

La valutazione dello "stato ossidativo" nella pratica clinica

Renata Cordara

Università degli studi di Genova. D.I.M.E.S (Dipartimento di Medicina Sperimentale) sezione di patologia generale

ABSTRACT

Assessment of oxidative status in clinical practice

Evidence has increased suggesting that a condition of oxidative stress, due to imbalance of oxidative/antioxidant systems, can produce alterations in important biological functions as a consequence of free radicals reactivity towards macromolecules and DNA. Free radical oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of a variety of human diseases. Direct measurement of oxidative stress in vivo, especially during antioxidant therapy, is a very complex question, because free radicals are highly reactive, have very short life and are present in very low concentrations. Thus, indirect methods, used for measuring secondary products of oxidative stress, are unspecific and may give conflicting data. Recently a new simple and cheap method to monitor oxidative stress in serum was developed. This test (d-ROMs) detects the derivatives of reactive oxygen metabolites and showed good precision, accuracy, linearity. The "total oxidative status" include in the biochemical profile also measurements of principal and secondary antioxidant defenses.

RIASSUNTO

E' noto che le condizioni di stress ossidativo rappresentano un importante fattore di rischio per molte patologie e per l'invecchiamento. Attualmente sono disponibili numerose terapie atte a rinforzare le principali strategie difensive antiossidanti dell'organismo, tuttavia, la valutazione in vivo dello "stato ossidativo" e soprattutto dei Ros (Radicali liberi dell'Ossigeno), non è scevra di problemi, pertanto, non sempre è agevole monitorare l'efficacia terapeutica dei numerosi presidi farmacologici in commercio. In vivo, la misurazione diretta dei Ros, molecole altamente instabili e reattive, può essere realizzata in due modi, ovvero con l'Electron Spin Resonance (ERS) o con il d-ROMs test, caratterizzati da complessità di applicazione e da costi molto diversi e decisamente più vantaggiosi per il secondo e recente test. Tuttavia, spesso si preferisce ricorrere a misurazioni indirette di peculiari prodotti di ossidazione delle macromolecole. Lo "stato ossidativo" di un individuo viene inoltre definito con accuratezza anche attraverso il "profilo biochimico antiossidante", ovvero, con una valutazione delle principali molecole antiossidanti nonché di peculiari enzimi.

I RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono molecole o frammenti di molecole che contengono un elettrone spaiato nell'orbita esterna. La loro caratteristica è l'estrema reattività, dovuta alla tendenza ad accoppiare l'elettrone spaiato con un altro appartenente ad un'altra molecola, comportandosi sia come accettori (ossidanti) che come donatori (riducenti) di elettroni (1,2). La stabilità dei radicali liberi è in genere di pochi nanosecondi, ma, grazie alla capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato generando strutture risonanti, può essere anche più prolungata (1). I radicali liberi vengono generati dalla scissione osmotica di un legame covalente ottenibile con energia termica o radiante oppure, negli organismi viventi, attraverso articolate reazioni enzimatiche (1). In campo biomedico hanno importante significato i radicali liberi che derivano dalla riduzione incompleta dell'ossigeno, denominati ROS (Reactive Oxygen Species) e rappresentati dal radicale idrossile (OH^{*}), dall'anione superossido (O₂⁻) e dall'ossigeno singoletto (¹O₂) (1,2,3,4). Questi ultimi, pur avendo una configurazione elettronica completa, presentano, analogamente ai radicali liberi, alta reattività per motivi di disposizione di spin o

di struttura molecolare (1,4). Negli organismi viventi la produzione dei ROS è un'inevitabile conseguenza del metabolismo aerobio ed uno dei principali siti di produzione sono i mitocondri, cioè le frazioni cellulari in cui avvengono le reazioni enzimatiche di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa dell'ATP (respirazione mitocondriale) (1,2,3,4). Anche il metabolismo di molte sostanze tossiche produce direttamente o indirettamente radicali liberi responsabili dell'"azione tossica" di tali molecole xenobiotiche (2,4). La pericolosità dei radicali liberi è dovuta alla capacità di dare spesso luogo a reazioni a catena, generando altre molecole che a loro volta innescano nuove reazioni radicaliche, come accade per la lipoperossidazione, durante la quale a causa della modificazione morfofunzionale dei lipidi, si generano numerose molecole, tra le quali alcune aldeidi (Malonaldeide o MDA, 4-Iidrossinonenale o HNE, ecc), capaci di provocare danni localmente ed a distanza (1,2,3,4,5,7,21). Un altro esempio di reazione radicalica a catena è rappresentato dall'ossidazione delle proteine, dovuta alla capacità dei ROS di generare idroperossidi sulle catene polipeptidiche; questi ultimi, in presenza di peculiari ioni metallici di transizione sono in grado di generare altri radicali a loro volta

responsabili di ulteriori reazioni a catena intra ed intermolecolari che generano numerosi sottoprodotti, tra cui aminoacidi ossidati, carbonili e prodotti di frammentazione (1,4,5,6). Anche i carboidrati e gli acidi nucleici sono suscettibili dell'attacco dei radicali liberi, responsabili, anche in questo caso, di profonde alterazioni morfofunzionali delle molecole, considerate stadi patogenetici fondamentali nello sviluppo di numerose malattie cronicodegenerative e, secondo le numerose teorie dell'invecchiamento (2,3,4,5,10).

LE STRATEGIE DI DIFESA ANTIOSSIDANTE E LA VALUTAZIONE DELLO "STATO OSSIDATIVO" DELL'ORGANISMO

Moderate quantità di O₂ si formano nelle cellule normali per fuga di elettroni che, nel passaggio lungo la catena respiratoria, sfuggendo ai trasportatori, reagiscono con l'O₂ riducendolo incompletamente. Questo fenomeno diventa più evidente in condizioni di iperossia e spiega i danni cellulari da aumentata tensione di O₂ per sovrapproduzione dei meccanismi che assicurano una efficace difesa contro i livelli fisiologici delle specie attive dell'O₂ (1,2,4,5,11). Esistono due tipi di difese, ovvero quelle primarie, meglio conosciute come "enzimatiche o ad esse subordinate" e quelle secondarie di natura "non enzimatica" (5,8,9,10,11). Le difese primarie comprendono enzimi che convertono le specie attive in forme meno dannose, come la Superossidodismutasi (SOD), la Glutationeperoxidasi (GPx), le Catalasi, cui si affiancano enzimi che catalizzano reazioni, per lo più di coniugazione e di trasporto, subordinate alle precedenti, come la Glutatione-S-Transferasi (GST), l'UDP Glucuronil-Transferasi, la NADPH-Chinone ossidoreduttasi, la GSSG-Reduttasi, e molti altri ancora (8,9,10). Anche il sistema enzimatico preposto alla riparazione dei danni causati dai radicali liberi al DNA viene considerato una difesa primaria (5,8). Le difese secondarie, ovvero quelle di natura non enzimatica, sono invece, esercitate da una serie di molecole capaci di arrestare reazioni già innescate dai radicali in eccesso (8,10,11). L'esempio più tipico è l'alfa-Tocoferolo (vitamina E), che, combinandosi con i radicali liberi generati entro il tessuto, si converte in un radicale scarsamente reattivo ed incapace di danneggiare le adiacenti molecole delle membrane cellulari. Il radicale tocoferolo ruota successivamente sulla superficie della membrana, dove viene riconvertito nella forma originaria per azione dell'Acido Ascorbico (vitamina C) e del Glutatione ridotto (GSH), due molecole difensive di importante significato (4,10,15,21). Tra le difese secondarie si annoverano anche Retinoidi, come la vitamina A, Carotenoidi come il Licopene, Flavonoidi, Chinoni, Urati, Bilirubina, inoltre, tutte le molecole caratterizzate, come il Glutatione, da gruppi tiolici o ad esse correlate (4,8,10,12,15). Sono considerate difese secondarie di tipo non enzimatico anche alcune proteine come la Transferrina, la Ferritina e la Ceruloplasmina, che sequestrano il ferro e il rame preposti all'attivazione delle reazioni radicaliche (4,8,10). Anche

alla Taurina, un betaaminoacido presente in concentrazioni millimolari in molti tessuti ed attivo a più livelli, vengono attribuite discrete proprietà antiossidanti (10). La patologia da radicali liberi è dovuta ad uno squilibrio tra la produzione di molecole radicaliche ed i meccanismi difensivi contro di esse, sia per un'eccesso di produzione delle prime che per un difetto assoluto o relativo delle difese primarie o secondarie (3,4,10,11,12). Tale condizione, definita "stress ossidativo", non essendo un fattore primitivo di malattia rientra tuttavia fra i meccanismi di danno cellulare alla base di molte patologie (aterosclerosi, diabete mellito, malattie cardiovascolari, artrite reumatoide, Alzheimer, ecc) (3,4,5,10,11,12,13). Le strategie terapeutiche antiossidanti mirano alla riduzione di tutte quelle contingenze endogene (flogosi croniche, stress psicofisico, ecc) o esogene (fumo, alcool, farmaci, ecc.) in grado di indurre stress ossidativo, e, quando questo non è possibile, a rinforzare le difese antiossidanti modificando e integrando la dieta con un pool di molecole antiossidanti di tipo vitaminico e non vitaminico (3,10,11,12,13,22,23). Prima di intervenire è tuttavia opportuno conoscere lo "stato ossidativo" del paziente, rappresentato dal livello sia dei radicali liberi che delle principali difese antiossidanti endogene (12,14). La misurazione diretta dei radicali liberi non è agevole, poiché tali molecole, altamente instabili e reattive, sono presenti in concentrazioni estremamente basse, pertanto, spesso, si preferisce ricorrere indirettamente alla misurazione di peculiari prodotti di ossidazione delle macromolecole, come la Malonaldeide (MDA), il 4-Idrossinonenale (HNE) ed altre aldeidi di minor significato (12,13,15,21). Lo "stato ossidativo" di un soggetto viene tuttavia completato dalla definizione del suo "profilo biochimico antiossidante", mirato a quantificare molte delle principali difese antiossidanti primarie e secondarie (12,14,15,24,25).

LA MISURAZIONE DIRETTA DEI RADICALI LIBERI: ERS E d-ROMs-TEST

In condizioni di stress ossidativo i Radicali Liberi in eccesso causano un significativo danno cellulare non immediatamente visibile ma importante per la genesi di molte patologie cronicodegenerative e soprattutto dell'invecchiamento fisiopatologico (2,3,4,9,11,13). Da ciò deriva l'importanza del contenere il livello di tali molecole entro valori di normalità, sia evitando le situazioni di stress ossidativo, sia potenziando in modo mirato le difese antiossidanti dell'organismo. Tuttavia, per realizzare tutto questo è indispensabile misurare lo "stato ossidativo" e soprattutto il livello dei Radicali liberi del nostro organismo. Fino a pochi anni fa, l'unico modo per misurare i Radicali liberi è stato l'ERS (Electro Spin Resonance), metodo discretamente preciso ed accurato, ma che poco si presta a misurazioni di routine in ambito clinico, in quanto di complessa applicazione e costoso (4,15,16,17,18,20). Il metodo prevede una prima fase in cui con una reazione colorimetrica viene evidenziato il contenuto totale dei radicali cationici del siero opportunamente trattato. Si misura quindi l'assorbanza a 505 nm, e, attraverso calcoli basati

sull'introduzione di peculiari fattori di calcolo e di correzione, si ottiene la valutazione dei Radicali liberi (4,15). Recentemente è stato messo a punto un secondo metodo di valutazione dei Radicali liberi, il d-ROMs test, che a parità di accuratezza e di precisione, offre, rispetto all'ERS, una maggiore semplicità e rapidità di esecuzione nonché costi decisamente molto più contenuti (16, 18, 19, 20, 23). Quest'ultimo test si basa sul concetto che la quantità di idroperossidi organici presenti nel siero è correlabile a quella dei Radicali liberi (16,18,19). Quando il campione di siero è dissolto in un tampone acido gli idroperossidi reagiscono con gli ioni metallici liberati dalle proteine nel mezzo acido e vengono convertiti in alcossi e perossiradicali in grado di ossidare un additivo, l'N,N-diethyl-parafenilen-diamina, nel corrispondente catione radicale (16,17,18,19). Queste reazioni possono essere, come per l'ERS, valutate attraverso la lettura spettrofotometrica a 505 nm di assorbanza ed i valori ottenuti, espressi in seguito ad ulteriori calcoli in Unità Carratelli (U.CARR), risultano, secondo numerosi Autori, praticamente sovrapponibili a quelli dell'ERS (16,18,19,20). I valori normali del d-ROMs test sono compresi tra 250 e 300 U.CARR (Unità Carratelli), dove 1 U.CARR corrisponde a 0,8 mg/l di H₂O₂. I valori al di fuori di questo range sono da considerarsi significativi di un'alterazione nell'equilibrio tra la capacità pro-ossidante ed antiossidante, ed in particolare, valori superiori a 300 U.CARR indicano inequivocabilmente una condizione di stress ossidativo (17,19,23).

LA VALUTAZIONE INDIRETTA DELLO "STATO OSSIDATIVO" ATTRAVERSO ALCUNI INDICI DI LIPOPEROSSIDAZIONE

I radicali liberi interagendo con le macromolecole possono provocare alterazioni morfofunzionali sia direttamente che indirettamente attraverso la produzione di una serie di molecole secondarie sufficientemente solubili e stabili da provocare danni a distanza dal punto di generazione (2,4,5,7,21). L'esempio più tipico è rappresentato dalla Lipoperossidazione lipidica, caratterizzata dalla produzione di una varietà di sottoprodotti, ed in particolare di alcune aldeidi molto stabili e solubili, capaci di reagire, non solo in situ, con i gruppi aminici e sulfidrilici di proteine e fosfolipidi modificandoli profondamente e generando addotti spesso dotati di specifiche fluorescenze (fluorofori) (7,21). Pertanto, un' eccesso di radicali liberi conseguente ad uno stress ossidativo prolungato può essere documentato anche con il dosaggio di tali molecole secondarie ed in particolare di alcune aldeidi lipoperossidative, come l'MDA e l'HNE (4,7,17,21). L'MDA, in quanto reattiva con l'Acido Tiobarbiturico, può essere agevolmente testata nel siero come MDA totale (libera e legata) con il TBA-Test, indagine semplice, relativamente rapida e soprattutto economica (7,15,21). Il dosaggio dell'MDA può tuttavia essere realizzato anche in HPLC, ovvero con il metodo consigliato per una accurata valutazione dell'HNE (7,21). Poiché nella pratica medica sono preferibili test più semplici, rapidi ed economici, spesso ci si limita semplicemente al dosag-

gio serico dell'MDA totale con il TBA-Test, evitando altre articolate e costose indagini (21), che spesso forniscono indicazioni discordanti e dati di ambigua interpretazione (13). E' tuttavia opportuno ricordare che le due molecole aldeidiche suddette sono attualmente oggetto di suggestive indagini di scarso significato nella pratica clinica, basti pensare ai numerosi studi sui sistemi enzimatici ad esse correlati (GST,ADH,ALDH) ed a quelli sui titoli anticorpali antiaddotti MDA-Albumina.

IL "PROFILO BIOCHIMICO ANTIOSSIDANTE"

Le numerose terapie preposte a prevenire o ad arginare i danni causati dallo stress ossidativo si basano sul rinforzo delle principali strategie difensive antiossidanti dell'organismo, la cui valutazione completa la definizione dello "stato ossidativo" del soggetto e consente di monitorarne le modificazioni (12,15,22,23). La maggior parte degli studi sull'argomento sono stati condotti non tanto per valutare l'efficacia terapeutica di molte molecole antiossidanti in uso ma soprattutto per indagare il "profilo biochimico" degli individui più longevi (24,25). Nella pratica clinica, soprattutto per selezionare strategie terapeutiche mirate per ciascun individuo, può essere vantaggioso il dosaggio plasmatico delle vitamine A,E,C, di alcune molecole Carotenoidi (alfa e beta-carotene, licopene totale e all-trans, beta-criptoxantina, zeaxantina, luteina), dei Gruppi Tiolici totali o selettivi (es. Glutazione) ed infine anche dell'Acido urico, tutti valutabili classicamente in HPLC (4,10,15,22,24,25). Tra i numerosi "enzimi di difesa", nella pratica clinica, ha particolare significato la SOD, che può essere dosata sia nel plasma (Metodo L'Abbè e Fisher) che nelle emazie con (Metodo Wintrobourn) (4,10,11,25). Infine, può essere utile completare il quadro dell'attività enzimatica antiossidante con la valutazione della GPx plasmatica (Metodo Flohè e Gunzler) ed eritrocitaria (Metodo Paglia), specie quando si esegue il dosaggio eritrocitario dei livelli di Glutazione, una tra le nuove e promettenti molecole utilizzate in terapia antiossidante (4,22,24,25). Tuttavia, è opportuno ricordare che le strategie difensive antiossidanti sono numerose e ciò non esclude la possibilità di ulteriori dosaggi mirati e funzionali ai meccanismi di azione di specifici protocolli terapeutici (23).

BIBLIOGRAFIA

1. Bindoli A., Cavallini L. I Radicali Liberi. Aspetti biochimici e medici. 1980 Piccin Editore.
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology & Medicine; 2nd Edition 1989. Clarendon Press, Oxford.
3. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. Lancet 1994; 344: 721-724.
4. Yagi K., Kondo M., Niki E., Yoshikawa T. Oxygen Radicals. 1992; Part I,II,III,IV: pag 3-808. Excerpta Medica
5. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Rev. 1994; 52: 253-265.
6. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem.

- J. 1997; 324:1-18.
7. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and related Aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991; 11:81-128.
 8. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur.J. Biochem*. 1993; 215: 213-219.
 9. Artur Y., Herbeth B., Guèmour L., Lecomte E., et al. Age-related variations of enzymatic defenses against free radicals and peroxides. *Free Radicals and Aging*. 1992; Part 3: 359-367
 10. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. 1991; Cap XV- XXII. Academic Press, London.
 11. Betteridge D.J. What is oxidative stress?. *Metabolism*. 2000; 49: 3-8.
 12. Giammarioli S., Filesi C., Sanzini E. Oxidative stress markers: specificity and measurement techniques. *Ann. Ist. Super. Sanità*. 1999; 35:563-576.
 13. Mercuri F., Quagliaro L., Ceriello A. Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2000 Winter; 2:589-600.
 14. Gerardi G., Usberti M., Martini G., Albertini A., et al. 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.
 15. Oxygen radicals in biological systems. *Method in Enzymology*. 1994; vol. 234: part. D(Section I,II,III):3-631. Ed Lester Parker. Academic Press.
 16. Rampoldi C. La misura dei fenomeni ossidoriduttivi. *GIMT* 1998; 4: 227-281.
 17. Digiesi V., Oliviero C., Gianni V., Rossetti M., et al. Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension. *Clin. Ter.* 1997; 148: 515-519.
 18. Alberti A., Bolognini L., Macciantelli D., Carratelli M. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylenediamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* 2000; 26:253-257.
 19. Cesarone M.R., Belcaro G., Carratelli M., Cornelli U., et al. A simple test to monitor oxidative stress. *Int.Angiol.* 1999; 2: 127-130.
 20. 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; 44:37-40.
 21. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990; 15:129-135.
 22. Emerit I., Packer L., Auclair C. Antioxidants in therapy and preventive medicine. 1990. Plenum Press, New York.
 23. Cornelli U, Terranova R., Luca S., Cornelli M, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women. *La medicina biologica*. 2002; 2: 35-39.
 24. Solichova D., Melichar B., Blaha V., Klijna M., et al. Biochemical profile and survival in nonagenarians. *Clinical Biochemistry*. 2001; 34: 563-569.
 25. Mecocci P., Polidori M.C., Troiano L., Cherubini A, et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28: 1243-1248.