In questa situazione inizia l'ossidazione delle macromolecole biologiche, lipidi, proteine e DNA con conseguenze sempre più gravi. Cambiamenti nell'equilibrio redox sembrano accompagnare praticamente tutte le patologie anche il ruolo dello stress ossidativo non è sempre ben chiaro in relazione alle varie patologie. Spesso ne è riconosciuto come causa o concausa, a volte come effetto e spesso queste classificazioni non sono definite ma si sovrappongono. È noto di quadri clinici, come quello diabetico, in cui lo stress ossidativo è sia concausa che effetto, alimentando così un ciclo virtualmente infinito. Non sempre lavorando sulla modulazione dell'equilibrio antiossidante si riesce a influenzare il decorso delle patologie, ma spesso ciò avviene e per questo motivo viene indagato il ruolo dello stress ossidativo nelle medesime. In questo lavoro saranno forniti gli strumenti per potersi approcciare alle tematiche dello stress ossidativo con cognizione di causa e nel capitolo 6 saranno forniti numerosi esempi in merito.



1.1 LE SPECIE REATTIVE

In tema di stress ossidativo si sente spesso citare l'azione nefasta dei cosiddetti radicali liberi. Ma cosa si nasconde dietro questa espressione? La definizione di radicale libero dice: "qualsiasi specie chimica abbia un elettrone non appaiato nel suo orbitale più esterno". Entro questa definizione ricadono 85 dei 103 elementi noti per non parlare di molecole di varia natura; da questo è facile intuire che la semplice definizione di radicale libero non implica la tossicità di una specie chimica. Spesso in ambito di stress ossidativo si associa ai radicali un forte potere ossidante e questo è vero per alcuni di essi, ma d'altra parte non tutti i forti ossidanti sono radicali. Per sgomberare il campo da tutta questa serie di equivoci è meglio parlare più genericamente, ma più correttamente di specie reattive (RS), ossia di specie chimiche fortemente ossidanti, radicali e non radicaliche. Più specificatamente, a seconda della loro natura chimica si possono suddividere in specie reattive dell'ossigeno, ROS, specie reattive dell'azoto, RNS, e specie del cloro, dello zolfo e del bromo, RCIS, RSS, RBrS. Le più importanti quantitativamente e qualitativamente sono ROS e RNS. Le principali RS di interesse biologico sono elencate nella figura 1.

<i>Free radicals</i>	<i>Nonradicals</i>
<i>Reactive oxygen species (ROS)</i>	
Superoxide, $O_2^{\bullet -}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\bullet}	Hypobromous acid, $HOBr$
Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl$
	Ozone O_3
Peroxyl, RO_2^{\bullet}	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)
Alkoxy, RO^{\bullet}	Organic peroxides, $ROOH$
Carbonate, $CO_3^{\bullet -}$	Peroxynitrite, $ONOO^-$
Carbon dioxide, $CO_2^{\bullet -}$	Peroxynitrous acid, $ONOOH$
<i>Reactive chlorine species (RCS)</i>	
Atomic chlorine, Cl^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl$
	Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl
	Chloramines
	Chlorine gas (Cl_2)
<i>Reactive nitrogen species (RNS)</i>	
Nitric oxide, NO^{\bullet}	Nitrous acid, HNO_2
Nitrogen dioxide, NO_2^{\bullet}	Nitrosyl cation, NO^+
	Nitroxyl anion, NO^-
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4
	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Peroxynitrous acid, $ONOOH$
	Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+
	Alkyl peroxynitrites, $ROONO$
	Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl

Figura 1: Principali RS; immagine da Halliwell & Whiteman 2004 [1]

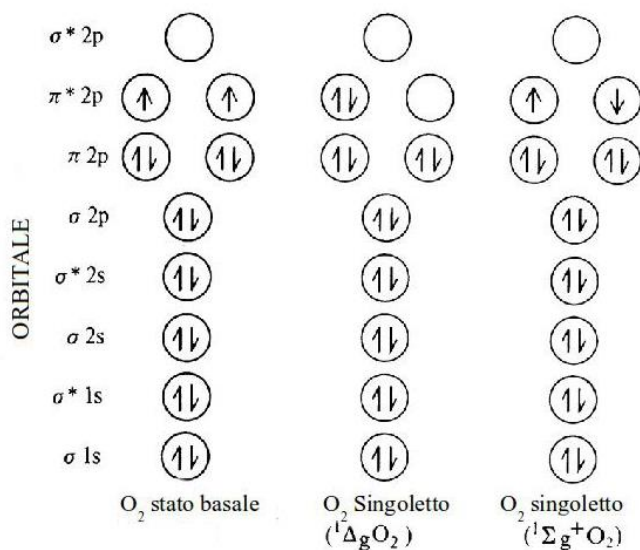


Figura 2: Configurazione elettronica delle varie forme di ossigeno molecolare

Particolare importanza ricopre la chimica dell'ossigeno dovuta alla sua particolare configurazione elettronica. L'ossigeno atomico possiede 8 elettroni che sono così distribuiti: 2 nell'orbitale più interno 1σ , 2 sull'orbitale esterno $2\pi_z$, e uno rispettivamente sugli orbitali $2\pi_y$ e $2\pi_x$. Nella configurazione molecolare O_2 l'ossigeno rimane una specie biradicalica, infatti si hanno due elettroni spaiati in due orbitali di antilegame $2\pi^*$ oltre che 14 elettroni collocati in 7 orbitali combinati contenente ciascuno 2 di essi. Quando gli elettroni spaiati hanno spin opposto si parla di ossigeno tripletto, ossia della forma più comune e stabile. Nell'atmosfera questa specie può passare a ossigeno singoletto mediante assorbimento di energia dai raggi UV da parte degli elettroni spaiati degli orbitali di antilegame $2\pi^*$. Delle

due forme di ossigeno singoletto possibili, ΔO_2 e ΣO_2 , particolarmente instabile e quindi reattiva risulta

essere la prima. Questa forma di ossigeno risulta essere la principale causa di ossidazione diretta non mediata da meccanismi biologici.

L'anione superossido, $O_2^{\bullet-}$, è un ROS con reattività piuttosto selettiva. Questa specie è prodotta da un certo numero di sistemi enzimatici, da reazioni di auto-ossidazione e da trasferimenti di elettroni non-enzimatici che riducono in maniera univoca l'ossigeno molecolare. Per esempio superossido dismutasi (SOD) accelera la dismutazione dell'anione superossido, convertendolo in perossido d'idrogeno (H_2O_2), e O_2 .

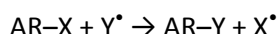
Il perossido d'idrogeno, non è un radicale libero ma ha un certo potere ossidante e in presenza di metalli di transizione può dare origine a radicali idrossilici, HO^{\bullet} . H_2O_2 può attraversare le membrane cellulari e può lentamente ossidare un certo numero di composti. H_2O_2 può essere formato in vivo per dismutazione dello ione superossido e mediante enzimi ossidasi.

OH^{\bullet} è un radicale altamente reattivo e diffusivo con un'emivita stimata nelle sole cellule di 9-10 s. La sua reattività e la capacità di diffondere anche lontano dal sito di origine ne fanno la specie reattiva più dannosa. Questo radicale può essere originato da diverse vie metaboliche, soprattutto inerenti al ciclo energetico o alla risposta immunitaria, e non metaboliche, come la reazione di Fenton (rottura omolitica di legami perossidici catalizzata da centri metallici) o per radiolisi dell'acqua.

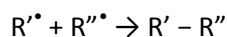
NO^{\bullet} è un radicale libero ed è riconosciuto come importante fattore di modulazione della vasocostrizione. Di per se non è una specie molto ossidante ma ad alte concentrazioni reagisce facilmente con lo ione superossido per originare perossinitrito, forse la RNS più reattiva e tossica, sia come potere ossidante diretto che come attivazioni di vie metaboliche. Per uso comune viene solitamente scritto NO senza il simbolo di radicale. [2-4]

Nonostante la grande varietà di declinazioni, le reazioni radicaliche possono essere facilmente riassunte in tre diverse tipologie: reazioni unimolecolari, reazioni radicale-molecola e reazioni radicale-radicali [2].

Le reazioni radicali unimolecolari derivano dall'instabilità del primo radicale formato. I radicali possono completamente decomporsi o riarrangiarsi prima della reazione con altre molecole o con altri radicali presenti. Nella decomposizione il radicale si degrada per dare una molecola stabile e/o un nuovo radicale. Nel riarrangiamento si hanno due modalità: la rottura di un legame C-C adiacente in un sistema ciclico/coniugato con la formazione concomitante di un nuovo legame e di un nuovo radicale isomerico oppure la migrazione di un atomo, attraverso l'astrazione intramolecolare dal centro radicale, creando così un nuovo radicale isomerico. Tra le interazioni radicale-molecola la reazione coi sistemi insaturi è la più tipica, o come aggiunta di un radicale a un doppio legame olefinico per dare un nuovo radicale saturo, ad esempio nella polimerizzazione indotta da radicali, o come aggiunta di un radicale a un doppio legame aromatico. In quest'ultimo caso il passaggio intermedio è un radicali libero e la reazione globale netta è lo spostamento di un sostituito aromatico.



Le principali reazioni tra radicali invece sono solitamente definite reazioni di spegnimento o di fine propagazione e originano da due radicali una specie stabile unita da un legame covalente.



Da quanto finora esposto si potrebbe pensare che la semplice presenza di specie reattive inneschi lo stress ossidativo e relativi problemi. In realtà ben determinate concentrazioni fisiologiche di specie reattive sono necessarie per il corretto svolgimento di numerose funzionalità. Tra i numerosi esempi che si possono citare abbiamo l'importanza delle specie reattive nella risposta immunitaria e la loro importanza come segnale di trasduzione di importanti vie metaboliche. Si ha quindi solitamente un incremento della produzione delle specie reattive in risposta ad uno stimolo e una risposta di contenimento delle stesse ad opera della cosiddetta rete antiossidante, ossia di quell'insieme di molecole aventi come scopo il neutralizzare l'eccesso di specie ossidanti. In condizioni fisiologiche si ha una situazione d'equilibrio in cui l'incremento della produzione di specie reattive in risposta ad un stimolo endogeno o esogeno viene controbilanciata dalle capacità protettive della rete antiossidante. Se le capacità protettive della rete

antiossidante sono compromesse o insufficienti o la produzione di specie reattive perdura per un tempo indefinito e si ha un'alterazione dell'equilibrio redox della cellula/tessuto/fluido con potenziali danni alle varie micro e macro strutture biologiche e il generarsi e/o propagarsi di patologie di vario genere. Questa situazione è denominata stress ossidativo [5].

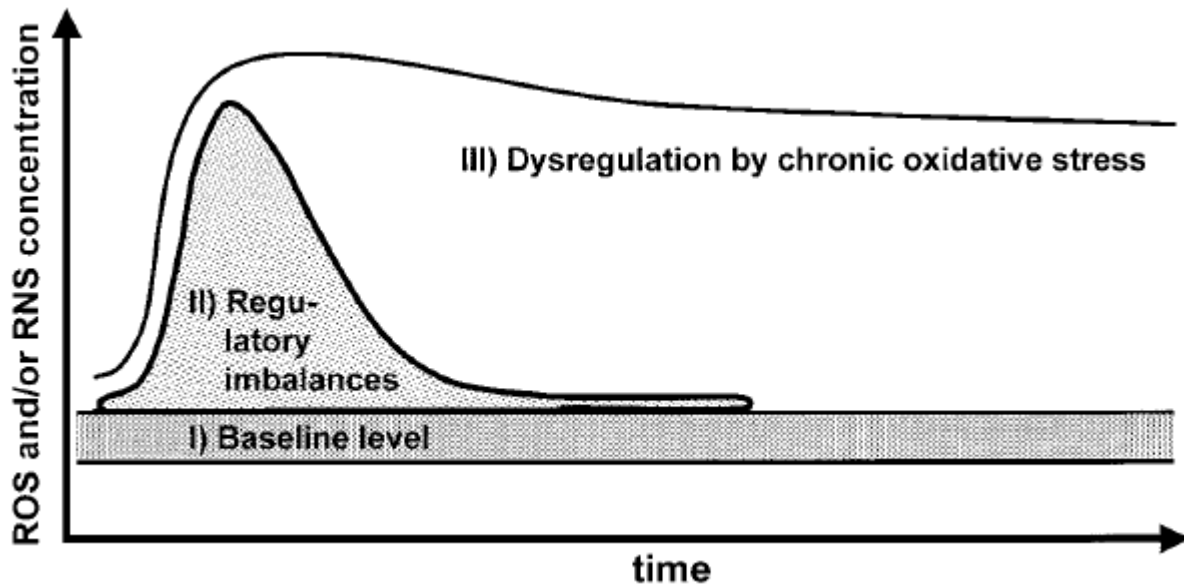


Figura 3: L'aumento della produzione di RS porta ad uno squilibrio temporaneo che costituisce la base della regolazione redox. La produzione persistente di quantità anormalmente ingenti di ROS o RNS, tuttavia, può portare a cambiamenti persistenti nella trasduzione del segnale e nell'espressione genica, che a sua volta può dar luogo a condizioni patologiche; immagine e didascalia rielaborate da *Droge 2001* [5]

- [1] Halliwell B & Whiteman M Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 2004;142:231–255
- [2] Aruoma OI Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease *JAOCS* 1998;75:199–212
- [3] Cornelli U, Iorio E Antiossidanti, aspetti terapeutici e diagnostici. Guna editore 2007 ISBN 88850076610
- [4] Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2010;15:186-190
- [5] Droge W; Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95

1.2 ORIGINE DEI ROS

Le principali specie reattive sono quelle incentrate sulla chimica dell'ossigeno e quindi denominate ROS. Un' esauriente descrizione di tutti i pathway di formazione ROS è impossibile e praticamente inutile perché ogni situazione fa testo a parte. Fortunatamente a livello strettamente biochimico le vie di formazione sono in pratica essenzialmente 4 e poi declinabili nelle varie situazioni prese in esame:

- Origine mitocondriale
- Reazione di Fenton
- Risposta immunitaria
- Origine metabolica dei ROS

1.2.1 ORIGINE MITOCONDRIALE DEI ROS

I mitocondri sono forse la principale fonte di ROS in condizioni di normalità. La produzione di ROS nei mitocondri è generalmente associata a due fenomeni comunque tra loro interconnessi: la catena respiratoria e la produzione di ATP. In condizioni normali la produzione di ROS è fisiologica e contenuta dalla rete antiossidante ma in caso di disregolazione, disfunzioni, stimoli eccessivi etc. la produzione non è più contenuta dalla rete antiossidante ed si sviluppa una situazione di stress ossidativo.

La catena respiratoria mitocondriale, situata nella membrana mitocondriale interna ed è composta da quattro complessi integrali multimerici di proteine di membrana (complessi I-IV), coenzima Q (CoQ) e citocromo c, una proteina periferica che si lega la superficie esterna della membrana mitocondriale interna. La catena respiratoria è piuttosto complessa e suddivisibile in varie reazioni:

- (I) Il complesso I (NADH-ubichinone ossidoreduttasi) accetta gli elettroni da NADH e il complesso II (succinato deidrogenasi) accetta gli elettroni dal succinato. Gli elettroni passano mediante un gradiente elettrochimico attraverso CoQ (ubichinone) al complesso III (ubichinol-citocromo c ossidoreduttasi), dal complesso III al citocromo c, e dal citocromo c al complesso IV (citocromo c ossidasi), che utilizza quattro elettroni per ridurre l'ossigeno molecolare all'acqua. La riduzione di ossigeno da un elettrone a $O_2^{\bullet-}$ si svolge principalmente nei complessi I e III.
- (II) Il complesso III genera $O_2^{\bullet-}$ mediante l'auto-ossidazione di ubisemichinone durante il ciclo chinonico. $O_2^{\bullet-}$ può essere generato in due diversi siti, Q_0 e Q_1 , all'interno del complesso III. Il sito Q_0 rilascia $O_2^{\bullet-}$ nello spazio intermembrana, mentre il sito Q_1 rilascia $O_2^{\bullet-}$ nella matrice. La maggior parte del $O_2^{\bullet-}$ generato dal complesso III viene generato al sito Q_0 . Al contrario, $O_2^{\bullet-}$ generato dal complesso I viene rilasciato nella matrice.
- (III) L' $O_2^{\bullet-}$ generato dai complessi I e III può essere ridotto a H_2O_2 da CuZnSOD o MnSOD che risiedono nei mitocondri. MnSOD si trova nella matrice mitocondriale.
- (IV) CuZnSOD è localizzato nello spazio intermembrana mitocondriale e nel citosol.
- (V) Una volta generato, l' H_2O_2 si muove attraverso le membrane mitocondriali arrivando anche nel citosol, H_2O_2 può essere ridotto sia dall'enzima glutazione perossidasi (GPX) nella matrice mitocondriale che dall'enzima catalasi nel citosol.

- (VI) L' $O_2^{\bullet -}$ che viene rilasciato nello spazio intermembrana può anche accedere al citosol ed essere ridotto a H_2O_2 tramite CuZnSOD citosolica.
- (VII) $O_2^{\bullet -}$ può anche passare attraverso il passaggio di permeabilità mitocondriale (MPTP) 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina direttamente nel citosol per contribuire alla morte cellulare necrotica. [1]

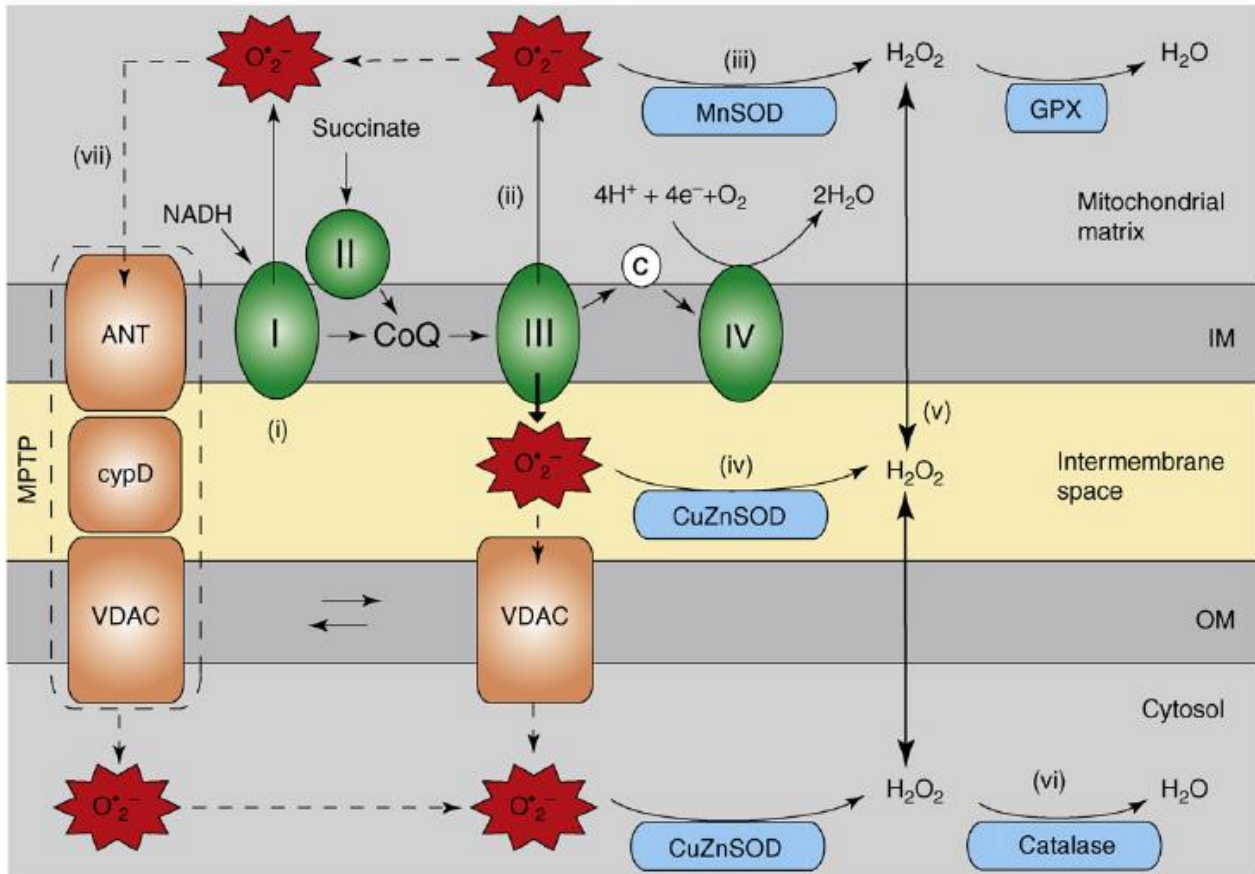


Figura 1: Formazione di ROS nella catena respiratoria; immagine da Poyton et al. 2009 [1]

Come si può facilmente intuire numerosi sono i ROS prodotti durante la catena respiratoria quindi una qualsiasi disfunzione nei meccanismi di protezione o produzione può portare facilmente a un surplus di specie ossidanti con tutte le dannose conseguenze del caso.

I radicali liberi sono generati anche durante la fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Il modello nella figura sottostante mostra la catena di trasporto dell'elettrone sulla membrana interna del mitocondrio comprendente complessi I-V. Gli elettroni derivati da substrati del ciclo di Krebs (o ciclo dell'acido tricarbossilico, TCA) nella matrice mitocondriale entrano nella catena di trasporto di elettroni al complesso I (C1). L'energia negli elettroni è utilizzata per pompare i protoni dalla matrice nello spazio della membrana interna sia mediante il complesso I che il complesso III (C3). Gli elettroni passano poi al complesso IV (C4) dove passano alla matrice e si combinano con ossigeno molecolare e protoni per formare acqua. I protoni nello spazio inter-membrana si muovono verso la matrice attraverso il complesso V (C5): ATP-sintasi e il potenziale chemiosmotico vengono utilizzati per guidare la sintesi di ATP da ADP e fosfato inorganico. Occasionalmente, tuttavia, l'ossigeno reagisce in modo promiscuo con gli elettroni nella catena di trasporto (linee tratteggiate rosse) e sono generati radicali liberi in particolare $O_2^{\bullet -}$. Queste reazioni si verificano prevalentemente nei complessi I e III e producono $O_2^{\bullet -}$ su entrambi i lati della membrana. ATP è il substrato della maggior parte delle reazioni che consumano energia nel corpo. Le reazioni di formazione di $O_2^{\bullet -}$ si

verificano proporzionalmente al flusso di elettroni lungo la catena di trasporto e quindi maggiori livelli di spesa energetica portano a maggiori livelli di consumo di ossigeno (freccia verso l'alto) e aumenti della produzione di $O_2^{\cdot -}$. [2]

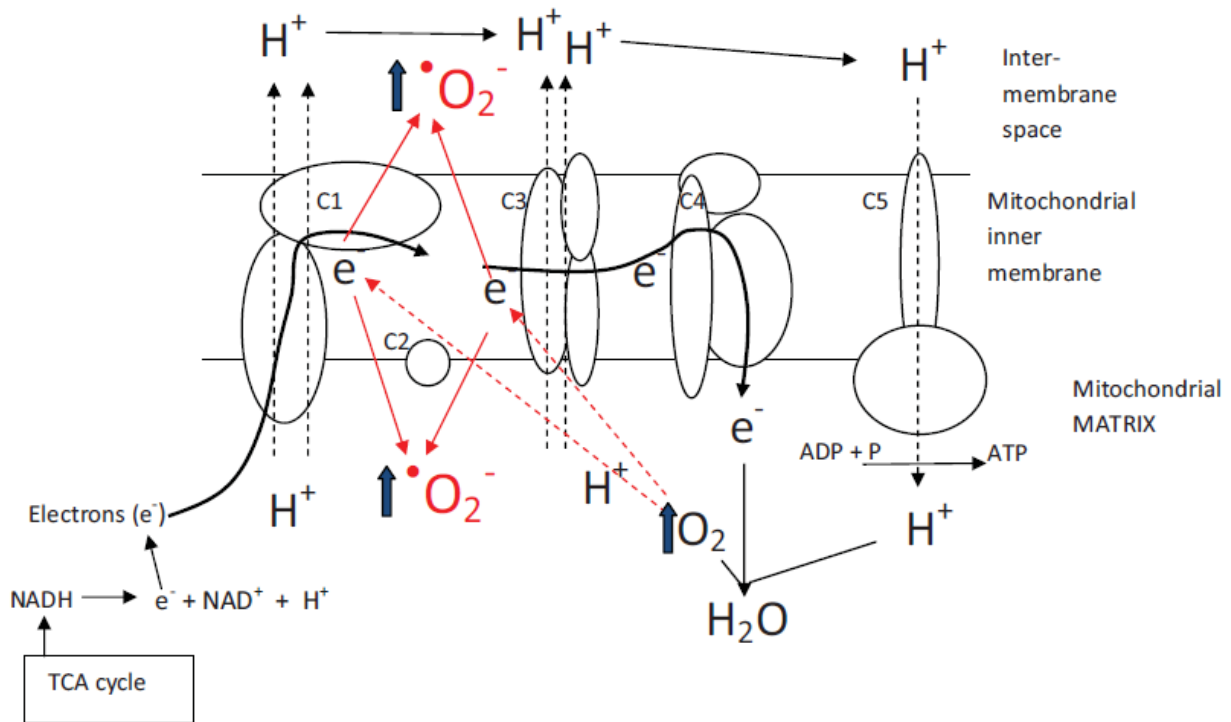


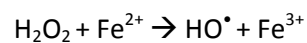
Figura 2: Produzione di anione superossido durante la sintesi di ATP; immagine da *Speakman & Garratt 2013* [2]

[1] Poyton OR, Ball KA, Castello PR Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2009;20(7)

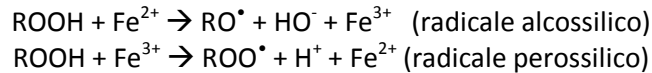
[2] Speakman JR & Garratt M. Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model; *Bioessays* 2013;36:93–106

1.2.2 REAZIONE DI FENTON

La presenza di ioni metallici liberi in ambiente cellulare o extracellulare, solitamente rilasciati da proteine di trasporto, da origine a tutta quella serie di reazioni note collettivamente come reazione di Fenton tra i cui prodotti predominano i radicali [1][2] Per reazione di Fenton si intende la rottura omolitica di un legame perossidico ad opera dell'azione catalizzante di uno ione di un metallo di transizione inizialmente nel suo stato ridotto. In realtà la reazione è molto più complessa, ma per i fini di questo lavoro è più che sufficiente questa descrizione. In ambito biologico il metallo catalizzante è tipicamente il ferro e più raramente il rame. Il substrato della reazione Fenton sempre in ambito biologico può essere il tipico perossido di idrogeno:



o un qualsiasi perossido organico, in questo caso i prodotti d'interesse sono il radicale perossilico e alcossilico [3]:



- [1] Carin T, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. Redox Report 2009;14(3):102-108
- [2] Lee DA & Goodfellow JM. The pH-Induced Release of Iron from Transferrin Investigated with a Continuum Electrostatic Model. Biophysical Journal 1998;74:2747-2759
- [3] Mwebi N Fenton & Fenton-like reactions: The nature of oxidizing intermediates involved. Ph.D. Thesis, 160 (2005 University of Maryland (College Park, Md.)

1.2.3 RISPOSTA IMMUNITARIA

I ROS, ma le RNS, sono implicati in numerosi processi della risposta immunitaria [1]. La fagocitosi dei neutrofili e dei macrofagi stimola diversi processi cellulari, incluso il "burst respiratorio", per cui aumenta l'assorbimento cellulare di ossigeno finalizzato alla produzione di potenti agenti battericidi ossidanti quali acido ipocloroso e il radicale idrossilico oltre che lo ione perossinitrito. L'emigrazione dei leucociti in un sito infiammatorio porta alla fagocitosi con il rilascio di enzimi da parte di macrofagi e neutrofili. La fagocitosi stimola vari processi indipendenti, in particolare il cosiddetto "burst respiratorio" che risulta dall'attivazione della NADPH-ossidasi, un enzima normalmente inattivo nelle cellule a riposo. La generazione di ROS inizia con il rapido assorbimento di ossigeno e l'attivazione della NADPH-ossidasi e la produzione di $\text{O}_2^{\bullet-}$.



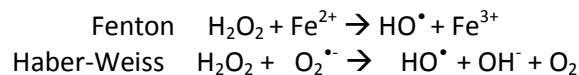
$\text{O}_2^{\bullet-}$ viene quindi rapidamente convertito in H_2O_2 dall'enzima superossido dismutasi .



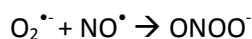
I ROS finora generati saranno poi utilizzati in varie reazioni a scopo difensivo. Per esempio, i granuli citoplasmatici dei neutrofili contengono l'enzima mieloperossidasi (MPO). In presenza dello ione cloruro, il perossido di idrogeno viene convertito in acido ipocloroso (HOCl), un potente ossidante e agente antimicrobico.



Sebbene non sia importante quanto il sistema MPO-dipendente, il meccanismo indipendente da MPO è comunque essenziale ed è particolarmente pertinente nei macrofagi maturi che non dispongono di MPO. Nel sistema MPO-indipendente si ha la generazione di radicali idrossilici a partire dai ROS finora generati mediante le reazioni di Fenton e Haber-Weiss. Entrambe le reazioni sono catalizzate da ferro ionico e ioni di altri metalli di transizione.



Altro fenomeno di risposta immunitaria in cui è coinvolto un radicale è la reazione di produzione dello ione perossinitrito che sarà però trattata approfonditamente in seguito.



- [1] Knight JA Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. Annals of Clinical & Laboratory Science, 2000;30(2)

1.2.4 FORMAZIONE METABOLICA DI ROS

In molti processi metabolici sono coinvolti enzimi in grado di sintetizzare ROS, a volte questi ROS sono necessari alla specifica via metabolica, più spesso sono una degenerazione della stessa.

Per esempio nel metabolismo degli acidi nucleici la trasformazione dell'ipoxantina a xantina e poi ad urato coinvolge un particolare enzima la xantina-deidrogenasi che in condizioni di stress ossidativo, come quello prodotto da ischemie prolungate, passa ad avere un'attività ossidativa. Tra i prodotti della reazione coinvolgente la xantina-ossidasi si ha una discreta quantità di $O_2^{\bullet-}$. Anche durante la produzione di noradrenalina da dopamina o durante la formazione degli eicosanoidi, come la prostaglandina da acido arachinoico, si vengono a formare ingenti quantità di $O_2^{\bullet-}$. Altro enzima solitamente coinvolto nella produzione di ROS è la NAD(P)-ossidasi, specialmente nel reticolo endoplasmatico.[1]

In tutti questi casi e molti altri simili il problema non risiede nella produzione di ROS ma quanto nella sovrapproduzione degli stessi o nelle carenze dei sistemi difensivi.

[1] Cornelli U, Iorio E. Antiossidanti, aspetti terapeutici e diagnostici. Guna editore 2007 ISBN 88850076610

1.3 LA RETE ANTIOSSIDANTE

La citotossicità delle specie reattive è da imputare alla loro elevata reattività legata alla loro forte natura ossidante. Come visto nella sezione precedente la produzione di ROS è fisiologica, dannosa è la sovrapproduzione di essi o il venir meno dei meccanismi di controllo. Questi meccanismi di controllo sono globalmente definibili come rete antiossidante e comprendono svariate molecole, più o meno complesse, con proprietà antiossidanti. Ma cosa si intende per proprietà antiossidanti? In pratica ogni atomo/molecola può, in determinate situazioni cedere o ricevere elettroni a o da altri atomi/molecole. La molecola che acquisisce elettroni compie un'ossidazione mentre la molecola che cede elettroni compie una riduzione. La molecola ossidante si riduce acquisendo elettroni mentre la molecola riducente si ossida perdendo elettroni. Reazioni di questa tipologia sono definite ossidoriduzioni e coinvolgono sempre due specie: una ossidante e una riducente. La facilità con cui una molecola cede o acquisisce elettroni dipende dalle sue caratteristiche intrinseche, ma anche e soprattutto dalla tipologia delle molecole con cui reagisce e dalle concentrazioni in gioco. Solitamente una molecola che tende a comportarsi da ossidante sarà tanto più ossidante quanto più sarà concentrata e lo stesso discorso varrà anche per le molecole riducenti. In conclusione se tutto è così relativo com'è possibile definire cos'è riducente, ossia un antiossidante? La semplice chimica non è sufficiente e sarà conveniente considerare non tanto le molecole prese in esame, ma la loro reattività nell'ambiente fisiologico, e si avrà così una suddivisione in molecole tendenzialmente ossidanti e molecole tendenzialmente antiossidanti. Non è importante la tipologia di molecola quanto la sua azione fisiologica. È quindi opportuno definire come antiossidanti tutte quelle specie che potendo facilmente donare elettroni o di catalizzare reazioni di riduzione, in ambiente fisiologico smorzano il potere ossidante delle specie reattive prima che queste possano reagire con le varie macromolecole, lipidi, proteine e DNA, causandone danni strutturali. Tutto questo discorso vale se si considerano specie e concentrazioni fisiologiche, perché ci sono casi di specie classificate come antiossidanti ma aventi in particolari situazioni, specialmente legate al sovradosaggio delle stesse, azione ossidante. Il caso più eclatante è quello della vitamina E. Alcune patologie sono trattate con elevate dosi di vitamina E, ma se il soggetto è in una condizione di stress ossidativo si avrà che la vitamina E agirà da ossidante. Questo succede perché la vitamina E coerentemente con la sua natura e con quanto finora esposto si ossiderà riducendo le specie reattive ma si avrà come risultato anche una forte concentrazione di vitamina E ossidata che cercherà di tornare allo stato nativo ossidando, cioè acquisendo elettroni, da specie chimiche molto più diluite quindi con un potere ossidante minore (riducente maggiore a seconda del punto di vista chimico).[1]

A livello fisiologico si hanno molte molecole con proprietà più o meno spiccatamente antiossidanti che vanno a formare la cosiddetta rete antiossidante. Il concetto di rete antiossidante è piuttosto importante perché spesso questi antiossidanti agiscono in modo sinergico e l'azione protettiva non è mai l'effetto di una singola specie antiossidante ma di tutte le molecole coinvolte. La rete antiossidante è composta da enzimi con attività antiossidante, catalasi e perossidasi di varia natura, e da antiossidanti non enzimatici; quest'ultimo gruppo arbitrariamente suddivisibile in antiossidanti in senso stretto come le vitamine A, C ed E e in molecole tra le cui proprietà e funzionalità vi è anche quella di agire come antiossidanti. Non tutti gli antiossidanti sono presenti nei vari sistemi biologici del nostro organismo ma molto dipende dalla loro origine e dalle loro caratteristiche fisiche, tipicamente dimensione e polarità. Per esempio la vitamina E e β -carotene date la loro idrofobicità sono gli antiossidanti d'elezione nelle membrane fosfolipidiche; la vitamina C è tra i principali antiossidanti circolanti vista la sua idrofilia, il coenzima Q₁₀ è prodotto ed utilizzato all'interno della cellula mentre lo squalene è prodotto all'interno della cellula e poi secreto[1]. Spesso sono erroneamente denominate come antiossidanti anche molecole il cui effetto netto è quello di ridurre lo stress ossidativo, inteso come sbilanciamento dell'equilibrio redox, senza però intervenire in reazioni redox. L'esempio classico è quello di molecole che legandosi ai metalli ne inibiscono le capacità catalitiche necessarie alla produzione di specie reattive. Vista la complessità e la vastità dell'argomento, si è deciso di affrontarlo nel medesimo modo della produzione delle specie reattive, ossia si fornirà una

panoramica dei principali antiossidanti ma indipendente dal contesto in cui sarà possibile calarli di volta in volta.

[1] Cornelli U, Iorio E. Antiossidanti, aspetti terapeutici e diagnostici. Guna editore 2007 ISBN 88850076610

1.3.1 ANTIOSSIDANTI ENZIMATICI

I principali componenti enzimatici della rete antiossidante sono tre enzimi denominati superossido-dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione-perossidasi (GPX). [1-3]

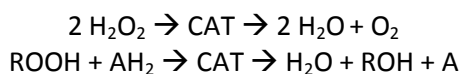
SOD è l'enzima antiossidante che catalizza la dismutazione dell'anione superossido altamente reattivo a O_2 e H_2O_2 , quest'ultimo una oltre che essere meno reattivo dell'anione superossido viene ulteriormente degradato da CAT o GPX.



Nell'uomo esistono tre forme di SOD: CuZnSOD citosolico, MnSOD mitocondriale e SOD extracellulare (EC-SOD). SOD distrugge l'anione superossido per successiva ossidazione e riduzione dello ione metallico di transizione sul sito attivo in un meccanismo di tipo ping-pong con tassi di reazione notevolmente elevati.

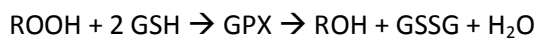
MnSOD è un omotetramero (96 kDa) contenente un atomo di manganese per subunità che compie cicli da Mn^{3+} a Mn^{2+} e ritorno a Mn^{3+} durante la dismutazione a due stadi del superossido. La catena respiratoria nei mitocondri è una delle principali fonti di radicali dell'ossigeno e MnSOD è il principale enzima antiossidante mitocondriale. MnSOD è stato dimostrato essere fortemente indotto e depresso dalle citochine, ma è solo moderatamente influenzato dagli ossidanti. MnSOD mitocondriale può essere inattivato mediante nitratura di un specifico residuo tirosinico ad opera dello ione perossinitrito. CuZnSOD ha due subunità identiche di circa 32 kDa, ciascuna contenente un cluster di metallo, il sito attivo è costituito da un atomo di rame e un atomo di zinco. La CuZnSOD svolge un ruolo importante nella prima linea di difesa antiossidante. Alcuni studi sembrano dimostrare che MnSOD è essenziale per la vita mentre CuZnSOD non lo è. EC-SOD è una glicoproteina tetramericamente contenente rame e zinco presente negli spazi interstiziali dei tessuti e anche nei fluidi extracellulari e rappresenta la maggior parte dell'attività SOD nel plasma, nel sistema linfatico e nel liquido sinoviale. È il principale antiossidante nell'interstizio della parete dei vasi sanguigni ed è l'unico enzima extracellulare conosciuto per contrastare l'anione superossido. EC-SOD, non è indotto dal suo substrato o da altri ossidanti e la sua regolazione nei tessuti dei mammiferi si verifica principalmente in un modo coordinato da citochine, piuttosto che come risposta di singole cellule agli ossidanti. EC-SOD controlla la disponibilità di anione superossido extracellulare, importante per una varietà di percorsi fisiologici, compresi i mezzi di inattivazione dell'ossido nitrico. EC-SOD ha il controllo primario dell'inattivazione del NO. [1][2]

CAT è un asterisco tetramericamente costituito da quattro subunità unidirezionali. Essa contiene quattro gruppi di ferroprotoporfirina e la sua massa molecolare è di circa 240 kDa. La catalasi è uno degli enzimi più efficienti conosciuti. È così efficiente che non può essere saturato dal H_2O_2 indipendentemente dalla sua concentrazione. CAT reagisce con esso per formare acqua e ossigeno molecolare. CAT reagisce con donatori di H (metanolo, etanolo, acido formico, fenolo ...) e perossidi organici come una perossidasi.



CAT protegge le cellule dal perossido d'idrogeno generato all'interno di esse. Anche se la catalasi non è essenziale per alcune cellule in condizioni normali, ha un ruolo importante nell'acquisizione della tolleranza allo stress ossidativo nella risposta adattativa delle cellule. CAT reagisce con H_2O_2 prima che esca dalla cellula. [1][2]

La GPX è la principale perossidasi a base selenica, essa catalizza la riduzione di tutta una serie di perossidi, anche organici, usando il glutatione (GSH) come fonte di elettroni, proteggendo così le cellule dei mammiferi dai i danni ossidativi.



Ci sono almeno cinque isoenzimi GPX trovati nei mammiferi. Anche se la loro espressione è onnipresente, i livelli di ciascuna isoforma variano a seconda del tipo di tessuto e della localizzazione. Le varie forme sono presenti nel mitocondrio, nel citosol e nelle membrane. GPX condivide il substrato, H_2O_2 e perossidi organici, con la catalasi, ma con affinità relative diverse. Il ciclo redox del glutatione è una delle principali fonti di protezione contro i bassi livelli di stress ossidativo, mentre l'attività della CAT diventa più significativa nella protezione contro gravi stress ossidanti. Nonostante alcuni meccanismi protettivi anche GPX è suscettibile di denaturazione ad opera dello ione perossinitrito. [1][2]

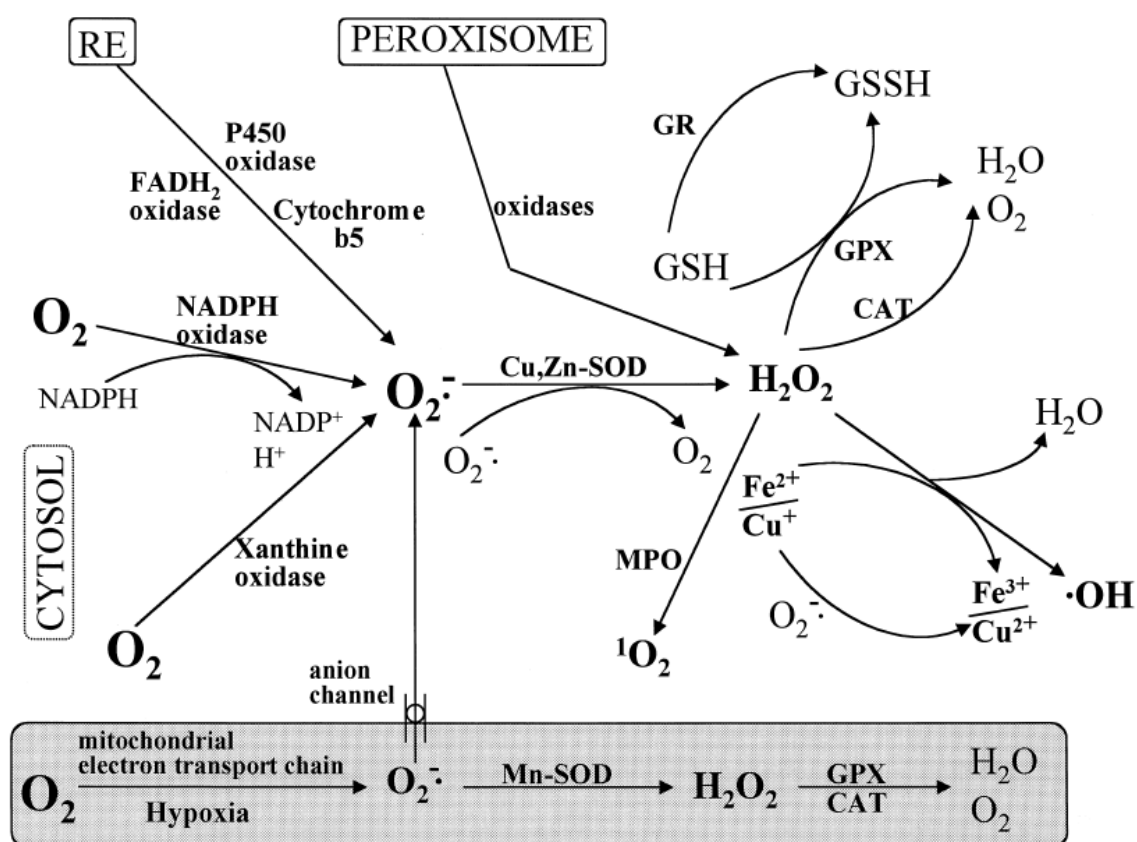


Figura 1: Azione degli enzimi antiossidanti in relazione alla produzione dei ROS; immagine da Mates et al. 1999 [1]

[1] Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I Antioxidant Enzymes and Human Diseases. Clinical Biochemistry 1999;32(8): 595–603

[2] Mates JM Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000;153:83–104

[3] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO Journal 2012;5:9–19

1.3.2 ANTIOSSIDANTI NON ENZIMATICI

Tra le principali molecole con proprietà antiossidanti le più importanti sono le vitamine C ed E, i caroteni in particolare il β -carotene, e l'acido urico. Al contrario degli enzimi che fungono da catalizzatori per diverse reazioni questa tipologia di antiossidanti reagisce direttamente con le specie reattive formando dei prodotti più stabili e quindi meno aggressivi e tossici donando direttamente gli elettroni.

La vitamina E è una vitamina liposolubile, è concentrata nel sito idrofobo della membrana cellulare e rappresenta la principale difesa contro il danneggiamento della stessa causato dalle specie reattive. La vitamina E dona l'elettrone al radicale perossilico, prodotto durante la perossidazione lipidica. Il termine vitamina E in realtà denomina un intero insieme di molecole simili di cui le principali sono i tocoferoli e tra di essi il più importante per la biologia umana è l' α -tocoferolo. La reattività della vitamina E con i radicali perossilici organici è associata alla presenza dell'anello benzenico in grado di stabilizzare il radicale formatosi durante l'ossidazione della vitamina E. Vista la collocazione di questa vitamina i radicali perossilici con cui reagisce sono solitamente di origine lipofila, ossia i radicali perossilici degli acidi grassi polinsaturi nei fosfolipidi della membrana o nelle lipoproteine. Molto importante è la capacità della vitamina E di interrompere la propagazione del danno ossidativo da reazioni di propagazione radicalica sottraendo i radicali perossilici formatosi trasformandoli in perossidi organici relativamente più stabili. La vitamina E è il principale antiossidante lipidico nei vari tessuti e nel plasma. Oltre che i radicali perossilici la vitamina E è in grado di reagire con tutti i principali radicali, quali radicali idrossilici, alcossilici e ossigeno singoletto. [1][2]

La vitamina C o acido L-ascorbico è solubile in acqua ed è presente nello stato deprotonato nella maggior parte delle condizioni fisiologiche. È considerato l'antiossidante idrofilo più importante nei fluidi extracellulari ed è coinvolta in molte attività cellulari di natura antiossidante. La vitamina C si è dimostrata efficace nell'eliminare l'anione superossido, H_2O_2 , ipoclorito e radicali idrossilici, oltre che radicali perossilici e ossigeno singoletto. Negli studi con lipidi plasmatici umani è stato dimostrato che l'acido ascorbico è molto più efficace nell'inibizione della perossidazione lipidica iniziata da un iniziatore radicale perossile rispetto ad altri componenti plasmatici, come per esempio tioli proteici, urati, bilirubina e α -tocoferolo. Bloccando efficacemente i radicali perossilici nella fase acquosa prima di iniziare la perossidazione dei lipidi, l'acido ascorbico riesce a proteggere le anche biomembrane dai danni ossidativi. Altra importante funzione dell'acido ascorbico è il ripristino della forma ridotta della vitamina E. In studi in vitro è stato dimostrato che l'acido ascorbico riduce il radicale tocoferossilico e quindi ripristina l'attività antiossidante del tocoferolo. [1][2]

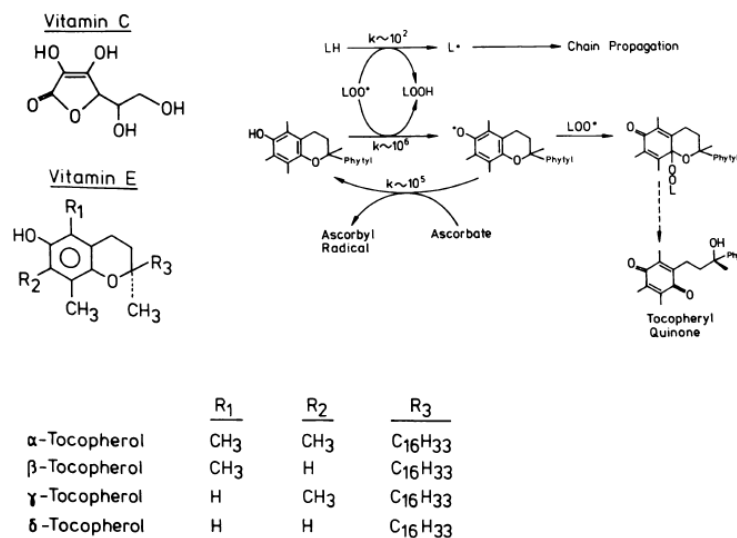


Figura 2: Struttura delle vitamina E ed E, reazione di ripristino della vitamina E; immagine rielaborata da Sies & Stahl 1995 [2]

I carotenoidi sono i pigmenti presenti nelle piante, sono composti naturali con proprietà lipofile; più di 500 composti diversi sono stati identificati ma β -carotene e licopene sono i più importanti. La maggior parte dei carotenoidi contiene un'esteso sistema di doppie legami coniugati, responsabile della loro attività antiossidante. Questi doppi legami stabilizzano la forma ossidata radicalica del carotene. I caroteni reagiscono efficacemente col radicale perossile, idrossile e con l'anione superossido. I carotenoidi mostrano i loro effetti antiossidanti in bassa pressione parziale d'ossigeno, ma possono avere effetti pro-ossidanti a livelli più elevati di ossigeno. Oltre che come antiossidanti tout-court i carotenoidi e gli acidi retinoici sono in grado di regolare i fattori di trascrizione inibendo l'attivazione del fattore NF- κ B dell'interleuchina oltre che la produzione di fattore di necrosi tumorale. I carotenoidi influenzano anche l'apoptosi delle cellule. I carotenoidi, in special modo il licopene sono ottimi nel controllo della diffusione dell'ossigeno singoletto, la velocità di reazione è quasi pari a quella di diffusione.[1][2]

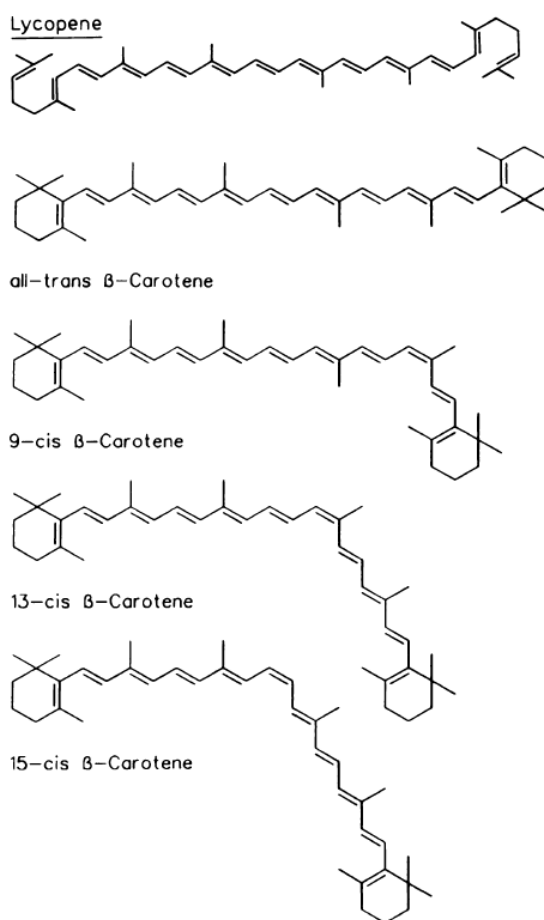


Figura 3: Struttura del licopene e isomeri del β -carotene; immagine rielaborata da Sies & Stahl 1995 [2]

L'acido urico e il suo ione urato sono un prodotto enzimatico finale del degrado dei nucleosidi purinici ed è tra i principali antiossidanti idrofili. Molto importante è la sua attività nella saliva. I meccanismi attraverso cui l'acido urico espleta la sua capacità antiossidante non sono del tutto chiari, anche se sembra probabile che non sia un antiossidante diretto visto che la sua capacità antiossidante dipende molto dalla presenza di acido ascorbico. È noto come l'acido urico sia l'unico antiossidante efficace nei confronti dello ione perossinitrito in ambito extracellulare e come sia particolarmente efficiente nei confronti di radicali carbonilici e perossilici in ambiente idrofilo. In ambiente idrofobo e nei confronti dell'ossigeno singoletto è, invece, completamente inefficiente.[3]

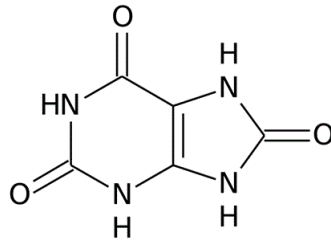


Figura 4: Acido urico

- [1] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO Journal 2012;5:9–19
- [2] Sies H & Stahl W Vitamins E and C, α -carotene, and other carotenoids as antioxidants. J Clin Nutr 1995;62:1315s-21s.
- [3] Sautin YY & Johnson RJ; Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox. Nucleosides Nucleic Acids. 2008;27(6):608–619.

1.4

SPECIE REATTIVE E DENATURAZIONE DELLE MACROMOLECOLE BIOLOGICHE

L'alta reattività delle specie reattive siano esse ROS o RNS è alla base della loro aggressività nei confronti delle varie strutture biologiche. Da un punto di vista più strettamente biochimico la reazione tra RS e macromolecole può portare ad alterazione nelle proprietà chimico-fisiche delle molecole tali da inibire le loro funzioni con danni anche gravi per la funzionalità dei tessuti di cui fanno parte. Le macromolecole più interessate da questi fenomeni sono lipidi, proteine e DNA.

1.4.1 LIPIDI

Il processo complessivo della perossidazione lipidica è costituito da tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. L'iniziazione, la prima fase, comporta l'attacco di un ROS capace di estrarre un atomo di idrogeno da un gruppo metilenico nel lipide. La presenza di un doppio legame adiacente al gruppo metilene indebolisce il legame tra carbonio e idrogeno, e l'idrogeno può essere facilmente rimosso dalla molecola dell'acido grasso. Il processo di estrazione dell'idrogeno produce un acido grasso con un elettrone non accoppiato ossia un radicale. Quando l'ossigeno è presente nei tessuti circostanti, il radicale acido grasso può reagire con esso portando alla formazione di radicali lipoperossilici. Durante la fase di propagazione questi radicali molto reattivi sono in grado di estrarre un altro idrogeno dalla molecola dell'acido grasso creando così perossidi lipidici. I perossidi lipidici, ROOH, sono una specie relativamente instabile e possono essere ridotti da GPX ad alcoli di acido grasso o reagiscono con metalli redox per produrre una varietà di prodotti reattivi (ad esempio epossidi, aldeidi, ecc.). La reazione degli idroperossidi lipidici con gli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} , per esempio, provoca la formazione di radicali alchilici e lipoperossilici rispettivamente. Una volta formati i radicali lipoperossilici possono essere riorganizzati attraverso una reazione di ciclizzazione a endoperossidi, precursori della MDA. Il principale prodotto aldeidico della perossidazione lipidica oltre a MDA è il 4-idrossinonenale (HNE).[1][2]

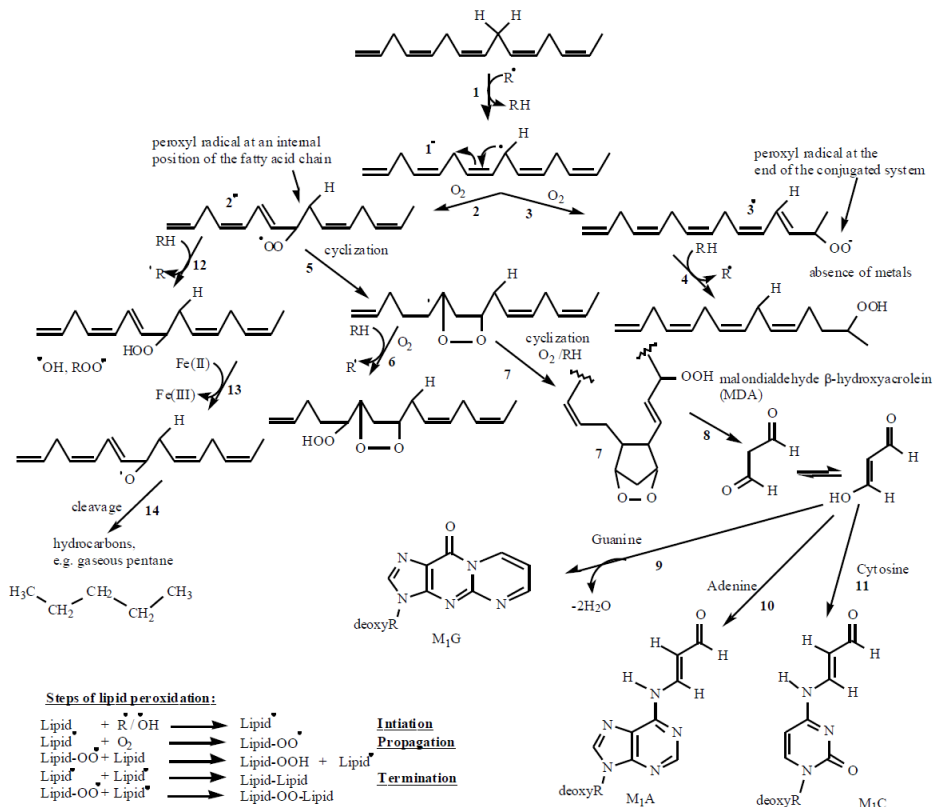


Figura 1: Reazioni inerenti all'ossidazione dei lipidi; immagine da Valko et al. 2005 [1]

Un'altra possibile via di ossidazione dei lipidi porta alla formazione degli isoprostani. La classe degli isoprostani più utilizzata come marker è denominata F2-IsoPs dalla presenza di un anello prostanico di tipo F2 analogo alla prostaglandina 2 α . Un possibile meccanismo di formazione di tali molecole si basa sulla generazione di un perossido biciclico per addizione di ossigeno all'acido arachidonico radicalizzato per perdita di un elettrone da un suo doppio legame, formazione di perossido radicale per ulteriore addizione di ossigeno e stabilizzazione dei gruppi perossidici a idrossilici per addizione di idrogeno. Sulla base di questo meccanismo di formazione, si formano quattro regioisomeri indicati come 5-, 12-, 8 o 15-serie a seconda dell'atomo di carbonio a cui è collegato l'ossidrile catena laterale. [3]

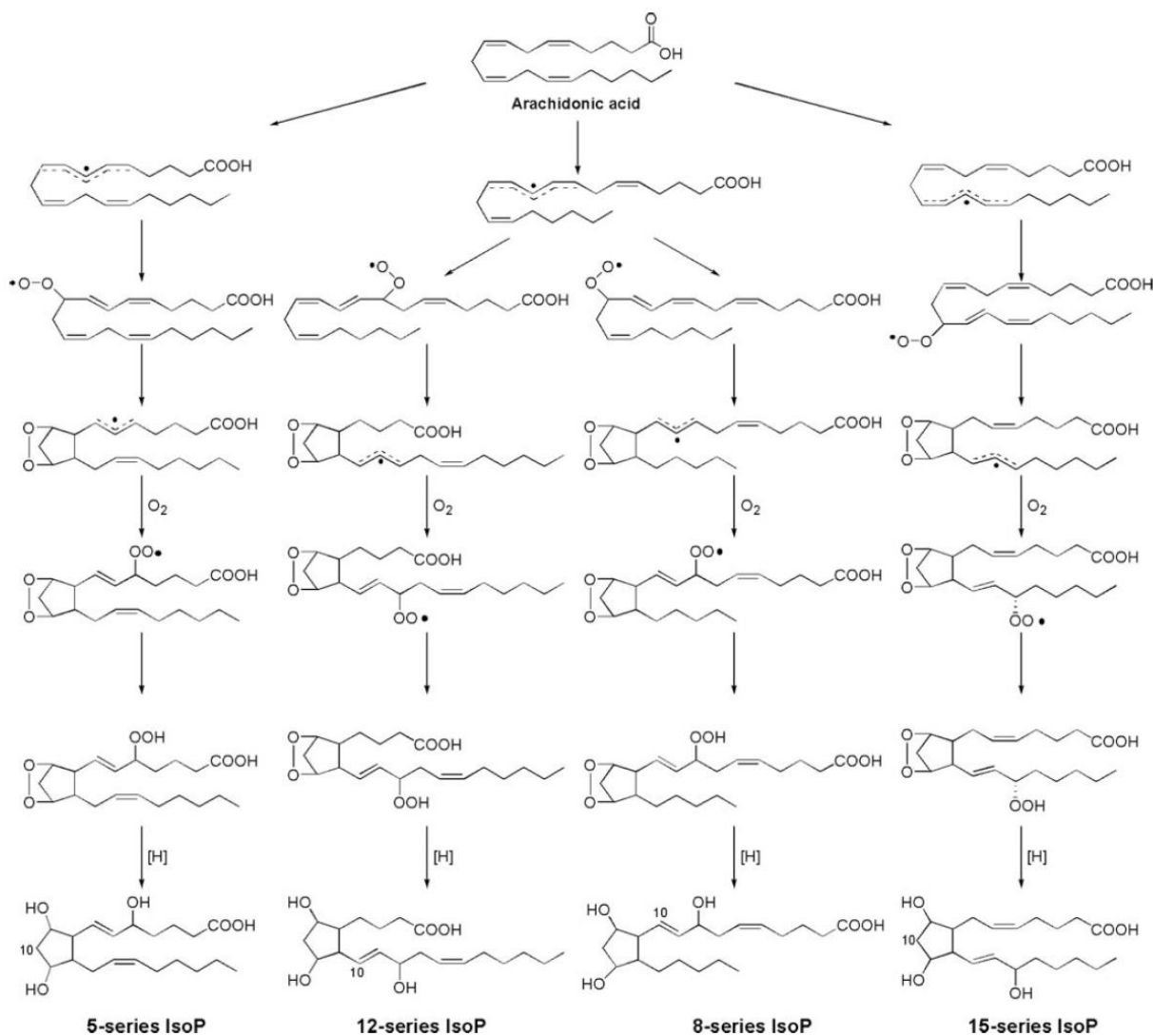


Figura 2: Reazioni di formazione degli isoprostani; immagine da Milne et al. 2008 [3]

[1] Valko M., Morris H, Cronin MTD Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2005;12: 1161-1208
 [2] Gutteridge JM Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995;41(12):1819-1828
 [3] Ginger L, Milne, Huiyong Y, Morrow JD; Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. *the journal of biological chemistry* 2008;283(23)15533–15537

1.4.2 PROTEINE

I meccanismi ossidativi a carico delle proteine sono molteplici e possono essere a carico sia dei residui amminoacidici laterali che sulla catena centrale. L'ossidazione delle proteine può portare alla rottura delle stesse, ma anche alla formazione di legami intra/intermolecolari o alla formazione di perossidi col conseguente fenomeno di propagazione del danno ossidativo. Più in generale si modifica la struttura proteica e questo comporta modifiche funzionali che disturbano il metabolismo cellulare. Le principali modifiche proteiche osservate sono: perdita di attività catalitica, modificazioni degli aminoacidi, formazione di gruppi carbonile, aumento dell'acidità, diminuzione della stabilità termica, cambiamento della viscosità, frammentazione, formazione dei legami tra proteine e proteine, formazione di ponti S-S e maggiore suscettibilità alla proteolisi [1]. Di seguito saranno illustrati i più diffusi fenomeni ossidativi a carico delle proteine.

Amino acid	Oxidation products
Arginine	Glutamic semialdehyde
Cysteine	Disulfides, cysteic acid
Glutamyl	Oxalic acid, pyruvic acid
Histidine	2-Oxohistidine, asparagine, aspartic acid
Lysine	2-Amino adipic semialdehyde
Methionine	Methionine sulfoxide, methionine sulfone
Phenylalanine	2,3-Dihydroxyphenylalanine, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenylalanine
Proline	2-Pyrrolidone, 4- and 5-hydroxyproline pyroglutamic acid, glutamic semialdehyde
Threonine	2-Amino-3-ketobutyric acid
Tryptophan	2-, 4-, 5-, 6-, and 7-hydroxytryptophan, nitrotryptophan, kynurenine, 3-hydroxykynurenine, formylkynurenine
Tyrosine	3,4-Dihydroxyphenylalanine, Tyr-Tyr cross-linkages, Tyr-O-Tyr, cross-linked nitrotyrosine

Figura 3: Residui di aminoacidi delle proteine ossidate e prodotti formati; immagine da Cabiscol et al. 2000 [1]

Come illustrato nella figura seguente, l'attacco ossidativo alla catena polipeptidica è innescato dalla estrazione OH^\bullet dipendente dell'atomo α -idrogeno di un residuo amminoacidico per formare un radicale carbonioso (reazione c nella figura). Il radicale idrossile necessario per questa reazione può essere ottenuto anche da radiolisi dell'acqua o da scissione catalizzata da metallo di H_2O_2 (reazioni a e b). Il radicale carbonioso così formato reagisce rapidamente con O_2 per formare un possibile generatore di radicali alchilperossidici (reazione d), che può dare origine all'alchilperossido (reazione f), seguito dalla formazione di un radicale alcossile (reazione h), che può essere convertito ad un derivato proteico idrossilico (reazione j). Significativamente, molte delle fasi in questo percorso che sono mediate da interazioni con H_2O_2 e possono essere catalizzate anche da Fe^{2+} (reazioni e, g, e i) o da Cu^+ (non mostrate). L'intermedio alchilico e alchilperossidico in questo percorso può subire reazioni secondarie con altri residui di aminoacidi nella

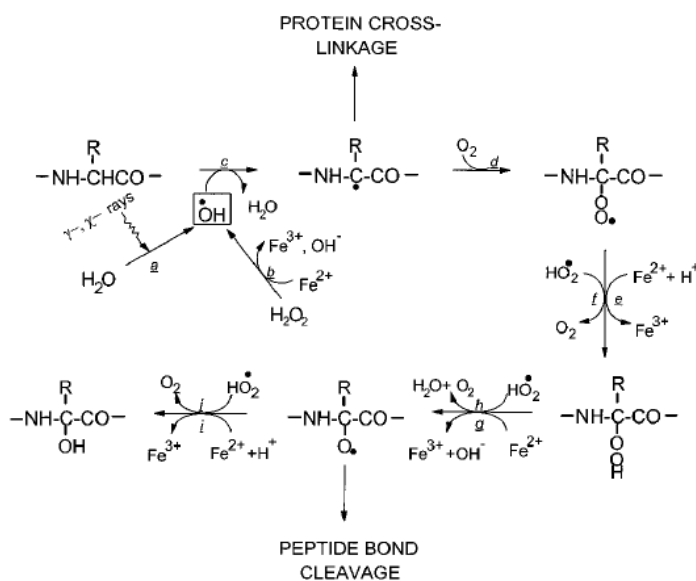


Figura 4: Ossidazione ROS-mediata delle proteine; immagine da Berlett & Stadtman 1997 [5]

stessa o una molecola di proteina diversa per generare un nuovo radicale concentrato sul carbonio in grado di sottoporsi a reazioni simili a quelle illustrate finora. Inoltre, in assenza di ossigeno, quando la reazione d nella figura è impedita, il radicale centrato sul carbonio può reagire con un altro radicale centrato sul carbonio per formare un derivato cross-linked proteina-proteina [1][3][4].

L'ossidazione catalitica metallica (MCO) delle proteine è un meccanismo di modifica post-traslatoria che lega un catione capace di ciclo redox (come $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) ad un sito di legame metallico sulla proteina. La reazione con ossigeno molecolare o H_2O_2 genera ROS che ossidano i residui amminoacidici presso o vicino a quello sito di legame del catione. Questi prodotti reagiscono in modo specifico

nel sito, e la reazione è considerata come un processo "in gabbia" in cui il ROS prodotto non è rilasciato nel mezzo circostante ma reagisce preferenzialmente coi gruppi funzionali del o circostanti al sito di legame del metallo. In questo meccanismo, si suppone che il principale ROS prodotto sia il radicale idrossile mediante reazione di Fenton, tuttavia, possono anche formarsi altre tipologia di ROS. [2][3]

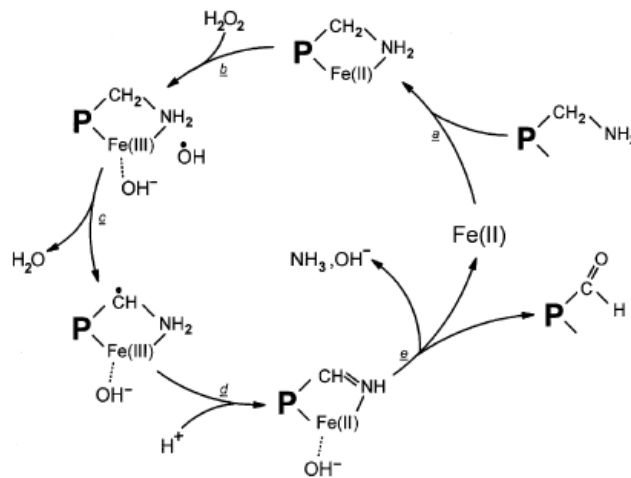


Figura 5: Ossidazione di proteine sito-specifica metallo catalizzata: immagine da Stadtman & Levine 2003 [3]

Spesso sono monitorati come marker di danno ossidativo le proteine carbonilate. Esse sono originate per ossidazione diretta di alcuni residui della catena laterale o per formazione di addotti. Per esempio è stato dimostrato che gli alcheni α , β -insaturi come il 4-idrossinonale prodotti durante la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi reagiscono con i gruppi solfidrilici delle proteine per formare addotti stabili. I gruppi carbonilici vengono anche introdotti nelle proteine mediante reazione con i derivati carbonilici (chetoammine e chetoaldeidi) generati come conseguenza dell'ossidazione di zuccheri riducenti o dei loro prodotti di ossidazione con residui lisinici.[1][3][4]

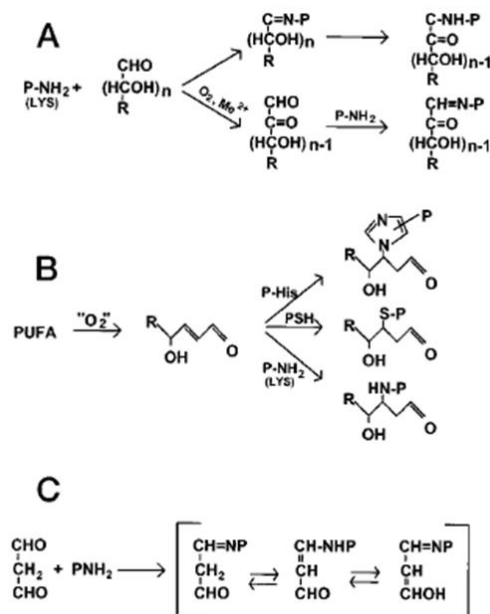


Figura 6 :Formazione di proteine carbossilate mediante glicazione, glicosidazione, e da reazioni con prodotti di perossidazione lipidica (PUFA). A, reazioni di uno zucchero con gruppi idrossi-proteici, lisina (P-NH₂). B, addizione di 4-idrossi-2-nonenal alla proteina con lisina (PNH₂), istidina (P-His) o cisteina (PSH). C, reazione di proteine con gruppo amminico (PNH₂) con il prodotto di perossidazione lipidica, MDA.; immagine e didascalia da Berlett & Stadtman 1997 [5]

Altro fenomeno ossidativo deriva dalla formazione del perossinitrito. I residui di metionina e cisteina sono particolarmente vulnerabili all'ossidazione da perossinitrito, ei residui di tirosina e triptofano sono obiettivi selettivi per la nitratazione dipendente da perossinitrito. La nitratazione dei residui di tirosina è un problema poiché impedisce la capacità dei residui di tirosina di subire interconversioni cicliche tra forme fosforilate e non fosforilate o tra forme nucleotidilate e non modificate compromettendo uno dei più importanti meccanismi di regolazione cellulare di trasduzione del segnale.[4]

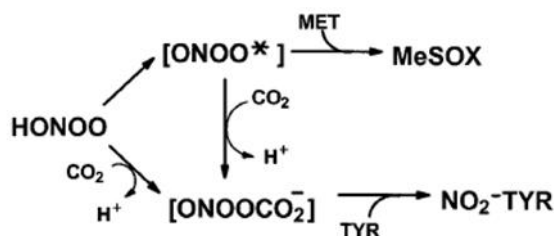


Figura 7: Effetti del perossinitrito sui residui aminoacidici; immagine da Berlett & Stadtman 1997 [5]

[1] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species; Internatl Microbiol (000;3:3–8

[2] Stadtman ER Protein oxidation and aging. Science 1992;257:1220–1224

[3] Stadtman ER & Levine RL; Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 2003;25:207–218

[4] Berlett BS & Stadtman ER; Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. The Journal Of Biological Chemistry 1997;272(3):20313–20316

1.4.3 DNA

In caso di stress ossidativo I meccanismi di danneggiamento del DNA sono essenzialmente due, anche se entrambi portano alla denaturazione dello stesso: la diretta ossidazione dello stesso e la formazione di radicali e addotti. L'ossidazione diretta del DNA può avvenire per contatto diretto con specie ossidanti quali per esempio l'ossigeno singoletto diffuso nei tessuti o per estrazione di un idrogeno radicalico a causa di radicali liberi, tipicamente idrossilici. I fenomeni di ossidazione possono avvenire su tutte le basi puriniche e pirimidiniche, ma anche a carico del 2-deossiribosio. Dalla reazione tra il radicale carbonilico così formatosi e il radicale idrossile si formano i principali addotti. In realtà i meccanismi sono vari e molto complessi e dipendono dalle proprietà e dalle condizioni delle molecole e dell'ambiente coinvolto; per esempio dalla presenza o meno di ossigeno. Alcuni meccanismi comprendono anche la formazione di perossidi, quindi esiste anche un minimo effetto di propagazione. Il principale marker di stress ossidativo a carico del DNA è fornito da 8-idrossideossiguanosina (8-oxo-dG). [1][2]

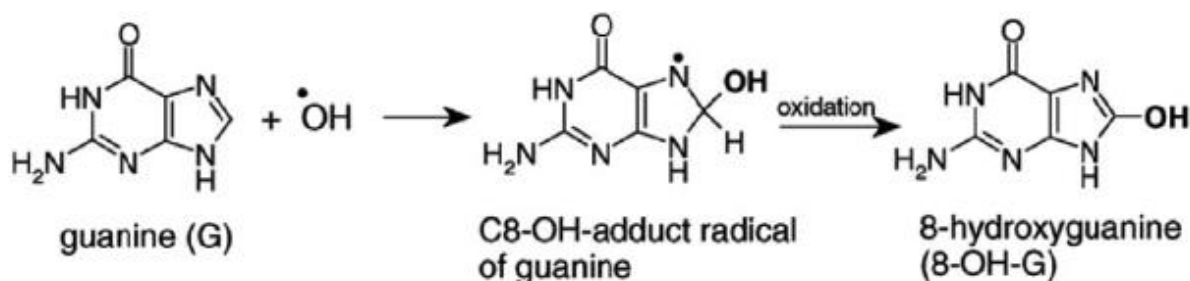


Figura 8: Formazione di 8-oxo-dG; immagine da Klaunig et al. 2010 [3]

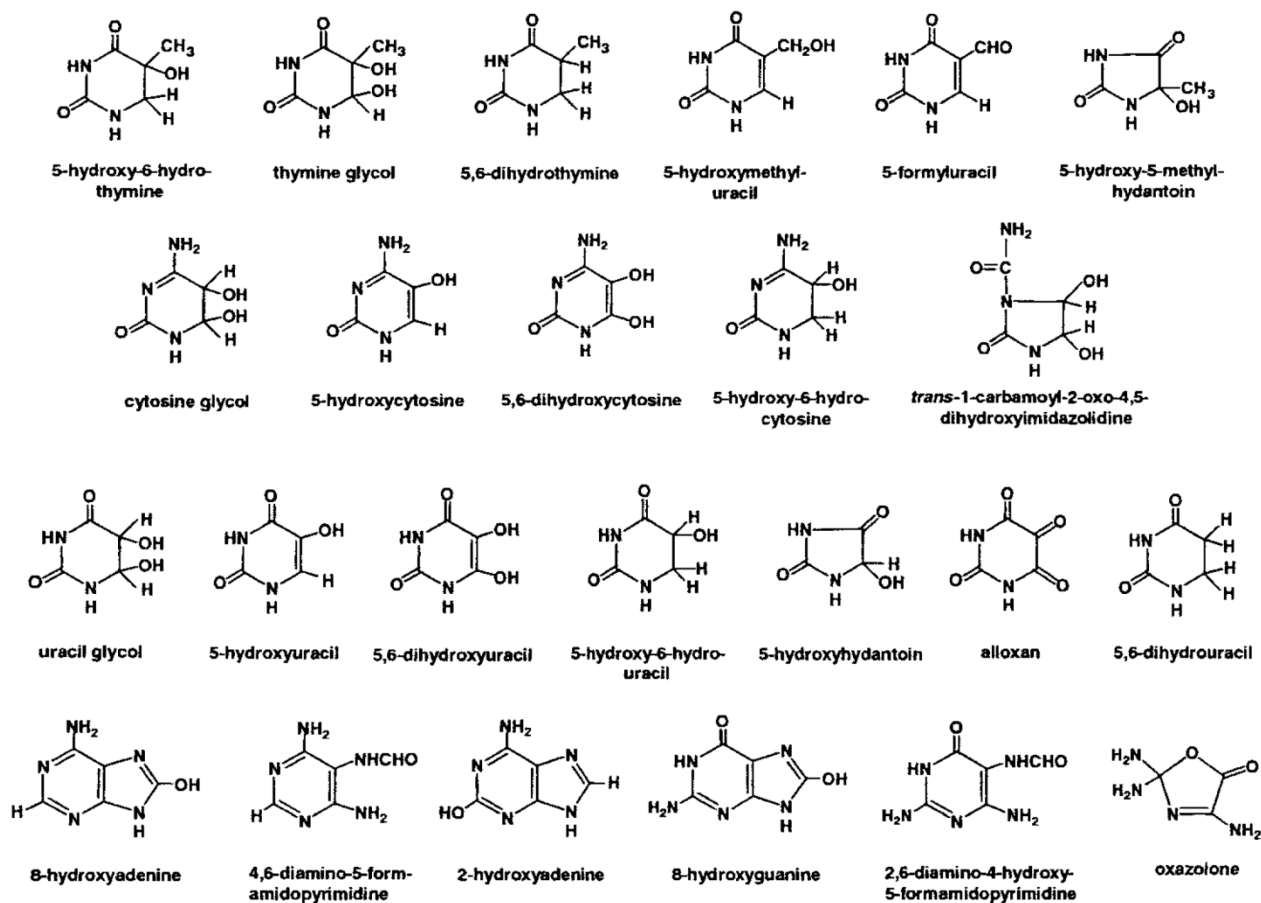


Figura 9: Possibili prodotti di ossidazione del DNA; immagine da *Cooke et al. 2003* [2]

[1] Aust AE, Jamie F Eveleigh Mechanisms of DNA Oxidation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1999;222(3):246–252

[2] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17:1195–1214

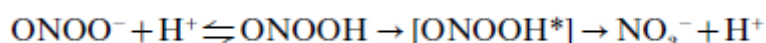
[3] Klaunig JE, Kamendulis JM, Hococevar BA; Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 2010;38:96-109

1.5

CENNI SULLO STRESS NITROSATIVO

Spesso trascurato, è lo stress nitrosativo ossia inerente alla chimica delle RNS. Le RSN includono l'ossido d'azoto (NO) e il biossido di azoto (NO₂) oltre a specie non radicaliche quali l'ione perossinitrito (ONOO⁻) e nitrosamine. Nei mammiferi, le RNS derivano principalmente da NO, che è sintetizzato a partire da O₂ e L-arginina, e dalla sua reazione con l'anione superossido con conseguente formazione di perossinitrito. Quest'ultimo è in grado di indurre la perossidazione lipidica e la nitrosazione di molte molecole, tra cui la tirosina, che normalmente agiscono come mediatori della funzione enzimatica e della trasduzione del segnale. L'ossido nitrico è un radicale libero con proprietà vasodilatatorie ed è un'importante molecola di segnalazione cellulare coinvolta in molti processi fisiologici e patologici. Sebbene gli effetti vasodilatatori del NO possano essere terapeutici, l'eccessiva produzione di RNS può influenzare la struttura e la funzione proteica e, di conseguenza, può causare cambiamenti nell'attività enzimatica catalitica, modificare l'organizzazione citoscheletrica e pregiudicare la trasduzione del segnale cellulare. Le condizioni ossidanti disturbano le risposte vasodilatatorie e gli effetti connessi con NO sono stati proposti anche per la produzione di ROS a partire dall'interazione tra NO e l'anione superossido. In assenza di L-arginina e in condizioni di basso tenore di antiossidanti, aumenta la produzione intracellulare dell'anione superossido. L'incremento dei livelli di anioni superossido favorisce le reazioni tra esso e NO per generare perossinitrito, si così la generazione di una specie tossica e il decremento di una specie utile. Da un punto di vista strettamente stechiometrico anche un eccessivo aumento di NO, in seguito a vari stimoli, favorisce la formazione dello ione perossinitrito. La sopravvivenza cellulare è in gran parte dipendente dai livelli fisiologici sostenuti di NO. Il sistema enzimatico ossido nitrico sintetico (NOS) catalizza la formazione di NO da O₂ e L-arginina utilizzando NADPH come donatore di elettroni ed è costituito dalle seguenti isoforme: NOS neuronali (nNOS o NOS I), NOS inducibile (iNOS o NOS II) e NOS endoteliali (eNOS o NOS III). In generale, NO prodotto da eNOS e da nNOS sembra regolare le funzioni fisiologiche mentre la produzione di NO indotta da iNOS è più attiva nelle situazioni fisiopatologiche. iNOS è espresso principalmente nei macrofagi dopo l'induzione da parte delle citochine. [1][2]

L'anione perossinitrito prodotto della reazione tra l'anione superossido e NO, e il suo acido coniugato, l'acido perossinitroso (ONOOH) sono ossidanti potenti noti per essere in grado di ossidare un'ampia gamma di bersagli biologici. L'anione perossinitrito è una specie relativamente stabile; tuttavia, l'acido perossinitroso decade, riorganizzandosi in nitrato con un'emivita inferiore a 1 s a pH fisiologico e 37 °C. L'elevata reattività dell'anione perossinitrito sembra essere legata alla formazione di un intermedio estremamente reattivo durante il riarrangiamento da acido nitroso a nitrato. [3]



Il principale stimolo alla produzione di NO è l'ipossia. In condizioni d'ipossia il citocromo C ossidasi che in condizioni normali catalizza la riduzione dell'ossigeno ad acqua catalizza la riduzione dello ione nitroso ad NO. Esiste tutta una serie di meccanismi di controllo della concentrazione di NO, come per esempio quello basato sulla flavoemoglobina, un enzima catalizzante la reazione da NO a ione nitrato, ma in condizioni di forte stress ossidativo, non sono sempre sufficienti e quindi inizia la reazione di formazione dello ione perossinitrito e la conseguente innescazione dello stress nitrosativo. [4].

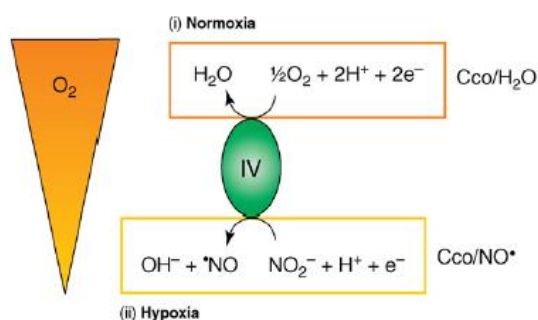


Figura 1: Produzione di NO in situazione d'ipossia; immagine da Poyoton et al. 2009 [4]

Il principale bersaglio dello stress nitrosativo sono le proteine in particolare i gruppi tiolici (solitamente residui di cisteina), e i residui di tirosina, metionina, istidina e triptofano. [5]. Per quanto riguarda i gruppi tiolici, se si parla di semplici processi

ossidativi si possono incorrere in ossidazioni, generalmente reversibili, ad acido solfenico (R-SOH) o a legami, intra e inter-molecolari disolfuro (R-S-S-R), in caso di ossidazioni irreversibili si ha la formazione di acidi solfinici (R-SO-OH) e acido solfonici (R-SO₂-OH). Altra reazione dell' NO con i gruppi cisteinici è la formazione di addotti S-nitrotiolicci, che se prodotti in quantità fisiologiche fungono da riserva di NO vista la loro relativa reversibilità. I residui di metionina, istidina e triptofano sono particolarmente soggetti all'ossidazione per opera dello ione perossinitrito mentre i residui di tirosina tendono a formare addotti [5]. Lo stress nitrosativo è coinvolto in molte patologie, in ordine sparso ricordiamo: diabete [2], aterosclerosi [5], Alzheimer [5], aterosclerosi [5], malattia polmonare cronica ostruttiva [5], preeclampsia [1], artrite reumatoide [5] e arresto cardiaco [6].

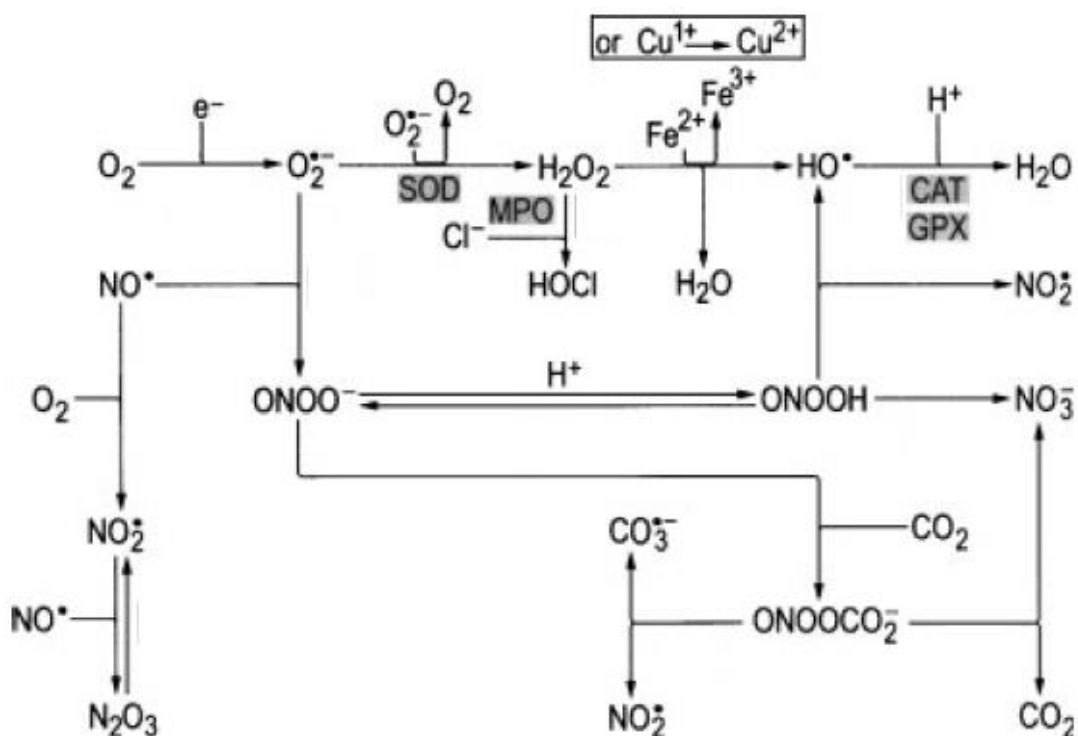


Figura 2: Pathway reattivo delle RNS in relazione alle ROS; immagine rielaborata da Dalle-Donne et al. 2005 [5]

[1] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A and Gupta S The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. Reproductive Biology and Endocrinology 2012;10
 [2] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E et al. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. Rev Diabet Stud. 2010; 7(1):15–25.
 [3] UIJANO C, ALVAREZ B, M. GATTI RM, et al. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. Biochemical Journal 1997; 322(1):167-173
 [4] Poyton OR, Ball KA, Castello PR Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. Trends in Endocrinology and Metabolism 2009;20(7)
 [5] Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. Mass Spectrometry Reviews 2005;24: 55–99
 [6] Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, et al. Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. Front Biosci (Landmark Ed). 2009;1(14):2230-7

2

LA DETERMINAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO

Come già ampiamente spiegato nel capitolo precedente una condizione di stress ossidativo può essere generata da una sovrapproduzione di specie reattive o da una riduzione delle rete antiossidante. Lo stress ossidativo può essere sia causa che epifenomeno di svariate patologie e anche se spesso non è facile distinguere tra i due casi è di notevole importanza poter risolvere tale ambiguità. Purtroppo lo stress ossidativo è una condizione fisiologica complessa in cui sono coinvolte svariate reazioni biochimiche, spesso diverse a seconda del comparto interessato o del fenomeno scatenante e quindi non si è potuto sviluppare una metodologia analitica univoca. Nel tempo sono stati presentati numerosi metodi basati su principi diversi. I vari metodi possono essere classificati in vari gruppi [1]:

- a) determinazione diretta o indiretta delle specie chimiche di natura radicalica mediante risonanza magnetica dell'elettrone (EPR electronic paramagnetic resonance o ESR electronic spin resonance); questo tipo di analisi è ritenuto il golden standard nell'analisi qualitativa e quantitativa di specie radicaliche;
- b) metodologie di quantificazione di specifici sottoprodotti o intermedi derivanti da processi ossidativi
- c) metodologie basate su reazione delle specie reattive con composti fluorescenti o chemiluminescenti
- d) metodologia per la quantificazione del potere antiossidante di un fluido o di tessuto in genere riferita come capacità riducente nei confronti di un specifico substrato o quantificazione di marker antiossidanti
- e) metodologie elettrochimiche per la determinazione del potere antiossidante totale o di analiti marker di stress ossidativo.
- f) marker generici di stress (non necessariamente ossidativo) : cortisolo

[1] Cornelli U. I modulatori fisiologici; 2010 ed. MediService

2.1 DETERMINAZIONE DIRETTA O INDIRECTA MEDIANTE RISONANZA DI SPIN ELETTRONICO

Marker individuato o nome delle tecnica	Ref.
Alfa-fenil-N-tert-butilnitrono	[1]
Idrossilazione aromatica del salicinato	[2]
Radicale ascorbico	[3] [4]

Uno dei metodi spettroscopici più usato e conosciuto per l'individuazione e lo studio dei radicali è la spettroscopia di risonanza di spin elettronico. La spettroscopia di risonanza di spin elettronico è una tecnica che permette lo studio di radicali liberi stabili o persistenti. Essa permette inoltre lo studio di specie radicaliche transienti che si formano nel corso di una reazione se sufficientemente stabili. Inoltre mediante tecniche di spin-trapping, normalmente applicate a problematiche di biochimica, è possibile studiare anche radicali instabili. La tecnica dello spin-trapping consiste nel far legare una specie radicalica, quindi paramagnetica con un opportuno agente catturante diamagnetico, quindi la specie risultante sarà comunque un radicale, ma con struttura tale per cui la stabilità della specie radicalica finale sia sufficientemente stabile da essere analizzata. Da spettri ESP possono essere ottenute informazioni strutturali e di carattere cinetico oltre che informazioni sulla formazione e il decadimento dei radicali. Questa tecnica analitica si presta anche ad interpretazioni di carattere quantitativo. La spettroscopia di risonanza di spin elettrico è basata sulle caratteristiche fisiche dell'elettrone. L'elettrone è una particella subatomica che possiede una certa massa ed una certa carica, dotata di un movimento di rotazione attorno a se stessa che viene chiamato spin (trottola). Tale spin può essere uguale a $\frac{1}{2}$ o a $-\frac{1}{2}$ a seconda del verso in cui ruota l'elettrone. A causa della sua rotazione l'elettrone genera un campo magnetico. Nel caso in cui l'elettrone sia sottoposto ad un campo magnetico esterno l'energia dei due stati di spin, che in condizioni normali sono degeneri, ossia avente pari energia, viene modificata a causa dell'interazione del campo magnetico esterno con quello generato dall'elettrone.

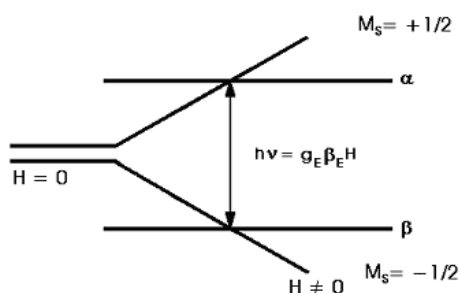


Figura 1: Splitting dei livelli di spin di un elettrone in presenza di un campo magnetico H.

La differenza di energia che si viene a creare tra i due stati di spin dipende dall'intensità del campo magnetico applicato e da un valore denominato g_E pari a 2,003 per l'elettrone libero e dipendente dall'intorno per quanto riguarda le molecole. Quando l'elettrone è esposto ad una radiazione elettromagnetica appropriata la cui frequenza ν soddisfa la condizione di risonanza, sono possibili transizioni tra i due livelli energetici cioè gli elettroni possono assorbire o emettere energia per passare da uno stato all'altro. Solitamente si ha assorbimento. In termini pratici si irradia il campione con microonde a frequenza fissa e si fa variare il campo magnetico fino ad ottenere il fenomeno della risonanza. Tale fenomeno è registrato come un picco di assorbimento caratteristico della specie paramagnetica in esame, in quanto dipendente da g_E e viene rivelato come derivata prima dell'assorbimento, in funzione dell'intensità del campo magnetico. L'uso della derivata dipende dalla necessità di ampliare segnali di debole intensità.

Uno spettrometro EPR consiste di: un elettromagnete, il quale permette di variare con continuità il campo magnetico applicato; un generatore di radiazioni elettromagnetiche che emette microonde in un campo molto ristretto di frequenze; una cella portacampioni; un rivelatore che permette di misurare l'entità dell'assorbimento subito dalla radiazione elettromagnetica e da un rivelatore.

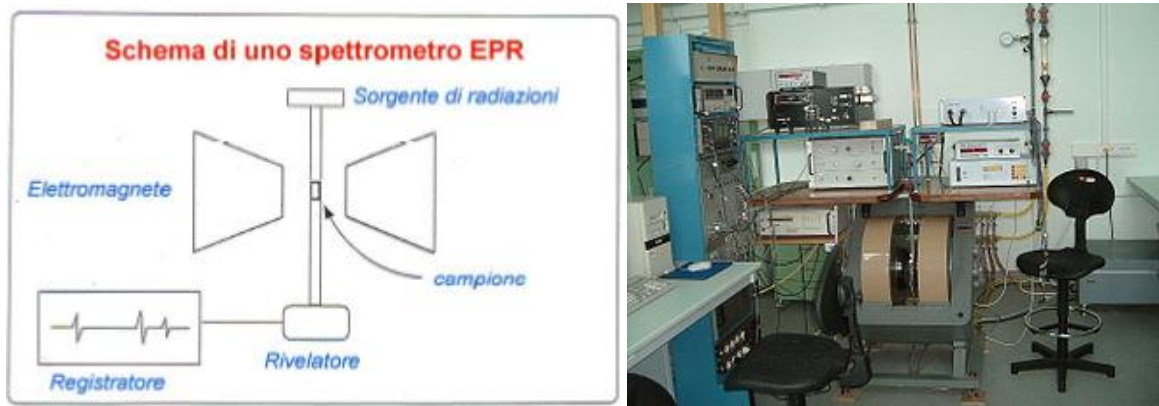


Figura 2: Schema e fotografia di un spettrometro EPR

Uso di tecniche EPR nello studio di tematiche biochimiche è spesso associato all'applicazione di metodiche spin-trap, di fatto solo l'ossido nitrico è sufficientemente persistente da essere determinato direttamente. Gli spin-trap devono essere messi a contatto con le specie reattive per determinarne la reazione ma questo porta alla formazione di addotti che sono rilevati dallo spettrometro EPR ma possono anche alterare i processi cellulari, quindi i risultati di tali analisi vanno ponderati con cautela. Alcuni spin-trap possono essere utilizzati senza problemi come il salicinato, l'antipirina o la fenilalanina, quest'ultima utilizzato spesso per la determinazione del radicale idrossile, in quanto non tossici. Più spesso a causa della loro tossicità si possono utilizzare solo in esperimenti ex vivo o su animali come 5,5-dimetil-1-pirrolina N-ossido (DMPO), ma anche 1,1,3-trimetil-isoindolo N-ossido (TMINO), 5,5-dietilcarbonil-1-pirrolina N-ossido (DECPO) e altri ancora [5]. Inoltre l'esecuzione di tali test comporta l'utilizzo di strumentazione complessa e personale altamente formato oltre che tempistiche non indifferenti. Per tutti questi motivi le tecniche EPR non escono dai laboratori di ricerca e difficilmente potranno diventare tecniche routinarie.

- [1] Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet JJ, Goudeau JJ, Lecour S, David M, Rochette L, Girard C. Systemic Free Radical Activation Is a Major Event Involved In Myocardial Oxidative Stress Related to Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesiology* 2002; 96:80-7
- [2] INGELMAN-UNDBERG M, KAUR H, TERELIUS Y, PERSSON JO, HALLIWELL B. Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. *Biochem. J.* 1991; 276, 753-757
- [3] Buettner GR1, Jurkiewicz BA. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(1):49-55.
- [4] Roginsky VA1, Stegmann HB. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. *Free Radic Biol Med.* 1994 Aug;17(2):93-103.
- [5] Halliwell H, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004; 142: 231-255

2.2

DETERMINAZIONE DI MOLECOLE DERIVANTI DA PROCESSI DI OSSIDAZIONE

Le specie radicaliche non sono solitamente di facile analisi, spesso sono specie instabili di breve permanenza nei cicli metabolici e anche qualora fossero presenti stabilmente nei tessuti, le tecniche di rivelazione diretta non sono sempre di semplice applicazione, vedi tecniche EPR, quindi nella valutazione dello stress ossidativo è utile individuare dei marker di facile analisi. Un marker è definito come una sostanza quantificabile, stabile e quindi resistente alla degradazione, utilizzabile come indicatore di un particolare stato fisiologico. Stante questa definizione sono definibili come marker tutte quelle molecole più o meno facilmente analizzabili, derivanti dai processi di ossidazione a carico delle principali biomolecole, lipidi, DNA e proteine. Il marker ideale dovrebbe avere determinate caratteristiche:

- dovrebbe essere chimicamente stabile, ossia non soggetto ad alterazioni durante la manipolazione e lo stoccaggio del campione
- dovrebbe avere un ruolo nella patogenesi di una malattia e nel migliore dei casi dovrebbe essere predittivo del suo decorso
- essere presente nel tessuto d'indagine o ad esso correlabile
- le sue tecniche di analisi devono essere sufficientemente precise e riproducibili, ed il più semplici possibile
- non deve essere influenzato da fattori dietetici
- avere una bassa variabilità biologica
- devono esistere dati sull'intera popolazione

Come è facile immaginare difficilmente un singolo marker potrà avere tutte le caratteristiche necessarie e per questo motivo si utilizzano i marker più disparati anche compatibilmente con il fine delle analisi.

Marker individuato o nome delle tecnica	Ref.
Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS)	[1] [2] [3]
Malondialdeide (MDA)	[1] [4] [5] [6]
4-idrossinonenale (HNE)	[7] [8] [9] [10]
Idrocarburi respiratori	[11] [12]
Isoprostani	[13] [14] [15] [16]
DNA ossidato (8OHdG)	[17] [18]
Proteine carbonilate	[19] [20] [21]

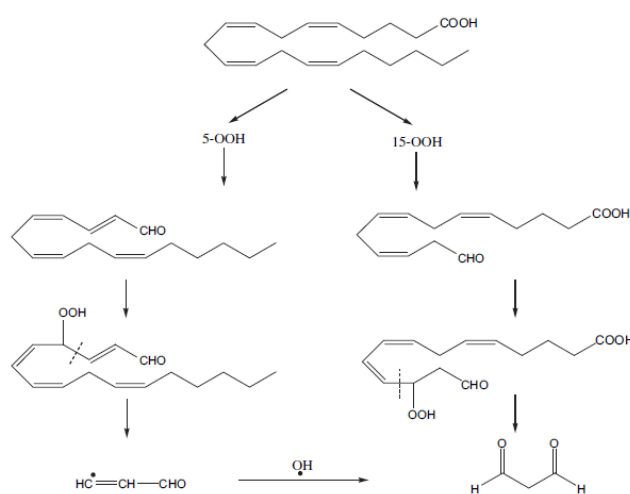


Figura 1: Biosintesi di MDA, illustrazione da *Del Rio et al.* [1]

Tra i primi markers di stress ossidativo ad essere studiato, e tuttora molto analizzato, vi è la malondialdeide (MDA). Tale molecola è prodotta durante i processi di perossidazione degli acidi grassi polinsaturi con due o più doppi legami separati da un solo carbonio. Le modalità di produzione della MDA non sono ancora del tutto note. Tra le ipotesi proposte abbiamo quella di Stanley [22] secondo cui la MDA deriverebbe da un precursore non volatile con struttura contenente un perossido biciclico simile a quello presente nella biosintesi delle prostaglandine. Da questo precursore si formerebbe MDA in condizioni di stress ossidativo.

Due meccanismi di sintesi alternativi sono stati proposti in tempi più recenti da Esterbauer [23]. Essi si basano sulla formazione idroperossido a partire dagli acidi grassi e successive β -scissioni della catena degli acidi grassi, come illustrato in figura 1. I primi (1970-1995) e tuttora più diffusi saggi per la determinazione della MDA sono stati sviluppati sulla base della derivatizzazione con acido tiobarbiturico (TBA). La condensazione di queste due molecole dà luogo ad un addotto ad elevata assorbività facilmente valutabile con uno spettrofotometro. Purtroppo, la specificità di questi saggi è bassa, TBA può reagire anche con composti diversi da MDA, seppur derivati dai processi ossidativi. Inoltre, il trattamento dei campioni biologici per ottenere la condensazione del prodotto viene generalmente effettuato ad alta temperatura (tra gli 80 e i 100°C per 1 ora circa a seconda della metodica) e questo può generare un'ulteriore ossidazione della matrice con evidente sovrastima dei risultati. Per ridurre al minimo l'ossidazione della matrice la maggior parte di questi metodi comportano la precipitazione delle proteine del campione biologico prima della reazione con TBA. Nonostante la laboriosità dei test e la loro aspecificità i saggi basati sull'addotto MDA-TBA vengono spesso utilizzati con apparente successo in studi clinici. Tuttavia viste le condizioni chimiche del test sembra che tali saggi diano una misura dell'ossidabilità del campione e non del suo stato di ossidazione [1]. Spesso queste metodiche sono denominate TBARS. In tempi recenti grazie allo sviluppo della chimica strumentale è stato possibile sviluppare metodiche alternative ai saggi appena descritti. In particolare la determinazione della MDA senza derivatizzazione è possibile mediante tecniche separative quali HPLC (high pressure liquid chromatography) accoppiate con rivelatori di assorbanza nel UV [4] o mediante GC-MS (gas-chromatography-mass-spectrometry) con rivelatore quadrupolare. [5] Quest'ultime metodiche potrebbero essere facilmente automatizzabili e quindi utilizzabili per analisi routinarie, ma visto l'alto costo iniziale dei macchinari e la necessità di personale altamente specializzato non si sono mai realmente diffuse al di fuori dei laboratori di ricerca. È stato fatto anche qualche tentativo di determinare la MDA mediante reattivo di Schiff, reattivo aspecifico sensibile alle aldeidi, ma con scarsi risultati. [6] Un'altra tipologia storica di marker dei processi di lipoperossidazione sono gli idrocarburi respiratori, in particolare pentano ed esano derivanti da acidi grassi polinsaturi n-3 o n-6 [24]. Già dagli anni '70 del secolo scorso è nota la correlazione tra lipoperossidazione e tali idrocarburi presenti nell'esalato respiratorio [25], e già negli anni '80 si iniziò ad applicare tecniche strumentali atte alla loro misurazione come la gas-cromatografia [12]. La misura degli idrocarburi nell'esalato respiratorio, essendo non una tecnica invasiva, potrebbe essere particolarmente adatta per l'uso di routine nella ricerca e nella clinica, tuttavia, la mancanza di metodi standardizzati per la raccolta, l'elaborazione e l'analisi dell'aria espirata ha comportato l'uso di una grande varietà di tecniche diverse che hanno dato risultati anche molto discordanti tra loro. La principale fonte di errore deriva dalla contaminazione del campione con l'aria dell'ambiente di campionamento presente nei polmoni del soggetto, in cui di solito le concentrazioni di idrocarburi sono molto più grandi e più variabili rispetto a all'aria espirata. [11]

Un altro marker derivante da processi di lipoperossidazione, di più recente utilizzo è il 4-idrossinonenale (HNE). Quest'aldeide deriva da acidi grassi polinsaturi (PUFA) aventi un doppio legame C=C in posizione 6 come l'acido arachidonico, il più efficiente precursore di HNE, o l'acido linoleico. Il meccanismo di formazione di HNE dai PUFA non è ancora pienamente noto ma sembra essere di natura radicalica non enzimatica il cui primo step potrebbe essere la formazione di un lipoperossido. HNE può essere analizzato come tale o mediante analisi dei suoi numerosi addotti, derivanti dalla sua straordinaria reattività nei confronti di vari substrati [7]. Le metodologie di analisi dell'HNE sono piuttosto varie e solitamente di natura strumentale, vanno da tecniche di gascromatografia a tecniche di spettrometria di massa accoppiata con elettrospray [7]. Esistono tecniche basate su HPLC con rivelazione in assorbimento UV [8]. La tecnica strumentale più semplice, e forse l'unica applicabile alla pratica clinica quotidiana è la derivatizzazione di HNE con 1-metil-2-fenilindolo e quantificazione mediante analisi colorimetrica dell'addotto, ma questa tecnica tende a sovrastimare il dato non essendo altamente specifica e rivelando tutte le aldeidi a 9 carboni [9]. Molto diffuse sono anche tecniche di immunofissazione denominate Western blot [10] Questa tipologia di metodica biologica è generalmente basata su di una separazione elettroforetica delle proteine su poliaccrilamide, trasferimento delle stesse su membrana di nitrocellulosa mediante capillarità, spesso coadiuvata da tecniche di electroblotting. La rivelazione qualitativa e quantitativa avviene mediante tecniche di assorbimento UV-visibile o chemiluminescenza associate a tecniche ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) o ELISpot.

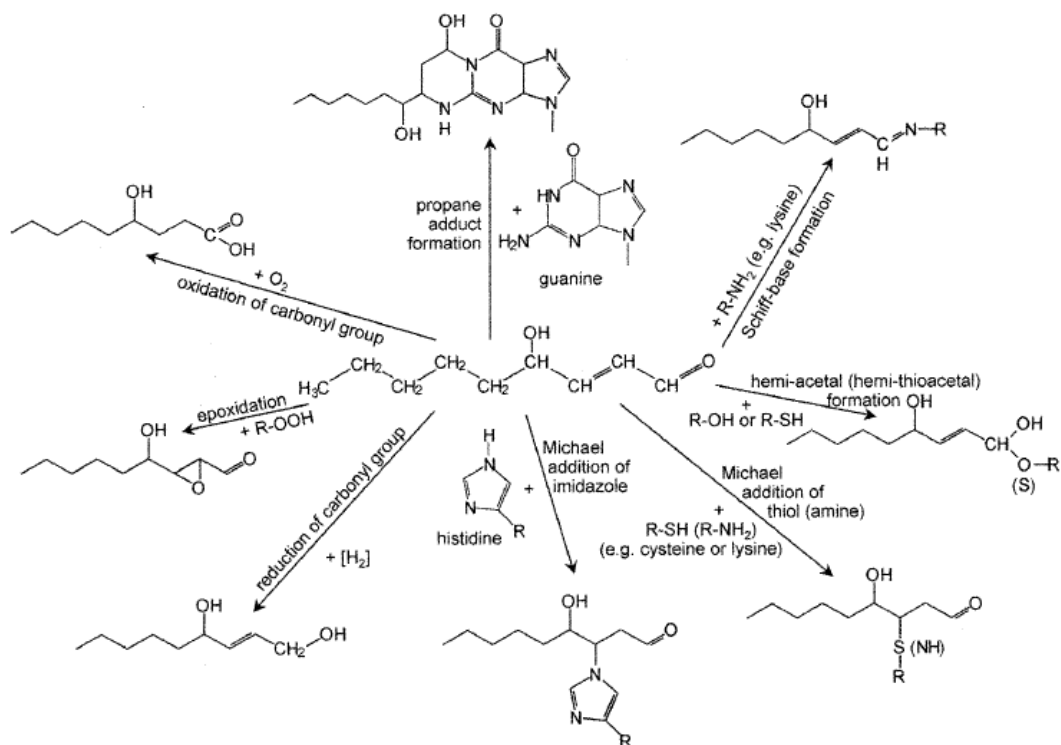


Figura 2: Panoramica delle reazioni del HNE con vari substrati, illustrazione da *Poli et al.* [7]

Altra classe di marker dei processi di ossidazione lipidica molto nota e utilizzata specialmente in ambito di ricerca è quella degli isoprostani. La classe di isoprostani più utilizzata come marker è denominata F2-IsoPs dalla presenza di un anello di tipo F2 analogo alla prostaglandina 2 α . Un possibile meccanismo di formazione di tali molecole si basa sulla generazione di formazione di perossido biciclico per addizione di ossigeno all'acido arachidonico radicalizzato per perdita di un elettrone da un suo doppio legame, formazione di perossido radicale per ulteriore addizione di ossigeno e stabilizzazione dei gruppi perossidici

a idrossilici per addizione di idrogeno. Sulla base di questo meccanismo di formazione, si formano quattro regioisomeri indicati come 5-, 12-, 8 o 15-serie a seconda dell'atomo di carbonio a cui è collegato l'ossidrilica catena laterale. La principale tecnica di analisi degli isoprostani è la spettroscopia di massa accoppiata alla gascromatografia o alla cromatografia liquida ad alte pressioni. Gli isoprostani vengono solitamente determinati nelle urine [13], ma anche nel plasma sanguineo [14], e più raramente nell'esalato [15].

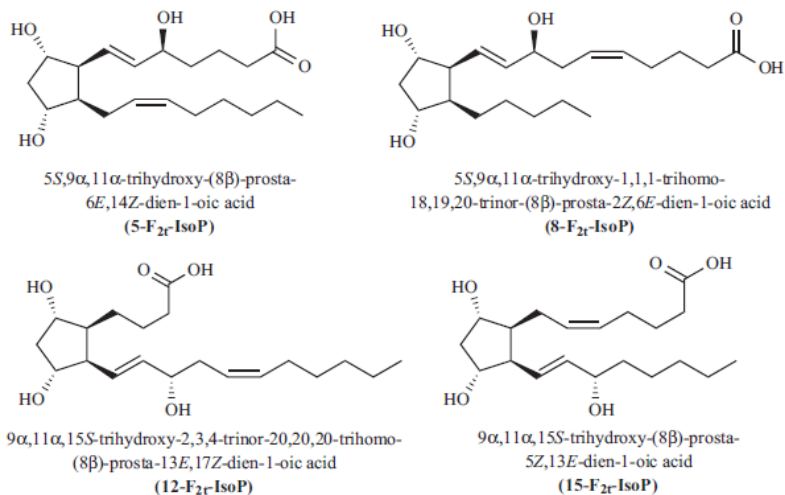


Figura 3: struttura delle 4 serie di isoprostani. Modificato da *Schwedhelm et al.*[16]

Altra tipologia di macromolecola facilmente suscettibile di attacco da parte dei radicali liberi è il DNA, tale fenomeno viene indicato come danno ossidativo al DNA. Le possibili reazioni sono molteplici ma i principali prodotti dell'ossidazione radicalica del DNA sono addotti di natura radicalica composti da base azotate e radicale H \cdot o OH \cdot , più raramente questi addotti comprendono la molecola di zucchero. Esistono varie

tecniche analitiche per la misura del danno ossidativo al DNA. Le tecniche di GC (gas-chromatography) o di LC (liquid-chromatography) o MS (mass-spectrometry) possono misurare simultaneamente numerosi prodotti diversi, e fornire un'analisi accurata del danno ossidativo. La misurazione di più prodotti evita conclusioni fuorvianti che potrebbero essere tratte dalla misurazione di un singolo prodotto, in quanto i livelli di prodotto variano in funzione delle condizioni di reazione e dello stato redox delle cellule. In passato, GC-MS è stata utilizzata per la misurazione del glucosio e delle basi modificate oltre che di addotti DNA-proteina, mentre più recentemente si è utilizzato LC-MS/MS (liquid-chromatography-mass spectrometry tandem) per la misurazione dei nucleosidi modificati. Con l'uso di queste tecniche di misurazione potrebbero però crearsi artificialmente degli addotti non originariamente presenti nel campione. L'uso di condizioni sperimentali adeguate può evitare la formazione di addotti artificiali [17]. Il principale marcatore di stress ossidativo del DNA è l'addotto che si forma dalla reazione di addizione di un radicale idrossile al C8 della base azotata guanina denominato 8-deossiguanosina (8OHdG)[26]. Esso può essere rilevato e quantificato con metodologia LC-MS o con metodologie ELISA. Sebbene sia possibile, la sua analisi a livello cellulare, la metodologia stessa comporta la parziale ossidazione del DNA e comunque quando anche ciò non avvenga normalmente non si conoscono i livelli basali di 8OHdG per un opportuno confronto. Più utile è la determinazione del livello di stress del DNA sistemico mediante la misura del 8OHdG nelle urine.[18]

Un diffuso biomarker di stress ossidativo a livello sistemico è costituito dai gruppi carbonilici, aldeidici o chetonici presenti sulle catene laterali delle proteine, specialmente sui residui di prolina, arginina, lisina e tirosina. I gruppi carbonilici hanno il vantaggio di essere chimicamente stabili, il che è utile sia per quanto riguarda l'analisi che lo stoccaggio dei campioni. La generazione dei gruppi carbonilici può avvenire sia come conseguenza di diretta ossidazione delle proteine, principalmente via α -amidazione o via ossidazione della catena laterale glutaminica, con formazione di un peptide in cui l'azoto terminale è bloccato da α -chetoacido. Inoltre i gruppi carbonili possono essere introdotti nelle proteine per reazione del nucleofili presente nelle catene laterali di principalmente cisteina, istidina, o lisina, con aldeidi, tipicamente 4-idrossi-2-nonenale, malondialdeide o 2-propanale, derivanti dalla perossidazione lipidica. Altri addotti sono formati con derivati carbonilici derivanti dalla reazione di zuccheri riducenti, o dei loro prodotti di ossidazione con i residui lisinici delle proteine (reazione di glicazione). [19].

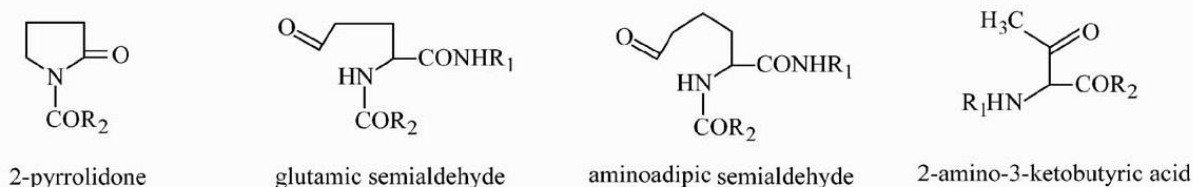


Figura 4: Strutture dei derivati carbonilici derivanti dall'ossidazione diretta della catena laterale, illustrazione da *Dalle-Donne et al. 2003* [19]

Le moderne metodologie di analisi dei derivati carbonilici sono basate sulla derivatizzazione del gruppo carbonile con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) con conseguente formazione di addotti stabili 2,4-dinitrofenilidrazoni[20]. Gli addotti così prodotti si possono facilmente analizzare con sensibilità anche significativa mediante spettrofotometria di assorbimento nell'UV, eventualmente accoppiata con HPLC per la separazione dei vari residui proteici, ma anche tecniche ELISA o elettroforetiche.[19]

[1] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2005;15:316-328

[2] Schimke I, Kahl PE, Romaniuk P, Papias B. Concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum after myocardial infarction *Klin Wochenschr.* 1986;64(23):1237-9.

[3] Glantzounis GK, Tselepis AD, Tambaki AP, Trikalinos TA, Manataki AD, Galaris DA, Tsimoyiannis EC, Kappas AM. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc* 2001;15: 1315-1319

[4] Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2002;311:76-79

[5] Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Anal biochem* 1997;245: 161-166

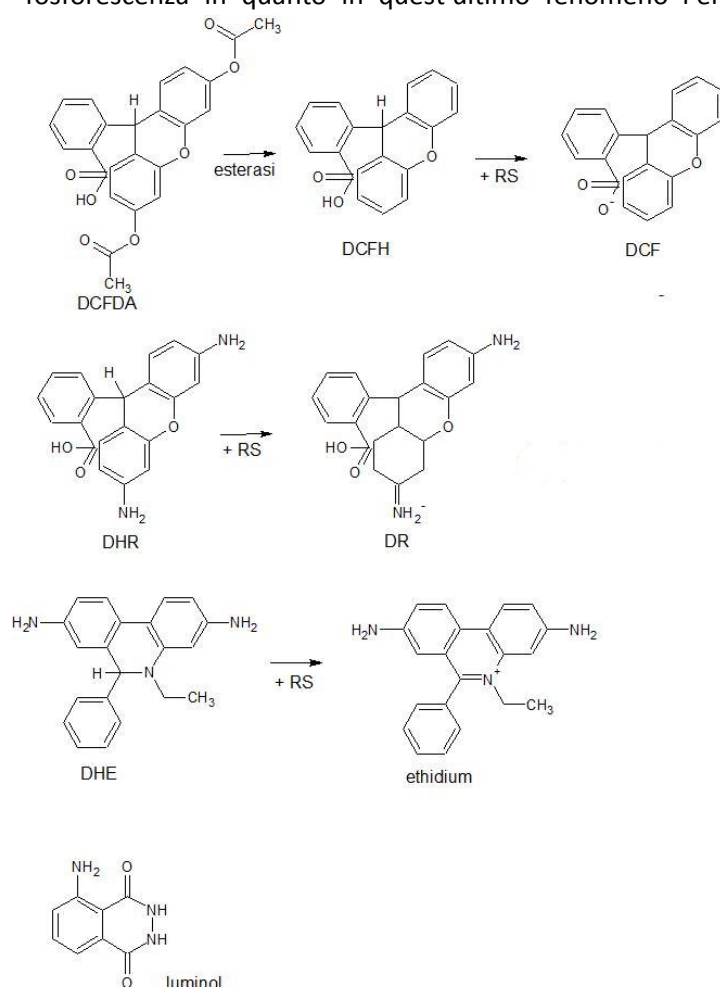
- [6] Suha A , Kilin A, Cöbek B. Evaluation of a simple colorimetric analysis for urinary malondialdehyde determination. *Pathology and Laboratory Medicine International* 2010;2:23–26
- [7] Poli G, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the Pathomechanisms of Oxidative Stress. *IUBMB Life* 2000; 50: 315–321
- [8] Lang J, Celotto C, Esterbauer H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 1985;150: 369-378
- [9] Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Règnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol* 1998;11:1176-1183.
- [10] Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-Hydroxynonenal Mediates Oxidative Stress-Induced Neuronal Apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 1997;17(13):5089–5100
- [11] Knutson MD, Handelman GJ, Viteri FE. Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;28(4):514–519
- [12] Zarlling EJ, Clapper M. Technique for Gas-Chromatographic Measurement of Volatile Alkanes from Single-Breath Samples. *CLIN. CHEM.* 1987;33/1:140-141
- [13] Milne JL, Yin H, Morrow JD. Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. *the journal of biological chemistry* 2008;283:15533–15537,
- [14] Hozawa A, Ebihara S, Ohmori K, et al. Increased Plasma 8-Isoprostane Levels in Hypertensive Subjects: the Tsurugaya Project. *Hypertension Research* 2004;27:557-561
- [15] Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, et al. Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216–220,
- [16] Schwedhelm E, Benndorf RA, Böger RH, Tsikas D. Mass Spectrometric Analysis of F2-Isoprostanes: Markers and Mediators in Human Disease. *Current Pharmaceutical Analysis* 2007;3:39-51
- [17] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;32:1102–1115
- [18] Halliwell H, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004; 142: 231–255
- [19] Dalle-Donne I, Rossib R, Giustarini D, Milzania A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003;329:23–38
- [20] Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990;186:464–478
- [21] Chevion M , Berenshtein E , Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research* 2000;33: S99-108]
- [22] Pryor WA, Stanley JP. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 1975;40:3615-7.
- [23] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81 - 128.
- [24] Kneepkens CMF, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 1994;17(2):127-160
- [25] Litov RE, Irving DH, Downey JE, Tappel AL. Lipid peroxidation: a mechanism involved in acute ethanol toxicity as demonstrated by in vivo pentane production in the rat. *Lipids* 1978;13:305-7.
- [26] Zdaroglu Md, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research* 2012; 46(4): 382–419

2.3

DETERMINAZIONE DI SPECIE REATTIVE MEDIANTE REAZIONI CHE COINVOLGONO REATTIVI FLUORESCENTI O CHEMIOLUMINESCENTI

Molecola su cui è basata la tecnica	Ref.
Diclorofluorescina diacetata (DCFDA)	[1] [2]
Diidrorodamina 123 (DHR)	[3]
Dicloeetidio (DHE)	[3]
Luminol	[4]

Queste tecniche sono perlopiù molto limitate all'ambito della ricerca per la loro intrinseca complessità, anche a livello strumentale, e sono utilizzate per studi accurati sui sistemi cellulari. Le tecniche di analisi in fluorescenza e chemiluminescenza rientrano nella categoria della spettrometria nel campo UV-visibile. La fluorescenza è la capacità di alcuni composti di emettere radiazione di lunghezza d'onda diversa, solitamente maggiore, quando irraggiati da radiazione avente una lunghezza d'onda ben determinata. La quantità totale di radiazione emessa è proporzionale alla concentrazione delle specie fluorescente. Solitamente queste tecniche prevedono l'attivazione o la disattivazione di molecole fluorescenti ad opera degli analiti onde poter eseguire una loro quantificazione diretta. La fluorescenza si differenzia dalla fosforescenza in quanto in quest'ultimo fenomeno l'emissione di radiazione continua anche dopo la cessazione dell'irraggiamento.



Le tecniche di chemiluminescenza invece sono invece basate su reazioni che durante il loro svolgimento emettono radiazione elettromagnetica. Questo è possibile con la formazione di un intermedio in uno stato eccitato che rilassandosi rilascia fotoni invece che calore.

Tra le varie molecole usate come sonde per la determinazione di specie reattive abbiamo la diclorofluorescina diacetata (DCFDA) reattiva nei confronti di radicali perossilico e alcossilico, radicale idrossilico, radical-anione carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), NO_2^{\cdot} , perossinitrito ma non nei confronti di perossido di idrogeno e radicale superossido.

[1] [2] DCFDA viene usata per la determinazione di specie reattive a livello cellulare sia nel citosol che nello spazio intracellulare. DCFDA non è una molecola fluorescente ma in ambiente cellulare essa viene deacetilata in diclorofluorescina (DCFH) da enzimi esterasi, essa è

Figura 1: Principali molecole fluorescenti e chemiluminescenti usate per la determinazione delle specie reattive.

reattiva nei confronti delle specie reattive citate formando DCF⁻ una molecola fortemente fluorescente. Alta molecola usata è diidrorodamina 123 (DHR) ossidata a rodamina 123 (DR), molecola fluorescente, da radicale idrossile ONOO⁻, NO₂[•], derivati delle perossidasi e acido ipocloroso [3]. Per la determinazione dello ione superossido può essere utilizzato dicloeoetidio (DHE) ossidato ad una molecole fluorescente, probabilmente etidio [3]. Per quanto riguarda la determinazione di specie reattive mediante chemiluminescenza la principale molecola utilizzata è il luminol anche se non esente da interferenze di varia natura . [4]

[1] Lebel CP, Ischiropoulos H, Hondy, SC. Evaluation of the probe 20,70-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5:227–231.

[2] Ischiropoulos H, Gow, A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA ,Crow JP. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol.* 1999;301:367–373

[3] Buxser Se, Sawada G, Raub Tj. Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* 1999;300:256–275

[4] Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O₂⁻. *Free Radic. Biol. Med.* 1993;15:447–451.

2.4

DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE TOTALE DI UN FLUIDO O DI UN TESSUTO O DI MARKER ANTIOSSIDANTI

<i>Marker individuato o nome delle tecnica</i>	<i>Ref.</i>
TRAP	[1] [2] [3]
FRAP	[4]
TOSCA	[5]
TEAC-ABTS	[6] [7]
ORAC	[8] [9]
CUPRAC o similari	[10]
DEPPH	[11]
Acido urico	[12] [13] [14]
Allantoina	[15]
Vitamin E	[16]
Tioredoxina e glutaredoxina	[17]
Molibdeno riducente	[18]
Superossido dismutasi (SOD)	[19]
Catalasi (CAT)	[20]
Glutathione Perossidasi	[21]

Per quanto riguarda la quantificazione della capacità di un fluido biologico o di un tessuto di rispondere all'insulto ossidativo vi sono due vie classiche. Una prima via consiste nella individuazione e quantificazione di un marker, ossia molecole la cui capacità antiossidante sia nota e con le caratteristiche descritte nel paragrafo dei marker da stress ossidativo. Molto più spesso, si determina, però il potere antiossidante totale di un campione, ossia non si determina solo un determinato marker ma si determina la quantità di un particolare substrato ridotto dal campione preso in esame o la capacità di un campione di resistere ad un ben determinato insulto ossidativo, ossia la capacità denominata scavenging . Questo perché è spesso molto più conveniente e probante analizzare la capacità totale di un campione di opporsi a condizioni di stress ossidativo che non la concentrazione di singoli marker. Ricordo che quelli comunemente chiamati antiossidanti, chimicamente sono dei riducenti, e quindi possono ridurre solo specie chimiche aventi un potenziale di riduzione superiore al loro. Di conseguenza non si può parlare di generico potere antiossidante ma solo riferito ad un substrato di riferimento. Ad esempio si può parlare di capacità ferro-riducente o rame-riducente a seconda della tipologia di analisi effettuata. Questo porta anche ad una scarsa o nulla confrontabilità tra tipologie diverse di test in termini di risultati numerici ma non pregiudica il confronto tra test in termini di correlazione.

Tra i primi substrati utilizzati per la determinazione del potere riducente vi è lo ione ferrico. Questo ione è naturalmente presente in tutta una serie di reazioni biochimiche quindi il suo potenziale di riduzione risulta estremamente adatto alla determinazione degli antiossidanti in sistemi biologici. La metodologia storica basata sullo ione ferrico è nota come FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) [4], anche se poi è stato applicato col medesimo nome a molti altri campioni biologici come ad esempio sostanze di derivazione vegetale. [22] [23] Il principio del FRAP si basa sulla capacità dei vari antiossidanti di ridurre il complesso di Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-s-triazina , sinteticamente indicato come $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$; il complesso ridotto è fortemente colorato di blu, per cui la reazione può essere monitorata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 593 nm.

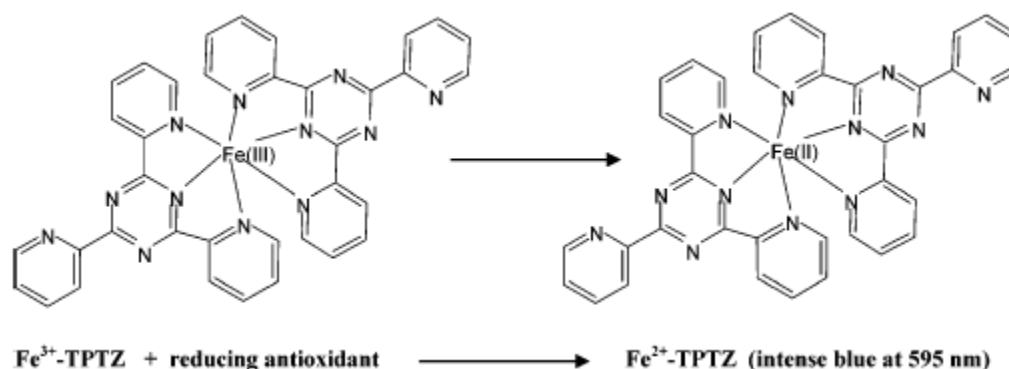


Figura 1: Principio del FRAP

Una variante piuttosto nota del test FRAP utilizza Cu^{2+} invece di Fe^{3+} come substrato ossidante ed è denominata CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capability) [10]. Questi test sono basati sulla riduzione del Cu^{2+} a Cu^+ mediante l'azione combinata di tutti gli antiossidanti (agenti riducenti) presenti in un campione. Lo ione rameoso viene determinato spettrometricamente a 450 nm mediante la sua complessazione con neocuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina). Di questa metodologia ne sono state sviluppate molte versioni, anche commerciali, semplicemente cambiando la molecola complessante. Probabilmente non molto diffuso ma utile a capire e confermare le potenzialità di questa tipologia di determinazione degli antiossidanti è il metodo basato sulla riduzione del Mo^{6+} a Mo^{5+} . In questo caso abbiamo che il complesso verde-azzurro Mo^{6+} -fosfati viene ridotto a complesso incolore Mo^{5+} -fosfati, quindi la reazione può essere seguita spettrofotometricamente a 694 nm. [18]

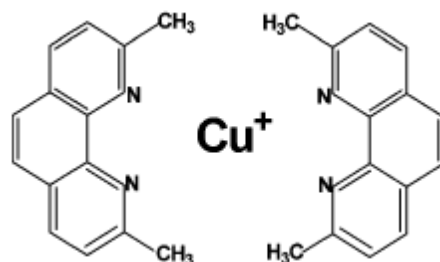


Figura 2: Complesso Cu^+ -neocuproina

I substrati ossidanti possono anche non essere cationi metallici ma di natura organica come dimostra la diffusione del metodo TEAC. Tale test, sempre spettrofotometrico, riportato per la prima volta in letteratura agli inizi degli anni '90 del secolo scorso [6], valuta la capacità degli antiossidanti di ridurre il radical catione ABTS^{•+} (acido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-solfonico) precedentemente sintetizzato per ossidazione del composto incolore ABTS mediante persolfato di sodio o potassio) [7]. Il radical catione ABTS^{•+} così generato è molto stabile nel tempo, ed è caratterizzato da una intensa colorazione blu-verde con massimi di assorbimento localizzati a 415, 645, 734 e 815 nm, anche se analiticamente vengono principalmente utilizzati i massimi a 415 e 734 nm [23]. Tale metodologia è ampiamente diffusa anche per la possibilità, mediante piccoli accorgimenti, di determinare sia antiossidanti lipofili che quelli idrofili. L'acronimo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) deriva dal fatto che principalmente questa metodologia viene tarata con trolox, un analogo liposolubile della vitamina E.

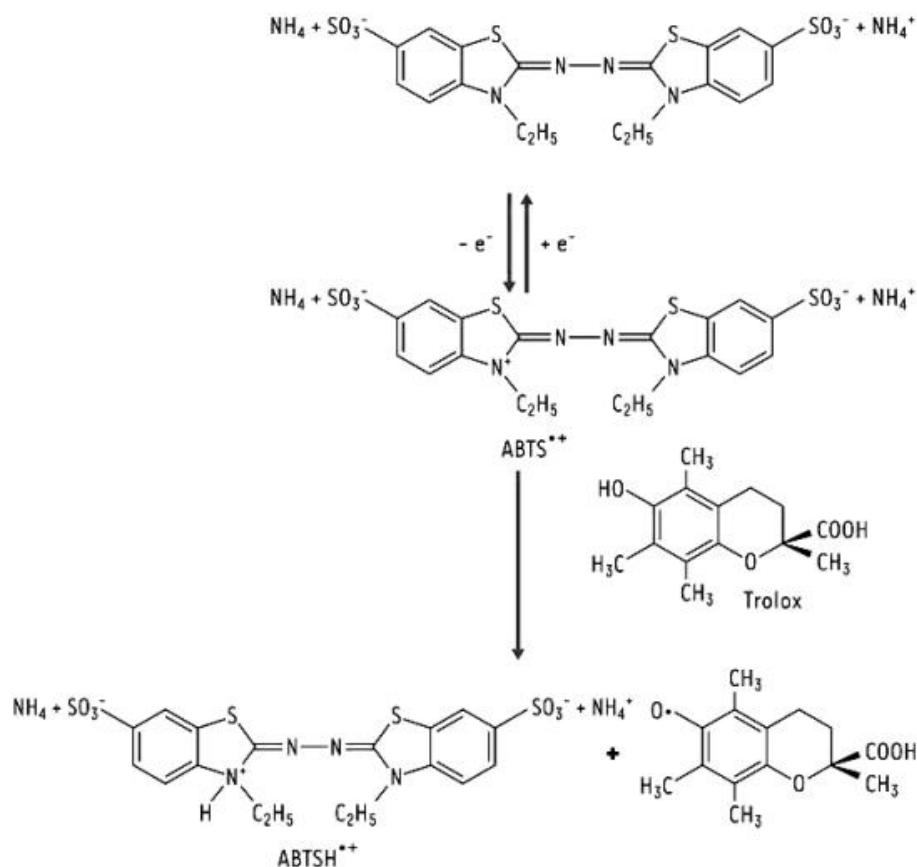


Figura3: Principio del TEAC

Altra metodologia piuttosto simile, almeno nel principio, e diffusa, è il saggio del DPPH (2,2'-Difenil-1-picrilidrazile) il cui radicale azotato è sufficientemente stabile da poter essere analizzato per via spettrofotometrica avendo un massimo di assorbimento a 520 nm. La reazione tra antiossidanti e il radicale sopracitato porta alla formazione della forma non radicalica incolore del DPPH, pertanto la decolorazione della soluzione, come nel metodo TEAC, è associabile alle concentrazioni di antiossidanti nel campione. [11]

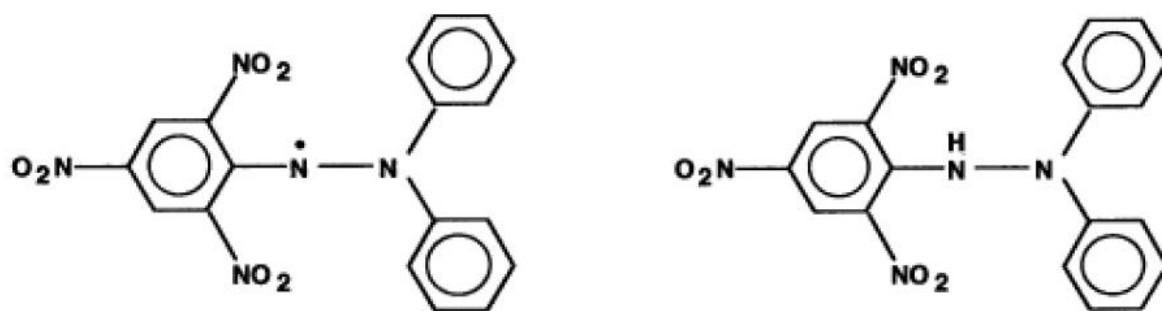


Figura 4: Forma radicalica e non del DPPH

Tra le metodologie basate, invece sulla valutazione della risposta all'insulto ossidativo tra le più diffuse e conosciute abbiamo e diffuse abbiamo ORAC, TRAP e TOSCA. Il metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), valuta la capacità antiossidante come capacità di scavenging delle molecole antiossidanti nei confronti del radicale alchilperossilico[8]. Il principio del metodo ORAC è quello di misurare il decadimento dell'intensità di fluorescenza di una molecola target, in seguito alla formazione di radicali alchilperossilici, ottenuti tramite la decomposizione termica di un azocomposto organico. I radicali alchilperossilici si

attaccano sulla struttura molecolare del composto fluorescente determinando un effetto di spegnimento o "quenching" della fluorescenza, che viene monitorato nel tempo. Il metodo originario utilizzava come "molecola probe" di fluorescenza la β -ficoeritrina [8] sostituita poi dalla fluoresceina. La fluoresceina, oltre ad essere piú facilmente reperibile ed economica, è piú stabile della β -ficoeritrina e permette di ottenere una maggiore sensibilità e selettività [9]. Le molecole antiossidanti presenti nel campione bloccano e inibiscono l'azione dei radicali generati, in tal modo il probe di fluorescenza mantiene costante ed inalterata la sua intensità emissiva, finché sono presenti antiossidanti. Quando le molecole di antiossidante non sono piú sufficienti a bloccare l'azione dei radicali questi attaccano la fluoresceina, causando un netto e repentino calo dell'intensità di emissione. Ovviamente all'aumentare della concentrazione di antiossidante, aumenta il valore della "lag phase" o "lag time", ovvero il tempo di protezione da parte dell'antiossidante, prima dell'attacco alla fluoresceina da parte dei radicali.

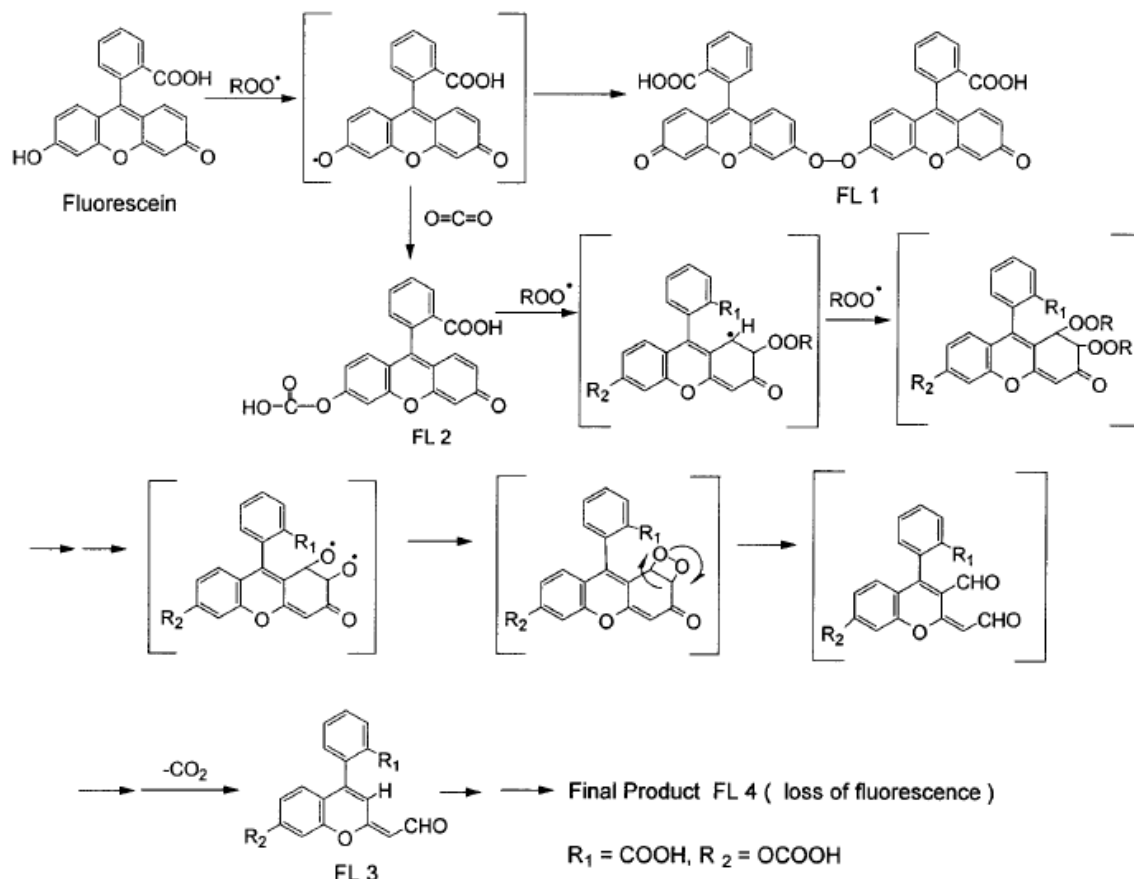


Figura 5: Meccanismo di ossidazione delle fluoresceina proposta da *Ou et al 2001* [9]

Molto simile al precedente risulta essere il TRAP, Total Reactive Antioxidant Potential [1] [2] [3], di cui può essere considerato l'antenato. Medesimi sono i reagenti e il principio, diverso è solo la metodologia di analisi del segnale. Nel TRAP si considera il tempo massimo per cui gli antiossidanti proteggono la molecola probe, nell'ORAC invece si considera l'area sottesa alla curva di decadimento dell'intensità emissiva, tenendo quindi conto della lag phase, ma anche della velocità di perdita della fluorescenza e dell'effetto dell'inibizione. Altro metodo per la determinazione della capacità di scavenging totale è il TOSCA, Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay. In questo metodo i radicali generati da omolisi termica di 2,2-azobisamidinopropano (ABAP) provocano l'ossidazione dell'acido α -cheto- γ -metilbutirrico (KMBA) a etilene e la formazione di etilene viene monitorata mediante analisi gascromatografica dello spazio di testa del recipiente di reazione. La parziale inibizione della formazione di etilene in presenza di antiossidanti che competono con KMBA nelle reazioni di ossidazione radicalica è alla base del metodo [5].

Altra possibile via di determinazione del potere antiossidante è la quantificazione di un opportuno marker. Sicuramente il piú noto e accettato è l'acido urico, ma è possibile anche la determinazione

dell'allantoina, un derivato dell'acido urico [15], della tioredossina, della glutaredossina, due proteine multifunzionali redox-attive [17] e della vitamina E [16]. L'acido urico è il prodotto finale del metabolismo delle purine (ad es. adenina, guanina). Le purine sono convertite in acido urico nel fegato. Il livello di acido urico nel corpo è determinato dall'equilibrio tra sintesi e l'eliminazione urinaria. Storicamente l'acido urico viene determinato mediante la sua conversione enzimatica, con uricasi ad allantoina, facilmente rilevabile spettrofotometricamente nell'UV per assorbimento della lunghezza d'onda 283 nm [12]. Un altro metodo storico sfrutta la formazione stechiometrica di perossido di idrogeno legata all'azione dell'uricasi per una reazione con una perossidasi e o-dianisidina al fine di avere un composto finale bruno determinabile spettrofotometricamente a 436 nm [13]. In altri metodi sono stati proposti più recentemente tra i quali ricordo l'inibizione della luminescenza di particolari complessi a base di Tb ed Eu. [14].

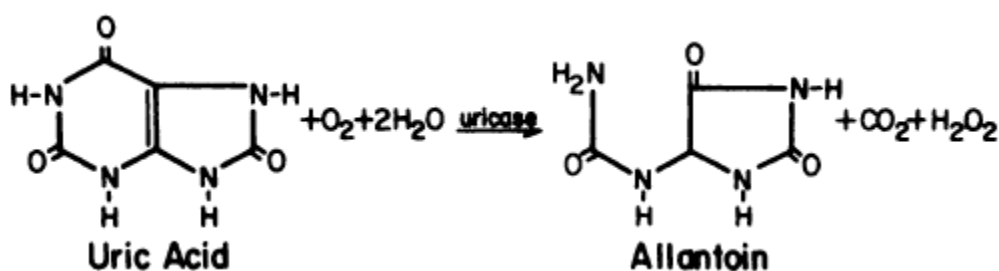


Figura 6: Ossidazione dell'acido urico da parte dell'uricasi

Tra i marker più di più diffusa analisi, almeno in ambito di ricerca, e di più riconosciuto potere descrittivo nei confronti dello status antiossidante sono gli enzimi antiossidanti, SOD, CAT e GPX. SOD è l'enzima antiossidante che catalizza la dismutazione dell'anione superossido a perossido d'idrogeno. Negli esseri umani, ci sono tre forme di SOD: citosolico (Cu Zn-SOD), mitocondriale (Mn-SOD) e extracellulare. CAT invece è un enzima la cui attività è basata su un gruppo ferroporfirina ed è in grado di dismutare il perossido d'idrogeno a acqua e ossigeno o i perossidi organici in acqua e gruppi alcolici in presenza di donatori d'idrogeno. Medesima attività hanno le varie forme di GPX, con la differenza di usare glutazione come substrato e selenio come centro metallico. [24] Le tecniche analitiche ad esse associate sono generalmente di tipo spettrofotometrico e basate su più reazioni enzimatiche, in genere si analizza la capacità di risposta del campione nei confronti di una quantità nota di campione. Vista la complessità delle stesse non riporto le metodiche ma rimando agli autori originari per le più diffuse o importanti, *Paoletti et al 1986* [19] per quanto riguarda SOD, *Goth 1991* [20] per CAT e *Lawrence e Burk 1976* per GPX [21].

- [1] Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters* 1985;187(1)
- [2] Chevon M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research* 2000;33:S99-108
- [3] Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of Tissue Homogenates and Their Cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 388:261-266.
- [4] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70-76
- [5] Winstona GW, Regolib F, Dugas Jr. AJ, Fonga JH, Blancharda KA. A Rapid Gas Chromatographic Assay for Determining Oxyradical Scavenging Capacity of Antioxidants and Biological Fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 1998;24(3):480-493
- [6] Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidants status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993;84:407-412;
- [7] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 1999;26:1231-1237
- [8] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1993;14:303-311
- [9] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-4626
- [10] Apak R, Lu KG, Re M, et al. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:7970-7981

- [11] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 2004;26(2).
- [12] Duncan PH, Gochman N, Cooper T, Smith E, Bayse D. A Candidate Reference Method for Uric Acid in Serum. I. Optimization and Evaluation. *CLIN. CHEM.* 1982;28:284-290
- [13] Domagk GF, Schlicke HH. A colorimetric method using uricase and peroxidase for the determination of uric acid. *Analytical Biochemistry* 1968;22:219-224
- [14] Poole RA, Kielar F, Richardson SL, Stenson PA, Parker D. A ratiometric and non-enzymatic luminescence assay for uric acid: differential quenching of anthranide excited states by anti-oxidants. *Chem. Commun.* 2006:4084-4086
- [15] Mikami T, Kita K, Tomita S, Qu GJ, Tasaki Y, Ito A. Is allantoin in serum and urine a useful indicator of exercise-induced oxidative stress in humans? *Free Radical Research* 2000;32(3)
- [16] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *the lancet* 1996;347:781-786
- [17] Nakamura H, Vaage J, Valen G, Padilla A, Björnstedt M, Holmgren A. Measurements of Plasma Glutaredoxin and Thioredoxin in Healthy Volunteers and During Open-Heart Surgery. *Free Radical Biology and Medicine* 1998;24(7-8):1176-1186
- [18] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. *Analytical Biochemistry* 1999;269:337-341
- [19] Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in tissue Extracts. *ANALYTICAL BIOCHEM* 1986; 153:536-541
- [20] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991;196:143-15
- [21] Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophysical Res. Com.* 1976;71: 592-598.
- [22] Songa HP, Kima DH, Joa C, et al. Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and antioxidant activity of fresh vegetable juice. *Food Microbiology* 2006;23:372-378
- [23] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:4290-4302
- [24] MatÉsa JM, Pérez-Gómezalgnacio C, De Castro N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases; *Clinical Biochemistry* 1999;32:595-603

2.5

METODOLOGIE ELETTROCHIMICHE PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE TOTALE O DI ANALITI MARKER DI STRESS OSSIDATIVO.

<i>Tecnica analitica</i>	<i>Ref.</i>
Determinazione voltammetrica del potere antiossidante totale	[1] [2] [3]
Determinazione voltammetrica di acido urico e/o acido ascorbico	[4] [5]
Determinazione voltammetrica del perossido d'idrogeno	[6]
Determinazione voltammetrica dei perossidi organici	[7]
Determinazione potenziometrica dell'attività ossidante/antiossidante	[8] [9]

Le tecniche elettrochimiche, ossia basate sull'interazione degli analiti con una corrente elettrica in condizioni strettamente controllate sono estremamente versatili e potenzialmente estremamente selettive.

Da un punto di vista strettamente chimico tutte quelle molecole etichettate con antiossidanti sono specie riducenti che perciò tendono a cedere elettroni in reazioni di ossidoriduzione. Questa loro caratteristica permette di poter applicare metodologie di analisi chimica di tipo elettrochimico per la loro determinazione diretta. Al contrario l'analisi dell'attività ossidante è più complessa avendo i fluidi biologici carattere normalmente riducente. In questo caso come descritto in seguito si possono effettuare analisi indirette di marker di ossidazione sfruttando non tanto il potere ossidante del fluido, che non esiste, ma la selettività della tecnica analitica in esame. La principale tecnica elettrochimica utilizzata è la voltammetria ciclica e più raramente la potenziometria. Sono chiamati metodi voltammetrici quelle tecniche elettroanalitiche basate sulla misura della corrente in funzione del potenziale applicato. La voltammetria si basa sulla misura della corrente in una cella elettrochimica in condizioni di completa polarizzazione di concentrazione, nella quale la velocità di ossidazione o di riduzione è limitata esclusivamente dalla velocità del suo trasferimento di massa alla superficie dell'elettrodo. Per aumentare la polarizzazione dell'elettrodo di lavoro si usano elettrodi piuttosto piccoli con aree di pochi millimetri quadrati o addirittura dell'ordine dei micrometri quadrati, condizione questa che incontra favorevolmente le esigenze della ricerca su campioni biologici spesso di ridotto volume.

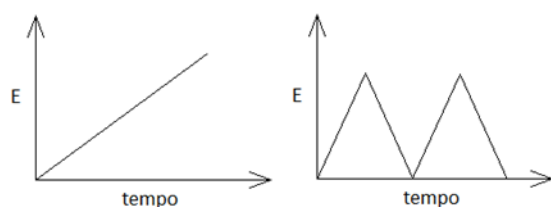


Figura 1: Esempio di scansione voltammetrica

La tensione dell'elettrodo di lavoro e quindi il potenziale applicato viene sistematicamente variato in funzione del tempo, tipicamente in un intervallo di 1-2 V. Esistono molteplici tipologie di scansione di cui la più semplice è quella lineare rispetto al tempo e la più applicata in ambito biologico è quella ciclica in cui l'intervallo di potenziale viene percorso alternativamente nelle due direzioni.

Parlando di voltammetria l'informazione quantitativa è desunta dalla corrente limite ossia della massima quantità di corrente generata dalla presenza dell'analita, denominata i . L'informazione qualitativa è invece desunta dal potenziale di semionda $E_{1/2}$ essendo esso legato al potenziale standard della reazione presa in esame. Esso è definito come il potenziale applicato quando la corrente è $i/2$ [10]. La maggior applicazione della voltammetria ciclica allo studio delle stress ossidativo è legata alla determinazione del potere antiossidante di un fluido biologico, perlopiù plasma sanguineo. Solitamente si utilizza un elettrodo di lavoro di carbone, in quanto elettrodi di metallo, il platino è il più diffuso, danno problemi di adsorbimento dell'ossigeno e delle proteine con denaturazione dell'elettrodo stesso e conseguenti problemi analitici [11], ed un elettrodo di riferimento Ag/AgCl. Tipicamente la scansione copre l'intervallo da -0,3 V a 1,3 V con velocità da 100mV/s a 600 mV/s ottenendo un tipico voltammogramma a due picchi anodici correlabili a $E_{1/2} \approx 400$ mV e $E_{1/2} \approx 900$ mV. [12]

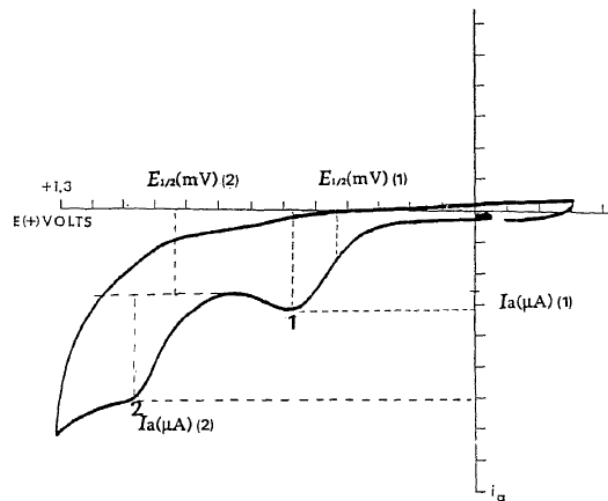


Figura 2: Tipico voltammogramma del plasma di una persona sana; illustrazione da *Chevion et al. 1997* [4]

Per quanto riguarda la composizione dei del mix di antiossidanti originanti i due picchi si sa che il picco 1 è dato essenzialmente da acido urico e ascorbico mentre la composizione del secondo è meno noto. Si pensa che esso sia dato da acido α -lipoico, cofattori delle chetodeidrogenasi acide e una serie di altri antiossidanti fisiologici, tra cui nicotinamide, adenina dinucleotide fosfato, e melatonina [1]. In particolari condizioni analitiche si è riusciti a determinare separatamente la concentrazione dia acido ascorbico da quella di acido urico utilizzando i loro leggermente diversi $E_{1/2}$, rispettivamente 380 e 420 mV [4]. Per quanto riguarda la valutazione dell'attività ossidante la voltammetria può essere utilizzata con successo per la quantificazione diretta del perossido d'idrogeno. In particolare si analizza mediante voltammetria ciclica il picco di corrente a $E_{1/2} \approx 1300$ mV corrispondente alla riduzione elettrolitica del perossido d'idrogeno. [6] Questa tecnica, utilizzando un elettrodo di lavoro di platino è stata utilizzata principalmente in studi coinvolgenti il cervello. L'analisi dei perossidi organici, tipici marker dell'ossidazione lipidica, è invece più problematica in quanto l'elettro-riduzione di tali molecole sull'elettrodo a carbone è cineticamente sfavorita e quindi la bassa quantità di corrente generata non permette un'analisi accurata. Però aggiungendo ioni ferrosi e innescando la reazione di Fenton per via elettrocatalitica si riesce a aumentare la corrente generata fino a quantità utili [7]. Molto meno usata ma comunque nota è la possibilità di utilizzare tecniche potenziometriche per la determinazione del potere antiossidante o dell'attività ossidante di un fluido biologico. Le tecniche potenziometriche sono basate sulla possibilità di misurare la differenza di potenziale tra due semicelle elettrochimiche in assenza di passaggio di corrente. Molto semplicemente il potenziale E_{cell} della cella elettrochimica misurato è dato da $E_{rif} + E$ dove E_{rif} è il potenziale noto dell'elettrodo di riferimento ed E il potenziale sviluppato dalla semicella contenente l'analita di interesse. Conoscendo E_{cell} e E_{rif} si può conoscere E che mediante la legge di Nernst, che collega il potenziale al rapporto tra le concentrazioni di specie ridotte e ossidate, può essere collegato alla concentrazione di analita [10]. Una delle possibili tecniche è quella di misurare il potenziale di semicella di una soluzione contenente un mediatore costituito da una soluzione di $K_3(Fe(CN)_6)/K_4(Fe(CN)_6)$ il cui potenziale dipende di fatto dal rapporto di concentrazione tra ioni ferrosi e ioni ferrici. Logicamente tale rapporto dipende dal campione posto a contatto con esso. Questo mediatore può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di antiossidanti per via diretta, ponendo il campione direttamente a contatto col mediatore, o per via indiretta ponendo nel mediatore oltre al campione una fonte di radicali liberi. In quest'ultimo caso si misura non tanto la capacità antiossidante ma la capacità di un campione di rispondere all'insulto ossidativo. Una comoda fonte di radicali è la degradazione del 2,2-azobis(2-metilpropionamide) [8]. Dall'osservazione della variazione del potenziale in funzione del tempo, del mediatore posto a contatto col campione si è riusciti a quantificare in un'unica analisi sia la capacità ossidante che antiossidante del campione.

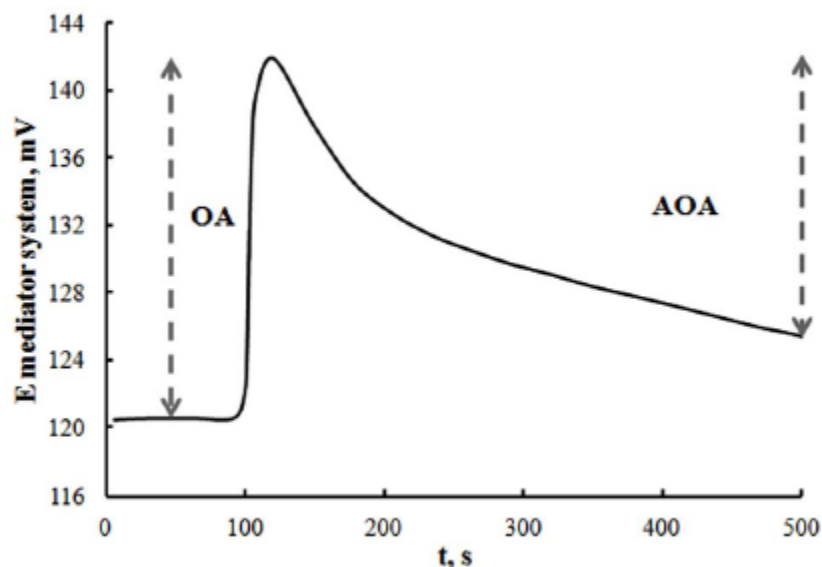


Figura 3: Dipendenza della del potenziale del mediatore in funzione del tempo in un campione di liquido seminale; illustrazione da *Brainina et al. 2012* [?]

Generalmente si osserva un aumento del potenziale del sistema mediatore, rispetto a quello iniziale e i seguito una sua diminuzione. Questo fenomeno è dovuto all'interazione degli ossidanti con $K_4(Fe(CN)_6)$ e dalla successiva interazione degli antiossidanti con $K_3(Fe(CN)_6)$. Ovviamente la velocità di reazione della componente ridotta del sistema mediatore con i radicali liberi e i perossidi (componente ossidante) è più alta che la velocità di reazione del componente ossidato del sistema mediatore con gli antiossidanti del campione. Ciò consente la valutazione del potere ossidante e del contributo antiossidante.

- [1] Mittal A, Flint RJ, Fanous M, et al. Redox status of acute pancreatitis as measured by cyclic voltammetry: Initial rodent studies to assess disease severity. *Crit Care Med* 2008;36(3)
- [2] Psotová J, Zahálková J, Hrbáč J, Šimánek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. two case reports. *Biomed. Papers* 2001;45(2):81–83
- [3] Chevion S, Berry EM, Kitrossky N, Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;22:411–421
- [4] Chevion S, Berry EM, Kitrossky N, Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;22:411–421.
- [5] Chen JC, Chung HH, Hsu CT, et al. A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood. *Sensors and Actuators* 2005;110:364–369
- [6] Sanford AL, Morton SW, Whitehouse KL, et al. Voltammetric Detection of Hydrogen Peroxide at Carbon Fiber Microelectrodes. *Anal Chem.* 2010; 82(12): 5205–5210.
- [7] Laine DF, Cheng IF. Analysis of hydrogen peroxide and an organic hydroperoxide via the electrocatalytic Fenton reaction. *Microchemical Journal* 2009; 91:78–81
- [8] Lebel CP, Ischiropoulos H, Hondy, SC. Evaluation of the probe 20,70-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5:227–231.
- [9] Ischiropoulos H, Gow, A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow JP. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol.* 1999;301:367–373
- [10] Skoog DA, West MD, Holler FJ, Crouch SR. *Fondamenti di chimica analitica.* 2009, ed EdiSES
- [11] Khubutiya M, Evseev AK, Kolesnikov V, Goldin MM, Davydov A. Measurements of Platinum Electrode Potential in Blood and Blood Plasma and Serum. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2010;46:537–541.
- [12] Chevion S, Hofmann M, Ziegler R, Chevion M, Nawroth PP. The antioxidant properties of thiocetic acid: characterization by cyclic voltammetry; *biochemistry and molecular biology international* 1997 Vol. 41, No. 2, Pages 317–327

2.6

MARKER GENERICI DI STRESS : CORTISOLO

Un piccolo discorso a parte merita il cortisolo. Sebbene venga denominato l'ormone dello stress, in questo caso non si intende stress ossidativo ma stress inteso come insieme degli stimoli a cui è sottoposto un sistema. Per questo motivo non mi dilungo sull'argomento che sebbene interessante si discosta dai nostri obiettivi. Il cortisolo è un ormone prodotto dalle cellule della fascicolata del surrene in risposta all'ormone ipofisario ACTH il quale è dunque il precursore del cortisolo.

In linea del tutto generale un alterazione della sua produzione avviene in a condizioni di stress fisico, come sforzi prolungati [1], in presenza di malattie, specialmente in fase critica [2], o in presenza di stress psicofisico[3]. Gli effetti del cortisolo sull'organismo umano sono i più disparati e la loro descrizione esula dai nostri obiettivi ma in generale possiamo affermare che il ruolo del cortisolo sia quello di preparare l'organismo a rispondere ai vari stimoli e che bassi livelli sono da intendersi come iporeattività dell'organismo allo stress (in questo caso definito come insieme degli stimoli a cui è sottoposto) mentre elevati livelli indicano una risposta in atto e sono tipici di una situazione non ottimale. Le tecniche sviluppate per la determinazione del cortisolo sono svariate e comprendono metodologia fluorometriche, HPLC con rivelazione spettrofotometrica, tecniche immunochimiche o per competizione di legame. Il cortisolo viene ricercato principalmente del plasma sanguineo, nell'urina e nella saliva, tra l'altro sembra esistere una certa relazione tra i livelli plasmatici e salivari. [4][5][6]. Al momento non ci sono approfonditi studi di correlazione tra cortisolo e stress ossidativo ma i due argomenti potrebbero essere strettamente dipendenti e studi in tale senso potrebbero riservare notevoli sorprese.

[1] Skoluda N, Dettenborn L, Stalder T, Kirschbaum C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:611–617

[2] Boonen E, Vervenne H, Meersseman P, et al. Reduced Cortisol Metabolism during Critical Illness. *The new England journal of medicine* 2013;368(16)

[3] Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epe E. Good Stress, Bad Stress and Oxidative Stress: Insights from Anticipatory Cortisol Reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(9): 1698–1708.

[4] Turpeinen U, Markkanen H, Välimäki M, Stenman UH. Determination of urinary free cortisol by HPLC. *Clinical Chemistry* 1997;43:8 1386–1391

[5] Thijssen JH, van den Berg JH, Adlercreutz H, Gijzen AH, de Jong FH, Meijer JC, Moolenaar AJ. The determination of cortisol in human plasma: evaluation and comparison of seven assays. *Clinica Chimica Acta* 1980;100:39-46

[6] Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19(4):313–333

3

LA DETERMINAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO MEDIANTE I TEST DI H&D

Come già ampiamente spiegato nel capitolo 1 e come sarà approfondito nel capitolo 4, dedicato alla valutazione dei parametri qua descritti, è di estrema importanza la valutazione dello equilibrio redox nella sua complessità. L'equilibrio redox dipende dalla concentrazione di ossidanti e pro-ossidanti ma anche dalla capacità dell'organismo di contrastarli, ossia da quella che viene descritta come capacità antiossidante. Di conseguenza si è sempre pensato di abbinare ad un test in grado di valutare la componente ossidante un test in grado di valutare la componente antiossidante per fornire una valutazione globale. Sempre nella logica di una valutazione globale dell'equilibrio redox, si è sempre scelto come fluido biologico da esaminare il sangue. Questo perché, entrando esso in contatto con tutti i vari compartimenti è un ottimo indice dello status ossidativo globale.

3.1 IL PASSATO : D-ROMS E BAP

I test di prima generazione per la determinazione dello status ossidativo sono stati il d-ROMs test ed il BAP test (da qui in poi designati come d-ROMs e BAP). Il d-ROMs test è l'analisi dedicata alla porzione ossidativa dello status ossidativo in quanto è stato sviluppato per la determinazione dei perossidi, mentre il BAP test è una metodica della classe dei determinanti la capacità ferro riducente.

3.1.1 d-ROMs TEST

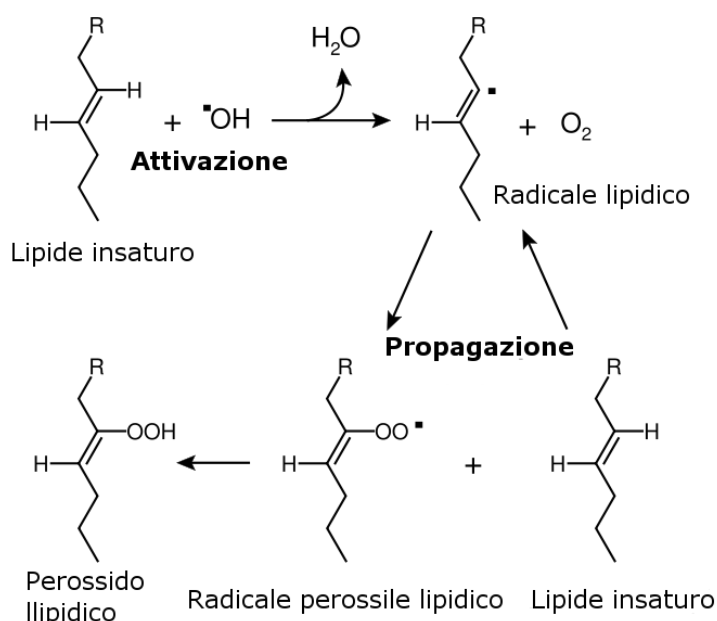
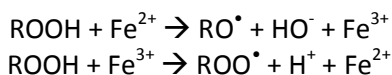


Figura 1: Esempificazione della formazione dei perossidi

Per quanto riguarda il d-ROMs è un test della tipologia atta a quantificare un marker di stress ossidativo chiaramente descritto da Alberti e colleghi in *Alberti et al. 2000* [1], da cui derivano tutte le informazioni di questo paragrafo, se non diversamente specificato. I radicali liberi organici, spesso derivanti dalla reazione di lipidi insaturi con radicali liberi di varia natura, reagiscono molto facilmente con l'ossigeno formando perossidi. Il risultato primario di una concentrazione di radicali liberi insolitamente elevata, indipendentemente dalla sorgente, è l'inizio di una serie di processi nocivi a base radicale che portano ad effetti estremamente severi, tra i cui intermedi troviamo perossidi di varia natura. Come già spiegato più diffusamente nel paragrafo precedente, la determinazione diretta dei radicali liberi non è di

semplice attuazione, specialmente in vivo. Si è quindi pensato di monitorare i livelli di un marker di stress ossidativo molto significativo dei processi ossidativi radicalici in corso quale può essere la concentrazione di perossidi. Ulteriore importanza della determinazione dei perossidi risiede nel fatto che, al contrario della maggior parte dei marker di stress ossidativo analizzati, non sono i prodotti finali dei processi ossidativi ma sono tra i primi e più importanti intermedi della maggior parte di questi processi, questo implica che la determinazione dei perossidi non misura solo un danno conclamato ma anche un danno potenziale e quindi determina la possibilità di intervenire più tempestivamente [2]. Si parla di danno potenziale perché i perossidi organici sono una possibile fonte di radicali liberi, anche se grazie ai vari sistemi antiossidanti non è detto tutti i perossidi generino radicali liberi. Per esempio le perossidasi riducono i perossidi organici ai loro alcoli corrispondenti, tra l'altro, sebbene le perossidasi interagiscano con i perossidi organici nell'organismo, è improbabile che le perossidasi causino interferenze significative con il test dei d-ROM a causa della loro bassa attività plasma e della correlazione debole tra attività di perossidasi e valori di d-ROMs [3][4]. La predittività dell'analisi dei perossidi sembra essere confermata da alcuni dati preliminari sulla relazione tra valori d-ROMs e concentrazione di proteina C-reattiva, noto marker di infiammazione conclamata. Si è notato che il valore di d-ROMs tende ad innalzarsi prima di quello della proteina C-reattiva, in una fase pre-infiammatoria ancora asintomatica [5]. Altra importante conferma dell'importanza della determinazione dei perossidi è stata evidenziata da studi in cui la loro concentrazione è stata positivamente correlata con la concentrazione di 8-iso-PGF_{2α}, un isoprostano, ($r = 0.68$; $p < 0.05$) e inversamente correlata con la capacità dei campioni di rispondere ad un insulto ossidativo da parte di acido ipocloroso ($r = -0.82$; $p < 0.01$)[6]. In un altro studio si evidenzia la non sorprendente, facendo entrambi parte del processo

ossidativo dei lipidi, correlazione tra MDA libera, quantificata mediante cromatografia, e perossidi ($r=0.472$; $p=0.0003$) [7]. I perossidi nonostante una reattività piuttosto diversificata, sono eccellenti nucleofili e in condizioni fisiologiche sono piuttosto stabili. In condizioni fisiologiche, ma non solo, la loro principale modalità di reazione è la decomposizione catalizzata da un metallo di transizione, quasi sempre ferro, più raramente rame o altri, con formazione di radicali alcossilici e perossilici. Questa reazione è in realtà un insieme piuttosto complesso di reazioni non del tutto chiarite complessivamente note come reazione di Fenton, dal chimico che per primo la descrisse [8]. La natura esatta di questa complessa reazione non è ancora del tutto chiarita nonostante la mole di studi effettuata su di essa, in particolare non propriamente noti rimangono i vari passaggi intermedi della stessa. Per un approfondimento sulla stessa, di cui qui non è la sede adatta, si rimanda all'ottimo lavoro di *Mwebi et al. 2005* [9]. Molto in generale, ma più che sufficiente per i nostri fini, la reazione di Fenton dei perossidi organici può essere considerata la somma delle reazioni sotto illustrate in cui il metallo di transizione, da qui, in poi il ferro, riveste un ruolo di catalizzante continuamente rigenerato. Questo almeno in teoria vista la diversità di velocità delle reazioni: la seconda è circa mille volte più lenta, motivo per cui per catalizzare la reazione di Fenton si usa usualmente lo ione ferroso e non il ferrico.



I radicali generati da questa reazione possono poi ossidare substrati facilmente ossidabili con cui entrano in contatto. Si è quindi cercato un substrato con la caratteristica di essere ossidato dai radicali perossilici e alcossilici e che cambiasse colore dopo la reazione di ossidazione onde essere determinabile mediante tecnica spettroscopica. A causa del fatto che i radicali alcossilici e perossilici sono specie transienti di breve durata, non sono disponibili valori sperimentali dei loro potenziali di riduzione, ma sono state ottenute stime affidabili dei potenziali di riduzione di entrambi i tipi di radicali combinando grandezze termodinamiche derivanti da reazioni in fase gas e in soluzione acquosa. Si è ottenuto un potenziale di circa 1,23 V e di 0,77 V vs NHE per le coppie ($\text{RO}^\bullet / \text{RO}^-$) e ($\text{ROO}^\bullet / \text{ROO}^-$). I potenziali stimati hanno confermato che gli alcossili sono ossidanti migliori dei perossili. Diverse indagini elettrochimiche hanno dimostrato che le para-fenilendiammine N-alcilate sono facilmente sottoposte all'ossidazione mono-elettronica, inoltre i prodotti di reazione sono persistenti in soluzione, in particolare il radical-catione della N,N-dietil-para-fenilendiammina (DEPPD). Anche se il potenziale di ossidazione di questa particolare diamina non è disponibile esso è stimato essere compreso tra 0,33-0,43 V vs NHE e 0,76 V vs NHE, quindi essendo il suo potenziale di ossidazione compatibile con i potenziali di riduzione dei radicali di alcossi e perossidi, e a causa della particolarissima persistenza del radical catione, si è scelta la DEPPD come substrato cromogeno

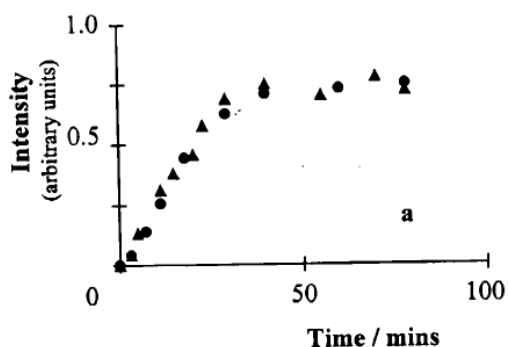


Figura 2: Colorazione di una soluzione contenente un perossido, DEPPD e ioni ferrosi; immagine da *Alberti et al. 2000* [1]

per la rivelazione dei perossidi. d-ROMs è basato su solide basi sperimentali. Inizialmente si è valutato lo spettro di assorbimento aggiungendo ad un tampone acetato contenente un eccesso di DEPPD e ioni ferrosi una piccola quantità di tert-butilidroperossido. La soluzione si è arrossata nel tempo dando picchi di assorbimento a 505 e 549 nm. Come esemplificato in figura 2, la sua intensità spettrale è aumentata nel tempo. L'aumento del valore di assorbanza è risultato piuttosto lineare nei primi 6 minuti per rallentare fino a raggiungere un plateau dopo un intervallo di tempo che dipende dalla temperatura (circa 100 minuti a temperatura ambiente). La soluzione è stata monitorata anche mediante EPR dando un risultato qualitativamente coerente come quanto riportato in letteratura. Considerando che in assenza di ioni metallici

la stessa soluzione di DEPPD e tert-butilidroperossido non dava praticamente colorazione si è potuto concludere che il radical-catione monitorato derivasse dall'azione dei radicali perossilici e alcossilici originati mediante Fenton nei confronti della DEPPD. Comprova il fenomeno il fatto che la graduale

aggiunta di EDTA, un forte chelante del ferro, rallenta fino a bloccare la reazione. È stato rilevato che i valori di assorbanza misurati dopo 80 minuti dalla miscelazione a temperatura ambiente erano rappresentativi, entro gli errori sperimentali, della concentrazione iniziale di tert-butilidroperossido, inoltre è stato notato che nei primi 5-7 minuti il profilo del tempo dell'assorbanza è abbastanza lineare e la pendenza, ossia la velocità di reazione, è direttamente correlata alla concentrazione iniziale dei perossidi. Pertanto, con un protocollo appropriato, il valore $\Delta\text{abs}/\text{min}$ può essere utilizzato per determinare facilmente la concentrazione iniziale di perossidi. Similmente a quanto osservato nel caso del tert-butilidroperossido, quando esso è sostituito da siero/plasma umano la miscela inizialmente quasi incolore lentamente vira rosso-viola, con intensità sempre maggiori. La soluzione ha anche dimostrato di essere attiva all'EPR e gli spettri osservati sono identici a quelli rilevati nell'esperimento modello con tert-butilidroperossido in condizioni simili. L'attribuzione di semplici spettri EPR a determinate specie chimiche è difficile ma quando la complessità degli spettri aumenta, come nel nostro caso, tale attribuzione difficilmente è errata. Non si può quindi dubitare che anche in questo caso lo spettro EPR osservato appartiene al radical catione della DEPPD formatasi mediante la reazione proposta. Sia il valore di assorbanza che la forza del segnale EPR indicano la quantità di perossidi inizialmente presenti nel campione di siero e quindi dello stress ossidativo a cui era sottoposto l'organismo da cui era stato raccolto il campione. La singola linea EPR osservata, quando si lavora con un'alta modulazione del campo magnetico, potrebbe essere facilmente integrata, rendendo così relativamente facile la misurazione della concentrazione radicale e della sua dipendenza temporale. È stato quindi possibile stabilire che i profili temporali dell'assorbanza a 505 nm e dell'intensità EPR spettrale di un determinato campione hanno coinciso per un periodo di circa 100 minuti a temperatura ambiente. La diluizione del campione di siero sotto esame ha portato in tutti i casi a intensità spettrali EPR o letture di assorbanza ridotte proporzionalmente alla diluizione operata. Si può quindi valutare lo stress ossidativo attraverso il monitoraggio dell'effetto ossidante esercitato da un campione di siero/plasma sanguineo su un additivo come DEPPD nelle condizioni proposte, mediante una semplice tecnica spettroscopica. Riassumendo nel d-ROMs test una piccola porzione di plasma (10 μl) viene posta in una soluzione di lavoro ottenuta dal miscelamento di un tampone acetato, addizionato di ioni ferrosi, e di una soluzione condensata di DEPPD e incubata a 37°C per 5 minuti. La differenza di assorbanza tra 3 e 5 minuti è proporzionale all'iniziale quantità di perossidi presenti nel campione per effetto dei fenomeni fin qui illustrati. Il test restituisce un valore dato in U.Carr corrispondenti 0,08 mg/dl di perossido d'idrogeno. Il senso di questa unità di misura non è che in un campione risultante 300 U.Carr vi sia una concentrazione di 24 mg/dl di perossido d'idrogeno, concentrazione incompatibile con la vita, ma che nel medesimo campione vi sono una quantità di perossidi organici che danno lo stesso segnale che darebbero 24 mg/dl di perossido d'idrogeno. [10]

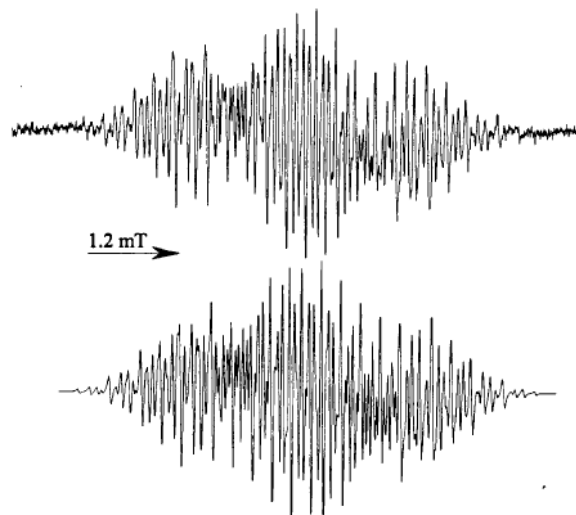
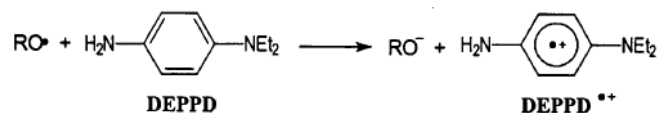


Figura 3: Dall'alto al basso, reazione di ossidazione radicalica di DEPPD; spettro EPR del radical catione in soluzione e spettro EPR del radical catione da simulazione su computer; immagine da *Alberti et al. 2000* [1]

Le performance analitiche, basate su dati sia interni che pubblicati [10-13], sono le seguenti:

- limite di quantificazione 50 U.Carr
- linearità 50-600 $\mu\text{mol/l}$

- CV% < al 5%
- variabilità biologica < al 5%
- antiossidanti quali vitamina C, glutatione, acido urico e bilirubina anche esogeni, non danno interferenza, se in concentrazioni fisiologiche

Inoltre su plasma sanguigno canino è stata dimostrata l'alta linearità del test nei confronti di un campione di plasma diluito più volte. Il segnale di campioni così ottenuti ha dimostrato di avere un r^2 pari 0,95. [14] Molto importante, al fine di uso diagnostico del d-ROMs, è stata la determinazione dell'intervallo di riferimento. Sono stati analizzati oltre 8000 soggetti sani da cui è stato dedotto un intervallo di riferimento pari a 250-300 U.Carr in soggetti sani.[1][15]

Un modo per testare la sensibilità del dROMs rispetto alle perturbazioni dello status ossidativo di un organismo può essere quello di manipolare la produzione di radicali liberi dello stesso utilizzando metodi che aumentino la produzione basale di radicali liberi, come l'esposizione all'iperossia o l'iniezione di generatori di specie reattive o di inibitori di antiossidanti. Molti studi hanno mostrato che il d-ROMs test è molto sensibile a questi interventi. Ad esempio, dopo 5 e 15 minuti di riperfusione (vale a dire il ripristino del flusso di sangue in un tessuto o organo precedentemente ischemico) di criceti siriani, i valori plasmatici di d-ROMs sono aumentati rispettivamente del 72% e dell'89% rispetto ai valori di base e sono diminuiti fino al valore basale dopo 30 minuti dalla riperfusione [16]. Tuttavia, il pretrattamento dei criceti siriani con l'enzima antiossidante superossido dismutasi ha mantenuto i valori di d-ROMs a livelli normali, mostrando indirettamente che la maggior parte delle molecole rilevate dal test provengono dall'ossidazione delle biomolecole indotta dai radicali liberi. Analogamente è stato osservato [17] che le ripetute esposizioni dei pazienti all'ossigeno iperbarico (per esempio 100% di ossigeno) hanno comportato un significativo aumento dei valori di d-ROMs nel plasma, nonché delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico, noto marker di danno lipidico. In un altro esperimento simile[18] è stato rilevato che non esistevano differenze nei valori di d-ROMs nei ratti esposti al 14,4%, 20,9% e al 35,5% di ossigeno, ma con esposizioni al 39,8%, al 62,5% e all'82,2% di ossigeno i valori di d-ROMs aumentano all'aumentare della percentuale di ossigeno. Nel medesimo studio è stato osservato che anche i cambiamenti morfologici nei globuli rossi indotti dagli attacchi ossidativi erano presenti nei ratti esposti al 39,8%, 62,5% e 82,2% ossigeno. In un altro esperimento, a canarini domestici è iniettati DL-butionina(S,R)-sulfoximina, un composto che riduce i livelli cellulari di glutatione, inibendo la sua sintesi [19]. Rispetto ai controlli, i canarini trattati con la sulfossimina hanno avuto una significativa diminuzione del glutatione e un significativo aumento dei valori dei d-ROMs rispettivamente [20]. Sul d-ROMs è possibile fare altre interessanti considerazioni. I risultati ottenuti con il test d-ROMs sono coerenti con gli studi che quantificano i perossidi organici quantificati con altri metodi. Ad esempio, una maggiore produzione di perossidi organici (misurata mediante d-ROMs) durante una risposta immunitaria/infiammatoria è coerente con altri studi che hanno quantificato la produzione di perossidi organici usando metodi diversi [21]. Questo legame forte e significativo tra gli perossidi organici e la risposta immunitaria è ulteriormente corroborato dalle significative correlazioni riscontrate tra i valori di d-ROM e conteggi delle leucociti [22] [23]. Inoltre, è stata riscontrata una maggiore produzione di perossidi organici in relazione ad un aumento dei livelli di ormoni dello stress usando il d-ROMs [24][25] e una correlazione coi valori di proteina C-reattiva[26].

[1] Alberti A, Bolognini I, Macciantelli D, Caratelli M. the radical cation of n,n-diethyl-para- phenyldiamine : a possible indicator of oxidative stress in biological samples. Res. Chem. Intermed. 2000;26:253-267

[2] Stier A, Massemin S, Zahn S, Tissier ML, Criscuolo F. Starting with a handicap: effects of asynchronous hatching on growth rate, oxidative stress and telomere dynamics. free-living great tits. Oecologia 2015;179:999-1010

[3] Costantini D, Monaghan P, Metcalfe NB. Biochemical integration of blood redox state in captive zebra finches (*Taeniopygia guttata*). J Exp Biol 2011;214:1148-1152

[4] Costantini D, Monaghan P, Metcalfe N. Early life experience primes resistance to oxidative stress; J Exp Biol 2012a;215:2820–2826

[5] Corsetti R, Villa M, Pasturenzi M, Finco A, Cornelli U. Redox State in Professional Cyclists Following Competitive Sports Activity;The Open Sports Medicine Journal, 2012; 6:34-41

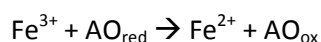
- [6] Lubrano V, Vassalle C, L'abbate A, Zucchelli GC. A new method to evaluate oxidative stress in humans. *Immuno-analyse Biologie Spécialisée* 2002;17:172-175.
- [7] Cighetti G, Paroni R, Marzorati S et al. Evaluation of oxidative stress in critically ill patients by a commercial assay and gas chromatographic-Mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:1515-1517.
- [8] Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron; *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1894;65
- [9] Mwebi N. Fenton & Fenton-like reactions: The nature of oxidizing intermediates involved University of Maryland (College Park, Md.) Ph.D. Thesis, 2005;160.
- [10] Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F, Caporaso N. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to Evaluate the Oxidative Status of Human Plasma. *Free Radical Research* 2002;36 (8):869–873
- [11] Iamele L, Fiocchi R, Vernocchi A. Evaluation of an automated spectrophotometric assay for reactive oxygen metabolites in serum *Clin Chem Lab Med* 2002; 40 (7): 673-6.
- [12] Trotti R, Carratelli M, Barbieri M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med* 2002;44 (1): 37-40.
- [13] Trotti R, Carratelli M, Barbieri M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Medica* 2002;44(1):37-40
- [14] Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Vet Res Commun* 2008;32:137–143
- [15] Cornelli U, Cornelli M, Terranova R, Luca S, Belcaro G. Ageing and free radicals. *Progress in Nutrition* 2000; 2(3)
- [16] Bertuglia S, Giusti A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1064-1071
- [17] Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem* 2004;37:312-317
- [18] Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ishihara A Oxygen concentration-dependent oxidative stress levels in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012;381763
- [19] Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine) *J Biol Chem* 1979;254:7558–7560
- [20] Costantini D. Oxidative stress ecology and the d-ROMs test: facts, misfacts and an appraisal of a decade's work; *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2016: 809-820
- [21] Stier A, Massemin S, Zahn S, Tissier ML, Criscuolo F. Starting with a handicap: effects of asynchronous hatching on growth rate, oxidative stress and telomere dynamics. free-living great tits. *Oecologia* 2015;179:999-1010
- [22] Casagrande S, Costantini D, Groothuis TGG. Interaction between sexual steroids and immune response in affecting oxidative status of birds. *Comp Biochem Physiol* 2012;163:296–301
- [23] Schneeberger K, Czirjak GA, Voigt CC. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *J Exp Biol* 2013;216:4514-4519
- [24] Costantini D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecol Lett* 2008;11:1238-1251
- [25] Haussmann MF, Longenecker AS, Marchetto NM, Juliano SA, Bowden RM. Embryonic exposure to corticosterone modifies the juvenile stress response, oxidative stress and telomere length. *Proc R Soc Lond B* 2012;279:1447-1456
- [26] Kamezaki F, Yamashita K, Kubara T, Suzuki Y, Tanaka S, Rkouzuma R, Okazaki M, Tasaki H, Otuji Y. Derivatives of reactive oxygen metabolites correlates with high-sensitivity C-reactive protein. *J Atheroscler Thromb.* 2008 Aug;15(4):206-12.

3.2.2

BAP TEST

Il BAP (Biological Antioxidant Potential), è basato sulla capacità del plasma sanguigno di ridurre lo ione ferrico a ferroso. Il BAP può essere considerato un diretto discendente della metodica FRAP [1] con il quale ne condivide il principio chimico. Grazie alla sua semplice metodica e alla stabilità dei reagenti utilizzati il BAP risulta di più semplice utilizzo rispetto al FRAP e di più adatto uso clinico.

Il BAP è basato sulla capacità di una soluzione di lavoro colorata, contenente una fonte di ioni ferrici legati ad un adeguato substrato, di decolorarsi quando gli ioni ferrici vengono ridotti a ioni ferrosi dai componenti antiossidanti (riducenti) del plasma sanguigno. Come tutte le analisi quantitative spettrofotometriche, d-ROMs compreso, il BAP è basato sulla legge di Lambert-Beer che correla l'assorbanza alla concentrazione di analita. Nel BAP una piccola porzione di plasma, 10 µl, viene posta a contatto con la soluzione di lavoro menzionata e dopo un'incubazione di 5 minuti a 37 °C l'assorbanza risulta essere inversamente proporzionale, ricordo che stiamo parlando di una decolorazione, alla concentrazione di antiossidanti. Il BAP è quindi basato sulla seguente reazione [2]:



Dove AO sono gli antiossidanti nella loro forma ridotta e nella loro forma ossidata rispettivamente. Il

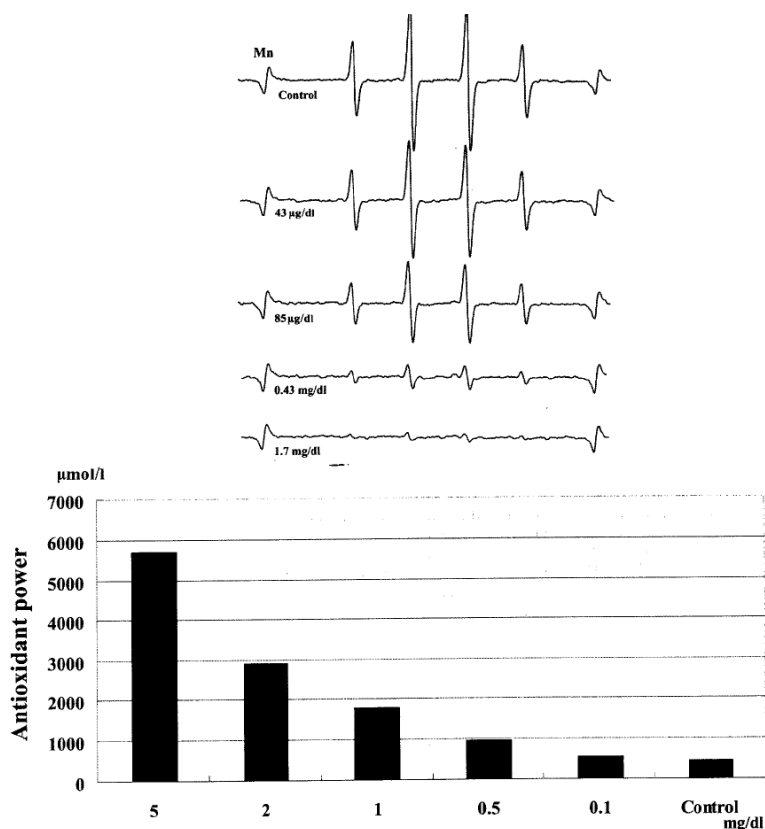


Figura 4: In alto il segnale ESR in relazione alla concentrazione di bilirubina e in basso il segnale del BAP in relazione alla concentrazione di bilirubina; immagini da Dohi at all 2005 [6]

solo ed esclusivamente dalla concentrazione degli ioni ferrici. Su questo principio si basa la determinazione degli ioni ferrici nel BAP. Valutando quindi l'intensità fotometrica di decolorazione, dovuta alla riduzione della quantità di ioni ferrici, è possibile quantificare la capacità antiossidante del plasma in esame. Questa capacità antiossidante non è assoluta ma riferita al substrato ione ferrico. Considerando però il potenziale di riduzione dello stesso contemporaneamente al fatto che ioni ferrici sono fisiologicamente presenti nel nostro organismo e spesso coinvolti in reazioni di ossidoriduzione possiamo affermare che il BAP fornisca una valida approssimazione della capacità antiossidante del plasma. È possibile ipotizzare sulla base di quanto detto che il BAP quantifichi tutti quegli antiossidanti che reagiscono direttamente con le specie reattive ossidanti. Scopo del BAP è la valutazione globale degli antiossidanti quindi non è mai stato condotto nessuno studio col fine di analizzare la natura degli antiossidanti reagenti al BAP. Si può tuttavia supporre che siano i medesimi reagenti al FRAP visto l'analogo principio su cui si basano le due metodologie. Il contributo relativo delle varie specie al valore FRAP sembra essere: 60% acido urico, 15% acido ascorbico, 10% proteine (es. albumina), 5% α -tocoferolo, 5% bilirubina, 5% altro[1]. Come si vede sono tutti antiossidanti diretti. Di contro sono stati condotti studi che dimostrano la reattività del BAP nei confronti dell'acido ascorbico e acido urico. In questi studi, condotti su soluzioni degli analiti citati, si osserva un significativo aumento del segnale del BAP in concomitanza dell'aumento delle concentrazioni di acido urico e ascorbico [7]. Ulteriori esperimenti hanno permesso di valutare la reattività del BAP nei confronti della bilirubina [6] e dell' α -tocoferolo [8] dimostrando l'universalità di risposta del BAP nei confronti di tutti i principali antiossidanti diretti del plasma sanguigno. La miglior prova della bontà dei risultati derivanti dal BAP viene forse dal particolare studio di Dohi at all [6]. In esso si dimostra la capacità di scavenging della bilirubina nei confronti di radicali idrossili prodotti mediante reazione di Fenton

problema diviene quindi quantificare la concentrazione di una delle due forme di ferro, e se Benzie, l'inventore del FRAP determinò lo ione ferroso, nel BAP si decise di determinare lo ione ferrico. Per la quantificazione dello ione ferrico si pensò di utilizzare la storica metodica basata sullo ione tiocianato [3]. Questa metodica è basata sulla complessazione dello ione ferrico da parte dello ione tiocianato con formazione di un complesso fortemente colorato di rosso. A dir la verità la struttura del complesso non è propriamente definita, in quanto in soluzione sono possibili fino a 6 diversi complessi di formula $[\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{(3-n)+}$ con n compreso tra 1 e 6, di conseguenza in ogni soluzione contenente ioni ferrici e ioni tiocianato si formeranno diversi di questi complessi in quantità variabile. La formazione di questi complessi dipende dal pH e dalla polarità [4][5]. Per comodità di esposizione tutte queste strutture saranno riassunte nel termine complesso tiocianato-ione ferrico. Riassumendo la colorazione di una soluzione contenente ioni ferrici e ione tiocianato in eccesso dipenderà

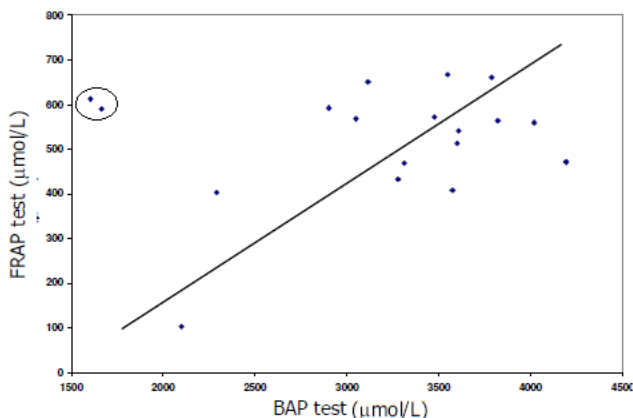


Figura 5: Confronto tra risultati BAP e FRAP; evidenziati i dati anomali; unpublished data.

$p < 0,05$ dimostrando così la stessa affinità tra i due test; risultati, nella figura 5. Da notare che il FRAP è generalmente tarato in trolox, un analogo idrosolubile della vitamina E e il BAP in vitamina C. Il significato di queste taratura con un monoanalita quando è stato dimostrato che i test sono reattivi a più analiti sta in questione di semplicità analita e nel fatto che poi i risultati andranno interpretati come segnale equivalente a quello di x trolox e x vitamina C. Seppur tardiva rispetto all'evoluzione del test è giunta recentemente una nuova prova dell'accuratezza dei risultati del BAP essendo stato positivamente correlato ai risultati della tecnica basata su ABTS, $r = 0,501$ con $p < 0,05$ [9]

Le performance analitiche, basate perlopiù su dati interni sono le seguenti:

- limite di quantificazione 393 $\mu\text{mol/l}$
- linearità 300-10000 $\mu\text{mol/l}$
- CV% < al 5%
- variabilità biologica < al 5%

Inoltre su plasma sanguigno canino è stata dimostrata l'alta linearità del test nei confronti di un campione di plasma diluito più volte. Il segnale di campioni così ottenuti ha dimostrato di avere un r^2 pari 0,95 [10]. In accordo con numerosi dati interni e con i dati pubblicati da *Nagata et al.* 2008 [11], si è stabilito un valore soglia di 2200 $\mu\text{mol/l}$ al sopra del quale la capacità antiossidante si presume sufficiente, mentre al di sotto della quale si manifesta invece una carenza.

[1] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay; *Analytical Biochemistry* 1996;239:70–76

[2] Martarelli D1, Cocchioni M, Scuri S, Pompei P. Diaphragmatic breathing reduces exercise-induced oxidative stress. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:932430.

[3] Woods J, Mellon M; Thiocyanate Method for Iron: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed* 1941;13 (8):551–554

[4] Ozutsumi K, Kurihara M, Kawashima T. Structure of iron(III) ion and its complexation with thiocyanate ion in N,N-dimethylformamide. *Talanta* 1993;40:599-607

[5] Krishnamoorthy G, Prabhananda BS. Kinetics of formation of Fe(III) complexes in aqueous DMSO. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 1981;43:1267-1275

[6] Dohi K, Satoh K, Ohtaki H, Shioda S, Miyake Y, Shindo M, Aruga T. Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo.* 2005;19 (5): 855–860.

[7] Nakayama K, Terawaki H, Nakayama M, Iwabuchi M, Sato T, Ito S. Reduction of serum antioxidative capacity during hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:218–224

[8] Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Does Edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxid. Redox Signal.* 2007;8: 281–287.

[9] Jansen EHJM, Ruskovska T. Comparative Analysis of Serum (Anti)oxidative Status Parameters in Healthy Persons. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:6106-6115

[10] Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Vet Res Commun* 2008;32:137–143

[11] Nagata K, Hasegawa T, Hirokado Y, Kiyama K, Otsuki C. Lifestyle-related diseases and the oxidative stress regulation system. *Jpn J Psychosom Med.* 2008;4(3): 176-183.

3.2

IL PRESENTE: D-ROMS FAST, PAT E SAT

Per anni i test d-ROMs e BAP si sono rivelati essere un valido strumento di valutazione dello stress ossidativo ma si è ritenuto possibile migliorarli entrambi giungendo alla creazione del d-ROMs fast e del PAT test.

3.2.1

d-ROMs FAST TEST

Il d-ROMs fast è la versione veloce del d-ROMs test, ossia dà il medesimo risultato, con la medesima validità diagnostica nella metà del tempo. Il d-ROMs test e il d-ROMs fast test sfruttano il medesimo principio chimico già diffusamente illustrato. Entrambi sfruttano la capacità dei perossidi di degradarsi a radicali alcossilici e perossilici in presenza di ioni metallici di transizione (reazione di Fenton) e la capacità di questi radicali così generati di reagire con DEPPD formando il radical-catione della medesima. Questo radical-catione è colorato e sufficientemente stabile da essere analizzato mediante una tecnica spettrofotometrica in grado di correlare l'assorbanza letta alla concentrazione iniziale di perossidi. Entrambi i test funzionano in modalità cinetica ossia correlano la velocità di colorazione della soluzione alla concentrazione di perossidi nel campione. Tuttavia, non è possibile applicare la modalità cinetica al d-ROMs test prima di 180 secondi, perché la velocità di reazione è ancora in aumento e non ancora costante. A parità di tempo analizzato, utilizzando la differenza di assorbanza misurata prima di 180 secondi, i dati risultano sottovalutati. Questo fenomeno non è presente nel d-ROMs fast test. Si può ragionevolmente supporre che la ragione della lenta velocità iniziale di reazione del d-ROMs sia causata dalla composizione del campione stesso, ad esempio per la presenza di antiossidanti. Da un punto di vista teorico la presenza di antiossidanti potrebbe avere due effetti diametralmente opposti. Gli antiossidanti potrebbero, sempre teoricamente, influenzare entrambi i passaggi della metodologia, in particolare la reazione di Fenton e l'ossidazione del DEPPD. Per il primo passo, per quanto riguarda la reazione di Fenton, si potrebbe pensare che la rapida riduzione degli ioni ferrici a ioni ferrosi causata dagli antiossidanti possa migliorare l'efficienza della reazione (la velocità della reazione catalizzata ioni ferrosi è circa 1000 volte superiore di quando è catalizzata da ioni ferrici) mantenendo costante la concentrazione degli ioni ferrosi. Questa ipotesi, tuttavia, è stata scartata dopo aver analizzato i dati sperimentali che mostrano una diminuzione iniziale del tasso di reazione e non un aumento. Un'ipotesi più plausibile è che gli antiossidanti presenti nel campione prevengano l'ossidazione del DEPPD ad opera dei radicali liberi generati dalla reazione di Fenton. Per quanto riguarda il d-ROMs classico la velocità di colorazione della soluzione, ovvero il tasso di formazione del radical-catione DEPPD^{•+}, sarà influenzato entro i primi 180 secondi dalla presenza degli antiossidanti. Non appena gli antiossidanti si esauriscono, la velocità di colorazione dipenderà solo dalla concentrazione dei radicali liberi e quindi è applicabile alla modalità cinetica. Questa ipotesi è rafforzata dai dati ottenuti utilizzando ioni ferrici piuttosto che ioni ferrosi nel d-ROMs fast. Gli antiossidanti che sono presenti nel plasma sono facilmente ossidati dagli ioni ferrici come mostrato nella grande diffusione di metodi analitici per la determinazione degli antiossidanti basati sulla riduzione di ioni ferrici da parte dell'antiossidante. L'ossidazione degli antiossidanti mediante ioni ferrici elimina la barriera difensiva contro l'ossidazione del DEPPD e produce ioni ferrosi idonei a catalizzare la reazione di Fenton. Ciò spiega la precoce costanza del tasso di colorazione e la conseguente riduzione del tempo di analisi. I dati sperimentali supportano quanto detto finora.

Un primo importante esperimento è stata l'analisi della cinetica della reazione, ossia sul medesimo campione di siero umano è stata applicata la metodica classica e la metodica fast ed è stata misurata l'assorbanza della soluzione ogni 30 secondi per 5 minuti di reazione a 37°C. Come già descritto la velocità di reazione di Fenton associata all'ossidazione DEPPD è relativamente bassa e l'assorbanza della soluzione colorata è massima e stabile dopo 90 minuti, che tuttavia, è un tempo troppo lungo troppo lungo per l'analisi dei dati clinici raccolti regolarmente. Con la metodica del d-ROMs classico è possibile correlare la velocità di colorazione, ossia la velocità di reazione tra 180 e 300 secondi, con la concentrazione iniziale di

perossidi perché l'aumento dell'assorbanza durante tale intervallo di tempo è lineare come mostrato nel grafico A (figura 6). Questo è possibile in quanto l'incremento di assorbanza è linearmente correlato col tempo di reazione. In modalità cinetica, una volta impostato l'intervallo di tempo delle misurazioni, la differenza di assorbanza dipenderà solamente dal coefficiente angolare. Il coefficiente angolare sarà proporzionale alla velocità di reazione a sua volta proporzionale alla concentrazione di perossidi. Quindi, si può facilmente valutare la concentrazione di perossido osservando la differenza di assorbanza tra due punti di lettura. Per quanto riguarda l'analisi cinetica, i risultati della prova con d-ROMs classico evidenziano che il modello lineare spiega adeguatamente il gradiente di colore nel corso del tempo ($R^2 > 0.99$); tuttavia, l'analisi dei residui indica che l'approssimazione lineare è errata (come si vede nella figura 1 grafico B). Guardando al grafico B sembra che la migliore approssimazione potrebbe essere una curva di secondo grado. Graficando le differenze di assorbanza in funzione del tempo, cioè della velocità di reazione, si può vedere che essa raggiunge un plateau in cui la differenza di assorbanza rimane costante dopo circa 180 secondi (figura 1 grafico C). Entro i primi 180 secondi l'aumento della velocità non è costante, il che significa che la modalità cinetica non è applicabile.

Al contrario, nella modalità fast, il modello lineare descrive sufficientemente bene l'assorbanza della soluzione in funzione del tempo, $R^2 > 0,99$ ma il grafico del residuo non mostra anomalie; vedi figura 2 grafico A e B. Inoltre, la velocità di reazione è costante dopo 60 secondi (figura 1 grafico C) e questo consente di accorciare il tempo di analisi da 300 a 150 secondi in totale.

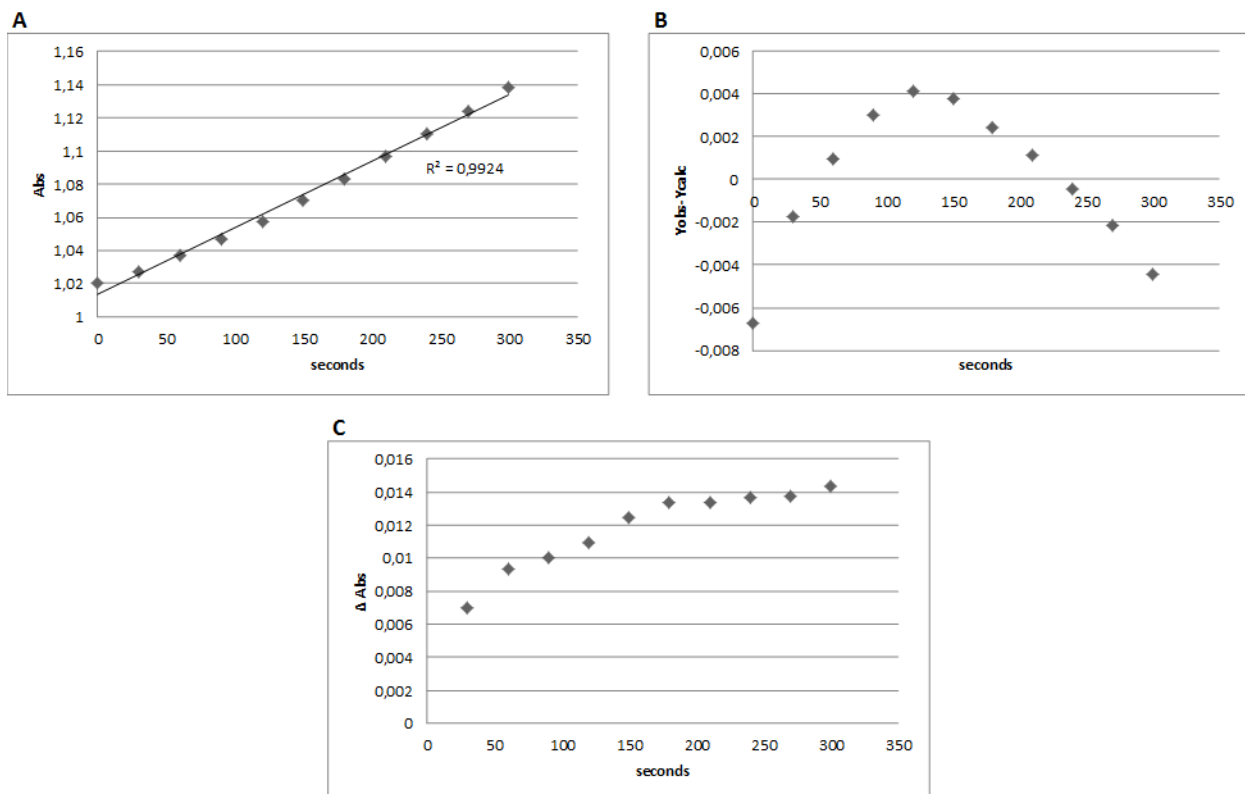


Figura 1: Risultati dell'analisi cinetica del test d-ROM Classico: Grafico A- Assorbanza in funzione del tempo di reazione; Grafico B- grafico dei residui; Grafico C- grafico della velocità di reazione

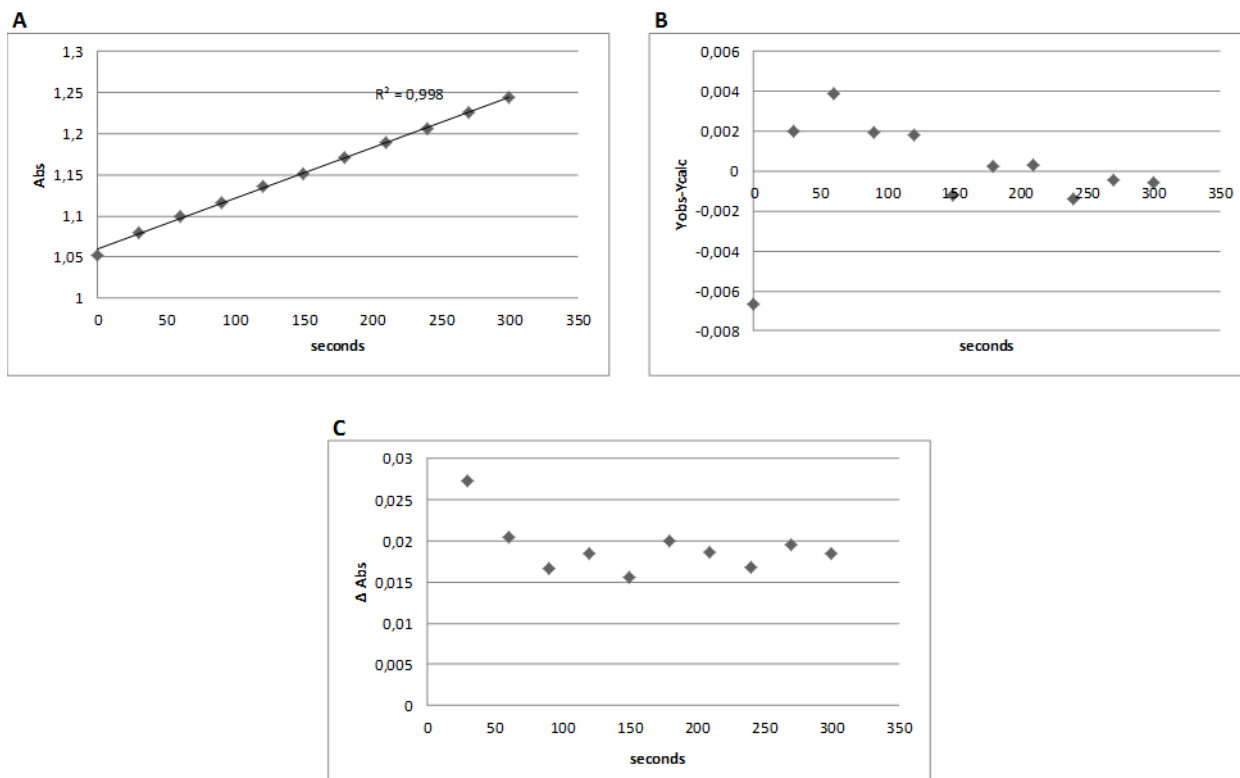


Figura 2: Risultati dell'analisi cinetica del test d-ROM fast: Grafico A- Assorbanza in funzione del tempo di reazione; Grafico B- grafico dei residui; Grafico C- grafico della velocità di reazione;

I risultati delle due modalità sono stati quindi confrontati tra loro. Il problema di dimostrare la sovrapposizione dei due risultati dalle due modalità è stato affrontato in tre modi diversi. I risultati di ogni approccio indipendente hanno i risultati simili. I dati ottenuti mediante le due differenti modalità non sono significativamente diversi (campioni utilizzati: 10 campioni di plasma umano e 5 campioni di siero equino). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicati con il test d-ROMs classico e con il d-ROMs fast. La concentrazione di perossido dei campioni era compresa tra 137 e 670 U.Carr, coprendo quindi l'intero intervallo di linearità dei test.

Nel primo approccio, il risultato di ogni campione ottenuto dal test d-ROM è stato confrontato con il risultato dello stesso campione ottenuto con il test FAST usando il t-test. In tutti i casi non è stata trovata alcuna differenza significativa tra i due risultati del test. I valori p erano tra 0,171 e 0,770.

Nel secondo approccio, è stato dimostrato con il t-test che la differenza media percentuale tra i valori ottenuti dai due test non è significativamente diversa da zero.

L'ultimo e più approfondito approccio ha contemplato la regressione lineare tra i due dati delle due modalità. Si è dimostrato che la linea retta ottenuta non è significativamente diversa dalla bisettrice $X = Y$ (figura 3), quindi i valori ottenuti con il test FAST di d-ROM si sovrappongono perfettamente ai valori ottenuti dal test dei d-ROM.

I seguenti dati sono stati ottenuti attraverso la regressione lineare:

- coefficiente angolare pari a 0,95 e significativamente diverso da 0 ($p \approx 10^{-15}$) ma non significativamente diverso da 1 ($p = 0,99$);
- intercetta pari a 10,00 ma non significativamente diverso da 0 (p -valore = 0,26);
- R^2 pari a 0,99.

Le performance analitiche sono le medesime della modalità classica.

	d-ROMs TEST		d-ROMs FAST		p
	value (U.Carr)	SD	value (U.Carr)	SD	
plasma umano					
sample 1	229	6	221	10	0,348
sample 2	384	17	404	27	0,386
sample 3	670	23	651	24	0,414
sample 4	240	7	228	17	0,453
sample 5	464	6	443	20	0,293
sample 6	373	23	345	10	0,250
sample 7	233	11	229	14	0,770
sample 8	229	5	218	10	0,285
sample 9	308	6	309	10	0,866
sample 10	227	5	241	12	0,171
siero equino					
sample 1	489	30	472	19	0,299
sample 2	290	22	285	16	0,737
sample 3	277	10	281	18	0,719
sample 4	137	9	142	3	0,382
sample 5	451	8	432	39	0,437

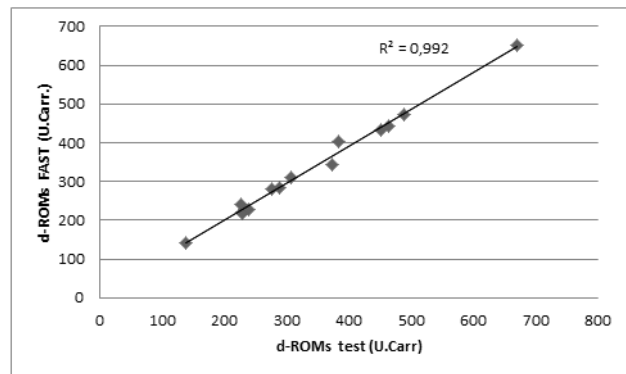


Figura 3: Sovrapponibilità d-ROMs classico-d-ROMs fast

3.2.2 PAT

Se l'evoluzione del d-ROMs a d-ROMs FAST rispondeva perlopiù ad esigenze cliniche di velocizzazione delle analisi, l'evoluzione del BAP a PAT (Plasma Antioxidant Test) è stata causata dall'esigenza di risolvere un serio problema analitico. Si è scoperto, infatti, che il BAP, come probabilmente tutti i test in cui è necessaria la determinazione colorimetrica dello ione ferrico, soffre l'interferenza degli ioni fosfato. Il fosfato di ferro è un sale insolubile (Kps in soluzione acquosa a 25°C tra 10^{-16} e 10^{-29} a seconda della struttura del precipitato come facilmente riscontrabile nelle tabelle di solubilità), quindi una parte degli ioni ferrici originariamente complessati dallo ione tiocianato si legherà agli ioni fosfato derivanti dal campione effettuando una decolorazione della soluzione di lavoro indipendente dalla concentrazione di antiossidanti ma dipendente dalla concentrazione di ioni fosfato. Il risultato di questa reazione competitiva è una sovrastima della stima della capacità antiossidante, anche piuttosto notevole. Il contenuto dei fosfati nei vari tessuti e fluidi varia a seconda della dieta, delle patologie, dell'attività fisica o dell'esposizione a fattori esogeni. Nel plasma, il contenuto dei fosfati oscilla tra i tra 7,8 e 13,5 mg/dl [2]. Il fosfato plasmatico esiste in forma di anioni fosfato monovalenti e bivalenti. Approssimativamente il 10% è legato alle proteine, il 35% è legato con il sodio, il calcio e il magnesio, e il rimanente 55% è in forma libera. Sebbene sia il fosfato organico che inorganico siano presenti nel sangue, solo il fosfato inorganico viene quantificato in quanto la parte organica è principalmente localizzata nelle cellule ematiche e diversamente disponibile per le reazioni biologiche o analitiche. Si è resa quindi necessaria l'introduzione di un secondo metallo di transizione avente una maggior affinità coi fosfati ma non interferente col tiocianato. Questo metallo è stato individuato nello zirconio [1](sali di zirconio di varie struttura sono noti per la loro insolubilità [3]). Il principio chimico alla base del PAT è il medesimo alla base del BAP, ossia si misura la capacità del plasma sanguineo di ridurre lo ione ferrico a ferroso secondo la seguente reazione:

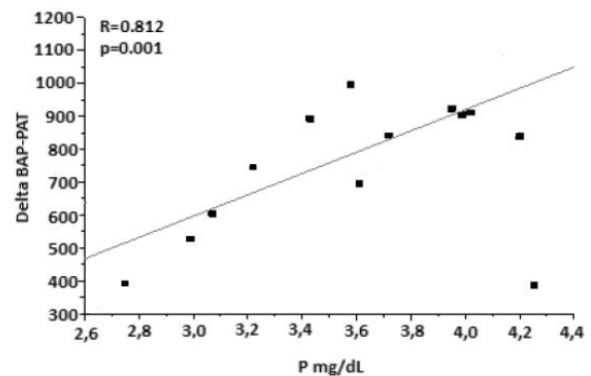
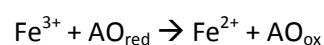


Figura 4: correlazione tra Δ BAP-PAT e livelli di fosfati espressi come fosforo; immagine rielaborata da *Benedetti et al. 2013* [1]



L'aggiunta di un opportuno sale di zirconio nella giusta quantità ha permesso di eliminare l'interferenza originata dai fosfati come opportunamente dimostrato da *Benedetti et al. 2013* [1]. Particolarmente importante è risultata la significativa correlazione ($r=0,812$ $p<0,05$) tra i valori di fosfati misurati nel plasma di 16 volontari apparentemente sani e la differenza di capacità antiossidante misurata con la metodica PAT e con la metodica BAP sui medesimi campioni. Tutto questo a forte riprova di quanto finora affermato. Altro miglioramento del PAT rispetto al BAP test è la velocizzazione delle reazioni, ottenuta mediante la modifica dell'ambiente di reazione (in particolare polarità e composizione) con tempi di analisi ridotti ad 1 minuto d'incubazione solamente. Le performance analitiche del PAT sono piuttosto simili a quelle del BAP test essendo lineare tra 500 e 6000 $\mu\text{mol/l}$ (sempre riferita ad una soluzione standard di vitamina C) e avendo un CV% medio inferiore al 5,5%. Quanto finora detto a riguardo del PAT non deve però inficiare i passati meriti del BAP, in quanto seppur con valori assoluti alterati dalla presenza di fosfati ha dato in passato ottime prove come descritto nel paragrafo precedente. Per un discorso di confrontabilità (in termini di numero assoluto) tra dati BAP e dati PAT, almeno in termini generali, si è deciso di riscalare i valori PAT su quelli BAP. Come già accennato in *Benedetti et al. 2013* [1] la differenza media tra BAP e PAT è del 40% con oscillazioni comprese tra il 25% e il 50%. Si è deciso quindi di introdurre l'U.Cor, definita come 1,4 $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C. È possibile che sul singolo soggetto il valore di PAT e di BAP differiscano, tanto maggiormente quanto più estremo sia il contenuto di fosfati, ma a livello di confrontabilità sui grandi numeri grazie all'introduzione dell'U.Cor non si sono riscontrate evidenti problematiche. Per esempio è stato possibile utilizzare i valori di riferimento determinati su persone sane mediante BAP. Detto questo, vista la miglior esattezza del PAT rispetto al BAP (ricordo che per esattezza si intende la vicinanza del valore letto con l'ipotetico valore vero) è questi da preferirsi sicuramente nella pratica clinica e di ricerca.

[1] Benedetti S, Primiterra M, Catalani S, Finco A, Canestrari F, Cornelli U. Performance Evaluation of the Innovative PAT Test, Comparison with the Common BAP Test and Influence of Interferences on the Evaluation of the Plasma Antioxidant Capacity. Clin. Lab. 2013;59:1091-1097

[2] Ganong WF. Review of Medical Physiology. Lange Medical Book/Mc Grow-Hill, 21st Edition- 2001

[3] Trobajo C, Khainakov SA, Espina A, García JR. On the Synthesis of α -Zirconium Phosphate. Chem. Mater. 2000;12(6):1787-1790

3.2.3 SAT

Particolare attenzione si è sviluppata negli ultimi anni per la valutazione dell'equilibrio redox del cavo orale in generale e della saliva in particolare. Per quanto riguarda le considerazioni sulla valutazione dello status del cavo orale in relazione a patologie locali si rimanda alla sezione dedicata del capitolo 6. Sebbene una correlazione statistica tra i markers di stress ossidativo sistemici (PAT e d-ROMs) e salivari (SAT) non è ancora stata provata è noto una certa relazione tra lo stress ossidativo sistemico e quello del cavo orale [1][2][3][4][5][6]. Si può, seppur con una certa cautela, affermare che a meno della presenza di patologie locali, lo status redox orale possa rispecchiare almeno in parte quello sistemico. Logicamente la presenza di patologie locali, quali per esempio parodontite e carie, altera lo status redox locale eliminando ogni possibile correlazione con quello sistemico. Il principio chimico del SAT è il medesimo del PAT ossia viene misurata la capacità della saliva di ridurre lo ione ferrico a ferroso in presenza di un cromogeno colorato quando è legato allo ione ferrico e incolore quando è legato allo ione ferroso. La base chimica del SAT è la medesima del PAT anche nel contrasto alle interferenze da parte dei fosfati, ossia mediante l'utilizzo dell'opportuna quantità di un sale di zirconio [7]. Nella saliva il problema dei fosfati è maggiore in quanto maggiori sono le concentrazioni di fosfato riscontrate, 2-50 mg/dl [5][7][8]. Le prestazioni analitiche del SAT sono le medesime del PAT ma l'unità di misura utilizzata è $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C (abbreviabile in μM), non essendoci in questo caso problemi di continuità storica. Si evidenzia ancora il fatto che un risultato di 1000 μM non indica la presenza di tale concentrazione di vitamina C nella saliva, anche perché il principale antiossidante presente è l'acido urico, ma un livello di antiossidanti che hanno un potere riducente pari a quello di 1000 $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C. Particolare attenzione è stata posta nell'elaborazione degli intervalli di riferimento per pazienti sani.

	Benedetti et al. 2014 [7]	Montuori [9]	Shorer [10]	Corradini[11]
Centro	Dipartimento Scienze biomolecolari; Facoltà Scienze e Tecnologie dell'Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"	Reparto di igiene orale e prevenzione; Ospedale San Raffaele(Milano)	Reparto di igiene orale e prevenzione; Ospedale San Raffaele(Milano)	Dip di scienze odontomastologiche e maxilo facciali; Facoltà di medician e chirurgia I dell'Università Sapienza (Roma)
Numerosità	70	8	20	50
Genere	26 M 44 F	Non disponibile	4 M 16 D	25 M 25 M
Età	18-40	40-70	18-50	18-56
Criteri salute	Assenza di patologie sistemiche o parodontali; non fumatori; cavo orale apparentemente sano, esame oggettivo	Assenza di patologie sistemiche o parodontali; non fumatori; nessuna assunzione di alcolici; nessun trattamento con farmaci	Assenza di patologie sistemiche in atto; PSR negativo (periodontal screening and recording); parodonto sano; assenza di sensibilità dentinale	Apparentemente sani, esame soggettivo
Media	1309	2386	1323	2032
SD*	531	269	613	332
Mediana	1156	2438	1179	2133
Minimo	947	1967	376	1432
Massimo	3821	2717	2616	2624

Tabella 1: Dati SAT da differenti studi

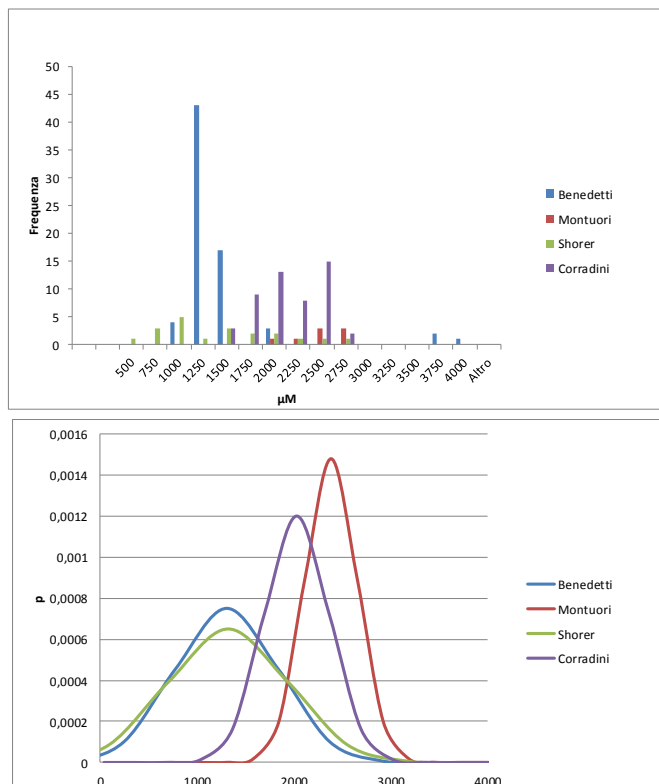


Figura 5: Rappresentazione grafica estesa dei dati SAT presi in esame per definire l'intervallo di normalità

Per quanto riguarda l'elaborazione dei valori di riferimento del test SAT si è lavorato sui dati provenienti da 4 studi diversi (una pubblicazione [7] e tre tesi di laurea [9-11]) per un totale di 148 casi. I dati inclusi in questa elaborazione derivano esclusivamente da pazienti apparentemente sani, specialmente per quanto riguarda la salute del cavo orale. Nella tabella 1 sono descritti gli studi presi in considerazione, le informazioni note sul campione in esame e i risultati dei test SAT. Nella figura 5 sono comparati graficamente i risultati degli studi presi in esame. Nel primo grafico i dati sono raffigurati mediante istogramma mentre nel secondo grafico sono illustrate le distribuzioni gaussiane descriventi i vari gruppi di dati. Le gaussiane sono raffigurate con il dato SAT sulle ascisse e la rispettiva probabilità sulle ordinate. Già da un punto di vista grafico è intuibile che i quattro campioni siano diversi.

Questa intuizione è facilmente dimostrabile mediante analisi ANOVA, da cui risulta una differenza significativa tra i gruppi ($p \approx 10^{-16}$) presi in esame. Approfondendo l'analisi statistica mediante il test di Bonferroni (test per confronto multiplo a posteriori) si nota, di fatto, l'esistenza

di due soli gruppi in quanto i dati da Benedetti e Shorer non differiscono significativamente tra loro ma differiscono da gli altri gruppi e contemporaneamente i dati da Montuori e Corradini non differiscono tra loro ma sono significativamente diversi da Benedetti e Shorer. Quindi quale range di valori di SAT ci si può

aspettare in una persona apparentemente sana? Un valore attorno ai 1000-1500 μM o un valore più vicino alle 2000 μM ? La risposta a questo quesito passa per la definizione di apparentemente sano. Questa definizione, anche quando corredata da riferimenti oggettivi, rimane una valutazione perlopiù soggettiva e quindi passibile di differenze di valutazione anche tra professionisti del settore come gli autori delle analisi. Se escludiamo alcuni dati dello studio di *Benedetti et al. 2014* [7], anormalmente alti possiamo costatare che ogni professionista è stato piuttosto coerente con se stesso, ma non con tutti i colleghi. Allo stato attuale non abbiamo informazioni sufficienti per discriminare quale dei due macrogruppi di valori assumere come range di riferimento, nello specifico non possiamo giudicare più sani di altri i pazienti di un gruppo piuttosto che di un altro, quindi si è deciso di considerare tutti i dati ottenuti nel loro insieme. Si è deciso di considerare come intervallo di riferimento 1000-2300 μM , ossia i valori compresi tra il 17esimo e l'87esimo percentile (i dati nel loro insieme non sono approssimabili ad una distribuzione gaussiana quindi non è possibile usare la deviazione standard; si sono decisi i percentili indicati sulla base del fatto che secondo il teorema di Tchebycheff la deviazione standard, l'indice di dispersione comunemente usato con distribuzioni normali, comprende il 67% delle osservazioni e si è trasposta questa percentuale alla statistica non parametrica). Sulla base di successive nozioni, approfonditamente descritte nell'opportuna sezione del capitolo 6, si è deciso di limitare precauzionalmente l'intervallo di riferimento a 1000-2000 μM e di considerare l'intervallo 2000-2500 μM come valori borderline, ossia valori ancora normali ma sufficientemente alti da necessitare un controllo più approfondito.

Tra i primi studi clinici adatti a dimostrare l'utilità del SAT test è possibile citare le tesi di laurea di Shorer Ionea [10] e di Montuori Fiorella [9]. Lo studio di Shorer è stato condotto su pazienti sottoposti a sbiancamento mediante una pasta contenente perossido d'ossigeno attivato a radicale idrossile mediante lampada UV. Al tempo zero è stato eseguito il SAT test per rilevare i valori basali, dopo 15 giorni i test sono stati ripetuti dopo la sessione di sbiancamento e dopo altri 7 giorni i test sono stati ripetuti. Il principale risultato di questo studio è stata la significativa diminuzione ($p < 0,001$) del valore medio di SAT tra il valore basale e dopo la sessione di sbiancamento, da 1323 μM a 779 μM , e successivo ripristino del valore dopo una settimana dallo sbiancamento, 1165 μM . Questo andamento indica chiaramente che in presenza di un forte potere ossidante, in questo caso esogeno, il valore di SAT diminuisce, fornendo la prova in vivo del fatto che il SAT misura effettivamente il potere antiossidante della saliva; potere antiossidante che in questo caso si è consumato per fronteggiare l'aggressività dei radicali perossili. In occasione della terza analisi essendo venuta a mancare la perturbazione esterna ad opera dei radicali il valore di SAT è tornato ai valori iniziali. Più complesso come approccio è stato il lavoro di Montuori, in questo caso i pazienti sono stati divisi in due gruppi, pazienti parodontalmente sani e non. I due gruppi si sono sottoposti a tre visite, ossia al tempo zero e dopo 45 e 90 giorni da esso. Nella prima seduta il gruppo controllo è stato sottoposto a indice di placca (IP) indice di sanguinamento (BOP), seduta di igiene orale professionale e IIOD (istruzione igiene orale domiciliare). Il gruppo test è stato sottoposto a check up parodontale (compreso di raggi x endorali, a BOP, IP e sondaggio profondità tasche parodontali (PD)) e sono stati sottoposti al protocollo OSFMD (one stage full mouth disinfection), scaling e levigature radicolari nelle 24 ore. Inoltre entrambi i gruppi sono stati sottoposti a SAT test. Alla seconda e alla terza visita sono stati rivalutati i vari indici e parametri presi in questione. L'indice di placca è stato rilevato mediante un rilevatore cromatico di placca a base di eritrosina, l'indice di sanguinamento è invece la percentuale di siti sanguinanti dopo il sondaggio parodontale. Come si potrà apprezzare dai risultati numerici, questo studio evidenzia la coerenza tra l'andamento degli indicatori della patologia parodontale e l'andamento dei valori di SAT. In particolare nei pazienti parodontici si ha avuto una diminuzione dei valori di SAT da una media di 3030 μM a circa 2000 μM già al primo controllo e tale valore si è poi mantenuto inalterato al terzo controllo. Questa diminuzione è stata accompagnata da un dimezzamento della profondità delle tasche parodontali e da una diminuzione del 6% dell'indice di placca e di una diminuzione del 68% dell'indice di sanguinamento. Una diminuzione, anche se inferiore, dei valori di SAT è stata osservata anche nel gruppo controllo passando da 2380 μM a 1570 μM , probabilmente dovuta al semplice miglioramento delle pratiche di igiene orale quotidiana. Da questo studio sembra emergere un certo collegamento tra l'alto valore di SAT e lo stato infiammatorio del cavo orale. Un altro studio, finora non pubblicato, ha valutato l'incidenza della pratica di igiene orale professionale sul valore di SAT. In questo studio si è eseguito il SAT test prima e dopo la seduta di igiene orale professionale e

si sono ottenuti alcuni interessanti risultati. In primo luogo si ha avuto una diminuzione del valor medio da 2883 μM a 1686 μM . Di maggior interesse invece sono i risultati che si osservano se i pazienti vengono divisi in base al valore di SAT iniziale. Se il valore di SAT iniziale è superiore a 2000 μM si ha una forte diminuzione da 3607 μM , un valore alto, a 1887 μM , un valore normale, mentre se il valore iniziale era inferiore a 2000 μM non si è vista una diminuzione apprezzabile. I risultati di quest'ultimo gruppo escludono il fatto che la generale diminuzione osservata nel SAT sia dovuta a qualche effetto diluizione operato durante l'igiene professionale. Considerando quindi che si è osservato un miglioramento del valore SAT solo quando questo era originariamente compromesso si possono interpretare questi risultati come indice del fatto che il valore del SAT test sia un indice della salute generale del cavo orale: non è diminuito quando era già normale ma solo quando il trattamento di igiene professionale ha agito su situazioni alterate. Considerando anche che non tutte le situazioni compromesse sono migliorate fino alla normalità si può assumere anche che il test possa essere utilizzato anche come valutazione dell'efficienza della dell'igiene orale professionale, anche se questo dovrebbe essere dimostrato ulteriormente con studi più vasti.

Altro interessante dato emerso dallo studio dei dati interni è la forte correlazione trovata tra l'indice di sanguinamento e il SAT test. Su 32 casi si è trovato un r di Pearson di 0,70 con una significatività $p < 0,01$, in particolare si nota come non si siano trovati casi di SAT inferiori a 2000 μM se l'indice di sanguinamento è superiore al 30%.

Tutti le variazioni citate in questo paragrafo sono risultate significative da un punto di vista statistico.

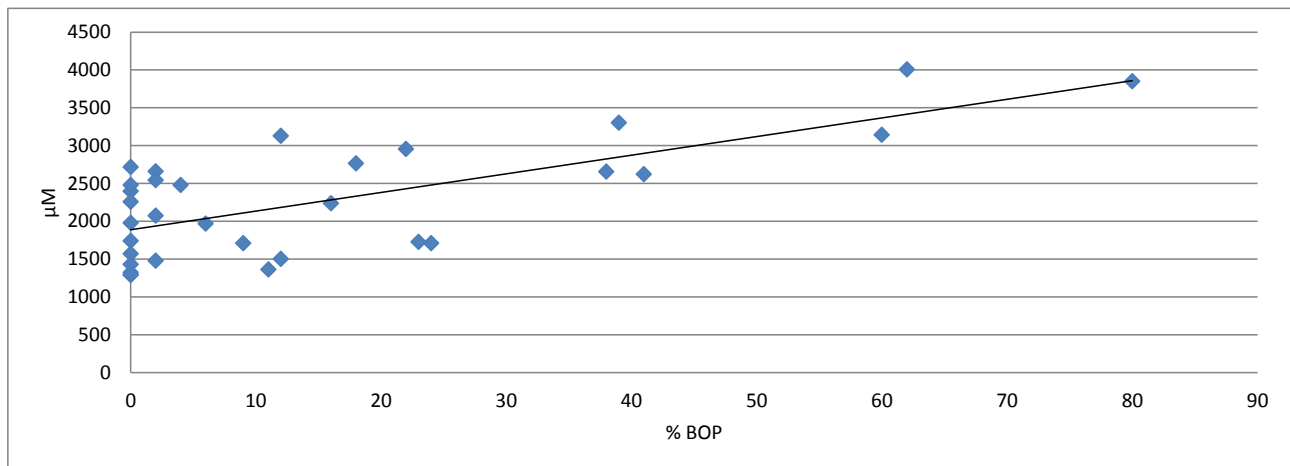


Figura 6: Correlazione tra valori SAT e valori BOP

Molto interessante, seppur con dei risultati non del tutto coerenti con quanto finora detto è anche il recente studio di *Tartaglia et al. 2017* [12]. Dall'analisi di 50 casi si è osservato una certa relazione tra bassi valori di SAT e PSR (Periodontal Screening and Recordings) positivo ossia risultate pari a 2 su di una scala da 0 a 4. In particolare è stata calcolata una sensibilità dell'85% e una specificità del 36% ossia più dell'80% dei pazienti parodontici aveva un SAT basso ma solo il 36% dei pazienti con SAT basso era parodontico. A questo punto occorrono due precisioni, col fatto di considerare il PSR solo positivo o negativo non siamo a conoscenza della gravità dello stato dei pazienti parodontici inoltre lo studio è stato fatto in una sola seduta senza follow up quindi non è stato possibile verificare l'andamento nel tempo dei valori. A fronte dei dati ottenuti gli autori sospettano la possibilità che il basso valore di SAT sia potenzialmente predittivo dell'insorgenza della patologia parodontale, ma tale evidenza ha bisogno di prove più solide e studi di maggior portata per essere confermata.

È in fase di validazione una versione destinata all'uso autodiagnostico del SAT basata non sulla misurazione fotometrica ma sul confronto visivo del colore della soluzione con un'opportuna scala colorimetrica

[1] Deminice R, Sicchieri T, Payão PO, Jordão AA. Blood and Salivary Oxidative Stress Biomarkers Following an Acute Session of Resistance Exercise in Humans. *Int J Sports Med* 2010; 31

[2] Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Morita M. Short-Term Effects of Non-Surgical Periodontal Treatment on Plasma Level of Reactive Oxygen Metabolites in Patients With Chronic Periodontitis. *Periodontol* 2009;80(6)

- [3] Ben-Zvi I1, Green Y, Nakhoul F, Kanter Y, Nagler RM. Effects of diabetes mellitus, chronic renal failure and hemodialysis on serum and salivary antioxidant status. *Nephron Clin Pract.* 2007;105(3):c114-20. Epub 2006 Dec 29.
- [4] Nagler RM1, Salameh F, Reznick AZ, Livshits V, Nahir AM. Salivary gland involvement in rheumatoid arthritis and its relationship to induced oxidative stress. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Oct;42(10):1234-41.
- [5] Edgar WM. Saliva: its secretion composition and functions. *Br Dent J* 1992;172:305-312.
- [6] Tamaki N, Tomofuji T, Maruyama T, Ekuni D, Yamanaka R, Takeuchi N, Yamamoto T. Relationship between periodontal condition and plasma reactive oxygen metabolites in patients in the maintenance phase of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2008 Nov;79(11):2136-42
- [7] Benedetti S, Primiterra M, Finco A, Canestrari F, Cornelli U. Validation of a Patented Method to Determine the Antioxidant Capacity of Human Saliva Based on the Reduction of Iron: the SAT test. *Clin. Lab.* 2014;60:475-482
- [8] Lura HE. Investigation on the Salivary Phosphates and Phosphatases. *J Dent Res* 1947;26: 203.
- [9] Montuori F. Valutazione dello stress ossidativo nel cavo orale nei pazienti affetti da malattia parodontale. tesi di laurea in "Igiene Dentale", facoltà di medicina e chirurgia, Università Vita-Salute San Raffaele A.A. 2010/2011
- [10] Shorer I. Effetto dello sbiancamento professionale sullo status ossidativo del cavo orale; tesi di laurea in "Igiene Dentale", facoltà di medicina e chirurgia, Università Vita-Salute San Raffaele A.A 2011/2012
- [11] Corradini E. Lo stress ossidativo nel cavo orale: potere antiossidante della saliva e malattia parodontale; tesi di master interdisciplinare di I livello Tecnologie avanzate nelle scienze di igiene orale; dipartimento di scienze odontomastologiche e maxillo facciali; facoltà di medicina e chirurgia I dell'Università Sapienza (Roma) A.A. 2009/2010
- [12] Tartaglia GM, Gagliano N, Zarbin L, Tolomeo G, Sforza C. Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults. *Archives of Oral Biology* 2017;78:34-38

3.3

d-ROMS E CERULOPLASMINA

La ceruloplasmina è una ferrossidasi sierica che contiene più del 95% del rame presente nel plasma. Questa proteina è un membro della famiglia delle ossidasi multi-rame, un gruppo evolutivamente conservato di proteine che utilizzano il rame per accoppiare l'ossidazione del substrato con la riduzione dell'ossigeno nel ciclo di smorzamento dello stesso. Nonostante la necessità di rame nella funzione ceruloplasminica, questa proteina non svolge alcun ruolo essenziale nel trasporto o nel metabolismo di questo metallo. Molto più importante è la sua funzione difensiva nei confronti degli ioni ferrici, specialmente se accoppiata con la transferrina, la principale proteina di trasporto del ferro nel plasma. La ceruloplasmina viene prodotta nel fegato e rilasciata nel plasma sanguigno dove ha la capacità di ossidare gli ioni ferrosi (tossici per la loro capacità di generare radicali liberi) a ioni ferrici, ossia nella forma legata dalla transferrina[1][2]. In tempi più o meno recenti alcuni autori, *Erel 2005*, *Harma et al. 2006* e *Kilk et al. 2014* [3-5] hanno accostato il d-ROMs alla ceruloplasmina o meglio hanno affermato che il d-ROMs non sia sensibile ai perossidi ma che il segnale letto sia dovuto solo all'attività ossidante della ceruloplasmina. Siccome tali affermazioni potrebbero portare ad un uso sbagliato del d-ROMs e a gravi conseguenze interpretative si è deciso di riunire in questo paragrafo tutte le considerazioni finora fatte in merito. La principale prova nell'infondatezza di tali affermazioni sta nel fatto che non esiste correlazione tra il risultato letto dal d-ROMs e la concentrazione di soluzioni di rame e ceruloplasmina appositamente preparate [6]. Il discorso però si può fare molto più ampio come dimostra il recente lavoro di Costantini [7] di cui il proseguito del paragrafo è in larga parte una parziale sintesi. La prima considerazione coinvolge le concentrazioni di perossidi e ceruloplasmina nelle varie specie/condizioni e viene evidenziato il fatto che, per esempio, seppur maiale e uomo hanno il medesimo contenuto in ceruloplasmina [8] il valore di d-ROMs è dalla due alle sei volte maggiore nel maiale [9]. Similmente, è noto che nei mammiferi e negli uccelli la ceruloplasmina è attiva e quantificabile a livelli simili sia nei neonati che negli adulti [10-12], mentre ridotto o assente è il contenuto di perossidi nei neonati rispetto agli adulti della medesima specie: giovani gheppi in *Costantini e Dal'Omol. 2006* [13]; gheppi adulti in *Casagrande et al. 2011*[14]; uomo in *Vassalle et al. 2006* [15] e cavallo in *Sgorbini et al. 2015* [16]. Anche se, in generale, i modelli di variazione dei valori di d-ROM e di ceruloplasmina differiscono tra loro, implicando una bassa o nessuna correlazione tra loro [17-19], si deve considerare inoltre che non è corretto dedurre una potenziale interferenza di una determinata molecola in un dosaggio da una semplice correlazione. Inoltre bisogna tener conto che la ceruloplasmina contribuisce alla regolazione dell'equilibrio ossidativo nell'organismo [20-23], quindi può accadere sia trovare che di non trovare correlazioni tra ceruloplasmina e i vari marcatori di danno ossidativo, inclusi i perossidi organici [24-28]. Gli autori già citati hanno sollevato critiche per il dosaggio dei d-ROM, sostenendo che non è un esame valido per la quantificazione dello stato ossidativo plasmatico, tuttavia, questi studi critici si sono basati su metodologie seriamente inadeguate, ma soprattutto risaltano anomalie varie rispetto ai protocolli precedentemente convalidati. Ad esempio, in *Erel 2005* [3] sono stati utilizzati chelanti per la preparazione di campioni che interferiscono con la reazione del d-ROMs [29]. I chelanti sequestrano gli ioni di ferro, necessari per la reazione e questo è già stato spiegato nello studio di validazione [30]. Quindi, anticoagulanti come EDTA o citrato non devono essere utilizzati in fase di campionamento. Recentemente, critiche simili a quelle di *Harma et al. 2006* [4] sono state sollevate da *Kilk et al. 2014* [5]. Ancora una volta, queste critiche sono basate sull'inadeguatezza metodologica nell'applicazione del saggio dei d-ROMs. In primo luogo *Kilk et al. 2014* ha verificato la capacità del d-ROMs di valutare i danni ossidativi utilizzando soluzioni di perossido di idrogeno. È stato osservato che il d-ROMs è in grado di rilevare debolmente il perossido di idrogeno solo quando si verificava a concentrazioni molto elevate ($\geq 50 \mu\text{M}$), concentrazione che talvolta si trova nel plasma di individui con stress severo ossidativo; quindi, gli autori hanno concluso che la quantità di perossidi nel plasma è un po' al di sopra del limite di rilevazione del dosaggio d-ROMs solo in condizioni di forte stress ossidativo. La piccola capacità del d-ROMs nel misurare il perossido d'idrogeno non è però una novità [31], in quanto il d-ROMs principalmente misura la concentrazione di perossidi organici [6]. Il d-ROMs può rilevare perossidi organici a concentrazioni ben inferiori a $10 \mu\text{M}$ [32], Inoltre, in *Gerardi et al. 2002* [32] viene evidenziata la correlazione significativamente positiva con i perossidi lipidici misurati con il saggio FOX. In secondo luogo per *Kilk et al.*

2014 le letture d-ROMs di soluzioni contenenti ceruloplasmina e siero diminuiscono diminuendo la temperatura di incubazione da 37°C (protocollo di d-ROM) a 23°C e a 4°C, mentre quelle di soluzioni contenenti perossido di idrogeno sono meno dipendenti dalla temperatura. Questi risultati sono ancora inaffidabili perché, primo, la reazione di Fenton è altamente dipendente dalla temperatura [33], come mostrato anche dalla diminuzione delle letture di soluzioni di idroperossido di cumene al diminuire delle temperature di incubazione, e secondo la diminuzione dell'assorbanza di soluzioni di idroperossido di cumene con temperatura è simile a quella dei campioni di plasma. In terzo luogo, gli autori hanno ipotizzato che tioli come quelli dell'albumina e del glutathione potrebbero interferire col dosaggio dei perossidi. Tuttavia, la quantità di albumina o glutathione che *Kilk et al. 2014* aggiungono ai campioni di siero è una dose farmacologica e non fisiologica, inoltre, come sottolineato dagli stessi autori, il glutathione non ha influenzato i valori di d-ROMs a concentrazioni fisiologiche. Sulla base delle considerazioni finora fatte si possono rigettare le ipotesi di non adeguatezza del d-ROMs nel dosaggio dei perossidi, in quanto il d-ROMs test e di conseguenza il d-ROMs fast non dosa la ceruloplasmina.

- [1] Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien JP, David S. Ceruloplasmin Regulates Iron Levels in the CNS and Prevents Free Radical Injury. *The Journal of Neuroscience* 2002;22(15):6578–6586
- [2] Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* 2002;22:439-458
- [3] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111
- [4] Harma MI, Harma M, Erel O. Measuring plasma oxidative stress biomarkers in sport medicine. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:505
- [5] Kilk K, Meitern R, Härmsen O, Soomets U, Hõrak P. Assessment of oxidative stress in serum by d-ROMs test. *Free Radical Res* 2014;48:883-889
- [6] Colombini F, Carratelli M, Alberti A. Oxidative stress, d-ROMs test, and ceruloplasmina. *Free Radical Research* 2016;50(4)
- [7] Costantini D. Oxidative stress ecology and the d-ROMs test: facts, misfacts and an appraisal of a decade's work; *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2016: 809-820
- [8] Feng J, Ma WQ, Gu ZL, Wang YZ, Liu JX. Effects of dietary copper (II) sulfate and copper proteinate on performance and blood indexes of copper status in growing pigs. *Biol Trace Elem Res* 2007;120:171-178
- [9] Brambilla G, Civitareale C, Ballerini A, Fiori M, Amadori M, Archetti LI, Regini M, Betti M. Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine; *Redox Rep* 2002;7:159-163
- [10] Lin H, Deculypere E, Buyse J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) - 2. Short-term effect. *Comp Biochem Physiol* 2002;139:745-751
- [11] Fleming JJ, Santhosh S, Selvakumar R, Jose A, Eapen CE. Usefulness of ferroxidase activity of ceruloplasmin in the diagnosis of Wilson's disease. *Indian J Clin Biochem* 2009;24:15-22
- [12] Wang J, Li D, Che L, Lin Y, Fang Z, Xu S, Wu D. Influence of organic iron complex on sow reproductive performance and iron status of nursing pigs. *Livest Sci* 2014;160:89-96
- [13] Costantini D, Dell'Omo G. Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comp Biochem Physiol* 2006;145:137–142
- [14] Casagrande S, Dell'Omo G, Costantini D, Tagliavini J, Groothuis T. Variation of a carotenoid-based trait in relation to oxidative stress and endocrine status during the breeding season in the Eurasian kestrel: a multi-factorial study. *Comp Biochem Physiol* 2011; 160:16-26
- [15] Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, Ndreu R, Zucchelli GC. Automation and validation of a fast method for the assessment of in vivo oxidative stress levels. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1372-1375
- [16] Sgorbini M, Bonelli F, Rota A, Marmorini P, Biagi G, Corazza M, Pasquini A. Maternal and neonatal evaluation of derived reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. *Theriogen* 2015;83:48-51
- [17] Zappasodi F, Squitti R et al Neuronal functionality assessed by magnetoencephalography is related to oxidative stress system in acute ischemic stroke. *NeuroImage* 2009;44:1267-1273
- [18] Talukder S, Kerrisk KL, Gabai G, Fukutomi C. Changes in milk oxidative stress biomarkers in lactating dairy cows with ovulatory and an-ovulatory oestrous cycles. *Animal Reprod Sci* 2015;158:86-95
- [19] Talukder S, Kerrisk KL, Ingenhoff L, Gabai G, Garcia S, Celi P. Changes in plasma oxidative stress biomarkers in dairy cows after oestrus synchronisation with controlled internal drug release (CIDR) and prostaglandinF2α (PGF2α). *Anim Prod Sci* 2014;54:1490-1496
- [20] Goldstein IM, Kaplan B Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 1979;254:4040–4045
- [21] Calabrese L, Carbonaro M. An e.p.r. study of the non-equivalence of the copper of caeruloplasmin. *Biochem* 1986;238:291-295
- [22] Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1989;264:21–26
- [23] Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1994;93:1493-1501
- [24] Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidation products and antioxidant markers in plasma of patients with Graves' disease and toxic multinodular goiter: effect of methimazole treatment. *Free Radical Res* 2004;38:659-664

- [25] Maykova EV, Ismagilova RK, Alimova FK, Valeeva IH, Podolskaya AA, Kravtsova OA. The association study of antioxidant status and antioxidant genes polymorphisms in patients with ischemic heart disease in the Republic of Tatarstan. *World Appl Sci J* 2013;27:1367-1371
- [26] Saravanan G, Ponmurugan P. S-allylcysteine improves streptozotocin-induced alterations of blood glucose, liver cytochrome P450 2E1, plasma antioxidant system, and adipocytes hormones in diabetic rats. *Int J Endocrinol Metab* 2013;11:e10927
- [27] Kusuma Kumari M, Sankaranarayana T. Evaluation of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients.; *IOSR J Dent Med Sci* 2014;13:46-50
- [28] Papageorgiou E, Kostikas K, Kiropoulos T, et al. Increased oxidative stress in exudative pleural effusions: a new marker for the differentiation between exudates and transudates? *Chest* 2005; 128:3291–3297
- [29] Banfi G, Malavazos A, Iorio EL, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi MM. The iron o-dianisidine/xylol orange assay in comparative oxidative stress assessment. Some possible shortcomings. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:506–508
- [30] Alberti A, Bolognini I, Macciantelli D, Caratelli M. the radical cation of n,n-diethyl-para- phenyldiamine : a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* 2000;26:253-267
- [31] Liang Y, Roede JR, Dikalov S, Miller NG, Dudley Jr, SC, Quyyumi A, Jones DP. Determination of ebselen-sensitive reactive oxygen metabolites (ebROM) in human serum based upon N,N'-diethyl-1,4-phenylenediamine oxidation. *Clin Chim Acta* 2012;414:1-6
- [32] Gerardi G, Usberti M, Martini G, Albertini A, Sugherini L, Pompella A, Di LD. Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationships to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:104-110
- [33] Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater* 2003;98:33-50

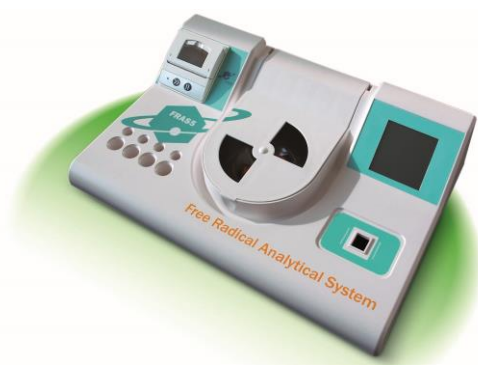
3.4

METODOLOGIA DEI TEST DESCRITTI, CAMPIONAMENTO, PROCEDURE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I test finora descritti sono stati sviluppati nell'ottica di un loro massivo utilizzo nella pratica clinica. Quindi le metodiche effettivamente sviluppate sulla base di quanto detto finora sono state semplificate al fine di garantire la massima fruibilità dei test senza rinunciare al rigore scientifico imposto dall'ambito di applicazione. In quanto test colorimetrici possono essere eseguiti su qualsiasi spettrofotometro ma sempre per garantire la massima utilità la ditta H&D srl ha sviluppato negli anni dei fotometri compatti appositamente dedicati, di facile gestione e manutenzione adatti a qualsiasi ambito, anche extra-laboratorio, d'analisi come potrebbe essere un qualsiasi ambulatorio. La più recente versione di questi fotometri è denominata FRAS5 e incorpora una centrifuga, necessaria alla preparazione di alcuni campioni, onde permettere l'indipendenza da qualsiasi altra strumentazione, una cella di lettura termostata a 37°C, necessaria per l'incubazione a temperatura controllata dei vari test ed una stampante per l'immediata stampa dei risultati ottenuti. Sulla macchina sono già carica vari programmi in grado di seguire e guidare passo a passo l'utente finale nell'esecuzione dei vari test e nel calcolo di vari indici. La particolare configurazione della macchina ne garantisce l'utilizzabilità praticamente a chiunque in ambito sanitario anche senza pregresse esperienze di laboratorio.



Figura 1: esempio di prelievo di sangue capillare con microvetta eparinata



Caratteristiche generali	
Alimentazione	100 -240 VAC 50- 60 Hz
Consumo	60 VA
Pressione sonora	<75 dBA
Classe protezione IP	IP30
Peso	2,6 kg
Dimensioni	40 x 26,5 x 13 (h) cm
Sistema fotometrico	
Sorgente luminosa	Led monocromatico ad alta efficienza
Lunghezza d'onda	505 nm
Banda passante	±6 nm
Fotorivelatore	fotodiode
Temperatura cella lettura	37°C
Caratteristiche centrifuga	
Velocità	Fissa a 6000 rpm ± 5%
Diametro rotore	9 cm
G-force	≈ 1600 G
Alloggiamenti	4
Condizioni operative	
Temperatura	15-32 °C (in funzione) 0-50 °C (spento)
Umidità relativa	20- 80 % (in funzione) 0 -90 % (spento)
Altitudine	<2000 m

Tabella 1: Foto e caratteristiche tecniche del fotometro FRAS5

Come per ogni metodica, particolare importanza riveste il campionamento, ossia il prelievo del fluido da analizzare. Il prelievo di sangue e saliva hanno logicamente metodiche e problematiche diverse. Per il d-ROMs fast e PAT l'analisi viene condotta più propriamente su plasma da sangue capillare. Viene utilizzato il plasma per un discorso di standardizzazione del metodo, ossia i principali analiti sono solitamente presenti come soluti nel plasma, il quale è una componente variabile del sangue intero, quindi se l'analisi fosse fatta su sangue intero l'ematocrito potrebbe influenzare seppur minimamente la variabilità del dato. In altre parole se si prendessero due campioni di plasma con la medesima concentrazione di, per esempio, perossidi, ma l'ematocrito fosse molto diverso e l'analisi fosse fatta sul campione di sangue intero, risulterebbe che i due pazienti abbiano un valore di d-ROMs diverso, in particolare sarà più alto nel soggetto con il minor ematocrito, avendo questi a parità di sangue intero una maggiore quantità di plasma nel campione. Altro motivo per preferire l'uso del plasma al sangue intero è la possibilità che l'emoglobina e l'ossiemoglobina possano interferire col d-ROMs fast e la certezza della sua interferenza col PAT, a causa del ferro che possono liberare nell'ambiente di reazione. Il prelievo di sangue capillare (si potrebbe usare anche quello venoso, i risultati sarebbero uguali, ma il campionamento sarebbe più invasivo) avviene mediante digito puntura con lancetta pungidito e raccolta del sangue in microvetta eparinata (50-100 µl). Il plasma sarà poi ottenuto per centrifugazione a circa 1600 G per 90 secondi nella centrifuga integrata nel fotometro FRAS5. Particolare importanza riveste l'anticoagulante usato durante il prelievo in relazione al fatto che i principi chimici dei test in esame sono basati entrambi su ioni ferrici e ferrosi. Per la buona riuscita del test risulta quindi di fondamentale importanza che il prelievo avvenga utilizzando eparina come anticoagulante e non, i più diffusi EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) o citrati. Entrambe queste molecole sono forti chelanti del ferro e riducono l'attività catalitica dello stesso nel caso dei test tipo d-ROMs, portando ad una sovrastima del dato [1]. Nel test PAT, invece, si ha che esse riescono a sottrarre ioni ferrici al complesso tiociano-ione ferrico e quindi sono causa di una decolorazione non dovuta all'attività antiossidante del campione ma all'attività chelante degli anticoagulanti con conseguente pesante sovrastima del dato. Nel caso dei test di tipo d-ROMs l'errore è più subdolo perché si ottengono valori sottostimati ma comunque accettabili mentre nel caso del PAT i valori riscontrati sarebbero veramente eclatanti e fuori norma.

Molto importante risulta essere l'evitare la pratica del prelievo con mezzi privi di anticoagulanti per poi passare il sangue nelle microvette eparinate. Questa pratica che potrebbe sembrare innocua porta ad una notevole sovrastima del risultato del d-ROMS (fino al 50%). È ipotizzabile che questo si dovuto all'immediato innescarsi dei processi di coagulazione del sangue, infatti importante è il ruolo dei ROS come mediatori nella trasduzione del segnale associato all'attivazione e alla modulazione delle integrine associate ai fenomeni iniziali della coagulazione. A seguito della lesione della parete del vaso vi è una produzione di ROS concomitante con la stimolazione della coagulazione del sangue [2] che può portare ad una errata valutazione dei valori di d-ROMs. Per il medesimo motivo questa pratica è da escludere anche nel caso di sola analisi PAT, in quanto è ipotizzabile un abbassamento dei valori dello stesso.

Sample	EDTA (%)	Citrate (%)
1	-57	-44
2	-59	-44
3	-68	-50
4	-62	-46
5	-57	-42
6	-57	-42

Per quanto riguarda il campionamento della saliva la principale problematica affrontata è la non costante concentrazione dell'acido urico (il principale antiossidante presente nella saliva), la quale dipende dalla presenza o meno dello stimolo e dal flusso salivare prodotto. In questo caso la standardizzazione del metodo di campionamento è di primaria importanza onde poter avere risultati tra loro congruenti. È noto da molto tempo che la concentrazione di acido urico nella saliva è inversamente proporzionale al flusso salivare (di fatto rimane stabile la quantità assoluta prodotta nel lasso di tempo) fino ad un circa 1 ml/min. A flussi maggiori invece la concentrazione di acido urico rimane costante[3]. Di conseguenza si è deciso di elaborare una metodica tale per cui il campionamento soddisfi questo requisito. Il campionamento avviene mediante un pezzo di cotone che deve essere roteato in bocca per 60 secondi simulando la masticazione ma senza masticare direttamente il cotone (per non strizzarlo e

Figura 2: Riduzione del segnale in funzione dell'anticoagulante; rielaborato da Verde et al. 2002 [1]

perdere del campione). Il cotone imbevuto di saliva viene poi posto in un apposito bicchiere di plastica. A questo punto si determina il flusso salivare pesando il tutto e sottraendo il peso del contenitore e del cotone precedentemente determinato e se il flusso è compreso tra 1,1 e 1,4 ml/dl (il limite superiore è stato fissato per non rischiare una diluizione degli antiossidanti diversi dall'acido urico per cui si è visto un comportamento simile al medesimo in relazione al flusso salivare).

Le semplici metodiche del d-ROMS fast e del PAT sono descritte nelle figure 3 e 4. La metodica SAT è perfettamente sovrapponibile a quella del PAT a meno del campione utilizzato. Il d-ROMS fast è formato da tre reagenti: R1, una miscela condensata del cromogeno predosata in cuvetta; R2 un tampone predosato in eppendorf; R3 una soluzione acida di ioni ferrici. PAT e SAT sono invece formati da due reagenti: R1, una soluzione idroalcolica di tiocianato predosata in cuvetta e R2 una soluzione acida di ioni ferrici.

Ultimo aspetto importante delle metodiche analitiche è la conservazione del campione in esame. Da dati interni e da dati pubblicati [4][5][6] si è potuta elaborare la seguente tabella. Per quanto riguarda la conservazione del sangue ha dato risultati migliori la conservazione del solo plasma eparinato già separato dalla parte corpuscolare.

		2-8°C	-4°C	-20°C
plasma	d-ROMs	36 ore	48 ore	1 anno
	PAT	12 ore	48 ore	2 mesi
saliva	SAT	2 ore	24 ore	7 giorni

Tabella 2: Tempi di conservazione dei campioni in funzione dall'analisi proposta



Figura 3: Procedura analitica del d-ROMS fast



Figura 4: Procedura analitica PAT, uguale a meno del prelievo e pretrattamento del campione a quella del SAT

- [1] Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F, Caporaso N. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to Evaluate the Oxidative Status of Human Plasma. *Free Radical Research* 2002;36 (8):869–873
- [2] Gregg D1, de Carvalho DD, Kovacic H. Integrins and coagulation: a role for ROS/redox signaling? *Antioxid Redox Signal*. 2004 Aug;6(4):757-64.
- [3] Mason DK, Boyle JA, Harden RM, Duncan AM, Greig WR. The influence of flow rate on the concentration of uric acid in human parotid and submandibular saliva. *J Dent Res*. 1966;45(5):1439-44.
- [4] Benedetti S, Primiterra M, Finco A, Canestrari F, Cornelli U. Validation of a Patented Method to Determine the Antioxidant Capacity of Human Saliva Based on the Reduction of Iron: the SAT test. *Clin. Lab*. 2014;60:475-482
- [5] Cavalleri A, Colombo C, Venturelli E, Miceli R, Mariani L, Cornelli U, Pala V, Berrino F, Secreto G. Evaluation of reactive oxygen metabolites in frozen serum samples. Effect of storage and repeated thawing. *Int J Biol Markers*. 2004;19(3):250-3.
- [6] Celi P, Sullivan M, Evans D. The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood; *The Veterinary Journal* 2008;183:217-218

4

LA VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO MEDIANTE I TEST H&D

4.1

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO SISTEMICO

La valutazione dell'equilibrio redox sistemico sono basate sui lavori e sulle indicazioni del prof. Umberto Cornelli della Loyola University School of Medicine(Chicago), parzialmente rielaborate anche dalla dott.ssa Annarosa Finco di Cor. Con. International s.r.l. (Parma) e dal sottoscritto.

Come già ampiamente descritto nel capitolo precedente lo stress ossidativo sistemico può essere valutato mediante la misura di marker di specie reattive (concentrazione dei perossidi mediante d-ROMs CON/FAST test) e mediante misura della capacità antiossidante del plasma sanguineo (capacità ferro riducente mediante PAT TEST). L'analisi di questi valori consente la valutazione globale dello status ossidativo. Rifacendoci al precedente capitolo si può ricordare che:

- il **d-ROMs** ha come riferimento la concentrazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) trasformato poi in U. Carr. (Unità Carratelli); valori di riferimento in tabella 1;

250-300	Valori normali
300-320	Condizione border-line
321-340	Stress ossidativo lieve
341-400	Stress ossidativo medio
401-500	Stress ossidativo elevato
> 500	Stress ossidativo elevatissimo

Tabella 1: Valori di Riferimento del d-ROMs fast

- il **PAT** ha come riferimento l'acido ascorbico (Vitamina C) trasformato poi in U. Cor. (Unità Cornelli); valori di riferimento in tabella 2.

> 2800	Valori molto alti
2200-2800	Valori normali
2200-2000	Valori border line
2000-1800	Stato di lieve carenza
< 1800	Stato di carenza

Tabella 2: Valori di Riferimento del PAT test

La prima considerazione fondamentale per entrambe le determinazioni è che esse, pur avendo dei range di riferimento della normalità, sono da considerare come delle misure relative, quindi da valutare in relazione ai valori che appartengono a quel determinato soggetto. Scostamenti dell'entità di $\pm 10\%$ rispetto al "valore tipico" del soggetto, per entrambi i metodi, non sono indicativi di variazioni importanti, ma solamente di fluttuazioni da considerare prudentemente, il più delle volte, nell'ambito della normalità. La farmacologia clinica attuata sulle due misure suggerisce che una riduzione del 10% può essere considerata sufficientemente significativa solo nel caso di valori di partenza medio-elevati, oppure in condizioni sperimentali molto controllate.

I poli sostanziali della modifica dell'equilibrio redox sono l'aumento del d-ROMs e la riduzione del PAT, rispettivamente al di sopra e al di sotto della normalità.

Tuttavia, la presenza in letteratura di più di 700 pubblicazioni, come lavori clinici e sperimentali, consente di delineare pressoché tutti i possibili scenari di modificazione dell'equilibrio redox, sostanzialmente si possono avere 9 scenari:

- condizioni d-ROMs alto (**A**) con PAT basso (**B**), normale (**N**), alto (**A**)- definite come **AB, AN, AA**; dove la prima lettera indica lo status del d-ROMs e la seconda lettera lo status del PAT;
- condizioni d-ROMs normale (**N**) con PAT basso (**B**), normale (**N**), alto (**A**) - definite come **NB, NN, NA**; dove la prima lettera indica lo status del d-ROMs e la seconda lettera lo status del PAT;
- condizioni d-ROMs basso (**B**) con PAT basso (**B**), normale (**N**), alto (**A**)- definite come **BB, BN, BA**; dove la prima lettera indica lo status del d-ROMs e la seconda lettera lo status del PAT.

Questo perché lo status ossidativo va analizzato nella sua totalità, ossia va tenuto conto dei valori di d-ROMs in relazione del valore di PAT e viceversa e mai dei singoli valori presi singolarmente. Inoltre è importante capire che i valori ideali sono quelli definiti come range di normalità, perché alti valori di PAT e bassi valori di d-ROMs, seppur intuitivamente potrebbero essere considerati una situazione favorevole, come spiegato nei prossimi paragrafi sono sintomi di situazioni più o meno patologiche, nonostante non siamo nel caso classico di stress ossidativo, ossia ossidanti alti e ridotta capacità antiossidante, tale combinazione si configura lo stesso come tale, semplicemente cause e implicazioni sono diverse.

Condizioni d-ROMs alto (A) e PAT correlati: basso (B), normale (N), alto (A)

Una misura di d-ROMs elevata, ovvero > 320 U. Carr., si riscontra in tutte le patologie reattive e dismetaboliche, che vanno dall'infiammazione, all'aterosclerosi, al diabete, alla menopausa, ad alcuni tumori su base solida o circolante ed infine al distiroidismo (sia ipo- che iper-) oltre che a sforzi intensi, dieta sbilanciata e ad abitudini igieniche scorrette (fumo, alcool, etc.).

Nel contesto del sesso femminile, gli incrementi di d-ROMs più tipici e massivi sono spesso osservabili in seguito all'impiego dei contraccettivi orali (Figura 1), durante la gravidanza, all'uso di levotiroxina e di antipsicotici.

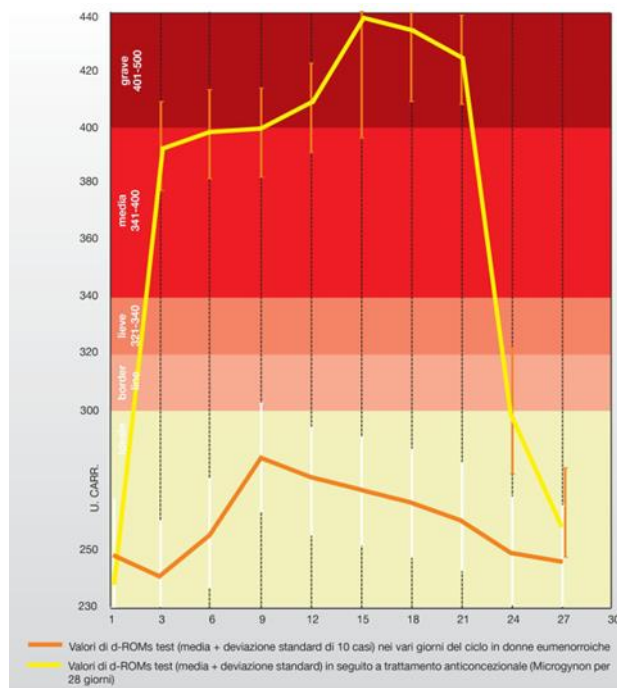


Figura 1: Andamento dello stress ossidativo durante i giorni di ciclo mestruale in donne eumenorriche e in donne in trattamento con pillola anticoncezionale

Oltre a questo, nelle donne eumenorroiche, durante la fase estrogenica del ciclo mestruale si osserva un innalzamento dei valori anche oltre il 20 %, con picco nell'intorno della fase ovulatoria e ancora incrementi attenuati intorno al 10 % nella fase progesterinica (Figura 2 e Figura 3).

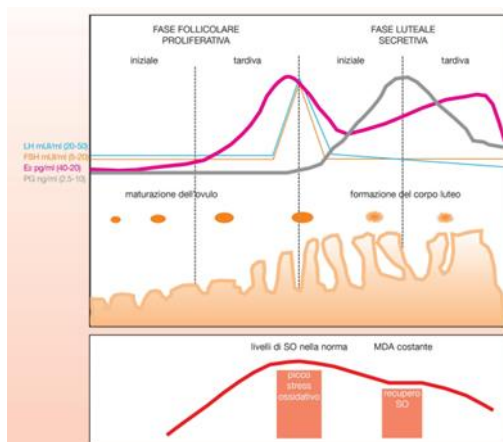


Figura 2: Corrispondenza tra ciclo mestruale e stress ossidativo “fisiologico”

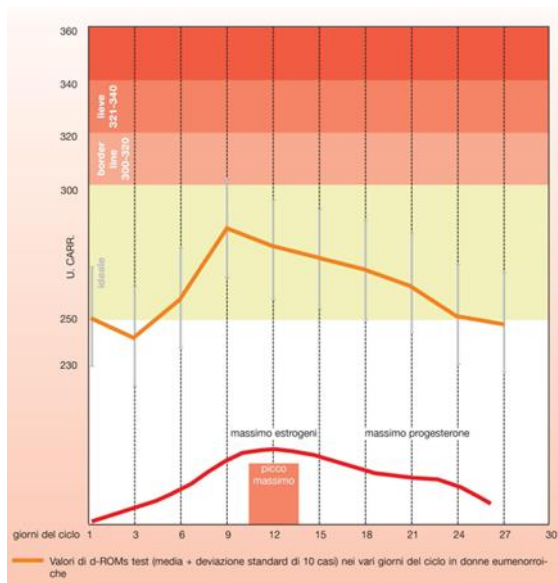


Figura 3: Andamento dello stress ossidativo durante i giorni del ciclo mestruale in donne eumenorroiche

Nel contesto del sesso maschile, gli incrementi più tipici e massivi sono osservabili in seguito a malattie croniche cardiovascolari, i cui valori comunque raramente raggiungeranno le dimensioni di picco di quelli femminili. Risulta pertanto evidente la valenza estrogenica della bilancia ossidativa, dove gli estrogeni fanno da modulatori fisiologici, nel senso che governano buona parte dell’equilibrio redox. Nella pratica clinica giornaliera, già solamente un semplice aumento del d-ROMs (tenendo in considerazione le fasi accennate del ciclo mestruale) indica che l’equilibrio redox è alterato. Nel caso di una terapia in corso, l'aumento dei valori del test implica che il compenso terapeutico sia precario.

La misura del PAT, ridotta o normale (condizioni **AB, AN**), suggerisce che è in atto un tentativo di compenso. Questo è quanto solitamente avviene durante le fasi del ciclo mestruale.

Nel caso di **AB** darebbe indicazione della necessità di modificare i comportamenti in termini igienici di dieta/attività fisica, oppure integrativi con pool di modulatori fisiologici ad azione antiossidante specifici a seconda della patologia di base.

La condizione più preoccupante, se protratta nel tempo, è quella **AA**, ovvero caratterizzata da un aumento concomitante del PAT. Infatti, se il soggetto non è in terapia con modulatori fisiologici, un aumento del PAT indica danno cellulare (prevalentemente endoteliale), ma la presenza anche di cellule circolanti che

disperdono il loro contenuto di riserva antiossidante in circolo. Tale fenomeno si è osservato, ad esempio, in ciclisti professionisti che, al permanere di tale condizione definita "Redox Infiammatoria", precipitavano dopo breve tempo (anche solo dopo 24h) in patologie infiammatorie/infettive. La letteratura è molto fornita di lavori sperimentali nei quali si dimostra che l'aumento della riserva antiossidante circolante (comunque misurata), concomitante a quello degli indici ossidativi, è indice di patologia saliente. Il paradosso evidente, in tali condizioni, è tale che la somministrazione di modulatori fisiologici ad azione antiossidante migliora la condizione clinica.

<p>PAT < 2200 U. Cor. [condizione AB, STRESS OSSIDATIVO ASSOLUTO]</p> <p>Tipica condizione di scarso apporto di antiossidanti con la dieta e/o di consumo di riserva antiossidante in seguito a sforzo fisico o a condizione di stress ossidativo in fase di compenso. Si osserva in seguito a uso di anticoncezionali, levotiroxina, antipsicotici e spesso anche in menopausa.</p> <p>Suggerimenti per i test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox, la condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di modulatori fisiologici ad azione antiossidante.</p>
<p>PAT 2200-2800 U. Cor. [condizione AN, STRESS OSSIDATIVO POTENZIALE]</p> <p>Condizione di compenso dello stress ossidativo, si osserva in seguito ad esercizio fisico adeguato in soggetti allenati. Si può verificare in seguito a uso di anticoncezionali, levotiroxina, antipsicotici e spesso anche in menopausa.</p> <p>Suggerimenti per i test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox, la condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di modulatori fisiologici ad azione antiossidante.</p>
<p>PAT > 2800 U. Cor. [condizione AA, CONDIZIONE REDOX INFIAMMATORIA.]</p> <p>Probabile lesione endoteliale e attivazione di cellule reattive (linfociti, macrofagi) oppure batteri lisati e/o tossine batteriche. Negli atleti tale condizione è definita redox infiammatoria e sono noti valori > 3500 U. Cor.</p> <p>Suggerimenti per i test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox, la condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di modulatori fisiologici ad azione antiossidante.</p>

Tabella 3: Riassunto casistiche di elevati valori di d-ROMs

Una volta assegnata una terapia antiossidante, dovrà essere premura del medico e/o specialista valutare ed analizzare il cambiamento dei valori di d-ROMs e PAT in relazione alla cartella clinica del soggetto in esame. Si ricorda che ogni organismo risponde in maniera diversa. Perciò è fondamentale l'interpretazione finale del medico/specialista. Inoltre nella pratica sperimentale capita spesso di osservare dei soggetti che hanno dei valori di d-ROMs elevati senza ritrovare nell'anamnesi o nell'indagine clinica alcun dato rivelatore di una patologia in atto. In questi casi è utile la somministrazione di acido acetilsalicilico (500 mg) al mattino e ripetere la misura al pomeriggio. Se il valore si riduce è indice di un processo infiammatorio in atto e quindi implica un'indagine più approfondita.

Condizione d-ROMs normale (N) e PAT correlati: basso (B), normale (N), alto (A)

Nel caso di un d-ROMs normale, non si può escludere a priori l'assenza di una patologia (fatto salvo il principio di normalità relativa del soggetto), ma certamente si può ipotizzare che il soggetto sia compensato sul piano dell'equilibrio redox.

Anche in questo caso la misura di PAT integra la conoscenza dello stato del soggetto e suggerisce, nel caso **NB**, le dovute iniziative igienico/integrative. Tale condizione si osserva spesso negli sportivi amatoriali, i quali compensano molto bene lo stress ossidativo in ragione della riserva antiossidante fornita dall'attività muscolare. Quest'ultima tuttavia tende a consumarsi in ragione dello sforzo più o meno prolungato. E' la

condizione tipica dei dolori muscolari dopo esercizio fisico, soprattutto quando questo è praticato senza la dovuta continuità e gradualità. Dopo il termine dell'esercizio, se questo non è stato estenuante e incongruo, ovvero oltre la reale capacità fisica, si osserva una riduzione del PAT. Se tale riduzione è eccessiva mancherà quella parte di riserva antiossidante capace di limitare la componente infiammatoria. Quest'ultima deriva dallo stress muscolare (prevalentemente da quello eccentrico) e dal relativo dilagare delle miochine a valenza infiammatoria, oltre che delle cellule reattive (linfociti, macrofagi ecc). La condizione **NA** (a differenza di quella **AA** menzionata in precedenza), non è da considerarsi preoccupante in quanto fisiologica.

<p>PAT < 2200 U. Cor. [condizione NB, STRESS OSSIDATIVO RELATIVO]</p> <p>Si tratta della fase iniziale di ogni condizione reattiva, ovvero del consumo di riserva antiossidante in seguito a condizioni ancora non clinicamente evidenti che possono degenerare se la discesa della riserva antiossidante non è compensata.</p> <p>Suggerimenti per i test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox, la condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di modulatori fisiologici ad azione antiossidante.</p>
<p>PAT 2200-2800 U. Cor. [condizione NN, BILANCIAMENTO OSSIDATIVO OTTIMALE]</p> <p>Condizione di compenso completo dello stress ossidativo.</p> <p>Suggerimenti per i test: ripetere a distanza di alcuni mesi come controllo di routine.</p>
<p>PAT > 2800 U. Cor. [condizione NA, POTENZIALE ANTIOSSIDANTE ELEVATO]</p> <p>Probabile integrazione in corso.</p> <p>Suggerimenti per test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox, la condizione suggerisce di seguire una dieta controllata.</p>

Tabella 4: Riassunto casistiche di valori normali di d-ROMs

Condizione d-ROMs fast basso (B) e PAT correlati: basso (B), normale (N), alto (A)

Quando ci si riferisce a d-ROMs basso si vogliono indicare valori < 250 U. Carr. Sono valori tipici negli atleti, infatti le masse muscolari dell'atleta (anche solo amatoriale) producono quantità molto consistenti di antiossidanti, oltre che di sistemi tampone a valenza antiossidante (carnosina). Ci sono alcune popolazioni, come quelle asiatiche, che per ragioni di abitudini alimentari/ambientali tendono ad avere dei livelli relativamente ridotti rispetto a quelle europee o di altri paesi occidentali. In conseguenza di tutto ciò i livelli che sono da considerare effettivamente ridotti in senso assoluto sono quelli < 180 U. Carr. Questa condizione si osserva nell'immunodepressione comunque provocata. Tale condizione è confermata dalla misura del PAT, che nei soggetti affetti da immunodepressione per patologia intercorrente è ridotta rispetto alla normalità, ovvero ci si riferisce alla condizione **BB**, mentre la condizione **BA e BN** presuppongono condizioni alimentare/ambientale particolari ancora definibili come salutistiche, ma anche in questo caso vale il concetto di relatività della misura. Se le condizioni del soggetto sono veramente salutistiche è sufficiente chiedere questi faccia due rampe di scale e si noterà un innalzamento del d-ROMs fast, con minimi spostamenti del PAT. Se questo non avviene sarà bene approfondire l'esame clinico del soggetto per sospetta immunodepressione.

<p>PAT < 2200 U. Cor. [condizione BB, IPOREATIVITA' ASSOLUTA]</p> <p>Si tratta di una condizione iporeattiva che si può considerare di immunodepressione solo nel caso di valori di < 180 U. Carr. E' suggerita integrazione con Modulatori Fisiologici solo se si esclude la presenza di un tumore.</p> <p>Suggerimenti per test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox. La condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di modulatori fisiologici ad azione antiossidante.</p>
<p>PAT 2200-2800 U. Cor. [condizione BN, IPOREATIVITA' RELATIVA]</p> <p>Condizione legata a fattori genetici/razziali/ambientali, oppure iatrogena in seguito ad impiego di antiinfiammatori (steroidi o non steroidi).</p> <p>Suggerimenti per test: ripetere il test a breve termine per controllare il ripristino dell'equilibrio redox. La condizione suggerisce di seguire una dieta controllata e l'impiego di Modulatori Fisiologici ad azione antiossidante.</p>
<p>PAT > 2800 U. Cor. [condizione BA, POTENZIALE ANTIOSSIDANTE MOLTO ELEVATO]</p> <p>Probabile integrazione in corso.</p> <p>Suggerimenti per test: ripetere a breve in seguito a sospensione dell'integrazione o a digiuno.</p>

Tabella 5: Riassunto casistiche di valori bassi di d-ROMs

In sede di prima valutazione dello status ossidativo va prestata all'eventuale integrazione di antiossidanti. Un elevato valore di PAT potrebbe derivare anche dalla stessa integrazione per questo motivo sarebbe bene eseguire una rivalutazione sospendendo preventivamente l'integrazione onde poter distinguere un valore di PAT dovuto ad un'infezione piuttosto che ad un eccesso di antiossidanti. Valori normali o deficienti di PAT in pazienti sottoposti ad integrazione solitamente indicano la necessità di non interrompere l'integrazione o l'inefficienza del trattamento; anche in questo caso sarebbe opportuno in linea di massima una valutazione col trattamento sospeso. Quelle delineate sono indicazioni di massima perché ogni caso è a sé e sta nell'esperienza dello specialista analizzare approfonditamente i risultati delle analisi.

Molto importante è la rivalutazione del paziente dopo un congruo periodo di tempo che va dai sei mesi del paziente risultato normale ai tre mesi del paziente con valori alterati. Nel primo caso si tratta un controllo da intendersi come pratica di prevenzione e buona gestione dello stress ossidativo mediante controlli periodici. Nel secondo caso invece si tratterà perlopiù di controllare se i consigli e l'eventuale integrazione data durante la visita precedente, siano stati seguiti e che effetto abbiano avuto. Si potrebbe essere tentati di fornire una serie infinita di tabelle comprendenti le varie casistiche ma sarebbe uno sterile virtuosismo, perché seppur è vero che si possano dettare delle linee generali universalmente valide, la rivalutazione è sempre piuttosto complessa, potendo essere influenzata da molti fattori. Sarà compito dello specialista formarsi in tal senso e fare le valutazioni del caso. In linea di massima si può affermare che tutti gli interventi, sia sullo stile di vita che di integrazione con antiossidanti dovrebbero avere come obiettivo quello di far tornare entrambi i valori, d-ROMs e PAT, entro gli intervalli di normalità. Se così non fosse la valutazione principale da fare è se tali valori siano in miglioramento o stazionari. In caso di valori stazionari o il paziente non ha seguito le indicazioni proposte o le stesse non erano sufficienti a risolvere il problema, se al contrario i valori sono in miglioramento ma non ancora normali, molto probabilmente è solo questione di tempistiche. Per affiancare questo complesso processo decisionale si è sviluppato un indice denominato OSI REDOX e un'applicazione web denominata OB MANAGER ONLINE.

4.2 OSI REDOX

Per facilitare, ma non sostituire, la valutazione dello status ossidativo è stato sviluppato dal sottoscritto l'indice OSI REDOX (Oxidative Stress Index REDOX). Questo indice riassume in un unico valore le informazioni derivanti dall'analisi d-ROMs e dall'analisi PAT e quindi semplifica almeno in prima battuta l'analisi dell'equilibrio redox da parte dell'utente finale. OSI REDOX non è una semplice formula aritmetica ma un algoritmo logico-matematico in grado di ponderare le informazioni derivanti dai valori d-ROMs e PAT congiuntamente alla presenza o meno di integrazione di antiossidanti per quantificare in un unico valore quanto lo stato ossidativo sia distante dalle condizioni di normalità. L'indice si innalza proporzionalmente ad un qualsiasi scompensamento. Le cause dell'innalzamento dell'indice possono essere l'aumento o la diminuzione della concentrazione sia di perossidi che di antiossidanti e più elevato sarà lo scostamento dalla normalità più elevato sarà OSI REDOX. Logicamente sia i valori di PAT che di d-ROMs agiscono contemporaneamente su di esso quindi lo scostamento di entrambi i valori dalla normalità farà innalzare OSI REDOX maggiormente che non quando sarà uno solo dei due test a dare risultati esterni all'intervallo di normalità. Inoltre esiste la possibilità di indicare, in presenza di valori PAT superiori a 2800 U.Cor, ossia della soglia di normalità, l'eventuale assunzione di integratori, in questo caso l'algoritmo è in grado di ponderare questa informazione, correggendo il valore finale. In particolare, in questo caso, l'algoritmo considera l'elevato valore di PAT non solo come indice di squilibrio dello stato ossidativo ma anche come derivante dall'assunzione di integratori a base di antiossidanti ed eseguirà le adeguate correzioni. Per una migliore comprensione dell'indice OSI REDOX è stato elaborato una tabella contenente 336 valori OSI REDOX derivanti da altrettante combinazioni di valori PAT e valori d-ROMs (tabella 2). Tale tabella è valida solo in assenza di integrazione di antiossidanti. In presenza di integrazione di antiossidanti le opportune correzioni operate dall'algoritmo la rendono non corretta e pertanto non è possibile riferirsi ad essa in tale situazione. Inoltre grazie alle informazioni del paragrafo precedente è stato possibile classificare i valori di OSI REDOX in quattro intervalli (tabella 1).

<40	normalità
41-65	Valori borderline, stato di allerta, primi sintomi di un possibile scompensamento
66-120	Situazione critica, scompensamento ormai conclamato
121<	Situazione molto critica

Tabella 1

d-ROMs	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800	3000	3200	3400	3600	3800	4000
600	220	213	206	200	195	191	188	186	186	188	191	195	200	206	213	220
575	208	200	193	187	181	177	174	172	171	172	174	177	181	187	193	200
550	197	188	181	174	168	163	160	158	157	158	160	163	168	174	181	188
525	186	177	168	161	155	150	146	144	143	144	146	150	155	161	168	177
500	175	165	156	148	142	136	132	129	129	132	136	142	148	156	165	175
475	165	154	145	136	129	123	118	115	114	115	118	123	129	136	145	154
450	155	144	134	124	116	109	104	101	100	101	104	109	116	124	134	144
425	146	135	123	113	104	97	91	87	86	87	91	97	104	113	123	135
400	138	126	114	103	93	84	77	73	71	73	77	84	93	103	114	126
375	132	118	106	94	82	72	64	59	57	59	64	72	82	94	106	118
350	126	112	99	86	73	62	52	45	43	45	52	62	73	86	99	112
325	122	108	93	79	66	53	41	32	29	32	41	53	66	79	93	108
300	119	105	90	75	61	47	33	21	14	21	33	47	61	75	90	105
275	119	104	89	74	59	44	30	15	0	15	30	44	59	74	89	104
250	119	105	90	75	61	47	33	21	14	21	33	47	61	75	90	105
225	122	108	93	79	66	53	41	32	29	32	41	53	66	79	93	108
200	126	112	99	86	73	62	52	45	43	45	52	62	73	86	99	112
175	132	118	106	94	82	72	64	59	57	59	64	72	82	94	106	118
150	138	126	114	103	93	84	77	73	71	73	77	84	93	103	114	126
125	146	135	123	113	104	97	91	87	86	87	91	97	104	113	123	135
100	155	144	134	124	116	109	104	101	100	101	104	109	116	124	134	144
PAT-->	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800	3000	3200	3400	3600	3800	4000

Tabella 2

Per quanto riguarda l'assenza di integrazione di antiossidanti dalla tabella si vede che valori normali di OSI REDOX si hanno in presenza di valori di PAT e d-ROMs contemporaneamente normali o quando solo uno dei due test è di poco fuori dall'intervallo di normalità. I valori borderline di OSI si hanno in presenza di discostamenti dalla normalità di entrambi i due test e tipicamente indicano l'insorgere di qualche

problematica: o un aumento dei perossidi o una diminuzione della riserva antiossidante, sintomi di una possibile infiammazione in fase iniziale, o un anomalo incremento della riserva antiossidante o un principio di ipoattività; tutte situazioni da tenere sotto controllo. Alti e altissimi valori di OSI REDOX si hanno in presenza di notevoli scostamenti dalla normalità dei due test tipicamente in presenza di alti valori di entrambi i test o d-ROMs alto e contemporaneo PAT basso, entrambi sintomi di un elevato stress ossidativo. È possibile un alto valore di OSI REDOX anche in caso di forte ipoattività. Un alto OSI REDOX è sintomo di una situazione grave e conclamata da valutare approfonditamente. In presenza di alti valori di PAT contemporanei all'assunzione di antiossidanti l'algoritmo ne calcola l'incidenza e il valore restituito sarà inferiore rispetto a quello ritrovabile in tabella in corrispondenza dei valori letti.

Di per sé l'indice OSI REDOX non ha la valenza diagnostica delle tabelle sinottiche d-ROMs-PAT della sezione precedente ma sicuramente è un ottimo punto di partenza per la valutazione globale dello stress ossidativo da parte del medico e di più facile comprensione da parte dello stesso e del paziente. OSI REDOX non è diagnostico di per sé ma un suo innalzamento è da intendersi come campanello d'allarme e dovrebbe spingere ad una più attenta analisi dei risultati ottenuti. OSI REDOX è ottimo per monitorare nel tempo le variazioni di status ossidativo di un paziente dovendo valutare l'andamento di un solo valore invece che l'interazione reciproca di più valori e informazioni. OSI REDOX non sostituisce l'analisi dei valori d-ROMs e PAT ma è da intendersi come un'agevolazione della stessa.

Esempi di valutazioni mediante OSI REDOX:

Esempio 1: OSI REDOX = 35, lo status ossidativo è nella norma, ci si aspettano valori di PAT o di d-ROMs negli intervalli di normalità o leggermente compensati. I valori di PAT potrebbero essere elevati, ma considerati come normali se in presenza di assunzione di integratori a base di antiossidanti.

Esempio 2: OSI REDOX = 68, lo stato ossidativo è alterato, sarà quindi opportuno tenere sotto osservazione i valori di d-ROMs e PAT onde ipotizzare l'origine dello scompenso e agire di conseguenza.

Esempio 3: prima analisi: d-ROMs 400 U.Carr e PAT 2100 U.Cor; seconda analisi d-ROMs 350 U.Carr e PAT 1900 U.Cor. dopo integrazione con antiossidanti. Utilizzando solo questi dati non è semplice valutare se il paziente ha avuto un miglioramento/ peggioramento. Il valore di d-ROMs si è abbassato, ma si è abbassato anche il valore di PAT, ossia della barriera antiossidante, quindi come vanno interpretati questi dati? La situazione è migliorata o peggiorata? L'OSI REDOX calcolato in questa situazione è pari a 80 per la prima analisi e 67 per la seconda analisi. Se confrontiamo i valori di OSI REDOX si potrà vedere un abbassamento da 80 a 67, quindi si può dedurre che l'equilibrio redox è migliorato, anche se non ancora ottimale, quindi la supplementazione di antiossidanti sta avendo effetto e non va in interrotta non essendo ancora arrivati ad un OSI ottimale

4.3 OBRI

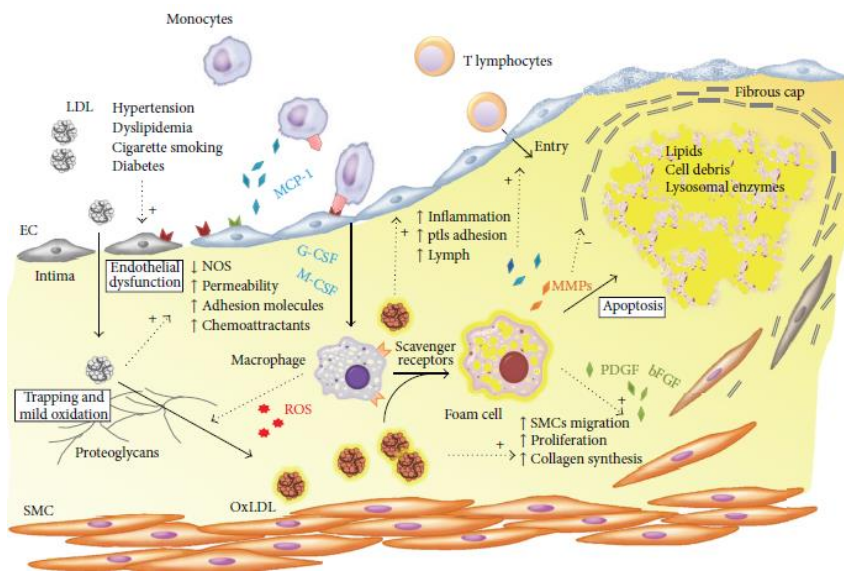


Figura 1: Ipotesi percorso di lipoproteina ossidata a bassa densità (oxLDL) nel processo di aterogenesi secondo l'ipotesi ossidativa dell'aterosclerosi; immagine da *Maiolino et al. 2013* [2]

La valutazione della condizione di stress ossidativo ha particolarmente importanza prognostica nel caso di pazienti affetti da malattie cardiovascolari. Quando la quantità eccessiva di molecole biologiche ossidate nel sangue (siero o plasma), non è compensata da un'adeguata capacità antiossidante, si genera lo stress ossidativo, il quale, se protratto nel tempo, determina una riduzione delle aspettative di vita in particolare in pazienti affetti da malattie cardiovascolari [1]. Il ruolo dei lipidi e delle lipoproteine ossidate nella patogenesi dell'aterosclerosi è ormai

accettato e in particolare sembra che le lipoproteine ossidate, specialmente le LDL sembrano essere le principali responsabili. [2][3]

Tutte le lipoproteine hanno un contenuto di colesterolo e relativi esteri e come per il resto dei lipidi, il colesterolo è sottoposto a fenomeni di ossidazione che derivano sia da processi sia enzimatici che non enzimatici. Questi meccanismi possono essere endogeni o esogeni come per l'ossidazione del colesterolo avviene durante i processi di stoccaggio e cottura degli alimenti. In generale, i processi ossidativi del colesterolo portano alla formazione di ossisteroli (OxChs), dei quali perlomeno quattro sono di origine endogena. Tre di questi, rispettivamente 7 α -idrossicolesterolo, 24-idrossicolesterolo, 27-idrossicolesterolo derivano dal processo ossidativo svolto nei citocromi P450 in ragione della formazione dei sali biliari, mentre il quarto, 4 β -idrossicolesterolo, non è correlato alla sintesi di questi sali. Un intermedio tra il colesterolo e il 7 β -idrossicolesterolo è rappresentato da 7 β -idroperossicolesterolo che è un classico perossido, il quale può subire la reazione di Fenton ed è quindi in grado di propagare lo stress ossidativo. Una parte degli OxChs si può ritenere fisiologica e funzionale, in ragione della polarità/mobilità che consente loro di attraversare più facilmente le membrane, con velocità di 3 ordini di grandezza superiore a quella del colesterolo, tanto da rappresentare un efficiente meccanismo per eliminare l'eccesso di colesterolo nelle cellule. Tuttavia, anche il loro eccesso è dannoso e tale da innescare rapidamente il sistema reattivo cellulare di autodistruzione (apoptosi) o di aggressione da parte dei macrofagi, che porterà di conseguenza alla rimozione della cellula stessa. Come già scritto, si deve osservare, inoltre, che il colesterolo alimentare, la cui assunzione è mediamente nell'ordine di un centinaio di milligrammi/giorno, può essere già nella forma ossidata. In tale forma esso, come del resto per tutti i lipidi, è parzialmente assorbito e incorporato nei chilomicroni che si formano all'interno delle cellule intestinali (enterociti) e, unico tra i lipidi ossidati, potrà poi essere trasferito a tutte le lipoproteine (gli altri lipidi ossidati si limitano ai chilomicroni e ai remnants). Pertanto, gli OxChs sono utilizzati nella formazione delle lipoproteine a densità varia (VLDL, HDL) le quali saranno già parzialmente ossidate e potranno innescare ulteriori processi di ossidazione per propagazione. Si deve tenere presente che, in termini di ossidazione, è importante considerare il colesterolo totale, senza distinzione tra colesterolo VLDL, IDL (remnants), LDL o HDL, in quanto in qualsiasi struttura il colesterolo può essere ossidato, come tale o nella forma esterificata.

Vista l'enorme importanza del colesterolo, sia in senso strutturale che metabolico, esso è dotato di un ampio sistema di difesa. La prima linea di difesa è la sua esterificazione con acidi grassi (a diversa lunghezza di catena carboniosa). Questo processo consente la deposizione del colesterolo all'interno delle lipoproteine. In condizioni normali il colesterolo è raccolto sia come tale che nella sua forma esterificata dalle ACAT A: Colesteril Acil Transferasi) epatiche ed intestinali ed è poi convogliato alle lipoproteine ad alta densità (HDL). Queste successivamente lo cederanno attraverso proteine trasportatrici (ovvero Colestetyl Esters Protein Transporter o CEPT) alle altre lipoproteine a densità più ridotta (principalmente alle VLDL e LDL) scambiandolo con i trigliceridi. Si opera in tale modo il trasferimento dei trigliceridi, che saranno veicolati (da parte dalle stesse HDL) verso il fegato con il colesterolo esterificato residuo, sia come tale che come ChOx. La seconda linea di difesa, è rappresentata dai sistemi enzimatici ad azione antiossidante presenti nelle HDL stesse, le paraoxonasi (PON). Queste sono coadiuvate dalla rete antiossidante circolante la quale è composta da una variegata serie di derivati che vanno dall'albumina, all'acido urico e agli antiossidanti assunti con l'alimentazione di natura vitaminica, es .Vit E e Vit C o non vitaminica, es. polifenoli. La terza linea di difesa è rappresentata dai sistemi antiossidanti del comparto cellulare, prevalentemente rappresentati dal glutathione libero (GSH) e dai classici antiossidanti intracellulari, es. vitamine del gruppo B, Coenzima Q10, acido lipoico, oltre che da quelli enzimatici come le catalasi, perossidasi, glutareduttasi. Poiché gli ROOH sono relativamente stabili, essi rappresentano una minaccia ossidativa sia per il colesterolo strutturale che per quello metabolico. Tuttavia, il processo ossidativo deve essere visto come rapporto tra entità ossidante e entità ossidabile. Questo processo segue le normali regole stechiometriche quindi si devono valutare le concentrazioni di tutte le componenti molecolari coinvolte nei rapporti ossidativi e protettivi.

A questo scopo è stato sviluppato e brevettato [4] OBRI ossia, Oxidative Balance Risk Index. La formula per calcolare il valore OBRI è la seguente:

$$OBRI = k * \frac{OI}{PI} * \frac{Ch}{Ch_b}$$

Dove:

OI è denominato indice ossidativo ed è pari a $\frac{d-ROMs\ value}{Ch_b}$

PI è denominato indice protettivo ed è pari a $\frac{PAT\ value}{Ch_b}$

Ch è il valore del colesterolo al momento delle analisi

Ch_b è il valore limite del colesterolo fissato a 200 mg/dl per l'uomo

K è un valore costante determinato al fine di avere un valore OBRI unitario nel caso di PAT pari a 2500 U.Corr, d-ROMs pari a 275 U.Corr e colesterolo pari a 200 mg/dl, ossia nelle condizioni normali. Tale valore è costante ma diverso a seconda della specie, per l'uomo è pari a 9,1 e per il ratto è pari a 5,95.

In considerazione di quanto finora esposto per l'uomo OBRI è calcolabile con la seguente formula:

$$OBRI = 0,0455 * \frac{OI}{PI} * Ch$$

Le prime prove dell'indice OBRI sono state eseguite su un totale di 146 ratti maschi di ceppo Wistar-Charles, stabulati singolarmente in condizioni controllate (25°C, umidità 60%, cibo ed acqua ad libitum) per sette giorni. L'ottavo giorno sono stati sottoposti a prelievo di sangue dalla vena caudale e sono stati valutati i seguenti parametri: Ch, d-ROMs, PAT, OI, PI e OBRI. In questo caso si è assunto come Ch_b il valore medio di colesterolo. L'esperienza è stata condotta su gruppi di 24-26 ratti per sessione, per un totale di sei

sessioni distribuite lungo un anno per tener conto di tutte le stagioni. Nella presente esperienza più che valori assoluti sono stati analizzati le relazioni tra gli stessi.

	Ch	d-ROMs	PAT	OI	PI	OBRI	PAT/d-ROMs
Ch	1						
d-ROMs	-0.063	1					
PAT	0.284*	-0.494*	1				
OI	-0.537*	0.860*	-0.543*	1			
PI	-0.622*	-0.328*	0.527*	0.037	1		
OBRI	-0.150	0.934*	-0.729*	0.848*	0.454*	1	
PAT/d-ROMs	-0.152	-0.809*	0.722*	-0.730*	0.420*	-0.826*	1

Tabella 1: correlazione valori misurati nei ratti, * P<0,01

Per determinare la significatività delle correlazioni si è impiegato il livello di $p < 0.01$. La numerosità del campione è tale che consente di ritenere significativi anche valori di "r" corrispondenti a 0,216. In generale tutte le correlazioni osservate sono coerenti fornendo anche delle indicazioni. Per quanto riguarda il Ch, quando si alzano i suoi livelli a parità di valori di d-ROMs e PAT, si riducono ovviamente anche gli indici OI e IP, in quanto il valore di Ch è al denominatore, ma l'indice OBRI non si modifica, testimoniando il formarsi di un equilibrio con funzione protettiva. In relazione al d-ROMs, si nota che il suo valore è direttamente correlato con OI e OBRI mentre è, inversamente correlato con PAT e PI e, ovviamente, con PAT/d-ROMs. L'elevata correlazione dell'indice PAT/d-ROMs FAST con OBRI ($r = 0.934$; $p < 0.01$) sembrerebbe indicare che tale indici entrambi rappresentino una variabile sufficiente per determinare il rischio ma come verrà chiarito in seguito non è così, in quanto successive esperienze riveleranno che l'indice PAT/d-ROMs è molto meno discriminante di OBRI. Il PAT, come atteso, è direttamente correlato con IP e PAT/d-ROMs FAST (rispettivamente $r = 0.527$ e 0.722 ; entrambi $p < 0.01$) e inversamente correlato con OI ($r = -0.543$; $p < 0.01$) e OBRI ($r = -0.729$; $p < 0.01$). Queste sono correlazioni attese in quanto legate alle componenti delle equazioni. L'indice OI ha correlazioni rispettivamente positiva con OBRI ($r = 0.848$; $p < 0.01$) e negativa con PAT/d-ROMs FAST ($r = -0.730$; $p < 0.01$). Lo stesso dicasi di PI. Come si potrà notare in seguito, ai fini di OBRI sono molto importanti le modificazioni di colesterolo, le quali saranno comprese nella determinazione di OBRI in termini di rapporto Ch/Ch_b . Per tale motivo si osserverà come OBRI si differenzi in termini prognostici dal rapporto PAT/d-ROMs FAST. Senza considerare le variazioni di CT infatti, OBRI sarebbe simile a PAT/d-ROMs moltiplicato per 5,95. Se invece si considerano anche i livelli di Ch, l'indice OBRI sarà sostanzialmente differente dal rapporto PAT/d-ROMs FAST. Questo è in linea con l'evidenza clinica che la riduzione dei livelli di colesterolo è da ritenersi importante per la riduzione del rischio cardiovascolare, ma si deve considerare anche il bilancio ossidativo. In 21 dei ratti presi in esame l'indice OBRI è stato valutato anche dopo ulteriori 2 settimane di stabulazione nelle medesime condizioni onde valutare la stabilità dell'indice nel tempo a parità di condizioni. L'indice OBRI è risultato estremamente stabile non avendo subito modificazioni significative: $1,2 \pm 0,38$ nella prima valutazione a fronte di $1,1 \pm 0,41$ nella seconda. I precedenti 21 ratti sono stati monitorati dopo anche dopo 24 mesi e dopo 28 ne è stata monitorata la mortalità spontanea. Si sono osservate dei significativi aumenti del CT ($p < 0.05$) e di d-ROMs, mentre il PAT restava costante. Anche l'indice OI restava costante, mentre l'indice PI e il rapporto PAT/d-ROMs subivano una significativa riduzione ($p < 0.05$). Questo comportamento indica che, con l'aumentare dell'età degli animali, si determina la tendenza alla perdita dell'equilibrio ossidativo, come evidenziato anche dall'aumento dei perossidi non compensato da pari aumento del PAT. Lo sbilanciamento ossidativo si osservava sia nella riduzione del rapporto PAT/d-ROMs FAST (-19% ; $p < 0.05$) che nell'aumento dell'OBRI ($+53\%$; $p < 0.05$). La consistente diversa entità di modificazione dei due termini indica una maggior sensibilità dell'indice OBRI rispetto a quello PAT/d-ROMs. Questa differenza di sensibilità si evidenzia in modo netto quando si prende in considerazione la mortalità degli animali in relazione agli indici stessi. Nei 28 mesi, su un numero complessivo di 19 animali sono stati osservati 10 decessi, due animali sono stati esclusi dalla rivalutazione causa morte prematura. A 28 mesi 10 dei 14 animali nei quali l'OBRI è aumentato

sono deceduti, mentre nei 5 animali dove OBRI si era ridotto nessuno è deceduto. Tale differenza è significativa al test del chi quadrato esatto secondo Fisher ($p = 0.0108$). Sono state analizzate e messe in relazione alla mortalità anche i valori finora descritti, sia presi singolarmente Ch, d-ROMs, PAT, che come indici, PAT/d-ROMs FAST, OI e PI. Sono stati considerati come valori "favorevoli" gli aumenti di PAT, IP, PAT/d-ROMs, mentre sono stati considerati come "sfavorevoli" gli aumenti di CT, OI, d-ROMs. Non esiste alcuna significativa differenza di mortalità in relazione a tutte le altre variabili analizzate le quali si quotavano su valori di probabilità esatta tra $p 0.1372$ e $p 0.8724$, dunque non significativa.

Da tutto questo si evince che l'indice OBRI ha un valore predittivo di sopravvivenza mentre tutte le altre variabili o indici non possiedono tale caratteristica.

Importanti conferme di quanto detto finora sono arrivate dai risultati della prima applicazione dell'indice OBRI su di un campione umano. L'indice OBRI è stato utilizzato per la prima volta durante uno studio dell'effetto di alcune statine in pazienti con aterosclerosi. In particolare sono risultati estremamente interessanti le relazioni osservate tra valori OBRI e lo spessore della media e dell'intima delle carotidi (CIMT) per il riconosciuto ruolo di quest'ultima come marker per aterosclerosi.[5]

Sono stati presi in considerazione 22 soggetti affetti da aterosclerosi della carotide documentata attraverso ecografo. I soggetti erano tutti di sesso maschile, con età compresa tra 54 e 64 anni. I criteri di ammissione prevedevano la presenza di ipercolesterolemia, Ch compreso tra 230 e i 300 mg/dl con trigliceridemia inferiore a 300 mg/dl, da sottoporre a terapia con statine. I criteri di esclusione consistevano in qualsiasi altra terapia o qualsiasi patologia cronica, pertanto i soggetti potevano essere trattati solamente con la statina. I controlli sperimentali sono stati svolti in 2 periodi: basale ovvero entro una settimana prima dell'inizio del trattamento e dopo 3 mesi di trattamento con una statina (limitatamente a lovastatina o pravastatina). Le statine sono sempre state impiegate a dose fissa, rispettivamente di 10 mg di lovastatina e 20 mg di pravastatina somministrate sempre ed esclusivamente prima del pasto serale. L'esperienza era di tipo "registry". Per ogni controllo, si eseguiva un'ecografia carotidea bilaterale con ecografo. Le carotidi erano analizzate su immagini trasversali e longitudinali. L'esame includeva la valutazione della carotide comune entro 1.5 cm dall'origine del bulbo, il bulbo stesso, le carotidi esterna ed interna. Lo spessore della media e dell'intima della carotidi (CIMT) era misurato sulle immagini svolgendo 5 misure su ciascuna arteria. Le placche arteriose erano escluse (considerando che per placca qualsiasi protrusione di perlomeno 1.5 mm all'interno dell'arteria). La misurazione CIMT era espressa in mm. Le variabili di laboratorio erano valutate entro 3 giorni dell'esame ecografico e facevano parte della normale routine analitica per questo tipo di pazienti. La valutazione consisteva in: livelli di colesterolo e trigliceridi (CT, HDL, LDL, TG); bilancio ossidativo rappresentato da d-ROMs e da PAT con relativi indici OI, PI e OBRI. Si notava come, ad esclusione di HDL e OI, tutti i dati rilevati dopo trattamento con statine fossero significativamente diversi in senso favorevole. Tra le classiche variabili di riferimento per l'azione delle statine, si può osservare che dopo il trattamento il Ch, LDL e TG si riducevano rispettivamente del 21 ± 7.0 , 28 ± 10.5 , 12 ± 9.8 %, mentre per OBRI la riduzione era molto più consistente essendo del 43 ± 13.8 %. Non è stato possibile evidenziare differenze tra le due statine impiegate in ragione del limitato numero di casi per ciascun prodotto. Interessante è la correlazione tra la riduzione di indice OBRI e il miglioramento di CIMT ($r = 0.546$; $p < 0.05$), mentre tutte le altre variabili non sono correlate. A conferma di tale dato, le uniche differenze significative delle variabili in studio si osservano in quei casi per i quali i valori di OBRI si sono significativamente ridotti. Si deve osservare che tali risultati confermano quelli ottenuti nell'esperienza coi ratti, dai quali emergeva che OBRI era l'unico tra gli indici di laboratorio ad essere correlato con la durata della vita del ratto. In conclusione, è emerso che OBRI si rivela estremamente attendibile nel determinare il miglioramento reale della bilancia ossidativa in relazione ai livelli di colesterolo, tale che solamente nei soggetti nei quali l'indice migliora in modo sensibile si può osservare anche una regressione della patologia vascolare aterosclerotica. Indicativamente emerge che, limitatamente nel periodo di osservazione di 12 settimane, la riduzione del CIMT si osserva quasi esclusivamente quando l'indice OBRI migliora perlomeno del 45%. Dalle esperienze accumulate si è potuto elaborare una tabella di comparazione da utilizzare per la valutazione dei valori OBRI.

<1,2	normalità
1,2-1,4	valori borderline
1,4<	valori alti

Tabella 2

Ove non specificatamente indicato i dati e le affermazioni presenti in questo paragrafo derivano da:

Belcaro G, Cornelli U, Finco A The carotid intima–media thickness modification following atorvastatin is bound to the modification of the oxidative balance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2014;19(5)

Cornelli U, Bondiolotti G, Battelli G, et al Activity of 30 different cheeses on cholesterol plasma levels and Oxidative Balance Risk Index (OBRI) in a rat model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2015;66(4):383-390

[1] Vassalle C. et al. Elevated levels of oxidative stress as a prognostic 20 predictor of major adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(8):712-7

[2] Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò LA. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts. *Mediators of Inflammation* Volume 2013, Article ID 714653

[3] Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis; *Biochemical Society Transactions* 2001;29(2)

[4] brevetto n° MI2014a000575

[5] Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness, A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation* 2007;115:459-67.

4.4

VALUTAZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA SALIVA

Come descritto nel capitolo precedente, la misurazione del potere antiossidante avviene mediante l'utilizzo del SAT test. Sempre riferendosi a quanto ampiamente spiegato nel capitolo precedente, ma anche nell'apposita sezione del sesto capitolo è stata elaborata la seguente tabella di valori di riferimento:

< 1000 μM	Stato di carenza
1000-2000 μM	Valori normali
2000-2500 μM	Valori borderline
>2500 μM	Valori elevati

Tabella 1: Valori di Riferimento del SAT test

Essendo il SAT test concettualmente molto più recente dei precedenti, il materiale su cui basare la valutazione dei valori ottenuti è inevitabile minore. Da quanto appreso da varie esperienze ed osservazioni nonché confermato dalla letteratura, sappiamo che valori classificati come bassi sono il sintomo di una carenza di antiossidanti. Questa carenza di antiossidanti può essere solitamente dovuta a due motivi. In primo luogo può trattarsi di una carenza cronica dovuta ad errati stili di vita e di alimentazione, oltre che da deficit cronici. Secondariamente l'abbassamento del potere antiossidante può essere dovuto alla necessità dell'organismo di controllare un'eccessiva produzione di RS e quindi l'organismo sta di fatto utilizzando le sue scorte di antiossidanti per cercare di contenere una situazione in fase di squilibrio. Solitamente in presenza di questi valori può essere utile una supplementazione di antiossidanti e comunque va approfondita la valutazione globale del cavo orale. Dal lato opposto della scala un valore elevato può essere generalmente ricondotto a tre situazioni diverse. Il paziente può aver assunto integratori a base di antiossidanti che hanno artificialmente alzato il valore di SAT. Altra causa di falso positivo è l'assunzione di alimenti nelle ore precedenti al prelievo, in questo caso l'effetto è dovuto sia al contenuto di antiossidanti endogeni presenti in alcuni alimenti ma soprattutto alle modificazioni di tipo chimico indotte nella saliva dalla presenza di cibo nel cavo orale. Ultima e più significativa causa di innalzamento di valori SAT è la presenza di un'infezione nel cavo orale. Quindi in presenza di un elevato valore di SAT, eliminata la possibilità che si tratti di un falso positivo, sarà opportuno sincerarsi della causa di tale valore e intervenire di conseguenza. Come già spiegato per i valori di PAT potrebbe essere opportuna anche una supplementazione a base di antiossidanti.

4.5

L'APPLICAZIONE WEB "OB Manager Online"

Come si può intuire l'interpretazione dei dati PAT e d-ROMs può non essere agevole. Le cause dei vari scostamenti, specialmente considerando che i due dati non vanno mai considerati indipendentemente ma sempre in relazione uno con l'altro, possono essere molteplici e di non facile comprensione, soprattutto in seguito ad una valutazione superficiale. Per questo motivo in passato è stato sviluppato un software denominato "OB Manager" di sostegno all'interpretazione dei dati. Questo primo software nonostante alcune implementazioni recenti quali l'inserimento dell'indice OSI REDOX ed il passaggio ad applicazione web "OB Manager", seppur di grandissimo aiuto, a causa della complessità delle valutazioni in gioco risultava essere comunque piuttosto limitato. Tra la fine del 2016 e l'inizio del 2017 grazie al lavoro di un team, composto dal sottoscritto ed altri colleghi, tra cui la dottoressa Annarosa Finco, biotecnologa, e il dottor Riccardo Malaspina, ingegnere informatico, basandosi sui lavori del professor Umberto Cornelli, Loyola University School of Medicine(Chicago) e del dottor Eugenio Luigi Iorio, presidente del comitato scientifico dell' Osservatorio Internazionale Stress Ossidativo, e sulla mole di pubblicazioni in nostro possesso, tale supporto informatico è stato notevolmente implementato al punto di poter essere considerato un nuovo e più valido programma. Tale programma viene denominato "OB Manager Online" In questa nuova versione sono stati potenziati gli algoritmi al punto di personalizzare completamente le valutazioni e i consigli forniti sul singolo caso ma soprattutto è stata data la possibilità di seguire accuratamente il paziente durante tutte le rivalutazioni da esso eseguite, con particolare attenzione all'efficacia dell'integrazione antiossidante. Inoltre per la prima volta nelle valutazioni è stata considerato l'effetto di eventuali terapie antiossidanti in atto in relazioni ai valori trovati, specialmente per quanto riguarda le rivalutazioni successive alla prima. Il fatto di essere configurata come applicazione web permette, tra l'altro, l'accesso ad essa a chiunque abbia semplicemente una connessione ad internet senza più la necessità di installazione di un software sul proprio device. Le valutazioni fornite non devono essere intese come sostituto del parere medico, ma sono da intendersi come supporto ed agevolazione allo specialista, a cui spetterà sempre l'ultima parola. Per quanto valido ed efficiente possa essere un supporto informatico non potrà mai sostituirsi allo specialista ma solo supportarlo sempre meglio. Oltre che come supporto nella valutazione delle condizioni di stress ossidativo "OB Manager Online" è strutturato al fine di dare la possibilità allo speciasta di archiviare semplicemente e correttamente tutti i dati di tutti i sui pazienti.

Come ogni supporto informatico "OB Manager Online " è basato su , informazioni in ingresso, input, e informazioni in uscita, output. Nel nostro caso gli input saranno naturalmente i valori ottenuti dai test PAT e d-ROMs, il valore di colesterolo totale se conosciuto e l'anamnesi del paziente. Il primo step, dopo avere eseguito le analisi sullo stress ossidativo è l'inserimento dei dati anagrafici del paziente.

Nome Maria	Cognome Rossi	Data di nascita (gg-mm-aaaa) 12-01-1949	Sesso: M <input type="radio"/> F <input checked="" type="radio"/>
Indirizzo	Città	CAP	Stato
Codice fiscale	Telefono	Email	
Eventuali note			

Figura 1: Screenshot della maschera di inserimento dei dati del paziente; i dati qui inseriti come nelle prossime figure sono dati inventati al fine di illustrate le funzionalità di OB Manager Online e seppur verosimili non fanno riferimento ad alcuna persona reale.

Il secondo step consiste nell'inserimento dei valori analitici, ossia del valore di PAT e d-ROMs, oltre che del valore di colesterolo. Inoltre viene richiesto di inserire l'apposita spunta se il paziente assume un'integrazione alimentare a base di antiossidanti. Da notare nella figura 2 anche la possibilità di visionare gli eventuali esami precedenti del paziente.

Figura 2: Screenshot della maschera di inserimento dei valori del paziente.

Il passo successivo è la compilazione della scheda anamnestica del paziente. Questa scheda è stata strutturata in tre blocchi: situazione clinica attuale, fattori di rischio e farmaci assunti. Da sottolineare il fatto che essa è particolarmente mirata sulla valutazione dello stress ossidativo, infatti è stata costruita per valutare tutte quelle situazioni cliniche, tutti quei fattori di rischio e/o situazioni particolari, nonché farmaci che possono influire in un modo o nell'altro sui valori della capacità antiossidante o sulla concentrazione di perossidi nel sangue. La scheda anamnestica va compilata nuovamente contestualmente ad ogni nuovo esame per permettere al programma di valutare la situazione attuale, ossia situazioni cliniche cambiate o sopraggiunte, miglioramenti o peggioramenti nelle stile di vita, ossia la presenza o meno di nuovi fattori di rischio.

Situazione clinica attuale		
<input type="checkbox"/> Trauma recente	<input checked="" type="checkbox"/> Infezione virale recente	<input type="checkbox"/> Infezione batterica recente
<input type="checkbox"/> Problemi Cardiaci	<input type="checkbox"/> Problemi Neurologici (Familiarità con Alzheimer)	<input type="checkbox"/> Sindrome da iperfunzione tiroidea
<input type="checkbox"/> Ipertensione arteriosa	<input type="checkbox"/> Manifestazione clinica da aterosclerosi	<input type="checkbox"/> Dislipidemia
<input type="checkbox"/> Diabete mellito complicato	<input type="checkbox"/> Disfunzione epatica	<input type="checkbox"/> Malattia neoplastica
<input type="checkbox"/> Forme reumatiche/artrosi	<input type="checkbox"/> Patologia apparato respiratorio cronica	<input type="checkbox"/> Patologia osteoarticolare
<input type="checkbox"/> Sindrome da immunodeficienza	<input type="checkbox"/> Disfunzione renale	<input type="checkbox"/> Problemi oftalmici (congiuntivite,...)
<input type="checkbox"/> Problemi cavo orale	<input type="checkbox"/> Indebolimento memoria	<input checked="" type="checkbox"/> Invecchiamento della pelle
<input checked="" type="checkbox"/> Stanchezza generale/Sposatezza	<input type="checkbox"/> Predisposizione ad affezioni virali stagionali	<input checked="" type="checkbox"/> Indebolimento vista
Profilo fattori di rischio		
<input type="checkbox"/> Gravidanza in atto	<input checked="" type="checkbox"/> Menopausa in atto	<input type="checkbox"/> Fase di ovulazione
<input type="checkbox"/> Sovrappeso/Obesita'	<input type="checkbox"/> Eccesso calorie	<input checked="" type="checkbox"/> Basso consumo di frutta e verdura
<input type="checkbox"/> Eccessivo consumo di alcolici	<input type="checkbox"/> Moderato consumo di alcolici	<input type="checkbox"/> Fumo di sigaretta
<input type="checkbox"/> Attività fisica agonistica	<input type="checkbox"/> Attività fisica amatoriale	<input checked="" type="checkbox"/> Vita sedentaria
<input type="checkbox"/> Stress psico-fisico	<input type="checkbox"/> Esposizione significativa a radiazioni UV	<input type="checkbox"/> Esposizione significativa a inquinamento ambientale
<input type="checkbox"/> Chemioterapia in atto	<input type="checkbox"/> Radioterapia in atto	<input type="checkbox"/> Dialisi in atto
Farmaci		
<input type="checkbox"/> Antidepressivi/tranquillanti	<input type="checkbox"/> Antipertensivi/betabloccanti	<input checked="" type="checkbox"/> Diuretici/lassativi
<input type="checkbox"/> Assunzione estrogeni/progestinici in atto	<input type="checkbox"/> Assunzione corticosteroidi in atto	<input type="checkbox"/> Farmaci per il controllo colesterolo
<input type="checkbox"/> Farmaci per problemi alla tiroide	<input type="checkbox"/> Anticoagulanti	<input type="checkbox"/> Antidolorifici/Antinfiammatori
<input checked="" type="checkbox"/> Terapia ormonale sostitutiva	<input checked="" type="checkbox"/> Assunzione altri farmaci in atto	

Figura 3: Screenshot della maschera scheda anamnestica.

Dopo il salvataggio di tutti i dati inseriti “OB Manager Online” restituisce i primi risultati ossia il calcolo degli indici OSI REDOX e OBRI, un promemoria della scheda anamnestica e una visualizzazione visiva dei risultati su grafici. Nel caso di più esami ripetuti su questi grafici sono presenti anche i valori precedenti. Per una veloce interpretazione di dati sullo sfondo dei grafici sono riportati gli intervalli dei valori di riferimento.



Figura 4: Screenshot dei valori restituiti da “OB Manager Online” e dei grafici costruiti.

Il principale output è però il cosiddetto report, un file in formato stampabile con tutte le valutazioni elaborate da “OB Manager Online” e tutti gli spunti di riflessione per lo specialista. Inizialmente è riportato una tabella di riepilogo dei valori immessi e degli indici calcolati, oltre che i relativi intervalli di riferimento e il grafico dei valori dell’indice OSI REDOX di tutti gli esami effettuati dal paziente. I valori anomali sono già evidenziati con la lettera H, high, se elevati o L, low, se inferiori ai limiti di normalità. Da questo punto in poi il report è suddiviso a blocchi.

Il primo blocco è intitolato “Giudizio globale REDOX” e nella prima parte è costituito da un’iniziale valutazione del valore OSI REDOX, eventualmente anche in relazione all’ultimo esame fatto, e da una valutazione dei valori d-ROMs e PAT e soprattutto da una valutazione delle possibili cause di questi valori se non rientrano negli intervalli di normalità, inerentemente alla scheda anamnestica compilata. Il programma restituisce inoltre una valutazione globale della situazione basandosi sui valori immessi. Queste considerazioni sono un punto cruciale di tutto il report perché sono elaborate non solo a partire dai valori immessi ma anche in relazione all’eventuale assunzione di integratori a base antiossidante, inoltre se non è il primo esame, il programma tiene conto di ciò e le valutazioni sono basate anche sulla situazione pregressa in relazione all’andamento degli effetti dell’integrazione antiossidante. Questo perché a parità di valori se la situazione iniziale era diversa, diverse saranno anche le valutazioni. L’esempio classico è quello

di valore di d-ROMs pari a 350 U.CARR e PAT pari a 3500 U.Cor . Se nell'esame precedente i valori erano rispettivamente 450 U.CARR e a 4500 U.Cor, la situazione sta migliorando, ossia facendo riferimento a quanto illustrato nelle sezioni precedenti, siamo di fronte all'evolversi positivamente di una situazione infiammatoria. Se nell'esame precedente i valori erano 310 U.CARR e PAT pari a 2900 U.Cor si prospettano tutta una serie di possibilità che lo specialista dovrà vagliare, nel caso specifico l'integrazione di antiossidanti è sovradosata o tra un esame e il successivo la situazione clinica è mutata al punto da ritenere insufficiente l'integrazione antiossidante? L'ultima considerazione di questo blocco riguarda la valutazione del valore OBRI.

Il secondo blocco intitolato "Consigli generali" è basato come il resto del report sui valori dei marker di stress ossidativo ma in relazione ai fattori di rischio riportati nella scheda anamnestica. In questo blocco vengono riportati tutta una serie di consigli inerenti allo stile di vita, ossia su quali aspetti dello stesso rivolgere principalmente le attenzioni in relazioni a valori di- d-ROMs e PAT trovati. Questo perché l'integrazione alimentare a base di antiossidanti è importante ma rimane imprescindibile dal miglioramento dello stile di vita.

Nel terzo blocco, intitolato "Consigli di integrazione antiossidante" il programma sulla base delle informazioni a lui note elabora un eventuale elenco di consigli di integrazione antiossidante. Il programma sulla base dei dati suggerisce se intraprendere o meno un'integrazione antiossidante, inoltre può suggerire se protrarre o interrompere un'integrazione già in atto. L'elenco dei suggerimenti è basato su un piccolo database di formulazioni di integratori antiossidanti ad azione più o meno specifica indicate situazioni diverse. Sulla base dei dati il programma elabora anche un'ipotesi di durata del trattamento. L'ultimo blocco denominato "Controllo" suggerisce quando sarebbe auspicabile una successiva rivalutazione

A questo punto mi pare doverosa una precisazione. Il programma da noi elaborato, come il precedente in uso, elabora dei suggerimenti, il più circostanziati possibile in base alle informazioni in possesso, ma la valutazione ultima è e deve rimanere appannaggio dello specialista. "OB Manager Online" da dei consigli, evidenzia possibili situazioni critiche o anomale, in definitiva è un valido supporto, ma non potrà mai sostituire il parere dello specialista, specialmente se adeguatamente formato.

5

FATTORI DI RISCHIO

L'equilibrio redox sistemico può essere compromesso da fattori di varia natura anche molto diversi tra loro. Varie patologie e situazioni cliniche possono essere all'origine di questi scompensi ma esistono anche tutta una serie di fattori comportamentali e ambientali in grado di influenzare negativamente o positivamente lo stress ossidativo. In questo capitolo saranno trattati tutti questi fattori, quelli presi in considerazione sono:

Abuso di alcolici

Esposizione a fumo di sigaretta

Abitudini alimentari

Età

BMI elevato

Dislipidemia

Iperglicemia

Contraccezione a base di ormoni nelle donne

Esposizione a metalli pesanti o aumento della biodisponibilità dei metalli

Esposizione a pesticidi ed erbicidi

Esposizione all'inquinamento dell'aria

Condizioni lavorative

Uso di stupefacenti

Ogni paragrafo è composto da una rapida overview dei meccanismi d'azione e quando necessario da una tabella riassuntiva della principale bibliografia in merito. Tale biografia non è da intendersi esaustiva ma a titolo d'esempio. Nota: se non diversamente specificato le analisi citate sono da intendersi su siero o plasma.

5.1 ABUSO DI ALCOLICI



L'eliminazione primaria dell'etanolo avviene attraverso un meccanismo ossidativo attraverso il metabolismo epatico. Dopo l'ingestione, l'alcool subisce la deidrogenazione ad acetaldeide. Successiva deidrogenazione dell'acetaldeide produce acido acetico e radicali metilici e acetilici. La tossicità dell'etanolo è principalmente causata dall'acetaldeide, dalla propagazione del ciclo redox e dalla generazione catalitica di stress ossidativo[1][2]. Lo stress ossidativo, probabilmente indotto dal metabolismo dell' EtOH, [3] può stimolare i passaggi di ossidazione della reazione di Maillard per aumentare la produzione di prodotti avanzati di glicazione (AGE); quando questi si accumulano sono considerati

tossici. L'accumulo di AGE è associato ad una notevole regolazione delle attività antiossidanti. Quando l'AGE si lega con il suo recettore, RAGE, viene prodotto uno stato infiammatorio tramite l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B e seguito dall'espressione di citochine [4][5]. L'alcool può accelerare lo stress ossidativo attraverso meccanismi diretti e indiretti che aumentano l'apoptosi, alterano le strutture cellulari e producono tessuti dannosi. Inoltre, i danni ai mitocondri, accoppiati ad una debolezza della difesa antiossidante, possono favorire la formazione di ulteriori radicali liberi [6]. Il livello e la durata dell'esposizione dell'etanolo sono tra i principali fattori di alterazione della produzione di NO. In basse dosi, l'etanolo aumenta le attività di NO e eNOS, aumentando la vasodilatazione endoteliale, d'altra parte, dosi più elevate possono compromettere la funzione endoteliale [2]. Il danno cellulare da NO in vivo deriva anche dalla produzione di perossinitrito dovuta l'interazione NO-anione superossido in condizioni di stress ossidativo. Altro possibile effetti dell'EtOH sull'equilibrio redox è una sua possibile interferenza col metabolismo del ferro, che se non eme è considerato un forte pro-ossidante, e sul metabolismo mitocondriale [7]. Accertato è l'aumento di ROS, in particolare di perossidi sierici, noto marker di lipoperossidazione. Se sull'aumento della lipoperossidazione gli autori sono concordi, per quanto riguarda la capacità antiossidante il discorso si fa più complesso, perché se in genere il potere riducente totale del plasma non viene alterato, sono state spesso riscontrate modificazioni a carico dei singoli antiossidanti. Sul tipo e sull'entità di tali alterazioni i dati in letteratura non sono pienamente concordi ma sono generalmente interpretati come una risposta di tipo adattativo, tra l'altro non pienamente soddisfacente, all'aumentato stress ossidativo. L'inefficienza di tale risposta è evidente, in quanto lo stress ossidativo contribuisce alla generazione di potenti chemiotattici per neutrofilii, stimola l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi del collagene, inoltre la perossidazione lipidica a livello epatico gioca un ruolo importante nella progressione della steatosi dell'epatite e della cirrosi epatica. I danni da stress ossidativo si propagano anche in tessuti e sistemi extraepatici come dimostrano i danni endoteliali nei bevitori cronici e l'aumentato stress ossidativo sistemico [7][8][9][10]. Da sottolineare che una dieta ricca di grassi contemporanea all'assunzione di alcolici sembra aggravare ulteriormente lo status ossidativo [10]. Particolare invece sembra l'effetto dell'assunzione di modeste quantità di vino rosso (250 ml) contemporaneamente all'assunzione di cibi grassi. Infatti sebbene non vi siano alterazioni dei livelli lipidici rispetto a un pari pasto accompagnato da acqua, è stata evidenziato un aumento della capacità antiossidante e una minor concentrazione di perossidi (monitorati mediante d-ROMs test e MDA) nei campioni di plasma prelevati dopo il pasto accompagnato da vino rosso. [11]

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni
H&D test	
<i>Macinelli et al 2007 [12]</i>	Le donne sono più esposte ai danni ossidativi derivanti dall'assunzione di etanolo. Il 44% del campione femminile mostrava alti valori di d-ROMs contro il 25% del campione maschile. (n=37, 9 donne e 28 uomini)

<i>Trotti et al. 2004 [9]</i>	I forti bevitori hanno una maggior concentrazione plasmatica di perossidi, probabilmente di derivazione lipidica, dei bevitori moderati. 368 U.Carr (254-718) per i forti bevitori contro 245 U.Carr (200-360) per i bevitori moderati (forti bevitori n=40 moderati bevitori n=44)
<i>Trotti et al. 2002 [13]</i>	I forti bevitori hanno condizioni ossidative e trombotiche peggiori del gruppo controllo. 328 U.Carr (143-847) per i forti bevitori contro 245 U.Carr (200-366) per i bevitori moderati. Capacità antiossidante misurata come capacità di risposta all'insulto ossidativo inalterata tra i due gruppi. (forti bevitori n=45 moderati bevitori n=42)
<i>Trotti et al. 2001 [8]</i>	Un gruppo di forti bevitori ha mostrato un valore di d-ROMs (344±68 U.Carr) rispetto ai 4100 soggetti apparentemente sani usati come gruppo controllo per determinare i valori di riferimento del d-ROMs (n=25)
Altro	
<i>Das & Vasudevan 2007 [14]</i>	Review; l'assunzione di alcool induce abbassamento di GHS, innalzamento di etilradicali, addotti proteici del nonenale e aumento della MDA
<i>Albano 2006 [15]</i>	Review; lo stress ossidativo indotto da etanolo è il risultato della compromissione delle difese antiossidanti con la sovrapproduzione di specie reattive di ossigeno; trovate specie etilradicali derivanti dal metabolismo dell'etanolo, riscontrato una riduzione della concentrazione di GHS e dell'attività di SOD, CAT e GPX, supplementazione con Vitamina E contrastano lesioni epatiche
<i>Defeng Wu et al. 2003 [16]</i>	Review; negli studi riportati si evidenzia un collegamento tra stress ossidativo originato da consumo di alcool e l'incidenza di patologie stress-correlate; viene evidenziato un aumento dei perossidi lipidici, delle modificazioni a livello proteico e un GHS epatico ridotto; viene evidenziato il ruolo protettivo della supplementazione con di Vitamina E, SOD e GHS

- [1] Kovacic P. Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses* 2005;65:90–96.
- [2] Deng XS, Deitrich RA. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Curr Clin Pharmacol* 2007;2:145–153.
- [3] Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkowska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P: Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001;8:59–70.
- [4] Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lerici CR. Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol* 2001;11:340–346.
- [5] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269:9889–9897.
- [6] Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C850–C856.
- [7] Iwao Kurose, Hajime Higuchi, Shinzo Kato, Soihiro Miura, Hiromasa Ishii. Ethanol-Induced Oxidative Stress in the Liver. *Alcoholism* 1996;20:77a–85a
- [8] Trotti R, Carratelli M, Barbieri M, et al. Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica* 2001; 86:85-91

- [9] Trotti R, Carratelli M, Bo P, Barbieri M, Mangiagalli A, Samuele A, Gabanti E, Blandini F. Pro-oxidant activity and methionine metabolism in chronic alcohol abusers: relationship to alcohol withdrawal and folate administration; *Panminerva Med.* 2004;46 (3): 161–164.
- [10] Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol* 1994; 29 (5): 513-522
- [11] Ventura P1, Bini A, Panini R, Marri L, Tomasi A, Salvioli G. Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004;74(2):137–143.
- [12] Mancinelli R, Giordano R, Ciprotti M, Costantini S, Senofonte O, D'Illio S, Vargas M, Attilia ML, Ceccanti M . Oxidative stress and protective factors (vit B1, Zn, Se) in male and female alcoholics. *Alcohol and Alcoholism* 2007; 42(Supplement 1):i57-i60;
- [13] Trotti R. Carratelli M. Barbieri M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Medica* 2002;44(1):37-40
- [14] Das DM & Vasudevan SK. Alcohol-induced oxidative stress. *Life sciences.* 81;177-87.
- [15] Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society* 2006;65:278–290
- [16] Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):277-84.

5.2

ESPOSIZIONE A FUMO DI SIGARETTA



Il fumo di sigaretta è una fonte di stress ossidativo diretto e indiretto, ossia fornisce sia specie ossidanti sia attiva percorsi metabolici che inducono a stress ossidativo e infiammazioni. Il fumo influisce sull'equilibrio redox del cavo orale e del polmone principalmente ma non esclusivamente. Il fumo di sigaretta è una ricca fonte di radicali liberi. Questi radicali generati dal fumo da sigarette sono sufficientemente stabili per essere rilevati mediante EPR. La componente gas-inalata del fumo di sigaretta contiene un gran numero di radicali organici fortemente reattivi, principalmente ROS e RNS

fortemente reattivi. Il fumo contiene anche alte concentrazioni di olefine e dieni reattivi oltre che 500 ppm di ossido di azoto (NO). Importante è anche l'apporto di ferro con conseguente possibilità di reazioni di Fenton[1]. Inoltre dalla reazione tra NO e anione superossido si genera lo ione perossinitrito, il quale oltre ad essere un forte ossidante di suo, penetra nei compartimenti intracellulari attivando la proteina IKK con conseguente attivazione del fattore NF-κB. La cronica attivazione di questo fattore porta ad infiammazione e stress ossidativo[2]. Nei fumatori è stata riscontrata una maggiore densità di macrofagi alveolari, parallelamente ad un aumentata quantità di H₂O₂ rilasciato dagli stessi, nonché una accelerata maturazione ed attivazione degli stessi. Inoltre è stato dimostrato in vitro che l'esposizione al fumo di tabacco degli stessi ne aumenta il metabolismo ossidativo[1]. L'esposizione acuta al fumo di sigaretta aumenta i marcatori dello stress ossidativo. NO e derivati aumentano entro 24 ore dopo l'esposizione al fumo. Il rapporto GSH/GSSG, risulta diminuito dopo l'esposizione acuta del fumo sia negli studi su animale che in vitro. È interessante notare che l'esposizione acuta al fumo di sigaretta causa anche il danneggiamento degli acidi grassi nelle membrane cellulari, misurata da un aumento dei prodotti di perossidazione lipidica nell'uomo (aria espirata e plasma). Nell'uomo tutti i marcatori ossidativi aumentano entro la prima ora dopo l'esposizione acuta al fumo e la maggior parte dei marcatori sono tornati alla normalità entro 90 minuti. L'aria espirata è il primo compartimento in cui può essere osservato un aumento dei marcatori di stress ossidativo, seguito da BAL (lavaggio broncoalveolare) e dal sangue. Negli animali molti marcatori di stress ossidativo cambiano nelle prime 6 ore dopo l'esposizione acuta al fumo e ritornano alla normalità entro 24 ore. In tutti gli scompartimenti (tessuto polmonare, BAL e sangue) GSH o suoi derivati sono depressi nello stesso periodo, suggerendo una risposta generalizzata all'esposizione acuta al fumo. L'esaurimento iniziale di GSH dopo l'esposizione acuta al fumo sembra essere seguito da un aumento di GSH nelle 24 successive dopo, suggerendo un meccanismo di protezione delle cellule contro lo stress ossidativo da fumo. In sintesi, l'esposizione acuta al fumo aumenta immediatamente i marcatori dello stress ossidativo in tutti i modelli e persino provoca danni alla membrana cellulare mentre il rapporto GSH/GSSG svolge un ruolo importante nella protezione del polmone contro gli ossidanti del fumo di sigaretta. [3]

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni
H&D test	
<i>Vassalle et al.2011 [4]</i>	Il fumo è risultato un fattore di rischio nello sbilanciamento dell'equilibrio redox (n=332)
<i>Vassalle et al.2009 [5]</i>	Il fumo è risultato un fattore di rischio nello sbilanciamento dell'equilibrio redox (n=179)
<i>Buico et al. 2009 [6]</i>	Nei fumatori sono stati trovati livelli di perossidi (misurati col d-ROMs test ma tarato in μM di TBH invece delle canoniche U.Carr) aumentati,

	8,08±3,43 vs 5,96±2,30; inoltre il potere antiossidante del plasma, misurato con la tecnica ABTS si è ridotto da 675±61 a 589±103 μM di Trolox equivalenti (n=50, gruppo controllo n=15)
Altro	
<i>Shah et al.2015 [7]</i>	Il fumo ha aumentato significativamente la concentrazione di xantina ossidasi e malondialdeide e diminuito quella le vitamine C ed E
<i>Wofniak et al.2013 [8]</i>	Nei pazienti affetti da malattia polmonare ostruttiva cronica l'astinenza dal fumo per mesi ha riequilibrato i principali parametri di stress, in particolari sono diminuite le molecole sensibili al TBARS
<i>Inonu et al. 2012 [9]</i>	La concentrazione di 8-isoprostano nell'esalato dei fumatori è pari a quella di pazienti affetti da malattia polmonare ostruttiva cronica e maggiore del gruppo controllo
<i>Tonguç et all 2011[10]</i>	In pazienti parodontici i livelli MDA sistemici (plasma sanguineo) e locali (tessuti gengivali) sono aumentati dal fumo oltre all'impatto dovuto alla periodontite. Anche la diminuzione delle attività locali di SOD, GSH-Px e CAT osservate nei pazienti con periodontite sono accentuate dal fumo.
<i>Chelchowska et al. 2011[11]</i>	Nelle donne gravide l'aumento di MDA nel plasma sanguineo è stato maggiore nelle fumatrici piuttosto che nelle non fumatrici; inoltre la capacità antiossidante (TRAP) è risultata significativamente più bassa nel gruppo nelle fumatrici. La concentrazione plasmatica dell'acido urico e di vitamina E, A e β-carotene erano ridotte in tutte le fumatrici rispetto alle donne in gravidanza non fumatrici. La concentrazione di MDA nel plasma del sangue cordonale dei neonati delle madri in fumo era significativamente più elevata e la difesa antiossidante era più bassa.
<i>Virupaxappa et al. 2011 [12]</i>	L'aumento del livello di MDA nel siero e la diminuzione della vitamina C sono stati riscontrati nei fumatori cronici rispetto ai non fumatori, in uomini con infarto acuto del miocardio

- [1] Repine JE, Bast A, Lankhorst A. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:341–357
- [2] Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, et al. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. archives of oral biology 2011;56:48 – 53
- [3] van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Hacken NHTT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax 2004;59:713-721
- [4] Vassalle C, Novembrino C, Maffei S, et al. Determinants of oxidative stress related to gender: relevance of age and smoking habit; Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2011;49:1509–1513
- [5] Vassalle C, Maffei S, Ndreu R, Mercuri A. Age-related oxidative stress modulation by smoking habit and obesity. Clin Biochem. 2009;42(7-8):739-41
- [6] Buico A, Cassino C, Ravera M, Betta PG, Osella D. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma Redox Report 2009;14:125-131
- [7] Shah AA, Khand F, Uddin Khand A. Effect of smoking on serum xanthine oxidase, malondialdehyde, ascorbic acid and α-tocopherol levels in healthy male subjects. Pak J Med Sci 2015;31(1).
- [8] Wofniak A, Górecki D, Szpinda MB, Mila-Kierzenkowska C, Wofniak B. Oxidant-Antioxidant Balance in the Blood of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease After Smoking Cessation Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013, Article ID 897075.
- [9] Inonu H, Doruk S, Sahin S, Erkorkmaz U, et al. Oxidative Stress Levels in Exhaled Breath Condensate Associated With COPD and Smoking. Respir Care 2012;57(3):413– 419.

- [10] Tonguç MO, Öztürk O, Sütçü R, et al. The Impact of Smoking Status on Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Levels in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2011;82:1320-1328
- [11] Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska T, Leibschan K. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2011;155:132-136
- [12] Virupaxappa Kashinakunti S, Kollur P, Shantappa Kallaganada G, Rangappa M, Basavaraj Ingin J. Comparative study of serum MDA and vitamin C levels in non-smokers, chronic smokers and chronic smokers with acute myocardial infarction in men. *J Res Med Sci.* 2011; 16(8): 993–998

5.3

ERRATE ABITUDINI ALIMENTARI



La forte influenza tra abitudini alimentari e i livelli di marker di stress ossidativo è ormai considerato un fatto noto ed accettato [1][2][3], e la letteratura in merito è estremamente vasta, per questo motivo in questa sezione saranno presenti a titolo esplicativo solo alcuni lavori inerenti ai test H&D.

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni	
H&D test		
<i>Vadalà et al. 2016 [4]</i>	Succo di frutta e verdura	Sono aumentati gli antiossidanti salivari (n=30)
<i>Cornelli et al. 2015 [5]</i>	Vari tipi di formaggi	Alcuni tipi di formaggi presi in esame hanno influenzato positivamente o negativamente l'equilibrio antiossidante. (lavoro su modello animale) (n=141)
<i>Kim et al 2012 [6]</i>	Dieta vegetariana	I valori di d-ROMS sono diminuiti nei soggetti vegetariani rispetto ai soggetti onnivori (vegetariani n=45 onnivori n=30)
<i>Ichikawa et al. 2012 [7]</i>	Alimenti vegetali es. broccoli	Nei soggetti nella cui dieta sono stati implementati gli alimenti vegetali sono diminuiti i valori di d-ROMs e aumentati i valori di BAP (n=14 gruppo controllo n=15)
<i>Giongo et al. 2011 [8]</i>	Mirtilli	L'assunzione di mirtilli ha aumentato i valori di BAP (n=24)
<i>Cornelli et al. 2011 [9]</i>	Dieta povera di antiossidanti	Durante la sezione d'perimento in cui i soggetti erano sottoposti ad una dieta povera di antiossidanti si è visto un aumento dei valori di d-ROMs (n=12)
<i>Colombo et al 2006 [10]</i>	Miglioramento delle abitudini alimentari, aumento del consumo di derivati vegetali	Si è notato un decremento del valore di d-ROMs in seguito al miglioramento delle abitudini alimentari (n=104)
<i>Erba et al. 2005 [11]</i>	The verde	Si notato un notevole decremento dei valori di d-ROMs in seguito all'introduzione nella dieta di due tazze di the verde.

- [1] Jun Dai, Dean P Jones, Jack Goldberg, et al. Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1364-1370
- [2] Pal Yu B. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;21:651-668
- [3] Bloomer RJ, Kelsey H, Fisher-Wellman BS. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gender Medicine* 2008;5:218-228
- [4] Vadalà M, Palmieri B, Laurino C. Energy Restoration by an Original Fruits & Vegetables Juice Intake in a Cohort of Elderly People Affected by Sarcopenia. *Int J Sports Exerc Med* 2016;2:046
- [5] Cornelli U, Bondiolotti G, Battelli G, Zanoni G, Finco A. Activity of 30 different cheeses on cholesterol plasma levels and oxidative balance risk index (OBRI) in rat model. *Int J Food Sci Nutr* 2015:1–8.
- [6] Kim MK, Cho SW, Park YK. Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels. *Nutr Res Pract*. 2012;6(2):155-161
- [7] Ichikawa Y, Goto N, Gomyo T, Miura M. Effects of vegetable intake on biomarkers related to oxidative stress in healthy young females. *Anti-Aging Medicine* 2012;9(6):155-160
- [8] Giongo L, Bozza E, Caciagli P, Valente E, Pasquazzo MT, Pedrolli C, Iorio EL, Costa A. Short-term blueberry intake enhances biological antioxidant potential and modulates inflammation markers in overweight and obese children. *Journal of Berry Research*. 2011;1:147-158
- [9] Cornelli U, Belcaro G, Finco A. The oxidative stress balance measured in human with different markers, following a single oral antioxidants supplementation or a diet poor of antioxidants. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2011:64-70.
- [10] Colombo C, Muti P, Pala V, Cavalleri A, Venturelli E, Locardi M, Berrino F, Secreto G. Plant-based diet, serum fatty acid profile, and free radicals in postmenopausal women: the diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Int J Biol Markers*. 2006;61–63.
- [11] Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti F, Biagi PL, Testolin G. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in Humans. *J Nut Biochem*. 2005;16(3):144–149

5.4 ETÀ



L'età non è certo un fattore controllabile ma rientra a diritto tra i fattori di rischio di stress ossidativo, essendo stata dimostrata una sua influenza sull'equilibrio redox, in particolare sui marker di lipoperossidazione. In uno studio condotto da *Vadalà et al.* 2017 [1] su 200 persone tra i 10 e i 94 anni amboessesi si evidenzia un piccolo aumento tra i valori di d-ROMs nelle persone over 50 ma nessuna differenza nei valori di PAT. Nello studio da noi condotto e descritto nella sezione "Geriatrics" del prossimo capitolo si nota invece nelle persone over 60 un forte aumento del d-ROMs rispetto

ai valori normali, più forte nelle donne che negli uomini, e una leggera diminuzione dei valori di PAT rispetto alla media ma senza differenza di genere. Anticipando anche quanto descritto nella sezione "Neonatology" del capitolo seguente, cioè il fatto che i neonati hanno valori fortemente inferiori alla popolazione adulta, si rafforza la considerazione che il fattore età sia da prendere in considerazione durante la valutazione dello stress ossidativo. È stata trovata inoltre una certa correlazione ($r=0,25$ $p=0,014$) tra i valori di d-ROMs e l'età considerando tutto l'intervallo vitale[2], correlazione che non si trova più considerando intervalli minori.

[1] Vadalà M, Palmieri B, Malagoli A, Laurino C. Oxidative stress, plasma/salivary antioxidant status detection and health risk factors. *Asian Journal of Medical Sciences* 2017;8:32-41

[2] Vassalle C. An easy and reliable automated method to estimate oxidative stress in the clinical setting.; Armstrong D, Ed. *Advanced Protocols for Oxidative Stress in the Methods in Molecular Biology series*. Humana press. 2009;477:31-9

5.5 BMI ELEVATO



È noto ed accettato che un surplus di massa grassa, solitamente causa di un elevato BMI, sia un rischio indipendente di stress ossidativo [1][2][3]. Le motivazioni sono molteplici. La più banale consiste nell'abbondanza del substrato, i lipidi, coinvolto in reazioni ossidative, con conseguente maggiore predisposizione alla formazione di lipoperossidi, notevole fonte di stress ossidativo oltre effetto dello stesso[4]. Oltre a servire come deposito di stoccaggio per l'energia lipidica, il tessuto adiposo è un organo endocrino metabolico attivo. Le citochine infiammatorie

interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) sono espresse in tessuto adiposo umano. In uomini e donne sani, le concentrazioni sistemiche di IL-6 aumentano con l'adiposità ed è stato stimato che fino a un terzo dell'intera IL-6 circolante provenga da il tessuto adiposo. La sintesi epatica della proteina C-reattiva (CRP) in fase acuta è in gran parte regolata da IL-6. Concentrazioni elevate di CRP si associano ad uno stato infiammatorio e coerentemente con l'idea che l'obesità sia uno stato infiammatorio cronico, il rapporto BMI e è significativamente e positivamente associati ai livelli di CRP sierici . L'infiammazione è una fonte di stress ossidativo. Anche in caso di moderata perdita di peso è stata riscontrata una diminuzione dei livelli circolanti di TNF- α , IL-6 e CRP[2]. Inoltre un'alta concentrazione di trigliceridi nel citosol causa un'elevata presenza di esteri dell'acetil-CoA, una forma metabolicamente attiva degli acidi grassi. Questi esteri inibiscono la traslocazione del nucleotidi adenina causando una deficienza intramitocondriale di esso. Questa deficienza è un potente stimolatore della produzione mitocondriale di ROS [5]. In colture in vitro si notato un maggior livello di stress ossidativo dovuto ad maggior attivazione della NAPH ossidasi in presenza di acidi grassi[6]. La frequente associazione tra elevato BMI ed iperglicemia è anch'esso un motivo per cui il BMI va considerato un fattore di rischio da considerare in sede di valutazione dello stress ossidativo.

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni
H&D test	
<i>Faienza et al. 2012 [7]</i>	È stato osservato un aumento dei valori di d-ROMs e una riduzione dei valori di BAP in un gruppo di bambini obesi rispetto al gruppo controllo, inoltre i valori di d-ROMs e BAP erano direttamente e inversamente correlati col BMI. (n=25, controllo n=30)
<i>Vassalle et al. 2009 [8]</i>	L'aumento di peso è risultato essere un fattore di rischio nei confronti di un aumento del rapporto tra i valori di d-ROMs e il potere antiossidante misurato come capacità di rispondere ad un insulto ossidativo. (n=179)
<i>Atabek et al. 2004 [9]</i>	È stato osservato un aumento del valore di d-ROMs nei bambini obesi.(n=24, controllo n=24)
Altro	
<i>Vincent et al. 2007 [10]</i>	Review; l'obesità eleva lo stress ossidativo nelle popolazioni giovani, vecchie e cliniche, come dimostrano elevazioni nella perossidazione lipidica (MDA, idroperossidi, 4-idrossinonenale, isoprostani, dieni coniugati) o nell'ossidazione proteica (8-idrossi-deossiguanosina); la

	perossidazione lipidica è associata a diversi indici di adiposità e ad una bassa difesa antiossidante sistemica (ossia enzimi antiossidanti, antiossidanti alimentari del tessuto, glutazione)
<i>Amirkhizi et al.2007 [11]</i>	È stato osservata una maggior concentrazione di MDA nelle donne obese e una correlazione negativa nelle stesse tra SOD e GPX con BMI
<i>Furukawa, et al 2004 [6]</i>	È stata osservata una significativa correlazione tra il BMI e la concentrazione urinaria dell'isoprostano 8-epi-PGF _{2α} e tra la concentrazione plasmatica delle molecole sensibili al TBARS in soggetti obesi non diabetici
<i>Keaney et al. 2003 [1]</i>	È stata osservata una significativa correlazione tra il BMI e la concentrazione urinaria dell'isoprostano 8-epi-PGF _{2α}
<i>Ozata et al. 2002 [12]</i>	È stata riscontrata una riduzione dell'attività della SOD e della GPX contemporanea ad un aumento delle molecole sensibili al TBARS in soggetti obesi

[1] Keaney JH, Larson MJ, Vasan RS, Wilson PWF, et al. Obesity and Systemic Oxidative Stress Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:434-439

[2] Higdon JV, Frei B. Obesity and Oxidative Stress, A Direct Link to CVD?: A Direct Link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:365-367

[3] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans; *International Journal of Obesity.* 2006;30(3):400-418

[4] Matsuda M, Shimomura L. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice* 2013;7:e330-e341

[5] Atabek ME, Vatansev H, Erkul I. Oxidative Stress in Childhood Obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2004;17:1063-1068

[6] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation.* Ann Arbor 2004;114: 1752-61

[7] Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, et al. Oxidative Stress in Obesity and Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Horm Res Paediatr* 2012;78:158-164

[8] Vassalle C, Maffei S, Ndreu R, Mercuri A. Age-related oxidative stress modulation by smoking habit and obesity. *Clin Biochem.* 2009;42(7-8):739-41.

[9] Atabek ME, Vatansev H, Erkul I. Oxidative stress in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004;17(8): 1063-1068.

[10] Vincent HK, Innes KH, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2007;9:813-839.

[11] Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? *ARYA Atherosclerosis Journal* 2007;2(4): 189- 192

[12] Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin M, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity; *Clinical Biochemistry* 2002;35:627-631

5.6 DISLIPIDEMIA



Col termine dislipidemia si intende una qualsiasi variazione del contenuto lipidico del sangue ma in questo contesto deve essere intesa nell'accezione di aumento dei grassi circolanti. Dagli studi visionati sembra probabile che un aumento dei grassi circolanti sia un fattore di rischio per lo sviluppo di stress ossidativo. I trigliceridi alti del siero e gli acidi grassi liberi portano ad un accumulo eccessivo di lipidi nei tessuti non adiposi e questo accumulo di lipidi è associato a disfunzione e morte cellulare[1]. In uno studio su topi sottoposti a dieta ricca di grassi si è identificato un accumulo di 4-

HNE e proteine carbonilate, oltre che infiammazione epatica. In questo studio, oltre al colesterolo, l'accumulo di trigliceridi e acidi grassi saturi mediante l'aggiunta di un componente ad alto contenuto di grassi ha accelerato lo stress ossidativo, forse attraverso l'up-regulation dei geni coinvolti nella generazione di ROS, è stata ipotizzata l'influenza sul complesso di ossidazione NADPH, e la riduzione dell'espressione dei geni per gli enzimi antiossidanti [2]. Alcuni studi riportati da *Brookheart et al. 2008* [1] dimostrano che la lipotossicità può essere modellata in linee cellulari stabilizzate mediante supplementazione di supporti di coltura con concentrazioni fisiopatologiche di un grasso saturo saturo quale il palmitato. In questi studi l'integrazione di palmitato di diversi tipi di cellule porta alla morte cellulare attraverso l'accumulo di ROS e l'induzione di stress ossidativo nel reticolo endoplasmatico. Un certo numero di studi suggeriscono che il palmitato induca ROS attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi. L'inibizione di ROS mediante la supplementazione di antiossidanti non solo inibisce la morte delle cellule lipotossiche, ma riduce anche notevolmente l'induzione della risposta stressoria, suggerendo che lo stress ossidativo mediato dai lipidi porta allo stress nel reticolo endoplasmatico [1]. È noto che l'infusione di intralipid (olio di soia ed eccipienti destinato all'alimentazione parenterale) per mimare o indurre dislipidemia induca un aumento di isoprostani, 4-HNE e altri markers di stress ossidativo[2][3]. Inoltre come maggiormente illustrato in tabella è nota una certa correlazione tra valori d-ROMs e livelli dei lipidi.

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni
H&D test	
<i>Atabek et al. 2004</i> [4]	I valori di d-ROMs sono positivamente correlati con colesterolo, trigliceridi e LDL. (n=48)
<i>Capunzo et al 2001</i> [5]	I valori di d-ROMs sono positivamente correlati con colesterolo, e HDL negli uomini. (n=126)

[1] Brookheart RT, Michel CI, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. The Non-coding RNA gadd7 Is a Regulator of Lipid-induced Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress. *The journal biol chem* 2011;284:7446–7454,

[2] Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S. Lipid-Induced Oxidative Stress Causes Steatohepatitis in Mice Fed an Atherogenic Diet. *HEPATOLOGY* 2007;46:1392-1403

[3] Heno F, Lopes, Kelley L, Martin, Khaled Nashar, Jason D. Morrow, Theodore L. Goodfriend, Brent M. Egan. DASH Diet Lowers Blood Pressure and Lipid-Induced Oxidative Stress in Obesity. *Hypertension*. 2003;41 1-8

[4] Atabek ME, Vatansev H, Erkul I. Oxidative stress in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004;17(8): 1063–1068.

[5] Capunzo M, Iorio EL, Cavallo P. Correlation between oxidative stress and plasma lipids levels: results of a preliminary study [original title "Correlazione fra stress ossidativo e livello di lipidi plasmatici: risultati di uno studio preliminare"]. *I Quaderni dell'Università di Salerno*. 2001. 91–102.

5.7 IPERGLICEMIA



L'influenza della concentrazione di glucosio sullo stress ossidativo verrà ampiamente trattata nella sezione dedicata al diabete del sesto capitolo, qua si riporta una breve sintesi. Più glucosio fluisce attraverso il percorso glicolico più piruvato e acetil-CoA vengono prodotti, portando all'aumento della produzione di NADH. Poiché NADH è un vettore di elettroni, la quantità in eccesso provoca una pressione elettronica sulla catena di trasporto di elettroni mitocondriale. Questo è particolarmente vero per gli epatociti e le β -cellule pancreatiche in cui glucochinasi (esochinasi D), l'enzima attivato dalla alimentazione, è inibito dal glucosio-6-fosfato (G6P).

Pertanto, più glucosio produce più G6P che verrà ripartito attraverso la glicolisi e il ciclo di Krebs, portando alla produzione di altro NADH. La pressione elettronica indotta da NADH sovrapprodotta porterà un grosso carico di lavoro al complesso mitocondriale I che è il principale sito di riciclaggio di NADH. In questa condizione, il complesso lavorerà al massimo della sua capacità di ossidare più NADH a NAD^+ nel tentativo di migliorare la condizione pseudoipossica. Tanto più NADH viene ossidato dal complesso I tanto più anione superossido verrà prodotto in quanto il complesso I, è anche coinvolto nel pompaggio protonico, portando ad un aumento proporzionale della perdita di elettroni che consentirà di ridurre parzialmente l'ossigeno per produrre anione superossido. Questo scenario potrebbe peggiorare in condizioni pseudoipossiche poiché se meno NAD^+ è disponibile per trasportare elettroni dell'ossigeno, più ossigeno sarà disponibile per la riduzione parziale a opera degli elettroni perduti del complesso I e del complesso III, quest'ultimo anche coinvolto nel pompaggio protonico. [1]

[1] Yan LJ. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. Journal of Diabetes Research 2014, Article ID 137919.

5.8

CONTRACCZIONE A BASE ORMONALE NELLE DONNE



Per tutta una serie di motivi non ancora molto chiari, ma probabilmente legati a fenomeni ormonali, le donne sono più propense a sviluppare stress ossidativo come dimostrano i valori di d-ROMs mediamente più elevati [1]. Numerose evidenze dimostrano che ulteriore fattore di rischio nel genere femminile deriva dall'assunzione di estrogeni e progestinici, principalmente a scopo contraccettivo. Gli effetti degli estrogeni e del progestinici sullo stress ossidativo sono ancora controversi. Gli estrogeni mostrano un'attività antiossidante inibendo l'espressione e la

funzionalità dell'ossidazione $NADP^+/NADPH$ [2], aumentando l'espressione e il livello di attivazione dell'isoforma endoteliale della sintesi dell'ossido nitrico (eNOS)[3] e stimolando l'espressione e l'attività della MnSOD e della SOD extracellulare [4]. Queste attività antiossidanti degli estrogeni sono contrastate dalle progestine attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi e l'inibizione dell'espressione e dell'attività del MnSOD e dell'ecSOD [5]. Un effetto pro-ossidante diretto degli estrogeni è stato mostrato, invece, in modelli animali come il ratto [6] e il criceto siriano [7]. Questi effetti pro-ossidanti degli estrogeni possono essere parzialmente spiegati dal loro metabolismo, infatti, gli estrogeni possono essere metabolizzati in estrogeni del catecolo dagli enzimi del citocromo P450. Da quest'ultimi derivano a sottoprodotti che sono potenti agenti riducenti in grado di generare ROS [8]. L'aumento del rame sierico è noto ed è stato attribuito all'induzione da parte degli estrogeni della sintesi epatica della ceruloplasmina, la principale proteina contenente rame [9]. Il rame, come lo zinco, è un elementi che svolge un ruolo vitale come co-fattore catalitico per una varietà di enzimi tra cui CuZnSOD. Uno squilibrio tra questi due elementi potrebbe causare una disfunzione di CuZnSOD e, di conseguenza, una diminuzione della protezione dei lipidi contro l'ossidazione da parte di ROS. Ci sono numerose prove che suggeriscono che il rame gioca un ruolo diretto nella perossidazione lipidica. Il rame è un metallo di transizione redox-attivo pro-ossidante in grado di catalizzare la reazione di Fenton [10]. I livelli di rame sono positivamente correlati ai livelli di perossidi lipidici[11][12]. Riassumendo ogni tipo di contraccettivo orale a base di estrogeni/ progestinici genera un picco ematologico in estrogeni o progestinici (a seconda del tipo di contraccettivo) che non è su scala fisiologica e pertanto un' ossidazione che normalmente può essere considerata "leggera e controllabile" diventa stress ossidativo, come dimostrato dagli alti livelli di LDL ossidato, dall'aumento di rame ematico e dalla sovrapproduzione di ossidi d'azoto.

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni
H&D test	
<i>Vadalà et al.2017 [1]</i>	Non si osservano differenze statisticamente significative tra donne sottoposte a contraccettivi ormonali e il gruppo controllo, sia come potere totale antiossidante (PAT) sia come perossidi (d-ROMs) ma si nota per quanto riguarda il d-ROMs una notevole allargamento dell'intervallo con la presenza di una maggiore percentuale di valori anomalmente alti. (n=24, controllo n=76)
<i>Chen et al. 2012 [13]</i>	Si osservato un valore di d-ROMs più elevato nelle donne sottoposte a contraccettivi ormonali piuttosto che nel gruppo controllo, (dati espressi come mediane e intervallo interquartile) 380[328-502] U.Carr vs 325[271-369]U.Car (n=24, controllo n=63)

<i>Finco et al. 2011 [14]</i>	Partendo da una media di 240±22 U.Carr il 70% delle donne ha raggiunto valori superiori alle 400 U.Carr durante l'assunzione del contraccettivo orale per poi scendere a valori normali durante la sospensione
Altro	
<i>Pincemail et al 2007 [12]</i>	A livello di antiossidanti non si sono trovate differenza nelle concentrazioni di Vitamina C e α -tocoferolo ma si è riscontrato un abbassamento del β -carotene (imputabile ad una maggiore conversione in retinolo); si osservato un aumento del rame plasmatico e dei lipoperossidi
<i>De Groote et al. 2009 [15]</i>	È stato osservato un aumento dei livelli di liporossidi e di rame sierico e una diminuzione del β -carotene
<i>Subakir et al. 2000 [16]</i>	Si osservato un aumento dei lipoperossidi e una diminuzione della vitamina E

- [1] Vadalà M, Palmieri B, Malagoli A, Laurino C. Oxidative stress, plasma/salivary antioxidant status detection and health risk factors. *Asian Journal of Medical Sciences* 2017;8:32-41
- [2] Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J* 2001;15:2121-30.
- [3] Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002;23:665-86.
- [4] Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170-7.
- [5] Itagaki T, Shimizu I, Cheng X, et al. Opposing effects of oestradiol and progesterone on intracellular pathways and activation processes in the oxidative stress induced activation of cultured rat hepatic stellate cells. *Gut* 2005;54:1782-9.
- [6] Gordon KB, Macrae IM, Carswell HV. Effects of 17beta-oestradiol on cerebral ischaemic damage and lipid peroxidation. *Brain Res* 2005;1036:155-62.
- [7] Bhat HK, Calaf G, Hei TK, Loya T, Vadgama JV. Critical role of oxidative stress in estrogen-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3913-8.
- [8] Prokai-Tatrai K, Prokai L. Impact of metabolism on the safety of estrogen therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1052:243-57.
- [9] Akhter S, Shamsuzzaman AK, Banarjee M, Seema SA, Deb K. Serum copper in rural women taking combined oral contraceptive. *Mymensingh Med J* 2006;15:25-9.
- [10] Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990;8:281-91.
- [11] Patel RP, Svistunenko D, Wilson MT, Darley-Usmar VM. Reduction of Cu (II) by lipid hydroperoxides: implications for the copper-dependent oxidation of low-density lipoprotein. *aBiochem J* 1997;322:425-33.
- [12] Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U. Effect of different contraceptive methods on the oxidative status in women aged 40–48 years from ELAN study in the province of Liège, Belgium. et al. *Hum Reprod* 2007;22:2335–43.
- [13] Chen JT, Kotani K. Oral Contraceptive Therapy Increases Oxidative Stress in Pre-Menopausal Women; *International Journal of Preventive Medicine* 2012;3:893-896
- [14] Finco A, Belcaro G, Cesarone MR. Assessment of the activity of an oral contraceptive on the levels of oxidative stress and changes in oxidative stress after co-treatment with two different types of physiological modulators with antioxidant action *Contraception* 2011;84:418-422
- [15] De Groote D, Perrier d'Hauterive S, Pintiaux A, et al. Effect of oral contraception with ethylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18–35 years old. *Contraception* 2009;80:187–93.
- [16] Subakir SS, Madjid A, Sabariah S, Affandi S. Oxidative stress, vitamin E and progestin breakthrough Bleeding; *Human Reproduction* 2000;15:18-23

5.10

ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI O AUMENTO DELLA BIODISPONIBILITÀ DEI METALLI



Vari studi hanno dimostrato che molti metalli subiscono reazioni cicliche redox e possiedono la capacità di produrre radicali reattivi quali, tipicamente, l'anione di superossido e l'ossido nitrico nei sistemi biologici. La disfunzione dell'omeostasi di ioni metallici può condurre allo stress ossidativo. Per approfondire il legame stress ossidativo-metalli si consigliano le review di *Jamova et al. 2011* [1] e *Valko et al. 2005* [2] da cui derivano le informazioni qui riportate. Lo stato di redox della cellula è prevalentemente dipendente dalla coppia redox Fe^{2+}/Fe^{3+} , i cui livelli sono attentamente controllati. I

meccanismi omeostatici impediscono l'assorbimento eccessivo del ferro nell'intestino e regolano la velocità di rilascio del ferro. Il ferro cellulare che non viene utilizzato da altre ferroproteine si accumula nella ferritina, tuttavia la sua capacità di legare ferro è limitata, quindi vi è la possibilità di avere del ferro libero. Tra le cause di sovraccarico di ferro vi è, per esempio, l'emocromatosi. Gli effetti tossici del ferro libero sono dimostrati dalla sua capacità di catalizzare attraverso la reazione di Fenton la generazione di radicali liberi reattivi dannosi sia nella forma ione ferrico che nella forma ione ferroso, anche se quest'ultima è molto più efficiente. Altra reazione implicata nella generazione di stress ossidativo è la reazione di Haber-Weiss in cui lo ione ferrico catalizza la reazione tra anione superossido e perossido d'idrogeno a formare tra le altre specie il radicale idrossile, uno tra i più potenti ossidanti. Altro metallo importante per il mantenimento dello stato redox cellulare è il rame (coppia redox Cu^+/Cu^{2+}). I meccanismi con cui un'alterazione dei livelli ematici di rame influiscono sullo stato redox sono molteplici. In primo luogo anch'esso è un ottimo catalizzatore della reazione di Fenton. Inoltre formando particolari complessi con i lipidi ne catalizza l'ossidazione. In particolari contesti il rame partecipa a reazioni che portano alla formazione di radicali liberi quali la contemporanea presenza di acido ascorbico, perossido e rame, o il processo di riduzione dello ione rameico ad opera α -tocoferolo. Il rame ha anche un'azione indiretta sull'equilibrio redox influenzando alcuni meccanismi antiossidanti. Il rame, insieme allo zinco, è alla base del funzionamento di alcuni tipi di SOD, per cui una sua diminuzione può comportare una riduzione delle difese antiossidanti. Il rame può anche legarsi permanentemente al GSH interrompendone il ciclo di riduzione-ossidazione inficiando le difese antiossidanti. Tra i metalli pesanti propriamente detti che sono in grado di influenzare l'equilibrio redox abbiamo, il cromo, cobalto, nickel, cadmio, arsenico, mercurio e piombo. Il cromo ha due forme stabili, il Cr^{3+} e il Cr^{6+} , quest'ultimo è generalmente considerato più tossico ed ad alte concentrazioni cancerogeno. Cr^{6+} viene ridotto nella saliva e nel succo gastrico o sequestrato dai batteri nel tratto intestinale; viene ridotto anche nel sangue e nel polmone. Il processo di riduzione dello ione Cr^{6+} a Cr^{3+} comporta la produzione di radicali liberi, ossigeno singoletto e anione superossido, nonché forme intermedie di cromo attive come catalizzatori della reazione di Fenton. Cr^{6+} può anche essere chelato ma solitamente il processo di chelazione libera altri metalli dagli agenti chelanti con tutte le conseguenze del caso. I meccanismi inerenti alla tossicità redox del cobalto non sono molto chiari ma è noto che il Co^{2+} sotto forma di vari complessi in condizioni fisiologiche è in grado di produrre anione superossido e radicali liberi tra cui idrossile. Inoltre è noto che in presenza di SOD è in grado di portare l'ossigeno disciolto a radicale idrossile. Lo stress ossidativo sembra avere un ruolo importante nella carcinogenesi nickel-indotta. A parte come catalizzante della reazione di Fenton non è molto chiaro il meccanismo per cui il nickel induce stress ossidativo ma l'aumento di MDA e radicali idrossilici in presenza di questo metallo oltre al fatto che questi prodotti diminuiscono grazie alla presenza di SOD, GSH o acido ascorbico confermano la sua influenza sull'equilibrio redox. Sembra inoltre che possa legarsi irreversibilmente al GSH inattivandolo. Per quanto riguarda il cadmio esso non è in grado di generare direttamente radicali liberi, tuttavia è nota la generazione indiretta di vari radicali che coinvolgono il radicale superossido, il radicale idrossile e l'ossido nitrico. In animali esposti al cadmio si è osservato un aumento della MDA e dei lipoperossidi oltre che dell'attività della GPX e una riduzione dell'attività della SOD. Altro meccanismo proposto è la possibilità che

il cadmio sostituisca ferro e rame nelle rispettive sedi aumentando la porzione libera di questi metalli con le conseguenze sopra descritte. La generazione di ossigeno reattivo attraverso l'azione dell'arsenico comprende la generazione di superossido, ossigeno singoletto, radicale perossile (ROO), ossido nitrico, perossido di idrogeno, perossido dimetilarsinico radicali, $(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}^\bullet$) e anche il radicale dimetilarsinico, $(\text{CH}_3)_2\text{As}^\bullet$. L'esatto meccanismo responsabile della generazione di tutte queste specie reattive non è ancora chiaro, ma alcuni studi hanno proposto la formazione di specie di arsina come intermedio. Diversi studi in vivo e in vitro suggeriscono che l'esposizione di animali a forme inorganiche o organiche di mercurio induca stress ossidativo. L'elevata affinità degli ioni mercurici per i gruppi tiolici suggerisce la possibilità di denaturazione di varie molecole, in particolare del glutatione, che direttamente o indirettamente, provochi o predisponga allo stress ossidativo. È stato osservato che la somministrazione di mercurio come Hg^{2+} nei ratti ha determinato l'esaurimento del glutatione e una maggiore formazione di H_2O_2 e della perossidazione dei lipidi nei mitocondri renali. Per quanto riguarda il metilmercurio i mitocondri sono il primo obiettivo della sua tossicità e il meccanismo di trasporto elettronico mitocondriale è il sito più probabile in cui si crea un eccesso di ROS in grado di indurre lo stress ossidativo nell'avvelenamento da metilmercurio. La somministrazione di cloruro di mercurio ai ratti ha riportato una marcata diminuzione nell'attività di superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi e glutatione disulfide reduttasi nella corteccia renale. Anche se in altri tessuti, come per esempio nel testicolo, si ha avuto un aumento dell'attività antiossidante, quest'ultimo fenomeno potrebbe essere un tentativo di adattamento protettivo. Si è scoperto inoltre che il mercurio inorganico può aumentare la capacità di altri reagenti di indurre la perossidazione lipidica. L'effetto patogenetico del piombo è multifattoriale in quanto interrompe direttamente l'attività degli enzimi, inibisce competitivamente l'assorbimento di importanti minerali e interferisce col sistema antiossidante. I danni causati dai radicali liberi derivanti dal piombo sono compiuti da due meccanismi indipendenti, sebbene correlati. Il primo riguarda la formazione diretta di ROS, compreso l'ossigeno singoletto, i perossidi di idrogeno e gli idroperossidi e il secondo meccanismo si ottiene mediante l'esaurimento della capacità antiossidante cellulare. Esistono interrelazioni tra questi due meccanismi in modo che l'aumento della ROS da un lato conduca contemporaneamente all'esaurimento capacità antiossidante dall'altra. L'effetto principale del piombo è sul metabolismo del glutatione. Un organismo esposto al piombo ha i livelli di glutatione significativamente abbassati rispetto ai gruppi di controllo. Esistono due enzimi specifici, la glutatione reduttasi e l'acido deltaaminolevulinico deidrogenasi (ALAD), entrambi inibiti dal piombo. È stata osservata una correlazione diretta tra i livelli di piombo nel sangue, l'attività di ALAD e i livelli di MDA negli eritociti di lavoratori esposti al piombo. L'inibizione dell'ALAD da parte del piombo aumenta i livelli del substrato acido delta-aminolevulinico (ALAD) che è noto per stimolare la formazione di ROS sostenuta dai livelli elevati di MDA.

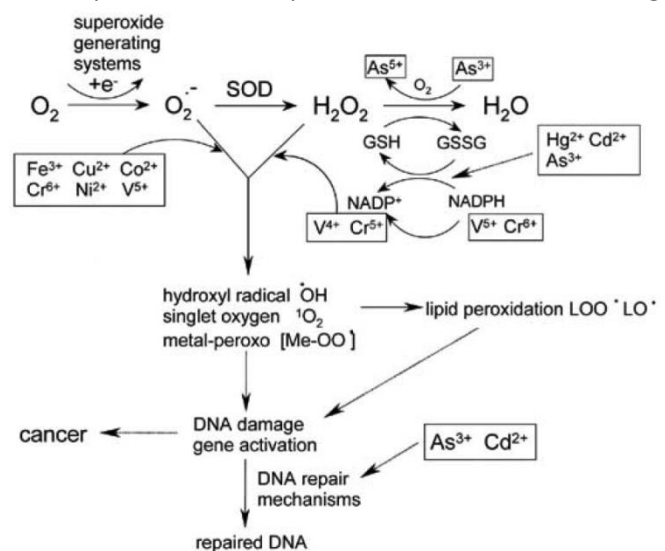


Figura 1: Breve riepilogo dei principali processi interferiti da metalli, immagine da Valko et al. 2005 [2]

È stata osservata una correlazione diretta tra i livelli di piombo nel sangue, l'attività di ALAD e i livelli di MDA negli eritociti di lavoratori esposti al piombo. L'inibizione dell'ALAD da parte del piombo aumenta i livelli del substrato acido delta-aminolevulinico (ALAD) che è noto per stimolare la formazione di ROS sostenuta dai livelli elevati di MDA.

[1] Jomovaa K, Valkob M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 2011;283:65–87

[2] Valko M, Morris H, Cronin MTT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. Current Medicinal Chemistry 2005;12: 1161-1208

5.11 ESPOSIZIONE A PESTICIDI



Il termine "pesticidi" è un nome generale che comprende molte sostanze chimiche, principalmente classificabili come insetticidi o erbicidi. I radicali liberi svolgono un ruolo importante nella tossicità dei pesticidi e delle sostanze chimiche ambientali. I pesticidi possono indurre lo stress ossidativo, portando alla generazione di radicali liberi o/e ad alterazione degli antiossidanti, del sistema enzimatico e della perossidazione dei lipidi [1][2]. Gli erbicidi bipiridili sono veleni sistemici molto potenti. Questi erbicidi sono utilizzati in tutto il mondo come erbicidi di contatto e come

essiccanti di colture su prodotti come il cotone. Bipiridile significa che la struttura contiene due anelli di piridina, anelli aromatici in cui un atomo di carbonio è sostituito da un atomo di azoto accoppiato ad un gruppo etilenico [3]. Il meccanismo di base dello stress ossidativo coinvolgente i bipiridili è semplice e coinvolge un processo di ossidazione/ riduzione ciclica. In primo luogo, subiscono una riduzione da parte di NADPH per formare radicali liberi che donano il loro elettrone a O_2 , producendo un anione superossido; dopo l'esaurimento di NADPH, il superossido reagisce con se stesso e produce radicali liberi dell'idrossilato che portano alla morte cellulare [4]. L'organo che è prevalentemente coinvolto è il polmone, esso subisce una lesione bifasica dopo l'esposizione all'erbicida. La fase distruttiva, caratterizzata dalla distruzione dell'epitelio alveolare, risulta come conseguenza del ciclo redox. Gli effetti dannosi dell'erbicida sul tessuto polmonare in vivo e sulle cellule polmonari isolate sono notevolmente potenziati a concentrazioni di ossigeno elevate, fornendo ulteriore prova di quanto finora detto [3][5]. Le piretrine sono insetticidi naturali derivanti dal *Chrysanthemum cinerariifolium* giallo e dal *Tanacetum cinerariifolium* e sono tra i più antichi insetticidi noti [6]. Inoltre sono stati prodotti numerosi derivati sintetici noti come piretroidi, con una maggiore stabilità chimica rispetto alle piretrine naturali. Diversi studi hanno indicato che i piretroidi inducono lo stress ossidativo. Tracce di questo sono evidenti in molti organi, tessuti e cellule, come il fegato, il cervello, il rene e gli eritrociti. Il contenuto aumentato degli enzimi antiossidanti, come la SOD e la GPX negli eritrociti è probabilmente una risposta adattiva iniziale a un aumento dello stress ossidativo [7][8][9]. Gli organofosfati sono sostanze chimiche che inibiscono la colinesterasi, usate prevalentemente come pesticidi, essi comprendono tutti gli insetticidi contenenti fosforo derivato da acido fosforico e sono generalmente tra i più tossici di tutti i pesticidi. È stato dimostrato che lo stress ossidativo può indotto da organofosfati negli esseri umani [10]. La perossidazione lipidica è evidente nei tessuti cerebrali [11] e negli eritrociti umani [12]. È stato inoltre dimostrato che la necrosi tubulare acuta che accompagna la tossicità degli organofosfati è correlata a ROS e perossidazione lipidica [13]. Gli organoclorurati sono insetticidi che contengono carbonio, cloro e idrogeno. Sono anche chiamati idrocarburi clorurati, insetticidi clorurati e sintetici clorurati. Tra di essi abbiamo i sempre più rari DDT e ciclodiene, e l'esaclorocicloesano. La perossidazione lipidica è stata proposta come un importante meccanismo molecolare coinvolto nella lesione tissutale indotta dall'esaclorocicloesano. Molti studi hanno mostrato l'effetto ossidativo del esaclorocicloesano nei vari organi dei mammiferi, come il sangue del ratto [14], il cervello [15], i testicoli [16] e il fegato [14]; tutti questi effetti erano duraturi e dipendenti dall'età. Generalmente è risultata aumentare la perossidazione dei lipidi, accoppiata con alterati livelli di GSH e degli enzimi antiossidanti.

[1] Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): RA141-147

[2] Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999; 107: 33-47

[3] Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Williams & Wilkins, Maryland, 1997; 1614-63

[4] Smith LL. Mechanism of paraquat toxicology in lung and its relevance to treatment. *Hum Exp Toxicol* 1978;6:31-36

[5] Jones GM, Vale JA. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2000;38: 123-28

[6] Dorman D, Beasley V. Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. *Vet Hum Toxicol*, 1991; 33: 238-43

- [7] Gupta A. Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats. *J Appl Toxicol*, 1999;19: 67–72
- [8] Giray B. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett* 2001;118:139–46
- [9] Kale M, Rathore N, John S, Bhathagar D: Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alteration in antioxidant status in rat erythrocytes. A possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 1999; 105: 197–205
- [10] Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M: Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 179–82
- [11] Verma RS. Chlorpyrifos-induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain. *Indian J Exp Biol* 2001;39:174–77
- [12] Gultekin F: The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch Toxicol* 2000;74:533–538
- [13] Poovala VS, Huang H, Salahudeen AK: Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-induced renal tubular cytotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 1746–52
- [14] Simon-Giavarotti KA. Enhancement of lindane-induced liver oxidative stress and hepatotoxicity by thyroid hormone is reduced by gadolinium chloride. *Free Radic Res* 2002;36:1033–39
- [15] Sahoo A. Acute hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in rat cerebral hemisphere. *Neurochem Res*, 1998;23:1079–84
- [16] Samanta L. Age-related differences of hexachlorocyclohexane effect on hepatic oxidative stress parameters of chicks. *Indian J Exp Biol* 1997;35:457–61

5.12

ESPOSIZIONE ALL'INQUINAMENTO DELL'ARIA



A riguardo dello stress da inquinamento atmosferico, riferito particolarmente ai prodotti da combustione riporto la traduzione di un paragrafo dell'ottima review di *Lodovici & Bigagli 2010* [1] che ottimamente riassume i processi alla base dell'influenza di tale inquinamento sull'equilibrio redox. Nota: la numerazione della bibliografia è stata adattata.

“Particolato e gas inquinanti sono considerati i fattori d'inquinamento più importanti nelle aree urbane e sono stati ipotizzati diversi meccanismi per spiegare gli effetti negativi sulla salute nell'uomo, soprattutto nel sistema cardiopolmonare [2]. Anche se ogni inquinante può esercitare una propria tossicità specifica nei sistemi respiratori e cardiovascolari, l'ozono, gli ossidi di azoto e i particolati sospesi dispongono di una proprietà comune di essere potenti ossidanti, sia attraverso effetti diretti sui lipidi e sulle proteine o indirettamente attraverso l'attivazione di percorsi di ossidazione intracellulare [3][4][5]. I ROS possono essere generati sulla superficie di particelle in cui si adsorbono idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e nitro-PAH, oltre che i metalli di transizione (ferro, rame, cromo e vanadio) che catalizzano la reazione di Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}_3^{+} + \text{OH}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$) generando il radicale idrossilico fortemente reattivo in grado di indurre un danno ossidativo del DNA [6][7]. Diversi studi hanno dimostrato che il ferro e altri metalli di transizione che si trovano nelle particelle o la loro presenza sulle superfici svolgono un ruolo nella generazione di ROS nei sistemi biologici [8]. Le particelle connesse al benzo(a)pirene è stato dimostrato essere biodisponibili e possono indurre danni ossidativi del DNA negli organi bersaglio sistemici, compresi il polmone e il rene [9][10]. Inoltre, va osservato che l'ozono e le anidridi dell'azoto sono solitamente presenti insieme alle particelle nell'aria ambiente, anch'essi sono ossidanti con effetti potenziali in termini di danni ossidativi del DNA. Allo stesso modo, composti volatili, come il benzene, nell'inquinamento atmosferico urbano, possono indurre l'ossidazione del DNA [11][12]. Inoltre, gli ossidanti fotosensibili (ozono e perossiacetil nitrato), ossia gli inquinanti secondari formati dall'azione della luce solare su un'atmosfera contenente idrocarburi reattivi e NO_x , contribuiscono ad aumentare lo stress da ossidazione [13]. Quindi, in presenza di elevata formazione di ROS, si verificano danni mitocondriali con induzione di isoforme NADPH ossidasi 4 (NOX4), insieme ad un'attivazione di cellule infiammatorie (neutrofili, eosinofili e monociti) e un maggior numero di macrofagi in grado di generare ROS e RNS [14][15][16]. Inizialmente, quando lo stress ossidativo è relativamente basso, diversi fattori di trascrizione, come il fattore nucleare eritroide-2 (Nrf2), inducono l'attivazione di una serie di enzimi antiossidanti e di disintossicazione (ad es. CAT, SOD e glutatione S-transferasi) che contrastano la formazione di ROS proteggendo da esiti biologici avversi [17][18]. Nella seconda fase, se la risposta protettiva antiossidante non riesce o è inadeguata per affrontare l'aumento della produzione di ROS, il risultato è una situazione proinfiammatoria con vari effetti citotossici. Questi effetti sono mediati dalle cascate della proteina-attivata mitocromatica (MAPK) e di NF- κ B, responsabili dell'espressione di citochine, e altre molecole coinvolte nei processi infiammatori [19].”

[1] Lodovici M, Bigagli E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure; Journal of Toxicology Volume 2011, Article ID 487074.

[2] Schnelle-Kreis J, Kupper U, Sklorz M et al., Daily measurement of organic compounds in ambient particulate matter in Augsburg, Germany: new aspects on aerosol sources and aerosol related health effects. Biomarkers 2009;14:39–44, 2009.

[3] Møller P, Loft S. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. Environmental Health Perspectives 2010;118:1126–1136.

[4] Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. Journal of Environmental Science and Health C 2008;26:339–362.

[5] Jeng HA. Chemical composition of ambient particulate matter and redox activity. American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology 2007;293:170–181.

[6] Andersson H, Piras E, Demma J, Hellman B. Low levels of the air pollutant 1-nitropyrene induce DNA damage, increased levels of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells. Toxicology 2009;262:57–64.

- [7] Park JH, Troxel AB, Harvey RG, Penning TM. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology* 2006;19:719–728.
- [8] Ghio AJ, Richards JH, Carter JD, Madden MC. Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicologic Pathology* 2000;28:619–627.
- [9] Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Tesfaigzi Y, Dahl AR. Respiratory epithelial penetration and clearance of particle-borne benzo[a]pyrene. *Research Report* 2001;101:5–27.
- [10] Kim KB, Lee BM. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Letters* 1997;113:205–212.
- [11] Uzma N, Kumar SS, Hazari MAH. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *American Journal of Industrial Medicine* 2010;53:1264–1270.
- [12] Sørensen M, Skov H, Autrup H, Hertel O, Loft S. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage. *Science of the Total Environment* 2003;309:69–80.
- [13] Liu HH, Wu YC, Chen HL. Production of ozone and reactive oxygen species after welding. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2007;53:513–518.
- [14] Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V et al. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology* 2003;285:L671–L679
- [15] Li N, Sioutas C, Cho A et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives* 2003;111:455–460.
- [16] Amara N, Bachoual R, Desmard M et al. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redoxdependent mechanism. *American Journal of Physiology* 2007;293:L170–L181
- [17] Kang KW, Lee SJ, Kim SG. Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2005;7:1664–1673.
- [18] Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 2009;34:176–188.
- [19] Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 2009;78:539–552.

5.13 CONDIZIONI LAVORATIVE



Nella valutazione dell'equilibrio redox un ruolo importante viene svolto dalle condizioni lavorative del soggetto. Le modalità con cui queste influiscono sullo stress ossidativo sono le più disparate possibili e spesso includono alcuni dei fattori finora trattati, per esempio esposizione a metalli pesanti o pesticidi, per cui non si entrerà nel dettaglio delle varie dinamiche. La tabella seguente vuole essere un esempio dell'importanza del considerare anche questo aspetto nella valutazione dello stress ossidativo.

Rif. Bibliografico	Principali considerazioni	
H&D test		
<i>Costa et al 2016 [1]</i>	Benzinai	L'esposizione al benzene aumenta significativamente il valore di d-ROMs
<i>Gozzo et al. 2005 [2]</i>	Lavoratori del travertino	Si è osservato un forte aumento dei valori di d-ROMs e una diminuzione della GPX nella popolazione presa in esame rispetto al gruppo controllo (lavoratori n= 37, gruppo controllo n=67)
<i>Flore et al 2004 [3]</i>	Lavoratori sottoposti a lunghi periodi in piedi	È stato analizzato il valore di d-ROMs prima e dopo il turno lavorativo a degli infermieri in sala chirurgica, rispetto ad un gruppo di lavoratori sedentari, si è visto che in quest'ultimi in valore di d-ROMs non è variato, 254 ± 67 vs 263 ± 63 U.Carr , mentre negli infermieri è statisticamente aumentato, 285 ± 69 vs 338 ± 82 . (infermieri n = 62, gruppo controllo n=65)
<i>Liotti et al. 2000 [4]</i>	Lavoratori esposti a polveri	Si è confrontato il valore di d-ROMs di lavoratori esposti a polveri, di soggetti affetti da malattia polmonare ostruttiva cronica e un gruppo controllo; si è trovato un aumento di d-ROMs nel 40% e 60% dei casi rispetto al gruppo controllo (n=14, n=11, n=38 rispettivamente)
Altro		
<i>Singh et al 2013 [5]</i>	Lavoratori esposti al piombo	Si è osservato un aumento della concentrazione di MDA.
<i>Sauvain et al. 2011 [6]</i>	Autisti di bus	Si è osservato un aumento del 8-OHdG nell'urina.
<i>Kim et al. 2011 [7]</i>	Lavoratori esposti a composti organici volatili	Si è osservato nei soggetti esposti un aumento della MDA (danno ossidativo dei lipidi) ma non del 8-OHdG (danno ossidativo del DNA).

<i>Ogu et al 2011 [8]</i>	Agricoltori esposti a pesticidi	Nei soggetti esposti sono aumentati i marker di lipoperossidazione e l'attività degli enzimi SOD e CAT (sintomo di sistema antiossidante stimolato)
<i>Uzma et al. 2010 [9]</i>	Lavoratori esposti al benzene	Si è osservato un aumento significativo dei valori di ROS e MDA nel sangue e nelle urine dei soggetti esposti contemporaneamente ad un abbassamento dei livelli di GSH e SOD
<i>Moro et al 2010 [10]</i>	Lavoratori esposti a vernici	Si è osservato che MDA e attività enzimatica antiossidante (SOD e CAT) sono aumentate nei soggetti esposti, mentre i gruppi tiolici non proteici sono diminuiti
<i>Buyukhatipoglu et al 2010 [11]</i>	Lavoratori sanitari con lunghi turni di lavoro (16-24 ore)	Sono stati monitorati vari parametri inerenti allo stress ossidativo indicativamente ad inizio e fine turno ed è risultato un aumento dei marker di ossidazione contemporaneo ad una riduzione del potere antiossidante

- [1] Costa C, Ozcaglib E, Gangemi S, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress and role of dietary factors in gasoline station attendants. *Food and Chemical Toxicology* 2016;90:30-35
- [2] Gozzo ML, Callà C, Colacicco L, Lippa S, De Sole P, Giardina B, Mormile F. Markers of oxidative damage in workers of travertine quarries in Italy. *Biochimica Clinica*. 2005;29 (2): 253.
- [3] Flore R, Gerardino L, Santoliquido A, Pola R, Flex A, Di Campi C, Pola P, Tondi P. Enhanced oxidative stress in workers with a standing occupation. *Occup Environ Med* 2004;61:548-550.
- [4] Liotti F, Maselli R, De Prisco R, Iorio EL, De Seta C, Sannolo N. Oxidant agents in work environment and professional bronchopneumopathies [original title "Agenti ossidanti in ambiente di lavoro e broncopneumopatie professionali"]. Proceedings of the Meeting "Giornate Scientifiche della Facoltà 2000". 17-19 May 2000. Second University of Naples, Naples, Italy. 2000. P. 555-556.
- [5] Singh Z, Chadha P, Sharma S. Evaluation of Oxidative Stress and Genotoxicity in Battery Manufacturing Workers Occupationally Exposed to Lead. *Toxicol Int* 2013; 20(1): 95-100.
- [6] Sauvain JJ, Setyan A, Wild P, Tacchini P, Lagger G, Storti F, Deslarzes S, Guillemin M, Rossi MJ, Riediker M. Biomarkers of oxidative stress and its association with the urinary reducing capacity in bus maintenance workers. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2011;6:18.
- [7] Kim JH, Moon JY, Park EY, et al. Changes in Oxidative Stress Biomarker and Gene Expression Levels in Workers Exposed to Volatile Organic Compounds. *Industrial Health* 2011;49:8-14
- [8] Ogu S, Gultekin F, Nesimi Kisioglu F, Kucukoner E. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicology and Industrial Health* 2011;27(9):820-825
- [9] Uzma N, Kumar BS, Hazari MAH. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *American journal of industrial medicine* 2010;53:1264-1270
- [10] Moro A, Mariele C, Brucker N, et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Science of the total environment* 2010;408:4461-4467
- [11] Hakan B, Idris K, Mehmet V, et al. Oxidative Stress Increased in Healthcare Workers Working 24-Hour On-Call Shifts. *The American journal of the medical* 2010;340:462-467

5.14 USO DI STUPEFACENTI



I cannabinoidi sono costituenti attivi della marijuana, la droga ricreativa più comunemente utilizzata in tutto il mondo. I cannabinoidi possono generare radicali liberi che possono alterare il funzionamento del sistema nervoso centrale e periferico. La componente fondamentale della marijuana nota per esercitare effetti psicologici nei fumatori conosciuto come delta-9-tetraidrocannabinolo (THC) [1]. La generazione di ROS è spesso associata a rotture di DNA indotte da THC [1]. L'eossidazione del legame 9,10-alchene da THC è il meccanismo proposto di danno del DNA e l'alchilazione del DNA mediante epossidi genera contemporaneamente ROS [2][3]. Uno studio di *Sarafian et al. 1999* [4] ha dimostrato significativi incrementi dose-dipendenti della produzione di ROS in vitro indotti da fumo di marijuana contenente THC, che si manifestato con livelli di nitrato più elevati rispetto ai controlli. Inoltre, il fumo di sigaretta privo di THC non ha generato un aumento del ROS comparabile, indicando che l'aumentata produzione ROS dipende dalla componente THC del fumo di marijuana. Inoltre, sempre secondo *Sarafian et al. 1999*, studi precedenti hanno dimostrato che l'esposizione cronica della marijuana provoca una continua diminuzione dei sistemi antiossidanti GSH-dipendenti e provoca apoptosi necrotica [4]. Gli antiossidanti come la vitamina E hanno dimostrato di prevenire la neurotossicità indotta da THC, in particolare la morte cellulare neuronale. [1]



La cocaina è una sostanza stupefacente che agisce come potente stimolante del sistema nervoso centrale, vasocostrittore e anestetico. La cocaina è un alcaloide di origine vegetale. Il percorso ossidativo della cocaina produce diversi metaboliti che innescano un maggiore grado di perossidazione lipidica rispetto alla cocaina stessa, con cicli di riduzione simultanea e produzione di stress ossidativo e radicali perossilici lipidici. La formaldeide è uno dei molti metaboliti ossidativi della cocaina descritti nella generazione di ROS. La norcocaina è un altro metabolita della cocaina che, dopo l'ossidazione, viene ulteriormente metabolizzato in nitrossido. Lo stress ossidativo risultante porta ad esaurimento delle riserve di GSH [5][6][7]. L'esposizione acuta aumenta GSSG mentre diminuisce GSH con esposizione cronica [8]. Inoltre è stato osservato aumento della produzione di citochine infiammatorie e dell'espressione di TNF-alfa e NF-kappa B [9]. L'apoptosi indotta da ROS è stata associata anche all'uso di cocaina[10]. Alcuni antiossidanti, quali i tioli, sono stati efficacemente provati per prevenire l'apoptosi indotta da cocaina, fornendo un ulteriore prova di quanto finora detto. [11]

[1] Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR. Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Neurosci* 1998;18:5322–5332.

[2] Marimatsu S, Watanabe K, Matsunaga T, Yamamoto I, Imaoka S, Funae Y. Cytochrome P450 isozymes involved in the oxidative metabolism of delta-9-tetrahydrocannabinol by liver microsomes of adult female rats. *Drug Metab Dispos* 1992;20:79–83.

[3] Kovacic P, Osuna JA. Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer. *Curr Pharm Des* 2000;6:277–309.

[4] Sarafian TA, Magallanes JA, Shau H, Tashkin D, Roth MD. Oxidative stress produced by marijuana smoke. An adverse effect enhanced by cannabinoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1286–1293.

[5] Kovacic P. Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses* 2005;65:90–96.

[6] Zimmerman EF, Potturi RB, Resnick E, Fisher JE. Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice. *Teratology* 1994;49:192–201.

[7] Lloyd RV, Shuster L, Mason RP. Reexamination of the microsomal transformation of N-hydroxynorcocaine to norcocaine nitroxide. *Mol Pharmacol* 1993;43:645–648

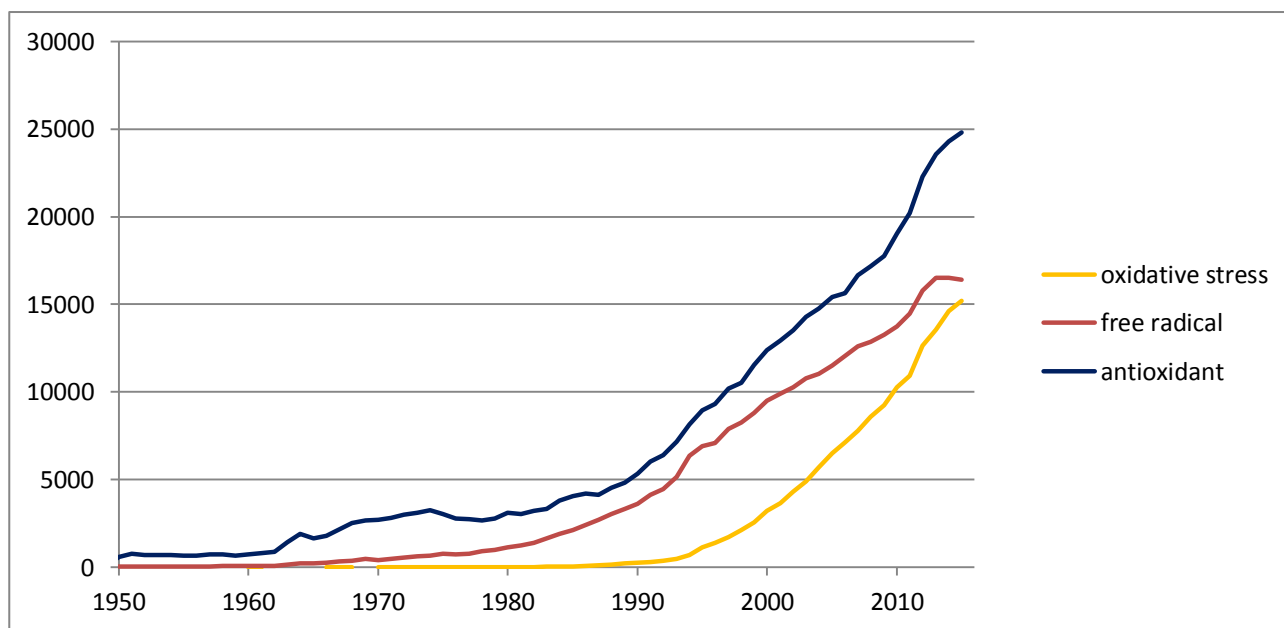
[8] Lipton JW, Gyawali S, Borys ED, Koprach JB, Ptaszny M, McGuire SO. Prenatal cocaine administration increases glutathione and alpha-tocopherol oxidation in fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2003;147:77–84.

- [9] Lee YW, Hennig B, Fiala M, Kim KS, Toborek M: Cocaine activates redoxregulated transcription factors and induces TNF-alpha expression in human brain endothelial cells. *Brain Res* 2001;920:125–133.
- [10] Zhang L, Xiao Y, He J. Cocaine and apoptosis in myocardial cells. *Anat Rec* 1999;257:208–216.
- [11] Zaragoza A, Diez-Fernandez C, Alvarez AM, Andres D, Cascales M: Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of N-acetylcysteine and deferoxamine. *Br J Pharmacol* 2001;132:1063–1070

6

IMPLICAZIONI DELLO STRESS OSSIDATIVO IN DIVERSI AMBITI MEDICI

In quest'ultimo capitolo saranno descritte le implicazioni dello stress ossidativo in alcuni dei principali ambiti medici specifici. L'interesse intorno a questo argomento è decisamente vasto ed è cresciuto esponenzialmente negli anni. Basti pensare che utilizzando il noto motore di ricerca specialistico PubMed si hanno circa 165.000 riscontri per *oxidative stress*, oltre 300.000 per *free radical* e quasi 500.000 per *antioxidant*, di cui circa 15.000 per *antioxidant supplementetion*. Come si può vedere nella figura proposta nonostante lo stress ossidativo sia noto da circa 70 anni, i primi lavori di Harman D. sono degli anni '50 del secolo scorso, l'interesse per questi ambiti di ricerca è esploso negli anni '90 e non si più placato rimanendo tuttora molto attuale. Per esigenze tecniche troppo si è dovuto fare una scelta di quali ambiti proporre. I criteri di questa scelta sono stati essenzialmente due, in primo luogo si è scelto di descrivere quelle situazioni che di per sé non sono patologiche, come i primi mesi di vita o la vecchiaia, ma che per tutta una serie di motivi che verranno descritti hanno un impatto importante sull'equilibrio redox mentre l'altro criterio è l'importanza dello stress ossidativo in quel particolare ambito, perché è vero esso è presente nella maggioranza dei meccanismi fisiopatologici ma in alcune situazioni cliniche l'impatto è decisamente più importante. Gli ambiti trattati non vogliono considerarsi esaustivi ma solo un ampio scorcio sulla problematica dello stress ossidativo.



Numero di pubblicazioni scientifiche per anno nell'intervallo 1950-2015 rilevate mediante motore di ricerca PubMed

6.1 NEONATOLOGIA

Un ruolo centrale nella vita perinatale è rappresentato dalla sensibilità neonatale alle patologie connesse con la presenza di radicali liberi che includono displasia broncopolmonare, retinopatia del prematuro, enterocolite necrotizzante e l'emorragia intraventricolare, sepsi, lesioni, danni cerebrali [1-9]. Anche se ci sono diverse eziologie per le lesioni nel periodo neonatale i radicali liberi sono in gran parte riconosciuti come la principale causa di danni [10][11]. È sempre più evidente che lo stress ossidativo è il punto finale di una comune e complessa convergenza di eventi, alcuni determinati geneticamente e alcuni innescato da fattori di stress in utero [12-15]. Le relazioni tra produzione di radicali liberi e danni ai tessuti sono molto complesse nel periodo perinatale. Finora la ricerca si è soffermata principalmente sulla porzione ossidante dello status ossidativo tant'è che per quanto riguarda i valori normali di d-ROMs nei neonati esiste una discreta letteratura, descritta in tabella 1, mentre per quanto riguarda i valori di antiossidanti, abbiamo meno informazioni. L'unico studio in cui sono presenti dati riguardanti il BAP derivano da uno studio sull'uso di un antiossidante su neonati e prima del trattamento viene misurato un BAP di $3354 \pm 990 \mu\text{mol/l}$ nel gruppo controllo di 47 neonati e $2361 \pm 466 \mu\text{mol/l}$ nel gruppo trattato di 103 neonati. [16]

popolazione	numerosità	valore in U.Carr mean \pm SD	rif. bibl.
neonati a termine, analisi entro 78 ore dalla nascita	98	127 \pm 39	Parmigiani et al. [17]
neonati a termine entro 30 giorni dalla nascita	64	74 \pm 33	Iamele et al. [18]
neonati a termine prelievo da cordone ombelicale	80	115 \pm 26	Parmigiani et al. [19]
neonati a termine prelievo da cordone ombelicale	9	101 \pm 27	Dani et al. [20]
neonati prematuri, gestazione 27-36 settimane, prelievo da vena ombelicale dopo il clampaggio del cordone	16	48 \pm 7	Boncore et al. [21]
neonati prematuri, gestazione 27-36 settimane, prelievo da vena ombelicale dopo il clampaggio del cordone	15	46 \pm 22	Boncore et al. [22]

Tabella 1: Dati normali di d-ROMs nei neonati a termini e prematuri

È evidente il fatto che i neonati presentano un valore di d-ROMs decisamente inferiore alla popolazione adulta (250-300 U.Carr) [23] ed è da considerarsi normale un valore di circa 50-150 U.Carr. Evidente è anche l'ulteriore abbassarsi del dato in neonati prematuri rispetto a neonati a termine. Dagli articoli citati non si evincono differenze tra i generi, tra parto vaginale e taglio cesareo o correlazioni col peso alla nascita. Le cause di questa differenza di livelli di perossidi nel plasma dei neonati rispetto al plasma degli adulti non è ancora ben chiara. Probabilmente si tratta dell'effetto di più concause ma sono ipotizzabili due motivazioni prevalenti. Tra le principali cause potrebbe esserci uno scarso apporto alla concentrazione totale da parte dei ROS prodotti in concomitanza della produzione di ATP e la scarsa esposizione all'ossigeno. Infatti il livelli di ATP nel neonato sono piuttosto bassi e la pressione parziale di ossigeno intrauterina è circa 4-5 volte minore di quella extrauterina. [22] Un'altra ipotesi coinvolge invece l'azione dei leucociti polimorfonucleati (PMN), altra importante fonte di ROS. Già il fatto che il sistema immunitario del neonato non sia ancora stato sufficientemente formato e sollecitato potrebbe spiegare bassi livelli di

ROS ma sicuramente la spiegazione non è così semplice. Da alcuni studi in vitro sembra che PMN derivanti da pazienti adulti abbiano una velocità di produzione di ione superossido uguale a quelli derivanti da neonato, ma ci sono indizi che indicano una diversa reattività degli stessi. In particolare sebbene la reattività sia la stessa nei confronti della stimolazione con forbole miristato acetato, essa è minore nei PMN da neonato nei confronti dei poliliposaccaridi, un fattore associato infezioni batteriche da gram-negativi. Questa diversità di reazione è tanto più marcata nei neonati pretermine che non a termine [24][25]. Tra l'altro queste ipotesi sono applicabili anche all'osservazione di valori più bassi nei neonati pretermine.

Per quanto riguarda gli antiossidanti non abbiamo studi con valori BAP/PAT ma esiste una letteratura piuttosto ampia su cui val la pena spendere due parole. In linea generale occorre dire che la capacità antiossidante (misurata col metodo ABTS) nei neonati e negli adulti non è significativamente diversa mentre lo è rispetto a neonati pretermine, in quest'ultimi è risultata più bassa. Le differenze tra neonati a termini ed adulti sono perlopiù a livello di composizione, ossia si hanno livelli più elevati di acido ascorbico ma meno elevati di urati, α -tocoferolo ed albumina, ma già a 5 giorni dalla nascita queste differenze tendono ad appiattirsi [26]. Queste differenze sembrano imputabili alle proprietà di trasferimento della placenta. Per esempio essa non è molto permeabile agli antiossidanti liposolubili, e quindi vi è una bassa concentrazione di tocoferoli nel feto, al quale arrivano attraverso il cordone ombelicale. [27]. Nonostante questa apparente similitudine tra capacità antiossidante nell'adulto e nel neonato si ha che il neonato rimane comunque molto suscettibile a patologie correlate con lo stress ossidativo. Evidentemente esistono differenze più profonde che giustificano una minore capacità di compensazione in situazioni di stress ossidativo nei neonati. Un esempio è carenza di ceruloplasmina [6] nei neonati con conseguente aumento del ferro non-eme plasmatico provato anche da un contestuale aumento della ferritina e della ferrotransferrina [28]. Questa sovrabbondanza di ferro può più facilmente dare vita a ROS secondo la reazione di Fenton. Accertata, invece, è la maggior suscettibilità dei neonati pretermine allo sviluppo di stress per tutta una serie di cause varie legate per lo più all'inefficienza della rete antiossidante che non ad una aumentata produzione di ROS. Si è osservato che in neonati pretermine le concentrazioni di albumina, vitamina E ed urati sono minori che nei neonati a fine termine e non compensati da una maggiore concentrazione di acido ascorbico [26] [27]. Queste differenze potrebbero essere spiegate dal fatto che nell'ultimo 15% della gestazione che la maggioranza degli antiossidanti aumenta considerevolmente la sua concentrazioni, anche del 150%, specialmente quelli di natura enzimatica come SOD, CAT e GPX [9]. Alcuni studi mostrano una correlazione della capacità antiossidante del plasma col peso del neonato, non è però chiaro del tutto se c'è casualità in questo fatto, ossia non si è pienamente capito se è il peso che influenza la capacità antiossidante o più semplicemente il fenomeno dipende dal fatto che un neonato pretermine pesa mediamente meno [28]. Un'ulteriore causa della sensibilità dei neonati pretermine allo stress ossidativo sembra risiedere nella incapacità di modulare la concentrazione di antiossidanti in risposta ad uno stimolo di tipo ossidativo. [29]

	ipossia	non ipossia	
alla nascita	226±7	48±7	[21]
alla nascita	173±94	46±22	[22]

Tabella 2: Valori d-ROMs nel plasma di cordone ombelicale di neonati con ipossia e senza ipossia negli studi di Boncore

Studi in vitro su eritrociti derivanti da neonati pretermine e da adulti ugualmente trattati con fenilidrazina hanno dimostrato che quest'ultimi erano meno soggetti a stress ossidativo. [30/] Esistono quindi numerose prove della sensibilità dei neonati allo stress ossidativo. La principale e più diffusa causa di stress ossidativo nel neonato è l'ipossia su cui sono stati incentrati i due interessanti studi alla base delle informazioni riportate in questo paragrafo *Boncore at all 2000* e *Boncore at all 2002* [21] [22].

Il meccanismo alla base dei danni da insulto ipossico-ischemico comporta una serie di eventi come diminuzione dell'energia intracellulare, diminuiscono in membrana le concentrazioni di Na^+ e K^+ e l'attività dell'ATPasi, aumentano invece la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e la perossidazione dei lipidi di membrana. L'aumento della concentrazione intracellulare di calcio attiva la fosfolipasi A_2 che provoca il rilascio di acido arachidonico e la successiva generazione di radicali liberi attraverso la cicloossigenasi e lipossigenasi, due percorsi metabolici dell'acido arachidonico. Aumenta anche la produzione di NO. L'aumento della degradazione di ATP durante l'ipossia aumenta il substrato per la reazione della xantina ossidasi che porta ad un aumento della generazione di RS. La produzione radicali liberi può verificarsi anche in presenza di ferro libero nei sistemi biologici. Il ferro libero intracellulare può essere rilasciato dalla ferritina in condizioni di decremento dei composti ad alta energia e come più volte sottolineato questo porta alla catalisi della reazione di Fenton. La presenza di ferro libero negli eritrociti e nel plasma dei neonati li rende più suscettibili a questo meccanismo. Un'ulteriore fonte di generazione radicali liberi può essere l'attivazione dei fagociti mediata da reazioni infiammatorie durante l'ipossia. Qualunque sia l'origine, la generazione di radicali liberi espone il neonato prematuro a un sistema antiossidante poco sviluppato al danno ossidativo. Gli studi di Boncore dimostrano l'aumentata generazione di radicali liberi durante l'ipossia. Questo è evidente dalla presenza di significativamente alti livelli dei prodotti di degradazione dell'ATP quali xantina e ipoxantina. Le concentrazioni di perossidi sono significativamente correlate con i livelli plasmatici di ipoxantina e di AOPP (advanced oxidation protein product) un marker di ossidazione delle proteine. Questi dati supportano l'ipotesi che l'ipossia induce una maggiore generazione di radicali liberi nel neonato pretermine.

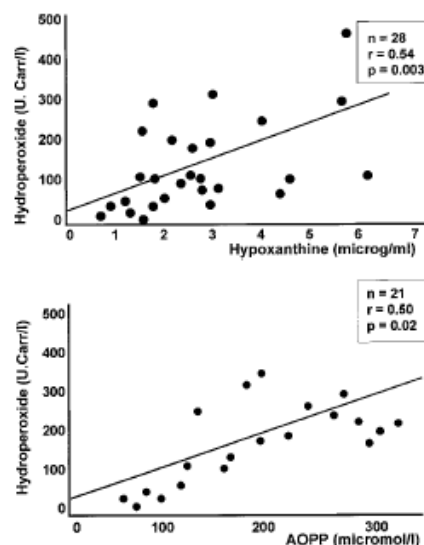


Figura 1: Correlazione tra i livelli di perossidi e ipoxantina e AOPP; immagine rielaborata da Boncore et al 2000 [21]

Data la conclamata importanza dello stress ossidativo nella patogenesi di svariate patologie esiste una discreta letteratura sull'integrazione di antiossidanti enzimatici e non, nel trattamento delle medesime. Si va da studi generalisti come lo studio degli effetti della luteina (β, ϵ -carotene-3,3'-diolo), una xantofilla, di formula $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$, corrispondente a quella del beta carotene con due gruppi ossidrilici negli anelli terminali, in cui si osserva una significativa diminuzione dei valori di d-ROMs e un contestuale aumento dei valori di BAP dopo il trattamento con la stessa [31][16]. Sempre dal punto di vista generalista è stata ipotizzata l'utilità del trattamento con melatonina. La melatonina chimicamente è una indolamina, fisiologicamente è un ormone prodotto dall'epifisi, il cui ruolo principale è regolare il ciclo sonno-veglia ma di cui è provata anche una notevole capacità scavenging specialmente nei confronti del radicale idrossile. La melatonina e i suoi metaboliti interagiscono in modo efficace con le varie specie reattive. È possibile che la terapia antiossidante con melatonina possa essere utile nella gestione dei neonati con patologie stress correlate, anche se ulteriori indagini biochimiche sono richieste per definire la terapia antiossidante più efficace. A favore dell'uso della melatonina vi è anche la sua provata sicurezza anche in dosi farmacologiche. È stato ipotizzato che il trattamento con melatonina potrebbe comportare una vasta gamma di benefici per la salute, il miglioramento della qualità della vita e ridurre le complicanze del periodo neonatale [6]. Alcuni studi più specialistici sono stati sintetizzati in una review pubblicata da Lee & Davis 2011 [9]. Per quanto riguarda la displasia broncopolmonare sono stati studiati gli effetti della somministrazione di antiossidanti esogeni come le vitamine A, E SOD umana ricombinante (rhSOD) in età fetale nel tentativo di impedirne l'insorgenza. Sebbene una meta-analisi suggerisce che la supplementazione con vitamina A riduce la displasia broncopolmonare, i risultati dello sviluppo neurologico e polmonare a 18-22 mesi di età gestazionale non erano significativamente differenti. Studi randomizzati sulla supplementazione di vitamina E non sono riusciti a mostrare una riduzione dell'incidenza di displasia broncopolmonare. Per quanto riguarda la retinopatia del prematuro, la quale sembra correlata ad una sovrapproduzione di NADPH ossidasi dovuta alle fluttuazioni della pressione parziale d'ossigeno a cui è esposto il neonato durante il parto, sono stati

fatti alcuni studi sul trattamento con N-acetilcisteina, resveratolo ed epicatechina ma i risultati sono ancora dubbi e la sperimentazione è ancora allo stato iniziale. Nei casi di leucomalacia periventricolare si sono studiati gli effetti della melatonina, la quale sembra avere una certa efficacia non tanto nella prevenzione quanto nella riparazione delle lesioni. Alcuni studi sembrano inoltre suggerire l'uso di glutamina e arginina nei casi di enterocolite necrotizzante.

- [1] Halliwell B, Gutteridge Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1–14.
- [2] Jobe AH, Bancalari E Bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Crit Care Med* 2001;163:1723–9
- [3] Perrone S, Vezzosi P, Longini M, et al. Biomarkers of oxidative stress in babies at high risk for retinopathy of prematurity. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009;1:547–52.
- [4] Epelman M, Daneman A, Navarro OM, et al. Necrotizing enterocolitis: review of state of the art imaging findings with pathologic correlation. *RadioGraphics* 2007;27:285–305.
- [5] Buonocore G, Perrone S, Longini M, et al. Non protein bound iron as early predictive marker of neonatal brain damage. *Brain*; 2003;126:1224–30.
- [6] Gitto E, Pellegrino S, Gitto P et al. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *Res.* 2009;46:128–139
- [7] Kakita H, Hussein MH, Daoud GA, et al. Total hydroperoxide and biological antioxidant potentials in a neonatal sepsis model. *Pediatric Research* 2006;60(6)2006
- [8] Tataranno ML, Perrone S, Buonocore G; Plasma biomarkers of oxidative stress in neonatal brain injury. *Clin Perinatol* 2015;42:529–539
- [9] Lee JW & Davis JM Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(2): 161–166.
- [10] Inder TE, Clemett RS, Austin NC, et al. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 1997;131:541–4.
- [11] Saugstad OD.] Chronic lung disease: the role of oxidative stress. *Biol Neonate* 1998;74(Suppl 1):21–8.
- [12] Dennery PA. Role of redox in fetal development and neonatal diseases; *Antioxid Redox Signal* 2004;6:147–53.
- [13] Perrone S, Longini M, Bellieni CV, et al. Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem* 2007;40:177–80.
- [14] Longini M, Perrone S, Kenanidis A, et al. Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radic Biol Med* 2005;38:537–41.
- [15] Longini M, Perrone S, Vezzosi P, et al. Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. *Clin Biochem* 2007;40:793–7.
- [16] Perrone S, Tei M, Longini M, et al Lipid and protein oxidation in newborn infants after lutein administration; *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014;ID 781454
- [17] Parmigiani S, Gambini L, Massari A, et al. Evaluation of reactive oxygen metabolites with micromethod in neonates: determination of standards of normality in full-term babies. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1997;68(Suppl 1):103-6.
- [18] Iamele L, Amboni P, Felletti S, et al. A Reference values of hydroperoxides in the blood serum of newborns and adults [original title "Valori di riferimento di idroperossido nel siero di neonati e adulti". *Biochimica Clinica.* 1997;21:7-8.
- [19] Parmigiani S, Payer C, Massari A, et al. Normal values of reactive oxygen metabolites on the cord-blood of full-term infants with a colorimetric method. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2000;71(1-2):59-64
- [20] C Dani, E Martelli, G Bertini, et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F119–F123
- [21] Buonocore G, Perrone S, Longini M, et al. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatric Research* 2000;47(2)
- [22] Buonocore G, Perrone S, Longini M et al. Oxidative Stress in Preterm Neonates at Birth and on the Seventh Day of Life; *Pediatric Research* 2002;52(1)
- [23] Alberti A, Bolognini I, Macciantelli D, Caratelli M. the radical cation of n,n-diethyl-para- phenyldiamine : a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* 2000;26:253-267
- [24] Bortolussi R, Howlett S, Rajaraman K, and Halperin S Deficient priming activity of newborn cord blood-derived polymorphonuclear neutrophilic granulocytes with lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α triggered with formyl-methionyl-eucyl-phenylalanine. *Pediatric Research* 1993;34(3)
- [25] Gahr M, Blanke R, Speer CP Polymorphonuclear Leukocyte Function in Term and Preterm Newborn Infants. *Biol Neonate* 1985;48:15–20
- [26] Gopina V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS* 1994;
- [27] Baydas G, Karatas F, Gursu MF, et al. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of Medical Research* 2002;33:276–280
- [28] Sullivan JS & Newton B Serum antioxidant activity in neonates. *Archives of Disease in Childhood* 1988;63:748-757
- [29] Davis JM & Auten RL ; Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth *Seminars in fetal and neonatal medicine* 2010;15(4): 191-195
- [30] Shahal Y, Bauminger AR, Zmora E, et al. Oxidative stress in newborn erythrocytes. *Pediatric Research* 1991;29(2)
- [31] Perrone S, Longini M, Marzocchi B, et al Effects of lutein on oxidative stress in the term newborn: a pilot study; *Neonatology* 2010;97:36-40

6.2 GERIATRIA

Esistono parecchie teorie, più o meno valide e più o meno contrastanti, sulla natura dei meccanismi alla base dell'invecchiamento. Queste teorie prendono in esame i vari aspetti del fenomeno, infatti abbiamo teorie genetiche, in cui il fattore predominante è a carico del DNA (somma di errori sempre più gravi col passare del tempo, morte programmata delle cellule, studio dei telomeri ecc.); teorie biochimiche basate sui vari aspetti del metabolismo e teorie mediche basate sulla diminuzione della produzione di ormoni e sul decadimento del sistema immunologico. Le varie teorie non si escludono completamente a vicenda. Tra le teorie finora più dimostrate e studiate vi è quella, di tipo metabolico, di Harman, [1-5]. Secondo di essa, l'invecchiamento è dovuto all'accumulo di danno ossidativo alle cellule e tessuti, associato ad un progressivo aumento della probabilità di morbilità e mortalità. Secondo Harman la principale fonte di danno ossidativo, o meglio di ROS, e primo bersaglio degli stessi, sono i mitocondri. I mitocondri sono gli organelli intracellulari responsabili della sintesi dell'ATP attraverso l'accoppiamento dei processi di fosforilazione ossidativa alla catena respiratoria nelle cellule umane e animali. Sebbene i ROS prodotti possano interagire con tutte le principali macromolecole sembra che il primo e più deleterio bersaglio sia il DNA mitocondriale (mDNA), infatti è stato dimostrato un accumulo di mDNA danneggiato, o meglio mutato, all'interno delle cellule dipendente dall'invecchiamento [6-8]. Sulla base di queste considerazioni è stata proposta una teoria da parte di Linnene, [9] secondo cui l'aumentata produzione di ROS nei mitocondri e l'accumulo di mDNA mutato nelle cellule postmitotiche costituiscono un fattore fondamentale del processo di invecchiamento. In condizioni fisiologiche normali una piccola frazione dell'ossigeno consumato dai mitocondri è costantemente convertito in anioni superossido, perossido di idrogeno, radicali idrossilici, ed altri ROS. Sebbene entro un certo intervallo di concentrazione locale, i ROS giocano ruoli importanti nella regolazione di molte funzioni cellulari specialmente come un messaggero secondario per l'attivazione di della trascrizione di specifici fattori, un eccesso di produzione di ROS è dannosa per le cellule per le motivazioni già esposte. Per contenere la reattività dei ROS nelle cellule umane vengono espressi tutta una serie di enzimi, principalmente superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPX). In linea molto generale le SOD catalizzano il passaggio da anione superossido a perossido d'ossigeno, mentre le CAT degradano i perossidi a specie non reattive. Molto importante è anche il ruolo delle molecole antiossidanti a basso peso molecolare, sia endogeni che esogeni, tra i quali; vitamina C ed E, urati, carotenoidi e flavonoidi[10]. Tuttavia le attività di questi enzimi antiossidanti e le concentrazioni degli antiossidanti a basso peso molecolare sembrano diminuire con l'età. Di conseguenza vi è un aumento età-dipendente della frazione di ROS che sfugge ai naturali meccanismi di difesa e che può danneggiare DNA, RNA, lipidi e proteine. Inoltre qualsiasi segnale o stimolo che innesca la sovrapproduzione di ROS può indurre l'apertura della membrana mitocondriale con conseguente liberazione di citocromo c ed altri fattori apoptogenici, che possono portare la cella all'apoptosi [11]. È stato dimostrato inoltre che la funzione respiratoria dei mitocondri diminuisce con l'età [12][13]. Inoltre, è stato dimostrato che l'alterazione della catena di trasporto degli elettroni, suscitata dagli inibitori delle vie respiratorie, da mutazione del mDNA, o da fattori genetici ha come effetto un'incrementata produzione di ROS nei mitocondri a causa della riduzione incompleta di ossigeno [14]. Molto interessanti e assolutamente complementari alle teorie finora esposte sono i lavori di Cutler [15] i cui risultati sono illustrati in tabella 1. Nei suoi studi Cutler rileva una certa correlazione positiva tra le concentrazioni di SOD, vitamina E, urato ed ascorbato con la massima aspettativa di vita di alcune specie di mammiferi, mentre evidenzia una correlazione negativa con la concentrazione di 8-deossiguanosina (8OHdG), marker di DNA ossidato. Egli ipotizza quindi che l'aspettativa di vita dipenda dal corredo di antiossidanti delle varie specie, il quale dipenda da una base genetica. Generalizzando si può affermare che dagli studi di Cutler emerge l'estrema importanza del fattore antiossidante come elemento contenitivo dei danni



Figura 1: Mitocondrio al microscopio elettronico

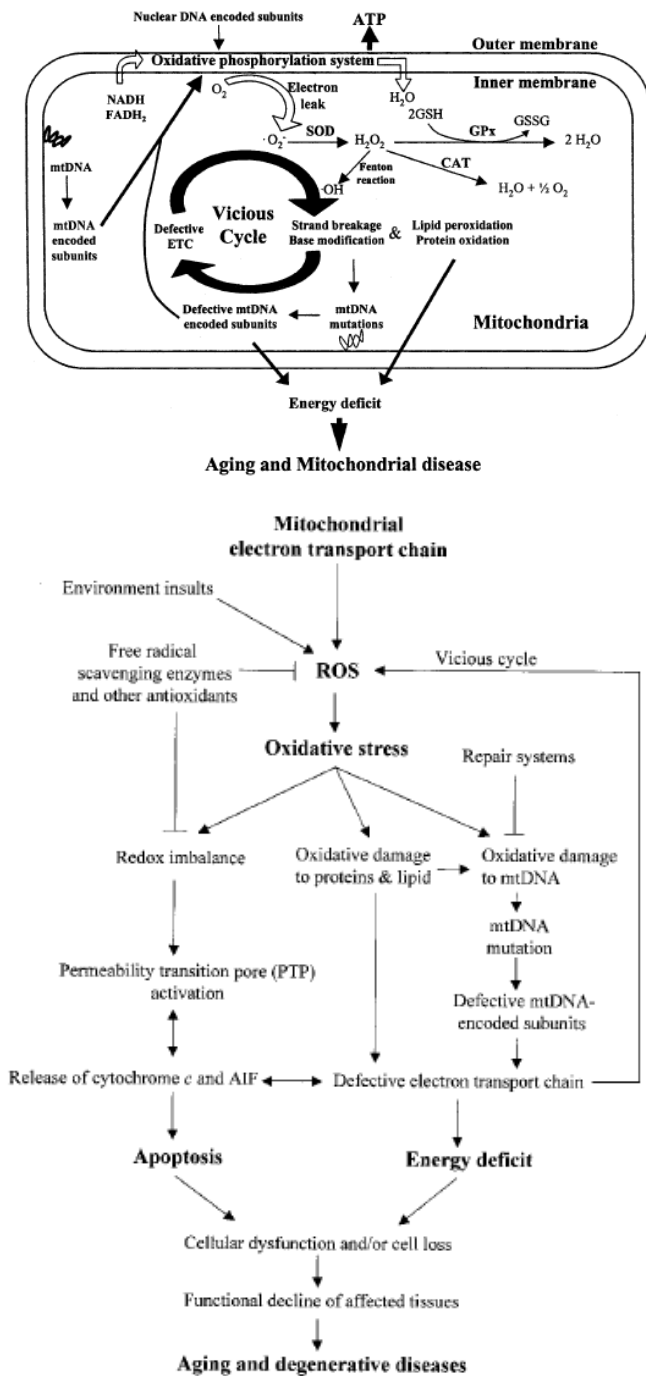


Figura 2: Il ruolo mitocondriale nell'invecchiamento umano e nelle malattie degenerative legate all'età. Il sistema di trasporto degli elettroni nella membrana mitocondriale interna, che è composto da subunità proteiche codificate da mtDNA e DNA nucleare, è attivamente coinvolta nella sintesi di ATP attraverso l'accoppiamento con la respirazione che consuma circa il 90% dell'ossigeno assorbito dalle cellule tissutali. Una frazione dell'ossigeno non è completamente ridotto dal trasferimento mono-elettronico (principalmente via ubiquinone) genera ROS e radicali liberi organici, che sono solitamente eliminati dalla funzione coordinata degli enzimi antiossidanti. Se non contrastati, possono causare danni ossidativi e la mutazione delle molecole di mtDNA che sono attaccati, almeno transitoriamente, alla membrana interna. Il mtDNA con modificazione ossidativa e/o mutazioni è trascritto e tradotto con produzione di subunità proteiche difettose che vengono assemblate per formare una catena di trasporto degli elettroni (ETC) difettosa. L'ETC compromessa non funziona solo in modo meno efficiente nella sintesi di ATP, ma genera anche più ROS, che aumenterà ulteriormente il danno ossidativo alle varie biomolecole nei mitocondri. Questo "circolo vizioso" si propaga in modi età-dipendenti ed è ampiamente osservato l'accumulo di danno ossidativo e la mutazione del mtDNA legata all'età, che porta ad un progressivo declino della funzione bioenergetica delle cellule dei tessuti nel processo di invecchiamento. D'altra parte, gli enzimi scavenger e i sistemi di riparazione del DNA per la rimozione dei danni ossidativi da ROS e da radicali liberi diventano meno efficienti in seguito al processo di invecchiamento. Inoltre, gli elevati livelli di ossidanti possono indirettamente indurre apoptosi cambiando potenziali redox cellulari, ossidando il glutathione ridotto, riducendo i livelli di ATP, e diminuendo e NADH e NADPH. Questi cambiamenti possono facilitare la perossidazione lipidica e l'apertura dei pori nella membrana mitocondriale, con successivo rilascio del citocromo c e altri fattori di apoptosi, attivando vie apoptotiche. Pertanto, l'accumulo di mtDNA mutato per ossidazione e di mitocondri difettosi, unitamente alla maggiore apoptosi, agiscono sinergicamente per causare il declino generale delle funzioni biochimiche e fisiologiche delle cellule dei tessuti alimentando il processo di invecchiamento, dell'essere umano.

Immagine e didascalia rielaborati da YH. Wei and HC Lee 2002 e da YH. Wei et al 2001 [16][17].

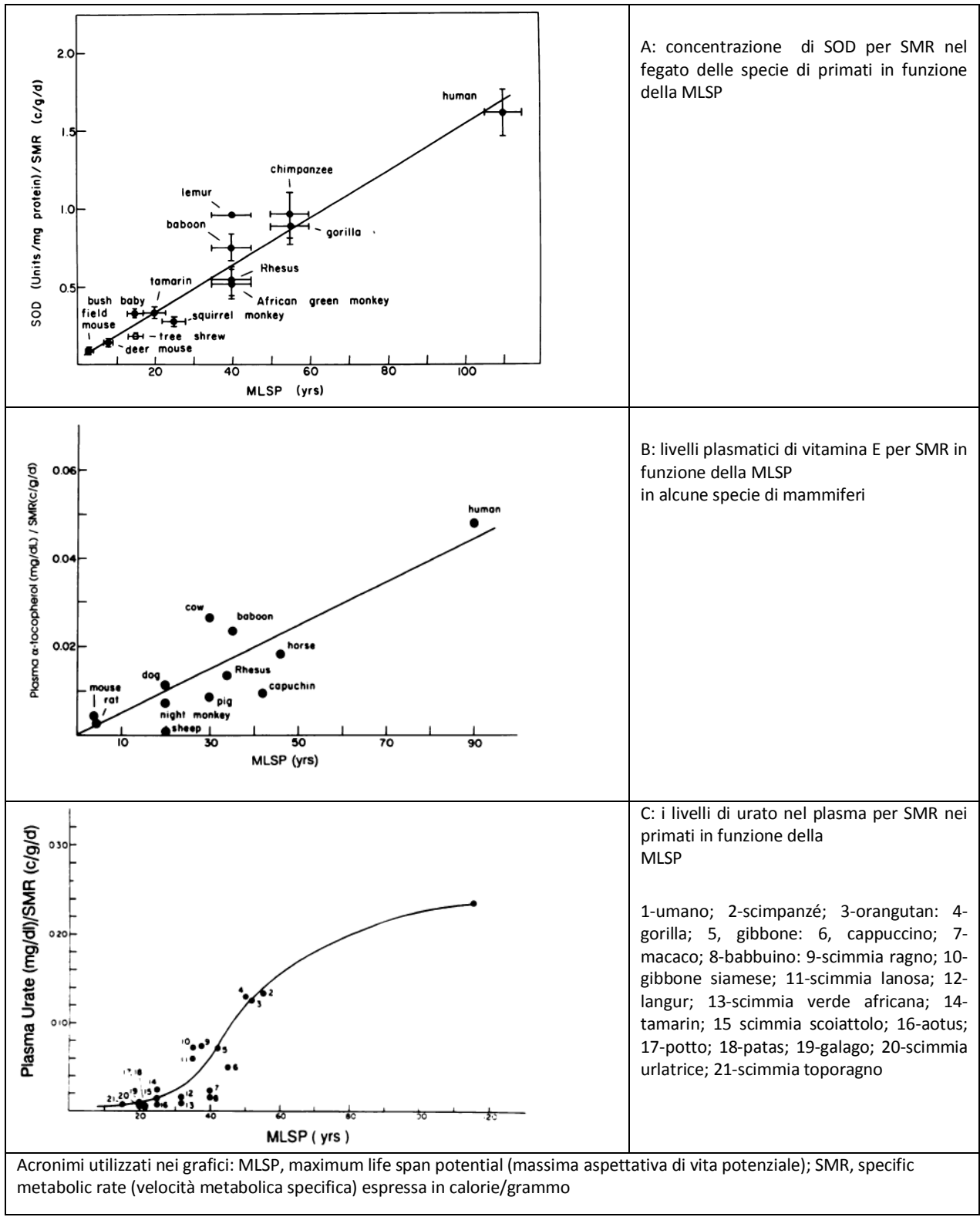


Tabella 1a: Grafici derivanti dei lavori Cutler riassunti in *Cutler 1991* [15]

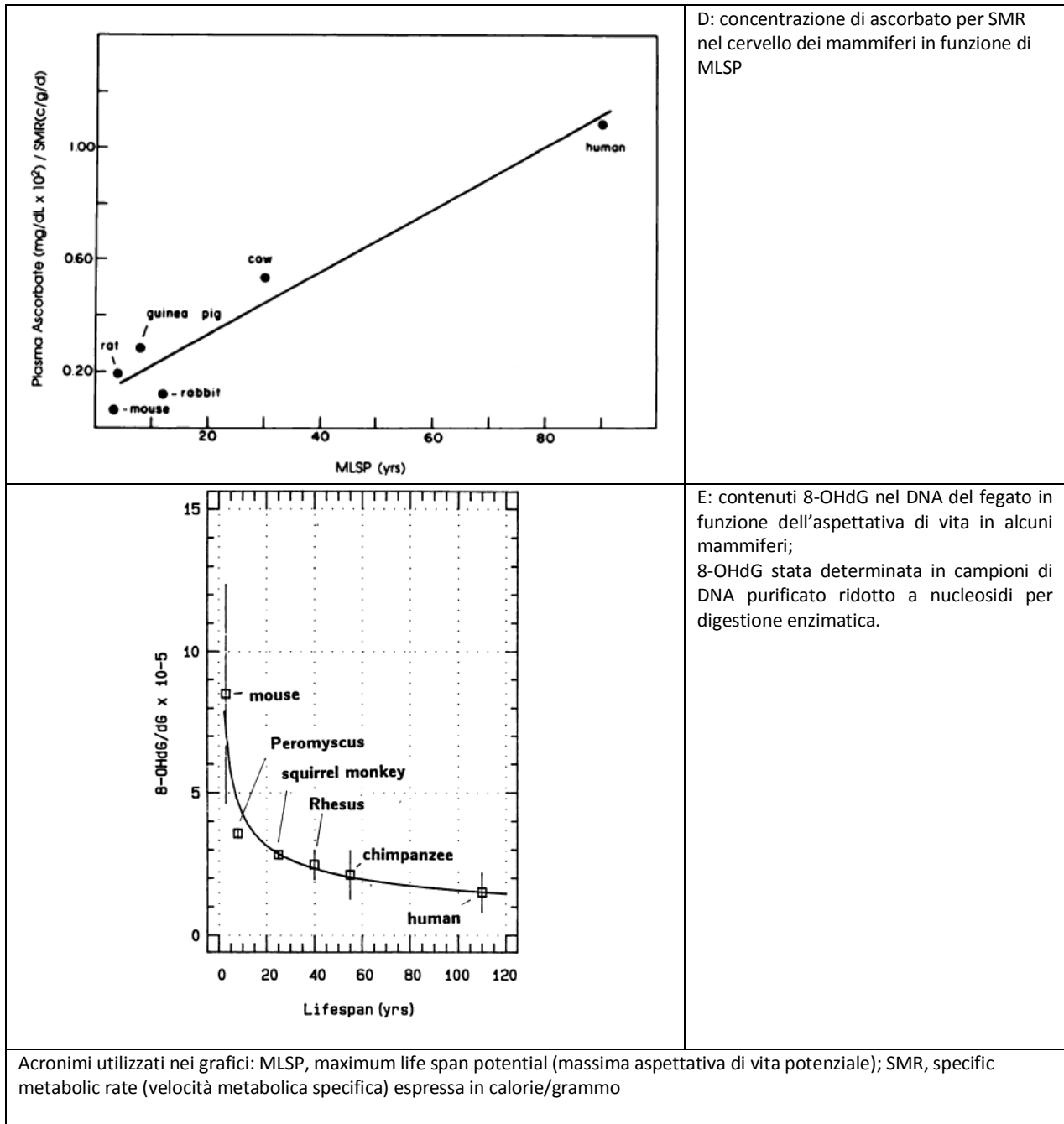


Tabella 1b: Grafici derivanti dei lavori Cutler riassunti in *Cutler 1991* [15]

causati dai ROS e di conseguenza come fattore di rallentamento dei processi di invecchiamento. L'importanza di un buon sistema antiossidante emerge inoltre da numerosi altri studi. Per esempio i centenari sani [18] hanno mostrato livelli plasmatici di vitamina E superiori agli anziani con età inferiore e al gruppo di controllo con età inferiore ai 60 anni, stesso andamento si ha per la vitamina A; Vitamina C e carotenoidi invece hanno avuto un' andamento inverso che è stato spiegato come conseguenza da una diminuita assunzione (anche se ciò è stato solo ipotizzato nello studio). Gli autori hanno concluso che vitamine E e A sono di particolare importanza per la longevità. Risultati simili sono stati riscontrati [19] nei centenari sani campani, che hanno mostrato livelli plasmatici elevati di vitamine C ed E rispetto ai soggetti di età compresa tra i 70 e i 99 anni, ma inferiore rispetto agli adulti più giovani (<50 anni). È interessante notare che l'invecchiamento in buona salute e la longevità della popolazione mediterranea è stata associata all'apporto nutrizionale di antiossidanti [20]. Inoltre un'importante studio denominato "ZENITH study" condotto su 387 volontari, ha evidenziato una diminuita capacità antiossidante nell'anziano, associata ad

un aumento dei tioli ossidati (ossia di antiossidanti utilizzati) [21]. Per quanto riguarda gli antiossidanti enzimatici la situazione non è molto chiara in quanto i risultati presenti in letteratura sono piuttosto discordanti. Sembra che negli animali senescenti i livelli di SOD, CAT e GPX di una serie di tessuti (fegato, cervello, rene, cuore, ecc) siano diminuiti [22-24]. La SOD risulta leggermente diminuita negli anziani. Analogamente, GPX sembra più elevata nei giovani adulti, stabilizzata in adulti con meno di 65 anni, e diminuita nelle persone anziane [25]. Secondo alcuni autori [18] l'attività della SOD nel plasma e nei globuli rossi e l'attività di GPX nel plasma, aumentano all'aumentare età. Quest'ultimi hanno concluso che la senescenza sembra essere associata con un declino nutrizionale nell'assunzione di antiossidanti contestualmente ad un aumento dell'attività enzimatica antiossidante; questo inteso come una risposta adattativa al livello di prodotti dell'aumentata produzione di ROS. Altro possibile fenomeno pro-ossidante, purtroppo poco studiato, è l'accumulo di ferro nel sangue correlato con l'età, sotto forma di transferrina e ferritina[26], ossia molecole che possono rilasciare ferro non eme disponibile per la reazione di Fenton. Sulla base di quanto noto è comunemente accettato il fatto che la persona anziana sia considerata un soggetto ad alto rischio di stress ossidativo. Questo si manifesta anche nella predisposizione dell'anziano a patologie età-correlate le quali sono a loro volta molto spesso legate a una situazione di stress ossidativo, vedi tabella 2. Occorre precisare che non sempre è chiaro se la situazione di stress ossidativo sia causa, concausa o effetto della patologia. In tutti i casi tale situazione è una sintomatologia importante in presenza di svariate situazioni da monitorare come fattore di rischio o come deleterio effetto in quanto le molecole derivanti da danno ossidativo sono spesso a loro volta estremamente reattive e quindi in grado di propagare il danno. Come si evince della tabella 2 praticamente ogni comparto del nostro corpo viene interessato dal fenomeno.

sistema neurologico	declino capacità cognitiva	<i>Maugeri et al. 2004</i>	[27]
		<i>Berr et al. 2000</i>	[28]
	Alzheimer	<i>Schmidt et al. 1998</i>	[29]
		<i>Blanco et al. 2017</i>	[30]
		<i>Zarkovic 2003</i>	[31]
		<i>Praticò et al. 2002</i>	[32]
		<i>Yves 2000</i>	[33]
	Parkinson	<i>Jenner 2003</i>	[34]
		<i>Yoritaka 1996</i>	[35]
sistema cardio-circolatorio	CAD (coronary artery diseases)	<i>Vassalle et al. 2008</i>	[36]
		<i>Vassalle et al. 2007</i>	[37]
		<i>Kedziodora-Kornatowska et al. 2004</i>	[38]
	aterosclerosi	<i>Cherubini et al. 2001</i>	[39]
		<i>Bruce et al. 1993</i>	[40]
polmone	COPD (chronic obstructive pulmonary diseases)	<i>Ismail et al. 2015</i>	[41]
		<i>Repine et al. 1997</i>	[42]
occhio	cataratta	<i>Spector 1995</i>	[43]
		<i>Bruce et al. 1993</i>	[40]
	degenerazione maculare	<i>Beatty et al. 2000</i>	[44]
sistema scheletrico	osteoporosisi	<i>Beak et al. 2010</i>	[45]
		<i>Sanchez-Rodriguez et al. 2007</i>	[46]
		<i>Liu et al. 2004</i>	[47]
pelle	Malattie della pelle	<i>Velaverde et al. 2012</i>	[48]
		<i>Bickers and Athar 2006</i>	[49]
		<i>Kohen and Irith 2000</i>	[50]

Tabella 2: Patologie età-correlate legate allo stress ossidativo

Sistema neurologico

Lo sviluppo di stress ossidativo, è una caratteristica di molte malattie neurologiche: ischemica, infiammatorie, metaboliche e degenerative. Lo stress ossidativo è spesso implicato in malattie neurodegenerative caratterizzate da accumulo filamenti anormali o deposizione di forme anomale di proteine specifiche nei neuroni, come il morbo di Alzheimer (AD), la malattia di Pick, malattie correlate ai corpi di Lewy, sclerosi laterale amiotrofica (SLA), e la malattia di Huntington. Le cause di morte neuronale nelle malattie neurodegenerative sono multifattoriali. In alcuni casi di familiarità con SLA è stata individuata una mutazione nel gene responsabile della trascrizione della SOD-1. In altre malattie neurodegenerative i ROS hanno ruolo, anche se spesso non del tutto chiaro nella

patogenesi precoce o implicazioni sulla morte neuronale in fase avanzata di malattia. Gli effetti dello stress ossidativo su cellule post-mitotiche, come i neuroni possono essere cumulativi, quindi, spesso non è chiaro se il danno ossidativo è una causa o una conseguenza della neurodegenerazione. La perossidazione dei lipidi di membrana cellulare, o di lipoproteine circolanti genera aldeidi altamente reattive tra i quali una delle più importanti è il 4-idrossinonenale. L'aumentata concentrazione di 4-HNE in malattie neurodegenerative e la distribuzione immunoistochimica di 4-HNE nel tessuto cerebrale indica un ruolo fisiopatologico dello stress ossidativo in queste malattie, e soprattutto un ruolo del 4-HNE nella formazione dei depositi di filamenti[31]. Più in generale l'aumento dello stress ossidativo sembra essere correlato alla perdita delle capacità cognitive. Un recente ed importante studio (n>1000) condotto sulla popolazione urbana di alcune città ceche e polacche ha evidenziato che i livelli di d-ROMs aumentati sono inversamente associati alla cognizione globale e alla fluidità verbale trasversale e in analisi prospettica gli effetti osservati corrispondevano a un'età superiore di 3-4 anni. Gli autori hanno concluso che esiste una modesta ma significativa relazione tra i valori di d-ROMs sierici e la funzione cognitiva nel campione di popolazione di adulti più anziani[51]. In un altro studio condotto su 125 ultra-ottuagenari campani si osservava una forte correlazione negativa tra i valori di perossidi misurati nel plasma col d-ROMS test e le capacità cognitive misurate mediante test cognitivi (MMSE; mini mental state examination) [27]. Risultati complementari provengono dall'analisi dello stato antiossidante di 1760 soggetti tra i 50 e i 75 dove si è valutato positivamente l'impatto dell' α -tocoferolo nei confronti del valore MDRS (mattis dementia rating score) [29]. Altro studio interessante è stato condotto in Francia dove per 4 anni su oltre mille soggetti sono state valutate le capacità cognitive sempre mediante MMSE, marker di ossidazione come molecole reattive all'acido tiobarbiturico e antiossidanti come la vitamina E negli eritrociti. Gli autori hanno concluso che un basso profilo antiossidante e/o elevati livelli di lipoperossidazione sono da considerarsi un fattore di rischio nei confronti del declino delle capacità cognitive.

Sistema cardio-circolatorio

Importante è la constatazione che lo stress ossidativo ha un ruolo centrale nell'aterogenesi e che studi epidemiologici mostrano che le malattie cardiovascolari sono associate a basse concentrazioni plasmatiche di acido ascorbico, tocoferolo, e β -carotene. Inoltre la formazione delle placche aterosclerotiche sembra iniziare dall'ossidazione LDL e delle apolipoproteine, oltre che da modificazioni delle stesse ad opera di aldeidi, che si

parametro	Adulti normotesi	Anziani normotesi	Anziani Ipertesi
nitriti/nitrati plasma ($\mu\text{mol/l}$)	2.96 \pm 1.49	1.91 \pm 1.26+	1.47 \pm 0.56*
gruppo carbonilici siero (nmol/mg proteina)	0.075 \pm 0.04	0.085 \pm 0.024	0.245 \pm 0.212*
MDA sangue ($\mu\text{mol/gHb}$)	0.230 \pm 0.115	0.186 \pm 0.03	0.307 \pm 0.116*
GSH sangue (mmol/l)	2.61 \pm 0.23	2.77 \pm 0.33	2.48 \pm 0.35*
attività SOD-1 sangue (U/gHb)	3218 \pm 793	2976 \pm 404	2835 \pm 469*
attività CAT sangue (BU/gHb)	17.04 \pm 2.89	23.5 \pm 3.9*	23.4 \pm 4.8*
* differenza significativa col valore degli anziani normotesi p < 0,05, + differenza significativa col valore degli adulti normotesi p < 0,05			

Tabella 3: Basata sulle informazioni di Kedziora-Kornatowska et al. 2004 [38]

ricorda essere il prodotto finale della perossidazione. Questi prodotti derivanti da processi ossidativi sono poi riconosciuti dai recettori dei macrofagi e da essi fagocitati[40]. Numerosi sono gli studi che collegano uno status di stress ossidativo all'insorgenza di CAD (coronary artery diseases), specialmente nel paziente anziano. Interessanti sono i risultati di Kedziora-Kornatowska et al 2004, [38] riassunti in tabella 3. Attesa e significativa è la diminuzione dei nitriti/nitrati degli anziani ipertesi rispetto a quelli normotesi, e di quest'ultimi rispetto agli adulti normotesi, in quanto tali molecole sono proporzionali alle concentrazioni di NO, un fattore di vasodilatazione. Per gli altri parametri se escludiamo l'aumentata attività delle CAT, comunque correlata da più autori come dipendente dall'età, si delinea chiaramente un quadro di stress ossidativo. MDA e gruppi carbonilici, ossia marker di ossidazione a carico di lipidi e proteine, sono

significativamente più elevati negli ipertesi che nei normotesi, indipendentemente dall'età di quest'ultimi. Discorso inverso vale invece per i marker di capacità antiossidante quali, GHS e attività della SOD [38]. Inoltre è stata osservata l'assenza di aterosclerosi in pazienti ottuagenari con elevati livelli di vitamina E nel plasma, specialmente se associata a bassi livelli di LDL ossidate [39]. Numerosi studi sono stati condotti in questo ambito dalla dottoressa Vassalle Cristina utilizzando il d-ROMs test. In particolare è stato osservato che in pazienti anziani affetti da CAD il valore di d-ROMs è significativamente più alto che nel gruppo

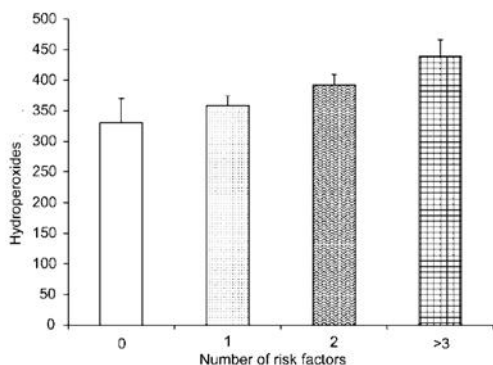


Figura 3: Valori d-ROMs in relazione al numero di fattori di rischio; analisi eseguita con ANOVA $p=0,016$; grafico da Vassalle et al. 2007 [37]

controllo di pari-età sani, 456 ± 15 vs 357 ± 14 U.Carr e che nelle donne con CAD il valore è maggiore che negli uomini, 536 ± 33 vs 428 ± 15 U.Carr. [36] Questi risultati confermano i dati di uno studio precedente condotto su di una popolazione simile (età media 65 anni) dove si era trovato un valore di 412 ± 16 U.Carr per pazienti affetti da CAD contro un valore di 341 ± 12 U.Carr del gruppo controllo. La particolarità di questo studio è stata però quella di mettere in relazione il valore di d-ROMs, ossia la concentrazione di perossidi con il numero di fattori di rischio. Come fattori di rischio sono stati considerati diabete mellito, ipercolesterolemia, ipertensione, tabagismo e proteina C-reattiva $> 1,5$ mg/l. Si è osservato che all'aumentare dei fattori di rischio, come illustrato in figura 3, aumenta significativamente la concentrazione di perossidi nel plasma sanguineo [37]. Questo risultato ha delle implicazioni piuttosto

importanti in quanto dimostra che l'aumento di perossidi è collegabile all'aumento del rischio. Vista l'incidenza delle malattie cardiovascolari in età avanzata e in considerazione dei numerosi dati noti, l'analisi dei livelli di perossidi potrebbe diventare un'utile strumento soprattutto in ambito preventivo.

Polmone

La principale patologia polmonare legata allo stress ossidativo è la broncopneumopatia cronica ostruttiva, in essa lo stress ossidativo sembra giocare un ruolo importante ma non dipendente dall'età. Semplicemente ad età avanzata è più tempo che si esposti a fattori di rischio quali fumo di sigaretta, infiammazioni croniche e prolungata esposizione ad agenti inquinanti. L'unico fattore dipendente dall'età è il già citato accumularsi del ferro che potrebbe portare all'aggravarsi di una situazione già conclamata essendoci prove di una maggiore concentrazione dello stesso nei macrofagi alveolari e nei lobi superiori dei polmoni dei fumatori. La connessione tra questa patologia e lo stress ossidativo è nella vulnerabilità dell'antiproteasi α_1 -antitripsina nei confronti degli agenti ossidanti a causa del suo alto contenuto in cisteina e metionina. α_1 -antitripsina è un agente inibente l'elastasi, un enzima che ledendo l'elastina, se presente in concentrazioni elevate, può causare seri danno ai tessuti ed è considerata un fattore importante nella patogenesi del COPD. Tra le fonti di ROS abbiamo il fumo di sigaretta, in quanto ricco di perossidi e ossido di azoto, nonché di radicali liberi, nonché agenti in grado di inzializzare reazioni radicaliche. Molto importanti come fonti di ROS sono anche i polimorfonucleati, per le modalità di produzione di ROS già citate più volte, e i macrofagi alveolari per i medesimi motivi. Entrambi presenti in caso di infiammazioni e/o infezioni specialmente se croniche. Altra importante fonte di ROS è la xantina ossidasi derivante dalla xantina deidrogenasi specialmente in seguito a processi ossidativi. Tutti questi processi è stato dimostrato essere decisamente aggravati dal fumo di sigaretta[41][42]. L'epitelio broncoalveolare è protetto da uno strato fluido di produzione endogena ad elevato contenuto di antiossidanti, quali soprattutto la mucina (glicoproteina ricca di cisteina), ma anche dotato di GSH, acido urico, acido ascorbico e albumina, che consentono una protezione da agenti ossidanti esogeni [52]. Per quanto riguarda il sistema antiossidante si è osservato in genere una abbassamento dell'attività degli enzimi antiossidanti e un generalizzato decremento degli antiossidanti a basso peso molecolare.[41][42]. La presenza di uno stato di stress ossidativo sistemico è stata studiata anche mediante d-ROMs test su 94 paziente con COPD e si è trovato un valore di d-ROMs significativamente più alto rispetto al gruppo controllo; inoltre è stata trovata una correlazione negativa tra d-ROM e volume di espiratorio forzato ($r = -0,275$, $p < 0,007$), d-ROMs e capacità vitale forzata ($r = -0,278$, $p < 0,007$), d-ROMs e flusso espiratorio forzato

($r = -0,226$, $P < 0,029$) e con saturazione di ossigeno ($r = -0,315$, $p < 0.010$) [53]. Recentemente è stata provata l'efficienza della spirulina (estratto di una particolare alga blu) come alimento funzionale nei confronti di pazienti affetti da COPD. In tali pazienti si è riscontrato un notevole miglioramento nel bilancio ossidativo, grazie a significativi decrementi in dei lipoperossidi e malondialdeide e significativi aumenti di CAT, SOD, glutatione transferasi (GST), GSH e vitamina C. [41]

Occhio

La patogenesi della degenerazione maculare è poco chiara ma in essa sembra giocare un ruolo importante anche lo stress ossidativo. La retina è particolarmente suscettibile ai danni da stress ossidativo a causa del suo elevato consumo di ossigeno, della sua alta percentuale di acidi grassi polinsaturi, e della sua esposizione alla luce visibile e alle radiazioni UV. Studi in vitro hanno mostrato che lesioni di varia natura sono riconducibili allo stress ossidativo e che le vitamine antiossidanti A, C, ed E sono la principale protezione contro questo tipo di lesioni. Sembra inoltre che gli accumuli di lipofusina derivino, almeno in parte, dall'ossidazione dei fotorecettori e che essa stessa sia sostanza fotoreattiva. Nonostante tutto però i rapporti tra i livelli sierici di antiossidanti e malattie maculari legata all'età sono meno chiari anche se stato provato un effetto protettivo di alte concentrazioni plasmatiche di un particolare tocoferolo, ma il meccanismo con cui lo stress ossidativo possa indurre alla degenerazione maculare non è ancora stato chiarito del tutto [44]. Altra importante patologia dell'occhio, almeno per incidenza è la cataratta e lo stress ossidativo sembra essere un'importante fattore nell'insorgenza della stessa. È noto che le proteine e i lipidi costituenti la lente siano maggiormente ossidati in soggetti affetti da cataratta piuttosto che in soggetti sani a parità di età (più del 60% dei residui di metionina risultano ossidati [40] . Probabilmente la principale causa di ossidazione, con conseguente opacizzazione della lente è da imputare all'elevata concentrazione di H_2O_2 riscontrato nell'umor acqueo di una larga maggioranza di soggetti afflitti da cataratta. Questo punto di vista è ulteriormente supportato da esperimenti che dimostrano che la formazione della cataratta in coltura organotipica è causata dal radicale superossido generato fotochimicamente a partire da H_2O_2 , e che la formazione del radicale idrossile è completamente impedita mediante l'aggiunta di una perossidasi. I danni causati da stress ossidativo non sembra essere reversibili e sembra esserci relazione inversa tra il periodo di stress e la quantità di tioli proteici ossidati. Dopo l'esposizione allo stress ossidativo, il set point redox del singolo strato di cellule epiteliali della lente (ma non il resto della lente) cambia rapidamente, passando da un'ambiente fortemente riducente a un ambiente ossidante. Quasi in concomitanza con questa modifica vi un'è estesa serie di danni al DNA e alle pompe di membrana, seguita dalla perdita di vitalità cellulare epiteliale e da morte per via di meccanismi necrotici e apoptotici. I dati suggeriscono che lo strato di cellule epiteliali è il sito iniziale di attacco da stress ossidativo [43]. A sostegno dell'importanza dello stress ossidativo nella patogenesi della cataratta vi sono evidenze del ruolo preventivo di ascorbati, tocoferoli e carotenoidi assunti mediante una dieta ricca di antiossidanti; di contro invece il tabagismo e l'esposizione a ossidanti di varia natura sembrano aumentare il rischio. [40]

Sistema scheletrico

L'etiologia dell'osteoporosi sembra essere strettamente correlata allo status ossidativo. È stata infatti riscontrata un rapporto SOD/GPX significativamente maggiore nei soggetti con osteoporosi. Questa maggiore attività delle SOD rispetto alla GPX favorisce l'aumento dei livelli di H_2O_2 . Alti livelli di H_2O_2 favoriscono la differenziazione delle cellule osteoblastiche in osteoclasti ed inibiscono la differenziazione delle cellule osteoblastiche a osteoblasti, propiziando così una diminuzione accentuata della densità ossea. [46]. L'elevata quantità di H_2O_2 può portare anche alla formazione di ROS attraverso i meccanismi noti e questo è rilevabile anche dagli elevati livelli di 8-OH-dG nei pazienti affetti da osteoporosi [45]. Esperimenti in vitro hanno mostrato come le metalotionine, proteine ricche di cisteina, endogene od esogene, potrebbero avere un ruolo protettivo nei confronti della patogenesi dell'osteoporosi. [47]

Pelle

La pelle è l'organo più grande e più esposto agli agenti esterni del corpo e costituisce un importante bersaglio per gli agenti fisici (radiazioni UV) e chimici (xenobiotici) endogeni in grado di alterarne la sua

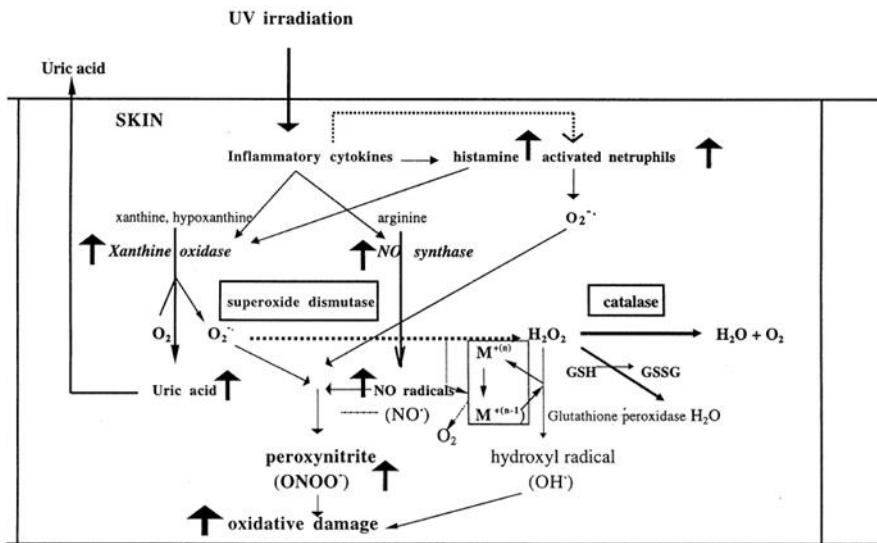


Figura 4: Meccanismo teorizzato da Koehn & Gati 2000 [50]

basso peso molecolare tra cui spicca squalene, specialmente a livello di derma, essendo il principale antiossidante del sebo, ma un ruolo importante viene giocato anche dalle vitamine C ed E. È noto che l'azione dei ROS può portare alla formazione di prodotti di ossidazione, come esempio 4-HNE o MDA o perossidi organici nella pelle, che possono snaturare proteine, alterare l'apoptosi, e influenzare il rilascio di mediatori proinfiammatori come le citochine, contribuendo alla patogenesi di malattie infiammatorie della pelle. Tra le patologie cutanee legate allo stress ossidativo possiamo ricordare la psoriasi, la depigmentazione, reazioni allergiche (specialmente quelle da contatto con nichel o suoi composti), infiammazioni cutanee e ulcere [49]. Altro conseguenza dello stress ossidativo è la perdita delle funzionalità meccaniche della pelle. Questo è dovuto al fatto che la stabilizzazione del tropocollagene avviene mediante ponti formati da allisina, ossia lisina ossidata, mentre nell'elastina avviene mediante desmosina, ossia quattro lisine ossidate a formare una struttura esagonale. Un'eccessiva ossidazione porta alla proliferazione di questi ponti irrigidendo il collagene e alterando le capacità strutturali dell'elastina. L'antiossidante esogeno che sembra aver i maggiori effetti in questo contesto è il β -carotene [54]. Delle principali cause di stress ossidativo almeno una sembra essere legata direttamente all'invecchiamento, ossia la carenza di SOD e la ridotta capacità energetica mitocondriale. Quest'ultimi fenomeni causano una serie di danni al DNA nucleare o per mancata difesa dai ROS o per problemi di trascrizione legati al minor apporto di ATP che portano alla senescenza delle cellule dell'epidermide. Questi fenomeni portano anche all'assottigliamento dell'epidermide [48]. Altro fenomeno all'origine dello stress ossidativo nella pelle è l'esposizione da raggi UV, i quali possono in primo luogo provocare la rottura omolitica delle molecole d'acqua con conseguente formazione di radicali idrossili [54], ma possono anche provocare stress ossidativi mediante altri meccanismi come teorizzato da Koehn and Gati 2000 [50]. Secondo questi autori l'esposizione ai raggi UV attiva due enzimi, ossia la xantina ossidasi e NO ossidasi, quest'ultimi provocano la produzione di ioni superossido e NO i quali combinandosi possono dare origine al perossinitrito, un RNS estremamente reattivo. Il meccanismo proposto è illustrato nella figura 4.

L'importanza dello stress ossidativo nei meccanismi legati all'invecchiamento è un fatto ormai accertato e accettato. Con l'aumentare dell'età aumentano le possibili cause di stress ossidativo e i problemi ad esso correlati quindi diventa di estrema importanza il monitoraggio dello stesso, ma soprattutto diviene sempre più importante adottare strategie efficienti per il controllo dello stato ossidativo. La prima e forse più importante linea di difesa nei confronti dell'insorgere o dell'aggravarsi di una situazione di stress ossidativo è basata sullo stile di vita. Le considerazioni che andremo ad illustrare sono generalizzabili ad ogni fascia di età, ma sono particolarmente importanti per il soggetto anziano in ragione di quanto illustrato finora. I

struttura e funzione. Molti inquinanti ambientali sono o essi stessi ossidanti o catalizzano la produzione di ROS, direttamente o indirettamente. È noto che i ROS possono alterare meccanismi apoptotici spesso coinvolti nella patogenesi di numerosi disturbi della pelle quali fotosensibilità e alcuni tipi di tumori maligni cutanei. La pelle possiede una lunga serie di meccanismi di difesa che interagiscono con i ROS per spegnerne la reattività. Questi includono enzimi come del tipo SOD, CAT o perossidasi e antiossidanti a

principali fattori influenzanti lo status ossidativo sono: l'alimentazione, il corretto esercizio fisico, tabagismo e abuso di alcolici.

L'alimentazione è la principale fonte di antiossidanti endogeni, i quali seppur caratterizzati da una minor attività di quelli endogeni ricoprono un ruolo fondamentale nella bilancia ossidativa. È universalmente riconosciuto che una buona alimentazione migliora lo stato di salute generale specialmente se ricca di antiossidanti come la dieta mediterranea. La dieta mediterranea ha sempre attratto l'interesse dei ricercatori in quanto vari studi epidemiologici evidenziano una minor incidenza di malattie cardiovascolari, di alcuni tipi di tumore e più in generale un'aspettativa di vita maggiore ed un migliore invecchiamento rispetto a popolazioni con fattori di rischio simili (per esempio medesima attitudine al tabagismo) o con un tenore di vita superiore come le popolazioni nordeuropee o nordamericane. La dieta mediterranea classica è basata su otto punti: elevato rapporto grassi insaturi/grassi saturi; moderato consumo di alcolici, elevato consumo di legumi, elevato consumo di cereali (pane incluso); elevato consumo di frutta, elevato consumo di verdura, basso consumo di carne; moderato consumo di latte e derivati. Gli effetti benefici della dieta mediterranea sono sempre più spesso associati alla quantità ma soprattutto alla qualità dei prodotti di origine vegetale, particolarmente ricchi in antiossidanti. Molto importante sembra essere l'apporto di antiossidanti dell'olio d'oliva (se di alta qualità, ossia extravergine ottenuto solo da spremitura meccanica) consumato in quantità anche 10 volte maggiori nei paesi mediterranei rispetto a quelli nordeuropei. [55][56]. Alti livelli di antiossidanti sono riscontrati nel plasma di centenari in buona salute imputabili perlopiù ad una corretta alimentazione. [57]

Sempre più dati evidenziano il benefico effetto dell'esercizio fisico continuativo sullo status ossidativo. È piuttosto evidente che l'esercizio sistematico riduce l'incidenza di malattie cardiovascolari e di altre malattie degenerative aumentando le prestazioni funzionali negli anziani. Durante l'esercizio fisico aumenta il consumo di ossigeno dell'intero corpo e specialmente in presenza di sforzi prolungati aumenta notevolmente la produzione di ROS e RNS in diversi tessuti (ad esempio, muscoli, cuore e fegato), aumentano di conseguenza i marcatori di stress ossidativo (gruppi carbonilici proteici, perossidi e MDA) e vi è un'alterazione degli antiossidanti in diversi tessuti. È stato ipotizzato che l'esercizio fisico induca adattamenti positivi nei sistemi di difesa antiossidante. Prove recenti suggeriscono che la quantità di attività fisica sia associata ad un'elevata capacità antiossidante enzimatica e che questa associazione sia

intensità-dipendente. Queste considerazioni non sono limitate all'anziano ma diventano più importanti in una situazione di aumentata possibilità di stress ossidativo come può essere l'età avanzata. In particolare è stato dimostrato che l'esercizio di resistenza prolungato nel tempo attenua la perossidazione negli anziani. Purtroppo questi benefici cessano al cessare dell'attività fisica, intesa come pratica continuativa e non come sforzo momentaneo [58][59]. Particolarmente interessante è lo studio condotto da Karolkiewicz. In esso due gruppi di anziani (over 65) sono stati costruiti sulla base delle chilocalorie consumate su base settimanale in esercizio fisico, più o meno di 1600. Nel gruppo di maggior consumo calorico si è vista una diminuzione del glutatone e della glutatone perossidasi negli eritrociti ma si è visto un aumento del glutatone nel plasma e questo aumento era inversamente proporzionale alla concentrazione di molecole reagenti all'acido tiobarbiturico nello stesso. L'aumentata concentrazione di glutatone a fronte di una diminuzione delle molecole reagenti all'acido tiobarbiturico implica un miglioramento dello status ossidativo nonostante non siano state rilevate differenze significative nella capacità antiossidante totale e nei livelli di H₂O₂. Tutto questo a

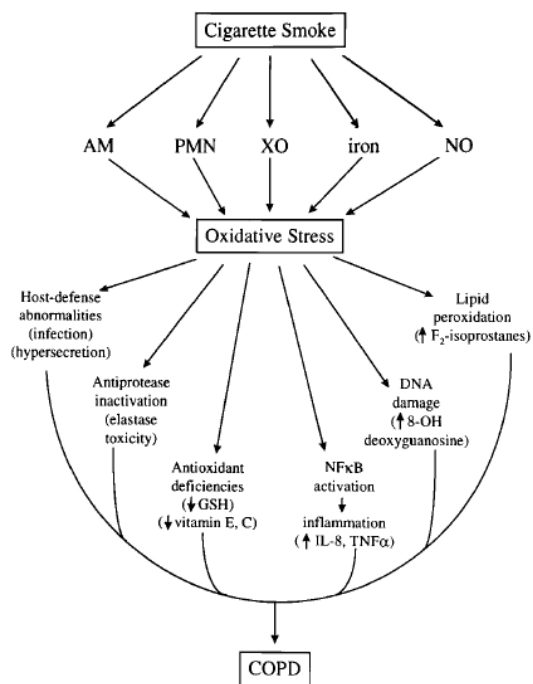


Figura 5: Effetti del fumo di sigaretta; immagine da Repine et al. 1997 [42].

riprova delle capacità adattative del nostro organismo. [60]

Il fumo di sigaretta è un notevole fonte di stress ossidativo, più in particolare è causa diretta o indiretta dell'aumento dei ROS sistemici e più in particolare a livello polmonare. Nei fumatori è stata riscontrata una maggiore densità di macrofagi alveolari (AM), parallelamente ad un aumentata quantità di H₂O₂ rilasciata dagli stessi, nonché una accelerata maturazione ed attivazione degli stessi. Inoltre è stato dimostrato in vitro che l'esposizione al fumo di tabacco degli stessi ne aumenta il metabolismo ossidativo. Discorso analogo vale per i polimorfonucleati (PMN), nota causa di stress ossidativo, di cui si riscontra un forte aumento nei fumatori. Il fumo sembra inoltre incentivare la trasformazione della xantina deidrogenasi a xantina ossidasi (XO), noto enzima produttore di ROS in grandi quantità. Il fumo di sigaretta sembra essere fonte di ferro, catalizzante la reazione di Fenton quindi la formazione di radicali liberi a partire dai perossidi. Altro causa di stress ossidativo nel fumo di sigaretta è la presenza nello stesso di NO, il quale reagendo con lo ione superossido forma perossinitrito una RNS estremamente aggressiva[42].

L'abuso cronico di alcolici è causa di stress ossidativo. In particolare è stato accertato l'aumento di ROS, in particolare di perossidi sierici, noto marker di lipoperossidazione. Se sull'aumento della lipoperossidazione gli autori sono concordi, per quanto riguarda la capacità antiossidante il discorso si fa più complesso perché se in genere il potere riducente del plasma non viene alterato sono state spesso riscontrate modificazioni a carico dei singoli antiossidanti. Sul tipo e sull'entità di tali alterazioni i dati in letteratura non sono pienamente concordi ma sono generalmente interpretati come una risposta di tipo adattativo, tra l'altro non pienamente soddisfacente, all'aumentato stress ossidativo. L'inefficienza di tale risposta è evidente in quanto lo stress ossidativo contribuisce alla generazione di potenti chemiotattici per neutrofili, stimola l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi del collagene, inoltre la perossidazione lipidica a livello epatico gioca un ruolo importante nella progressione della steatosi dell'epatite e della cirrosi epatica. I danni da stress ossidativo si propagano anche in tessuti e sistemi extraepatici come dimostrano i danni endoteliali nei bevitori cronici e l'aumentato stress ossidativo sistemico [61-64]. L'aumentato stress ossidativo sistemico è stato facilmente dimostrato mediante d-ROMs test da Trotti nei cui studi si evidenzia un significativo aumento dei lipoperossidi nel plasma sanguineo dei bevitori cronici rispetto ai bevitori moderati; valori compresi mediamente compresi tra le 300 e le 400 U.Carr per i forti bevitori e valori inferiori alle 300 U.Carr per bevitori moderati [61][62]. I meccanismi d'azione dell'alcol etilico sullo status ossidativo non sono ancora stati compresi appieno ma esso sembra interferire col metabolismo del ferro, che se non eme è considerato un forte pro-ossidante, e sul metabolismo mitocondriale [63]. Da sottolineare che una dieta ricca di grassi contemporanea all'assunzione di alcolici sembra aggravare ulteriormente lo status ossidativo [64]. Particolare invece sembra l'effetto dell'assunzione di modeste quantità di vino rosso (250 ml) contemporaneamente all'assunzione di cibi grassi. Infatti sebbene non vi siano alterazioni dei livelli lipidici rispetto a un pari pasto accompagnato da acqua, è stata evidenziato un aumento della capacità antiossidante e una minor concentrazione di perossidi (monitorati mediante d-ROMs test e malonildialdeide) nei campioni di plasma prelevati dopo il pasto accompagnato da vino rosso. [65]

La stretta correlazione tra stress ossidativo e invecchiamento ha destato sempre più interesse a riguardo degli effetti dell'integrazione di antiossidanti nella dieta, sotto forma di integratori alimentari o alimenti funzionali o nutraceutici. La letteratura in merito è piuttosto vasta ma essendo un ambito di studio relativamente recente non vi è ancora pieno accordo, più che sull'effettiva validità di questa pratica, sui meccanismi mediante i quali agisce. Anche se non pienamente concordi sugli effetti, la maggior parte degli autori è d'accordo nell'affermare l'inutilità se non la dannosità di una supplementazione incontrollata di antiossidanti. Per esempio grandi quantità di vitamina E possono portare ad un effetto pro-ossidante, in quanto il suo potenziale di riduzione dipende dalla sua concentrazione e una massiccia alterazione della stessa può ridurlo fino a far divenire la vitamina E ossidante nei confronti di alcune molecole organiche facilmente ossidabili. Perché l'integrazione con antiossidanti sia davvero efficace occorre conoscere i meccanismi su cui va ad agire ma soprattutto è importante applicare la corretta composizione dell'integratore nelle corrette dosi nei tempi adeguati [54][66] [67].La bibliografia su questo argomento è davvero vasta quindi mi limiterò a citare alcuni studi a titolo di esempio per dimostrare come tale approccio può essere utilizzato per tutti i principali compartimenti. Nel caso dell'osteoporosi è stato osservato in

donne in menopausa non fumatrici trattate con Vitamina C ed E una diminuzione delle molecole reagenti all'acido tiobarbiturico (TBARS) contemporanea ad un leggero ma significativo aumento della densità osse [68]. Un' integrazione a base di vitamina E a Vitamina C a lento rilascio ha dimostrato di poter ritardare l'avanzamento dell'aterosclerosi almeno negli uomini fumatori [69]. L'integrazione di zinco ha dimostrato di abbassare i livelli ematici di MDA e 8-OHdG e l'incidenza di infezioni nella popolazione anziana [70]. Nella profilassi di episodi influenzali è stata riscontrata l'utilità di un integratore a base di colostro bovino e vitamine tra cui principalmente A, C ed E, in questo caso è stata registrata una significativa diminuzione degli episodi influenzali nei confronti non solo del gruppo placebo ma anche del gruppo sottoposto a vaccino antinfluenzale [71]. Per quanto riguarda la pelle è stato dimostrato un buon effetto fotoprotettore dei carotenoidi, dell'acido lipoico e della melatonina, applicati per via topica o assunti oralmente [72]. I carotenoidi sembrano essere utili anche a livello oculare essendo stato osservato un aumento della attività visiva globale ad essi associato.[73]

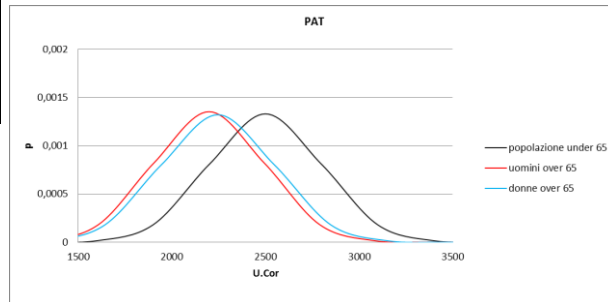
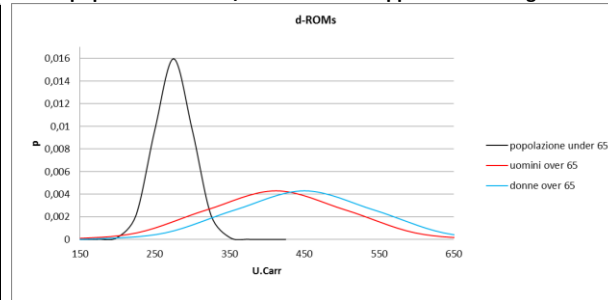
L'avanzare dell'età è sicuramente un fattore critico nel mantenimento di un buon status ossidativo, ma come dimostrato da un nostro studio l'aumento dello stress ossidativo non è uguale per tutti e non è così automatico il paradigma che maggiore sia l'età maggiore sarà lo stress ossidativo. Lo studio da noi condotto ha preso in esame quasi trecento soggetti di ambo i sessi con età compresa tra i 60 e i 92 anni il più possibile rappresentativi dell'intera popolazione (criteri di esclusione: età inferiore a 60 anni, traumi recenti, infezioni virali o batteriche recenti o in corso, neoplasie). Lo scopo di questo studio osservazionale analitico in vitro era quello di valutare l'entità dello stress ossidativo sistemico mediante lo studio delle concentrazioni e della distribuzione dei valori di alcuni marker di stress ossidativo, ossia la concentrazione di perossidi analizzata mediante d-ROMs fast, e il potere antiossidante, misurato mediante PAT. I risultati di tale studio sono illustrati nella figura 6. Il primo e più aspettato risultato è la constatazione che mediamente nell'anziano abbiamo riscontrato un'elevata concentrazione di perossidi e un basso potere antiossidante, entrambi significativamente diversi dai valori normali di questi parametri (figura 6 tabella b). Quindi si riscontra un elevato indice di danno ossidativo a fronte di barriere antiossidanti ridotte. Questi risultati sono estremamente coerenti con quanto illustrato finora. Nel nostro studio abbiamo rilevato che uomini e donne tendono a mostrare una lieve ma significativa diminuzione del valore di PAT rispetto alla popolazione adulta, ma non diversa tra i generi. Al contrario per quanto riguarda i valori di d-ROMs l'aumento è notevole e significativamente diverso tra i generi. Interessante è anche l'ampia distribuzione riscontrata in questo dato indice di una elevata variabilità del dato nella popolazione anziana, variabilità estremamente più elevata che nella popolazione adulta. I risultati più interessanti però derivano dallo studio di questi valori in relazione all'età del soggetto. Come evidenziato in figura 6 grafici d non esiste nessuna correlazione tra età e i marker studiati nel range di età preso in considerazione. Medesima considerazione deriva anche dall'analisi mediante ANOVA dei valori dei marker divisi per gruppi di età del soggetto, figura 6 tabelle e grafici f. Questa particolare analisi statistica è stata effettuata per ricercare un eventuale valore soglia di età tale per cui potesse esserci un brusco incremento dei perossidi e/o un decremento del potere antiossidante. Tale valore non è stato trovato. Questa mancanza di correlazione età-stress ossidativo nella popolazione over 65 sembra in contrasto con quanto finora detto. Sulla base dei dati esposti, in particolare basandoci sulla mancanza di correlazione età-markers contemporanea alla presenza di elevate concentrazioni di perossidi e basso potere antiossidante, contemporanea all'ampia distribuzione dei valori del d-ROMs, in considerazione anche del fatto che una percentuale non trascurabile dei valori riscontrati sono classificabili come normali (figura 6 grafici g), noi abbiamo ipotizzato che il processo di declino dello status ossidativo non sia lineare. Noi ipotizziamo che non sia tanto il semplice passare del tempo la causa di questo declino ma il moltiplicarsi delle possibilità di eventi avversi, più o meno influenzati dal caso, dalla predisposizione e dallo stile di vita e che quindi esista un margine di

intervento nel migliorare almeno la qualità dell'invecchiamento mediante monitoraggio, valutazione ed eventuale intervento sullo status ossidativo.

tabella a: caratteristiche della popolazione e provenienza								
n	290		regione	%	regione	%	regione	%
età	71±7		Lazio	51,2	Campania	1,8	Trentino A. A.	0,9
min-max	60-92		Puglia	16,1	Sardegna	1,8	Calabria	0,6
	uomini	donne	Piemonte	7,3	Toscana	1,8	Sicilia	0,6
n	105	185	Veneto	7,0	Liguria	1,5	Basilicata	0,3
età	74 ± 7	70 ± 6	Lombardia	3,6	V. d'Aosta	1,2	Abruzzo	0,3
min-max	60-92	60-88	Emilia Rom.	3,0	Friuli V. G.	0,9		

tabella b: markers di di stress ossidativo nella popolazione under/over 65 e loro rappresentazione grafica

d-ROMs (U.Carr)	
over 65	
tutti	437 ± 95
uomini	412 ± 93
donne	450 ± 93
under 65	
tutti	275 ± 25
PAT (U.Cor)	
over 65	
tutti	2229 ± 300
uomini	2199 ± 295
donne	2246 ± 302
under 65	
tutti	2500±300



Nota: per la bibliografia dei valori under 65 si veda il capitolo 3

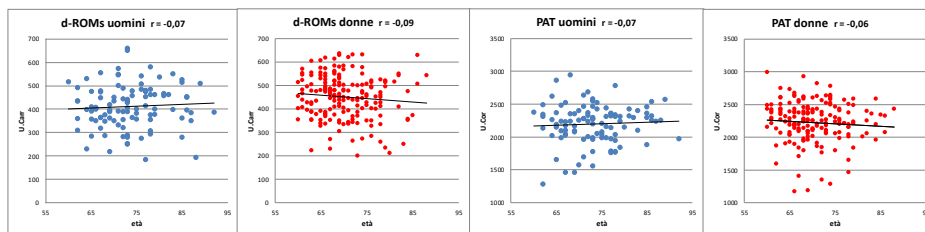
tabella c: analisi mediante t-Test dei markers di stress ossidativo

d-ROMs	tutti	uomini	donne
tutti	<0,0001	<0,0001	
uomini			<0,0001
donne			

PAT	tutti	uomini	donne
tutti	<0,0001	<0,0001	
uomini			0,21
donne			

Nota: se $p > 0,05$ la differenza non viene considerata significativa

grafici d: correlazione età-marker stress ossidativo



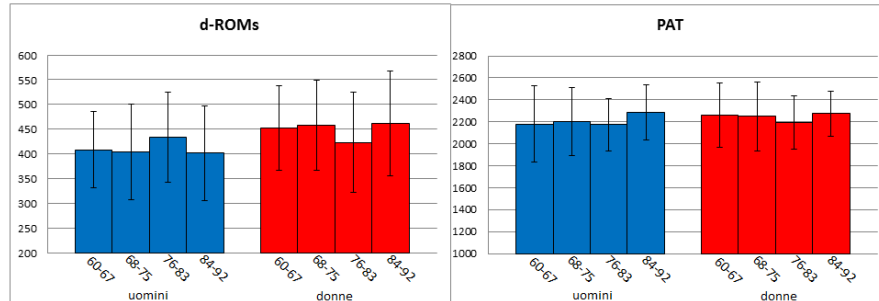
nota: nessun r calcolato è risultato significativo

Figura 6a: Riassunto risultati nostro studio

tabella e grafici e: valutazione dei marker di stress ossidativo per fasce d'età mediante ANOVA

età	d-ROMs (U.Carr)				p	PAT (U.Cor)				p
	60-67	68-75	76-83	84-92		60-67	68-75	76-83	84-92	
uomini	407 ± 78	403 ± 100	433 ± 92	401 ± 98	0,64	2179±342	2203±312	2174±253	2288±210	0,73
donne	452 ± 88	458 ± 92	423 ± 99	461 ± 106	0,34	2261±314	2250±318	2195±250	2275±212	0,78

Nota: se p > 0,05 la differenza tra gruppi non viene considerata significativ



grafici g: classificazione marker stress ossidativo secondo interpretazione

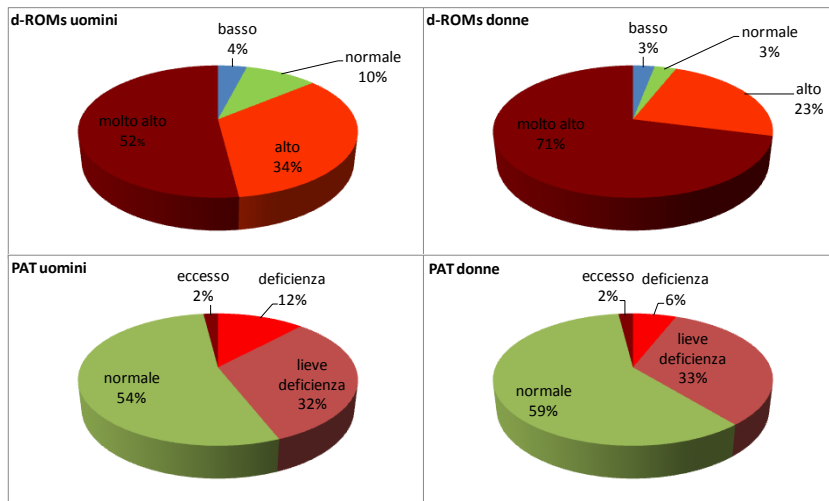


Figura 6b: Riassunto risultati nostro studio

[1] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11:298–300.
 [2] Harman, D The biological clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 1972;20:145–147.
 [3] Harman, D Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging* 1992;275(3–6):257–266
 [4] Harman D Extending functional life span. *Experimental Gerontology* 1998;33(1–2):95–112
 [5] Harman D Aging: Phenomena and Theories. *ann NY acad sci* 1998;874(1-7)
 [6] Miquel J, Economos JE, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell ageing; *Exp Gerontol* 1980;15:575–591
 [7] Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 1991;12:99–117
 [8] Lee HC, Yin PH, Lu CY et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* 2000;348:425–432
 [9] Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease. *Lancet* 1989;642–645
 [10] Virginia B.C. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, et al. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 2004;25:5–16
 [11] Tatton WG, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:195–213
 [12] Yen TC, Chen YS, King KL, et al. Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:994–1003
 [13] Cooper JM, Mann VM, Schapira AH Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci* 1992;113:91–98

- [14] Suzuki H, Kumagai T, Goto A, Sugiura T Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:542–545
- [15] Richard G Cutler Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 1991;53:373S–9S.
- [16] Hueiwei Y & Lee HC Oxidative stress, mitochondrial dna mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine* 2002, 227:671–682
- [17] Wei YH, Lu CY, Wei CY, et al. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease—consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system *Chinese Journal of Physiology* 2001;44(1):1–11
- [18] Mecocci, P, Polidori MC, Troiano, L, et al Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:1243–1248.
- [19] Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR et al Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1998;46: 833–838
- [20] Trichopoulou A, Lagiou P, Papas AM Mediterranean diet: are antioxidants central to its benefits. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health.* 1999;pp. 107–118.
- [21] Andriollo-Sanchez M, Hingler-Favier I, Meunier N, et al Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2005;59(Suppl 2):S58–S62
- [22] Salminen A, Saari P, Kihlstrom M Age- and sex-related difference in lipid peroxidation of mouse cardiac and skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988;89B:689–695.
- [23] Cand F & Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic. Biol. Med.* 1989;7:59–63.
- [24] Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol* 2004
- [25] Artur Y, Herberth B, Guemouri L, et al. Age-related variations of enzymatic defences against free radical and peroxides. *Free Radicals and Aging. Birkhäuser, Basel, 1992;pp. 359–367.*
- [26] Cook JD, Finch CA, Smith NJ Evaluation of the iron status of a population. *Blood* 1976;48:449–455
- [27] Maugeri D, Santangelo A, Bonanno MR, et al. Oxidative stress and aging: studies on an East-Sicilian, ultraoctagenarian population living in institutes or at home; *Arch Gerontol Geriatr Suppl.* 2004;9:271–7.
- [28] Berr C, Balansard B, Arnaud J et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Journal of Geriatric American Society* 2000;48(10):1285–1291
- [29] Schmidt R, Hayn M, Reinhart B et al. Plasma antioxidants and cognitive performance in middle-aged and older adults: results of the austrian stroke prevention study. *Journal of Geriatric American Society* 2998;46(11):1407–1410
- [30] García-Blanco A, Baquero M, Vento M, et al. E Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *Journal of neurological science* 2017;373:295–302
- [31] Zarkovic K 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2003;24(4–5):293–303
- [32] Praticò D, Clark CM, Liun F, et al. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of alzheimer disease. *Archives of Neurology.* 2002;59(6):972–976
- [33] Yves C Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):621S–9S.
- [34] Jenner P Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2003;53(S3):S26–S38
- [35] Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, et al. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:2696–2701
- [36] Vassalle C, Maffei S, Boni C, et al. Gender-related differences in oxidative stress levels among elderly patients with coronary artery disease. *Fertility and Sterility* 2008;89(3):608–613
- [37] Vassalle C, Landi P, Boni C, Zucchelli G Oxidative stress evaluated using an automated method for hydroperoxide estimation in patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(3):367–371
- [38] Kędziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2004;9635 – 641
- [39] Cherubini A, Zuliani G, Costantini F, et al High vitamin E plasma levels and low low-density lipoprotein oxidation are associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *JAGS* 2001;49:651–654
- [40] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:7915–7922
- [41] Ismail M, Hossain F, Tanu AR, Shekhar HU Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. *BioMed Research International* 2015: article ID 486120
- [42] Repine JE, Bast A, Lankhorst I Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341–357
- [43] Spector A ; 1. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *The FASEB Journal* 1995;9(12) 1173–1182
- [44] Beatty S et al The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey Of Ophthalmology* 2000;45(2)
- [45] Baek KH, Oh KW, Lee WY, et al. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcified Tissue International.* 2010;87(3):226–235
- [46] Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, et al. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2007; 8:124–130.
- [47] Liua AL, Zhangb ZM, Zhua BF et al. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biology International* 2004;8(12):905–911
- [48] Velarde MC, Flynn JM, Day NU, et al. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging* 2012;4(1)

- [49] Bickers DR & Athar M Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology* 2006;126: 2565–2575
- [50] Kohen R, Gati I Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 2000;148:149–157
- [51] Horvat P, Kubinova R, Pajak A, et al. Blood-based oxidative stress markers and cognitive performance in early old age: The HAPIEE Study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2016;42:297–309
- [52] Fisher BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD:oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation *Int J COPD* 2011;6:413-421.
- [53] Markoulis N, Gourgoulialis KI, Moulas A, et al Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity. *Pan Med* 2006;48:209-213.
- [54] Cornelli U & Eugenio I Antiossidanti, aspetti terapeutici e diagnostici Guna Editore 2007
- [55] Trichopoulou A & Vasilopoulou E Mediterranean diet and longevity; *British Journal of Nutrition* 2000;84(Suppl. 2):S205-S209
- [56] Trichopoulou A , Vasilopoulou E , Lagiou A Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical? *Nutrition Reviews* 1999;57(8):253-255
- [57] Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, et al. Oxidative Stress and Advancing Age: Results in Healthy Centenarians; *journal of the american geriatrics society* 1998;46(7):833–838
- [58] Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(12):2065-72.
- [59] Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG et al. effect of vitamin e and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radical Biology & Medicine* 2003;34(12):1575–1588
- [60] Karolkiewicz J, Szczêsniak L, Deskur-Smielecka E, et al. Oxidative stress and antioxidant defense system in healthy, elderly men: relationship to physical activity. *The Aging Male Volume* 2003;6(2)
- [61] Trotti R, Carratelli M, Barbieri M , et al. Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica* 2001;86:85-91
- [62] Trotti R, Carratelli M, Bo P, et al. Pro-oxidant activity and methionine metabolism in chronic alcohol abusers: relationship to alcohol withdrawal and folate administration.; *Panminerva Med.* 2004;46(3):161–164.
- [63] Kurose I, Higuchi H, Kato S, et al. Ethanol-Induced Oxidative Stress in the Liver; *Alcoholism* 1996;20:77a–85a
- [64] Nordmann R Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol* 1994;29(5):513-522.
- [65] Ventura P, Bini A, Panini R, et al. Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers . *Int J Vitam Nutr Res.* 2004;74(2):137–143.
- [66] FuscoD, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(3):377–387
- [67] U Cornelli Antioxidant use in nutraceutical .*Clinics in dermatology*; 2009;27:175-194
- [68] Ruiz-Ramos M el al. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol is useful to preventing bone loss linked to oxidative stress in elderly. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 2010;14(6)
- [69] Salonen JT, Nyyssöè K, Salonen R ,et al Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine* 2000;248:377-386
- [70] Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly:effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 2007;85:837–44.
- [71] Cesarone MS, Belcaro G, Di Renzo A,et al., Prevention of Influenza Episodes With Colostrum Compared With Vaccination in Healthy and High-Risk Cardiovascular Subjects: The Epidemiologic Study in San Valentino. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2007;13(2):130-136
- [72] Morganti P, Brunoy C, Guarneriz F, et al. Role of topical and nutritional supplement to modify the oxidative stress. *International Journal of Cosmetic Science* 2002;24:331-339
- [73] Morganti P, Fabrizi G, Cesare B Protective Effects of Oral Antioxidants on Skin and Eye Function. *Le JACQ* 2004;3(6):310–316

6.3 PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI

La stretta relazione tra alterazioni dell'equilibrio redox e patologie cardiovascolari è forse una delle più indagate ed accettate. Le prime ipotesi in merito risalgono alla fine degli anni '80 del secolo scorso [1]. Vista la vastità della bibliografia in questione è stato ritenuto opportuno fornire una panoramica dell'argomento senza entrare in dettagli che per quanto d'interesse esulerebbero dalle finalità del presente lavoro e focalizzarsi sui studi e sui risultati ottenuti coi test H&D. Nel complesso la generazione di ROS nelle cellule

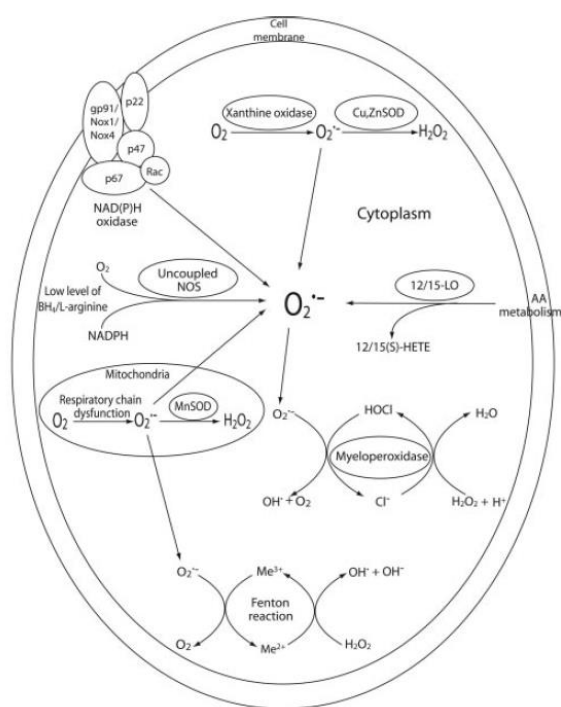


Figura 1: Produzione di ROS in una cellula endoteliale; immagine da Nageswara et al. 2005 [2]

vascolari ricalca quanto finora descritto. Come evidenziato in figura 1 tra le fonti di ROS abbiamo NAD(P)H ossidasi attivata e xantina ossidasi che generano anione superossido; disfunzioni nella catena respiratoria; le varie isoforme della SOD che dismutano l'anione superossido per la produzione di perossido di idrogeno; mieloperossidasi che genera HOCl da H₂O₂ in presenza di Cl e che H₂O₂ reagisce con metalli di transizione per produrre radicali idrossilici. Più tipica delle patologie vascolari è il disaccoppiamento delle NOS con produzione di anione superossido e la reazione di formazione dello ione perossinitrito per reazione di quest'ultimo con NO [2][3]. Le NO sintasi (NOS), e in particolare il NOS endoteliale (eNOS), possono essere fonti potenziali di anione superossido in determinate condizioni patofisiologiche[4]. In condizioni normali, questi enzimi trasferiscono gli elettroni dal gruppo eme al substrato L-arginina per formare L-citrullina e ossido nitrico (NO); 5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH4) serve come cofattore in questo processo [5]. Se la disponibilità di BH4 o L-arginina diminuisce, l'eNOS commuta

da uno stato accoppiato, che genera NO, ad uno stato disaccoppiato che genera anione superossido. L'aumento della produzione vascolare di anione superossido non altera solo il rilassamento vascolare dipendente dall'endotelio attraverso l'interazione con NO, ma il perossinitrito risultante può ossidare BH4. Ciò provoca una carenza di BH4 e disaccoppiamento di altre NOS e l'instaurarsi di un ciclo deleterio [6]. L'ottima review di Nageswara et al 2005 [1] può essere utilizzata per sintetizzare al meglio il rapporto tra stress ossidativo e le principali patologie cardiovascolari. Nota: per completezza di informazione sono riportate anche le citazioni bibliografiche in essa contenute.

Aterosclerosi

La maggior parte delle malattie cardiovascolari risulta dalle complicazioni dell'aterosclerosi. Un importante evento iniziatore per l'aterosclerosi può essere il trasporto di attraverso l'endotelio nella parete dell'arteria[7]. Le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce (SMC) e i macrofagi sono le principali fonti di ossidanti per la modifica ossidativa dei fosfolipidi. Le Ox-LDL possono danneggiare le cellule endoteliali e indurre l'espressione di molecole di adesione e fattori chemiotattici per macrofagi e monociti [8]. Questi processi portano all'attivazione e all'attaccamento di monociti e linfociti T alle cellule endoteliali [9]. Le cellule endoteliali, i leucociti e gli SMC secernono quindi fattori di crescita e chemiotattici che influenzano la migrazione di monociti e leucociti nello spazio subendoteliale[10]. I macrofagi generano specie di ossigeno reattivo (ROS), che convertono LDL in Ox-LDL fortemente ossidate, che loro volta vengono fagocitate dai macrofagi per formare una sorta di schiuma. La schiuma si combina con i leucociti per formare la striscia

grassa, e il processo continua il rilascio di fattori di crescita che inducono la migrazione di SMC nell'intima. La proliferazione di SMC, accoppiata con l'afflusso continuo e la propagazione di monociti e macrofagi converte le strisce grasse a lesioni più avanzate e, in ultima analisi, ad una placca fibrosa che sporgerebbe nel lumen arterioso. Più tardi si può verificare la calcificazione e la fibrosi continua, creando un cappuccio fibroso che circonda un nucleo ricco di lipidi. Questa formazione può anche contenere SMC morte o morenti. [2]

In *Loffredo et al 2007* [11] viene ipotizzato una stretta relazione tra la riduzione del FMD (flow-mediated dilatation) e lo stress ossidativo. Un abbassamento del FMD è riconosciuto come indice di un alto rischio di eventi avversi a livello vascolare. Tale abbassamento è ritenuto correlato ad una riduzione di NO in condizioni di stress ossidativo come mostrato dalla diminuzione di tale radicale in concomitanza dell'innalzamento dei marker di stress ossidativo. Importanti risultati sono stati ottenuti anche mediante l'uso del d-ROMs test in particolare è stato dimostrato come lo spessore medio-intimale della carotide, un riconosciuto fattore di rischio cardiovascolare, sia correlato con l'età, le LDL e col livello di perossidi misurato mediante d-ROMs, questi fattori sono indipendenti tra loro [12]. L'importanza di questo risultato risiede nella dimostrazione del collegamento tra i livelli di stress ossidativo e un riconosciuto valore di rischio cardiovascolare. Per quanto riguarda l'aterosclerosi si rimanda anche al capitolo 4 sezione OBRI e all'imponente lavoro di *Roland Stocker & John F. Kearney Jr. 2004*[13].

Ipertensione

L'ipertensione è un fattore di rischio per molte altre malattie vascolari tra cui l'aterosclerosi e l'ictus. La base molecolare dell'ipertensione è complessa; più di 50 geni sono coinvolti nella regolazione della pressione sanguigna. Tuttavia il ruolo del recettore AT1 nella regolazione dell'ipertensione è stato oggetto di un'intensa ricerca sia in vitro che in modelli animali. Angiotensina II modula l'ipertensione attraverso il suo effetto sul sistema renina-angiotensina e la stimolazione dei recettori AT1 nella parete vascolare che porta all'attivazione della ossidasi NADH/NAD(P)H nelle cellule vascolari. Lo stress ossidativo risultante è considerato un meccanismo unificante per l'ipertensione e l'aterosclerosi [14,15]. Oltre al suo effetto indiretto sull'attivazione della NAD(P)H ossidasi attraverso la stimolazione del recettore AT1, angiotensina II può anche regolare direttamente l'attivazione di NAD(P)H ossidasi[16]. Il ruolo critico dello stress ossidativo nell'ipertensione è stato dimostrato nei modelli animali: quando i ratti spontaneamente ipertensivi sono stati trattati con statine, l'anione superossido e l'attivazione del recettore AT1 diminuiscono con una riduzione concomitante della pressione sanguigna[17]. Meccanismi ossidativi multipli sono coinvolti nell'ipertensione [18]. Il trattamento dei pazienti ipertesi con AT1 non solo ha ridotto la pressione sanguigna e diminuisce i livelli di malondialdeide (MDA), marcatore dello stress ossidativo, [19] ma anche i diminuiti i cambiamenti strutturali indotti dall'ipertensione nelle arterie [20]. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che lo stress ossidativo è un modulatore di ipertensione. [2]

Arresto cardiaco

L'importanza dello stress ossidativo nell'insufficienza cardiaca cronica può essere valutata dal fatto che gli antiossidanti impediscono la progressione di diversi processi patologici, come l'ipertrofia cardiaca, l'apoptosi del miocito cardiaco, l'ischemia-reperfusion e lo stordimento del miocardio, che portano all'insufficienza cardiaca nei modelli animali. Nei miociti cardiaci del ratto, TNF- α e angiotensina II hanno indotto l'ipertrofia in modo dipendente da ROS; l'uso di antiossidanti, incluso idrossianisolo butilato, vitamina E e catalasi, ha contrastato questi effetti[21]. L'overespressione della catalasi riduce significativamente l'ipertrofia indotta da angiotensina II. Si sospetta inoltre che lo stress ossidativo indotto da NAD(P)H ossidasi porti all'ipertrofia[22]. Altre problematiche cardiache che possono portare all'arresto derivano dai ROS generati dalla xantina ossidasi e dalla disregolazione mitocondriale [23] e includono danni strutturali e disfunzioni contrattili. L'aumento della produzione di ROS può ridurre la biodisponibilità di NO e compromettere la funzione diastolica[24]. Inoltre, l'associato aumentato di perossinitrito può causare una deficienza contrattile del miocardio inattivando la Ca^{2+} -ATPasi sarcoplasmatica e sregolando l'omeostasi del Ca^{2+} [25]. [2] Tutto questo è coerente con quanto osservato da *Wolfram et al. 2004* [26] che

hanno osservato un aumento di isoprostani nel liquido pericardico proporzionale alla gravità dell'evento analizzato.

Ictus

I risultati di un certo numero di studi indicano che lo stress ossidativo causa danni cerebrali dopo l'ischemia e la reperfusion. I ROS prodotti durante l'ischemia cerebrale inducono la perossidazione dei lipidi, l'ossidazione delle proteine e il danno del DNA.[27][28] Nei roditori, la manipolazione dei geni responsabili della produzione di enzimi antiossidanti ha fornito la prova più evidente dell'implicazione dello stress ossidativo nei danni cerebrali indotti da ischemia. Nei topi riducendo l'attività della SOD, sono stati osservati fattori di infarto esacerbati e marcatori di stress ossidativi aumentati, come l'aumento della rilascio del citocromo c mitocondriale e la frammentazione del DNA dopo l'ischemia[29][30]. Al contrario, i topi con sovraespressione di SOD hanno mostrato un'aumentata protezione neuronale[31]. In un modello di reperfusion ischemia del topo, la carenza dell'enzima antiossidante GPx-1 ha determinato un triplicato aumento del volume dell'infarto del cervello, l'attivazione precoce dell'espressione di caspasi-3 e un aumento della apoptosi aumentata [32]. Conformemente a questo, l'infusione di ebselen, una molecola mimica del GPX, prima e durante l'occlusione dell'arteria cerebrale media nei ratti ha conferito una notevole protezione contro i danni ischemici[33]. Le concentrazioni diminuite di glutatione prima dell'infarto cerebrale in grave ischemia cerebrale focale transitoria nei ratti suggerisce che lo stress ossidativo potrebbe contribuire al danno cerebrale durante l'ictus[34]. Sono stati osservati significativi incrementi di omocistina plasmatica, di perossidi lipidici e NO oltre che livelli di ascorbato diminuiti nei pazienti con ictus rispetto ai controlli sani[35]. Anche rispetto a individui sani, i fagociti circolanti dei pazienti con l'ictus ischemico hanno mostrato una maggiore produzione di ROS. Queste osservazioni offrono la prova cumulativa che lo stress ossidativo svolge un ruolo distinto nella patogenesi della lesione cerebrale ischemica.[2]

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti utilizzando il d-ROMs test nell'ambito delle patologie cardiovascolari. Per esempio è stata dimostrato su di un gruppo soggetti afflitti da diabete di tipo II (n=100 vs gruppo controllo no diabete n=100), quindi in soggetti a forte rischio di stress ossidativo come in quest'ultimi esistesse una correlazione significativa tra il valore d-ROMs e il valore della pressione sanguigna. Correlazione più forte nei soggetti femminili che maschili, anche se non assente in quest'ultimi, e completamente assente nel gruppo controllo, i cui valori di d-ROMs erano significativamente inferiori [36]. Di estremo interesse sono i lavori della dottoressa Vassalle e colleghi in cui i markers di stress ossidativo vengono correlati alla mortalità per evento cardiaco. Nel lavoro del 2006 [37] i livelli di perossidi nel siero sono stati misurati in 157 pazienti consecutivi, seguiti durante un follow-up medio di 20 mesi. Si è potuto osservare che valori elevati di d-ROMs (superiori a 482 U.Carr) sono un fattore di rischio indipendente statisticamente significativo predittivo di morte cardiaca ma non di morte in generale. In altre parole nel gruppo di soggetti con alto valore di d-ROMs si è registrato un numero di morti imputabili ad eventi cardiaci significativamente superiore che non nel gruppo con bassi valori di d-ROMs. Risultati questi confermati dal lavoro del 2012 [38]dove 97 soggetti sono stati seguiti per 48 mesi ed è risultato che alti valori di d-ROMs (<482 U.Carr) sono significativo rischio di sviluppo di eventi cardiovascolari avversi maggiori.

[1] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989;320:915–924

[2] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS Oxidative Stress and Vascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:29-38

[3] Miller FR Jr, Gutterman DD, Rios CD, et al. Superoxide Production in Vascular Smooth Muscle Contributes to Oxidative Stress and Impaired Relaxation in Atherosclerosis. Circ Res. 1998;82:1298-1305

[4] Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. Am J Cardiol. 2003;91:7A–11A.

[5] Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9220 –9225

[6] Laursen J, Somers M, Kurz S, et al Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. Circulation. 2001;103:1282–1288.

- [7] Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831–842.
- [8] Rey F, Cifuentes M, Kiarash A, et al. Novel Competitive Inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res.* 2001;89:408–414.
- [9] McEver RP Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 1992;4:840–849.
- [10] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801–809.
- [11] Loffredo L, Marcocchia A, Pignatelli P, et al. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. *European Heart Journal* 2007;28:608–612
- [12] Kotani K, Koibuchi H, Miyamoto M, et al. Relationship between Reactive Oxygen Metabolites and Carotid Intima-Media Thickness in Subjects with Hypercholesterolemia *Med Princ Pract* 2010;19:496–498
- [13] Stocker E & Keaney JF jr Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis; *Physiol Rev* 2004;84:1381–1478,
- [14] Zalba G, San Jose G, Moreno M, et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001;38:1395–1399.
- [15] Nickenig G & Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.* 2002;105:393–396.
- [16] Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:981–987.
- [17] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension.* 2001;37:1450–1457.
- [18] Dellipizzi A, Guan H, Tong X, et al. Lipoxygenase- dependent mechanisms in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2000;22:181–192.
- [19] Koh K, Ahn J, Han S, et al.. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:905–910.
- [20] Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000;101:1653–1659.
- [21] Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation.* 1998;98:794 –799.
- [22] Zafari A, Ushio-Fukai M, Akers M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488–495.
- [23] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999;85:357–363.
- [24] Grocott-Mason R, Anning P, Evans H, et al Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am J Physiol.* 1994;267:H1804–H1813.
- [25] Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, et al. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res.* 2000;87:241–247.
- [26] Wolframa R, Oguoghob A, Palumboc B, Sinzingerb H Enhanced oxidative stress in coronary heart disease and chronic heart failure as indicated by an increased 8-epi-PGF₂; *The European Journal of Heart Failure* 2005;7:167– 172
- [27] Traystman R, Kirsch JR, Koehler RC Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1991;71:1185–1195.
- [28] Chan P Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:2–14.
- [29] Murakami K, Kondo T, Kawase M, et al.. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci.* 1998;18:205–213.
- [30] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* 1999;19:3414 – 3422.
- [31] Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci.* 1998;18:687–697
- [32] Crack P, Taylor JM, Flentjar NJ, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem.* 2001;78:1389 –1399.
- [33] Imai H, Graham DJ, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:56–63.
- [34] Lerouet D, Beray-Berthat V, Palmier B, et al. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2002;958:166 –175.
- [35] El Kossi M, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke.* 2000;31:1889 –1892.
- [36] Kotani K, Tsuzaki K, Taniguchi N, Sakane N; Correlation between reactive oxygen metabolites & atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus; *Indian J Med Res* 2013;137:742-748
- [37] Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, Landi P Elevated hydroperoxide levels as a prognostic predictor of mortality in a cohort of patients with cardiovascular disease; *International Journal of Cardiology* 2006;110:415 – 416
- [38] Vassalle C, Bianchi S, Battaglia D, et al. Elevated Levels of Oxidative Stress as a Prognostic Predictor of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease; *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2012;19(8):712-717

6.4 GINECOLOGIE ED OSTETRICIA

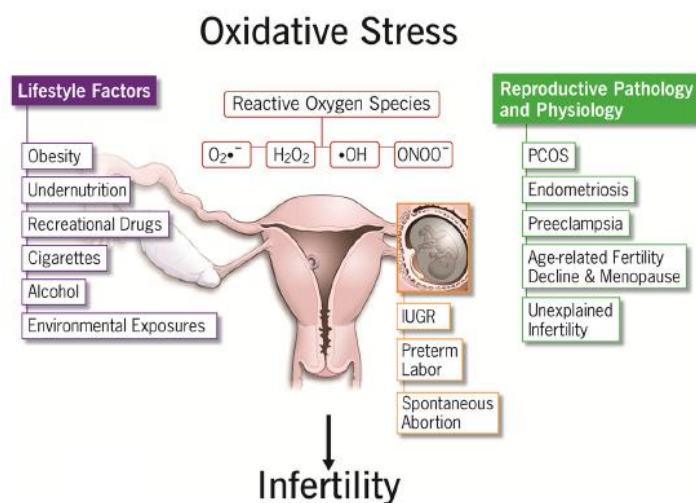


Figura 1: Principali fattori che contribuiscono allo sviluppo di stress ossidativo e loro impatto sulla riproduzione femminile; da Agarwal et al 2012 [1]

L'eccessiva produzione di ROS può influenzare la funzionalità dei mitocondri negli ovociti e negli embrioni. Nonostante la divisione cellulare sia attivata dai ROS una loro sovrabbondanza può arrestare la stessa [2][3]. Un moderato aumento dei livelli ROS può stimolare la crescita e la proliferazione delle cellule e consentire le normali funzioni fisiologiche, al contrario, un eccesso di ROS causerà lesioni cellulari (ad esempio danni a DNA, membrane lipidiche e proteine). Di particolare importanza in ambito ginecologico sono anche le RNS. Le RNS principalmente includono ossido di azoto (NO), biossido di azoto (NO_2) e ione perossinitrito ($ONOO^-$). Nei mammiferi, le RNS derivano principalmente da NO, derivato a sua volta da O_2 e L-arginina per azione di tutta una classe di enzimi denominata ossido nitrico sintetasi (NOS) utilizzando NADPH come donatore di elettroni. Dalla reazione tra ossido nitrico e ione superossido si origina lo ione perossinitrito [4][5]. L'ossido nitrico è un radicale libero con proprietà vasodilatatorie ed è un'importante molecola coinvolta in molti processi fisiologici e patologici. Sebbene gli effetti vasodilatatori del ossido nitrico possono essere terapeutici, un'eccessiva quantità porta alla produzione di RNS le quali possono influenzare la struttura delle proteine e quindi possono causare cambiamenti nell'attività enzimatica delle stesse, modificare l'organizzazione citoscheletrica e compromettere la trasduzione del segnale cellulare. Lo ione perossinitrito è in grado di indurre la perossidazione dei lipidi e la nitrosazione di molte molecole di tirosina le quali normalmente agiscono come mediatori di enzimi e come fattori della trasduzione di segnale [6-8]. Tra le varie condizioni che determinano la maggior espressione di NOS vi è l'ipossia. [9][10]. L'importanza del giusto bilancio dello status ossidativo in ambito riproduttivo femminile è nota. Ogni mese, una coorte di ovociti inizia a crescere e svilupparsi nella ovaia, ma la meiosi procede in solo uno, l'ovocita dominante. Questo processo è coadiuvato da un aumento di ROS e inibito dagli antiossidanti. Al contrario, la progressione della meiosi è promossa da antiossidanti [11]. È noto inoltre che durante la gravidanza normale, l'attivazione delle leucociti produce una risposta infiammatoria che è associata con una maggiore produzione di anioni superossido nel primo trimestre; inoltre è considerata normale una condizione di forte stress ossidativo durante il secondo trimestre, considerazione questa supportata dall'elevata produzione mitocondriale di perossidi lipidici e radicali liberi nella placenta durante il progredire della gestazione [1]. Come già accennato ad inizio paragrafo alcune problematiche in ambito riproduttivo sembrano essere correlate con una situazione di stress ossidativo.

Infertilità inspiegabile

L'infertilità non spiegata è definita come l'incapacità di concepire dopo 12 mesi di rapporti non protetti in coppie dove le cause conosciute di infertilità sono state escluse. È quindi considerata una diagnosi di esclusione. Naturalmente la sua fisiopatologia risulta poco chiara ma la letteratura suggerisce un possibile contributo dello stress ossidativo. In particolare è stato riscontrato un aumento di marker della perossidazione, come MDA e una diminuzione della capacità antiossidante nella cavità peritoneale [12-14]. Inoltre sono state osservate diminuite quantità di glutazione e vitamina E [14]. Il compromesso bilancio ossidativo del liquido peritoneale può essere un fattore determinante nella patogenesi dell'infertilità idiopatica, ma non sembra che trattamenti a base di antiossidanti, quale ad esempio N-acetil cisteina e cofattori dell'induzione dell'ovulazione abbiano avuti risultati positivi. [1]

Aborto spontaneo

L'aborto spontaneo si riferisce alla terminazione involontaria di una gravidanza prima della vitalità fetale a 20 settimane di gestazione o quando il peso fetale è <500 g. L'etiologia consiste principalmente in anomalie cromosomiche che rappresentano circa il 50% di tutti gli aborti. Anomalie congenite e fattori materni come anomalie uterine, infezioni e malattie costituiscono le cause rimanenti [15]. Lo stress ossidativo oscillante della placenta è stato proposto come un fattore causale di aborto spontaneo. In una gestazione normale si ha un'impennata della produzione di ROS nella placenta tra la decima e l'undicesima settimana di gestazione, controbilanciato dall'aumento della capacità antiossidante, in una sorta di adattamento alle nuove condizioni ossidative. Nei casi di aborto spontaneo l'insorgenza della circolazione intraplacentare materna si verifica prematuramente e sporadicamente tra l'ottava e la nona settimane di gravidanza [16]. In questa situazione nella placenta, sono stati rilevati alti livelli di HSP70 e nitrotirosina [17], marcatori di apoptosi sono stati riscontrati nei villi, suggerendo danni di tipo ossidativo al trofoblasto con successiva terminazione della gravidanza [4]. Gli enzimi antiossidanti non sono ancora sufficientemente espressi ed sufficientemente attivi per contrastare la precoce presenza di ROS dal momento che la loro espressione e attività aumenta con l'età gestazionale [16]. Quando lo stress ossidativo si sviluppa troppo presto in gravidanza può compromettere lo sviluppo della placenta e/o ottimizzare la degenerazione sinciziotrofoblastica culminando nell'interruzione di gravidanza [15].

Può verificarsi anche una diminuzione della capacità di disintossicazione della glutazione perossidasi, inoltre è stata spesso riscontrata una deficienza di selenio sia nell'aborto spontaneo che ricorrente [18][19]. L'apoptosi dei tessuti placentari può derivare da processi infiammatori indotti da stress ossidativo provocati da tutta una varietà di fattori. Diverse eziologie possono essere soggette ad iniziazione impropria del flusso sanguigno materno nello spazio intervilloso [1]. L'integrazione antiossidante è stata studiata in ambito di prevenzione dell'introduzione precoce di gravidanza, con l'idea di integrare le ridotte capacità antiossidanti placentari a fronte di un precoce ambiente ossidativo tuttavia una metanalisi degli studi rilevanti non è riuscita a segnalare la presenza di effetti benefici dovuti dell'aggiunta di antiossidanti [20].

Aborto spontaneo ricorrente

L'aborto spontaneo ricorrente è definito come una storia di 3 o più interruzioni di gravidanza consecutive. Nel 50% dei casi si possono individuare fattori causali ma nei rimanenti non sempre la causa è chiara anche se viene indicato un ruolo dello stress ossidativo nella eziologia della perdita di gravidanza ricorrente [21][22]. È stato recentemente suggerito che la madre possa convogliare nella placenta mediante le arterie spirali cellule NK in ottica di regolatori dello sviluppo e del rimodellamento dei vasi. È noto che i fattori angiogenici svolgono ruoli chiave nel mantenimento del rimodellamento dell'arteria a spirale. Il coinvolgimento di cellule NK uterine in casi di aborto spontaneo ricorrente è stato riconosciuto fin da subito sulla base di un osservato aumento dei livelli dei fattori angiogenici secreti dalle cellule NK uterine [23], nonché da aumentata angiogenesi delle cellule endoteliali in vivo e in vitro indotta da cellule NK uterine [24] nelle pazienti soggette ad aborti spontanei ricorrenti. Le pazienti in esame hanno mostrato un aumento delle cellule NK dell'endometrio, che erano positivamente correlati alla densità dei vasi endometriali, di conseguenza è stato suggerito un aumento dell'angiogenesi preimpianto, con precoce circolazione materna intraplacentare [25]. Con le conseguenze già descritte. Il deterioramento del

sinciziotrofoblasto e lo stress ossidativo che si verificano come conseguenza di una placentazione anomala possono spiegare l'aumentata sensibilizzazione del sinciziotrofoblasto allo stress ossidativo durante il primo trimestre, e questo potrebbe contribuire in modo significativo all'aborto spontaneo ripetuto idiopatico [26]. Nel plasma di donne aventi una storia di ripetuti aborti spontanei sono stati trovati alti livelli di lipoperossidi e MDA, bassi livelli di vitamina E e di β -carotene, oltre che un aumentato glutathione, probabilmente come risposta alle condizioni di stress ossidativo [27][28]. Sono stati inoltre monitorati bassi livelli di antiossidanti enzimatici quali GPX, SOD e CAT. La combinazione di acido folico e N-acetil-cisteina sembra piuttosto efficace nel trattamento di pazienti con storia di aborti spontanei ripetuti idiopatici [29][30] inibendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie [31] e l'apoptosi endoteliale [32] e mantenendo stabili i livelli intracellulari GSH.

Restrizione intrauterina della crescita (IUGR)

La restrizione della crescita intrauterina è definita come un peso alla nascita inferiore al decimo percentile ed è legata ad un'aumentata morbilità e mortalità. Nonostante le cause non siano del tutto note sembra giocare un ruolo importante l'insulto ossidativo da ipossia re-ossigenazione in seguito a preclanzia. Lesioni a livello dell'arteria spirale, sviluppo improprio delle arteriole, sviluppo improprio dell'albero villosa e impoverimento del sinciziotrofoblasta sono riconosciuti come fattori importanti nella patogenesi della restrizione intrauterina della crescita [33]. Nelle pazienti afflitte da tale condizione sono stati rilevati un aumento dell'attività dei radicali liberi e della perossidazione lipidica [34], MDA e l'enzima xantina ossidasi contemporaneamente a livelli più bassi di antiossidanti nel plasma, nella placenta e nel cordone ombelicale [33]. Sono state rilevate anche elevate concentrazioni urinarie di 8-OxOdG, un marker di ossidazione del DNA [35]. L'aumento dello stress ossidativo, specialmente nel reticolo endoplasmatico nel sinciziotrofoblasta, diminuisce la traduzione e l'espressione delle proteine a livello placentare arrivando ad innescare l'apoptosi. Inoltre lo stress ossidativo del reticolo endoplasmatico può esacerbare le risposte infiammatorie [36][37]. Modificazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} possono portare a problemi di perfusione. La cronicità di questi eventi possono spiegare la restrizione placentare della crescita [38].

Parto pretermine

Il parto è definito prematuro se avviene prima della 37esima settimana di gestazione ed è la principale causa di mortalità. Al di là delle loro differenze di tempistica, parto a termine e parto prematuro sono da tempo considerati come processi simili che si verificano attraverso un 'percorso comune'. La sequenza di contrazione uterina, dilatazione cervicale, e l'attivazione decidua costituisce la componente uterina di questo processo [39]. L'attivazione di questo percorso attraverso segnali fisiologici si traduce in un parto a termine, mentre il travaglio prematuro può verificarsi da attivazione spontanea di aspetti isolati del percorso comune a causa di condizioni patologiche che possono essere indotte da molteplici cause [40] o fattori di rischio. Le principali cause includono overdistensione uterina, ischemia, infezione, malattia cervicale, disturbi endocrini [39], emorragia della decidua e attivazione materno-fetale dell'asse ipotalamo-ipofisario [41]. Di queste etiologie, le infezioni in particolare intrauterine sono considerate un fattore particolarmente critico [42]. Questi meccanismi patogeni convergono su un percorso comune che prevede un'aumentata espressione della proteasi e di uterotonici. Il parto induce cambiamenti nelle membrane chorioamniotiche che sono coerenti con stati infiammatori acuti localizzati nonostante l'assenza di prove istologiche di infiammazione [43]. I ROS possono attivare il fattore NF- κ B, che stimola l'espressione di COX-2 e favorisce l'infiammazione con la successivo parto [41]. Sia nelle donne che hanno avuto parto a termine che a pretermine è stata riscontrata una diminuzione dell'espressione di GPX, diminuzione interpretata come riduzione delle difese antiossidanti ad opera dei ROS [44]. Altresì è stato rilevato una concentrazione di MDA e 8-OHdG significativamente superiore e GSH significativamente inferiore nel sangue di donne aventi avuto parto prematuro rispetto a parto a termine. Questo risultato ha suggerito che nelle donne con parto pretermine le difese antiossidanti siano ridotte e non sufficienti a contrastare i ROS. Ipotesi confermata anche dai bassi valori di FRAP e TAS riscontrati [45][46]. La concentrazione di MnSOD aumenta come risposta protettiva all'infiammazione e allo stress operativo e opera un ruolo di down-regulation del fattore NF- κ B[46]. Un'aumentata espressione di MnSOD è stata osservata nel feto e nelle partorienti in caso di parto prematuro[47].Le informazioni note supportano l'ipotesi che un ambiente materno in stress

ossidativo aumentato e con ridotte difese antiossidanti rende sia la madre che il feto più suscettibili al danno indotto da ROS e che l'infiammazione così prodotta induca lesioni ai tessuti e successivo parto prematuro[48].

Preeclampsia

La preeclampsia è un disturbo multisistemico complesso che può interessare anche donne precedentemente normotensive. La preeclampsia è la principale causa di morbilità e di mortalità materna e fetale. In tutto il mondo è presente nel 3-14% delle gravidanze[49]. Sintomi clinici della preeclampsia sono una pressione arteriosa > 140/90 mm Hg, misurata in due occasioni diverse ad almeno 6 ore di distanza contemporanea alla proteinuria ($\geq 0,3$ g di proteine in un campione di urina di 24 ore o persistente dopo 20 settimane di gestazione). I principali disturbi patofisiologici consistono in vasospasmo locale e nella porosità dell'albero vascolare con conseguente travaso di liquido intravascolare nello spazio extravascolare [1]. L'esatto meccanismo del vasospasmo non è ben chiarito, ma la ricerca ha dimostrato che le interazioni tra i vasodilatatori e vasocostrittori, quali NO, endotelina I, angiotensina II, prostaciclina e trombossano, possono causare la diminuzione della perfusione di certi organi [50]. L'ischemia placentare/ipossia è considerata come un importante fattore nell'induzione dello stress ossidativo, il quale può portare alla disfunzione delle cellule endoteliali e ad una disfunzione vasocostrittiva sistemica [51]. I ROS sono importanti per molte normali funzioni fisiologiche e per lo sviluppo della placenta ma in presenza di preeclampsia, lo stress ossidativo è molto più elevato rispetto alle gravidanze normali [52]. La preeclampsia precoce è associata a elevata concentrazione di proteine carbonilate, lipidi perossidici, residui di nitrotirosina e DNA ossidato, tutti indicatori di stress ossidativo placentare [53]. Lo stress ossidativo della preeclampsia si pensa sia originato da un'insufficiente conversione dell'arteria a spirale [54] che porta ad una diffusione placentale discontinua e a piccoli livelli di lesioni da ischemia-riperfusione [55]. La lesione da ischemia-riperfusione stimola produzione di ROS da parte di cellule trofoblastiche e endoteliali [56]. Lo stress ossidativo placentare può essere rilevato attraverso un aumento delle concentrazioni sieriche di i ROS, primo tra tutti il H_2O_2 [57], o marker di perossidazione lipidica come MDA [58] e sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico[57]. L'aumento dei livelli di un vasocostrittore come H_2O_2 parallelamente a livelli ridotti del vasodilatatore NO [57] sono stati osservati in preeclampsia e possono essere considerati la causa della vasocostrizione e dell'ipertensione associate alla malattia. L'attivazione dei neutrofili che si verifica in preeclampsia è un'altra importante fonte di ROS, e ne risulta una maggiore produzione dell'anione superossido con diminuzione di NO, e formazione di ione perossinitrito, con conseguente danno endoteliale in pazienti con preeclampsia [59]. Alla preeclampsia sono associati diminuiti livelli di eme-ossigenasi, un enzima antiossidante che ha proprietà antinfiammatorie e citoprotettive, essendo tra l'altro un precursore della bilirubina,[60], suggerendo un calo dei meccanismi protettivi. Sono state monitorate anche riduzioni dell'espressione cellulare di mRNA di eme-ossigenasi, SOD, GPX e di catalasi nel sangue di pazienti preeclampici [61][62][57]. I membri della famiglia enzimatica delle NAD(P)H ossidasi sono importanti generatori dell'anione superossido in molte cellule, tra cui trofoblasti e cellule endoteliali vascolari. L'aumento della produzione di anioni superossido mediante l'attivazione di questi enzimi può verificarsi attraverso diversi meccanismi fisiologici. Gli autoanticorpi contro il recettore angiotensinogeno AT1 [63] possono stimolare l'attività di NAD(P)H ossidasi, portando ad una maggiore generazione di ROS. In colture di trofoblasti e cellule muscolari lisce è stato osservato il recettore l'AT1 di donne con preeclampsia promuovere la generazione di anione superossido mediante sovraespressione di NAD(P)H ossidasi [64]. Le donne preeclampiche producono maggiori quantità di ROS e mostrano un'espressione maggiore di NAD(P)H di quelli senza la malattia [64]. Il meccanismo di attivazione del NAD(P)H placentare non è ancora chiara, ma è noto che tra la sesta e la l'ottava settimana si ha la sua attivazione; un'attivazione precoce può essere tra le cause di stress ossidativo. Livelli di TNF- α , e LDL ossidate sono maggiori nella preeclampsia ed è nota la loro capacità di attivare l'isoforma endoteliale di NAD(P)H ossidasi, aumentando ulteriormente in ultima analisi i livelli di anione superossido [65]. Altra prova dell'implicazione dello stress ossidativo nella patogenesi della preeclampsia è il fatto che donne preeclampiche mostrano livelli elevati di Paraoxonasi-1, un enzima che agisce per compensare l'ossidazione LDL e prevenire la perossidazione dei lipidi nel siero materno [66]. È stato osservato però che

in caso di preeclampsia grave quest'ultimo enzima risultata notevolmente diminuito nelle pazienti con grave preeclampsia. Questi risultati possono indicare un eccessivo consumo di antiossidanti per combattere l'aumento della perossidazione lipidica che può danneggiare l'endotelio vascolare, e probabilmente può essere coinvolta nella patogenesi della preeclampsia [67]. Le donne colpite da preeclampsia hanno anche uno status antiossidante totale (TAS) ridotto, GPX placentare ridotto [62][68][69] e bassi livelli di vitamine C ed E [57]. L'inadeguata assunzione di vitamina C sembra essere associata ad un aumentato rischio di preeclampsia [70] tuttavia la maggior parte delle prove fino ad oggi hanno trovato che la supplementazione antiossidante di routine durante la gravidanza non essere efficace per ridurre il rischio di preeclampsia. [71-73]

Lo stile di vita ha importanti ripercussioni sullo status ossidativo materno. Tra i comportamenti scorretti più diffusi vi sono la sovranutrizione, spesso sfociante in fenomeni di obesità, e la malnutrizione. I depositi di grasso viscerale sono di fatto una fonte di acidi grassi, L'effetto combinato di alti livelli di lipidi e la presenza di stress ossidativo, condizione tipica della condizione di obesità, stimola la produzione di lipoperossidi e lipoproteine ossidate. Un elevato BMI materno può avere effetti negativi sui mitocondri degli ovociti condizionando il metabolismo embrionale. Inoltre l'aumento dei livelli di acido grasso non esterificato nel plasma può indurre la formazione del radicale nitrossido [1]. Anche il limite opposto non è salutare infatti le donne malnutrite e quelle con un BMI basso sono soggette ad un aumentato rischio endoteliale dipendente dallo stress ossidativo [74]. Nell'utero di donne malnutrite tende ad accumularsi NO suscettibile di attacco da parte dell'anione superossido, quest'ultimo presente in aumentata quantità a causa della diminuzione dell'attività delle SOD. La combinazione di questi fattori può portare a danni di varia natura all'endotelio [75]. In donne con elevato o ridotto BMI sono stati riscontrati elevati livelli di MDA e di 8-OHdG, chiaro segno di danni ai lipidi e al DNA ad opera di stress ossidativo [74][76]. Il fumo è un altro noto fattore di stress ossidativo, evidenze suggeriscono che il tabagismo materno induca stress ossidativo sia alla madre che al feto [77]. In linea generale nei fumatori si riscontra un aumento dei polimorfonucleati fonte di ROS. Il fumo sembra inoltre incentivare la trasformazione della xantina deidrogenasi a xantina ossidasi, noto enzima produttore di ROS in grandi quantità, oltre che essere fonte di ferro, metallo catalizzante la reazione di Fenton, quindi la formazione di radicali liberi a partire dai perossidi. Altra causa di stress ossidativo nel fumo di sigaretta è la presenza nello stesso di NO, il quale reagendo con lo ione superossido forma perossinitrito [78]. Altra dannosa abitudine da un punto di vista dello status ossidativo è l'assunzione di alcool anche in quantità moderate. Un recente studio mostra come l'assunzione di alcolici produca un preminente stress ossidativo materno ed elevati livelli dei prodotti ossidati del glutathione, evidente sintomo di sovravoro del sistema antiossidante [79]. L'eliminazione primaria dell'etanolo avviene mediante un meccanismo di tipo ossidativo a livello epatico [80]. Dopo l'ingestione esso subisce la deidrogenazione e conseguente trasformazione in acetaldeide; il passo successivo è un'ulteriore deidrogenazione da acetaldeide ad

acido acetico con produzione di radicali acetili e metilici come sottoprodotti. Questi metaboliti sono responsabili della generazione di ROS, nonché radicali liberi essi stessi. L'uso regolare dell'alcool porta così alla sovrapproduzione di ROS, innescando la perossidazione dei lipidi, abbassando l'attività antiossidante delle SOD e riducendo i livelli di glutathione [81][82]. L'assunzione di alcool sembra essere correlata anche all'aborto spontaneo [83] anche a causa della sua natura pro-ossidante, l'uso di etanolo può portare ad apoptosi e danni ai sistemi protettivi

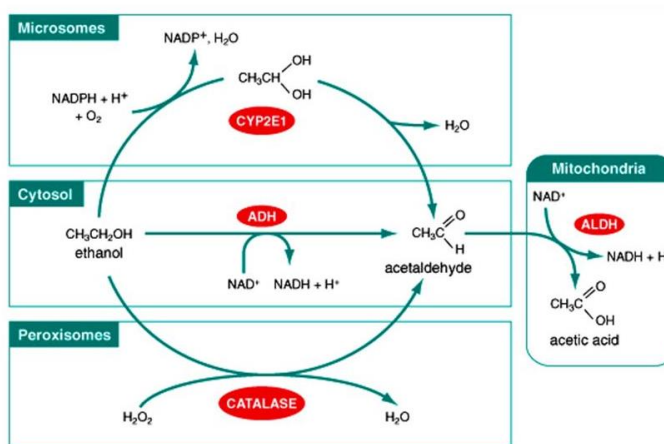


Figura 2: Metabolismo dell'etanolo

placentari. Studi su roditori hanno mostrato una possibile associazione tra etanolo e aumento placentare di NOS all'interno dei sinciziotrofoblasti con conseguente alterazione del flusso sanguigno. Tra gli effetti avversi possiamo annoverare anche la ridotta crescita del feto[80][81][84]. Altre abitudini deleterie per lo status ossidativo, oltre che per altri effetti, è l'uso di droghe ricreative quali cannabinoidi e cocaina. [1] Abitudine benefica è invece il moderato esercizio fisico. L'esercizio fisico produce uno stato ossidativo dovuto all'eccessiva generazione ROS. Qualsiasi tipo di esercizio aerobico o anaerobico estremo come la maratona o allenamenti coi pesi possono contribuire alla generazione di danni cellulari ma un modesto incremento di ROS comporta un aumento della [85].

L'importanza dello status ossidativo è importante anche in altri ambiti della ginecologia al di fuori della gestazione. Per esempio molto importante è il collegamento tra stress ossidativo e ciclo mestruale. A questo proposito riporto risultati e conclusioni di tre interessanti studi. Nel primo condotto da *Serviddio et al. 2002* [86] vengono analizzati i livelli di glutathione (GSH), glutathione ossidato (GSSG) e MDA, presenti a livello endometriale in relazione alla fase del ciclo. Inoltre questi analiti sono stati correlati con i livelli ormonali estrogenici (E_2) progestinici (P4), di ormone luteinizzante (LH) e follicolo-stimolante (FSH). Questi dati mostrano che la fase di picco dello stress ossidativo si verifica nelle fasi centrali del ciclo (fase follicolare tardiva e precoce fase luteale), o meglio al momento della maturazione ovulare. Questa fase di stress ossidativo si verifica con un aumento della produzione di GPX con conseguente riduzione di GSH e aumento del GSSG, mentre i livelli di MDA sono sostanzialmente stabili. Il massimo stress ossidativo sembra corrispondere ai picchi di E_2 e LH, mentre il picco P4 sembra corrispondere a una fase di recupero delle difese antiossidanti. Più dettagliatamente nello studio preso in esame si è voluto valutare se i cambiamenti ciclici nel pattern ormonale possano spiegare la modulazione dei principali indici redox nell'equilibrio ossidativo. I risultati hanno dimostrato chiaramente che la maggior parte delle variazioni nell'equilibrio ossidativo potrebbe essere spiegata dal ciclo ormonale sessuale. I loro dati mostrano che il ciclo dell'estrogeno ha l'influenza maggiore sui cambi di redox. I dati mostrano che le principali variazioni del metabolismo del GSH si verificano nelle cellule endometriali durante la fase estrogenica; questi sembrano essere strettamente correlati ai cambiamenti ormonali probabilmente perché la domanda di ossigeno e l'attività di sintesi aumentano in questa fase. Finora la fase durante la quale si formano i perossidi lipidici è una questione di dibattito. Infatti, sebbene diversi studi suggeriscano una sovrapproduzione di radicali liberi nell'alta fase estrogenica, a causa di un aumento del consumo di ossigeno in seguito alla crescita cellulare e alla sintesi del DNA [87][88], una condizione di stress ossidativo notevole non sembra verificarsi durante il ciclo mestruale. L'assenza di varianti MDA sosterrebbe questa ipotesi ma questo aspetto verrà chiarificato in uno dei prossimi studi presentati. L'induzione della perossidazione lipidica da parte degli estrogeni è ampiamente documentata [89]. Questi risultati possono portare all'ipotesi che gli estrogeni stessi possono indurre lo stress ossidativo. Una possibile spiegazione di questo apparente paradosso biologico è che gli effetti benefici di E_2 potrebbero essere correlati ai suoi effetti proossidanti [90]; Alcuni studi recenti hanno documentato l'induzione di enzimi antiossidanti da ossidanti [91][92]. Lo studio di Serviddio e colleghi indica che i cambiamenti del ciclo degli estrogeni sono strettamente correlati al metabolismo del GSH e suggerisce che il modello ormonale è coinvolto nel mantenere l'equilibrio ossidativo ottimale nell'endometrio stimolando l'attività degli enzimi antiossidanti e regolando il metabolismo del GSH. Poiché l'endometrio umano è sotto rigoroso controllo ormonale e GSH è richiesto per lo stato di redox ottimale dei gruppi tiolici, per le reazioni di disintossicazione, e per la regolazione del metabolismo, GSH sembra svolgere un ruolo fondamentale nel mantenimento delle funzioni delle cellule endometriali.

Il secondo studio preso in esame condotto da *Massafra et al. 2000* [93] ha preso in esame GPX, SOD e CAT negli eritrociti di donne durante le varie fasi del ciclo. I livelli di GPX aumentano nella fase follicolare tardiva e nella fase luteale precoce rispetto ad altre fasi mentre rimangono inalterati i livelli SOD e CAT. Anche in questo studio si correlano i cambiamenti dei livelli di E_2 ai cambiamenti dei livelli di GPX. In estrema sintesi, l'aumento di uno è contemporaneo all'aumento dell'altro. I livelli plasmatici di FSH, LH, P4, testosterone e androstenedione, invece non mostrano relazioni tempo-correlate con i livelli di GPX eritrocitaria mentre non significative sono le variazioni nei livelli SOD e CAT. Da quello che è stato osservato non sembra che E_2 abbia una diretta azione antiossidante ma esattamente l'opposto, in quanto il picco si

avrà al momento dell'attivazione cellulare necessaria per aumentare la produzione di energia in fase di secrezione, con un aumento successivo nella produzione di ROS quali superossido, H₂O₂ e radicali idrossilici. Se l'ovulo non è fecondato, essendo la fase luteale caratterizzata da un aumento dell'attività cellulare e dalla proliferazione del tessuto resta simile in termini di ossidazione. Lo stress ossidativo plasmatico non è mai stato continuamente esaminato durante tutte le fasi della del ciclo mestruale. Questa mancanza di informazioni viene sopperita dallo studio condotto da *Cornelli et al. 2013* [94] in cui viene misurata la concentrazione di perossidi a livello plasmatico di 20 donne (età 30,8±5,7; peso 63,2±6,7; altezza 1,67±0,07, BMI 22,6±1,58) mediante d-ROMs test parallelamente alla misura di E₂ e P4. L'utilità di questa misura sta nel fatto che siccome i perossidi possono derivare non solo dall'ossidazione lipidica ma anche dall'ossidazione di proteine, zuccheri, DNA ecc.. la misura dei perossidi totali è probabilmente più sensibile agli effetti dello stress ossidativo rispetto al singolo marker, come per esempio la MDA [95]. Dai dati osservati una donna è in una condizione di stress ossidativo per buona parte del ciclo mestruale. L'aumento di lipoperossidi anticipa di qualche giorno il picco di estrogeni e poi l'andamento è simile, con una tendenza alla diminuzione all'aumento del P4, come si vede in tabella 1. Già questa diversificazione dei valori del d-ROMs nell'arco del ciclo mestruale porta all'importante considerazione che gli indici di stress ossidativo nelle donne andrebbero valutati in relazione al periodo mestruale. Se lo stress ossidativo varia a seconda del ciclo mestruale le sue correlazioni con le varie patologie dovrebbe tener conto di questa "ciclicità ossidativa". Di fatto, sia la fase estrogenica che quella progestinica sono fasi di attivazione; la fase proliferativa implica un aumento della produzione e consumo energetico, che poi continua in quella più propriamente luteale di sviluppo vascolare (lacune vascolari) con una consistente produzione di monossido d'azoto (NO). L'NO, oltre ad avere natura radicalica, è un importante mediatore per la vasodilatazione, di rilassamento del miometrio, di azione antiaggregante e di stimolo angiogenetico che si svolge attraverso il VEGF (vascular endothelial growth factor); quest'ultimo a sua volta stimola le NO sintetasi, a indicare che l'NO cerca di mantenere il proprio livello con autoinduzione di NO sintetasi. Tale sintesi, pur svolgendosi attraverso tutte le fasi mestruali sia nella tipologia eNOS (endoteliale) che iNOS (indotta), aumenta in modo sensibile sotto stimolo progestinico. Tutto questo sistema deve essere controbilanciato in modo molto preciso. In concomitanza a questo incremento della sintesi di NO, si verifica localmente anche un aumento dell'attività della SOD. La SOD, operando la dismutazione dell'anione superossido, a formare H₂O₂ e O₂, impedisce la reazione tra NO[•] e O₂[•] che tende a produrre lo ione perossinitrito il quale, oltre ad avere un elevato potere ossidante, sottrae appunto NO limitandone la sua disponibilità. Tuttavia, l'elevato livello di NO disponibile ha comunque la possibilità di reagire con O₂[•], in quanto la reazione tra i due è in assoluto la più rapida dell'organismo (1 x 10⁻⁹ sec). Perciò non deve meravigliare che il risultato vettoriale di azione antiossidante e pro-ossidante della fase progestinica si stabilizzi su una dimensione di stress ossidativo. [94]

	t1	t3	t6	t9	t12	t15	t18	t21	t24	t27
d-ROMs CARR.U.	284	273	284	299 ^a	336 ^a	378 ^a	326 ^a	315 ^a	323 ^a	276
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	38.0	47.0	34.6	31.3	66.8	115.6	66.4	56.3	51.1	44.8
E₂ pg/mL			99	222 ^b	195 ^b	134 ^b	157 ^b	126		
			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		
			33.7	34.2	39.9	36.2	36.9	38.4		
P4 ng/mL					1.7		6.3 ^c	13.0 ^c	5.9 ^c	
					+/-		+/-	+/-	+/-	
					0.54		3.0	6.2	3.8	

^aDunnett's Two-Sided Multiple Comparison Test, p < 0.05 t_n Vs t₁.

^bDunnett's Two-Sided Multiple Comparison Test, p < 0.05 t_n Vs t₆.

^cDunnett's Two-Sided Multiple Comparison Test, p < 0.05 t_n Vs t₁₂.

Tabella 1: Risultati dello studio condotto da Cornelli et al 2013 sullo stress ossidativo durante il ciclo mestruale; tabella da *Cornelli et al 2013* [94]

Durante la normale fase del ciclo mestruale sarebbe importante analizzare anche il comportamento dei principali sistemi antiossidanti che consentono di evitare l'instaurarsi di fenomeni trombotici (frequenti nella condizione di stress ossidativo) derivanti da un prevalere delle proteasi coagulanti (esempio trombina), in quanto esse sono più resistenti allo stress ossidativo rispetto alle antiproteasi anticoagulanti

(serpine). Un meccanismo di protezione da tali fenomeni trombotici, potrebbero derivare dalla presenza nella donna di un particolare ormone peptidico, la relaxina (RLX), la quale potrebbe agire come un potente stimolatore dei sistemi antiossidanti. La RLX è un polipeptide formato da due catene peptidiche stabilizzate sia internamente che esternamente tra di loro da ponti S-S. Essa è prevalentemente secreta dal corpo luteo e impedisce le alterazioni del flusso endometriale per evitare fenomeni di ischemia e riperfusione, sia durante la fase proliferativa del ciclo, che durante l'eventuale gravidanza. Il fenomeno di ischemia e riperfusione provoca stress ossidativo, sia per produzione di ROS che per stimolo chemiotattico. L'azione della RLX si svolge sovra-regolando la iNOS e la eNOS oltre che l'angiogenesi in particolare - ma non esclusivamente- nell'endometrio. Un aspetto importante dell'azione della RLX è l'inibizione dell'adesività endoteliale delle cellule a valenza infiammatoria (linfociti, macrofagi) e dell'aggregazione piastrinica. Nel complesso quindi, la RLX influenza in modo molto consistente la perfusione e la distribuzione ematica nell'endometrio, mantenendo in esso le condizioni ideali di flusso e svolgendo un'azione tipicamente antiinfiammatoria e antitrombotica e si oppone agli effetti dello stress ossidativo; pertanto potrebbe svolgere un'azione di protezione dallo stesso. [94]

Gli effetti degli estrogeni sullo status ossidativo sembrano confermati dai dati degli studi condotti su donne assuntive contraccettivi orali a base dei medesimi ormoni, esse risultano in perenne stress ossidativo. [96][97]. Come descritto nello studio precedente lo stress ossidativo durante il ciclo sembra andare di pari passo con le modificazioni del pattern ormonale dello stesso, questo stress ossidativo "naturale" viene però controbilanciato da tutto un sistema di meccanismi ed antiossidanti endogeni atti a limitarne i danni [94][98][99]. Ogni tipo di contraccettivo orale a base di estrogeni/progestinici genera un picco ematologico in estrogeni o progestinici (a seconda del tipo di contraccettivo) che non è su scala fisiologica e pertanto un'ossidazione che normalmente può essere considerata "leggera e controllabile" diventa stress ossidativo. Come dimostrato dagli alti livelli di LDL ossidato, dall'aumento di rame ematico e dalla sovrapproduzione di ossidi d'azoto [96][97]. Altra prova dello stress ossidativo indotto dall'assunzione di contraccettivi orali viene dalla comparazione dei livelli di d-ROMs in donne in trattamento e non con gli stessi come si vede in figura 3. I dati derivano da *Cornelli et al. 2013* [94] per le donne non assuntive contraccettivi orali (nOC) e da *Finco et al 2011* [98] per le donne assuntive contraccettivi orali (OC).

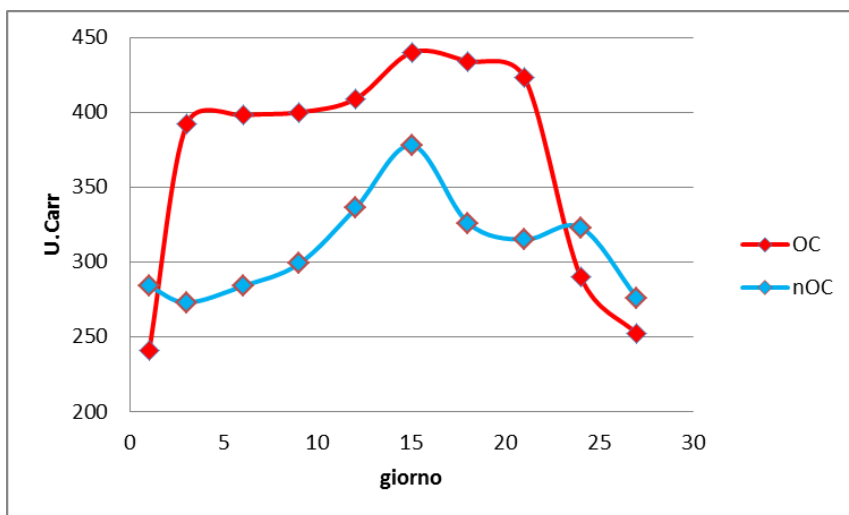


Figura 3: Andamenti dei valori di d-ROMs in presenza ed assenza di contraccettivi orali durante il ciclo mestruale.

Da quanto esposto finora si evince la particolare predisposizione dei contraccettivi orali all'induzione di stress ossidativo e la conseguente necessità di un controllo dello stesso. Da *Finco et al 2011* sono state valutate due diverse formulazioni [98]. Una (ARD Stenovit®), potremmo definirla più generica, a base di tutti e quattro i principali tipi di antiossidanti: di membrana (vitamina E e β-carotene), circolanti (vitamina C e flavonoidi), intracellulari (coenzima Q₁₀ e piridossina) e sistemici (selenio e L-cisteina) mentre la seconda formulazione

(MF Templar®) era basata su di un alto contenuto di catechine. Nonostante l'effettivo effetto antiossidante della prima formulazione fosse comprovato da studi precedenti su volontari sani [100], sorprendentemente solo la seconda formulazione ha avuto un effetto concreto nel modulare lo stress ossidativo indotto da contraccettivi orali, come si vede nei risultati in figura 4. Questa diversità di risultato è imputabile alla presenza di catechine. Le catechine sono antiossidanti che appartengono al gruppo dei flavonoidi e si trovano in molte specie di piante, ma la fonte più significativa della dieta umana proviene dalla pianta di tè

(Camelia sinensis). Infatti, la foglia di tè asciutta contiene circa il 25% in peso di catechine. L'azione antiossidante e una buona biodisponibilità che consente il facile raggiungimento dei tessuti negli organi principali (cuore, cervello, fegato, utero, ecc.) delle catechine sono note[101-103]. Inoltre, la presenza di acido lipoico e coenzima Q10 nella formulazione supportano l'azione mitocondriale necessaria per la produzione di ATP. ATP è utile per rigenerazione di equivalenti riduttori come GSH. Il perché della differenza di efficacia delle due composizioni è stato ricercato dagli autori nel concetto di compartimentazione dello stress ossidativo, ossia nel fatto che ogni compartimento del nostro corpo ha dinamiche diverse nei confronti dello stress ossidativo e che quindi è diversamente reattivo nei confronti di diversi modulatori fisiologici. Come, per esempio, lo squalene è specifico per l'epidermide e la carnosina per i tessuti cerebrali, le catechine sembrano essere specifiche questo comparto. Ipotesi quest'ultima confermata da un più vasto ed approfondito studio condotto dai medesimi autori nel 2012 [99] dove su di un gruppo di 64 donne sono stati confermati sia la presenza di stress ossidativo (elevati livelli di d-ROMs) nelle donne sottoposte a contraccezione orale, sia il benefico effetto del MF Templar®, questa volta contro gruppo controllo con placebo. Inoltre è stata dimostrata più approfonditamente l'effetto e la specificità delle catechine rispetto ai rimanenti componenti della formulazione mediante lo studio dell'effetto dell'assunzione di due tazze di tè.

Composition of ARD Stenovit®		Composition of MF Templar®	
Ingredients	Amount (mg)	Ingredients	Amount (mg)
0.2% Selenium yeast	24.00	0.2% Selenium yeast	24.00
97.5% Protected vitamin C	30.77	Pyridoxine hydrochloride	2.44
40% Bioflavonoids from citrus fruits	75.00	α-Lipoic acid	10.00
Zinc pidolate	25.00	Coenzyme Q10	10.00
Coenzyme Q10	10.00	10% β-carotene	0.5
L-Cysteine hydrochloride	12.61	Extract of decaffeinated green tea with 60% catechin, ^a	150.00
50% Vitamin E acetate	32.91	of which 40% EGCG	
Pyridoxine hydrochloride	1.22		
Vitamin A acetate 50,000 UI	0.7		
10% β-carotene	0.5		

^a Epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), and epicatechin (EC).

Time days	t_1	t_3	T_6	T_9	T_{12}	T_{15}	T_{18}	T_{21}	t_{24}	t_{27}
OC cycle, control cycle	241±22.3	392 ^a ±26.3	398 ^a ±26.6	400 ^a ±24.4	409 ^a ±41.9	440 ^a ±35.3	434 ^a ±36.8	423 ^a ±33.9	290 ^a ±53.7	252±28.3
OC cycle, ARD Stenovit®	241±22.3	391 ^a ±21.2	395 ^a ±20.0	398 ^a ±19.0	407 ^a ±39.5	438 ^a ±36.9	427 ^a ±36.7	423 ^a ±33.7	310 ^a ±80.4	257±36.1
OC cycle, MF Templar®	258±18.4	352 ^a b±39.8	340 ^a b±34.1	318 ^a b±28.9	320 ^a b±34.2	314 ^a b±30.3	322 ^a b±30.8	329 ^a b±25.2	277 ^a b±15.0	244±13.0

^a t Test for interdependent data, $p < .05$, t_1 vs. t_n .

^b Analysis of variance for orthogonal comparisons: controls=ARD Stenovit®>MF Templar®.

Figura 4: Composizione dei modulatori fisiologici presi in esame e loro effetto; immagine rielaborata da da Finco et al 2011 [98]

La menopausa viene definita come la permanente cessazione delle mestruazioni a causa della perdita di attività ovarica e follicolare. Molte donne spendono quasi un terzo della loro vita in menopausa. La menopausa è diagnosticata dopo un anno dalla fine dell'ultimo ciclo mestruale. Il periodo subito precedente a questo evento e in cui iniziano a manifestarsi i primi sintomi viene definito premenopausa e insieme all'anno menzionato viene definito climaterio. I sintomi primari della premenopausa sono caratterizzati da sintomi vasomotori (ad esempio vampate di calore e sudorazione notturna), cambiamenti mestruali (ad esempio oligomenorrea o amenorrea), secchezza vaginale e rapporti dolorosi (dispareunia). Altri sintomi possono essere incontinenza urinaria, cambiamenti d'umore e somatici. Tutti i sintomi elencati possono avere un impatto sulla qualità della vita [104]. La qualità degli ovociti diminuisce in relazione all'aumento età materna. Recenti studi hanno dimostrato che ovociti di bassa qualità contengono un aumento del mtDNA danneggiato e di aneuploidia cromosomica correlata all'età. Questi cambiamenti mitocondriali possono sorgere a causa di un eccesso di ROS che si verifica attraverso l'apertura dei canali ionici (per esempio la perdita di omeostasi Ca^{2+}). Alti livelli di 8-OHdG sono stati trovati in ovociti in avanzato stato di invecchiamento [105]. Stress ossidativo, depositi di ferro, lipidi nel sangue e grasso corporeo in genere aumentano con l'età, soprattutto dopo la menopausa. La cessazione delle mestruazioni porta ad un aumento dei livelli di ferro in tutto il corpo. I depositi di metalli elevati potrebbero indurre uno squilibrio ossidativo, che può spiegare perché l'incidenza di malattie cardiache è più alta in postmenopausa

—General characteristics of the two groups of women under treatment with Afragil® and placebo.

Variables	Product	Placebo	t test
Number	33	32	
Age	43±3.5	42±3.2	N S
Common symptoms*	16±4.7	17±1.9	N S
Changes	39±13.2	37±3.9	N S
Pains	25±5.6	23±2.6	N S

Data are mean values±SD.

—Components of Afragil® tablets.

Ingredients	mg
Calcium carbonate/lactate	800.0
Astaxantin	0.27
Lycopene	1.0
Vit D3	0.23
Bioflavonoids from Citrus	33.0

—Menopause symptom Score Questionnaire at the inclusion and after 8 weeks of treatment.

Variables	Period			
	Inclusion		After 8 weeks	
	Product	Control	Product	Control
<i>Common symptoms</i>				
Hot flashes	3.1±0.3	3.0±0.3	1.1±0.5 ^a	3.0±0.4
Night sweats	3.1±0.3	3.2±0.4	2.1±0.8	2.5±0.2
Irregular period	3.7±0.1	3.5±0.3	2.1±1.1	3.8±0.2
Loss of libido	2.1±1.1	3.0±0.4	1.1±0.6 ^a	3.4±0.3
Vaginal dryness	2.2±1.1	2.5±0.2	1.1±0.3 ^a	2.2±0.4
Mood swing	1.8±0.9	2.0±0.3	1.1±0.4	2.2±0.1
Total score ^b	16±4.7	17±1.9	9±4.1	17±1.7
<i>Changes</i>				
Fatigue	2.1±1.1	2.0±0.1	1.2±0.4	2.2±0.1
Hair loss	1.3±1.2	1.4±0.2	1.1±0.5	2.0±0.2
Sleep disorders	2.1±0.9	2.0±0.1	1.1±0.4 ^a	2.4±0.2
Difficult concentrating	2.5±0.4	2.2±0.2	1.3±0.6	2.4±0.3
Memory lapses	2.8±0.3	3.0±0.2	2.1±1.1	3.3±0.2
Dizziness	2.4±0.9	2.2±0.3	2.1±0.5	2.2±0.1
Weight gain	1.7±0.9	1.5±0.2	1.2±0.9	2.0±2.2
Incontinence	3.2±0.5	3.0±0.2	1.2±0.3 ^a	3.2±0.2
Bloating	1.1±0.8	1.2±0.2	0.9±0.4	2.0±0.2
Allergies	2.5±0.2	2.0±0.2	0.9±1.1	2.5±0.2
Brittle nails	1.2±0.5	1.2±0.2	1.0±0.4	2.2±0.2
Change in odor	3.1±0.4	3.0±0.3	2.3±0.3	3.1±0.1
Irregular heartbeat	1.9±0.3	2.0±0.2	1.1±0.4	2.2±0.1
Depression	2.9±0.2	2.2±0.3	1.1±0.3 ^a	2.5±0.2
Anxiety	3.1±0.7	3.0±0.3	1.4±0.6 ^a	3.2±0.1
Irritability	2.2±1.2	2.0±0.2	1.1±0.3	2.1±0.3
Panic disorder	3.1±0.5	3.3±0.2	0.8±0.3 ^a	3.1±0.2
Total score ^b	39±13.2	37±3.9	22±9.4	43±5.8
<i>Pains</i>				
Breast pain	2.6±1.2	2.3±0.2	1.3±0.3 ^a	2.7±0.1
Headaches	3.2±0.3	3.0±0.4	2.2±0.3	3.4±0.3
Joint pain	2.7±0.6	2.2±0.3	0.9±0.3 ^a	2.8±0.2
Burning tongue	1.1±0.5	1.0±0.4	1.0±0.2	1.3±0.1
Electric shocks	2.5±0.2	2.2±0.1	0.6±0.2 ^a	2.6±0.3
Digestive problem	3.1±0.3	3.0±0.2	1.1±0.4 ^a	3.3±0.3
Gum problems	2.2±0.5	2.0±0.1	1.2±0.3	2.2±0.1
Muscle tension	2.8±0.3	2.3±0.1	1.1±0.3	2.2±0.1
Itchy skin	2.9±0.3	2.3±0.3	1.2±0.3	2.2±0.1
Tingling extremities	2.2±0.8	2.2±0.1	1.1±0.3	2.0±0.1
Total score ^b	25±5.6	23±2.6	12±3.1	25±1.7

Data are mean values±SD. ^a t test for independent data: product vs. control at 8 weeks P<0.01; ^b sum of the block of signs/symptoms.

—Variations in plasma free radicals.

		Treatment	Placebo	P
		PL free radicals	Inclusion 388.4;28.3	384.2;22.5
Carr Units	4 weeks	321.3;33.4	392.3;26.2	0.05
	8 weeks	311;23.2	388.3;26	0.05

rispetto alle donne in premenopausa [106]. La menopausa porta anche ad una diminuzione dell'estrogeno e alla perdita dei suoi effetti protettivi contro i danni ossidativi all'endometrio [107]. Esiste un'interessante studio condotto da Sanchez-Rodriguez et al 2012 nel quale non si valuta lo stress ossidativo nelle donne in menopausa ma si vuole valutare quanto la menopausa sia un fattore di rischio nello sviluppo di stress ossidativo [108]. Lo studio è stato su 187 donne in perimenopausa di Città del Messico, di cui 94 in premenopausa (età media ± SD, 44,9 ± 4,0, estrogeno, 95,8 ± 65,7 pg/ml, ormone follicolo stimolante, 13,6 ± 16,9 mIU/MI) e 93 donne in postmenopausa (età media ± SD, 52,5 ± 3,3, estrogeni, 12,8 ± 6,8 pg/ml, ormone follicolo stimolante follicolo, 51,4 ± 26,9 mIU /ml). I lipoperossidi sono stati misurati come molecole reagenti all'acido tiobarbiturico. Tutte le donne hanno risposto alla scala della valutazione della menopausa, alla scala di insonnia Atene e ad un questionario strutturato sui fattori pro-ossidanti, quali il fumo, il consumo di bevande caffeiniche e alcoliche e l'attività fisica. Infine, è stato misurato il peso e l'altezza e il BMI. I livelli di lipoperossidi erano significativamente più elevati nel gruppo post-menopausa rispetto al gruppo premenopausa (0,357 ± 0,05 vs 0,331 ± 0,05 μmol/l, P = 0,001). Utilizzando la regressione logistica per controllare le variabili pro-ossidanti, è stato provato che la menopausa era il principale fattore di rischio per lo stress ossidativo. Inoltre è stata trovata una correlazione positiva tra il punteggio di valutazione della menopausa, il punteggio di insonnia e i lipoperossidi e questa relazione è stata più evidente nel gruppo post-menopausa (scala della menopausa, r =0,327 p=0,001, scala dell'insonnia, r=0,209 p<0,05). Dei molti tentativi di contrastare i sintomi della menopausa, una strada promettente sembra essere anche l'integrazione di antiossidanti come mostra lo studio di Belcaro et al 2010 [109]. In questo studio due gruppi di donne (trattamento e placebo) con uguali caratteristiche sono state sottoposte ad un dettagliato questionario per la valutazione dei sintomi della menopausa e all'analisi dei perossidi plasmatici mediante d-ROMs prima e dopo 8 settimane di trattamento con Afragil® o con un placebo. Il prodotto

Figura 5: Popolazione e risultati dello studio di Belcaro et al. 2010, oltre che composizione di Afragil®; rielaborato da Belcaro et al. 2010 [109].

menzionato è basato su calcio, vitamina D₃ ed una combinazione di antiossidanti. Calcio e vitamina D₃ sono noti per essere utili nella riduzione degli eventi cardiovascolari, per la salute dell'osso e più in generale per la qualità della vita. Gli antiossidanti utilizzati sono bioflavonoidi, che agiscono come antiossidanti circolanti, e due carotenoidi (licopene e astaxantina), due antiossidanti della membrana. I bioflavonoidi sono stati inclusi perché alcuni di loro sono stati mostrati una certa utilità nella gestione dell'osteoartrite. In particolare, i bioflavonoidi degli agrumi sono stati approvati dall'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) per la sana gestione delle articolazioni. Il lycopene è stato aggiunto alla formula per compensare i bassi livelli dello stesso nell'osteoporosi postmenopausale, inoltre, può contribuire alla riduzione dei processi infiammatori. L'astaxantina è stata inclusa nella formula perché è il carotenoide più attivo, la cui struttura gli permette, tra l'altro, di legare e inattivare i metalli di transizione che possono ossidare membrane delle lipoproteine e delle cellule. Come si può facilmente vedere in figura 5 sia i punteggi della scala di valutazione della menopausa che i livelli di perossidi sono significativamente diminuiti dopo il trattamento.

- [1] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012;10(49)
- [2] Liu L & Keefe DL Cytoplasm mediates both development and oxidation induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000;62:1828–1834.
- [3] Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000;62:1745–1753.
- [4] Burton GJ, Jauniaux E Oxidative Stress *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;25:287–299.
- [5] Ignarro LJ Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:503–514.
- [6] Webster RP, Roberts VH, Myatt L Protein nitration in placenta – functional significance. *Placenta* 2008;29:985–994.
- [7] Chandra A, Surti N, Kesavan S, Agarwal A Significance of oxidative stress in human reproduction. *Arch Med* 2009; 5:528–542.
- [8] Fujii J, Iuchi Y, Okada F Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:43.
- [9] Ducsay CA, Myers DA eNOS activation and NO function: differential control of steroidogenesis by nitric oxide and its adaptation with hypoxia. *J Endocrinol* 2011;210:259–269.
- [10] Xiao D, Bird IM, Magness RR, Longo LD, Zhang L Upregulation of eNOS in pregnant ovine uterine arteries by chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H812–H820.
- [11] Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:S40–S42
- [11] Polak G, Koziol-Montewka M, Tarkowski R, Kotarski J Peritoneal fluid and plasma 4-hydroxynonenal and malonyldialdehyde concentrations in infertile women. *Ginekol Pol* 2001;72:1316–1320.
- [12] Polak G, Rola R, Gogacz M, et al. Malonyldialdehyde and total antioxidant status in the peritoneal fluid of infertile women. *Ginekol Pol* 1999;70:135–140.
- [13] Gupta S, Surti N, Metterle L, et al. Antioxidants and female reproductive pathologies. *Arch Med* 2009; 5:151–173.
- [14] Wang Y, Sharma RK, Falcone T, et al. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 1997;68:826–830.
- [15] Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:335–347
- [16] Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, et al. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157:2111–2122.
- [17] Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 2003; 34:1265–1275.
- [18] Zachara BA, Dobrzynski W, Trafikowska U, Szymanski W Blood selenium and glutathione peroxidases in miscarriage. *BJOG* 2001;108:244–247.
- [19] Al-Kunani AS, Knight R, Haswell SJ, et al. The selenium status of women with a history of recurrent miscarriage *BJOG* 2001;108:1094–1097.
- [20] Rumbold A, Duley L, Crowther C, et al. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Database Syst Rev* 2005;4:CD004227.
- [21] Rai R & Regan L Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;368:601–611.
- [22] Poston L & Rajmakers MT Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome: a review. *Placenta* 2004;25(Suppl A):S72–S78.
- [23] Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol* 2006;80:572–580.
- [24] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12:1065–1074.
- [25] Quenby S, Nik H, Innes B, et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure *Hum Reprod* 2009;24:45–54.

- [26]Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online* 2003;6:84–96.
- [27]Miller H, Wilson R, Jenkins C, et al. Glutathione levels and miscarriage. *J Fertil Steril* 2000;74:1257–1258.
- [28]El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally Ael G, et al. Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:879–883.
- [29] Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, et al. Effect of Nacetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicol Sci* 2005; 88:525–533.
- [30]Amin AF, Shaaban OM, Bediawy MA N-acetyl cysteine for treatment of recurrent unexplained pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2008;17:722–726.
- [31] Lappas M, Permezel M, Rice GEN-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1723–1729.
- [32]Aluigi MG, De Flora S, D'Agostini F, et al. Antiapoptotic and antigenotoxic effects of N-acetylcysteine in human cells of endothelial origin. *Anticancer Res* 2000;20:3183–3187.
- [33] Biri A, Bozkurt N, Turp A, et al. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest* 2007;64:187–192.
- [34] Karowicz-Bilinska A Lipid peroxides concentration in women with intrauterine growth restriction. *Ginekol Pol* 2004;75:6–9.
- [35] Potdar N, Singh R, Mistry V, et al. Increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. Firsttrimester; *BJOG* 2009;116:637–642.
- [36] Yung HW, Calabrese S, Hynx D, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2008;173:451–462.
- [37] Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia; *Placenta* 2009;30(Suppl A):S43–S48.
- [38] Hafner E, Metzzenbauer M, Hofinger D, et al. Placental growth from the first to the second trimester of pregnancy in SGA-foetuses and pre-eclamptic pregnancies compared to normal fetuses. *Placenta* 2003;24:336–342.
- [39]Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113(Suppl 3):17–42.
- [40]Romero R, Gomez R, Mazor M, et al. The preterm labor syndrome. In *Preterm Labor* Edited by Elder MG, Romero R, Lamont RF. New York: Churchill Livingstone; 1997:29–49.
- [41] Behrman RE, Bulter AS *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention*. Washington DC: National Academies Press (US); 2007
- [42]Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, Nelson SM Inflammatory pathways in the mechanism of parturition *BMC Pregnancy Childbirth* 2007;7(Suppl 1):S7.
- [43]Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, et al. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(394):e391–324.
- [44] Khan RN, Matharoo-Ball B, Shaw RW Antioxidant enzyme expression, lipid peroxidation, and protein oxidation in human myometrium with parturition. *Reprod Sci* 2010;17:78–84.
- [45]Mustafa MD, Pathak R, Ahmed T, et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. *Clin Biochem* 2010;43:1124–1128.
- [46]Oberley LW Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 2005;59:143–148.
- [47] Than NG, Romero R, Tarca AL, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase mRNA expression in human chorioamniotic membranes and its association with labor, inflammation, and infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:1000–1013.
- [48] Chadha S, Jain V, Gupta I, et al. Nitric oxide metabolite levels in preterm labor. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33:710–717
- [49] Reslan OM & Khalil RA Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2010;8:204–226.
- [50] Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:109–127.
- [51] Khalil RA & Granger JP Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, 283:R29–R45.
- [52] Redman CW & Sargent IL Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009;30(Suppl A):S38–S42
- [53]Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia; *Placenta* 2009;30(Suppl A):S43–S48.
- [54]Roberts JM & Cooper DW Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357:53–56.
- [55] Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, et al. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002;9:147–160.
- [56] Burton GJ & Yung HW Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia; *Pregnancy Hypertens* 2011;1:72–78.
- [57] Aris A, Benali S, Ouellet A, et al. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta* 2009;30:342–347
- [58]Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, et al. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;94:23–27.

- [59] Tsukimori K, Fukushima K, Tsushima A, Nakano H Generation of reactive oxygen species by neutrophils and endothelial cell injury in normal and preeclamptic pregnancies. *Hypertension* 2005;46:696–700.
- [60] Ahmed A, Rahman M, Zhang X, et al. Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNF α -induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol Med* 2000;6:391–409.
- [61] Nakamura M, Sekizawa A, Purwosunu Y, et al. Cellular mRNA expressions of anti-oxidant factors in the blood of preeclamptic women. *Prenat Diagn* 2009;29:691–696.
- [62] Gupta S, Aziz N, Sekhon L, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2009;64:750–759.
- [63] Wallekut G, Homuth V, Fischer T, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999;103:945–952.
- [64] Dechend R, Viedt C, Muller DN, et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 2003;107:1632–1639.
- [65] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494–501.
- [66] Baker AM, Klein RL, Haeri S, et al. Association of Midgestational Paraoxonase 1 activity with pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Perinatol* 2010;27:205–210.
- [67] Kumru S, Aydin S, Gursu MF, Ozcan Z Changes of serum paraoxonase (an HDL-cholesterol-associated lipophilic antioxidant) and arylesterase activities in severe preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;114:177–181.
- [68] Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, et al. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;94:23–27.
- [69] Walsh SW: Eicosanoids in preeclampsia; *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:223–232
- [70] Klemmensen A, Tabor A, Osterdal ML, et al. Intake of vitamin C and E in pregnancy and risk of preeclampsia: prospective study among 57 346 women. *SF BJOG* 2009;116:964–974.
- [71] Poston L, Briley AL, Seed PT, et al. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2006;367:1145–1154.
- [72] Roberts JM, Myatt L, Spong CY, et al. Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *N Engl J Med* 2010;362:1282–1291.
- [73] Xu H, Perez-Cuevas R, Xiong X, et al. An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP). *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:239 e231–239 e210.
- [74] Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al. Low body mass index is a risk factor for impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:256–263.
- [75] Franco Mdo C, Dantas AP, Akamine EH, et al. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:501–509.
- [76] Robker RL, Akison LK, Bennett BD, et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1533–1540.
- [77] Ornoy A Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol* 2007, 24:31–41
- [78] Repine JE, Bast A, Iankhorst I Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care* 1997;156:341–357
- [79] Gauthier TW, Kable JA, Burwell L, et al. Maternal alcohol use during pregnancy causes systemic oxidation of the glutathione redox system. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:123–130.
- [80] Deng XS & Deitrich RA Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Curr Clin Pharmacol* 2007;2:145–153.
- [81] Toda N & Ayajiki K; Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol* 2010;45:347–355.
- [82] Kovacic P Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses* 2005;65:90–96.
- [83] Huang J, Okuka M, McLean M, et al. Effects of cigarette smoke on fertilization and embryo development in vivo. *Fertil Steril* 2009;92:1456–1465.
- [84] Kay HH, Grindle KM, Magness RR Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:682–688.
- [85] Fisher-Wellman K, Bell HK, Bloomer RJ Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:43–51.
- [86] Serviddio G, Loverro G, Vicino M, et al. Modulation of Endometrial Redox Balance during the Menstrual Cycle: Relation with Sex Hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2843–2848
- [87] Quarmby VE & Korach KS The influence of 17 β -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 1984;114:694–702
- [88] Persico E, Scalona M, Cicatiello L, et al. Activation of 'immediate-early' genes by estrogen is not sufficient to achieve stimulation of DNA synthesis in rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:287–292
- [89] Petit-Thevenin J, Lericque B, Nobili O, Boyer J Estrogen modulates phospholipid acylation in red blood cells: relationship to cell aging. *Am J Physiol* 1991;261:C423–C427
- [90] Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O Potential role of oxidized lipids and lipoproteins in antioxidant defense. *Free Radic Res* 2000;33:197–215
- [91] Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J* 1997;11:1317–1328

- [92] Agarwal A, Balla J, Balla G, et al. Renal tubular epithelial cells mimic endothelial cells upon exposure to oxidized LDL. *Am J Physiol* 1996;271:F814–F823
- [93] Massafra C, Gioia D, De Felice C, et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 2000;167:447–452.
- [94] Cornelli U, Belcaro G, Cesarone MR, Finco A Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013;11
- [95] Cornelli U, Belcaro G, Finco A; The oxidative stress balance measured in humans with different markers, following a single oral antioxidants supplementation or a diet poor of antioxidants. *J Chem Dermatol Sci Appl* 2011; 1:64–70.
- [96] De Groote D, Perrier d'Hauterive S, Pintiaux A, et al. Effect of oral contraception with ethylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18–35 years old. *Contraception* 2009;80:187–93.
- [97] Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, et al. Effect of different contraceptive methods on the oxidative status in women aged 40–48 years from ELAN study in the province of Liège, Belgium. *Hum Reprod* 2007;22:2335–43.
- [98] Fincoa A, Belcaro G, Cesarone MR Assessment of the activity of an oral contraceptive on the levels of oxidative stress and changes in oxidative stress after co-treatment with two different types of physiological modulators with antioxidant action *Contraception* 2011;84: 418-422
- [99] Fincoa A, Belcaro G, Cesarone MR Evaluation of oxidative stress after treatment with low estrogen contraceptive either alone or associated with specific antioxidant therapy. *Contraception* 2012;85:503-508
- [100] Cornelli U, Terranova R, Luca S, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the d-ROMs test as a marker of oxidative stress. *J Nutr* 2001;131:3208–11.
- [101] Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr* 2007;26:373S–88S.
- [102] Warden BA, Smith LS, Beecher GR, et al. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001;131:1731–7.
- [103] Saganuma M, Okabe S, Oniyama M, et al. Wide distribution of [3H](–) epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 1998;19:1771–6.
- [104] Belcaro G, Cesarone MR, Cornelli U, Dugall M Afragil® in the treatment of 34 menopause symptoms: a pilot study. *Panminerva med* 2010;52(Suppl. 1 to No. 2):1-6
- [105] Salmon AB, Richardson A Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med* 2010;48:642–655.
- [106] Crist BL, Alekel DL, Ritland LM, et al. Association of oxidative stress, iron, and centralized fat mass in healthy postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt)* 2009;18:795–801.
- [107] Tropea A, Miceli F, Minici F, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2303–2309.
- [108] Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012;19(3):361-367
- [109] Belcaro G, Cesarone MR, Cornelli U, Dugall M Afragil® in the treatment of 34 menopause symptoms: a pilot study. *Panminerva Med* 2010;52(Suppl. 1 to No. 2):1-6

6.5 OFTAMOLOGIA

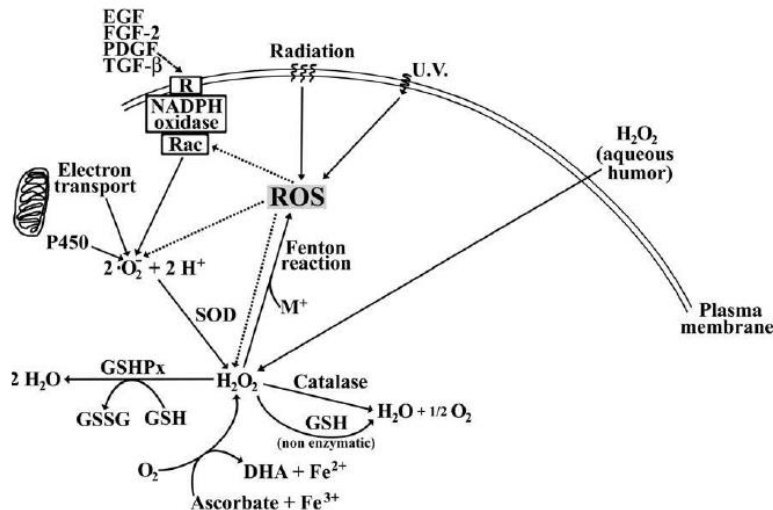


Figura 1: Generazione di ROS nella lente dell'occhio; figura da *Berthoud and Beyer 2009* [3]

L'occhio è una struttura metabolicamente molto attiva, continuamente bagnata dalla luce, quindi i processi ossidativi e particolarmente foto-ossidativi sono fattori critici nelle condizioni patologiche oculari, in particolare quelle associate all'invecchiamento [1]. La generazione di ROS nell'occhio può seguire diverse vie tra loro interconnesse. Il normale processo di trasporto di elettroni e l'attività del citocromo P450 possono generare anione superossido. Il complesso NADPH ossidasi con la partecipazione di RAC-GTPasi e associato all'attivazione dei recettori di membrana da parte di segnali

extracellulari, come i fattori di crescita, può produrre anione superossido. I fattori di crescita possono essere attivati dai ROS generati da reazioni fotochimiche ad opera della radiazione UV. L'anione superossido può essere generato anche per via fotochimica a partire da O_2 in presenza di donatori di elettroni come la riboflavina. Perossido d'idrogeno può essere prodotto dall'attività delle SOD sull'anione superossido ma può derivare anche dall'umore acqueo per diffusione; inoltre può essere generato a partire da ascorbato e ossigeno in presenza di ioni ferrici. Il perossido d'idrogeno può derivare anche da riduzione acido ascorbico mediata dell'anione superossido. Gli ioni metallici possono inoltre favorire la generazione di ROS a partire da perossidi di varia natura mediante reazione di Fenton. [2][3]

A causa della sua posizione esterna e perché la sua funzione è trasmettere luce alla retina, la lente è costantemente esposta alla luce e alle radiazioni UV quindi è uno degli organi più soggetti a soffrire lo stress ossidativo indotto da fonti esogene. Per questo motivo la lente ha diversi meccanismi enzimatici e non di protezione. I meccanismi non-enzimatici includono la presenza di alte concentrazioni di ascorbato, GSH, presenza dei cristalli (che agiscono come proteine chaperones) e filtri UV (es. derivati del triptofano). I meccanismi enzimatici, invece comprendono SOD, CAT e perossidasi (glutazione perossidasi, perossiredossine e microperossidasi). SOD catalizza la conversione dell'anione superossido a perossido d'idrogeno, il quale può essere degradato enzimaticamente da CAT o da GPX, un selenoenzima che richiede GSH. Microperossidasi (che derivano da scissione enzimatica del citocromo c) idrolizza anche i perossidi. Il perossido d'idrogeno può essere degradato anche per via non-enzimatica da glutazione ridotto.

La sintesi del cofattore GSH, coinvolge gli enzimi glutamil-cisteina sintetasi e glutazione sintasi. Nel reazioni biochimiche che richiedono GSH, GSH viene convertito nella sua forma ossidata, GSSG; il GSSG viene poi convertito al suo forma ridotta da GSSG reduttasi, un enzima che richiede NADPH (prodotto in gran parte attraverso la via pentoso fosfato) come cofattore [3]. Altri importanti antiossidanti non enzimatici sono a livello oculare, la vitamina E per la sua capacità di interrompere le reazioni a catena originata da radicali liberi, (la velocità di reazione tocoferolo-radicale libero è estremamente maggiore della velocità di reazione radicale libero-lipide) e l'azione della vitamina C, il principale antiossidante idrofilo nonché utilizzato nella rigenerazione dei tocoferoli a partire dai radicali tocoferili[4]. Diverse modifiche a carico delle proteine possono derivare dallo stress ossidativo compresa l'ossidazione delle metionine e delle cisteine, con la formazione di legami proteina-proteina di disolfuro e/o legami di disolfuro misti-tiolo. Queste modifiche possono portare alla formazione di aggregati insolubili ad alto peso molecolare che sono comuni, per

esempio nelle lenti catarattose. Importanti divengono quindi i meccanismi di riparazione delle proteine ad opera, per esempio, di tioltransferasi dipendenti da GSH, del sistema tioredossina/ tioredossina riduttasi NADPH-dipendente o di metossina sulfossido riduttasi. La tioltransferasi catalizza la detiolazione di legami a base di tioli. La tioredossina riduce i legami di proteine-proteine in una reazione che porta all'ossidazione della tioredossina. La tioredossina ossidata è ridotta da tioredossina riduttasi, un selenoenzima omodimerico che utilizza NADPH come cofattore. La metossina sulfossido riduttasi converte la metionina ossidata (metionina sulfossido) a metionina in una reazione che coinvolge la tioredossina riduttasi, il sistema tioredossina e NADPH.[3]

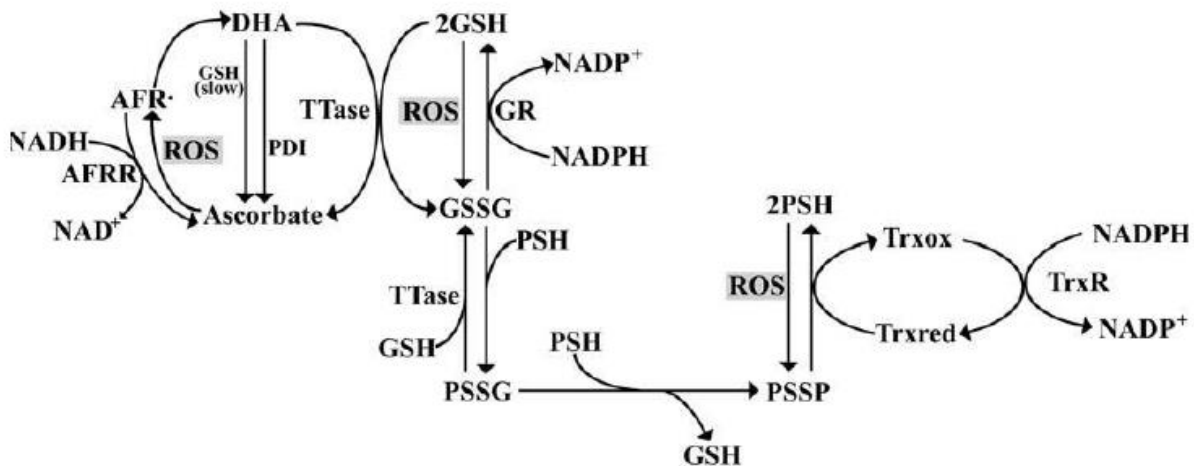


Figura 2: Meccanismi di protezione redox coinvolti nella lente dell'occhio; figura da Berthoud & Beyer 2009 [3]; AFR•, radicale libero ascorbato; AFRR, radicale libero ascorbato riduttasi NADH-dipendente; DHA, deidroascorbato; GR, GSSG riduttasi; GSSG, glutatione ossidata; GSH, glutatione ridotta; PDI, Proteina disolfuro isomerasi; PSH, Proteina contenente legami solfidrilici; PSSG, proteine glutationilate; PSSP, proteine con legami disolfuro ossidati; ROS, reactive oxygen species; TrxR, tioredossina riduttasi; Trxox, tioredossina ossidata; Trxred, tioredossina ridotta; Tase, tioltransferasi

I cromofori, o fotosensibilizzatori, sono molecole che assorbono la luce per produrre una reazione chimica che non avverrebbe in sua assenza. Il danno fotochimico può essere definito come lesione dovuta alle reazioni scatenate dall'assorbimento di radiazioni, principalmente UV da parte dei cromofori [5]. Per prima cosa la luce interagendo con un cromoforo idoneo può scatenare sia una risposta benevola sia reazioni dannose. Per prima cosa i danni fotoindotti possono interessare direttamente il cromoforo modificandone la struttura e quindi l'attività, esempio di questo è la formazione di dimeri di pirimidina nel DNA. Il cromoforo può però anche agire più propriamente da fotosensibilizzatore, innescando reazioni fotochimiche. Con l'assorbimento di radiazione il fotosensibilizzatore (cromoforo) viene passato da uno stato di stabilità ad uno stato di eccitazione. I meccanismi post-eccitativi sono essenzialmente due. Nel primo caso si verificano reazioni di sottrazione di idrogeni e/o elettroni tra fotosensibilizzatore e substrato, con conseguente formazione di radicali liberi o ioni radicalici. Questi prodotti vengono poi coinvolti in una serie di reazioni a catena a carico di lipidi, proteine e DNA con conseguenti lesioni, anche gravi, a carico delle strutture cellulari. Nel secondo meccanismo si ha il trasferimento di energia tra il fotosensibilizzatore eccitato e l'ossigeno con formazione dell'ossigeno singoletto dal forte potere ossidante. Quest'ultimo reagisce con grassi polinsaturi, basi del DNA, istidina, tiroxina o triptofano generando perossidi di varia natura, un'altra specie chimica in grado di propagare il danno ossidativo. Tra i principali cromofori rientra la lipofucsina, un insieme piuttosto indefinito di molecole spesso associata alla maculopatia [4]. La lipofucsina è ormai dimostrato essere un potente generatore fotoinducibile di una gamma di ROS tra cui l'anione superossido, e l'ossigeno singoletto e altri perossidi lipidici [6]. La produzione di ROS è fortemente dipendente dalla lunghezza d'onda in particolare la produzione di ROS aumenta all'avvicinarsi alla radiazione del blu. Inoltre, la fotogenerazione di ROS da granuli di lipofucsina aumenta con l'età [7]. Molto importante nei processi di protezione dai danni da fotostress è l'azione dei carotenoidi, molecole aventi una lunga catena polienica. L'azione dei carotenoidi si esprime in più modalità differenti. Per quenching diretto dell'ossigeno

singoletto, ossia per trasferimento diretto di energia tra quest'ultimo al carotenoide che successivamente disperde quest' energia al solvente in cui è diluito. Mediante classico meccanismo si scavengin in cui si ha la formazione di un radicale estremamente stabile e per questo poco reattivo. Inoltre i carotenoidi fungono da ottimi filtri per la luce blu. I carotenoidi maculari luteina e zeaxantina, sono quelli più resistenti alla luce e formano i principali componenti antiossidanti del pigmento oculare. A causa della loro lipofilia, i carotenoidi sono spesso coinvolti nei meccanismi di difesa delle membrane cellulari [4]. Tra le principali patologie oculari legato allo stress ossidativo abbiamo la retinopatia diabetica, degenerazioni vitreali, cataratta, glaucoma e maculopatia senile.

Retinopatia diabetica

La retinopatia diabetica rappresenta la più comune complicanza indotta dal diabete a livello oculare. Essa colpisce circa il 20% dei pazienti affetti da diabete mellito. Ne esistono due forme principali: La prima, denominata retinopatia non proliferante, rappresenta la fase iniziale della malattia. E' caratterizzata da un'aumentata fragilità delle pareti dei vasi (possibile causa di emorragie retiniche) e da una loro alterata permeabilità, che può determinare la fuoriuscita patologica (essudazione) di liquidi e materiale proteico e/o lipidico provenienti dal sangue. L'accumulo di liquidi nella macula (edema maculare) è la più comune causa di riduzione visiva nella retinopatia diabetica. Il secondo tipo di retinopatia diabetica è definito proliferante e rappresenta una fase più avanzata della malattia. Essa è caratterizzata dalla proliferazione di nuovi vasi all'interno dell'occhio; lo stimolo a tale proliferazione è rappresentato dalla non perfusione (o ischemia) di estese aree di retina, conseguente all'occlusione dei capillari e dei vasi di piccolo calibro. Nel quadro del controllo della retinopatia diabetica estremamente importante è il controllo dell'apporto lipidico e l'assunzione di antiossidanti. Nello studio epidemiologico WESDR (Wisconsin Epidemiologic Study Of Diabetic Retinopathy) è stata osservata una significativa tendenza al peggioramento della retinopatia all'aumentare dei livelli sierici di colesterolo[8]. Inoltre, si è osservato che nei pazienti arruolati nello studio ETDRS (Early Treatment Of Diabetic Retinopathy Study) con elevato livello sierico di colesterolo al momento dell' inclusione nello studio avevano il doppio delle probabilità di comparsa di esudati duri rispetto a pazienti con livelli sierici normali [9][10]. I primi studi sull'uso di inibitori del HMG-CoA riduttasi per abbassare i livelli di colesterolo hanno mostrato in pazienti diabetici con ipercolesterolemia una riduzione della progressione della retinopatia [11]. Non esistono dati sufficienti per valutare l'impatto dei farmaci antilipidemici sulla retinopatia diabetica sicuramente un regime alimentare povero di grassi e colesterolo potrebbe essere un buon punto di partenza per pazienti affetti da retinopatia diabetica[12]. Per quanto riguarda il ruolo dello stress ossidativo è noto che i radicali liberi svolgono un importante ruolo nella cascata di "signaling" del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) nelle cellule dei vasi sanguigni; inoltre la stimolazione della molecola di adesione intercellulare CAM-1 ad opera del VEGF coinvolge meccanismi sensibili allo stress ossidativo [13]. La molecola CAM-1 viene considerata un fattore chiave della leucostasi e dell'adesione monocitaria pertanto favorisce l'aumento della permeabilità vascolare [14], oltre che avere una funzione regolatoria nei confronti dell'attività dei leucociti nota fonte di stress ossidativo. Importante si è rivelato anche il contributo degli AGE in relazione allo stress ossidativo nella patogenesi della retinopatia diabetica. Storicamente l'accumulo di AGE si è dimostrato essere associato ad un ispessimento delle pareti vasali, all'ipertensione microvascolare, a disfunzione endoteliale e apoptosi dei periciti. Inoltre gli AGE riducono la sopravvivenza delle piastrine e aumentano l'aggregazione piastrinica, la promozione di uno stato procoagulativo e conseguente ischemia, con successiva neo-angiogenesi [15]. Accanto a questa visione tradizionale della patogenesi del danno retinico nel diabete, incentrata per lo più sul danno vascolare, è andata affiancandosi negli ultimi anni l'ipotesi di un danno neuronale precoce. Studi sperimentali hanno dimostrato che il diabete influenza negativamente l'intero apparato neurosensoriale della retina, accelerando l'apoptosi neuronale e alterando il metabolismo cellulare a sostegno dei recettori retinici[16]. Secondo tale ipotesi la retinopatia diabetica potrebbe essere vista anche come una "neuropatia sensitiva centrale", con caratteristiche simili a una neuropatia diabetica periferica. Gli AGE potrebbero giocare un ruolo anche in questi meccanismi ipotizzati recentemente. Infatti, le cellule macrogliali (o cellule di Müller) che hanno un ruolo fondamentale nella fisiologia retinica, risultano gravemente disfunzionali in condizioni di iperglicemia, principalmente a causa di accumulo di AGE a questo livello, dove aumentano l'espressione della proteina fibrillare acida della glia (GFAP), la produzione di ossido nitrico (NO) e la sintesi

di glutammato da parte della retina. Tutte queste alterazioni possono contribuire alla tossicità neuronale retinica. Sebbene quindi l'iperglicemia cronica rimanga il nesso eziopatogenico per eccellenza delle complicanze microvascolari del diabete, non solo oculari, è ormai chiaro che le future terapie dovrebbero essere indirizzate anche verso altri fattori, correlati non solo al controllo glicemico ma anche all'“imbalance” fra stress glico-ossidativo e capacità antiossidante del paziente diabetico. Uno di questi fattori potrebbe essere l'eccessiva formazione di AGE, che sono il frutto dell'unione dei due più importanti processi alla base di danno vascolare nel diabete, ovvero la glicazione e l'ossidazione. È noto che pazienti diabetici con e senza complicanze hanno una diversa propensione individuale all'ossidazione, in relazione a fattori ambientali e comportamentali [17]. In relazione a ciò, è stato ipotizzato che il razionale patogenetico degli AGE nella patogenesi e nella progressione del danno microvascolare comprenda due fasi temporaneamente distinte. Nei primi anni dall'insorgenza del diabete vi è una relazione causale e consecutiva fra l'iperglicemia, l'aumentato stress ossidativo e l'eccesso conseguente di AGE. Con il protrarsi della malattia, il danno persistente a carico delle proteine della catena respiratoria mitocondriale, operato dai processi di glicazione, genera un circolo vizioso iperglicemia-indipendente [18], in cui i processi di stress ossidativo sono “auto-alimentati” e gli AGE fungono da “mantenitori” di questo processo[19]. Se inoltre

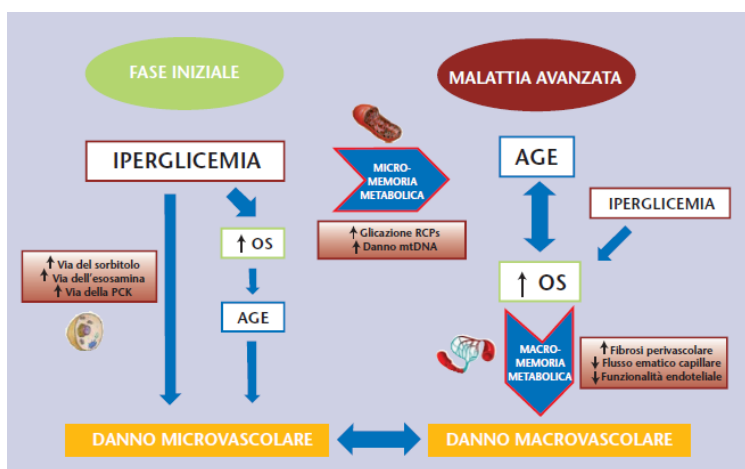


Figura 3: Rappresentazione schematica dei diversi contributi eziopatogenetici dell'iperglicemia, degli AGE e dello stress ossidativo, nelle diverse fasi del diabete mellito di tipo 2; illustrazione da *Chilelli et al 2016* [19]

consideriamo che una delle conseguenze dell' aumento del livello sierico di glucosio associata al diabete è lo stress ossidativo provocato dalla maggior produzione di ROS e da un'insufficiente attività di up-regulation e di down-regulation del meccanismo antiossidante possiamo capire quanto importante sia il ruolo dello status ossidativo nella patogenesi della retinopatia diabetica[20]. Questo viene supportato da una sperimentazione su ratti diabetici in cui si è visto che la somministrazione prolungata di antiossidanti inibisce significativamente, rispetto al gruppo di controllo lo sviluppo di capillari cellulari, inoltre una maggior varietà di antiossidanti sembra fornire una più elevata protezione rispetto alla singola molecola. [21][22]

Degenerazioni vitreali

Nell'occhio il gel vitreo è un corpo compatto omogeneo e chiaro alla nascita, con l'invecchiamento il gel vitreo può subire una degenerazione progressiva caratterizzata da liquefazione del vitreo e indebolimento dell'adesione vitreoretinale tra ioidi vitreo posteriore e la membrana limite interno [23][24] aumentando i rischi di patologie come il foro maculare, le membrane epimacolari, la sindrome da trazione vitreoretinale e il distacco retinico [25]. Nei soggetti giovani il gel vitreo appare omogeneo denso e compatto, infatti le strutture fibrose possiedono la stessa densità ottica della sostanza interfibrosa. Con l'età il gel vitreo appare rarefatto per la riduzione del suo volume, le sue fibre diventano brillanti, addensate e tortuose, in particolare dopo i 40 anni quando la trama vitreale diventa particolarmente evidente nella regione della base del vitreo (degenerazione vitreale senile). La degenerazione vitreale passa attraverso tre fasi: fluidificazione vitreale, sineresi, e distacco posteriore del vitreo (PVD). La fluidificazione, chiamata anche sinchisi, che inizialmente coinvolge la parte posteriore del corpo vitreo consiste nella formazione delle cosiddette lacune vitreali, cavità otticamente vuote a causa di un effetto Tyndall ridotto o assente. All'interno di queste cavità si ritrovano aggregati di fibrille di collagene condensate e acido ialuronico depolimerizzato. La seconda fase è denominata sineresi, un termine che indica la formazione di fibre isolate liberamente fluttuanti talora intrecciate tra loro formanti ammassi filamentosi all'interno di ampie zone di liquefazione vitreale. In questa fase le fibrille di collagene che limitavano le lacune si spezzano e formano lunghi filamenti che fluttuano all'interno delle lacune stesse

assumendo forme diverse descritte come mosche volanti o ragnatele (corpi mobili vitreali o miodesopie). L'ultima fase è rappresentata dalla coartazione vitreale per contrazione delle fibre di collagene con perdita delle aderenze vitreo retiniche con conseguente distacco posteriore del vitreo [24][26][27]. La patogenesi di queste degenerazioni non è ancora chiara, anche se si presume che i fattori coinvolti siano diversi, sembra importante il ruolo di un aumento della produzione dei radicali liberi o meglio uno squilibrio tra la produzione degli stessi e le difese antiossidanti [28][29]. Nel gel vitreo lo stress ossidativo può danneggiare le fibrille di collagene [30] alterando il loro rivestimento superficiale, necessario per prevenire l'aggregazione in fasci, e di conseguenza promuovendo la liquefazione vitreale [25]. Inoltre i radicali liberi possono promuovere la depolimerizzazione dell'acido ialuronico [31]. Lo stress ossidativo può provocare la rottura delle proteine che agiscono come colla molecolare tra il vetrino e la retina come la laminina la fibronetina e il solfato di eparano, in particolar attraverso l'attivazione delle metalloproteinasi della matrice [32][33]. Oltre ai fattori esogeni, alcune condizioni patologiche come il diabete o infiammazioni croniche possono causare stress ossidativo. Il diabete può alterare la barriera tra retina e sangue promuovendo la fuoriuscita di prodotto ossidati all'interno della camera vitrea. L'infiammazione invece può aumentare la produzione di radicali liberi attraverso percorsi come quelli che coinvolgono il fattore nucleare k-B (NF-kB) e il fattore di necrosi tumorale Alfa (TNF- α) [31]. La correlazione tra stress ossidativo e degenerazione vitreale è stata dimostrata nei modelli animali, principalmente negli occhi di coniglio e vitello. In particolare si è osservato una riduzione del peso molecolare dello ialuronato e l'aggregazione del collagene vitreo con conseguenti danni alla microstruttura del corpo vitreo in seguito a stress ossidativo indotto mediante esposizione a sorgenti luminose[28][29][34]. Interessanti sono i risultati di uno studio di *Nuzzi et al 2015* [35] condotto in ex vivo su umano durante l'impianto di lenti intraoculari dove si è osservato un significativo aumento dei TBARS, noto marker di stress ossidativo, nei pazienti affetti da PVD. Inoltre è stato osservato anche un piccolo ma significativo collegamento tra TBARS e fibrinogeno plasmatico (da regressione lineare monovariata risulta che il 17% della varianza del TBARS è spiegato dai livelli di fibrinogeno plasmatico), un marker infiammatorio comunemente usato nella valutazione preoperatoria oftalmica. In altre condizioni patologiche correlate allo stress ossidativo, come la degenerazione maculare, elevati livelli di fibrinogeno del plasma sono riconosciuti fattori di rischio confermando l'influenza del fibrinogeno sull'equilibrio ossidativo all'interno della camera vitrea e della retina [36]. Aumentando la permeabilità vascolare, il fibrinogeno può permettere il flusso di piccole molecole nel vetrino alterando così l'omeostasi di questo tessuto [1] e questo è il probabile motivo della sua correlazione coi TBARS. Non è però chiaro se l'aumento dei prodotti di lipoperossidazione riscontrato sia causa o effetto del processo di degenerazione vitreale. In un altro studio è stato inoltre riscontrata un'elevata concentrazione di ferro, noto promotore di stress ossidativo attraverso la reazione di Fenton, in varie patologie vitreoretinali quali malattia di Eales e retinopatia diabetica[37].

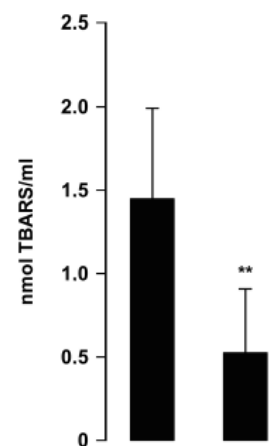


Figura 4: Livelli di TBARS in pazienti affetti da PVD e non; illustrazione da *Nuzzi et al 2015* [35]

Cataratta

La cataratta è un processo di progressiva perdita di trasparenza del cristallino nell'occhio. Ci sono tre tipi di cataratte, ognuna definita dalla posizione sul cristallino. Viene definita nucleare se si trova al centro del cristallino, questo tipo è spesso associato all'età; corticale se di forma a raggiera dell'esterno all'interno del cristallino, spesso associata al diabete; subcapsulare se si sviluppa sulla porzione posteriore del cristallino, quest'ultimo tipo è associata a diabete od esposizione a microonde[38]. L'importanza dello status ossidativo nella patogenesi di questa patologia è ormai accettato, come è appurato che alcuni fattori di rischio ad essa associati siano da collegare proprio allo stress di tipo ossidativo. Importante fattore di rischio riconosciuto è l'esposizione a radiazione UVB [39][40]. Considerando il fatto che i meccanismi di difesa dai raggi UV si degradano con l'età [41] si ha un'idea dell'importanza di questo fattore di rischio nella patogenesi della cataratta, specialmente negli anziani, come confermato dagli studi di Truscott che individuano nell'età un importante fattore di rischio di sviluppo della cataratta nucleare [42]. Fatto confermato anche dall'aumento di perossido d'idrogeno nell'umore acqueo correlato all'età [43]. Vari sono

i possibili meccanismi imputabili allo stress ossidativo coinvolti nella cataratta. Tra i più importanti e accertati vi è l'ossidazione delle proteine in particolare degli amminoacidi metionina e cisteina con conseguente deformazione della struttura proteica e opacizzazione del cristallino[3]. Infatti in pazienti catarattosi caratteristico è l'aumento dei gruppi carbonilici nelle proteine del cristallino a fronte di una diminuzione dei gruppi sulfidrilici [44]. Come caratteristico è il degradarsi del rapporto glutazione/glutazione ossidato a favore di quest'ultimo, chiaro sintomo di una sforzo da parte del sistema di tenere sotto controllo un aumentato insulto ossidativo. L'omeostasi del ferro sembra un altro importante fattore di rischio nella patogenesi della cataratta, infatti l'iperferritinemia ereditaria, con conseguente aumento dei livelli plasmatici di ferritina può portare a cataratta bilaterale congenita o precoce[2]. Inoltre è stato dimostrato in vitro che l'esposizione al perossido d'idrogeno induce a cambiamenti nell'espressione genica che sono stati parimenti riscontrati nella cataratta umana [2]. Interessante risulta il fatto che nei pazienti affetti da cataratta senile sia stato riscontrato un livello di MDA superiore ai pari età sani, nel sangue[45], fenomeno questo spiegabile solo da un diffuso stress ossidativo sistemico. È possibile affermare che nonostante non siano noti gli esatti meccanismi della patogenesi della cataratta lo stress ossidativo riveste un ruolo di primo piano in essi. Importanti sono anche i dati riguardanti la parte antiossidante dello status ossidativo nei pazienti catarattosi. Uno studio epidemiologico condotto su oltre 35.000 donne americane in 10 anni ha mostrato l'importanza dell'alimentazione. In esso è stato dimostrato che una dieta migliore riduce il rischio di sviluppare cataratta, in particolare il consumo di frutta e cereali integrali erano inversamente proporzionali alla possibilità di sviluppare cataratta. Questi risultati erano più evidenti nelle donne che non assumevano integratori di sola vitamina C. Quest'ultimo risultato non deve sorprendere essendo note le problematiche legate agli integratori monosostanza [46]. Da diversi anni vari studi hanno esplorato il possibile ruolo degli antiossidanti nella prevenzione dello sviluppo delle opacità del cristallino correlate all'età. Questo problema è stato affrontato in studi osservazionali che hanno valutato lo stato antiossidante dei partecipanti valutando la dieta, l'assunzione di vitamine C, E e carotenoidi o l'uso di integratori multivitaminici, anche con misurazione dei livelli plasmatici degli stessi. Nonostante alcune incongruenze riguardanti il tipo specifico di cataratta o di nutriente, molti di questi studi hanno prodotto dati che

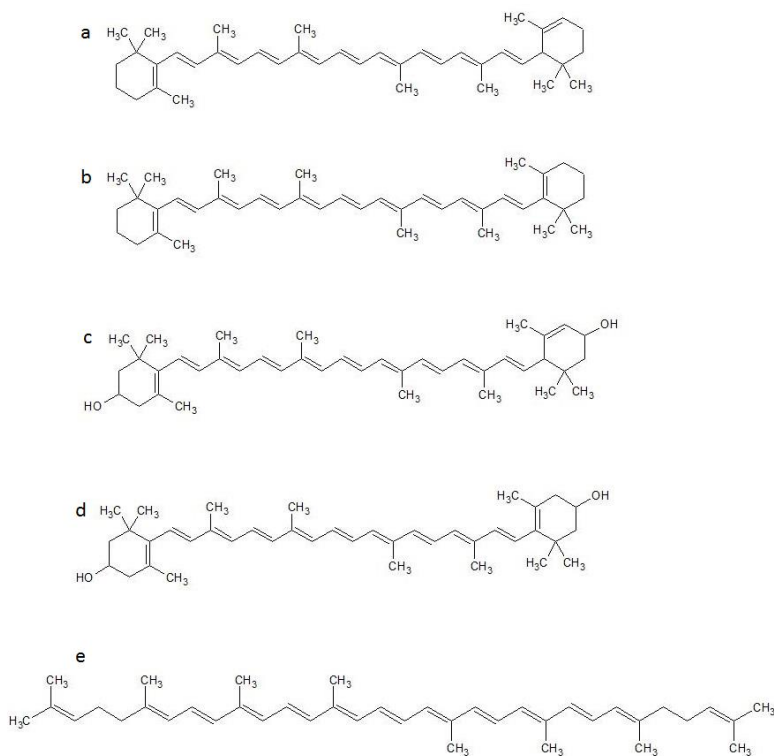


Figura 5: Struttura di: a) α-carotene; b) β-carotene; c) luteina; d) zeaxantina; e) licopene

suggeriscono che le persone con livelli plasmatici più elevati di antiossidanti o maggior assunzione degli stessi abbiano un rischio minore di sviluppare le opacità delle lenti correlate all'età [47-51]. Altri studi hanno portato a risultati negativi o inconcludenti [52][53] ma possibili limitazioni inerenti ai metodi di valutazione nutrizionale e/o di definizione della cataratta potrebbe spiegare alcune delle incongruenze osservate [54-56]. Gli spinaci sono l'alimento più spesso associati alla riduzione del rischio di opacità nucleari [57] Gli spinaci sono ricchi di luteina e zeaxantina, gli unici carotenoidi ottenibili mediante ingestione ritrovati nel cristallino. Questi composti hanno la capacità di impedire il danno da UV specialmente per la loro capacità di limitare il dilagare della lipoperossidazione [58]. Altro carotenoide che ha mostrato interessanti proprietà protettive è il

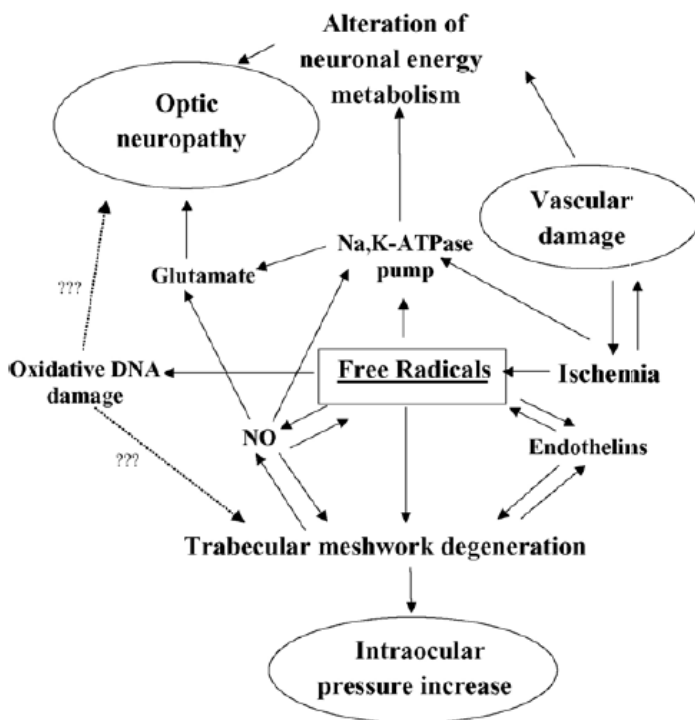
licopene. [59]

L'importanza protettiva dei carotenoidi viene evidenziata da uno studio condotto su oltre trecento pazienti amboessesi con età compresa tra i 66 e i 75 anni dove si evidenziava che il rischio di cataratta nucleare è basso in presenza di alti livelli di α e β carotene; il rischio di cataratta corticale è basso se è elevata la concentrazione di licopene e il rischio di cataratta subcapsulare è basso quando elevata è la concentrazione di luteina. [60]

Glaucoma

Il glaucoma è una malattia che colpisce il nervo ottico con progressivo danno alla capacità visiva ed è causato da un continuo aumento della pressione intraoculare [61]. Nell'occhio affetto da glaucoma il deflusso dell'umore acqueo viene ostacolato, il liquido si accumula e la pressione intraoculare comincia a salire, infine si produce una compressione o uno schiacciamento del nervo ottico con conseguente danno e morte delle fibre nervose. La lesione del nervo ottico si traduce in una progressiva alterazione del campo visivo, il quale tende progressivamente a restringersi fino alla sua completa scomparsa. Se le fibre del nervo ottico vengono danneggiate, all'interno del campo visivo si generano delle zone dette scotomi, in cui non è più possibile vedere. Quando le cellule nervose sono completamente distrutte la perdita della vista diventa definitiva ed irreversibile. Esistono varie tipologie di glaucoma. Il glaucoma cronico ad angolo aperto è il tipo più comune ed è dovuto ad una sorta di invecchiamento del sistema trabecolare di deflusso. L'umore acqueo raggiunge il trabecolato, ma non viene sufficientemente filtrato in quanto quest'ultimo è strutturalmente alterato (ostruzione dei canali di scarico). La pressione oculare aumenta causando un danno progressivo al nervo ottico. Se non diversamente specificato in questo paragrafo è ad esso che si fa riferimento.

Altra tipologia piuttosto comune è il glaucoma ad angolo chiuso dove l'umore acqueo non riesce a raggiungere il sistema trabecolare di deflusso perché l'angolo formato da iride e cornea è troppo stretto. Altre tipologie di glaucoma meno diffuse e dalle caratteristiche diverse sono il glaucoma a pressione normale, messo in relazione con uno scarso afflusso sanguigno, il glaucoma pigmentario, solitamente ereditario in cui alcuni frammenti dell'iride, trasportati dall'umore acqueo, vanno ad ostruire le fessure del trabecolato dalle quali fuoriesce il liquido e il glaucoma congenito in cui l'angolo di drenaggio è anomalo sin dalla nascita. Il ruolo preminente dello stress ossidativo nella patogenesi del glaucoma è stato ipotizzato



oltre vent'anni da Alvarado [62][63], esso suggerivano che la progressiva perdita di cellule trabecolari dovesse essere attribuito ai danni a lungo termine dei radicali liberi. Negli anni successivi, questa ipotesi è stata sostenuta da molti studi di varia natura. Si è visto per esempio che il trattamento di cellule umane trabecolari in vitro con perossido d'idrogeno compromette l'adesione e l'integrità cellulare[64], mentre in vivo la perfusione di cellule trabecolari con perossido d'idrogeno altera il meccanismo di drenaggio del umore acqueo dalla camera anteriore dell'occhio [65]. Una meta-analisi recente i cui risultati saranno riportati in seguito ha dimostrato la presenza di stress ossidativo nel siero e nell'umor acqueo di pazienti affetti da glaucoma. [66] Inoltre, è stato mostrato in vivo negli esseri umani che sia la pressione intraoculare che la perdita di capacità visiva sono significativamente correlati alla

Figura 6: Cascata patogenetica del glaucoma; illustrazione da Izzotti et al 2006 [61]

quantità di danni ossidativi del DNA che interessano le cellule trabecolari [67]. Il possibile ruolo patogeno dello stress ossidativo nel glaucoma è ulteriormente supportata dall'aumentata espressione di una molecola di adesione endoteliale-leucocitaria (ELAM-1) nelle cellule trabecolari dei pazienti con glaucoma, rispetto al gruppo controllo. L'espressione di ELAM-1 è controllata da un meccanismo di feedback autocrino di attivazione attraverso il fattore di trascrizione nucleare NFkB, e fa parte di un meccanismo complesso di protezione contro lo stress ossidativo [68]. Gli studi citati sottolineano il ruolo dei danni ossidativi endogeni nella patogenesi del glaucoma, questa interpretazione è in accordo con la teoria patogenica vascolare che indica nella disregolazione vascolare il passo patogenetico fondamentale, infatti, è stato dimostrato che anche nell'occhio [69] la disregolazione vascolare porta a ischemia e riperfusione, inducendo quindi danni ossidativi. Il collegamento stretto tra funzione vascolare e danno ossidativo è anche correlato alla fisiologica attività dell'endotelio, infatti, esso è coinvolto nella modulazione della permeabilità vascolare attraverso il rilascio di endoteline e NO, un importante ossidante extra e intracellulare in grado di peggiorare le condizioni metaboliche delle cellule trabecolari [70]. Le endoteline possono influenzare la motilità delle cellule trabecolari e la regolazione della pressione intraoculare [71]. Nel complesso, i suddetti studi suggeriscono che diversi meccanismi possono contribuire alla produzione di radicali liberi tuttavia, un ruolo predominante è giocato dal metabolismo, che può essere influenzato dalla disregolazione vascolare [72]. L'ossigeno molecolare può essere ridotto per formare il radicale anionico superossido e successivamente in perossido di idrogeno e radicale Idrossile. Il DNA può essere influenzato da danni ossidativi in varie forme comprese le modificazioni ossidative del nucleotide, delle basi o degli zuccheri, oltre che mediante formazione di addotti del DNA con prodotti derivanti da lipoperossidazione o ossidazione di proteine con conseguenze variabili in base al tessuto in cui si trovano. Il tessuto trabecolare è costituito da cellule perenni, in cui l'accumulo cronico di danni ossidativi al DNA può essere interpretato come un potenziale fattore patogenetico per la comparsa di malattie degenerative e fenomeni legati all'insorgenza del glaucoma. Nell'occhio come in ogni altro sistema biologico fondamentale importanza hanno i sistemi difensivi antiossidanti. Nell'occhio un importante ruolo protettivo è giocato da meccanismi enzimatici e non enzimatici basati su acido ascorbico e glutatione come già riportato. È stato dimostrato che le alterazioni più gravi del reticolo trabecolare si verificano negli strati più vicini con la camera anteriore [63]. Questa constatazione ha portato alla conclusione che i ROS contenuti nel umore acqueo contribuiscono all'insorgenza di alterazioni patogenetiche. Kahn *et al.* 1983 [65] hanno dimostrato che la resistenza al flusso di umore acqueo aumenta in presenza di alti livelli di perossido d'idrogeno. In condizioni fisiologiche il perossido d'idrogeno è è attivamente neutralizzato dal sistema antiossidante prima che sia in grado di indurre effetti nocivi sul percorso di deflusso [65]. Tuttavia, è possibile che questo equilibrio possa essere alterato nel tempo, dando così origine all'accumulo progressivo di danno ossidativo nelle cellule trabecolari [73], infatti è stato dimostrato che la riduzione delle celle trabecolari è correlata con l'età, ogni anno circa lo 0,58% delle cellule totali viene perso. Le cellule vengono perse, soprattutto nell'area di filtraggio[62]. I danni di origine ossidativa al DNA sono un fattore importante nella patogenesi del glaucoma ma sono solo il *primum movens* in una serie di fenomeni complessi che interagiscono reciprocamente definiti come "cascata patogenetica" del glaucoma. Particolar importanza è posta alla teoria patogenetica vascolare del glaucoma [74]. Infatti, NO svolge un ruolo fondamentale nella fisiologia neuronale sia come messaggero intracellulare che come modulatore della pompa di sodio cellulare [75]. Attraverso questi meccanismi aumenta la produzione di glutammato e di altri messaggeri intercellulari, che a loro volta causano una marcata e prolungata alterazione dell'attività della pompa ATP-dipendente Na^+/K^+ , un meccanismo implicato nella patogenesi di varie degenerative tra cui il glaucoma [76]. Inoltre, NO reagisce con l'anione superossido per formare il radicale perossinitrito [77]. Alla luce di tutte queste considerazioni, è altamente probabile che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante non solo nella degenerazione delle cellule trabecolari ma anche nel danneggiare la testa del nervo ottico. Si riportano infine gli interessanti risultati emersi da una meta-analisi condotta su 22 studi coinvolgenti un totale di oltre 2000 persone, di cui la metà erano gruppo controllo. Senza addentrarsi troppo nella trattazione statistica si può riassumere questo lavoro affermando che nel siero sanguineo il potere ossidante totale, misurato come capacità ferro-ossidante, è significativamente maggiore nei pazienti affetti da glaucoma che non nel campione di controllo e ad supporto di questo dato viene rilevata anche una maggior concentrazione di MDA, noto marker di lipoperossidazione avvenuta. Nell'umore acqueo è stata invece

rilevata una maggior concentrazione di MDA nei pazienti affetti da glaucoma. Per quanto riguarda la componente antiossidante si invece visto una significativa diminuzione del potere antiossidante del siero e dell'umor acqueo, (inteso come ferro-riducente) e un aumento delle SOD e della GPX nell'umore acqueo. [66] Da questi dati si evince una situazione di diffuso stress sistemico e locale nei pazienti affetti da glaucoma.

Nonostante la conclamata importanza dello stress ossidativo nella patogenesi del glaucoma non esistono in letteratura molti riferimenti a noi noti relativi ad un eventuale terapia antiossidante. Esistono alcuni sporadici studi preliminari condotti negli ultimi anni e seppur i risultati sembrano positivi nessuno di essi è risultato conclusivo[78-80]. Inoltre non sembra esserci una forte correlazione tra l'assunzione di antiossidanti mediante dieta e il rischio di insorgenza del glaucoma [81].

Degenerazione maculare senile

La definizione "degenerazione maculare" individua una serie di alterazioni degenerative della retina che si verificano principalmente nella macula, l'area retinica centrale e funzionalmente più importante.



Figura 7: Esempio di come varia la visione al progredire della degenerazione maculare

Compaiono depositi puntiformi, pigmentazione, atrofia e

neovascolarizzazione coroideale con esudazione e leakage. La degenerazione maculare è caratterizzata dalla perdita di acuità visiva centrale, da un'impressione soggettiva di curvatura di linee rettilinee o metamorfopia e graduale ampliamento dello scotoma centro-cecale.

La malattia ha un'etologia multifattoriale che coinvolge diversi aspetti ambientali e fattori di rischio genetici. Anche se l'età è il più significativo fattore di rischio, la degenerazione maculare è anche associata a ipertensione, aterosclerosi, fumo, dieta ricca di grassi e obesità, oltre che alla genetica. I processi inizialmente coinvolti nella patologia sono la lipofuscinosi e l'autofagocitosi seguite da infiammazione e neovascolarizzazione[82]. Alla maculopatia è associata la riduzione della perfusione coroidale, (ischemia) [83] con tutte le conseguenze del caso al livello di status ossidativo. Nell'occhio, in generale, i ROS possono essere sottoprodotti del metabolismo cellulare o il risultato di reazioni fotochimiche. La retina è un ambiente ideale per la generazione di ROS. Il consumo di ossigeno da parte della retina è molto più grande di qualsiasi altro tessuto, oltre alla presenza di un'elevata velocità metabolica. La retina è soggetta a elevati accumuli degli effetti delle radiazioni, è ricca di acidi grassi polinsaturi, e quindi facilmente ossidabili e fonte di metaboliti citotossici. La retina è anche molto ricca di fotosensibilizzatori, ossia molecole chimicamente definite cromogene che grazie alla loro capacità di interagire con la radiazione visibile sono molto sensibili a fenomeni di fotossidazione [5]. Come già accennato la retina è molto sensibile allo stress ossidativo fotoindotto, infatti anche se la luce e l'ossigeno sono essenziali per la visione, possono anche portare alla fotogenerazione di ROS con conseguenti danni fotochimici alla retina. La retina contiene una varietà di cromofori che quando eccitati alla lunghezza d'onda appropriata possono portare a significativi danni fotochimici. I fotosensibilizzatori principali nella retina sono i pigmenti visivi nelle cellule fotorecettori e la lipofuscina, i quali si accumulano entrambi con l'età nell'endotelio pigmentato reticolare. Altre molecole fotoreattive nella retina che possono fotogenerare ROS in determinate condizioni sono anche melanina, emoglobina e proteine contenenti ferro (ad esempio citocromo C), flavine, flavoproteine e carotenoidi [84]. I danni fotochimici nella retina possono essere ampiamente suddivisi in due categorie. Il danno spesso chiamato danno da luce blu, è causato da un livello relativamente elevato di irradiazioni e brevi esposizioni (secondi o minuti) ed è considerato tipico dell'endotelio pigmentato reticolare [85]. In questi casi i principali fotosensibilizzatori sono lipofuscina e

citocromi [84]. Nel secondo caso il danno è causato da basse irradiazioni e da esposizioni più lunghe (tipicamente ore o addirittura giorni) e i danni di questo tipo sono osservati per primi nei fororoscopi [86]. Nonostante i pigmenti visivi siano coinvolti in questo processo [84][87][88] sembra che un fondamentale ruolo fondamentale di fotosemnsibilizzatori lo ricoprano i metaboliti della vitamina A. Infatti la mancanza di retinolo protegge dai danni alla luce alla retina e questo è probabilmente dovuto alla ridotta disponibilità di metaboliti fotoreattivi della vitamina A [89].L'accumulo di età di lipofuscina denominata, anche di pigmento dell'età, nel reticolo pigmentato reticolare è fortemente correlato alla maculopatia . Nella retina i cambiamenti legati all'età sono stati ben documentati e sono caratterizzati dalla perdita di cellule, di accumulo di lipofuscina, cambiamenti della membrana di Bruch e Drusen. Con l'invecchiamento sia ha un deciso e generalizzato declino dei sistemi antiossidanti ed un contemporaneo aumento della concentrazione di ROS; questo è valido anche per la retina neurosensoriale e l'epitelio pigmentato retinico nonostante siamo molto ricchi di sistemi antiossidanti enzimatici e non [5][90], con conseguente correlazione tra danni alla retina ed invecchiamento della stessa, [91-90]. Nonostante una vasta letteratura, il collegamento con l'età non è stato ancora pienamente spiegato soprattutto per quanto riguarda la porzione antiossidante. Ad esempio, Miyamura e colleghi non lo hanno riportato collegamenti tra catalasi ed eme-ossigenasi con l'età [93], mentre altri hanno riferito che cambiamenti nell'attività delle catalasi, che diminuisce, ma non della superossido dismutasi, nell'epitelio pigmentato reticolare [94]. È stata riscontrata una notevole riduzione dei carotenoidi maculari [95] come è stata rilevata una riduzione di tre volte della glutatione S-transferasi-1 (un enzima che riduce i perossidi, lipidi ossidati e retinoidi ossidati) [96], a fronte di aumento della perossidazione lipidica [97]. A sostegno della teoria dei danni ossidativi gli studi della retina hanno mostrato un aumento correlabile con l'età la lipofuscina, un potente generatore fotoinducibile di ROS, nel epitelio pigmentato reticolare [84], l' 8-oxodG nella La retina [98], il danno del mtDNA [99], 4HNE e MDA [97][100]. Questi studi sono sostenuti da una pleora di studi su culture cellulari e modelli animali, tuttavia, è difficile valutare se con l'età i danni ossidativi sono dovuti principalmente a ridotti livelli antiossidanti, ad aumento della ROS, o più probabilmente ad una combinazione di questi. Anche se non è ancora chiaro se la maculopatia è semplicemente una manifestazione di un invecchiamento eccessivo o se rappresenta una patologia distinta indipendente dal processo di invecchiamento generale, molti studi, anche in modelli animali, spingono verso la seconda ipotesi supportando tra l'altro l'idea che lo stress ossidativo abbia un ruolo fondamentale nella patogenesi della stessa [101].

- [1] Williams DL Oxidative stress and the eye. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38:179-92.
- [2] Ottonello, S., Foroni C, Carta A, et al. Oxidative Stress and Age-Related Cataract. *Ophthalmologica* 2000;214:78-85
- [3] Berthoud VM & Beyer EC Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009;11(2)
- [4] Pece A, Marchetti M, Pallotti R I radicali liberi. Le monografie di : *Retina Research and Rehabilitation*. editore SOOFT, 2006
- [5] Beatty S, et al. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration Survey of ophthalmology 2000;45
- [6] Rozanowska M, Wessels J, Boulton M, et al. Blue light induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free radical biology & medicine*. 1998;24(7-8):1107-1112.
- [7] Rozanowska M, Pawlak A, Rozanowski B, Skumatz C, et al. Age-related changes in the photoreactivity of retinal lipofuscin granules: role of chloroform-insoluble components. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(4):1052-1060
- [8] Klein R, Klein BEK, et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: XVII : The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998;105(10):1801-1815
- [9] Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng d, et al Diabetic Retinopathy and Serum Lipoprotein Subclasses in the DCCT/EDIC Cohort. *Retina* 2004
- [10] Chew EY, Klein ML, Ferris FL et al Association of Elevated Serum Lipid Levels With Retinal Hard Exudate in Diabetic Retinopathy Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol*. 1996;114(9):1079-1084.
- [11] Sen K, Misra A, Kumar A et al. Simvastatin retards progression of retinopathy in diabetic patients with hypercholesterolemia. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2002;56:1-11

- [12] Augustin AJ, Dick HB, Koch F, Schmidt-Erfurth U Correlation of blood-glucose control with oxidative metabolites in plasma and vitreous body of diabetic patients. *Eur J Ophthalmol.* 2002;12(2):94-101.
- [13] Kim I, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7614-7620.
- [14] Mamputu JC & Renier G Advanced glycation end-products increase monocyte adhesion to retinal endothelial cells through vascular endothelial growth factor-induced ICAM-1 expression: inhibitory effect of antioxidants. *Journal of Leukocyte Biology* 2004;75(6):1062-1069
- [15] Stitt WA AGEs and diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:4867-74.
- [16] Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:3103-11
- [17] Lapolla A, Tubaro M, Reitano R, et al. The complexity of non-enzymatic glycation product sets of human globins. *Diabetologia* 2004;47:1712-5
- [18] Ceriello A, Inhat MA, Thorpe JE The “metabolic memory”: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:410-5
- [19] Chillelli NC, Piarulli F, Sartore G, Lapolla A Ruolo dei prodotti di glicazione avanzata nelle complicanze microvascolari del diabete di tipo 2: “attori protagonisti” nella memoria metabolica? *G It Diabetol Metab* 2016;36:22-27
- [10] Motoyoshi I, Yoshihiko N, Hiroshi M et al. Effects of hyperglycemia on oxidative stress and antioxidant potential in patients with type 2 diabetes *Diabetology International*, 2010;1(2):72-77
- [21] Kowluru RA, Tang J, Kern TS Abnormalities of Retinal Metabolism in Diabetes and Experimental Galactosemia VII. Effect of Long-Term Administration of Antioxidants on the Development of Retinopathy. *Diabetes* 2001;50(8): 1938-1942.
- [22] Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001;44(9):1102-1110
- [23] Larsson L, Österlin SG Posterior vitreous detachment. A combined clinical and physicochemical study. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985;23:92-95.
- [24] Foos RY & Wheeler NC. Synchrony senilis and posterior vitreous detachment. *Vitreoretinal juncture:Ophthalmology* 1982;12:1502-1512.
- [25] Sebag J & Graefes Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:690-8
- [26] LeGoff MM & Bishop PN Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* 2008;22:1214-22.
- [27] Bishop PN Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:323-344.
- [28] Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, Chakrabarti B Effects of visible-light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Res* 1987;44:863-70.
- [29] Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 1994;13:505-512.
- [30] Jariashvili K, Madhan B, Brodsky B, et al. UV Damage of Collagen: Insights from Model Collagen Peptides. *Biopolymers* 2012;97:189-98.
- [31] Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging* 2014;9:637-52.
- [32] Panickar KS & Anderson RA Effect of Polyphenols on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Neuronal Death and Brain Edema in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci* 2011;12:8181-207
- [33] Haorah J, Ramirez SH, Schall K, et al. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007;101:566-76
- [34] Sebag J Is pharmacologic vitreolysis brewing? *Retina* 2002;22:1-3.
- [35] Nuzzi R, Marchese A, Gulino GR, et al. Influence of posterior vitreous detachment and type of intraocular lens on lipid peroxidation in the human vitreous. *Molecular Vision* 2015;21:1106-1112
- [36] Smith W, Mitchell P, Leeder SR, Wang JJ. Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1998;116:583-7.
- [37] Konerirajapuram NS, Coral K, Punitham R et al. Trace Elements Iron, Copper and Zinc in Vitreous of Patients with Various Vitreoretinal diseases. *Indian J Ophthalmol* 2004;52:145
- [38] Vinson JA Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006;13:151-162
- [39] McCarty CA & Taylor HR A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. *Dev. Ophthalmol.* 2002;35:21-31.
- [40] Taylor H, West SK, Rosenthal FS, et al. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med* 1988;319:1429-1433.
- [41] Bova LM, Sweeney MH, Jamie JF, Truscott JF Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42:200-205.
- [42] Truscott JR Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp. Eye Res.* 2005;80:709-725.
- [43] Spector A & Garner WH Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981;33:673-681.
- [44] Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, et al. Protein Oxidation and Lens Opacity in Humans; *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2461-2465
- [45] Kaur S, Singh SP, Gujra U; Role of Malondialdehyde (MDA) in senile cataract. *JMR* 2016;2(2):44-46
- [46] Moeller SM, Taylor A, Tucker KL, et al Overall adherence to the dietary Guidelines for Americans is associated with reduced prevalence of early age-related nuclear lens opacities in women. *J. Nutr.* 2004;134:1812-1819.

- [47] Jaques PF, Chylack LT Jr, McGandy RB, Hartz SC Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch Ophthalmol* 1988;106:337–340.
- [48] Robertson J, Donner AP, Trevithick JR A possible role for vitamins C and E in cataract prevention. *Am J Clin Nutr* 1991;53:364S–351S.
- [49] Leske MC, Chylack LT Jr, Wu S The lens opacities case control study: Risk factors for cataract *Arch Ophthalmol* 1991;109:244–251.
- [50] Rouhianinen P, Rouhianinen H, Salonen JT Association between low plasma vitamin E concentration and progression of early cortical lens opacities. *Am J Epidemiol* 1995;144:496–500.
- [51] Christen WG, Liu S, Schaumberg DA, Buring JE Fruit and vegetable intake and the risk of cataract in women *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;8:1417–1422.
- [52] Italian-American Cataract Study Group. Risk factors for age-related cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts. *Am J Epidemiol* 1991;133:541–553.
- [53] Vitale S, West SK, Hallfrisch H, et al. Plasma antioxidant and risk of cortical and nuclear cataract. *Epidemiology* 1993;4:195–203.
- [54] Lyle BJ, Mares-Perlman JA, Klein BE, et al. Serum carotenoids and tocopherols and incidence of age-related nuclear cataract. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999;69:272–277.
- [55] Vitale S, West S, Hallfrisch J, et al. Plasma antioxidants and risk of cortical and nuclear cataract. *Epidemiology* 1993;4:195–203.
- [56] Leske MC, Chylack LT Jr, He Q et al. Antioxidant vitamins and nuclear opacities: the longitudinal study of cataract *Ophthalmology* 1998;105:831–836.
- [57] Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutr.* 2002;132:518S–524S.
- [58] Chitchumroonchokchai C, Bomser JA, Glamm JE, Failla ML Xanthophylls and alpha-tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells *J. Nutr.* 2004;134:3225–3232.
- [59] Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, et al. Lycopene Attenuates Oxidative Stress Induced Experimental Cataract Development: An In Vitro and In Vivo Study. *Nutrition* 2003;19: 794–799.
- [60] Gale CR, Nigel CR, Hall F et al. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology* 2001;108(11):1992–1998
- [61] Izzotti A, Bagnis A, Sacca SC The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research* 2006;612:105–114
- [62] Alvarado JA, Murphy CG, Polansky JR, et al. Agerelated changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1981;21:714–727.
- [63] Alvarado JA, Murphy C, Juster R Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normal *Ophthalmology* 1984;91:564–579.
- [64] Zhou L, Li Y, Yue BY, Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J. Cell. Physiol.* 1999 ;180 :182–189.
- [65] Kahn MG, Giblin FJ, Epstein DL Glutathione in calf trabecular meshwork and its relation to aqueous humor outflow facility *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1983;24:1283–1287.
- [66] Benoist d'Azy C, Pereira B, et al. Oxidative and Anti-Oxidative Stress Markers in Chronic Glaucoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2016;11(12)
- [67] Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in human trabecular meshwork and its correlation with intraocular pressure and visual field in primary open angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 2005;123: 458–463.
- [68] Wang N, Chintala SK, Fini ME, Schuman JS, Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype. *Nat. Med.* 2001:304–309.
- [69] Siskova A & Wilhelm J The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of the rat retina *Physiol. Res.* 2001;50:267–273.
- [70] Wiederholt M Nitric Oxide and endothelin in aqueous humor outflow regulation. I.O. Haefliger, J. Flammer (Eds.), *Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma*, Lippincott- Raven, New York, 1998, pp. 168–177.
- [71] Haefliger IO, Dettmann E, Liu R, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 1999;43:S51–S58.
- [72] Djordjevic VB Free radicals in cell biology *Int. Rev. Cytol.* 2004;237:57–89.
- [73] Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, et al. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma Patients *Am. J. Ophthalmol.* 2004;137:62–69.
- [74] Flammer J, Haefliger IO, Orgul S, Resink T Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucoma damage? *J. Glaucoma* 1999:212–219.
- [75] Nathanson JA, Scavone C, Scanlon C The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron* 199;14:781–794.
- [76] Ellis D & Nathanson J Nitric oxide in the human eye: sites of synthesis and physiologic actions on intraocular pressure, blood flow, sodium transport and neuronal viability. I.O. Haefliger, J. Flammer (Eds.), *Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma*, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1998, pp. 178–204.
- [77] Lipton SA Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* 1999:943–951
- [78] Mozaffarieh M & Flammer J A novel perspective on natural therapeutic approaches in glaucoma therapy *Expert Opinion on Emerging Drugs* Volume 2007;12(2)
- [79] Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, et al. Antioxidant Drug Therapy Approaches for Neuroprotection in Chronic Diseases of the Retina; *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(2):1865–1886
- [80] Izzotti A, Sacca SC, Di Marco B, et al. Antioxidant activity of timolol on endothelial cells and its relevance for glaucoma course *Eye* 2008;22, 445–453;

- [81] Jae H, Kang Louis R, et al. Antioxidant Intake and Primary Open-Angle Glaucoma: A Prospective Study. *Am J Epidemiol* 2003;158(4):337-346
- [82] Blasiak J, Petrovski G, Veréb Z et al. Oxidative Stress, Hypoxia, and Autophagy in the Neovascular Processes of Age-Related Macular Degeneration. *BioMed Research International* 2014;ID 768026
- [83] Arjamaa O, N ikinmaa M, Salminen A Regulatory role of HIF-1 α in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Research Reviews*, 2009; 8(4):349–358
- [84] Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B*. 2001;64 (2–3):144–161.
- [85] Ham WT Jr, Mueller HA, Ruffolo JJ Jr, et al. Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina. *Curr Eye Res*. 1984;3(1):165–174.
- [86] Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol*. 1966;5(5):450–473.
- [87] Mellerio, J. Light effect on the retina In: Albert, D.; Jakobiec, F., editors. *Principles and Practice in Ophthalmology*. W.B. Saunders; Philadelphia: 1994. p. 1326-1345.
- [88] Noell WK & Albrecht R Science. Irreversible effects on visible light on the retina: role of vitamin A. *Science* 1971; 172(3978): 76-79
- [89] Grimm C, Wenzel A, Williams T, et al. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42 (2):497– 505.
- [90] Zarbin MA Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122 (4):598–614.
- [91] de Jong PT Age-related macular degeneration .*The New England journal of medicine*. 2006; 355 (14): 1474–1485.
- [92] Khandhadia S & Lotery A. Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology *Expert Rev Mol Med*. 2010;12
- [93] Miyamura N, Ogawa T, Boylan S, et al. Topographic and agedependent expression of heme oxygenase-1 and catalase in the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1562–1565.
- [94] Liles MR, Newsome DA, Oliver PD Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol*. 1991; 109 (9):1285–1288.
- [95] Beatty S, Murray IJ, Henson DB, et al. Macular pigment and risk for agerelated macular degeneration in subjects from a Northern European population *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(2):439–446.
- [96] Maeda A, Crabb JW, Palczewski K Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: protection against oxidative stress and a potential role in aging. *Biochemistry*. 2005;44(2):480–489.
- [97] Castorina C, Campisi A, Di Giacomo C, et al A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymatic systems in rat retina as a function of age; *Neurochem Res*. 1992;17 (6): 599–604
- [98] Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Neufeld AH Increased mitochondrial DNA damage and downregulation of DNA repair enzymes in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid. *Molecular vision*. 2008;14:644–651
- [99] Jarrett SG, Lewin AS, Boulton ME The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders *Ophthalmic Res*. 2010;44(3):179–190.
- [100] Kopitz J, Holz FG, Kaemmerer E, Schutt F. Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration *Biochimie*. 2004;86 (11):825–831.
- [101] Jarrett SG & Boulton ME Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med*. 2012;33(4):399–417.

6.6 DIABETE

Il diabete è un gruppo di cambiamenti metabolici cronici quali carenza di insulina, resistenza cellulare all'azione di insulina, o entrambi aventi come effetto iperglicemia persistente. Il diabete è spesso associato a gravi complicanze di diversi organi che potrebbero compromettere qualità della vita e riduzione dell'aspettativa di vita[1]. Il glucosio è la principale fonte di energia utilizzato dal corpo per fornire energia

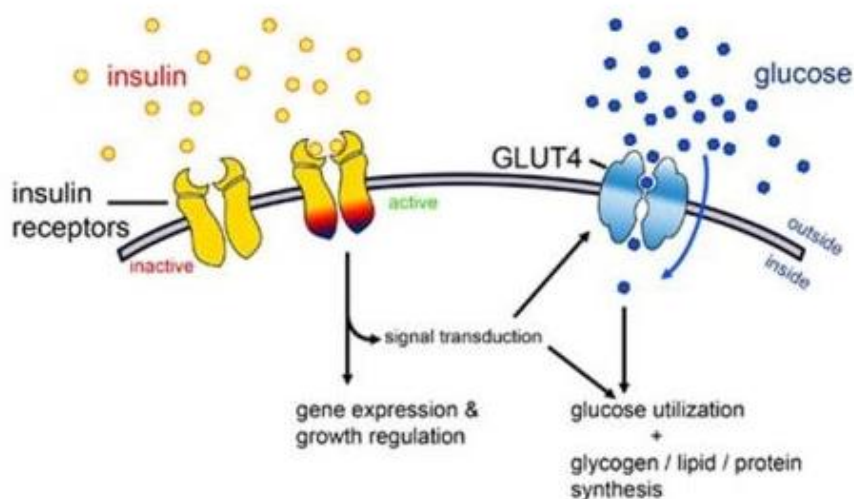


Figura 1: Assorbimento cellulare del glucosio, attivato dall'ormone insulina

alle cellule. L'insulina è un ormone deputato alla regolazione del metabolismo dei carboidrati e del grasso nel corpo. L'insulina regola l'assunzione da parte del fegato, del muscolo e del tessuto grasso del glucosio sotto forma di glicogeno. Essa attiva dei recettori di membrana insulina-sensibili che permettono l'assorbimento diretto del glucosio regolando il numero e la struttura delle apposite proteine di membrana deputate al trasferimento del glucosio. L'effetto immediato del diabete è l'iperglicemia con l'organismo che cerca di eliminare il glucosio attraverso i

reni. Ci sono tre tipi principali di diabete. Il diabete di tipo 1 deriva dalla mancata produzione dell'insulina da parte del corpo e attualmente prevede l'iniezione di insulina da parte del paziente. Il diabete di tipo 1 è anche conosciuto come diabete insulino-dipendente. Il diabete di tipo 2 deriva dalla resistenza all'insulina, una condizione in cui le cellule non riescono ad utilizzare correttamente l'insulina, talvolta combinata con una carenza assoluta d'insulina. È anche chiamato non insulino-dipendente. Il diabete gestazionale è quando donne gravide che non hanno mai avuto il diabete prima hanno un alto di livello di glucosio nel sangue durante la gravidanza. Può precedere lo sviluppo del diabete di tipo 2. L'elevazione cronica del livello di glucosio nel sangue porta a danni dei vasi sanguigni (angiopatia).

I problemi sono raggruppati in microangiopatia (danni ai piccoli vasi sanguigni) e macroangiopatia (danni alle arterie). La microangiopatia è causa di cardiomiopatia diabetica, nefropatia, neuropatia e retinopatia, la macroangiopatia provoca invece accelerazioni dell'aterosclerosi che contribuisce allo sviluppo di patologie coronariche come come l'infarto miocardico, miocardiosi diabetica, patologie vascolari periferiche e ictus[2]. Come riportato in tabella 1 la condizione diabetica è spesso, se non sempre, associata ad una condizione di stress sistemico e come verrà affrontato in questa sezione, a patologie stress correlate.

Studio	Tipologia di pazienti	Markers di ossidazione	Markers antiossidanti
Kotani et al. 2013 [3]	200 adulti con diabete di tipo 2 vs 100 pazienti controllo	Perossidi (d-ROMs) aumentati	-
Ikebuchi et al. 2010 [4]	59 adulti con diabete di tipo 2 vs 10 pazienti controllo	Perossidi (d-ROMs) aumentati	Potere antiossidante misurato mediante BAP non significativamente diverso.

Suys et al. 2007 [5]	37 ragazzi con diabete di tipo 1 vs 35 pazienti controllo	Perossi (d-ROMs) aumentati, MDA aumentata, ferritina aumentata	TAC-TE* ridotta, SOD negli eritrociti aumentata, albumina ridotta, acido urico ridotto, omocisteina ridotta
Dierckx et al. 2003 [6]	24 adulti con diabete di tipo 1 vs 25 pazienti controllo 6 adulti con diabete di tipo 2 vs 25 pazienti controllo (per esigenze d'esposizione sono esposti solo i confronti col gruppo controllo)	MDA aumentata MDA aumentata	Retinolo ridotto, GSH ridotto, acido urico ridotto, TAC-TE* Ascorbato ridotto, GSH ridotto, TAC-TE*
Berletta et al. 2001 [7]	43 adulti, non specificato il tipo	Perossidi (d-ROMs) aumentati nel 70% del campione totale, e nel 80% se si considerano pazienti affetti da meno di 3 anni	-
Shyamsunder et al. 2000 [8]	52 adulti con diabete (824 di tipo 1 e 28 di tipo 2) vs 31 pazienti controllo	Molecole reattive al TBARS aumentate	-

Tabella 1: Modificazione di markers di stress ossidativo nel paziente diabetico; se non specificato si intendo come valori misurati nel plasma/siero; * Total Antioxidant Capacity intesa come radical scavenging

Il legame tra diabete e stress ossidativo è molto stretto. Lo stress ossidativo è riconosciuto tra le cause sia dell'insulino-resistenza sia delle disfunzioni delle β -cellule delle isole di Langerhans. Parimenti uno degli effetti del diabete è il prodursi o comunque l'aggravarsi di una situazione di stress ossidativo, infatti sono spesso associate alla presenza di diabete patologie nella cui patogenesi lo stress ossidativo gioca un ruolo di primo piano [9-13]. Gli esperimenti di *Czech et al. 1974* [14], in cui si evidenzia che alte concentrazioni di H_2O_2 attivano il segnale dell'insulina e inducono le tipiche azioni metaboliche della stessa, sono considerati la prima evidenza sperimentale del legame tra ROS e trasduzione del segnale dell'insulina. In particolare H_2O_2 percorre lo stesso percorso dell'insulina causando la propagazione del segnale tipica dell'insulina, [15] stimolando la traslocazione di GLUT4 (trasportatore di glucosio tipo 4) nella membrana e la liposintesi negli adipociti [16]. Le proteine del substrato del recettore dell'insulina (IRS) sono gli effettori per l'attività di tirosin-chinasi del recettore dell'insulina (IR) all'attacco dell'insulina. Queste proteine sono coinvolte in una fase critica di segnalazione di insulina. Nello stato normale non-stimolato, le molecole di segnalazione dell'insulina sono distribuite tra il citosol e lo spazio intramembrana. Mentre dopo la stimolazione mediante insulina, i residui di tirosina su IR e IRS sono fosforilati attraverso la chinasi del recettore dall'insulina attivato. Ciò porta all'aumento di PI 3-chinasi nella membrana plasmatica e nello spazio intramembrana. Successivamente, l'attivazione del piccolo GTPasi-Rac induce una riorganizzazione citochistaltica che propaga i segnali di insulina. Infine, questo si conclude con gli effetti metabolici tipici dell'insulina, come l'aumento del glucosio. In condizioni di aumento dello stress ossidativo, vengono attivate delle cascate di segnalazione responsive di stress, come le cascate di MAP chinasi (proteine chinasi attivate da mitogeno). Ciò porta ad una maggiore fosforilazione Ser/Thr delle molecole IRS. Le molecole IRS modificate vengono rilasciate nello spazio intermembrana e maggiormente degradate. In queste condizioni, l'insulina non riesce a produrre effetti metabolici normali [17]. Su topi obesi sono stati osservati elevati livelli di H_2O_2 generato nel tessuto adiposo precedere l'insorgenza del diabete, il tutto accompagnato da un decremento di SOD, CAT, GPX [18]. Lo stress ossidativo non è coinvolto solo nell'insorgenza del diabete di tipo 2 ma anche nelle disfunzioni delle β -cellule. La glucotossicità e la lipotossicità sono fenomeni diabetici che generano stress ossidativo e sono implicati nella patogenesi della disfunzione delle β -cellule [19].

L'iperglicemia e l'iperlipidemia precedono la patogenesi primaria del diabete e esercitano un ulteriore effetto tossico sulle β -cellule. Ci sono prove derivanti da studi in vitro e in vivo che il glucosio e i lipidi sono dannosi per le β -cellule. È interessante notare che alcuni studi hanno riportato che la lipotossicità si verifica solo in presenza di livelli elevati di glucosio [20][21]. Di conseguenza, l'iperglicemia potrebbe essere un prerequisito per gli effetti negativi della lipotossicità.

Robertson et al. 1992 hanno dimostrato come l'espressione dell'insulina, il contenuto di insulina e la secrezione di insulina indotta da glucosio sono state progressivamente e drasticamente compromesse nel tempo quando la linea di β -cellule (cellule HIT-T15) è stata esposta ad elevate concentrazioni di glucosio [22]. L'evidenza che la glucotossicità è correlata allo stress ossidativo deriva da prove indirette inerenti all'utilizzo di antiossidanti, ossia si è osservato che N-acetilcisteina e aminoguanidina proteggono le cellule HIT-T15 contro gli effetti negativi da esposizione ad elevate concentrazioni di glucosio [23][24]. Utilizzando l'N-acetilcisteina o l'aminoguanidina in cellule sottoposte per molti passaggi a condizioni di glucosio elevate, è possibile osservare una conservazione dell'attività di promotore dell'insulina e dei livelli di mRNA di insulina antiossidante-dipendente [25]. Una prolungata esposizione in vitro di isole isolate o di cellule secernenti insulina ad elevati livelli di acidi grassi è associata a secrezione di insulina indotta da glucosio, alterazione dell'espressione di insulina e induzione della morte cellulare mediante apoptosi. Inoltre si ha che la maggior parte degli effetti correlati alla glucolipotossicità nelle β -cellule comporta la generazione di stress ossidativo e infiammazione. Parziale sostegno a queste teorie derivano da studi condotti su animali. Il topo db/db è un modello genetico di roditore ben accettato nello studio del diabete di tipo 2, grazie ad una mutazione nel gene del recettore di leptina. Kaneto et al. 1999 [26] hanno mostrato in uno studio in vivo che N-acetilcisteina è efficace nel migliorare la tolleranza intra-peritoneale al glucosio nei topi db/db. Gli autori hanno osservato che N-acetilcisteina ha migliorato la secrezione di insulina, diminuito moderatamente i livelli di glucosio nel sangue, aumentato la massa delle β -cellule e diminuisce l'apoptosi nei topi diabetici. Risultati simili si hanno avuto con vitamina E [27] e glicazide [28]. Nell'uomo invece si hanno numerosi studi che dimostrano la contemporanea presenza di iperglicemia, iperlipidemia e stress ossidativo ma non esiste ancora una procedura adeguata per provare il loro ruolo nell'origine delle disfunzioni delle β -cellule. [9]

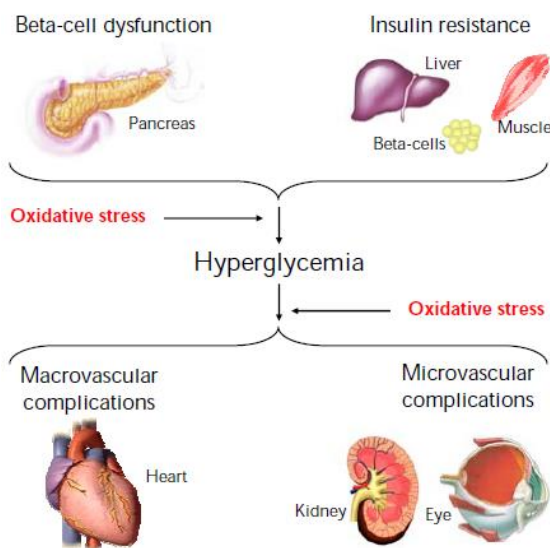


Figura 2: Lo stress ossidativo: causa ed effetto del diabete; immagine da Pitocco et al. 2010 [9]

Cercando di razionalizzare i complessi processi fisiologici in gioco, si può affermare che lo stress ossidativo, o meglio l'elevata concentrazione di ROS sia tra le cause della condizione di iperglicemia tipica del diabete, ma anche che la condizione di iperglicemia attiva tutta una serie di meccanismi tra i cui prodotti finali risultano esserci i ROS. La patologia diabetica è uno dei casi meglio conosciuti dove i ROS sono sia causa che effetto

della stessa. I meccanismi per cui i ROS sono causa dell'iperglicemia sono ben descritti nella review a cura di Liang-Jun Yan [12] di cui si riportano i passaggi fondamentali. Da notare il concetto di stress riduttivo associato ad un surplus di elettroni che genera uno stress di tipo ossidativo.

Euglicemia

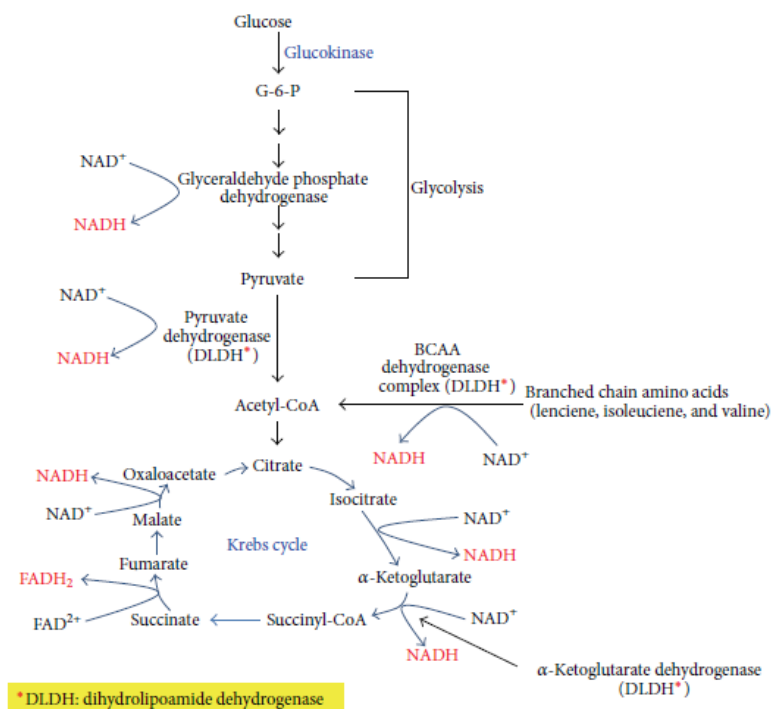
È considerato normale nel sangue una concentrazione di glucosio inferiore a 100 mg/m; concorrono al mantenimento di questa concentrazione sia l'assorbimento dello stesso nei tessuti sensibili all'insulina sia la produzione di glucosio da parte del fegato principalmente. Un rapido aumento del contenuto di glucosio nel sangue stimola la secrezione dell'insulina con conseguente aumento temporaneo dell'insulina nel sangue. L'aumento coordinato di glucosio ed insulina nel sangue inibisce la produzione di glucosio dal

fegato e facilita l'assorbimento del glucosio nei tessuti insulino-insensibili. L'euglicemia è strettamente mantenuta, dall'appropriata secrezione di insulina dalle β -cellule su stimolazione nutrizionale, ma anche sull'azione dell'insulina nel fegato e tessuti periferici.

NADH e stress riduttivo

Gli elettroni derivanti dal glucosio sono immagazzinati nelle molecole di NADH e utilizzati per la riduzione dell'ossigeno e la produzione di ATP. NADH è un composto riducente e un eccessivo la quantità di esso può causare stress riduttivo. La sovrapproduzione di NADH o la mancanza di NAD^+ può indurre l'accumulo di NADH, una condizione nota come pseudoipossia in cui l'ossigeno non può essere efficacemente consumato. Inoltre l'accumulo di GSH e NADPH, strettamente legati al metabolismo del NADH, sono anch'essi causa di stress riduttivo. Anche la disfunzione del complesso mitocondriale I, normalmente deputato al riciclo di NADH è tra le cause di stress riduttivo. Lo stress riduttivo sembra essere una delle cause di inibizione del rilascio dell'insulina da parte delle β -cellule.

Iperglicemia, livelli Elevati di NADH e pressione elettronica mitocondriale.



La maggior parte del glucosio viene degradato nel percorso glicolico mentre un rimanente 10-20% viene consumato dalla via dei pentosofosfati. In condizioni iperglicemiche, più glucosio fluisce attraverso il percorso glicolico più piruvato e acetil-CoA vengono prodotti, portando a all'aumento della produzione di NADH. Poiché NADH è un vettore di elettroni, la quantità in eccesso provoca una pressione di elettroni sulla catena di trasporto di elettroni mitocondriale. Questo è particolarmente vero per gli epatociti e le β -cellule pancreatiche in cui glucocinasi (esochinasi D) l'enzima attivato dalla alimentazione, è inibito dal glucosio-6-fosfato (G6P). Pertanto, più glucosio produce più G6P che verrà ripartito attraverso la glicolisi e il ciclo di Krebs, portando la

Figura 3: I percorsi convenzionali che generano NADH riducendo il glucosio tramite la glicolisi e il ciclo di Krebs. Immagine da *Liang-Jun Yan 2014* [12]

produzione di altro NADH. La figura 3 mostra le principali vie convenzionali che possono generare NADH.

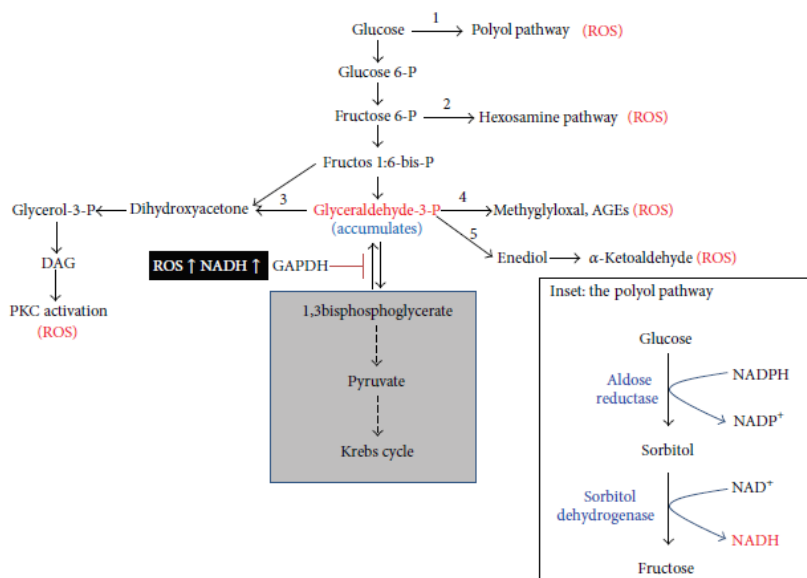
Pressione elettronica NADH-dipendente e produzione mitocondriale di superossido.

La pressione elettronica indotta da NADH sovrapprodotta porterà un grosso carico di lavoro al complesso mitocondriale I che è il principale sito di riciclaggio di NADH. In questa condizione, il complesso lavorerà al massimo della sua capacità di ossidare più NADH a NAD^+ nel tentativo di migliorare la condizione pseudoipossica. Tanto più NADH viene ossidato dal complesso I tanto più superossido verrà prodotto in quanto il complesso I, è anche coinvolto nel pompaggio protonico, portando ad un aumento proporzionale della perdita di elettroni che consentirà di ridurre parzialmente l'ossigeno per produrre superossido. Questo scenario potrebbe peggiorare in condizioni pseudoipossiche poichè se meno NAD^+ è disponibile per trasportare elettroni dell'ossigeno, più ossigeno sarà disponibile per la riduzione parziale a opera degli elettroni perduti del complesso I e del complesso III, quest'ultimo anche coinvolto nel pompaggio protonico.

Superossido e stress ossidativo

Il superossido è il precursore di tutte le specie di ossigeno reattivo che a livelli elevati possono causare stress ossidativo. il superossido può essere convertito in perossido di idrogeno mediante superossido dismutasi; il perossido di idrogeno può poi essere convertito per formare radicali idrossilici da ioni metallici. Inoltre, il superossido può anche reagire con ossido nitrico per produrre perossinitrito . Di conseguenza, una condizione di stress ossidativo si è completamente sviluppata a causa di un elevato livello di NADH, ottenendo la transizione da stress riduttivo a stress ossidativo Perciò lo stress riduttivo non è il contrario dello stress ossidativo anzi effettivamente porta allo stress ossidativo.

Inibizione della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi e percorsi metabolici alternativi del glucosio



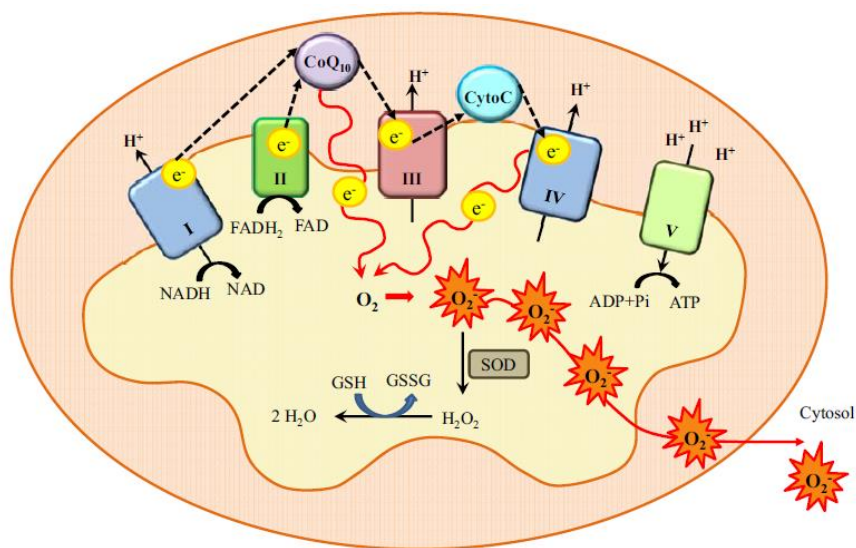
Come è stato affrontato nei punti precedenti, un eccesso di offerta di NADH può portare alla sovrapproduzione di superossido mitocondriale e di altre forme di ROS. Questi ROS possono quindi compromettere l'attività della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) che è molto sensibile alle modificazioni ossidative a causa di un residuo di cisteina indispensabile nel suo centro attivo. Inoltre, l'elevato livello di NADH potrebbe anche inibire l'attività di GAPDH. Tali

Figura 4: Interruzione della glicolisi e vie alternative per lo smaltimento degli intermedi ; immagine da Liang-Jun Yan 2014 [12]

deterioramenti riducono collettivamente l'efficienza del metabolismo del glucosio, inducendo l'accumulo di gliceraldeide 3-fosfato (G3P). Pertanto, tutti i prodotti intermedi precedenti incluso G3P dovranno essere smaltiti da percorsi alternativi meno efficienti con conseguenti problemi di accumulo, primo fra tutti quello del glucosio. L'elevata concentrazione di glucosio però porterà ad incentivare i primi punti di questo ciclo difficilmente interrompibile. Le possibili cause di produzione di ROS in conseguenza dello stato diabetico sono molteplici, come per esempio nella formazione dei ROS mediata degli AGE (advanced glycosylation and product). Il glucosio a concentrazioni elevate può dar luogo a reazioni non enzimatiche con i gruppi amminici primari delle proteine formando dei residui glicati denominati prodotti di Amadori che dopo una serie di disidratazioni e frammentazione vengono convertiti in addotti covalenti stabili denominati appunto AGE [29]. La glicazione delle proteine è direttamente correlata alla concentrazione del glucosio e quindi incentivata in caso di scarso controllo glicemico. Un'altra possibile fonte di AGE deriva dall'alimentazione specialmente di alimenti glicoproteici cotti [30]. Gli AGE si legano a un recettore di superficie cellulare conosciuto come recettore per AGE (RAGE). Questo legame inizia una cascata di eventi di trasduzione del segnale coinvolgendo i MAPK p44/ p42, il fattore nucleare Nf-κB, p21Ras e altri intermedi [31][32]. L'interazione di AGE con RAGE induce la produzione di ROS attraverso un meccanismo che coinvolge la localizzazione di molecole proossidanti sulla superficie cellulare [33]. La produzione ROS mediata da AGE è particolarmente implicata in complicazioni vascolari diabetiche [34][35]. Altra fonte di ROS è l'eccessiva attivazione del via dei polioli. L'enzima aldosi reductasi converte le aldeidi tossiche in alcoli inattivi [2]. Il glucosio è un substrato scarso per la riduzione dell'aldosi, ma a concentrazioni elevate questo enzima converte glucosio a sorbitolo, innescando il percorso di poliolo della conversione del glucosio al fruttosio. Simile alla GSH reductasi, l'enzima di aldosi reductasi dipende da NADPH come cofattore. Pertanto, l'attivazione eccessiva del percorso del poliolo esaurisce il NADPH citosolico e successivamente diminuisce

la concentrazione di GSH, lasciando la cella vulnerabile ai radicali liberi prodotti durante le normali funzioni cellulari come il trasferimento di elettroni. Inoltre l'accumulo di sorbitolo produce uno stress osmotico cellulare che genera altro lo stress ossidativo [36]. Questa via metabolica è stata anche un obiettivo per le terapie contro le complicazioni del diabete, inclusa la neuropatia [37]. Come già accennato in precedenza altra importante fonte di ROS nella patologia diabetica è il la disfunzione di alcuni meccanismi mitocondriali. Normalmente, NADH e FADH₂ sono prodotti come derivati del ciclo acido tricarbossilico e trasferiti ai mitocondri, dove servono come donatori di elettroni ai complessi enzimatici redox associati alla membrana mitocondriale.

Gli elettroni vengono trasportati attraverso i complessi ossidoriduttasi I, II, III e IV (citocromo c), finché non vengono trasferiti all'ossigeno molecolare, fino alla formazione di acqua. Il trasferimento di elettroni nei complessi I, II, III e IV produce un gradiente protonico nella membrana mitocondriale esterna, generando quindi un gradiente di potenziale tra la membrana mitocondriale interna e la membrana mitocondriale esterna, che guida la sintesi di ATP. Durante il trasferimento degli elettroni dal complesso II al complesso III i ROS vengono prodotti come sottoprodotti. I livelli di ROS prodotti durante la normale fosforilazione ossidativa sono minimi, e vengono normalmente contrastati efficacemente da antiossidanti cellulari come GSH e superossido dismutasi (SOD). In condizioni iperglicemiche, i livelli più alti di piruvato derivato dal glucosio aumentano il flusso di NADH e FADH₂ nella catena di trasporto elettronico e di conseguenza il gradiente protonico trans-membrana mitocondriale. A questo punto, il trasferimento di elettroni all'interno del complesso III è bloccato, di conseguenza il coenzima Q₁₀, dirotta gli elettroni all'ossigeno molecolare, generando così superossido [38][39]. Lo stress ossidativo nei mitocondri altera in modo critico la regolazione energetica e la sopravvivenza degli stessi attraverso almeno tre meccanismi diversi. In primo luogo, i livelli fisiologici di NO competono in modo reversibile con l'ossigeno molecolare per legarsi al citocromo c ossidasi, causando l'inibizione reversibile dello stesso e agendo come regolatore per il trasferimento di elettroni. Al contrario, in presenza di eccesso di superossido, NO viene convertito in ONOO[•], che compete con l'ossigeno molecolare per un legame irreversibile al citocromo c ossidasi. Così, ONOO[•] influenza profondamente la funzione mitocondriale e inibisce la sintesi di ATP [40][41].



In secondo luogo, lo stress ossidativo mitocondriale attraverso l'eccessiva produzione di superossido e ONOO[•], inibisce l'importazione di proteine essenziali ai mitocondri [42]. Infine, il danno ossidativo delle proteine di membrane interne esistenti induce una permeabilizzazione della membrana interna mitocondriale che precede il rilascio del citocromo c e l'apoptosi [43].

Figura 5: Produzione mitocondriale di ROS in causata da iperglicemia: immagine da *Fiorentino et al. 2013* [11]

Esiste una stretta correlazione tra lo stress ossidativo nel diabete e lo

sviluppo delle complicanze. Nei pazienti affetti da diabete di tipo 1, lo stress ossidativo è evidente alcuni anni prima prima dell'inizio delle complicanze. Mentre la malattia progredisce, il potenziale antiossidante diminuisce e i prodotti di perossidazione lipidica del plasma aumentano a seconda del livello del controllo glicemico [44]. Pazienti diabetici di tipo 2 hanno maggiori livelli di perossidazione lipidica rispetto ai soggetti di controllo, e un decremento dei livelli plasmatici di GSH e di enzimi GSH-metabolizzanti oltre del potenziale antiossidante direttamente correlato alla velocità di sviluppo delle complicazioni [45-47].

Tra le varie complicanze del diabete legate allo stress ossidativo sono malattie cardiovascolari, neuropatie, retinopatie, disfunzione erettile e complicanze legate al cavo orale. Le malattie cardiovascolari, come per

esempio la cardiomiopatia diabetica, l'aterosclerosi, e malattie microvascolari o macrovascolari sono tra le complicanze più diffuse. L'incidenza di malattie cardiovascolari nelle persone con diabete mellito è di tre o quattro volte superiore a quella degli individui non diabetici. Inoltre, i fattori di rischio noti come la dislipidemia, l'ipertensione e il fumo non possono spiegare questa maggiore prevalenza delle malattie vascolari nel diabete. [10][48]

Diabete e malattie cardiovascolari

Lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale nella aterogenesi e causa l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL). Aumentate concentrazioni di LDL sia ossidato che glicosato sono state documentate nei pazienti diabetici. Questo suggerendo che nel sangue sottoposto a stress ossidativo aumentato del paziente con diabete di tipo 2 l'ossidazione si verifica in vivo e che la glicazione delle LDL può rappresentare un evento predisponente alla successiva modifica ossidativa. Diverse evidenze supportano un ruolo proaterogenico per LDL ossidato (Ox-LDL) e la sua esistenza in vivo. Ox-LDL non è riconosciuto dal recettore LDL, ma da alcuni recettori sui macrofagi, che provocano così l'accumulo di colesterolo non regolato e portano alla formazione di schiuma e placche [49]. Le ROS possono inoltre modulare i percorsi di segnalazione intracellulari, per esempio agendo su proteine attivate da mitogeni o su fattori di trascrizione sensibili a redox (ad esempio NF- κ B, fattore 1 indotto dall'ipossia (HIF-1) e proteina attivatore 1 (AP-1), causando così cambiamenti nell'espressione proteica [50]. Studi clinici hanno trovato costantemente che la vasodilatazione dipendente dall'endotelio è anormale nei soggetti con diabete mellito [51][52] e sembra che la disfunzione endoteliale causata dall'iperglicemia sia, almeno in parte, dovuta alla sovrapproduzione di ROS. Questo sembra avvenire attraverso due percorsi principali: NADPH-ossidasi e eNOS disaccoppiato. L'iperglicemia, come l'acido grasso libero (FFA) e la lipoproteina a bassa densità ossidata (LDL), è stato dimostrato favorire l'attività endoteliale della NADPH ossidasi [53][54]. I vasi sanguigni di soggetti diabetici presentano una maggiore produzione di anione superossido e livelli di espressione più elevati di diverse sottounità di NADPH ossidasi (p22phox, p47phox e p67phox) [55], suggerendo che le NADPH ossidasi sono più attive nei pazienti diabetici. L'eccesso di anione superossido può reagire con l'ossido nitrico promuovendo la sintesi di perossinitrito, che a sua volta ossida il tetraidrobiopterina (BH4), riducendo così la sua disponibilità a eNOS [56][57]. In presenza di concentrazioni ridotte di BH4, l'eNOS diviene disaccoppiato e trasferisce gli elettroni all'ossigeno molecolare anziché a L-arginina, producendo superossido piuttosto che NO [56][58]. L'accumulo di ROS provoca disfunzioni endoteliali attraverso diversi meccanismi, infatti può aumentare i fattori pro-infiammatori e procoagulanti che modulano l'attività di NF- κ B, inducono l'apoptosi e riducono l'insulina. La vasodilatazione dipendente dall'endotelio è risultata migliorata dall'infusione della vitamina C antiossidante ma non dalla vitamina E [59][60]. Sebbene la disfunzione endoteliale abbia un ruolo fondamentale nell'avvio delle lesioni aterosclerotiche, le cellule endoteliali non sono l'unico tipo di cellula la cui funzione è modulata da uno stress ossidativo, infatti, lo stress ossidativo può indurre varie alterazioni fenotipiche anche nella cellula muscolare liscia vascolare (VSMC). I ROS possono promuovere la proliferazione e la migrazione di VSMC ed sono associati alla progressione delle lesioni aterosclerotiche. Tuttavia, eccessivo stress ossidativo può anche indurre l'apoptosi delle VSMC, che è potenzialmente coinvolta nell'instabilità della placca aterosclerotica [61][62]. Inoltre, lo stress ossidativo svolge un ruolo fondamentale nella progressione della risposta infiammatoria nella placca aterosclerotica che favorisce l'espressione delle molecole di adesione.

La cardiomiopatia diabetica è una complicanza cardiovascolare diabetica caratterizzata da alterazioni della struttura del tessuto cardiaco nel cui sviluppo la produzione di ROS indotta da iperglicemia sembra svolgere un ruolo importante. Le proteine coinvolte nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, come i canali ionici sarcolemali, canali del reticolo endoplasmatico per il calcio e le proteine contrattili, possono essere danneggiate da ROS, che inducono anche cambiamenti negativi nel metabolismo cellulare. I ROS non solo esercitano un effetto negativo sul tessuto cardiaco ma possono anche promuovere l'apoptosi cellulare [63][64]. Nei pazienti affetti da diabete mellito, sia l'eNOS che l'iNOS (iNOS) producono anione superossido aumentando così lo stress ossidativo e l'infiammazione, l'anione superossido danneggia la funzione contrattile [65]. Inoltre, lo stress ossidativo e l'infiammazione possono contribuire alla patogenesi della fibrillazione atriale più frequente nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti normoglicemici. Infatti, il ROS può danneggiare la funzionalità che le proteine strutturali [66].

Alcuni studi su stress ossidativo, malattie cardiovascolari e diabete sono stati condotti utilizzando il d-ROMs test. Tra i più recenti ricordiamo *Kitano et al 2016* [67] e *Kotani et al. 2013* [8]. Kitano ha misurato il d-ROMs di 34 pazienti con diabete mellito a 1 e 2 settimane dall'infarto miocardico e ha confrontato i dati con un ugual numero di pazienti dopo il medesimo evento ma non affetti da diabete. Ne risulta che i livelli del d-ROM sono diminuiti significativamente tra la prima settimana e seconda settimana (da $475,4 \pm 119,4$ U.Carr a $367,7 \pm 87,9$ U.Carr, $p < 0,001$) nei pazienti non diabetici, ma non si è mutata nei pazienti diabetici (da $463,1 \pm 109,3$ U.Carr a $461,7 \pm 126,8$ U.Carr, $p = 0,819$). Tra le conclusioni più importanti di questo studio vi è quindi il persistere di un livello di stress ossidativo plasmatico nel paziente diabetico, a differenza dei non diabetici, e il fatto che il d-ROMs a due settimane sia discretamente correlato ($r = 0,0367$, $p < 0,05$) ai risultati dei test di tolleranza al glucosio sembra individuare nell'iperglicemia la causa di questa persistenza. Lo studio di Kotani invece ha preso in esame 100 pazienti affetti da diabete mellito e 100 controlli. Tra i risultati del suo studio abbiamo che i pazienti con diabete hanno livelli di d-ROM significativamente più elevati rispetto ai casi controllo (322 ± 60 vs 345 ± 64 U. Carr., $p < 0,05$). Inoltre mediante un'analisi di regressione è stato rilevato che la pressione sanguigna sistolica ($\beta = 0,26$, $p < 0,05$) e il colesterolo lipoproteico ad alta densità (HDL-C: $\beta = -0,30$, $p < 0,05$) sono correlati indipendentemente e significativamente con i livelli di d-ROMs in pazienti con diabete, anche se queste correlazioni non erano significative nei controlli. Queste correlazioni erano inoltre molto più forti tra le donne che tra gli uomini.

Diabete e neuropatia

Altra complicanza legata al diabete è la neuropatia. La neuropatia diabetica proviene probabilmente da una combinazione di deficit microvascolari e neuronali. Lo stress ossidativo può contribuire in modo significativo a questi deficit e può essere un risultato diretto dell'iperglicemia. Brevi picchi postprandiali del glucosio plasmatico sono sufficienti a generare stress ossidativo iperglicemico. Al contrario, la privazione acuta di glucosio provoca anche l'apoptosi dei neuroni periferici attraverso un meccanismo che almeno parzialmente coinvolge lo stress ossidativo. In linea generale si può affermare che l'iperglicemia causa la degenerazione neurale attraverso l'aumento dello stress ossidativo che accompagna il diabete. Poiché il glucosio entra nei neuroni attraverso un trasporto facilitato dalla concentrazione con velocità gradiente-dipendente, i neuroni sono probabilmente più suscettibili al flusso di glucosio e al successivo

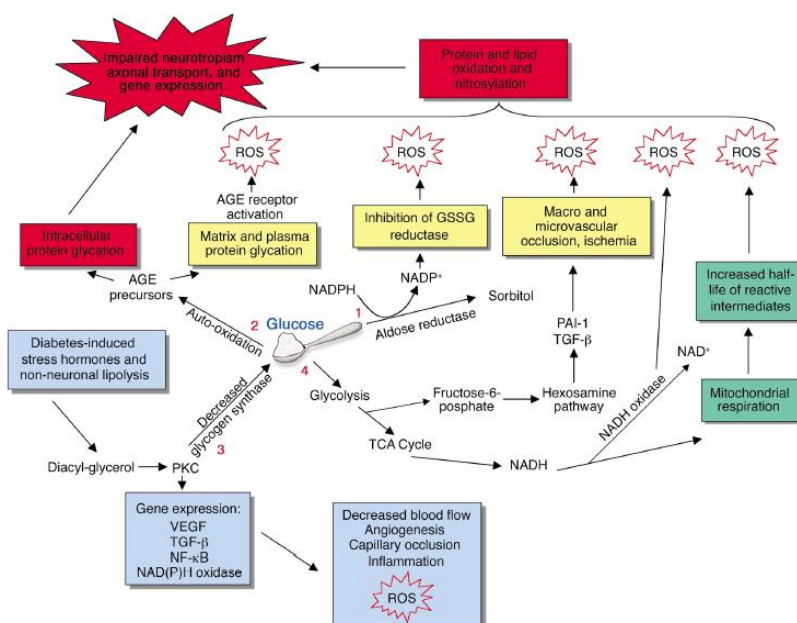


Figura 6: Relazione tra ROS indotti da diabete e neuropatia; immagine da *Feldman 2003* [72]

aumento dello stress ossidativo [10]. Gli esperimenti su animali e in vitro hanno dimostrato quattro importanti vie metaboliche attivate dall'eccesso di glucosio nello sviluppo di complicanze microvascolari [68]. La prima via metabolica aumentata è l'attività della via dei polioli che porta all'accumulo di sorbitolo e fruttosio, squilibri NADPH/NAP⁺ e cambiamenti nella trasduzione del segnale. La seconda è la glicazione non-enzimatica delle proteine che producono prodotti avanzati di glicazione (AGE). La terza è l'attivazione del PKC, iniziando così una cascata di risposte di stress ossidativo-correlate e l'ultimo è l'aumentato flusso della via dell'esosamina [68-71]. Mentre gli inibitori specifici di ciascun percorso bloccano una o più complicanze microvascolari diabetiche, solo recentemente è stato stabilito un legame che fornisce un meccanismo unificato di danni ai tessuti. Ogni percorso viene perturbato direttamente o indirettamente da una

sovrapproduzione di anione superossido mediata dall'iperglicemia dalla catena di trasporto elettronico mitocondriale. L'inibizione dell'accumulo di superossido o l'euglicemia ristabiliscono la sopravvivenza metabolica e vascolare e bloccano sia l'iniziazione che la progressione delle complicanze [68][70][73]. Nello stato diabetico, l'accumulo di anione superossido non controllato e gli aumenti conseguenti all'attività della via del poliolo, l'accumulo di AGE, l'attività PKC e il flusso di esosamina innescano un sistema avanzato di disfunzione cellulare progressiva. Nel nervo, questa confluenza di disturbi metabolici e vascolari porta ad una diminuzione della funzione neurale e alla perdita del supporto neurotrofico e, a lungo termine, può mediare l'apoptosi dei neuroni e delle cellule Schwann, le cellule gliali del sistema nervoso periferico [74-76]. È stata inoltre dimostrato negli animali la diminuzione del fattore di crescita del nervo (NGF), della neurotrofina-3 (NT-3), del fattore neurotrofico ciliico e dell'IGF-I nei nervi degli stessi con diabete sperimentale, correlata alla presenza di neuropatia [77-79].

Diabete e disfunzione erettile

Il meccanismo fisiologico dell'erezione è un complesso fenomeno neurovascolare che dipende dai fattori neurali, vascolari, ormonali e psicologici [80]. NO è il principale mediatore dell'erezione del pene [81]. NO è implicato in diverse funzioni fisiologiche, tra cui la regolazione della trasmissione neurale nel tessuto vascolare e nella funzione del sistema immunitario [82] inoltre un è noto un EDRF (Endothelium-derived relaxing factor) [83] ed è stato dimostrato svolgere un ruolo centrale nel meccanismo fisiologico dell'erezione del pene avviando il rilassamento muscolare liscio [84]. Altrettanto importante è il ruolo delle NOS sia neuronale che endoteliale che inducibile [80]. La disfunzione erettile sembra essere correlata almeno in alcuni casi ad una situazione di stress ossidativo [80][85][86]. Nel sangue di topi diabetici è stato riscontrato un valore di glutatione minore e una concentrazione di MDA maggiore rispetto allo stesso ceppo di roditori, sempre diabetico, ma trattato con antiossidanti (nel caso specifico infuso di ginseng

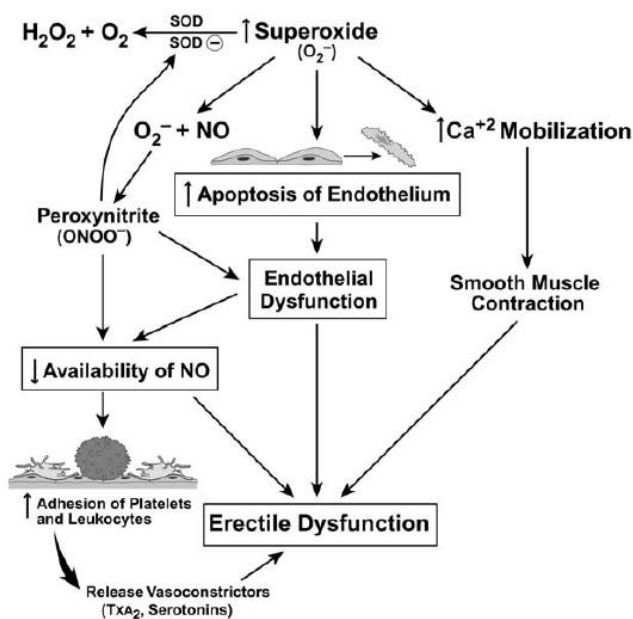


Figura 7: Relazione tra ROS e disfunzione erettile, immagine da Agarwal et al. 2006 [80]

rosso); nel gruppo non trattato la funzione erettile (valutata mediante pressione intracavernosa) era compromessa al contrario del gruppo trattato [87]. Nell'umano lo stress ossidativo sembra più collegato alla disfunzione erettile di origine aterosclerotica [85][86], per esempio il valore di d-ROMs in pazienti con disfunzione erettile e aterosclerosi è significativamente più elevato che non in pazienti con disfunzione erettile ma non aterosclerosi 349.75 ± 53.35 U.Carr vs. 285.43 ± 25.58 U.Carr, $P < 0.001$ [85]. Il principale collegamento tra stress ossidativo, diabete e disfunzione erettile sembra essere la sovrapproduzione di ROS, specialmente di superossido, e in particolare l'interazione di quest'ultimo NO. [88]. NO interagisce con l'anione superossido per formare perossinitrito, noto per svolgere un ruolo centrale nell'aterogenesi [89]. Perossinitrito reagisce con il residuo tirosinico delle proteine,

inattiva la superossido dismutasi e porta a una diminuzione della rimozione dell'anione superossido [90]. Ciò aumenta ulteriormente la formazione di perossinitrito e riduce la concentrazione di NO disponibile. Perossinitrito e superossido sono noti per aumentare l'incidenza di apoptosi nell'endotelio. Ciò porta alla denudazione dell'endotelio e all'ulteriore riduzione del NO disponibile [89][91]. L'anione superossido è noto per avere un effetto vasocostrizione diretto attraverso la mobilitazione di ioni di calcio [92] e questo può produrre potenzialmente disfunzione erettile. Inoltre, la ridotta disponibilità di NO è il processo patofisiologico chiave che porta alla disfunzione erettile [93]. NO diminuisce l'adesione delle piastrine e dei leucociti alle cellule endoteliali vascolari. Una concentrazione ridotta di NO aggrava i processi

d'adesione di queste cellule all'endotelio e favorisce il rilascio di sostanze (trombossano A2 e leucotrieni) che causano vasocostrizione, le quali aggravano ulteriormente la disfunzione erettile [80].

Diabete e patologia oculari

La retina ha un elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi e ha il più alto assorbimento di ossigeno e di ossidazione del glucosio rispetto a qualsiasi altro tessuto. Questo fenomeno rende la retina più suscettibile allo stress ossidativo [94]. È stato suggerito che la correlazione tra iperglicemia, alterazione dell'omeostasi redox e lo stress ossidativo sono gli eventi chiave nella patogenesi della retinopatia diabetica. Studi sugli animali hanno dimostrato che lo stress ossidativo non solo contribuisce allo sviluppo della retinopatia diabetica ma anche alla resistenza della retinopatia anche in caso di un buon controllo glicemico [95]. Questa resistenza della retinopatia diabetica è probabilmente attribuita all'accumulo di molecole danneggiate e ROS che non possono essere facilmente rimosse anche dopo il buon reinserimento del controllo glicemico. I livelli di anione superossido sono elevati nella retina di ratti diabetici e nelle cellule retiniche incubate in elevati livelli di glucosio [96-98] e il contenuto di perossido di idrogeno è aumentato nella retina dei ratti diabetici [99]. Perossidazione lipidica della membrana e danno ossidativo al DNA (indicato dall'aumento di 8-OHdG) e le conseguenze di lesioni causate da ROS sono elevate nella retina del paziente diabetico [96][100-102]. Nel diabete, nella retina sono diminuite le attività degli enzimi antiossidanti di difesa responsabili della scavenging dei radicali liberi quali la SOD, CAT, GPX e glutazione reduttasi [96][103]. Anche i livelli di GSH intracellulare sono diminuiti nella retina nel diabete [104] e gli enzimi responsabili del suo metabolismo sono compromessi [105].

Oltre agli enzimi antiossidanti di difesa, anche gli antiossidanti non-enzimi come la vitamina C, la vitamina E e il β -carotene, biologicamente utilizzati per la regolazione dell'omeostasi redox sono depressi durante lo stress ossidativo indotto da iperglicemia [106].

La retinopatia diabetica è trattata anche nella sezione oftalmologia a cui si rimanda per ulteriori delucidazioni

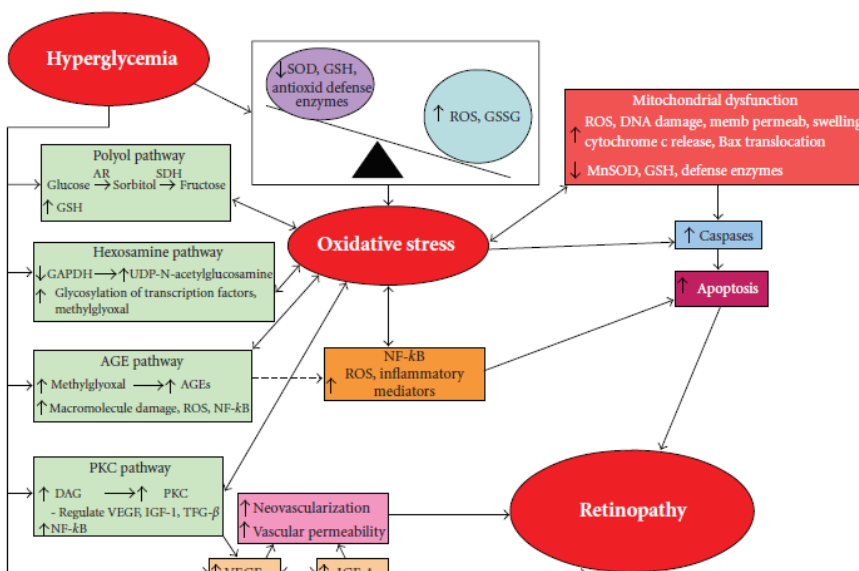


Figura 8: Relazione tra stress ossidativo e retinopatia; immagina da Kowluru & Chan 2007 [107]

Diabete e complicanze del cavo orale

La parodontite è una comune malattia infiammatoria cronica, iniziata da batteri che presentano una maggiore prevalenza e gravità nei pazienti con diabete di tipo 2. Vari studi indicano che la presenza comorbosa di parodontite può a sua volta influenzare negativamente lo stato diabetico e il trattamento della parodontite può portare a un migliore controllo metabolico nei pazienti diabetici. Le evidenze attuali indicano un'interrelazione bidirezionale tra il diabete e la parodontite infiammatoria [108][109]. La natura precisa di questa interrelazione non è chiara. Uno stato infiammatorio aumentato è stato proposto come meccanismo comune ad entrambe le condizioni [110][111] con un aumento delle citochine, incluso il TNF- α , postulato come possibile collegamento [112]. Si ipotizza che lo stress ossidativo sia un fattore comune nella malattia parodontale e nel diabete forse già nella condizione "pre-diabetica" e che lo squilibrio nel controllo redox risultante da questi stati di malattia agisca sinergicamente e amplificchi in modo bidirezionale il corso biochimico e clinico di queste malattie. L'eccesso di ROS generato da neutrofili perifericamente, innescato nello stato di parodontite, [113] e livelli ridotti di antiossidanti periferici [114]

possono essere causa di una riduzione della difesa antiossidante locale periferica già compromessa nello stato prediabatico o dallo diabetico. Quando entrambe le condizioni coesistono, l'equilibrio è diretto verso la stimolazione di vie metaboliche redox-sensibili, con sviluppo dell'infiammazione e della resistenza all'insulina, compromettendo così il controllo del glucosio nel sangue e contribuendo allo sviluppo di complicanze diabetiche. D'altra parte, le condizioni diabetiche di iperglicemia cronica e una maggiore formazione di AGE possono compromettere la capacità antiossidante [115] e aumentare l'attività di ossidazione di NADPH e la produzione di ROS da neutrofili [116] contribuendo sia al danno ossidativo diretto che indiretto nei tessuti parodontali in risposta a patogeni parodontali all'interno del biofilm a placca dentale. Inoltre è stato provato l'accumulo di AGE nei tessuti gengivali [117] ed è noto che la formazione di AGE sul collagene di tipo I ha significativamente aumentato l'adesione e la chemotassi dei neutrofili e ha un effetto primario sulla stimolazione successiva [118]. Questi risultati suggeriscono che i cambiamenti dipendenti dall'ossidazione nell'endotelio vascolare e nel collagene nei tessuti connettivi parodontali potrebbero aumentare il numero di PMN entrati, e ritardare la loro migrazione attraverso i tessuti, aumentando il loro potenziale dannoso dei ROS.

Come si è potuto valutare finora la patologie diabetiche e le sue complicanze sono strettamente legate al fenomeno dello stress ossidativo, per cui esiste una vastissima letteratura di tentavi più o meno riusciti, di intervenire mediante l'utilizzo di antiossidanti di varia origine. Gli studi in questo campo mirano perlopiù al contenimento dello stress ossidativo e delle complicanze. Data la vastità delle letture ritrovabili si propongono alcune tabelle riassuntive tratte dal lavoro di *Raimi et al 2005* [119] a cui si rimanda per i riferimenti bibliografici specifici.

Drugs with antioxidant properties which studied in diabetes

Drug	Mechanism of action	Potential use in diabetes
Angiotensin convertase inhibitors and angiotensin block receptors	Inhibition of angiotensin II and NAD(P)H oxidase expression	Nephropathy
Melatonin	Scavenging free radicals	Nephropathy, Neuropathy
α -lipoic acid	Scavenging of free radicals, metal ion chelation, antioxidant recycling	Neuropathy, retinopathy
Glibenclamide	Scavenging of free radicals	
Allopurinol	Inhibition of xanthine oxidase	
Metformin	↓xanthine oxidase activity, metal ion chelation, scavenging of free radical, inhibition of xanthine oxidase and phosphodiesterase, ↓production of tumor necrosis factor α , inhibition of advanced glycation end product formation	Cardiovascular disease
Repaglinide	Glutathione reductase and glutathione levels	
Phosphodiesterase inhibitors	Inhibition of phosphodiesterase, ↑cAMP & cGMP	
Caffeic acid phenethyl ester	Scavenging of free radicals	Cardiovascular disease
Carvedilol	Inhibition of electron adduction, inhibition lipid peroxidation in myocardial cell membranes, inhibition of release of O ₂ through neutrophils, preservation of the natural antioxidant systems of the body, scavenging free radicals,	cardiovascular disease

Immagine 9: tabella da *Raimi et al 2005* [119]

Plants with positive effects in diabetes by their antioxidant properties

Scientific name	Target	Active ingredients	mechanism of action and/or effects
Anoectochilus formosanus	STZ-induced diabetic rats	-	↓renal LP, ↑renal GSH, activity of kidney catalase
Trifolium alexandrinum		flavonoids	scavenging free radicals, ↓LP, ↑hepatic GSH
Viburnum dilatatum		cyanidin 3-sambubioside	scavenging free radical, ↓LP
Ever green shrubs such as Larrea divarita		nordihydroguaiaretic acid	xanthine oxidase inhibition, ion chelation, scavenging free radicals, ↓systolic BP, prevention of renal morphological alteration, improvement in renal function
Aralia elata		-	aldose reductase inhibition, anticarcinogenic activity
Viscum album		-	↓biomarker of oxidative stress, ↑GSH in heart & kidney
Many plants		quercetin	ion chelation, scavenging free radicals, ↓LP
Fomes fomentarius		-	alteration of SOD, CAT, and GSH-Px activities, ↓biomarker of oxidative stress
Allium sativum		s-allyl cysteine sulfoxide	↑GST, ↑SOD in liver & kidney, ↓LP
Eugenia jambolana		flavonoids	scavenging free radical
Aloe vera		-	↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST in liver & kidney, ↓LP
Scoparia dulcis		-	↑GSH, SOD, CAT, GSH-Px, and GST, ↓LP
Juglans regia	Type 2 diabetic mice STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice	pedunculagin	↓biomarker of oxidative stress
Plants like ferula assa-foetida		ferulic acid	scavenging free radicals, ↓LP
Vitis vinifera	alloxan-induced diabetic rats	proanthocyanidins	scavenging free radicals, ↑pancreatic GSH, ↓LP
Cassia fistula		-	↑SOD, CAT, GSH-Px and GR activities in the cardiac tissues, ↓LP in heart
Allium cepa		s-methyl cysteine sulfoxide	scavenging free radicals
Allium sativum		s-allyl cysteine sulfoxide	scavenging free radicals, ↓LP
Panax ginseng	Type 2 diabetic rats	-	scavenging free radicals, prevention of erectile dysfunction
Lycium barbarum	alloxan-induced diabetic rabbits	-	lipid lowering effect

STZ = streptozocin, LP = lipid peroxidation, GSH = reduced glutathione, BP = blood pressure, GSH-Px = glutathione peroxidase, GR = glutathione reductase, SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase (STZ- and alloxan-induced diabetes are models of type 1 diabetes mellitus, KK-Ay is a model of type 2 diabetes mellitus).

Immagine 10: tabella da Raimi et al 2005 [119]

Studies on the effects of antioxidant vitamins and supplements on diabetes and its complications

Vitamins	Target	Effects
Vitamin C	Type 2 diabetic patients	↓fasting plasma insulin levels, ↓HbA1c, improve insulin action No effect
Vitamin E (α-tocopherol)	STZ-induced diabetic rats	↓LP, ↓activity of GSH-Px and GST
	Diabetic patients	↓indicators of oxidative stress, ↓protein glycosylation, ↓insulin resistance
	Type 2 diabetic patients	↓indicators of oxidative stress, ↓oxidative susceptibility of LDL ↓HbA1c, ↓insulin levels, improve insulin action
	Type 1 diabetic patients	↓retinal hemodynamic abnormalities, normalization of creatinin clearance
Vanadium	STZ-induced diabetic rats	Scavenging free radicals, ↓LP in pancreas
Zinc (Zn)	Alloxane-induced diabetic rats	Induction of metallothionein synthesis, ↓LP in retina
Selenium	Alloxan-induced diabetic mice	↑GSH in liver & brain
β-carotene	Type 2 diabetic patients	No effect ↓oxidative susceptibility of LDL
	Diabetic rats	↑GSH peroxidase and GSH

STZ = streptozocin, MDA = malondialdehyde, GSH-Px = glutathione peroxidase, GST = glutathione S-transferase, LDL = low density lipoprotein, LP = lipid peroxidation, Hb = hemoglobin.

Alcuni studi in tal senso sono stati eseguiti anche coi test H&D. Per esempio si è valutata, con risultati positivi, l'effetto protettivo di un trattamento antiossidante nei confronti delle cellule retinali [120]. È stato eseguito uno studio pilota sull'uso preventivo dell'acido α-lipoico nel contenimento delle disfunzioni derivanti da diabete. Mediante l'uso del d-ROMs si è potuto constatare il miglioramento dello stress ossidativo sistemico nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo [121]. Risultati analoghi si erano ottenuti studiando l'effetto di un'integrazione basata su estratto di arancia rossa. [122]

Immagine 11: tabella da Raimi et al 2005 [119]

- [1] Powers AC In: Fauci A, Braunwald E, Kasper D, eds. et al. Diabetes mellitus. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill; 2008:2275–2304.
- [2] Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology* 2000;64: 139–153
- [3] Kotani K, Tsuzaki K, Taniguchi N, Sakane N. Correlation between reactive oxygen metabolites & atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2013;137:742-748
- [4] Ikebuchi M, Nishio Y, Maegawa H, et al. Effects of hyperglycemia on oxidative stress and antioxidant potential in patients with type 2 diabetes. *Diabetology International* 2010;1:72-77(6)
- [5] Suys B, de Beeck L, Rooman R, et al. Impact of Oxidative Stress on the Endothelial Dysfunction of Children and Adolescents With Type 1 Diabetes Mellitus: Protection by Superoxide Dismutase? *Pediatric research* 2007;62(4)
- [6] Dierckx N, Horvath G, van Gils C, et al. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet; *European Journal of Clinical Nutrition* 2003;57:999–1008
- [7] Barletta A, D'Amico MV, Vincelli MR, Venditti D, Scutellà M, Palladino A, Sebastiano C, Vitale C, Puntillo A, Bucci M, Tagliaferri M. Variazione dello stress ossidativo pre- e post-prandiale in pazienti diabetici. *Biochimica Clinica*. 2001;25 (2): 140.
- [8] Shyamsunder, Sridhar Chitturi, Bipin Kumar Sethi, Aneez; *Diabetes Research and Oxidative stress in diabetes; Clinical Practice* (2000) 50 Supplement 1 128
- [9] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. *The Review of DIABETIC STUDIES* 2010;7(1).
- [10] Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy *Endocrine Reviews*. 2004;25(4):612–628;
- [11] Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2013;19(32).
- [12] Yan LJ. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *Journal of Diabetes Research* Volume 2014, Article ID 137919.
- [13] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-90.
- [14] Czech MP, Lawrence JC Jr, Lynn WS. Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:4173-4177
- [15] Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, Tanaka K, Goodyear LJ. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol-3-kinasedependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E889-E897.
- [16] May JM, de Haen C. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1979;254:9017-9021.
- [17] Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2003;23:7794-7808.
- [18] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-1761.
- [19] Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008;29(3):351-366.
- [20] El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 2003;144:4154-4163.
- [21] Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Poitout V, Robertson RP. Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 2001;50:2481-2486.
- [22] Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 1992;90:320-325
- [23] Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Makamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 1996;320:855-863.
- [24] Tajiri Y, Moller C, Grill V. Long term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits beta-cell function. *Endocrinology* 1997;138:273-280.
- [25] Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10857-10862.
- [26] Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999;48:2398-2406.
- [27] Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:927-932
- [28] Kimoto K, Suzuki K, Kizaki T, Hitomi Y, Ishida H, Katsuta H, Itoh E, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Ohno H. Gliclazide protects pancreatic beta-cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:112-119.
- [29] Thornalley PJ 2002 Glycation in diabetic neuropathy: characteris-624 *Endocrine Reviews*, August 2004, 25(4):612–628
- [30] Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129–146
- [31] Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 1997;272:17810–17814
- [32] Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant

- stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 7742–7746
- [33] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation endproducts with their receptors/ binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269:9889–9897
- [34] Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:137–146
- [35] Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:932–939
- [36] Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, VanHuysen C, Sima AAF, Greene DA. Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia* 1993;36:608–614
- [37] Oates PJ, Mylari BL. Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs* 1999;8:2095–2119
- [38] Anabela P. Rolo, Carlos M. Palmeira. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212(2): 167-78.
- [39] Trumpower BL. The protonmotive Q cycle: energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 1990; 265: 11409-12.
- [40] Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD, Richter C. Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001;10:57–65
- [41] Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:46–57
- [42] Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001;263:107–117
- [43] Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495:12–15
- [44] Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994;43:1010–1014
- [45] Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab* 1992;18:264–271
- [46] Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M, Levy Y. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. *Isr Med Assoc J* 1999;1:228–231
- [47] Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)* 1996;90:255–260
- [48] Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications; *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005;59:365–373
- [49] Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res* 2002;36(12):1331–6.
- [50] Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signaling in cardiovascular disease. *Heart* 2004; 90: 486-7.
- [51] Sciacqua A, Grillo N, Quero M, Sesti G, Perticone F. Asymmetric dimethylarginine plasma levels and endothelial function in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 13804-15.
- [52] Del Turco S, Gaggini M, Daniele G, et al. Insulin resistance and endothelial dysfunction: a mutual relationship in cardiometabolic risk. *Curr Pharm Des* 2013;19(13):2420-31
- [53] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C: dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939-45.
- [54] Ceolotto G, Bevilacqua M, Papparella I, et al. Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3'-kinase5702 dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. *Diabetes* 2004; 53: 1344-51.
- [55] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010; 7: 15-25.
- [56] Seok Man Son. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pathogenesis of Vascular Complications of Diabetes. *Diabetes Metab J* 2012; 36: 190-198.
- [57] Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest* 1988; 82: 735-8.
- [58] Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220-5.
- [59] Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 552-7.
- [60] Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, et al. HOPE Study; MICRO-HOPE Study. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 2002; 25: 1919-27.
- [61] Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 2001; 50: 851-60.
- [62] Fukumoto H, Naito Z, Asano G, Aramaki T. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 1998; 5: 29-35.
- [63] Hayat SA, Patel B, Khattar RS, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 539-57.
- [64] Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, et al. 14-3-3 protein regulates Ask 1 signaling and protects against diabetic cardiomyopathy. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1797-806.

- [65] Kelm M, Schäfer S, Dahmann R, et al. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 185-94.
- [66] Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 104: 174-80.
- [67] Kitano D, Takayama T, Nagashima K, et al. A comparative study of time-specific oxidative stress after acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus *BMC Cardiovascular Disorders* 2016;16:102
- [68] Stevens MJ, Obrosova I, Pop-Busui R, Greene DA, Feldman EL. Pathogenesis of diabetic neuropathy. In Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus. D. Porte, Jr., R.S. Sherwin, and A. Baron, editors. McGraw Hill. New York, New York, USA. 2002; 747-770.
- [69] Windebank AJ, Feldman EL. Diabetes and the nervous system. In *Neurology and general medicine*. M.J. Aminoff, editor. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2001;341-364.
- [70] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
- [71] Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2001;44:1973-1988.
- [72] Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem *J. Clin. Invest.* 111:431-433 (2003).
- [73] Greene DA, Obrosova I, Stevens MJ, Feldman EL. Pathways of glucose-mediated oxidative stress in diabetic neuropathy. In *Antioxidants in diabetes management*. L. Packer, P. Rosen, H.J. Tritschler, G.L. King, and A. Azzi, editors. Marcel Dekker Inc. New York, New York, USA. 2000;111-119.
- [74] Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol. Dis.* 1999;6:347-363.
- [75] Russell JW, et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J.* 2002;16:1738-1748.
- [76] Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2003;52:165-171.
- [77] Apfel SC. Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. *Eur. Neurol.* 1999 ;41(Suppl. 1):27-34.
- [78] Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes*. 1997;46:S43-S49.
- [79] Feldman EL, Windebank AJ. Growth factors and peripheral neuropathy. In *Diabetic neuropathy*. P.J. Dyck and P.K. Thomas, editors. W.B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1998;377-386.
- [80] Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Rain R. Role of Oxidative Stress in the Pathophysiological Mechanism of Erectile Dysfunction *Journal of Andrology* 2006;27(3)
- [81] Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992;257:401-403.
- [82] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43: 109-142.
- [83] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
- [84] Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol.* 1997;157:320-324.
- [85] Barassi A, Colpi GM, Piediferro G, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Patients with Erectile Dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine* 2009;6: 2820-2825
- [86] Azadzi KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *The journal of urology* 2005;174:386-393.
- [87] Ryu JK, Lee T, Kim DJ, et al. Free radical-scavenging activity of korean red ginseng for erectile dysfunction in non-insulindependent diabetes mellitus rats. *Urology* 2005;65: 611-615.
- [88] Jones RW, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opin Pharm.* 2002;3:889-897.
- [89] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:1424-1437.
- [90] Zou M, Martin C, Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem.* 1997;378:707-713.
- [91] Khan MA, Thompson CS, Mumtaz FH, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Bruckdorfer RK, Naseem KM. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. *World J Urol.* 2001;19:220-224.
- [92] Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.* 1989;257:33-37.
- [93] Jeremy JY, Angelini GD, Khan M, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Thompson CS, Bruckdorfer KR, Naseem KM. Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc Res.* 2000;46:50-54.
- [94] Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD. Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Current Eye Research* 1984;3 (1):223-227.
- [95] Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003;52(3):818-823.
- [96] Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003;44:5327-5334.
- [97] Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;35:1491-1499.
- [98] Cui Y, Xu X, Bi H, et al. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research* 2006;83:807-816.

- [99] Ellis EA, Guberski DL, Somogyi-Mann M, Grant MB. Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/WOR diabetic rat. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;28:91–101.
- [100] Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1938–1942.
- [101] Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetologica* 2001;38:179–185.
- [102] Kowluru RA, Koppolu P. Termination of experimental galactosemia in rats, and progression of retinal metabolic abnormalities. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2002;43:3287–3291.
- [103] Haskins K, Bradley B, Powers K, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1005:43–54.
- [104] Kern TS, Kowluru RA, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1994;35:2962–2967.
- [105] Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia II. Comparison of γ -glutamyl transpeptidase in retina and cerebral cortex, and effects of antioxidant therapy. *Current Eye Research* 1994;13:891–896, 1994.
- [106] Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003;52:2346–2352.
- [107] Kowluru RA, Chan PS. Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy Experimental Diabetes Research Volume 2007, Article ID 43603,
- [108] Allen EM, Matthews JB, O'Connor R, O'Halloran D, Chapple ILC. Periodontitis and Type 2 Diabetes: Is Oxidative Stress the Mechanistic Link? *Scottish Medical Journal* 2009;54(2)
- [109] Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology* 2000;64:139–153
- [110] Iacopino AM. Periodontitis and Diabetes Interrelationships: Role of Inflammation. *Annals Periodontol* 2001; 6: 125-137.
- [111] Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH et al. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Perio Res.* 2007; 42: 377-81.
- [112] Engebretson S, Chertog R, Nichols A et al. Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Perio* 2007; 34: 18-24.
- [113] Fredriksson MI, Gustaffson AK, Bergstrom KG, Asman BE. Constitutionally hyperreactive neutrophils in periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74: 219-224.
- [114] Chapple IL, Milward MR, Dietrich T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr* 2007; 137: 657-64.
- [115] Abahusain MA, Wright J, Dickenson JW, de Bol EB. Retinol, alphatocopherol and carotenoids in diabetes. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 630- 635.
- [116] Mohanty P, Hanouda W, Garg R et al. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endo Metab* 2000; 85: 2970-2973.
- [117] Schmidt AM, Weidman E, Lalla E et al. Advanced Glycation Endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: A potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Perio Res* 1996; 31: 508-515.
- [118] Monboisse JC. In-vitro glycoxidation alters the interactions between collagens and polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* 2000; 350: 777-783.
- [119] Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005;59:365–373
- [120] Nebbioso M, Federici M, Rusciano D, et al. Oxidative Stress in Preretinopathic Diabetes Subjects and Antioxidants; *Diabetes Technol Ther.* 2012;14(3):257-63.
- [121] Gianturco V, Bellomo A, D'ottavio E, Formosa V, Iori A, Mancinella M, Troisi G, Marigliano V. Impact of therapy with α -lipoic acid (ala) on the oxidative stress in the controlled niddm: a possible preventive way against the organ dysfunction? *European Urology.* 2009;49:129-133.
- [122] Bonina FP, Leotta C, Scalia G, Puglia C, Trombetta D, Tringali G, Roccazzello AM, Rapisarda P, Saija A. Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes, Nutrition & Metabolism* 2002;15(1):14-19.

6.7 SALUTE DEL CAVO ORALE

Il miglior indicatore della salute del cavo orale è lo studio della saliva in quanto è in contatto costante con tutte le superfici della cavità orale e quindi la sua composizione dipende dai fenomeni occorsi sulle stesse. Inoltre rappresenta un ambiente dinamico in rapida evoluzione e costante equilibrio con le pareti del cavo orale e col liquido crevicolare. Da non sottovalutare è anche la facilità di raccolta della saliva.

[1] La saliva è una secrezione esocrina mucosa leggermente acida. La saliva è un complesso miscuglio di liquidi dalle ghiandole salivari maggiori e minori e dal fluido crevicolare gengivale, che contiene oltre che vari elettroliti, batteri orali e detriti alimentari. Le principali ghiandole salivari (ghiandole maggiori) includono le ghiandole parotidiche, situate di fronte ai primi molari, e le ghiandole submandibolari e sublinguali, che si trovano nel pavimento della bocca.

Le ghiandole minori che producono saliva si trovano nel labbro inferiore, nella lingua, nel palato e nelle guance [2]. I termini maggiori e minori si riferiscono alla dimensione anatomica delle ghiandole. La saliva può essere classificata come non stimolata o stimolata a seconda se la produzione sia quella basale o se sia stimolata da fattori vari. La saliva è un fluido molto diluito, composto da più del 99% di acqua e sebbene sia in contatto col flusso sanguigno tramite il liquido crevicolare essa non può e non deve essere considerata un ultrafiltrato del plasma [3]. Il pH normale della saliva è normalmente compreso tra i 6 a 7, ma può variare da un minimo di 5,3 fino a 7,8. Le ghiandole salivari maggiori contribuiscono alla maggioranza del volume della secrezione e del contenuto di elettroliti alla saliva, mentre le ghiandole salivari minori contribuiscono in misura minore al volume di secrezione ma in misura maggiore per la maggior parte delle sostanze di derivazione sanguinea [4]. La saliva è composta da una vasta gamma di elettroliti, tra cui sodio, potassio, calcio, magnesio, bicarbonato e fosfati. Inoltre nella saliva sono presenti immunoglobuline, proteine, enzimi, mucine e composti azotati, come urea e ammoniaca. Questi componenti interagiscono tra loro in funzione di vari obiettivi specifici: bicarbonati, fosfati e urea agiscono per modulare il pH e contribuiscono al potere tampone della saliva; le proteine e le mucine macromolecole servono ad aggregare e/o collegare o comunque ad influenzare i microrganismi orali e contribuiscono al metabolismo delle placche dentali; calcio, fosfato e proteine lavorano insieme come fattore di antisolubilità e modulano la demineralizzazione e la remineralizzazione infine le immunoglobuline, le proteine e gli enzimi forniscono un'azione antibatterica [5]. Importanti sono anche i componenti con funzione antiossidante. Nella saliva sono presenti antiossidanti di tipo enzimatico quali le perossidasi, la superossido dismutasi e le glutazione perossidasi, ossidasi e reduttasi, e antiossidanti molecolari quali l'acido urico, acido ascorbico, albumina [6-8]. La principale componente antiossidante della saliva è l'acido urico, minori sono i contributi di acido ascorbico e albumina, perlopiù sono presenti in concentrazioni inferiori a quelle trovate nel plasma. L'attività antiossidante totale della saliva correlata è fortemente correlata alla concentrazione dell'acido urico, a cui si può attribuire un contributo di più del 70%. L'importanza della vitamina C risulta marginale [7] anche se risulta maggiormente concentrata che nel plasma [9]. L'acido urico salivare deriva principalmente da quello plasmatico, motivo per cui esiste una certa relazione tra le due concentrazioni [10]. Tra gli enzimi più importanti, a livello salivare, vi sono le perossidasi; glutazione perossidasi, ossidasi e reduttasi, gli enzimi di supporto alla produzione e alla rigenerazione del glutazione, oltre che alle catalasi, sembrano avere un ruolo secondario. Le perossidasi presenti nella saliva sono principalmente due, quella salivare vera e propria e la mieloperossidasi, quest'ultima simile alla lattoperossidasi prodotta dai linfociti nelle regioni infiammate. Le perossidasi hanno essenzialmente due ruoli nella saliva: il controllo dei livelli di perossido d'idrogeno prodotto da batteri e

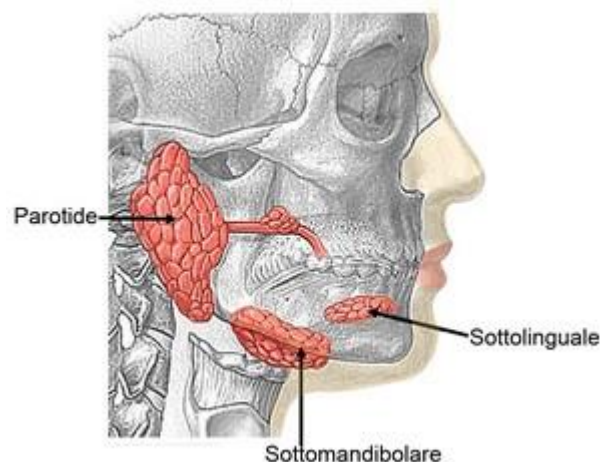


Figura 1: Dislocazione delle principali ghiandole salivari

leucociti e un'azione batteriologica specifica nei confronti di alcuni batteri. Oltre che ad esplicare il suo normale potere ossidante il perossido d'idrogeno risulta particolarmente dannoso nella saliva per la sua capacità di ossidare lo ione tiocianato, secreto dalle ghiandole, ad acido ipocianoso. Quest'ultimo ed il suo acido coniugato sono notevolmente citotossici (se presente nella giusta quantità è un utile battericida) in quanto potenti ossidanti [11][12]. Inoltre occorre considerare che durante la reazione in esame vi è anche la formazione di ossigeno singoletto, altro potente ossidante [13]. Altro percorso del perossido d'idrogeno è la sua reazione con il cloro a formare acido ipocloroso nei nucleofili per azione delle mieloperossidasi [14]. La composizione della saliva risulta essere diversa a seconda della ghiandola di produzione, e questo è legato al fatto che la percentuale di saliva prodotta dalle stesse dipende dal tipo di fattore stimolante e implica che la protezione antiossidante della bocca non è sempre la medesima ma che viene regolata a seconda del bisogno [6]. Inoltre la stimolazione del flusso salivare è associata ad una maggiore produzione di antiossidanti [7]. È stato dimostrato che la saliva ha una capacità antiossidante minore del plasma, almeno nei confronti di lipoperossidi (nell'esperimento in questione è stata monitorata la capacità dei fluidi di ridurre un derivato ossidato dell'acido arachidonico) [15]. Il flusso giornaliero medio salivare nelle persone sane tra 1 e 1,5 litri. I contributi percentuali delle diverse ghiandole salivari durante il flusso non stimolato sono i seguenti: 20% da parotide, 65% da submandibolare, dal 7% all'8% da sublinguale e meno del 10% da numerose ghiandole secondarie. Gli elevati flussi stimolati cambiano drasticamente i contributi percentuali di ciascuna ghiandola, con il parotide che contribuisce più del 50% delle secrezioni salivari totali [4]. Il flusso salivare varia da un minimo di 0,1 ml/min se non stimolato fino ad un massimo di 7 ml/min se stimolato. Gli stimoli principali sono di tre tipi: meccanici, l'atto di masticare, gustativi, il gusto acido stimola più intensamente del dolce, e in misura molto minore, olfattivi. Altri fattori che influenzano la secrezione includono fattori psichici come il dolore, alcuni tipi di medicinali e varie malattie locali o sistemiche che colpiscono le ghiandole [5]. Il flusso salivare è influenzato dai più disparati fattori, dai cicli circadiani e stagionali, con un flusso maggiore nella stagione invernale, dal genere e dall'età, flusso ridotto nelle donne e negli anziani, almeno quello non stimolato, da fattori esterni quali fumo e intensità luminosa [16][17]. Come già descritto nel terzo capitolo, la concentrazione di acido urico, ma non solo, dipende fortemente dal flusso salivare, quindi risultata di fondamentale importanza per il confronto dei metodi o parlare di quantità assolute degli analiti e non di concentrazione o standardizzare le modalità di prelievo onde stabilizzare anche le fluttuazioni del flusso salivare. Purtroppo questo concetto non è sempre stato applicato e quindi spesso i risultati degli studi si sono mostrati in disaccordo. Nelle considerazioni presenti in questa sezione si è cercato di tenere presente quanto più possibile queste dinamiche.

Tra le più diffuse patologie del cavo orale quelle più spesso associate allo stress ossidativo sono la parodontite e la carie.

La parodontite è una patologia da infiammazione cronica in grado di compromettere l'integrità dei tessuti di supporto al dente, conosciuti collettivamente come peridontium, cioè gengiva, legamento periodontale e alveolo dentale. La parodontite ha una etiologia complessa che agisce a più livelli: a livello microbico, basata sulla presenza di comunità microbiche disbiotiche con potenziale di infiammazione distruttiva; a livello ospitante, basato su fattori genetici che possono predisporre o proteggere dalla malattia; e a livello di fattori ambientali e di stato di salute sistemico che modificano la risposta dell'ospite in direzione protettiva o distruttiva [18]. In termini di microrganismi il cavo orale è forse una dei siti più colonizzati del nostro corpo, di circa 3000 microrganismi censiti su di esso [19] oltre 700 vivono nella nostra bocca [20]. La totalità di questi microrganismi, il loro genoma e l'ecosistema in cui vivono è denominato microbioma [21]. Tra il microbioma e l'ospite intercorre una relazione mutualistica denominata simbiosi. I microrganismi residenti ottengono un habitat protetto e caldo da parte dell'ospite e, in cambio, contribuiscono alla digestione alimentare, alla regolazione del metabolismo e alla prevenzione della colonizzazione da parte di esogeni, spesso patogeni [22]. Di solito queste comunità microbiche vivono in armonia (simbiosi) con l'ospite ma in certe occasioni questa relazione simbiotica viene rotta (disbiosi) causando l'insorgere di patologie. Questo cambiamento è generalmente indotto da una perturbazione dell'ecosistema, per esempio un abbassamento del pH, o una modifica sostanziale nella struttura del biofilm in cui vivono questi microrganismi [23]. I biofilm sono le complesse colonie formate da vari tipi di

microrganismi che hanno colonizzato le superfici dure e le mucose nella cavità orale. Biofilm diversi ricoprono superficie diverse ma nell'insieme il microbioma orale è estremamente dinamico essendo la cavità orale continuamente sollecitata da eventi esterni [24]. Particolare importanza nella patogenesi della paradontite è il biofilm denominato placca dentale. La placca dentale è un biofilm multispecie, supportato da una matrice glicoproteica, che si forma in continuo sulla superficie del dente [25]. In generale i colonizzatori primari tendono ad essere aerobi ed anaerobi facoltativi Gram-positivi, mentre predominano organismi anaerobici Gram-negativi nella placca matura, come *Fusobacterium*, *Treponema* e membri del phylum *Synergistetes*. Tutta una serie di pratiche di igiene orale sono utilizzate per rimuovere la placca dentale, in quanto se la pulizia dei denti è praticata regolarmente, la placca dentale è tenuta in uno stato immaturo e in quantità relativamente piccole, se un individuo non pratica igiene orale, invece, la percentuale di specie Gram-negativi e anaerobi aumenta e le endotossine e enzimi proteolitici passano nelle gengive e causano irritazione e infiammazione attivando percorsi pro-infiammatorie [26]. In individui predisposti si ha la formazione di tasche gengivali in cui facilmente si creano condizioni ambientali tali da indurre la disbiosi, ossia ambiente anaerobico, a pH acido-neutro, con basso potere antiossidante e ricco di nutrienti derivanti dal liquido crevicolare e dall'esquamazione dell'epitelio [27][28]. Il principale microrganismo associato all'insorgere della malattia paradontale è il *Porphyromans gingivalis* in associazione ad altri. [24][26][28]. Le proteasi batteriche e i prodotti finali metabolici, nonché componenti cellulari batterici come i lipopolisaccaridi, hanno la capacità di indurre risposte infiammatorie e immunoreazioni nell'ospite. Le proteasi possono degradare direttamente i tessuti dell'ospite o interferire coi suoi meccanismi difensivi degradando le proteine di difesa, immunoglobuline, o i sistemi di coagulazione del sangue. I prodotti finali del metabolismo come gli acidi grassi a catena corta (propionico, butirrico, isobutirrico e acidi isovalerici), ammoniaca e composti solforati (idrogeno solforato e metil-mercaptano) compromettono le funzioni della cellula dell'ospite [29].

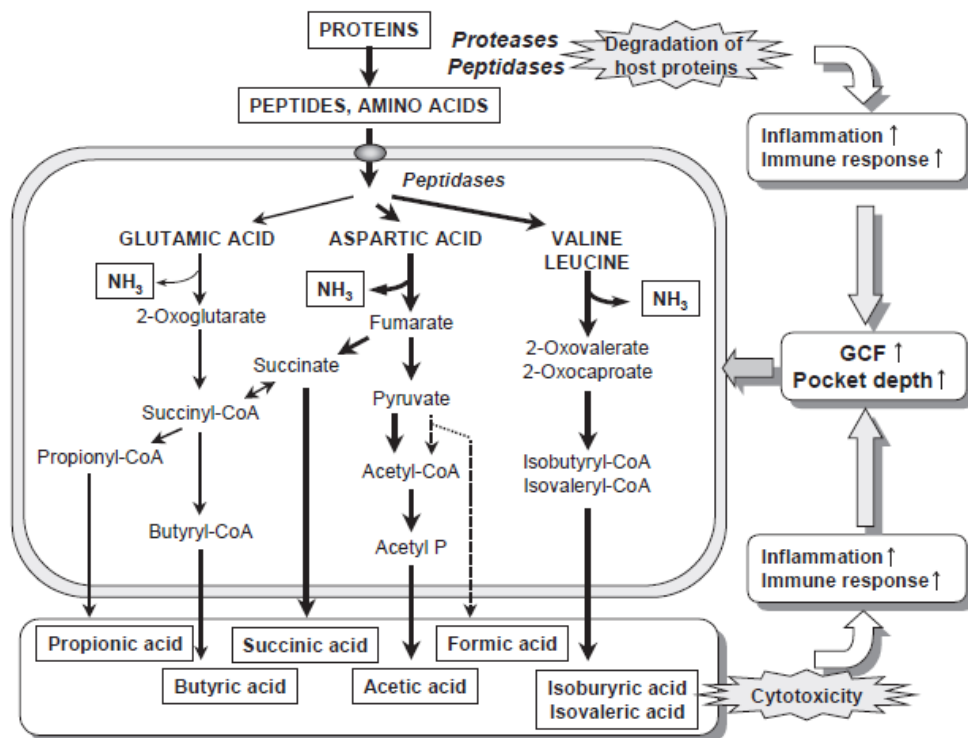


Figura 2: Il metabolismo degli aminoacidi da parte di *P. gingivalis* e *P. intermedia* e gli effetti di queste attività metaboliche sulle risposte dell'ospite. I percorsi metabolici per entrambi i batteri sono indicati con linee spesse. Ulteriori percorsi per *P. gingivalis* sono indicati in linee sottili, mentre ulteriori percorsi per *P. intermedia* sono indicati in linee tratteggiate.; immagine da *Takahashi 2005* [28].

La composizione del microbiota della cavità orale, in particolare la quantità e il tipo di microrganismi presenti, può influenzare il bilancio redox della stessa. Come più volte spiegato in termini generali il bilancio

redox dipende dal rapporto tra specie reattive di natura ossidante, principalmente ROS/RNS e capacità antiossidante del medesimo fluido o tessuto biologico. Nel cavo orale i ROS sono costituiti principalmente da anione superossido, radicali idrossilici perossido d'idrogeno e perossidi organici [30]. I meccanismi mediante i quali l'alterazione del microbioma implica l'insorgere di uno stato di stress ossidativo sono svariati anche se strettamente interconnessi tra loro. Per esempio una proliferazione dei batteri saccarolitici, dovuta alla massiccia presenza di carboidrati e zuccheri, porta all'aumento dell'attività della NADH ossidasi con conseguente aumento della produzione di perossido d'idrogeno [28]. Per preservare l'equilibrio solitamente all'aumento dei ROS l'organismo risponde con un aumento della capacità antiossidante [31]. Altra causa di stress ossidativo è la risposta immunitaria dei leucociti (polimorfonucleati in particolare) che in presenza di batteri, virus o altri stimoli, sono in grado di produrre grandi quantità di anione superossido, radicale idrossilico e ipoclorito [32][33], e in concomitanza di parodontiti viene registrato un forte aumento della concentrazione di neutrofili [18]. Alti valori di antiossidanti, invece, potrebbero essere correlati allo sviluppo di un bioma avverso nel cavo orale, in particolare nel peridontium. L'alto livello di antiossidanti potrebbe derivare dalla guerra in corso tra i batteri patogeni e il nostro sistema immunitario attraverso vari meccanismi. Una prima fonte di antiossidanti potrebbe derivare dai sistemi difensivi dei microrganismi stessi [33] [34]. I microrganismi sono molto sensibili ai ROS, i quali possono attaccare la membrana fosfolipidica danneggiandola seriamente o provocare danni al DNA con serie conseguenze specialmente in fase di trascrizione o duplicazione dello stesso. In conseguenza di ciò i batteri hanno sviluppato sofisticati sistemi difensivi basati su ROS scavengers ed enzimi, come SOD o CAT. Tale sistema difensivo antiossidante è relegato principalmente nel periplasma quando si tratta di batteri gram-negativi come quelli presenti nel bioma avverso del caso orale [35][36]. Nei batteri patogeni, le SOD periplasmatiche sono implicate nella virulenza, probabilmente per le loro proprietà protettive nei confronti degli anioni superossidici rilasciati dai macrofagi [37]. Una parte di questi antiossidanti può essere sversata nella saliva a seguito della lisi cellulare causata dai ROS prodotti dai polimorfonucleati. Durante questo scontro tra microrganismi patogeni e sistema immunitario viene prodotta un'elevata quantità di ROS. La principale fonte è dovuta alla più volte citata risposta immunitaria in particolare all'azione del NADPH ossidasi presente sulla superficie dei polimorfonucleati in grado di produrre grandi quantità di superossido dal quale poi possono derivare perossido d'idrogeno, radicale ossidrilico e acido ipocloroso. Altra notevole fonte di ROS, nel particolare superossido, nelle condizioni descritte è l'enzima NADH ossidasi associato al metabolismo dei carboidrati dei batteri saccarolitici del genere Streptococcus Actinomyces, batteri fortemente presenti nel bioma alterato [28]. Questa elevata concentrazione di ROS causa un aumento della produzione di antiossidanti, nel tentativo di arginare la reattività dei ROS e/o il richiamo degli antiossidanti da altri compartimenti, come il plasma sanguigno attraverso il fluido crevicolare, [28]. Altri antiossidanti possono derivare dall'eventuale lisi cellulare di cellule di varia natura ad opera dell'elevata concentrazione di ROS [33]. Sulla base di quanto finora esposto è possibile ipotizzare due cause per l'innalzamento della concentrazione di antiossidanti collegate alla presenza di batteri patogeni in seguito alla disbiosi del bioma del cavo orale. Una diretta e dipendente dalla lisi cellulare di batteri o altre cellule e una indiretta e dipendente dalla risposta dell'organismo per arginare l'aggressività dei ROS. Sulla base di quanto finora esposto, in caso d'insorgenza di parodontite ci possiamo aspettare valori del potere antiossidante totale della saliva piuttosto altalenanti. Teoricamente si potrebbe avere una fase pre-patologica di bassi valori, uno dei fattori influenzanti la patogenesi, una fase successiva di valori sempre bassi dovuti al consumo delle difese antiossidanti mediante i meccanismi descritti per finire con elevarsi dei valori in seguito al richiamo di antiossidanti da altri compartimenti e l'innescarsi di lisi cellulari. Prova del fatto che alti valori di antiossidanti non sono necessariamente un bene risulta dal fatto in caso in caso di parodontite grave, cioè in una situazione in cui il potere antiossidante della saliva è potenzialmente elevato, è più elevata del normale anche la concentrazione di MDA, ossia di un marker di lipoperossidazione strettamente correlato con fenomeni infiammatori.[38]

Molto più controverso è il rapporto tra carie e stress ossidativo, in quanto, come si vedrà in seguito, è conosciuto e accettato il fatto che il potere antiossidante della saliva sia maggiore nei pazienti affetti da carie ma praticamente sconosciuto è il ruolo dello stress nella patogenesi delle stesse. La carie dentale è una delle più comuni malattie del cavo orale infantili ma più in generale le persone sono suscettibili alla

malattia durante tutta la loro vita. La carie dentale è la distruzione localizzata di tessuti duri dentali ad opera di sottoprodotti acidi dalla fermentazione batterica di carboidrati alimentari. La carie dentale è una malattia multifattoriale che inizia con una variazione microbiologica all'interno del complesso biofilm buccale ed è influenzata da flusso e composizione salivare, esposizione al fluoro, consumo di zuccheri alimentari e da comportamenti preventivi come la pulizia dentale quotidiana. La carie dentale si traduce in uno squilibrio nell'equilibrio fisiologico tra i minerali dei denti e le biofibre microbiche orali. I batteri vivono sui denti in microcolonie e sono incapsulati in una matrice organica di polisaccaridi, proteine e DNA secreto dalle cellule che fornisce la protezione contro l'essiccazione, le difese dell'ospite e i predatori e fornisce una maggiore resistenza agli agenti antimicrobici. I batteri e i loro sottoprodotti si accumulano in biofibre sulle superfici dei denti. I meccanismi del processo di formazione delle carie sono simili per tutti i tipi di carie. I batteri endogeni (in gran parte streptococchi mutanti, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, e *Lactobacillus*) nel biofilm producono acidi organici deboli come sottoprodotto del metabolismo dei carboidrati fermentabili, questo acido fa sì che i valori locali del pH scendano al di sotto di un valore critico che determini la demineralizzazione dei tessuti dei denti. Si ha l'insorgenza di carie quando i processi di demineralizzazione superano quelli di mineralizzazione che si hanno in presenza di pH e biofilm ripristinati. Anche i gli enzimi batterici possono essere coinvolti nello sviluppo della carie [39]. Sulle implicazioni dello stress ossidativo nella patogenesi della carie non esiste molta letteratura e la poca esistente è molto datata, basata su esperimenti in vivo su roditori e perlopiù contrastante. Alcune molecole riducenti (considerabili alla stregua di antiossidanti) come la sodio azide [40] o il metabisulfito di potassio [41] sembrano avere un effetto inibente la cariogenesi, mentre al perossido d'idrogeno ed ad altri ossidanti come perossido di zinco e sodio perborato è stato attribuito un potere cariogeno [42]. Al contrario il perossido d'idrogeno a concentrazioni più elevate viene proposto come inibente della cariogenesi [40]. Il sospetto che uno sbilanciamento dell'equilibrio redox verso lo stato ossidante possa essere concausa della carie e che l'effetto inibente visto da Vincet F. sia da imputare ad un'azione antibatterica, è piuttosto forte ma allo stato attuale è un'ipotesi non supportata da prove concrete. Di certo vi è l'aumento del potere antiossidante della saliva in presenza di carie, rispetto a gruppi controllo privi di carie, come provato da vari studi. Il potere antiossidante globale sembra aumentare in presenza di carie indipendentemente dalla tecnica analitica utilizzata; è stato misurato mediante la tecnica dell' ABTS [43][44], come potere riducente nei confronti del Mo^{6+} [45] o come potere inibente di una reazione tra un substrato ossidante ed un cromogeno [46][47]. Tra l'altro è stata dimostrata una correlazione lineare tra il numero di carie nei denti decidui e il potere antiossidante della saliva [47]. Per quanto riguarda invece la porzione ossidante dell'equilibrio redox la letteratura è più scarsa e sebbene non pienamente concorde si tende a ritenere normale un aumento della MDA in pazienti con carie [48]. Le cause a cui è imputato l'aumento del potere antiossidante sono essenzialmente due: l'innalzamento delle proteine nella saliva [46][49][50] e l'innalzamento di acido urico [45]. Come già descritto tra i maggiori componenti della barriera antiossidante salivare, acido urico escluso, vi è un complesso sistema di perossidasi, alcune delle quali, le mieoloperossidasi dei nucleofili, sono direttamente implicate nel controllo batterico [51]. Gli zuccheri che promuovono la carie come saccarosio, glucosio e fruttosio, sono facilmente metabolizzate da *Streptococcus mutans* e lattobacilli ad acidi organici che demineralizzano smalto e dentina. Tra i derivati del fruttosio vi è l'acido urico [52]. Allo stato attuale delle conoscenze è più probabile che uno scompenso nel sistema redox della bocca sia un effetto che una causa dell'insorgenza della carie, ma per ora mancano studi convincenti sia a smentire che a confermare questo fatto.

Lo stress ossidativo è però legato anche ad altre patologie del cavo orale. Tra le più diffuse patologie del cavo orale legata alla stress ossidativo ci sono le afte ulcerose del cavo orale. L'aftha ulcerosa del cavo orale, è una malattia infiammatoria cronica della mucosa orale caratterizzata da singola o multiple ulcere dolorose che persistono e si ripetono per variabili periodi di tempo; è una patologia molto diffusa e si stima ne sia affetta circa il 20% della popolazione.

I pazienti soffrono di dolore orale che va dal semplice fastidio a dolori intensi, a volte persino debilitanti. [53]. Anche se l'esatta fisiopatologia di questo entità clinica rimane poco chiara, diversi fattori sono stati finora identificati come causa di questo disturbo, come lo sfondo genetico, immunologico, carenze nutrizionali, agenti infettivi, sia batterici che virali, traumi locali locali, fumo, stress emotivo e farmaci [54]

[53]. Negli ultimi anni si è sempre più spesso accostato a questi fattori lo stress ossidativo. Ci sono stati studi che hanno rilevato un aumento dello stress ossidativo e una diminuzione della capacità antiossidante nei pazienti con afte [55][56][57]. Poiché i radicali liberi dell'ossigeno reattivo causano la distruzione delle biomembrane mediante ossidazione degli acidi grassi e lo stress ossidativo sopprime la capacità del sistema immunitario di proteggere e ripristinare le cellule colpite, esso è da annoverare tra i fattori potenzialmente determinanti della suscettibilità a questo disturbo. In condizioni normali, le membrane mucose sono protette dai danni causati da ROS dalla barriera antiossidante composta perlopiù dalle vitamine A,C ed E, β -carotene, Se ed enzimi quali SOD, CAT, glutatione perossidasi e reduttasi [55]. Più nello specifico si è notato una diminuzione a livello salivare delle vitamine A, C ed E [55] e degli enzimi SOD, CAT e GPX, ma non dei livelli di acido urico [57]. Sempre a livello salivare è stata rilevata un aumento dei livelli di MDA [55]. A livello serico si è invece osservato una diminuzione dei livelli di delle vitamine A, C ed E, contemporaneo ad un aumento del livello di MDA [55], inoltre è stato rilevata un aumento della capacità totale ossidante ed antiossidante del siero [56].

Lo stress ossidativo sembra avere un ruolo anche nello sviluppo del cancro orale. I radicali liberi principalmente ROS/RNS inducendo stress ossidativo e nitrativo, sono considerati tra i principali fattori di carcinogenesi orale. I RNS (nitrosammine, nitrati, NO_3 e nitriti, NO_2) sono anche prodotti dalla reazione tra ROS e altri radicali liberi con ossido di azoto (NO) e sono quindi in equilibrio con esso. L'aumento di ROS e RNS può essere l'evento che porta al consumo e alla riduzione dei sistemi antiossidanti salivari, spiegando così il danno ossidativo al DNA e alle proteine e possibilmente la promozione del carcinoma[58][59]. Più in particolare nella saliva di pazienti affetti da carcinoma orale a cellule squamose è stato trovato una concentrazione di RNS maggiore rispetto al gruppo controllo (NO , +60%, NO_2 , + 190%, NO_3 , +93%), mentre tutti gli antiossidanti salivari(perossidasi glutatione transferasi, superossido dismutasi e potere antiossidante globale) sono stati sostanzialmente ridotti. Inoltre il marcatore 8-OHdG, un indicatore ampiamente utilizzato dell'ossidazione del DNA, è aumentato del 65% e il livello di carbonilazione delle proteine saliva è risultato significativamente maggiore.[58]

I principali fattori di rischio a livello locale sono la presenza di amalgami e l'abitudine al tabagismo. Il mercurio è la componente principale, circa il 50% in peso, dell'amalgama dentale che è stata utilizzata per decenni perché è durevole, poco costosa, facile da manipolare e posizionare a costi relativamente bassi. Il vapore di mercurio elementare liberato dall'amalgama dentale viene inalato e assorbito dall'organismo. Il rilascio di mercurio dalla superficie amalgama nella cavità orale può essere attribuito all'effetto della masticazione, della spazzolatura, della temperatura, del pH della saliva, della corrosione biologica dovuta ai batteri e alla corrosione elettrochimica [60]. È stata dimostrata la capacità del mercurio di interagire con gruppi solubili e proteine aventi gruppi tioloici e di produrre specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido, il perossido di idrogeno e il radicale idrossile, tutte specie che in sono in grado di indurre lesioni ossidanti ai tessuti attraverso diversi meccanismi, per esempio la perossidazione dei lipidi, il danneggiamento del DNA e alterazioni dell'omeostasi del calcio [61]. Il mercurio provoca danni ossidativi che inibiscono il ruolo antiossidante di GSH e formano un complesso Hg-tiolo reattivo che può interagire col perossido d'idrogeno per promuovere l'ossidazione delle molecole biologiche [62]. Che il mercurio presente nell'amalgama dentale sia la principale fonte di questo metallo pesante a livello salivare è certo; stata dimostrata le diretta correlazione tra il numero di amalgami e la concentrazione salivare dello stesso[60]. La presenza di amalgama dentaria induce un innalzamento dei livelli di MDA e una riduzione della concentrazione di glutatione e acido urico nella saliva[63], inoltre è stata dimostrata, almeno nelle donne, una significativa correlazione inversa tra il potere antiossidante totale (FRAP), e il livello mercurico nella saliva [60].

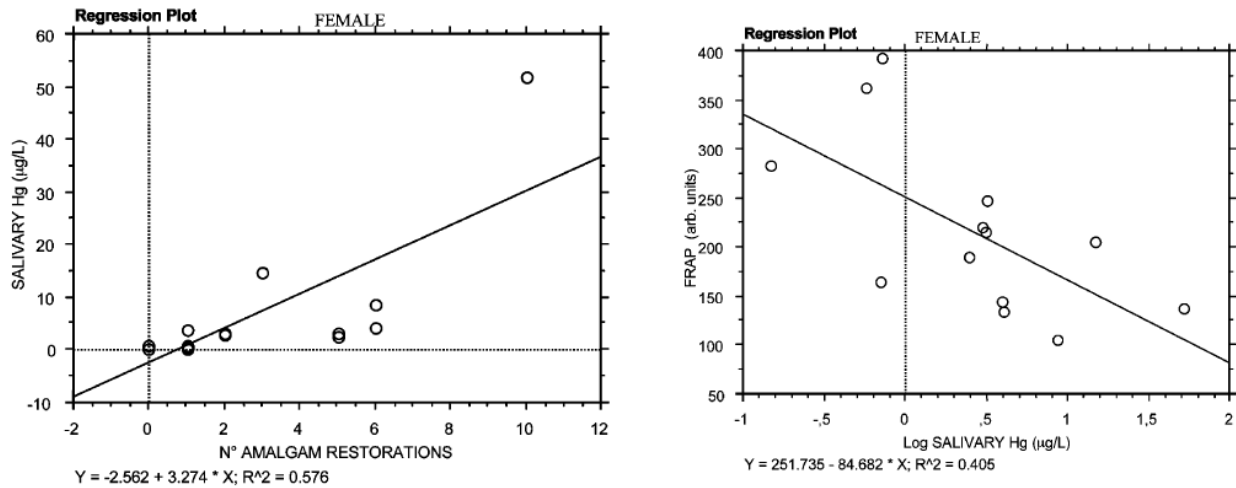


Figura 3: Correlazione tra numero di amalgami e mercurio salivare e correlazione tra FRAP e mercurio salivare; immagine rielaborata da Pizzichini et al. 2001 [60]

Per quanto riguarda il fumo di sigaretta, esso è una fonte di stress ossidativo diretto e indiretto, ossia fornisce sia specie ossidanti di suo, sia attiva percorsi metabolici che inducono a stress ossidativo e infiammazioni. Il fumo di sigaretta è una ricca fonte di radicali liberi. Questi radicali generati dal fumo da

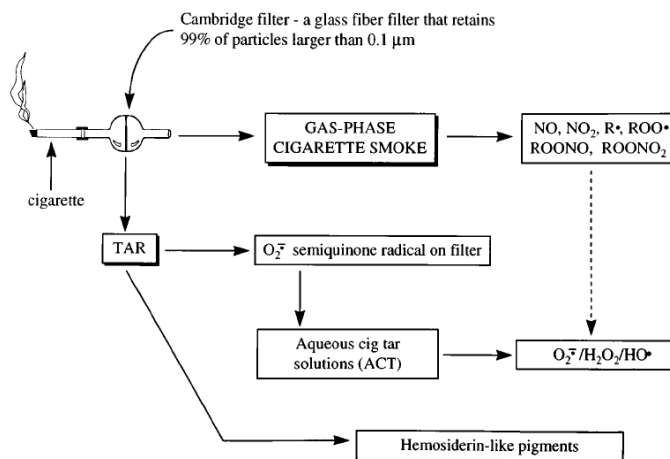


Figura 4: Fonti di stress ossidativo nel fumo di sigaretta; immagine da Repine et al 1997 [64]

sigarette sono sufficientemente stabili per essere rilevati mediante EPR. La componente gas inalata del fumo di sigaretta contiene, inoltre un gran numero di radicali organici fortemente reattivi, ROS e RNS fortemente reattivi. Il fumo contiene anche alte concentrazioni di olefine e dieni reattivi oltre che 500 ppm di ossido di azoto (NO). Importante è anche l'apporto di ferro con conseguente possibilità di reazioni di Fenton [64]. Inoltre dalla reazione tra NO e anione superossido si genera lo ione perossinitrito, il quale oltre ad essere un forte ossidante di suo, penetra nei compartimenti intracellulari attivando la proteina IKK con conseguente attivazione del fattore NF-κB. La cronica attivazione di questo fattore porta ad infiammazione e

stress ossidativo[65] A supporto di queste informazioni è osservato un aumento della MDA e una riduzione dell'attività di SOD, GPX e CAT nei tessuti gengivali dei fumatori [66] come è stato osservato un aumento delle proteine carbonilate nella saliva [67]

[1] Tóthová L, Kamodyová N, Cervenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2015;5(73)

[2] Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992;172:305-12.

[3] Grant DA, Stern IB, Listgarten MA, editors. *Saliva*. In: *Periodontics*. 6th ed. St Louis: CV Mosby; 1988. p.135-46.

[4] Edgar WM. Saliva and dental health. *Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting*. *Br Dent J* 1990;169:96-8.

[5] Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The j of prosthetic dentistry* vol.85 n.2

[6] Nagler R, Klein I, Zarzhevsky N, et al. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;32:268-277

[7] Moore S, Calder K, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant Activity of Saliva and Periodontal Disease. *Free Radical Research* 1994;21(6)

[8] Peresglina IA. The activity of antioxidant enzymes in the saliva of normal children. *Lab Delo* 1989;11:20-23

[9] Meyle J, Kapitzka K. Assay of ascorbic acid in human crevicular fluid from clinically healthy gingival sites by high-performance liquid chromatography. *Archives of Oral Biology* 1990;35:319-323

- [10] Kondrova I, Lissi EA, Pizzarro M. Total antioxidant potential in human saliva of smokers and non smokers *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:911-920
- [11] Grisham MB, Ryan EM. Cytotoxic properties of salivary oxidants; *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Published 1990;258:C115-C121
- [12] Thomas EL, Aune TM. Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. *Infect. Immun.* 1978;20:456-463
- [13] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820
- [14] Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J.Periodontol* 1991;62:761-764
- [15] Terao J, Nagao A, Yuki H, Itoh Y. Reduction of fatty acid hydroperoxides by human parotid saliva. *Lipids* 1993; 28: 121.
- [16] de Almeida V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9(3):72-80.
- [17] Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Saliva in Relation to Age and Gender. *J dent Re* 1994;73: 1416
- [18] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30–44.
- [19] Rajendhran J, Gunasekaran P. Human genomics and microbiomics: the post-genome scenario. *Curr Sci* 2009;97: 140– 141.
- [20] Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009;259: 12.
- [21] Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Jin LJ, Samaranyake LP. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis* 2010;16: 10.
- [22] Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev* 2012;70(Suppl.1):S2–9.
- [23] Marsh PD, Head DA, Devine DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—Implications for treatment. *Journal of Oral Biosciences* 2015;57:185–191
- [24] Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases* 2012;18:109–120
- [25] Flemmig TF, Beikler T. Control of oral biofilms. *Periodontol* 2011;55: 9–15.
- [26] Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* 2013;69:37– 143
- [27] Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 2010;8:481–90.
- [28] Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series* 2005;1284:103– 112
- [29] Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1997;8:269–290.
- [30] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239–247.
- [31] Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress :A critical review. *Free Radical Biology and Medicine* 2015;85:95–104
- [32] Grisham MB. Oxidant and free radicals in inflammation bowel diseases. *Lancet* 1994;344:859-861
- [33] Cornelli U. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in dermatology* 2009;27:175-194
- [34] Lushchak VI. Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)* 2001;66: 476.
- [35] Imlay JA. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol.* 2015;24: 124–131
- [36] Arts IS, Gennaris A, Collet JF. Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Letters* 2015;589:1559–1568
- [37] De Groote MA, Ochsner UA, Shiloh MU, Nathan C, McCord JM, Dinauer MC, Libby SJ, Vazquez-Torres A, Xu Y, Fang FC. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:13997–14001.
- [38] Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Salivary Lipid Peroxidation Product Malonaldehyde in Various Dental Diseases; *World Journal of Medical Sciences* 2006;1(2): 100-101
- [39] Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369: 51–59
- [40] Vincent F. Lisanti and Bertram Eichel. Antioxidant Inhibition of Experimentally Induced Caries in Hamsters; *J DENT RES* 1963;42: 1030
- [41] Jordan HV, Bowler HV, Berger ND. Testing of Antioxidants against Experimental Caries in Rats. *Journal of Dental Research* 1961;40(5)
- [42] Shapiro M, Brat V, Ershoff BH. Induction of Dental Caries and Pathological Changes in Periodontium of Rat with Hydrogen Peroxide and Other Oxidizing Agents. *J. dent. Res.* 1960;39:332-43.
- [43] Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *International journal of pediatric dentistry* 2006;16:186–191
- [44] Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Hendi SS, Kasraei S, Moghimbeigi A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18 (4):e553-6.
- [45] Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: An in-vivo study. *Indian Journal of Dental Research* 2013;24(2)
- [46] Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Ind J Clin Biochem* 2010;25(4):425–428
- [47] Uberos J, Alarcón JA, Peñalver MA, Molina-Carballo A, Ruiz M, González E, Castejon EJ, Muñoz-Hoyos A. Influence of the antioxidant content of saliva on dental caries in an at-risk community. *British Dental Journal* 2008

- [48] Sarode G, Shelar A, Sarode S, Bagul N. Association between Dental Caries and Lipid Peroxidation in Saliva; *International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology*. 2012;3(2):02-04
- [49] Stuchell RN, Mandel ID. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res*. 1983;62:552-4.
- [50] Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. The role of the saliva antioxidant barrier to reactive oxygen species with regard to caries development. *Redox Report* 2017:1-10
- [51] Prior RL, Coa G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:1173-81
- [52] Perheentupa J, Raivio K. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 1967;2:528-31.
- [53] Zunt SL. Recurrent aphthous stomatitis. *Dermatol. Clin*. 2003;21:33-39.
- [54] Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M. Recurrent aphthous stomatitis. *Quintessence Int*. 2000;31:95-112.
- [57] Saral Y, Kandi Coskun B, Ozturk P, Karatas F, Ayar H. Assessment of Salivary and Serum Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Patients with Recurrent Aphthous Ulceration. *Tohoku J. Exp. Med*. 2005;206:305-312
- [58] Akoglu G, Metin A, Kilinc F, et al. Total Serum Oxidant/Antioxidant Status and Arylesterase Activity in Recurrent Aphthous Stomatitis. *Ann Dermatol* 2013;25
- [59] Karıncaoğlu Y, Batcıoğlu K, Erdem T, Esrefoğlu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005;34: 7-12
- [53] Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary Analysis in Oral Cancer Patients DNA and Protein Oxidation, Reactive Nitrogen Species, and Antioxidant Profil; *Cancer* 2007;109:54-9
- [54] Korde S, Minal M, Amol C, et al. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review; *Oral Oncology* 2014;50:10-18
- [60] Pizzichini M, Fonzia M, Sugherini L, Fonzia L, Gasparonia A, Comporti M, Pompella A. Release of mercury from dental amalgam and its influence on salivary antioxidant activity. *The Science of the Total Environment* 2002;284.
- [61] Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995;18:321-336.
- [62] Miller DM, Woods JS. Redox activities of mercury-thiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity. *Chem Biol Interact* 1993;88:2335.
- [63] Huda Sh. Ahmed, Taghreed F. Zaidan, Ali Yakub Trace elements and oxidative stress markers in saliva of subjects with amalgam fillings. *J Bagh College Dentistry* 2012;24(3).
- [64] Repine JE, Bast AALT, Lankhorst L. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341-357
- [65] Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, et al. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. *Archives of oral biology* 2011;56:48 – 53
- [66] Tonguç MO, Öztürk O, Sütçü R, Ceyhan BM, et al. The Impact of Smoking Status on Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Levels in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2011;82:1320-1328
- [67] Nagler R, Lischinsky S, Diamonda E, et al. Effect of Cigarette Smoke on Salivary Proteins and Enzyme Activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000;379:229-236

6.8

STRESS OSSIDATIVO E SPORT

Che l'esercizio fisico sia connesso ad una sovrapproduzione di ROS è noto da molto tempo [1][2] ma solo nell'ultimo decennio si è iniziato ad approfondire seriamente questo collegamento e soprattutto a indagare sulle possibili applicazioni in campo sportivo professionistico [3]. Il legame tra stress ossidativo e sport o più in generale ed esercizio fisico ruota intorno alla teoria dell'ormesi. La tesi della teoria dell'ormesi è che i sistemi biologici rispondono all'esposizione a sostanze chimiche, tossine e radiazioni o stimoli con una curva di risposta a campana. Dai nomi degli scienziati che per primi la idearono l'ormesi viene definita dalla legge di "Arndt e Schulz" che afferma quanto segue: "Stimoli di debole intensità accelerano modestamente l'attività vitale, di media intensità la incrementano, di forte intensità la bloccano in parte, di elevatissima intensità la sopprimono completamente". I fenomeni inerenti a stress e esercizio fisico sembrano bene adattarsi a questa teoria.

Nel particolare, l'effetto dell'esercizio sull'equilibrio redox è estremamente complesso e dipende dell'età, del sesso e del livello di allenamento, nonché dall'intensità e dalla durata dell'esercizio. Sebbene l'allenamento moderato sia vantaggioso per l'equilibrio redox e la salute, gli sforzi acuti possono indurre la sovrapproduzione ROS. Anche se l'esercizio porta ad un aumento dello stress ossidativo, lo stesso stimolo sembra necessario per consentire un up-regulation nelle difese antiossidanti endogene. In particolare, questa ipotesi suggerisce che la reazione dell'organismo a ripetuti aumenti della produzione di ROS tramite esercizi coinvolge meccanismi di adattamento. In particolare, l'ormesi provoca un'elevata regolazione antiossidante mediante risposte adattative degli enzimi antiossidanti, SOD, CAT, GPX e glutazione-S-transferasi, e degli antiossidanti nonenzimatici, come le vitamine E, A, C e acido urico [4].

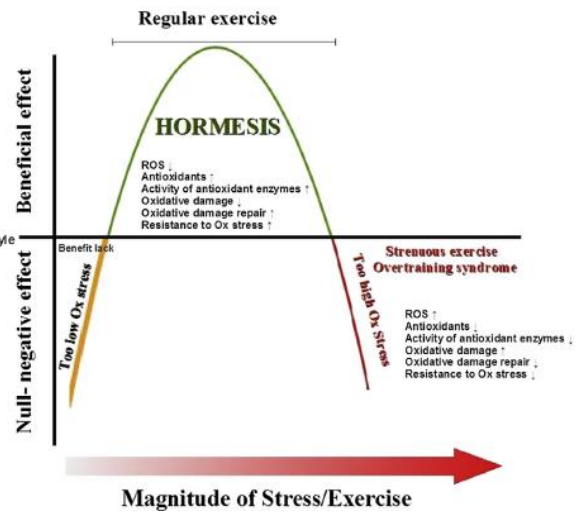


Figura 1: Ormesi ed esercizio fisico. L'esercizio fisico elimina l'ormesi, riduce lo stress ossidativo, protegge contro l'insorgenza e la progressione delle malattie e migliora le prestazioni e la qualità della vita. L'esercizio fisico e il sovraallenamento aumentano lo stress ossidativo e il rischio di malattie. Tuttavia, uno stato di stress ossidativo troppo basso conduce ad una mancanza di i benefici legati all'ormesi e può essere dannoso per la salute; immagine e didascalia da *Pingitore et al. 2015* [3]

Secondo la teoria dello stress, sviluppata da *Selye 1956* [5], ad uno stress cronico il corpo risponde con una diminuzione (reazione di allarme) e poi con una maggiore resistenza (fase di resistenza), seguita dalla fase d'esaurimento. Pertanto, i fattori di stress cronici potrebbero essere molto pericolosi poiché il periodo di riposo, che è obbligatorio per il recupero e un'efficace risposta allo stress, manca. Utilizzando un esempio di esercizio estremamente lungo,

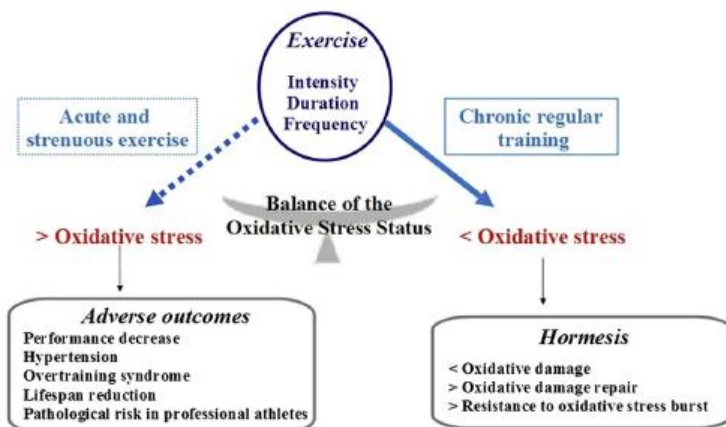


Figura 2: Influenza dell'esercizio fisico sullo stress ossidativo; immagine rielaborata da *Pingitore et al. 2015* [3]

come ad esempio più ore consecutive di corsa o nuoto, anche in soggetti altamente qualificati, il corpo può subire una grave "esaurimento" che potrebbe compromettere la salute degli individui. D'altra parte, in condizioni normali, i periodi di esercizio sono seguiti dai periodi di riposo e durante i quali l'organismo ha la capacità di far fronte all'esercizio "stressore" e, di conseguenza, l'adattamento avviene. Infatti, gli effetti adattivi dell'esercizio regolare sono perlopiù ma non limitatamente sistemici. Nel muscolo scheletrico, per esempio, un singolo acuto d'esercizio aerobico a lungo termine diminuisce la concentrazione del glicogeno, mentre l'adattamento normale di esercizio fisico ad un regime di allenamento è un aumento della concentrazione di glicogeni che supera significativamente il livello che si trova nei muscoli non addestrati. Allo stesso modo, l'esercizio anaerobico intensivo aumenta il livello di acido lattico, che può arrivare fino a 20-25 mmol/l nel sangue, ma l'adattamento anaerobico associato all'esercizio aumenta la capacità di far fronte all'acido lattico migliorandone l'eliminazione. L'esercizio fisico è effettuato al solo scopo di realizzare l'adattamento. Uno dei punti finali della curva di ormesi correlata all'esercizio è l'inattività fisica, purtroppo associata al nostro moderno stile di vita. È ben documentato che l'inattività fisica è associata ad una maggiore incidenza di una varietà di malattie e condizioni patologiche, tra cui le malattie cardiovascolari, il diabete di tipo II, l'atrofia muscolare, l'obesità e le malattie di Alzheimer e di Parkinson[6][7]. Principalmente sono le attività di resistenza che causano risposte adattative dell'espressione genica nei genomi nucleari e mitocondriali nel muscolo scheletrico. I cambiamenti dell'espressione genica sono modulati da una varietà di fattori di trascrizione che costituiscono la base di diversi o comuni meccanismi di adattamento. Uno dei cambiamenti più rilevanti indotti dalle attività fisiche è l'up-regulation del metabolismo energetico mitocondriale con conseguente aumento della generazione dei ROS da esso derivanti. Un esercizio intenso ed acuto attiva il fattore di trascrizione NF-κB per migliorare la trascrizione di geni degli enzimi antiossidanti come la MnSOD mitocondriale. L'esercizio regolare aumenta anche le difese antiossidanti nel muscolo scheletrico grazie ad un'aumentano oltre che delle SOD, dell'espressione genica della GPX. Sembra pertanto che i ROS fungano da messaggeri nell'espressione genica adattiva indotta dall'esercizio fisico. È stato osservato che le fibre muscolari esposte a H₂O₂ mostrano l'up-regulation di mRNA per enzimi antiossidanti (CAT, GPX, CuZnSOD e MnSOD), suggerendo che i ROS sono coinvolti nella risposta adattiva dell'espressione genica antiossidante mediante esercizio [7][8]. A riposo, lo stato di stress ossidativo è generalmente inferiore negli atleti rispetto agli individui sedentari, [9] anche se molte sono variabili che influenzano questi risultati. Diversi studi hanno mostrato una risposta ossidativa inferiore negli atleti rispetto ai gruppi controlli sia a riposo che subito dopo l'esercizio fisico, in quanto MDA, proteine carbossilate e 8-OHdG erano più bassi negli atleti rispetto agli individui non allenati, mentre l'attività di SOD era più alta negli atleti rispetto agli individui sedentari [10]. È interessante notare che anche gli individui ben allenati sono più resistenti a improvvisi picchi ossidativi provocati da esercizi acuti e faticosi, come mostrano dati su modello animale e umano [11]. L'esercizio fisico ha aumentato la MDA negli eritrociti di ratti sedentari, ma non in quelli allenati, e ha ridotto l'attività di SOD di eritrociti nei ratti sedentari, aumentando l'attività di questo enzima in ratti allenati [12]. Questi risultati sono coerenti con la teoria dell'ormesi, e possono anche spiegare i dati epidemiologici che mostrando come gli atleti di élite abbiano un'aspettativa di vita più lunga rispetto alla popolazione generale. Inoltre, è stata riscontrata una relazione inversa e lineare del tipo dose-dipendente tra volume di allenamento fisico e mortalità all'cause [4][13][14].

Di estremo interesse e coerenti con quanto finora esposto sono i risultati dello studio condotto da *Margonis et al 2007* [15]. In questo studio 20 atleti, in realtà sono definiti uomini allenati, sono stati sottoposti ad un ben determinato ciclo di allenamenti durante il quale sono stati monitorati costantemente i principali markers di stress ossidativo. I 20 volontari avevano le seguenti caratteristiche: 22.4±2.1 anni, 75.5±6.9 kg, 1.78±2.5 m, 11.9±2.4% massa grassa, 49.4±5.1 ml/kg/min VO₂max). Il ciclo d'allenamento era costituito da 1 settimana di familiarizzazione con gli esercizi dell'allenamento proposto e da cinque sottocicli di 3 settimane ciascuno di intensità crescente i primi tre, fino ad arrivare ad un ciclo di overtraining, decrescente il quarto e di riposo il quinto. Sono stati monitorati isoprostani, TBARS e proteine carbossilate per quanto riguarda i markers ossidativi e CAT, GPX, GSH, GSSG, GSH/GSSG e potere antiossidante totale TAC per quanto riguarda l'analisi della rete antiossidante. Come mostrano chiaramente i risultati illustrati nella figura seguente si ha un andamento prima crescente e poi decrescente dei markers ossidativi, coerente col carico di allenamento; le differenze più significative si sono registrate in concomitanze della

maggior maggiorazione del carico di lavoro. Di tipo adattativo è stata la risposta degli enzimi antiossidanti CAT e GPX che hanno mostrato un andamento simile a quello dei marker di ossidazione. Al contrario la capacità totale antiossidante ha un andamento tutto suo, si ha un primo incremento coi carichi di lavoro minori, una drastica riduzione nel sottociclo più intenso, quello per poi rialzarsi nei cicli finali. L'andamento di questo parametro è forse la più chiara dimostrazione dell'ormesi ricavabile dai risultati di questo studio, infatti finché il carico stressorio è rimasto contenuto i meccanismi di adattamento sembrano funzionare ma in condizioni più critiche tutto il meccanismo è risultato compromesso. GSH è diminuito mentre GSSG è aumentato solo dopo l'overtraining per tornare alla normalità in seguito. Di conseguenza, il loro rapporto (GSH/GSSG) è diminuito solo dopo l' overtraining ed è stato normalizzato successivamente. Quindi i volumi di lavoro inferiori non hanno influenzato lo stato di redox del GHS. Questi risultati indicano che durante l'overtraining, l'offerta GSH potrebbe non essere sufficiente per adattarsi al suo utilizzo massiccio, con conseguente riduzione della sua disponibilità nel sangue.

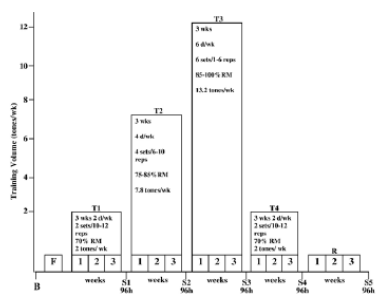


Fig. 1. Training and testing protocol. B, baseline; T1–T4, the four training periods; R, rest period; F, familiarization period; S1–S5, five sampling points (96 h following the last exercise session of each training period).

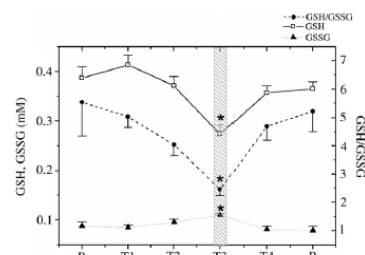


Fig. 4. GSH, GSSG, and GSH/GSSG responses during training. B, baseline; T1–T4, the four training periods; R, rest period; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; *denotes significant difference with baseline. Shaded areas denote the onset of overtraining.

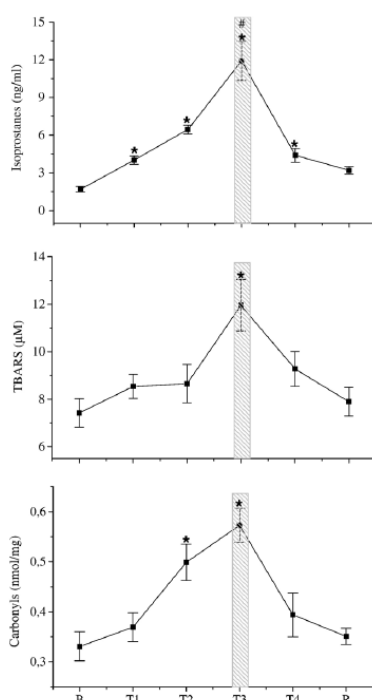


Fig. 3. Oxidative stress biomarkers (isoprostanes, TBARS, protein carbonyls) responses during training. B, baseline; T1–T4, the four training periods; R, rest period; *denotes significant difference with baseline; #denotes significant difference between T3 and T2. Shaded areas denote the onset of overtraining.

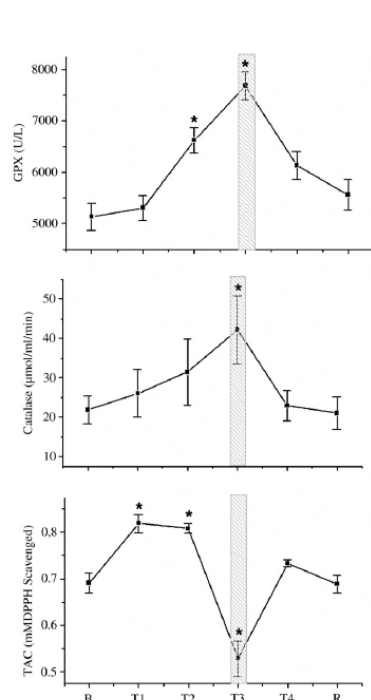


Fig. 5. Antioxidant status biomarkers (TAC, catalase, GPX) responses during training. B, baseline; T1–T4, the four training periods; R, rest period; TAC, total antioxidant capacity; GPX, glutathione peroxidase. *denotes significant difference with baseline; #denotes significant difference between T3 and T2. Shaded areas denote the onset of overtraining.

Figura 3: Riassunto dei risultati di Margonis et al 2007 [15]; immagini tratte e rielaborate da relativo lavoro.

Anche senza arrivare ai risultati eclatanti dello studio appena preso in esame esiste tutta una serie di studi che prendendo in esame sport diversi a livello professionistico, ad esempio pallamano, basket e ultramaratona, mostrano come dopo lo sforzo il bilancio redox sia squilibrato verso una situazione di stress ossidativo [16-18]. Naturalmente questa situazione di stress ossidativo ha fatto nascere l'idea di cercare di controllare i danni da esso causati mediante la somministrazione di integratori a base di antiossidanti o di modulazione degli stessi mediante dieta. Esiste già una certa letteratura in merito [3][16][19][20] con alterne valutazioni ma in questo ambito gli orizzonti da esplorare sono ancora molto vasti.

Molti studi in ambito sportivo sono stati fatti anche mediante i test H&D. In linea del tutto generale si è osservato che l'esercizio fisico, soprattutto se intenso (es. sforzo massimale al cicloergometro) induce un superamento della soglia delle 350 U.Carr; tuttavia, un'ora dopo tale sforzo, mentre i soggetti regolarmente allenati tornano rapidamente ai loro valori di normalità, e comunque al di sotto di 300 U.Carr, nei i soggetti non allenati i valori si mantengono più persistentemente elevati nel tempo [21].

Negli atleti correttamente allenati i valori di d-ROMs test sono mediamente più bassi di quelli rilevati nei soggetti non allenati [22]. L'allenamento sportivo adeguato ha come effetto un incremento limitato dei ROS, anche dopo la prestazione atletica [22][23] con un rientro successivo a valori, a volte anche inferiori a quelli basali. Questo fenomeno si ritiene dovuto ad uno stimolo alla produzione di difese antiossidanti che, nell'atleta ben allenato, si protrae oltre al termine della prestazione. Di seguito verranno illustrati i risultati ottenuti nei vari sport.

Calcio

Alcuni studi hanno valutato il livello plasmatico di stress ossidativo nel corso di un'intera stagione di football [22][24][25]. Fra questi, molto interessante risulta essere quello eseguito su 26 calciatori del Bologna, nel momento in cui la squadra era iscritta alla massima categoria del torneo professionale italiano [25]. Per ciascun atleta, sottoposto a regime di allenamento intenso, sono stati eseguiti cinque prelievi di sangue per la determinazione del livello dei radicali liberi, all'inizio della stagione, e nelle settimane successive, a cadenza regolare. I valori del d-ROMs sono risultati ≥ 300 U.Carr. nel 22% delle determinazioni. Nel corso della stagione agonistica, la tendenza si è dimostrata stabile verso elevati livelli di d-ROMs nel 15% dei casi, stabile su livelli border-line nel 15% dei casi, stabile nel range di riferimento nel 45% dei casi, in riduzione 20% dei casi (anche nel 15% dei casi era imputabile ad una assunzione di antiossidanti). La tendenza è stata in crescita solo nel 5% dei casi. Inoltre, il 37% dei calciatori hanno mostrato variazioni significative del potere antiossidante ($TAS \geq 1.30$ mmol/L). Confrontando i risultati dei due test si è osservata una leggero andamento inverso fra d-ROMs e TAS, a conferma del fatto che una buona capacità antiossidante limita la generazione di radicali liberi. In particolare, sono stati riscontrati frequentemente livelli di perossidi più elevati della norma, ma, in seguito, i valori si sono generalmente stabilizzati intorno ad uno specifico livello, che probabilmente riflette la risposta soggettiva allo stress ossidativo in rapporto all'attività fisica. Un esempio di perfetto adattamento dell'organismo alla condizione di stress ossidativo da sport, è il risultato ottenuto nello studio condotto da *Andersson et al* (2009) [26]. In tale studio sono stati valutati i livelli di d-ROMs in 16 calciatrici élite prima e dopo 90 minuti di partita e non sono stati osservati cambiamenti nel valore di radicali liberi (245 ± 25 U.Carr vs 249 ± 25 U.Carr) Tale risultato indica un perfetto bilanciamento antiossidanti e ossidanti dell'atleta ben allenato e ben alimentato. Degno di interesse, il rientro nella norma di valori di d-ROMs test precedentemente elevati in atleti sottoposti ad integrazione antiossidante [27][28]. Una buona integrazione antiossidante e una corretta alimentazione associate ad un allenamento ottimale permettono di mantenere sotto controllo la produzione eccessiva dei radicali liberi durante l'attività sportiva.

Ciclismo

Il d-ROMs test è stato applicato per la valutazione della condizione atletica durante alcune gare ciclistiche agonistiche al fine di valutare la condizione atletica e l'efficacia di eventuali terapie di sostegno [29][30]. In

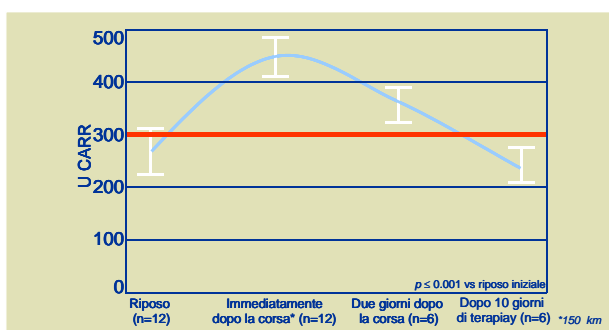


Figura 4: Andamento dei valori del d-ROMs test pre e post gara ciclistica di gran fondo (150 km)

particolare si è osservato che la valutazione dello stress ossidativo durante il Giro d'Italia ha permesso di capire quali atleti erano maggiormente "sofferenti" da un punto di vista ossidativo. Il d-ROMs si è dimostrato potenzialmente utile come marker predittivo di infiammazione [30]. Per il d-ROMs, infatti, si è osservato un suo aumento prima che la proteina C-reattiva (hs-CRP), marker di riferimento di infiammazione, uscisse dal range di normalità e soprattutto prima che si manifestasse un quadro clinico. Data l'esiguità del campione non è una conclusione definitiva ma apre alla possibilità di interessanti filoni di ricerca. In uno studio

longitudinale, è stato monitorato il livello di stress ossidativo in un campione di 12 atleti prima e dopo una gara ciclistica di granfondo (150 km) [2]. In sei dei dodici ciclisti reclutati, il d-ROMs test è stato ripetuto anche dopo 2 giorni, a riposo, e dopo 10 giorni di trattamento antiossidante specifico (A_{RD} Stenovit®) (Figura

4). Il trial ha confermato che gli atleti presentano in condizioni basali, prima della gara, livelli sierici di d-ROMs nei limiti della norma. L'intenso sforzo muscolare si accompagna ad un considerevole e statisticamente significativo incremento dei valori del d-ROMs test che, tuttavia, tendono a ridursi già due giorni dopo la gara, con maggior rapidità nei soggetti sottoposti ad integrazione antiossidante. Le gare ciclistiche impegnative (marathon, endurance), risultano essere nell'ambito delle varie discipline sportive tra quelle a cui si accostano i maggiori livelli di perossidi finora trovati. [31]

Ultra-endurance running/mountain ultra-marathon running

I livelli di ROS sono stati valutati anche in gare di ultra-endurance e ultra-marathon. Gare di questo tipo hanno un carico di fatica e una durata elevate, e di conseguenza anche la produzione di ROS potrebbe diventare "pericolosa" per l'atleta. In due studi pubblicati recentemente sono stati valutati i livelli di ROS durante una mountain ultra-marathon running (330 km e 24000 m di dislivello) [32] e durante una ultra-endurance running (50 o 100 km) [33]. Da entrambi gli studi è emerso che gli atleti, in seguito all'attività prolungata ed estenuante presentavano elevati livelli di ROS e un conseguente inizio di status infiammatorio

Corsa

In uno studio condotto da Iorio et al (2001) [34] sono stati valutati i livelli dei ROS su un campione di 50 soggetti adulti, di età media 25.5 ± 2.7 anni e di sesso maschile, tutti partecipanti ad una corsa cittadina per un percorso complessivo di 10.5 km. Il d-ROMs test è stato eseguito su campioni di sangue intero, prelevati prima (t_0), al traguardo (t_1), ed 1 ora dopo la fine (t_2) della competizione. I livelli di d-ROMs sono passati da 243.4 ± 22.6 (t_0) a 281.2 ± 21.7 (t_1), fino a 333.2 ± 19.7 (t_2). Le variazioni osservate sono risultate statisticamente significative.

Softball

Uno studio ha valutato il livello di radicali liberi in condizioni basali, dopo una sessione di allenamento e dopo una corsa di 3.000 metri, in un campione di 8 atlete professioniste afferenti alla Squadra Nazionale Italiana di Softball [2]. I risultati dello studio hanno mostrato, in particolare, un incremento statisticamente significativo dei valori di perossidi dopo attività aerobica, in rapporto allo sforzo muscolare da 223 ± 24 U.Carr a 446 ± 73 U.Carr.

Baseball

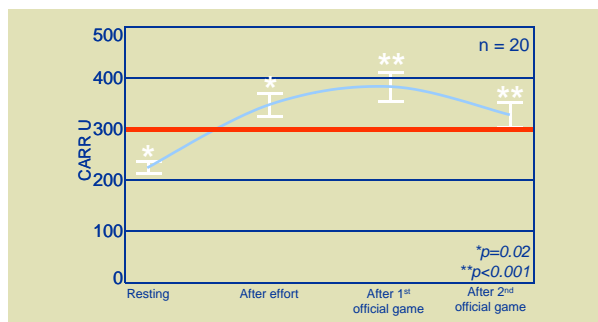


Figura 5: Andamento dei valori medi del d-ROMs test dopo due incontri ufficiali in giocatori di baseball

Su un campione di 20 giocatori della Nazionale Italiana Baseball è stato eseguito il d-ROMs test, in condizioni basali e dopo sia un test da sforzo che due incontri ufficiali. Fra le due competizioni, gli atleti sono stati sottoposti ad un ciclo di terapia antiossidante (AR_D Stenovit®) di 10 giorni [2]. Rispetto alla condizione di riposo, il livello medio di d-ROMs dopo l'allenamento o la competizione sono aumentati in maniera statisticamente significativa (Figura 5). È interessante sottolineare che l'assunzione di antiossidanti ha ridotto in maniera significativa il livello di d-ROMs dopo allenamento

Triathlon

Lo stress ossidativo è stato valutato in 10 atleti di triathlon allenati, a riposo e dopo una prova da sforzo (nuoto seguito da corsa) [2]. Il livello di perossidi dopo la prova da sforzo è aumentato significativamente rispetto ai valori rilevati a riposo, da 295 ± 56 U.Carr a 335 ± 60 U.Carr. In un recente studio è stato valutato l'effetto di un particolare integratore (Pycnogenol®) sulle performance di atleti che praticavano triathlon [35]. 32 uomini del gruppo trattato con Pycnogenol e 22 uomini del gruppo controllo sono stati inclusi nello studio. Si è osservato che il gruppo in trattamento aveva maggiori benefici rispetto al gruppo controllo: in

primis il tempo totale della gara è stato di 89' 44" per i soggetti del gruppo Pycnogenol rispetto ai 96'5" del gruppo controllo. Si è osservata una significativa riduzione dei crampi durante la corsa e nel post-corsa in particolare nel gruppo in trattamento. Di rilevante importanza si è osservata una significativa riduzione dei radicali liberi plasmatici un'ora dopo la fine della gara nel gruppo in trattamento rispetto al gruppo controllo.

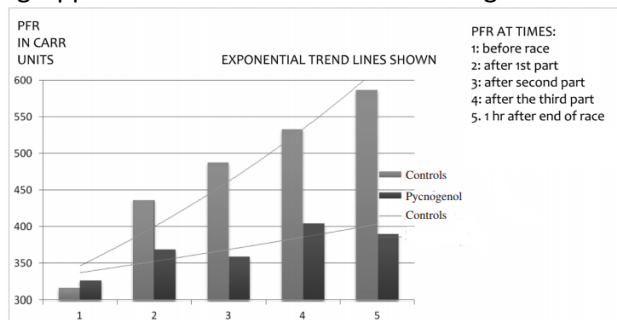


Figura 6: Aumento significativo dei valori del d-ROMs test negli atleti del gruppo controllo rispetto agli atleti trattati con un modulatore fisiologico specifico; immagine da Vinciguerra et al. 2013 [35]

Nel gruppo Pycnogenol si è osservato un aumento inferiore rispetto al controllo dei livelli di perossidi valutati con il d-ROMs test e una maggiore velocità di recupero fino ad arrivare a livelli normali (Figura 6). Dallo studio si evince che un buon allenamento e un buon supporto antiossidante, al pari di un livello controllato di radicali liberi permettono un miglioramento della performance dell'atleta.

Golf

Il d-ROMs test è stato eseguito in 12 atleti della Squadra Nazionale Italiana di Golf, dopo una corsa di 3.000 metri alla massima velocità [2]. Il livello di ROM è aumentato da 234±55 U.Carr in condizioni di riposo, a 294±64 U.Carr dopo attività aerobica.

- [1] Jenkins RR Exercise, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *International Journal of Sport Nutrition*, 1993;3:356-375
- [2] Beltrami G, Fanton F, Schiavottiello G. Determinazione dei radicali liberi in differenti attività sportiva e sue applicazioni. Rapporto della Commissione Medica Federale Italiana Baseball e Softball. Istituti Scientifico per lo Sport del Comitato Olimpico Nazionale Italiano (CONI), Roma. 1998
- [3] Pingitore A, Pace G, Lima P et al. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* 2015;31:916–922
- [4] Vassalle C, Pingitore A, De Giuseppe R, et al. Biomarkers to estimate bioefficacy of dietary/supplemental antioxidants in sports. In: Lamprecht M, editor. *Antioxidants in sport nutrition*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group; 2015:255–72.
- [5] Selye, H *The Stress of Life*. McGraw-Hill, New York 1956.
- [6] Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S,. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc. Immunol.* 2001;7:90–107.
- [7] Radak Z, Chung HY, Koltai E et al. Oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews* 2008;7(1)34-42
- [8] Franco AA, Odom RS, Rando TA Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:1122–1132
- [9] Falone S, Mirabilio A, Pennelli A, et al. Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. *Physiol Res* 2010;59:953–61.
- [10] Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Phys* 1997;272:1258–63.
- [11] Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:153–9.
- [12] Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 2004;91:622–7.
- [13] Lee IM & Skerrett PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:459–71.
- [14] Corbi G, Conti V, Russomanno et al. Is physical activity able to modify oxidative damage in cardiovascular aging? *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:728547.
- [15] Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis; *Free Radical Biology & Medicine* 2007;43:901–910
- [16] Schröder H, Navarro E, Tramullas A et al. Nutrition Antioxidant Status and Oxidative Stress in Professional Basketball Players: Effects of a Three Compound Antioxidative Supplement. *Sports Med* 2000;21:146-150
- [17] PoppMarin D et al Cytokines and Oxidative Stress Status Following a Handball Game in EliteMale Players. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2011: Article ID 804873
- [18] Mrakic-Sposta S, Gussoni M, Moretti S et al. Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. *PLoS ONE* 2015;10(11):e0141780.
- [19] Urso ML & Clarkson PM; Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation; *Toxicology* 2003;189(1–2):41-54

- [20] Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A et al. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radical Biology and Medicine* 2015;86:37-46
- [21] Margaritis I, O'Donovan I Oxidative status and the paradox of sport shortening and prolonging life. *Proceedings of The International Conference on Ageing*. Paris. 2004;19:39
- [22] Nanni G, Dolci A, Roi GS, et al. Utilità del monitoraggio biochimico dello stress ossidativo e dell'attività antiossidante durante la stagione cal-cistica. *Atti del 18 Congresso Nazionale L.A.M.I.CA*. 18-20 giugno 1998. Campione d'Italia. 1998:66.
- [23] Razzano M, Brambilla P, Picozzi I, et al. Valutazione di alcuni parametri metabolici ed ossidativi in atleti nel corso di una stagione agonistica. *Biochimica Clinica*. 2001;25(2):139
- [24] Dolci A, Muller MM Oxidative stress induced by physical exercise: the biochemical monitoring. *Proceedings of the Meeting "Medical Laboratory of Physical Exercise and Sports"*. 6-7 dicembre 2001. Padova. 2001:18.
- [25] Dolci A, Nanni G, Roi GS, et al. Oxygen free radicals and total antioxidant status in a professional players team during a football season. 1998 Poster congressuale
- [26] Andersson H, Karlsen A, Blomhoff R, et al. Plasma antioxidant responses and oxidative stress following a soccer game in elite female players. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20(4):600-8
- [27] Banfi G, Malavazos A, Iorio E, et al. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol*. 2006;96(5):483-6.
- [28] Schippinger G, Wonisch W, Abuja PM, Fankhauser F, Winklhofer-Roob BM, Halwachs G. Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(9):686-92.
- [29] Martarelli D, Cocchioni M, Scuri S, Pompei P. Diaphragmatic breathing reduces exercise-induced oxidative stress. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;17:623-628.
- [30] Corsetti R, Villa M, Pasturenzi M et al. Redox state in professional cyclist following competitive sports activity. *Open Sports Med J* 2012; 6:34-41.
- [31] Martarelli D, Pompei P. Oxidative stress and anti-oxidant changes during a 24-hours mountain bike endurance exercise in master athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009;49(1):122-7.
- [32] Mrakic-Sposta S, Gussoni M, Moretti S, Pratali L, Giardini G, Tacchini P, Dellanoce C, Tonacci A, Mas-torci F, Borghini A, Montorsi M, Vezzoli A. Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. *PLoS One*. 2015;10(11)
- [33] Vezzoli A, Dellanoce C, Mrakic-Sposta S, Montorsi M, Moretti S, Tonini A, Pratali L, Accinni R. Oxidative Stress Assessment in Response to Ultraendurance Exercise: Thiols Redox Status and ROS Production according to Duration of a Competitive Race. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:Article ID 6439037
- [34] Iorio EL, Carratelli M, Quagliuolo L, Caletti G. Oxidative stress evaluation in athletes. *Proceedings of the 2nd International Conference on Oxidative Stress and Aging*. 2-5 April 2001. Maui, Hawaii, USA. 2001. P60.
- [35] Vinciguerra G, Belcaro G, Bonanni E, Cesarone MR, Rotondi V, Ledda A, Hosoi M, Dugall M, Cacchio M, Cornelli U. Evaluation of the effects of supplementation with Pycnogenol® on fitness in normal subjects with the Army Physical Fitness Test and in performances of athletes in the 100-minute triathlon. *J Sports Med Phys Fitness*. 2013;53(6):644-54

6.9

UN ESEMPIO DI APPLICAZIONE INNOVATIVA: VALUTAZIONE DELLO STRESS SISTEMICO IN UNA PATOLOGIA LOCALIZZATA

Uno degli aspetti più significativi delle alterazioni dell'equilibrio redox è la possibilità che patologie, anche molto localizzate, quali le ulcere cutanee, abbiano un riflesso sull'equilibrio redox globale, o comunque fanno parte di quadri clinici che coinvolgono l'intero organismo e che di conseguenza, visti i possibili effetti dello stesso sui vari processi metabolici, sia opportuno un monitoraggio globale dello stress ossidativo in molti più casi di quanti si sospettino. Nel lavoro da noi prodotto [1] e sotto descritto si dimostra tra le altre cose la presenza di stress ossidativo sistemico in concomitanza di una patologia molto localizzata quale l'ulcera cutanea.

La pelle è l'organo più grande del corpo e funge da importante interfaccia ambientale oltre a fornire un involucro protettivo cruciale per vari meccanismi di omeostasi. Purtroppo la pelle è un obiettivo privilegiato di una ampia gamma di agenti fisici (raggi UVA e UVB) e chimici (xenobiotici) che sono in grado di alterare la sua struttura e funzione. Molti inquinanti ambientali sono essi stessi ossidanti o catalizzano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), direttamente o indirettamente. Si ritiene che i ROS possano alterare o comunque influenzare i meccanismi di apoptosi coinvolti nella patogenesi di varie malattie della pelle, tra le quali le ulcere croniche [2][3]. Le ulcere sono comuni e causano notevole morbilità nella popolazione. Le ulcere sono definite come ferite con un "full-thickness depth" e una "slow healing tendency" e hanno una prevalenza nella popolazione del 0,1-1,8 % con picchi del 3-5% negli over 65 ed un incremento fino al 12% negli over 70 [2][7]. In condizioni normali il processo di guarigione di una ferita è ben descritto a livello istologico da tre distinte fasi parzialmente sovrapposte: infiammazione, formazione di nuovo tessuto e rimodellamento del tessuto. Esiste però un considerevole numero di casi in cui la guarigione della ferita è compromessa, specialmente in pazienti anziani, soggetti diabetici o trattati con antinfiammatori o in soggetti sottoposti a chemioterapia o radioterapia. Il risultato di queste non-guarigioni sono ulcere croniche generalmente dolorose e difficili da trattare. Il processo di guarigione è regolato da vari fattori di crescita, chitosine e ormoni, ma sembra sempre più provata l'importanza di basse concentrazioni di ROS col ruolo di mediatori di segnale intracellulare [4]. I principali processi di guarigione regolamentati o almeno modulati dai ROS sono l'adesione, la proliferazione, la neo-vascularizzazione e l'apoptosi. [2]

Durante il processo di guarigione delle ferite sono due le principali fonti di ROS, l'esplosione respiratoria e i radicali generati dalla reazione di Fenton. Per esplosione respiratoria si intende l'elevata produzione di NADPH-ossidasi all'interno della membrana cellulare di cellule infiammate con conseguente riduzione dell' O_2 sulla membrana a $O_2^{\bullet -}$ e poi a H_2O_2 . Tale molecola in presenza di ioni ferrosi o rameosi può dare luogo alla reazione di Fenton e quindi portare alla presenza di radicale idrossile. Il fenomeno dell'esplosione respiratoria è legato alla massiccia presenza di neutrofili e macrofagi nella fase infiammatoria [2][4]. La reazione di Fenton è particolarmente avvantaggiata durante il risanamento di una ferita dal fatto che la radiazione UV causa il rilascio di ferritina dai fibroblasti la quale per effetto della radiazione UVA rilascia ioni ferrosi liberi [2]. In caso di ulcera venosa un'altra fonte di ferro libero e legato è la presenza di emoglobina più o meno integra all'interno dell'ulcera stessa in seguito alle lesioni del tessuto epiteliale [2]. Sono stati misurati i livelli totali di ferro in essudati di ferita cronica utilizzando spettroscopia di assorbimento atomico e hanno rivelato un aumento di quattro volte nel liquido cronico della ferita rispetto al liquido della ferita non cronica [2] con conseguente aumento della probabilità che avvenga la reazione di Fenton a livello locale [5]. È stato provato che alterazioni dei valori di antiossidanti sono presenti in pazienti affetti da ulcere croniche, in particolare è stato misurato un decremento del 15% della glutatione perossidasi e un aumento del 170% delle SOD rilasciate dai neutrofili [2]. Se i meccanismi antiossidanti non compensano adeguatamente l'aumento dei ROS in concomitanza di una ferita subentra un situazione di stress ossidativo con gravi conseguenze per il processo di guarigione [4]. Un forte aumento della concentrazione di 8-isoprostani è stato trovato nell'essudato di ulcere venose croniche in confronto al fluido esudato da ferite umane non ulcerose [4]. Il livello di acido urico è allontina nell'essudato di ulcere croniche è

significativamente superiori a quello delle ferite acute [2][6]. È stato inoltre notato un innalzamento dell'attività di iNOS (nitrosintetasi indotta).[5]

Questi studi non sono del tutto concordi perché alcuni hanno dato esito negativo., inoltre Il potere antiossidante totale dell'essudato delle ulcere non risulta significativamente diverso da quello delle ferite acute.[2] Tutti questi studi sono stati però eseguiti a livello locale, prevalentemente su essudato, ma non sono a noi noti studi sullo stress ossidativo a livello sistemico in pazienti affetti da ulcere. Utilizzando i già descritti d-ROMs test e PAT test si è voluto valutare i valori di questi marker di stress ossidativo sistemico in pazienti ulcerosi.

I criteri di inclusione in questo studio sono stati:

- età maggiore di 18 anni
- presenza ulcere cutanee

I criteri di esclusione sono stati:

- presenza di neoplasie
- presenza di HIV ed epatiti
- trattamenti ormonali in corso

Questi criteri di esclusione sono stati adottati per facilitare la discussione dei risultati eliminando alcune patologie esse stesse concomitanti ad una situazione di stress ossidativo. Su di un campione di 85 soggetti si sono ottenuti i seguenti dati:

	d-ROMS (U.Carr)	PAT (U.Corr)
Media	401	1966
SD	97	491
Min	684	2895
Max	209	798

I valori sono risultati significativamente diversi dagli intervalli di normalità precedentemente esposti con $p < 0,001$ in particolare si è evidenziata una chiara situazione di stress sistemico con un aumento dei ROS e una riduzione del potere antiossidante totale. A supporto dell'ipotesi che questa situazione sia molto probabilmente da imputarsi alla presenza della patologia ulcerosa si può citare il fatto che non si sono rilevate differenze significative tra fumatori e non fumatori o tra pazienti diabetici e non diabetici come ci si sarebbe potuto aspettare dalle informazioni a noi note. Una diminuita capacità antiossidante è stata osservata nei pazienti di sesso femminile, così come nei pazienti con ulcere venose croniche associate a diabete mellito. Ma in merito a questo fenomeno sarebbero opportuni degli approfondimenti. Si è comunque dimostrato quanto detto esposto all'inizio della sezione ossia l'importanza di una valutazione globale dell'equilibrio redox indipendentemente dalla localizzazione della patologia.

[1] Edoardo Raposio MD, PhD, FICSab Francesco Simonacci MDab Davide Gorni MScab Michele P. Grieco MD; Plasma Oxidative Stress in Patients With Chronic Vascular Cutaneous Ulcers; Journal of the American College of Clinical Wound Specialists in press

[2] Meinhard Wlaschek, PhD; Karin Scharffetter-Kochanek, MD; Oxidative stress in chronic venous leg ulcers; wound rep reg 2005;13:452-461

[3] David R. Bickers¹ and Mohammad Athar Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease; Journal of Investigative Dermatology (2006) 126, 2565-2575

[4] Matthias Schäfer, Sabine Werner; Oxidative stress in normal and impaired wound repair; Pharmacological Research 58 (2008) 165-171

[5] Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing ; Amit Soneja, Magdalena Drews, Tadeusz Malinski; Pharmacological report 2005:57:108-109

[6] Tim J. James, Margaret A. Hughes PhD, George W. Cherry DPhil, Richard P. Taylor; Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers; WOUND REP REG 2003;11:172-176

[7] Graham, Ian D. PhD; Harrison, Margaret B. PhD, RN; Nelson, E. Andrea PhD, BSc (Hon), RN; Lorimer, Karen MScN, RN; Fisher, Andrea MSN, MSc, RN; Prevalence of Lower-Limb Ulceration: A Systematic Review of Prevalence Studies; Advances in Skin & Wound Care: November 2003 - Volume 16 - Issue 6 - pp 305-316

LISTA DEGLI ACRONIMI e SIMBOLI CHIMICI

Acronimi

8-OHdG	8-ossi-7,8-diidro-2-deossiguanosina
ADP	adenosina difosfato
AGE	advanced glycation products
AOPP	advanced oxidation protein product
ATP	adenosina trifosfato
BH4	5,6,7,8-tetraidrobiopterina
BOP	indice di sanguinamento
CAD	coronary artery diseases
Ch	colesterolo
CRP	proteina creattiva
CUPRAC	CUPric ion Reducing Antioxidant Capability
DCFDA	diclorofluorescina diacetata
DCFH	diclorofluorescina
DEPPD	N,N-dietil-para-fenilendiammina
DHR	diidrorodamina 123
E2	ormoni estrogeni
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELIspot	enzyme-linked immunospot
eNOS	enzima ossido nitrico sintetasi indotto
EPR	eletronic paramagnetic resonance
ESR	eletronic spin resonance
ETC	electron transport chain
EtOH	etanolo
F2-IsoPs	isoprostano della classe 2
FMD	flow-mediated dilatation
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
FSH	ormone follicolo stimolante
G6P	glucosio-6-fosfato
GC	gas cromatografia
GC-MS	gas-chromatography-mass-spectrometry
GHS	glutazione
GPX	glutazione perossidasi
GSH	glutazione
HNE o 4-HNE	4-idrossinonenale
HPLC	high pressure liquid chromatography
iNOS	enzima ossido nitrico sintetasi endoteliale
IP	indice di placca
LC	cromatografia liquida
LDL	lipoproteine a bassa densità
LH	ormone luteizzante
MCO	ossidazione metallocalitica
MDA	malondialdeide
MPO	enzima mieloperossidasi
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetaidropiridina
MS	spetrometria di massa
NADH	nicotinammide adenina dinucleotide
NHE	Normal Hydrogen Electrode
nNOS	enzima ossido nitrico sintetasi neuronale
NOS	enzima ossido nitrico sintetasi
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
OxChs	ossisterolo
Ox-LDL	lipoproteine a bassa densità ossidata ossidate

P4	ormoni progestinici
PMN	polimorfonucleati, rif. a leucociti
PSR	Periodontal Screening and Recordings
PUFA	poly unstureted fatty acids
RBrS	reactive bromine species
RCIS	reactive chlorine species
RLX	relaxina
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RS	specie reattive
RSS	reactive sulfur species
SOD	enzima superossido dismutasi (preceduto dall'indicazione del centro metallico)
TBA	acido tiobarbiturico
TCA	acido tricarbossilico
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
THC	tetraidrocannabinolo
TOSCA	Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay
TRAP,	Total Reactive Antioxidant Potential
VEGF	vascular endothelial growth factor

Simboli chimici

$\text{CO}_3^{\bullet-}$	radical anione carbonato
H_2O_2	perossido d'idrogeno
HO^{\bullet}	radicale idrossile
HOCl	acido ipocloroso
NO^{\bullet}	ossido d'azoto
NO ₂	biossido d'azoto
$\text{O}_2^{\bullet-}$	anione superossdio
ONOO-	ione perossinitrito
ONOOH	aciod perossinitroso
RO^{\bullet}	radicale alcossilico
ROO^{\bullet}	radicale perossilico
ROOH	perossido organico, in genere di natura lipidica
RSOH	acido solfenico
RSO-OH	acidi solfinici
RSOO-OH	acidisolfonici