

STRESS OSSIDATIVO

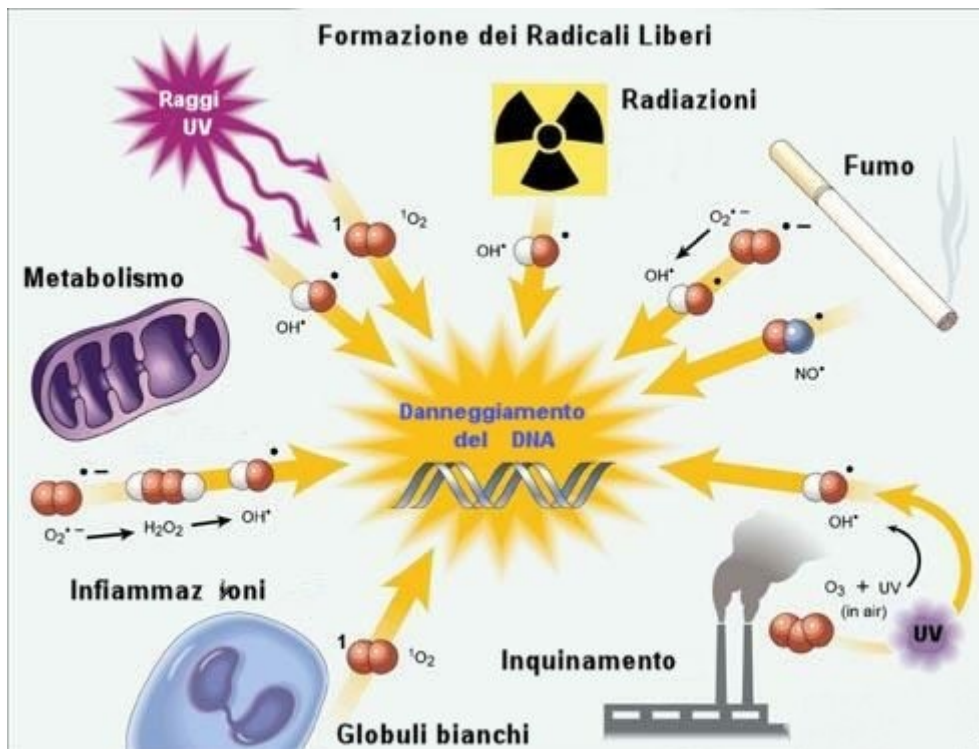
Lo stress ossidativo è indotto da uno squilibrio fra la produzione di specie chimiche altamente reattive, i radicali liberi, e le fisiologiche capacità di difesa, gli antiossidanti.

Questo processo è correlato all'eziopatologia di malattie croniche come cancro, malattie cardiovascolari e diabete e gioca un ruolo fondamentale nel processo di invecchiamento (1,2).

Il danno cellulare inizia a livello della membrana lipidica, per poi condurre ad un'alterata formazione di ATP, fino ad arrivare a modificazioni del DNA (3).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno un ruolo fondamentale nella mediazione del danno tissutale poiché l'ossigeno, oltre ad essere indispensabile alla vita, è anche tossico. Tra i più importanti ROS (4) ricordiamo:

- $\text{HO}\cdot$, radicale idrossile
- $\text{O}_2\cdot^-$, anione superossido
- H_2O_2 , perossido di idrogeno
- $^1\text{O}_2$, ossigeno singoletto.



Il radicale libero prodotto in maggiore quantità è l'anione superossido $O_2^{\cdot-}$. Esso reagisce con il perossido di idrogeno H_2O_2 e forma il pericoloso e potente radicale ossidrilico OH^{\cdot} più potente di $O_2^{\cdot-}$. **Agenti che provocano formazione di radicali liberi sono** : l'infiammazione, il fumo di sigaretta (molto dannoso, il tabacco è una potente tossina, il sole (le radiazioni ultraviolette in genere), lo stress, elevato consumo di alcool, esposizione ad ambienti inquinati, l'attività fisica intensa, una dieta eccessivamente ricca di proteine e di grassi animali, trattamenti a base di farmaci (soprattutto cortisonici che provocano un abuso di glucosio nelle cellule che non riescono più a smaltirlo).

Un eccesso di radicali liberi può rendere incontrollabile una malattia autoimmune. Nell'attività fisica intensa aumentano di circa 50 volte.

L'organismo di una persona sana è attrezzato per fare fronte alla presenza di questi radicali liberi difendendosi con un proprio sistema anti-radicali, che si chiama **sistema antiossidante**.

- Questo sistema antiossidante comprende meccanismi enzimatici e meccanismi non-enzimatici. Tra i primi vi è la superossidodismutasi, la catalasi e il glutatione ridotto. Tra le sostanze non enzimatiche ricordiamo la Vitamina E, la Vitamina C, i carotenoidi, i polifenoli, le antocianine, ecc.

Pertanto, alla formazione di radicali liberi il nostro organismo risponde mediante il suo sistema antiossidante.

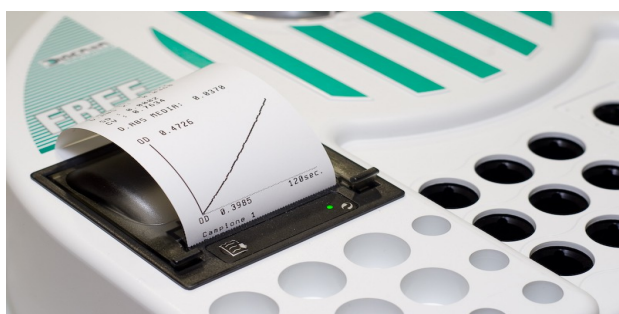
- Se però il quantitativo di radicali liberi prodotto è superiore a quello fisiologico, il nostro sistema antiossidante non è più in grado di neutralizzare questo eccesso, per cui i radicali liberi aggrediscono le cellule, provocando danni più o meno gravi. E ci traviamo in **stress ossidativo**.

D-ROMS

Il **d-ROMs test** effettua l'analisi dello stress ossidativo, quantizzando lo stato di ossidazione ematico in termini di U.CARR (unità Carratelli) dal nome dell'inventore del test. Il valore di 1 U.CARR corrisponde ad una concentrazione di perossido di idrogeno di 0.08 mg%.

I valori del D-Roms test

- Valore di riferimento: 250-300 U.CARR
- Valore di soglia border line : 300-320 U.CARR
- Condizione di lieve stress ossidativo : 320-340 U.CARR
- Condizione di stress ossidativo : 340-400 U.CARR
- Condizione di forte stress ossidativo : 400-500 U.CARR
- Fortissimo stress ossidativo : oltre 500 U.CARR I



La Malondialdeide (MDA)

L'attacco da parte dei radicali liberi ($R\bullet$) ai lipidi poliinsaturi presenti nelle membrane biologiche, determina l'avvio del processo di perossidazione lipidica, un processo di deterioramento O_2 -dipendente che porta alla compromissione dell'integrità delle membrane biologiche (5).

Questo processo è implicato inoltre nella modificazione ossidativa delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e gioca un ruolo fondamentale nell'aterogenesi (6).

Le molecole lipidiche più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi (UFA), in particolare i poliinsaturi (PUFA) presenti nei fosfolipidi e il colesterolo.

La suscettibilità degli acidi grassi poliinsaturi all'attacco radicalico è particolarmente evidente nella distruzione delle membrane biologiche e nella formazione di lipoproteine ossidate, con la produzione di perossidi lipidici e dei loro sottoprodotti come le aldeidi. Tra queste la malonidialdeide (MDA) e i 4-idrossi-2-alchenali come il 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE), rappresentano i maggiori prodotti terminali derivanti dalla rottura degli acidi grassi e dei relativi esteri (7). La stabilità e l'elevata reattività sono caratteristiche che rendono queste molecole dannose verso altri costituenti presenti all'interno e all'esterno della cellula, come gli acidi nucleici e le proteine, causando alterazione della funzionalità cellulare (3).

La Malondialdeide (MDA), con formula chimica $CH_2(CHO)_2$, è il principale prodotto della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi; si può inoltre originare dall'attacco dei radicali liberi al deossiribosio e all'acido sialico (8) e da processi enzimatici coinvolti nella sintesi delle prostaglandine (3).

La MDA si trova nel plasma umano a concentrazioni dell'ordine di $1 \mu M$ e nelle urine in concentrazioni di $0 - 3 \mu M$ ($0 - 0.2 \text{ ppm}$) (9).

Questo composto è un aldeide reattivo, causa di citotossicità nelle cellule e in grado di reagire con la deossadenosina e deossiguanina nel DNA, formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi (10).

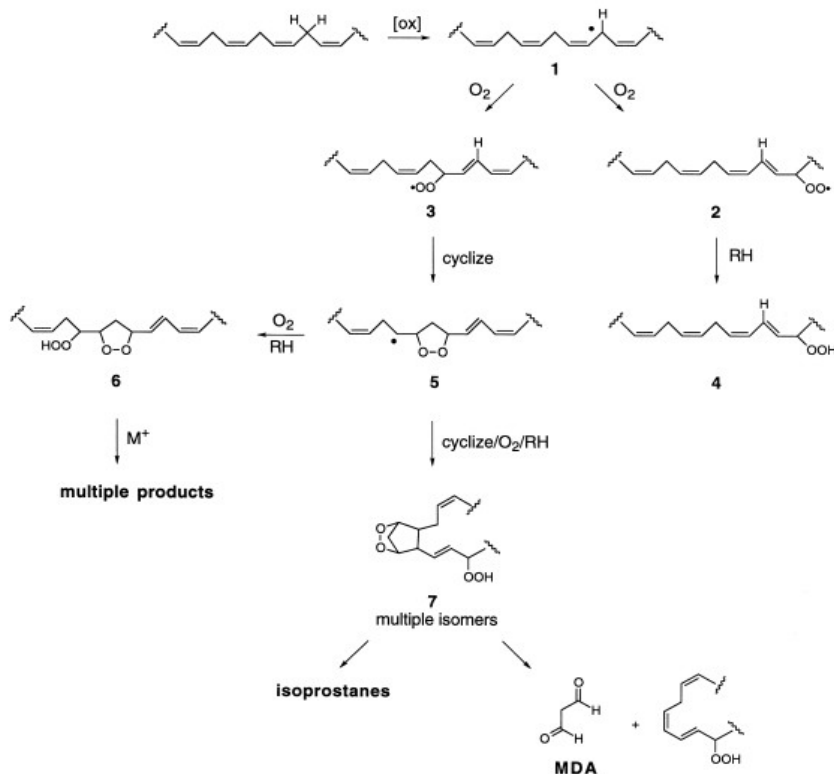


Fig.1: via di perossidazione lipidica

La tossicità della MDA coinvolge anche il sistema cardiovascolare, in particolare modo è implicata nei processi di aterogenesi e nell'irrigidimento del tessuto cardiaco e della parete dei vasi, data la sua interazione con le fibre di collagene (11,12). Per prevenire e monitorare un eventuale eccesso di radicali liberi, è necessario conoscerne il livello presente nel nostro organismo.

Sin dal 1960 sono stati messi a punto numerosi metodi per quantificare lo stress ossidativo in relazione a questa molecola, sia in vitro che in vivo.

Molti dei metodi di stima dello stress ossidativo nei campioni biologici, sfruttano la reattività chimica della MDA con l'acido tiobarbiturico (TBA), coinvolti in una spontanea reazione di addizione nucleofila.

La condensazione di queste due molecole origina un addotto facilmente rilevabile spettrofotometricamente, a una lunghezza d'onda di 532 nm (13).

Nonostante ciò, la specificità del test è bassa perché il TBA può reagire anche con altri composti che, oltre all'MDA, si originano dall'ossidazione di biomolecole. Inoltre è stato osservato che le concentrazioni di MDA o TBARS nel plasma umano, misurate con questo metodo, sono piuttosto variabili (0-50 $\mu\text{mol/L}$), probabilmente a causa dell'ossidazione che i campioni subiscono durante l'analisi (13).

Le sostanze reattive al TBA danno origine ad un composto colorato che può essere misurato per via colorimetrica o fluorimetrica, ma a causa della sua non specificità, per la misura dell'MDA in campioni biologici viene preferibilmente utilizzata la lettura in HPLC mediante rilevatore spettrofotometrico o fluorimetrico (13,14, 15), in quanto tutti i parametri analitici, come la linearità del

metodo, il limite di rilevamento, la specificità, la precisione, la stabilità del campione e le interferenze, permettono di fornire un valore più accurato (16).

È stato sperimentalmente rilevato da uno studio di Kurutas et al nel 2005 (*Mediators of Inflammation* Volume 2005 (2005), Issue 4, Pages 242-244. The Effects of Oxidative Stress in Urinary Tract Infection [Ergul Belge Kurutas](#), [Pinar Ciragil](#), [Mustafa Gul](#), [Metin Kilinc](#)) che elevati livelli di malondialdeide nelle urine possono essere un fattore prognostico rilevante nelle infezioni del tratto urinario, comprendendo uno spettro variabile tra infezioni batteriche asintomatiche e urosepsi. I livelli di malondialdeide sono stati rilevati con tecnica spettrofotometrica in colture di urine positive (36 pazienti) e negative (128), mostrando valori maggiormente elevati nei 36 pazienti con infezioni del tratto urinario.

I batteri rilevati erano: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida spp*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Nei soggetti sani i livelli di malondialdeide corrispondevano a 0.84 ± 0.44 nmol/mg creatinina, mentre nei soggetti con infezione alle vie urinarie 3.99 ± 1.16 nmol/mg creatinina. Si sostiene quindi che le infezioni urinarie possono causare stress ossidativo e anche gli enzimi antiossidanti possono diminuire quantitativamente. Kirschbaum riporta che l'attività enzimatica totale antiossidante è più bassa nei pazienti con patologie renali acute se paragonata a quella dei pazienti controllo (Kirschbaum B. Total urine antioxidant capacity. *Clin Chim Acta*. 2001;305(1-2):167-173).

Foxman e Chi (Foxman B, Chi JW. Health behavior and urinary tract infection in college-aged women. *J Clin Epidemiol*. 1990;43(4):329-337) inoltre hanno rilevato che la vitamina C, dalle importanti proprietà antiossidanti, è in grado di proteggere dalle infezioni del tratto urinario.

Nel nostro poliambulatorio utilizziamo BioxTest Oraxx (Bioxvita Diagnostic), un test colorimetrico pratico e veloce, basato sulla capacità di un trifenilmetano derivato, la pararosnilina, di legare composti aldeidici presenti nelle urine e dare una colorazione variabile tra il rosa e il violetto.

BioxTest Oraxx è un test messo a punto per determinare l'eventuale aumento delle concentrazioni di radicali liberi attraverso l'analisi delle urine. Il saggio colorimetrico è effettuato con l'urina del mattino e sulla base della colorazione risultante può essere stimato facilmente lo stress ossidativo.



BIBLIOGRAFIA

1. Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420:217-21.
2. Sohal RS, Morckett RJ, Orr WC. Mechanism of aging: an appraisal of the oxydative stress hypotesis. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:575-86.
3. 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&Cardovascular Diseases* 2005; 15, 316-328.
4. Halliwell B. [Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation](#). *Biochem Soc Trans.* 1996; 24(4):1023-7
5. Gutteridge JM, Halliwell B. [Iron toxicity and oxygen radicals](#). *Baillieres Clin Haematol.* 1989; 2(2):195-256.
6. Tribble DL. [AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasison vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association.](#) *Circulation.* 1999; 99(4):591-5.
7. Uchida K. [Cellular response to bioactive lipid peroxidation products](#). *Free Radic Res.* 2000;33(6):731-7.
8. 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?](#) *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-55.
9. Glagau H, Hauck RS. "Kit and method for determining redox status in urine" United States Patent ,6.835.554, 1994.
10. [Marnett LJ](#). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Reüs* 1999;424(1-2):83-95.
11. [Palinski W](#), [Ord VA](#), [Plump AS](#), [Breslow JL](#), [Steinberg D](#), [Witztum JL](#). ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb.* 1994 Apr;14(4):605-16.
12. [Slatter DA](#), [Bolton CH](#), [Bailey AJ](#). The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43(5):550-7.
13. [Guichardant M](#) , [L-Talbi Valette](#) , [C Cavadini](#) , [Crozier G](#) , [M Berger](#). Malondialdehyde measurement in urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 655(1):112-6.
14. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 775(1):121-6.
15. Chirico S. [High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid test.](#) *Methods Enzymol.* 1994; 233:314-8.
16. Cighetti G, Debiasi S, Paroni R, Allevi P. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. *Anal Biochem* 1999; 266:222-9.
17. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996;12(4):274-7.

