

Valutazione dello stress ossidativo

ROS

- I radicali liberi sono atomi o molecole aventi uno o più elettroni spaiati sugli orbitali più esterni.
- Essi tendono raggiungere la propria stabilità “strappando” elettroni a qualsiasi specie chimica con la quale vengono a contatto, ossidandola.

ROS

- **Esistono, quindi, radicali liberi dell'ossigeno, del carbonio, dell'azoto.**
- **I radicali liberi dell'ossigeno sono i più importanti-**
- **ROS (reactive oxygen species).**
- **Ossidano vari substrati organici (carboidrati, lipidi, amminoacidi, proteine, nucleotidi, ecc.).**

ROS E STRESS OSSIDATIVO

- **I ROS rappresentano una minaccia mortale per la vita della cellula che fortunatamente li tiene sotto controllo grazie ad un efficiente sistema di difesa. Tuttavia, in particolari condizioni, quando la produzione di ROS è eccessiva e/o la capacità di smaltire questi ultimi si riduce, la cellula è costretta a subire il danno da radicali liberi.**
- **stress ossidativo come una particolare forma di stress chimico indotto dalla presenza di una quantità eccessiva di specie reattive per un'augmentata produzione delle stesse e/o per una ridotta capacità di smaltimento.**

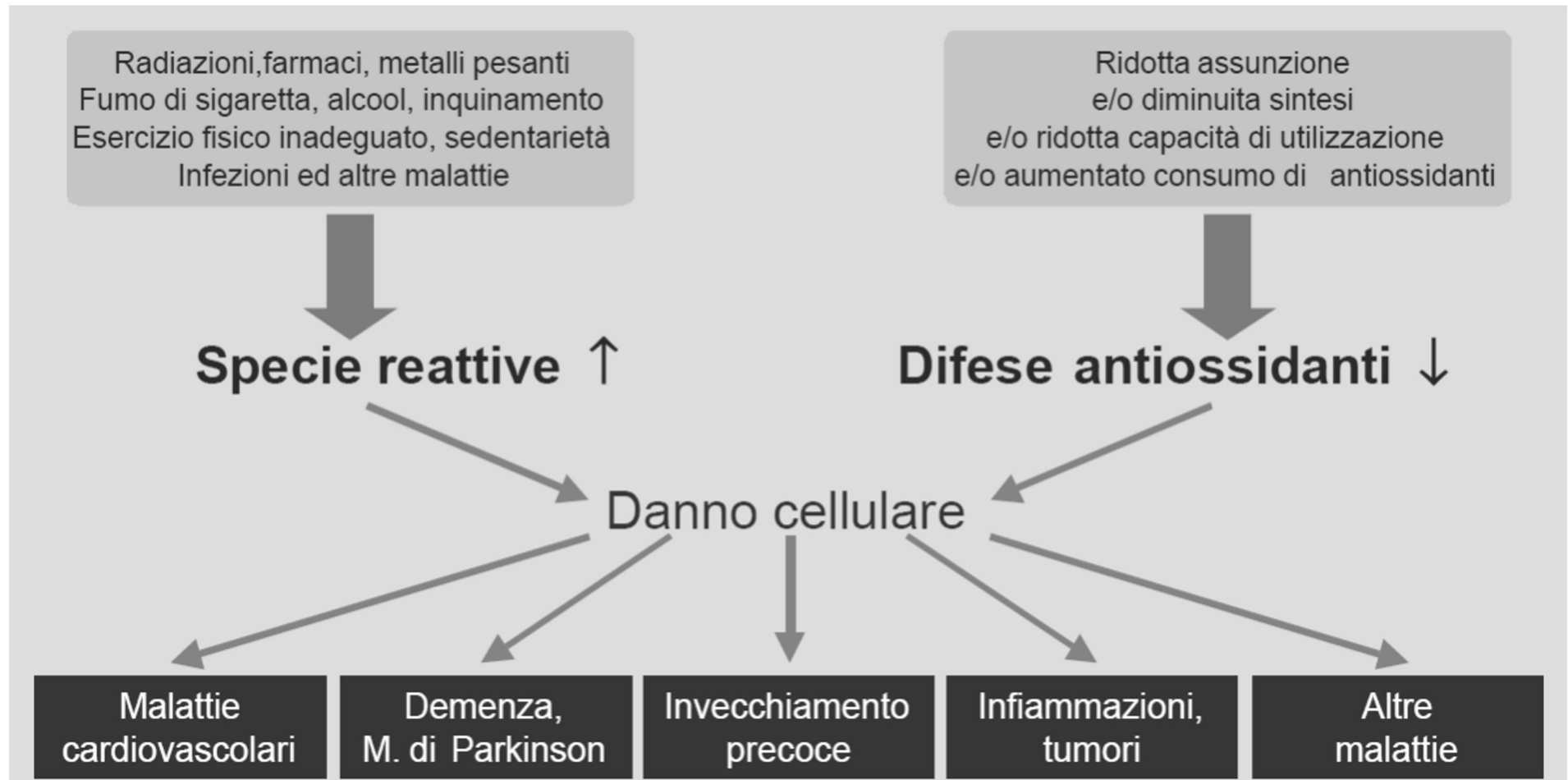
STRESS OSSIDATIVO ED ESERCIZIO FISICO

Le fibre muscolari possiedono un efficiente sistema antiossidante in grado di tenere sotto controllo la produzione eccessiva di ROS durante un esercizio fisico di moderata intensità (50-60%VO₂ max).

Sia gli antiossidanti endogeni che che quelli esogeni giocano un importante ruolo protettivo prevenendo, annullando o contrastando l'azione potenzialmente lesiva delle specie chimiche reattive sull'apparato muscoloscheletrico.

Quando l'esercizio fisico è intenso ed inadeguato, si determina una overproduzione di ROS che può danneggiare qualsiasi componente cellulare.

Eziopatogenesi schematica dello stress ossidativo

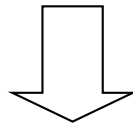


Patogenesi delle lesioni da stress ossidativo dell'apparato muscolo-scheletrico



Patogenesi delle lesioni da stress ossidativo

Il danno ossidativo a carico dell'apparato muscolo-scheletrico si può estendere anche alla matrice extracellulare propagandosi a distanza attraverso il sangue.



Danno ossidativo delle componenti non muscolari dell'apparato locomotore (tendini, legamenti, capsule articolari, menischi).

Valutazione biochimica dello stress ossidativo in Medicina dello Sport

La valutazione dello stress ossidativo nei soggetti che praticano attività sportiva è la condizione indispensabile per prevenire il danno tissutale da ROS e per monitorare l'andamento e la risposta ad un trattamento (specifico e/o antiossidante) a quadro clinico conclamato (lesioni traumatiche, da *overtraining*, infiammazioni)

Valutazione biochimica dello stress ossidativo in Medicina dello Sport

Nella valutazione globale dello stress ossidativo si prevede la contemporanea determinazione dello status pro-ossidante, attraverso il d-ROMs test, e dello status antiossidante, attraverso il I' OXY-Adsorbent test ed il BAP test.

Valutazione della componente pro-ossidante

Le tecniche di laboratorio disponibili per identificare e quantificare i ROS in un campione biologico prevedono procedure costose e molto complesse che richiedono una strumentazione e delle professionalità non disponibili in tutti i laboratori e dunque solo raramente applicabili nella routine clinica.

I radicali liberi sono, per definizione, specie chimiche estremamente reattive e a brevissima emivita. (emivita dei radicali liberi : 1×10^{-6} ; 1×10^{-9} s)

Valutazione della componente pro-ossidante

Per valutare la componente pro-ossidante, si può utilizzare un altro approccio, che NON misura direttamente i ROS ma valuta la presenza delle specie molecolari modificate dall' attacco dei radicali liberi.

In tale contesto, poiché la perossidazione è uno dei più comuni meccanismi del danno indotto dai ROS, il dosaggio degli idroperossidi fornisce un' indicazione molto affidabile dello status pro-ossidante di un individuo.

Valutazione della componente antiossidante

I test per la valutazione della componente antiossidante mirano generalmente a determinare il “potere” o l’“attività” della barriera antiossidante plasmatica nel suo complesso.

Valutazione globale dello stress ossidativo

Aumentata produzione di
metaboliti reattivi
d-ROMs test

Compromissione barriera
antiossidante
OXY-, BAP

Valutazione globale
dello stress ossidativo

Prevenzione e monitoraggio delle
patologie correlate allo stress ossidativo

Valutazione dello status pro-ossidante: il d-ROMs test

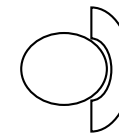
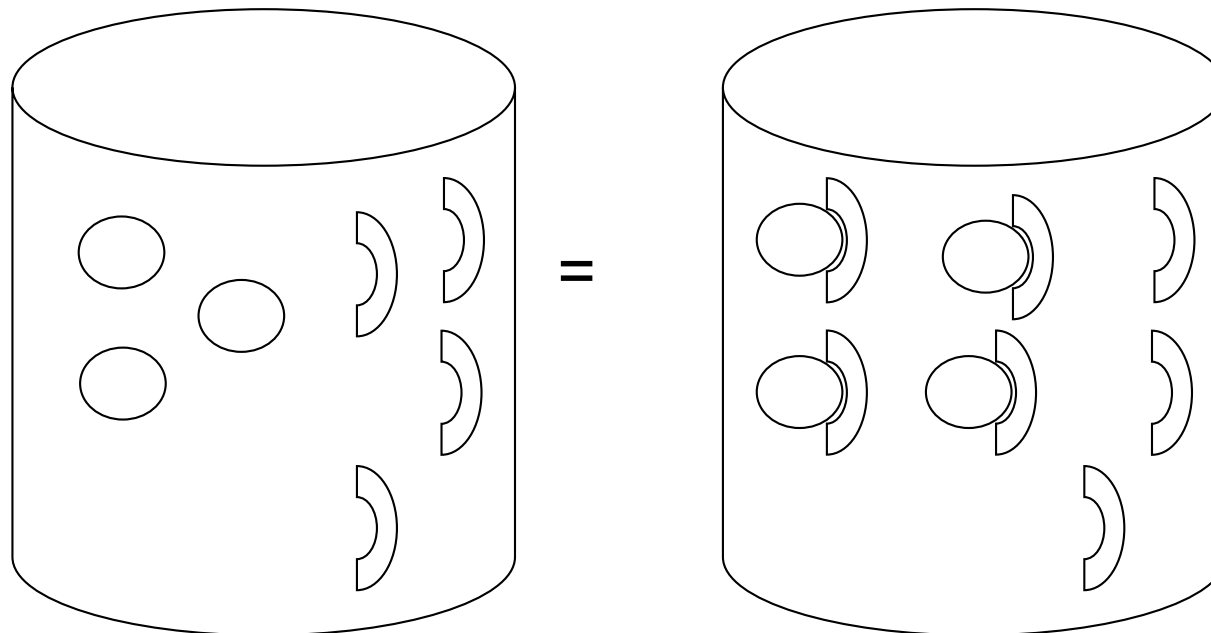
Il d-ROMs test è un test spettrofotometrico che consente di determinare, in un campione biologico, la concentrazione degli idroperossidi, generati nelle cellule dall'attacco ossidativo dei ROS su svariati substrati biochimici.

La sigla ROM indica che gli analiti misurati dal test, gli idroperossidi, sono dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Metabolites, ROM).

d-ROMs test: principio

Attraverso il d-ROMs test, gli idroperossidi presenti in un campione biologico, quale, ad esempio, il siero, dopo aver reagito con un apposito cromogeno incolore sviluppano un derivato colorato (dal rosa al rosso) rilevabile e quantificabile spettrofotometricamente.

○ Idroperossidi) cromogeno

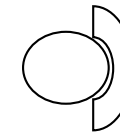
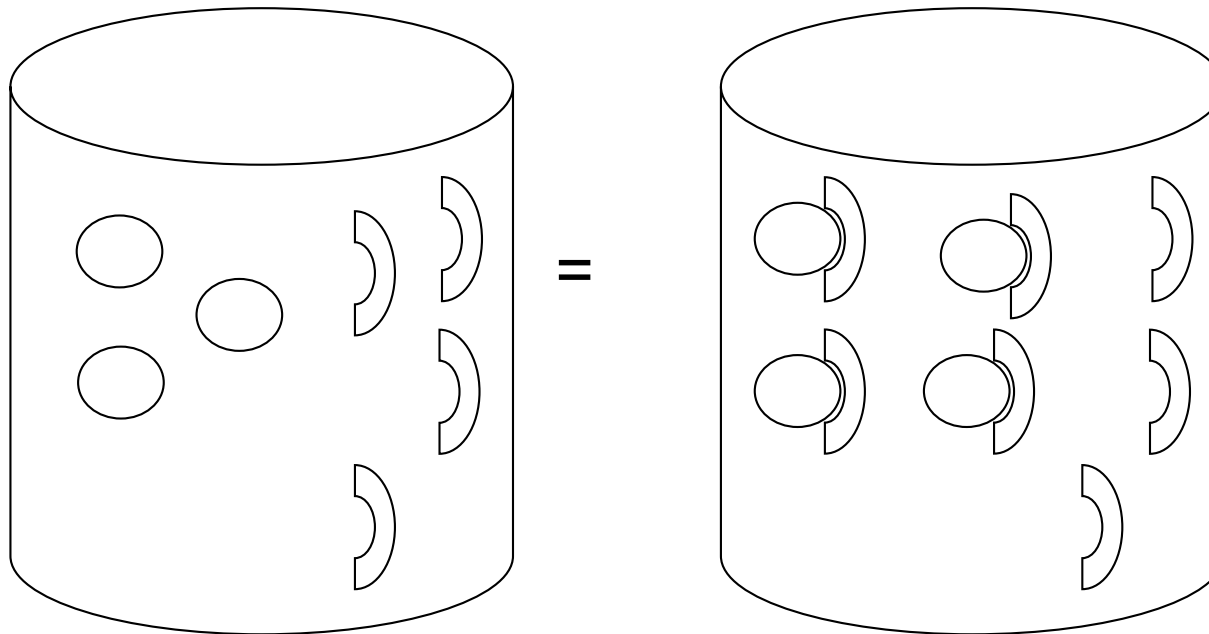


La reazione degli idroperossidi con il cromogeno ossida quest'ultimo generando un colore rosa-rosso misurabile

d-ROMs test: principio

La concentrazione degli idroperossidi, che correla direttamente con l'intensità del colore rilevato, viene espressa in unità di concentrazione di facile impiego nella pratica clinica. Tali unità sono indicate con la sigla U CARR dal cognome del chimico (Carratelli) che ha inventato e brevettato il d-ROMs test.

○ Idroperossidi) cromogeno



La reazione degli idroperossidi con il cromogeno ossida quest'ultimo generando un colore rosa-rosso misurabile¹⁷

Distribuzione dei valori di d-ROMs test in una popolazione sana

Serie	Intervalli (U CARR)	Intervalli (mg H ₂ O ₂ /dL)	Frequenze (n)	Dati cumulativi (%)
-	(U CARR)	(mg H ₂ O ₂ /dL)	(n)	(%)
1	200-210	16.00-16.80	29	0.6
2	211-220	16.88-17.60	89	2.6
3	221-230	17.68-18.40	193	6.8
4	231-240	18.48-19.20	244	12.2
5	241-250	19.28-20.00	342	19.7
6	251-260	20.08-20.80	547	31.8
7	261-270	20.88-21.60	659	46.3
8	271-280	21.68-22.40	731	62.3
9	281-290	22.48-23.20	654	76.7
10	291-300	23.28-24.00	491	87.5
11	300-310	24.08-24.80	256	93.1
12	311-320	24.88-25.60	162	96.7
13	321-330	25.68-25.40	80	98.5
14	331-340	25.48-27.20	57	99.7
15	341-350	27.28-28.00	13	100.0
B	Totale		4547	100.0

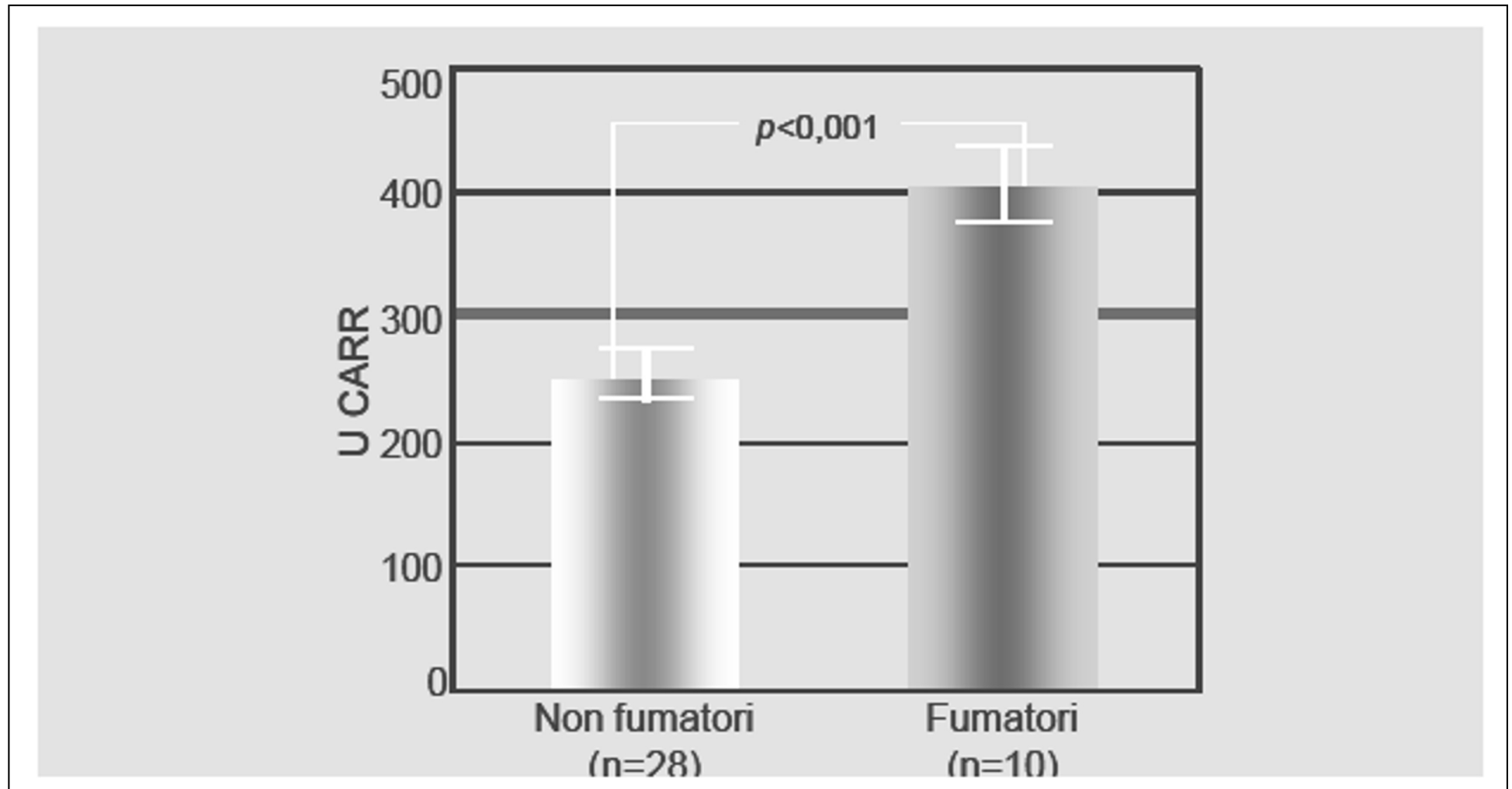
Gravità dello stress ossidativo sulla base dei valori del d-ROMs test

Idroperossidi (U CARR)	Idroperossidi (mg H ₂ O ₂ /dL)	Stress ossidativo (gravità)
300-320	24.08-25.60	Condizione border-line
321-340	25.68-27.20	Stress ossidativo lieve
341-400	27.28-32.00	Stress ossidativo medio
401-500	32.08-40.00	Stress ossidativo elevato
>500	>40.00	Stress ossidativo elevatissimo
Range normale: 250-300 U CARR 1 U CARR corrisponde a 0.08 mg H ₂ O ₂ /dL		

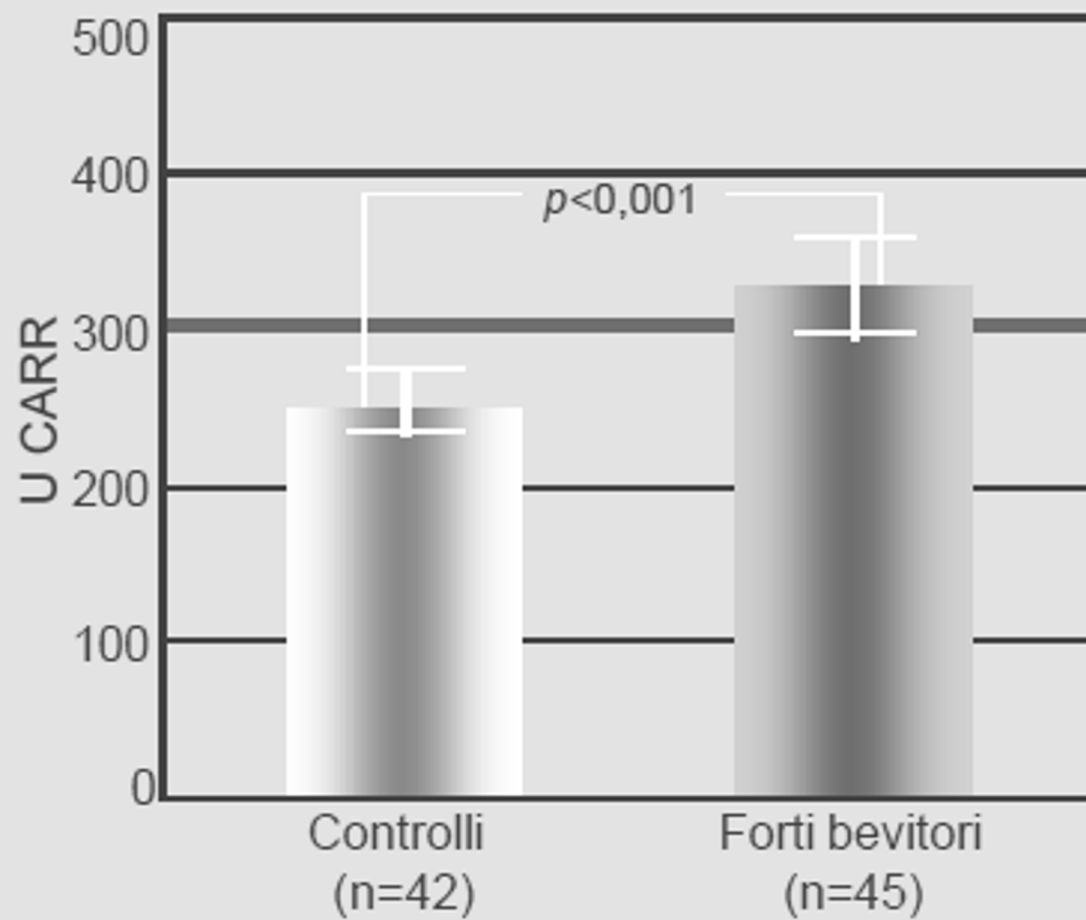
Utilità del d-ROMs test

Il d-ROMs test si è dimostrato validissimo nell'individuazione di soggetti a rischio di stress ossidativo per fattori legati allo stile di vita, quali il fumo di sigaretta, l'assunzione di bevande alcoliche, l'attività fisica inadeguata ed il sovrappeso.

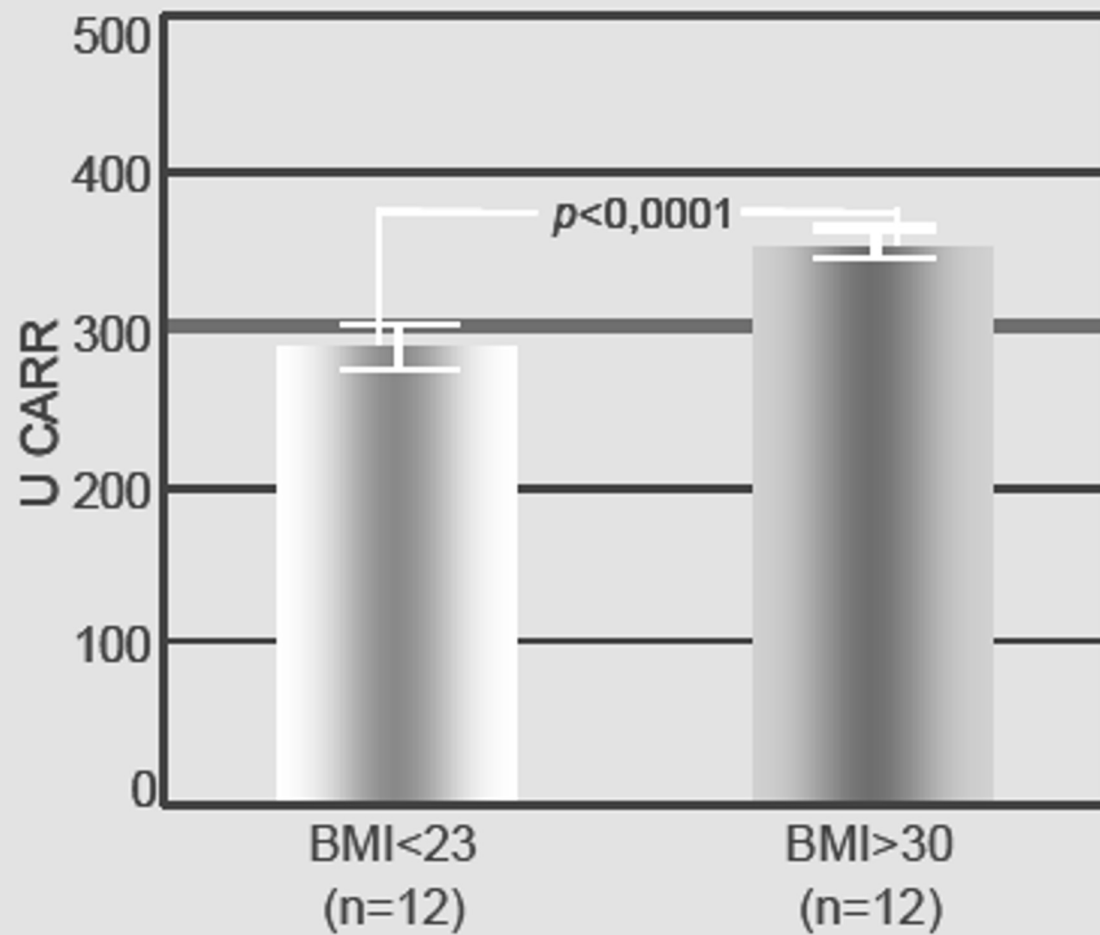
Valori elevati del d-ROMs nei fumatori



Valori elevati del d-ROMs negli alcolisti



Valori elevati del d-ROMs negli obesi

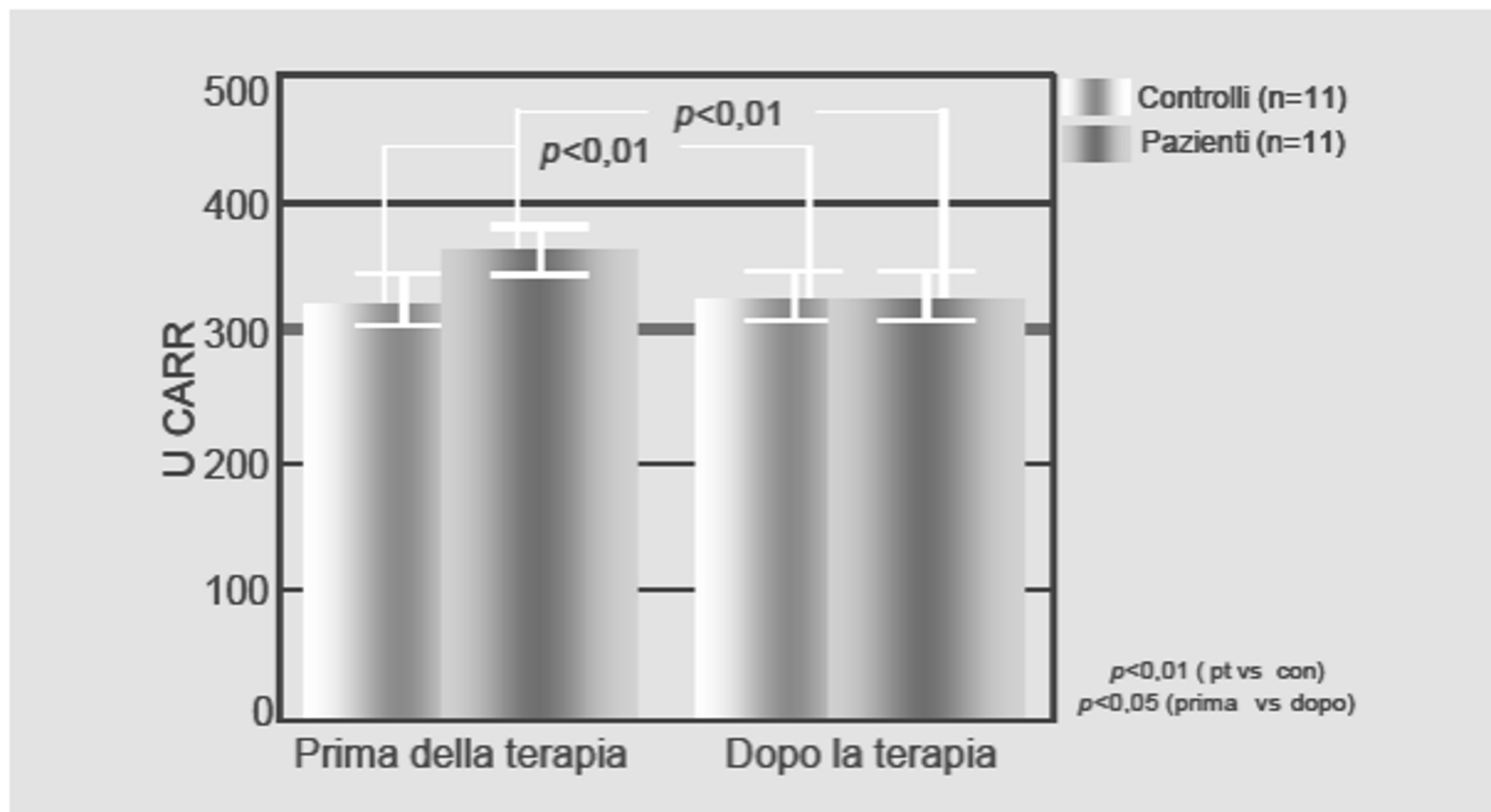


Utilità del d-ROMs test

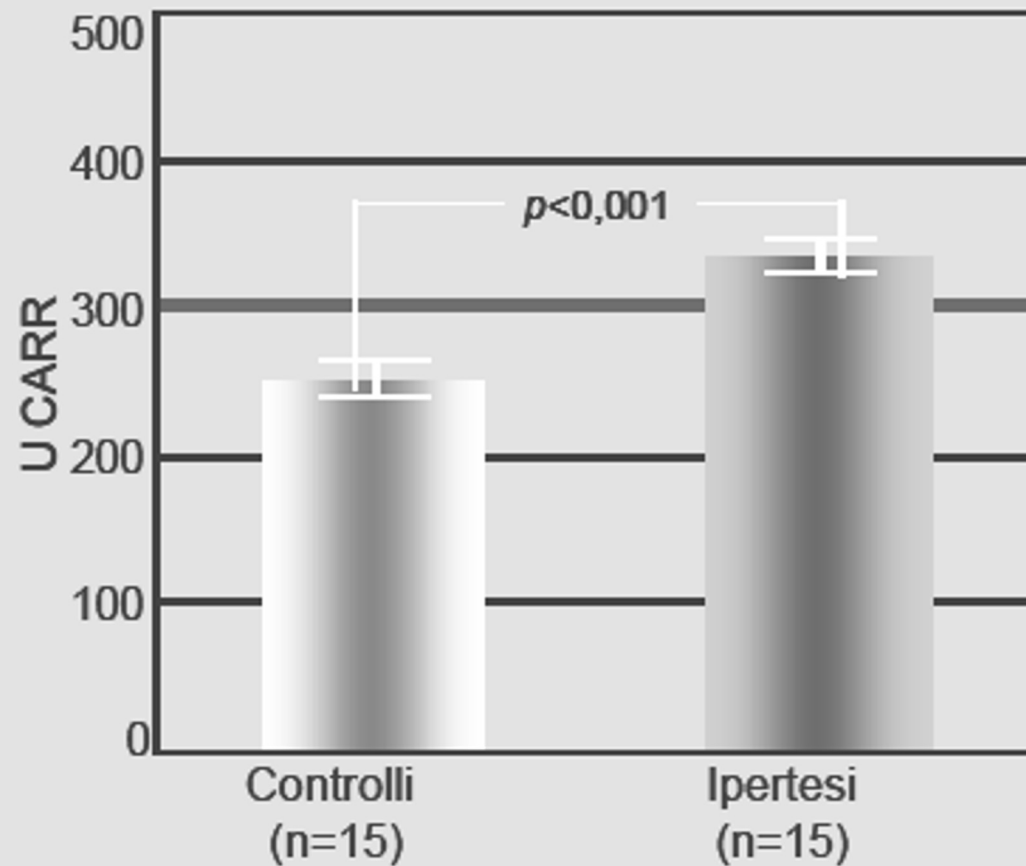
Oltre che nell' identificare soggetti a rischio per stress ossidativo in rapporto allo stile di vita, il d-ROMs test si è dimostrato estremamente utile anche nell' individuare e quantificare squilibri associati a situazioni patologiche.

Terapie antiossidanti messe in atto per contrastare alcune condizioni morbose associate allo stress ossidativo possono essere monitorate attraverso il d-ROMs test

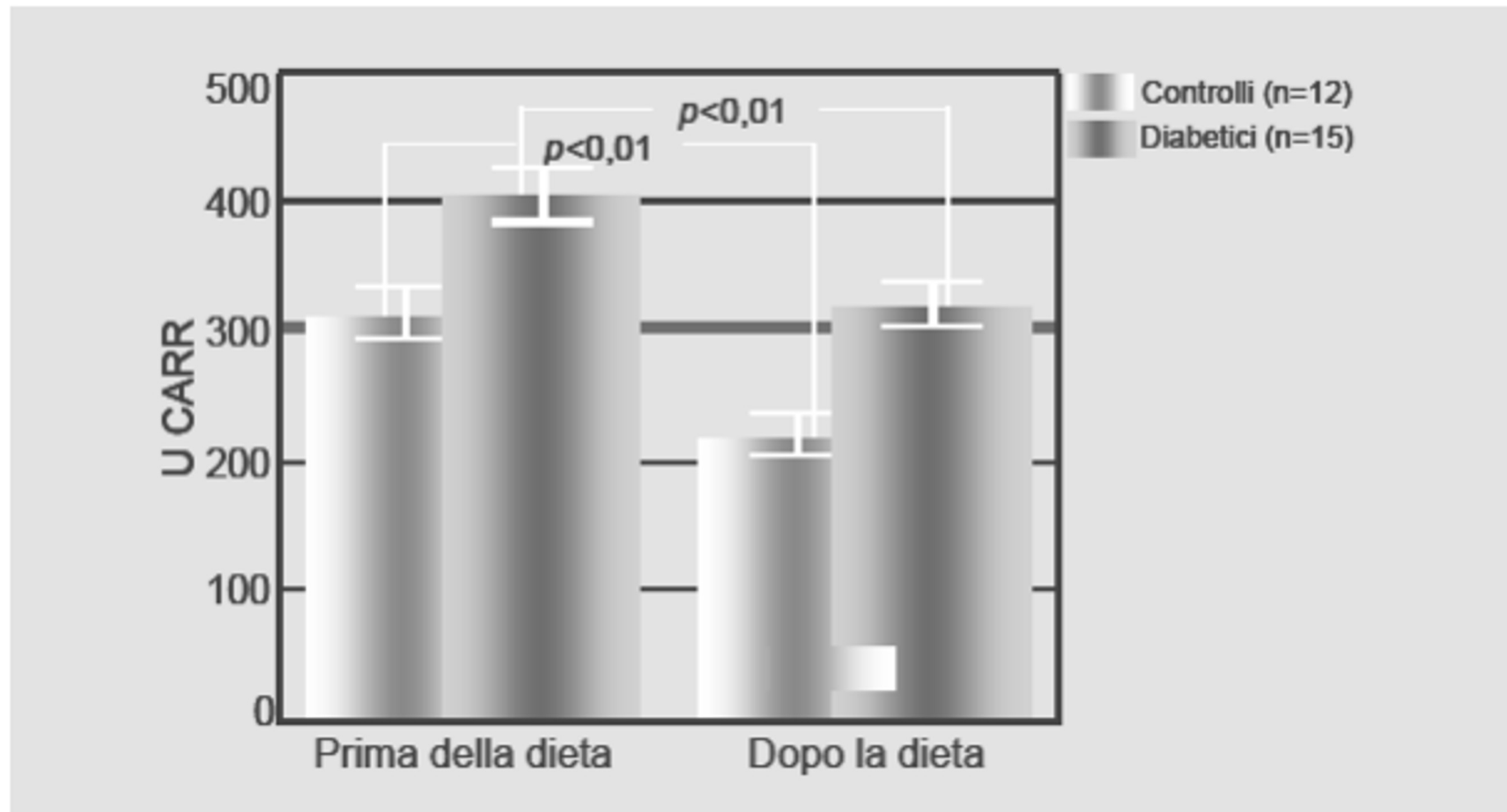
La terapia antiossidante riduce in modo significativo i livelli di stress ossidativo nella malattia di Alzheimer



L'ipertensione arteriosa non trattata si associa a valori elevati del d-ROMs test



Regolare regime dietetico riduce i livelli di stress ossidativo in pazienti con diabete di tipo II



Tabella

Candidati e finalità del d-ROMs test

Candidati	Esempi	Finalità
Soggetti normali, clinicamente asintomatici, senza alcun fattore di rischio per SO		Identificare e prevenire lo SO e le sue conseguenze (invecchiamento, malattie)
Soggetti normali, clinicamente asintomatici, con uno o più fattori di rischio per SO	Soggetti esposti a fonti di radiazioni e/o ad inquinanti atmosferici, soggetti in sovrappeso o obesi, alcolisti, fumatori, individui che svolgono attività fisica incongrua, soggetti che seguono un regime alimentare squilibrato, ecc.	Identificare e prevenire lo SO e le sue conseguenze

Tabella

Candidati e finalità del d-ROMs test

Candidati	Esempi	Finalità
Soggetti affetti da patologie correlate con lo SO	Pazienti con: m. di Alzheimer, m. di Parkinson, ictus, infarto, ipertensione arteriosa, vasculopatie periferiche, broncopneumopatie croniche ostruttive, celiachia, m. di Crohn, pancreatite, epatite, AIDS, artrite reumatoide, insufficienza renale cronica, sindromi mielodisplatiche, diabete, dislipidemie, sindrome di Down, alcune neoplasie, ecc.	Monitorare lo SO e prevenirne le sue conseguenze. Monitorare l'efficacia della terapia specifica sulla patologia in atto. Monitorare l'efficacia della terapia specifica e dell'eventuale trattamento antiossidante integrativo sullo SO associato alla patologia in atto.
Soggetti sottoposti a particolari trattamenti a rischio per SO	Pazienti sottoposti a terapie farmacologiche (antiblastici, estroprogestinici, ecc.), a emodialisi, a trapianto di organi, a interventi di rivascolarizzazione, ecc.	Identificare e prevenire lo SO e le sue conseguenze. Monitorare l'efficacia di eventuali misure messe in atto per prevenire il danno tissutale da SO.
SO: stress ossidativo		

Conclusioni sul d-ROMS test (1)

- **Il d-ROMs è l'unico test attualmente disponibile per la valutazione complessiva della componente pro-ossidante dello stress ossidativo**
- **Il d-ROMs è un test estremamente preciso e affidabile**
- **Il d-ROMs test richiede una strumentazione relativamente semplice comunemente disponibile presso qualsiasi laboratorio di analisi**
- **Il d-ROMs test richiede una minima manualità, con notevole riduzione delle possibilità di errore**

Conclusioni sul d-ROMS test (2)

Il d-ROMs test non è influenzato in maniera significativa dalla presenza di altre sostanze normalmente presenti nel sangue.

Il d-ROMs è un test che si presta in maniera eccellente per l'impiego nella prevenzione e nel monitoraggio delle condizioni correlate allo stress ossidativo, anche in rapporto ad eventuali interventi terapeutici.

Test di laboratorio per la valutazione dello status antiossidante

I più comuni test di laboratorio abitualmente impiegati per la valutazione dello status antiossidante sono:

- l' OXY Adsorbent test,**
- il BAP test**

L' OXY-Adsorbent test

Numerose sostanze presenti nel plasma sono in grado di “tamponare” la potenziale capacità ossidante dei ROS; tali sostanze “ *tamponanti* ” contribuiscono alla costituzione della cosiddetta barriera antiossidante plasmatica.

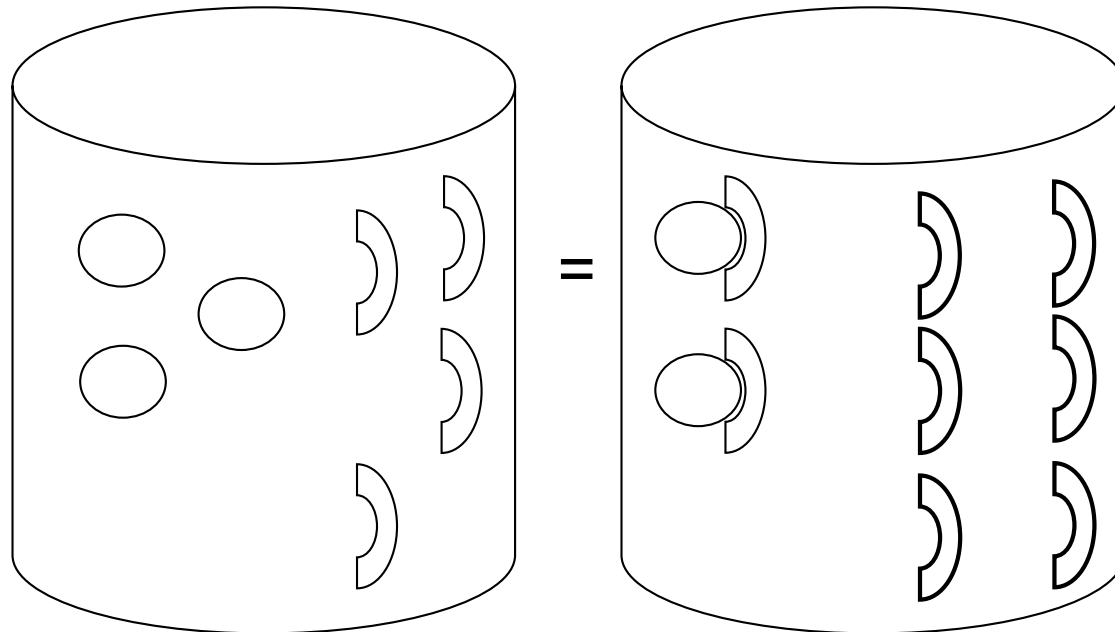
L' OXY-Adsorbent test valuta la capacità del plasma di opporsi all' ossidazione massiva da parte di un composto, una soluzione di acido ipocloroso (HClO) sostanza altamente ossidante.

Principio del test

Un campione di plasma viene sottoposto, per un determinato intervallo di tempo (10 minuti), all'azione ossidante massiva di una soluzione di **acido ipocloroso** a concentrazione nota.

○ Sostanze antiossidanti

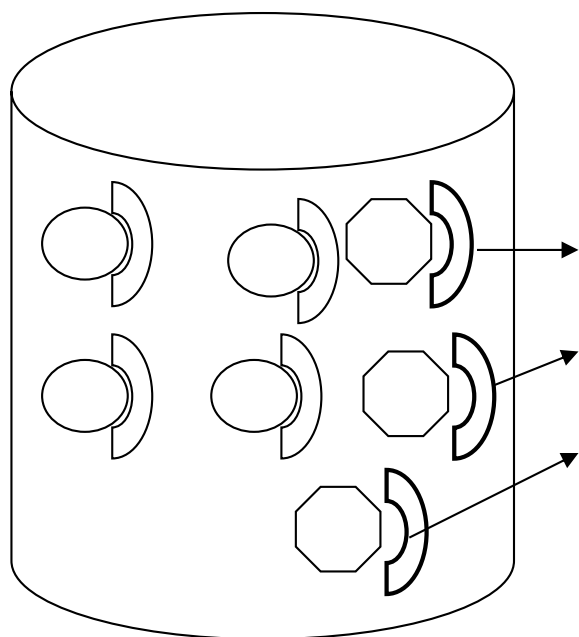
) Acido ipocloroso (HClO)



Principio del test (2)

Al termine dell'intervallo previsto, resterà nel nostro campione l'acido ipocloroso in eccesso (che non ha reagito).

Se, a questo punto, si aggiunge al sistema un cromogeno in grado di reagire (ossidandosi) con l'acido ipocloroso presente in soluzione, questo cromogeno ossidato diventa colorato e potrà essere dosato spettrofotometricamente.



Cromogeno che ossidato diventa colorato: l'intensità del colore viene dosata

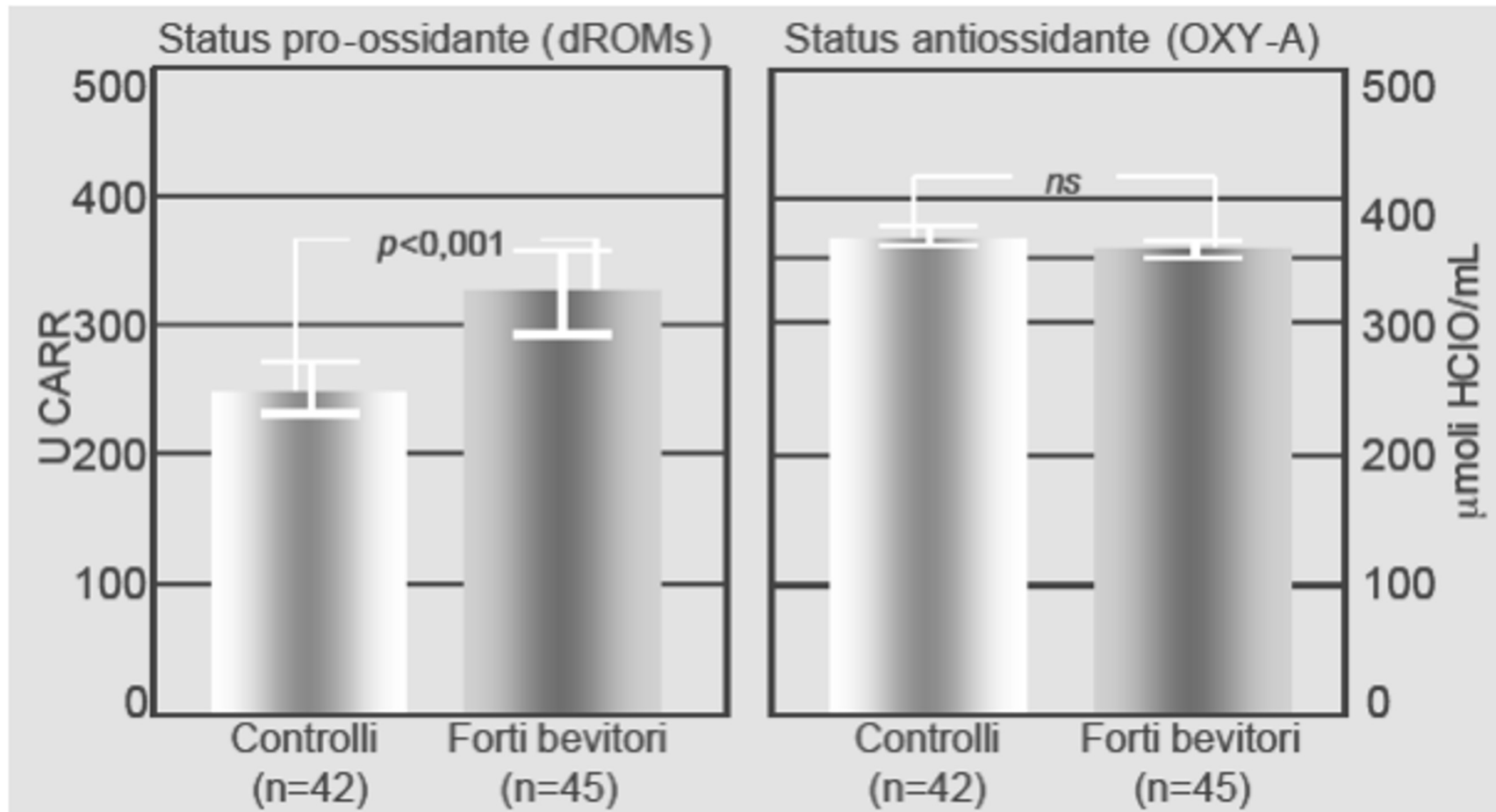
Principio del test (3)

La concentrazione del complesso colorato sarà inversamente proporzionale alla capacità antiossidante presente nel campione.

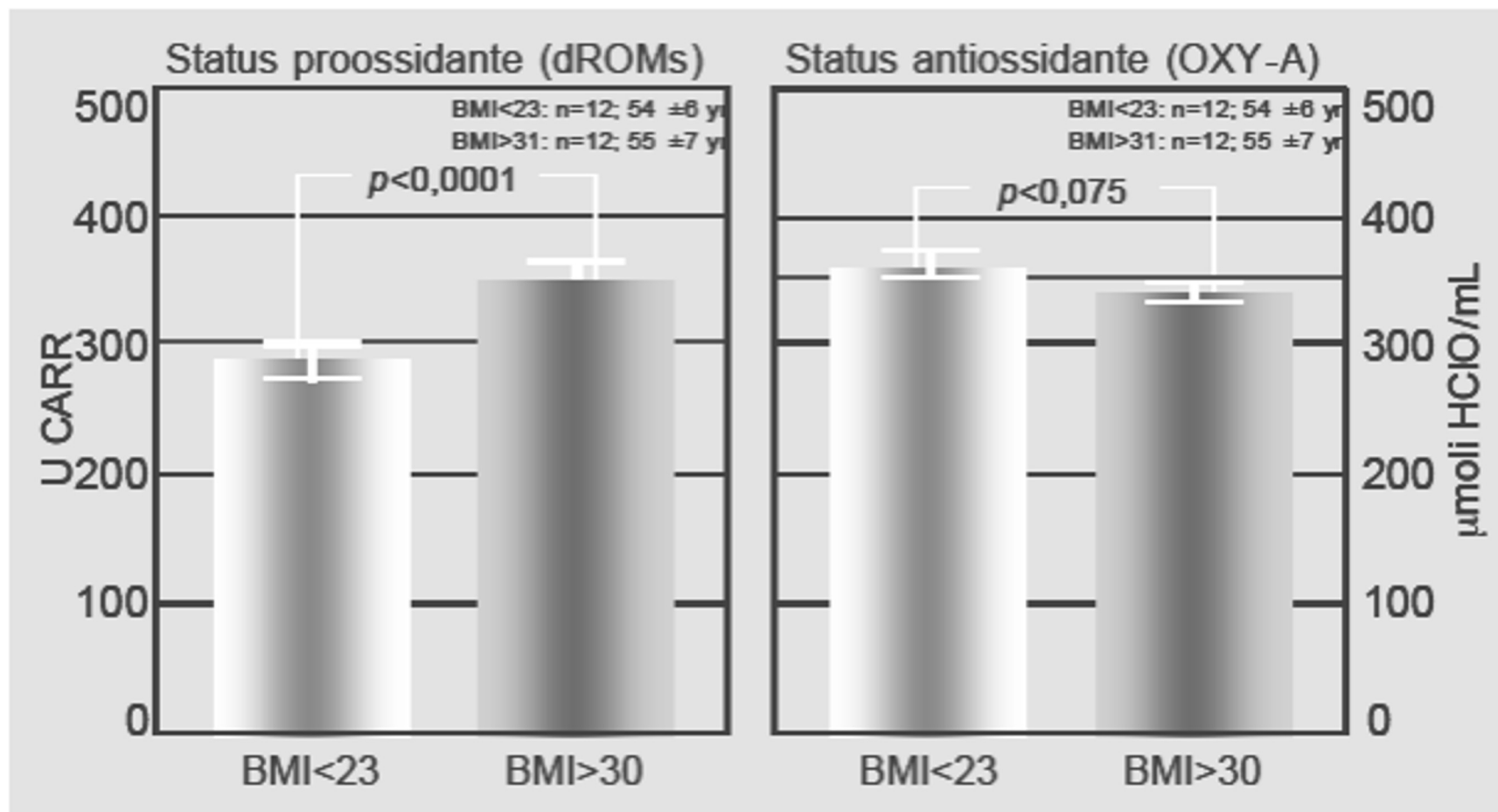
Tabella 5. 2 Gravità dello stress ossidativo in rapporto ai valori forniti dall'OXY-Adsorbent test

$\mu\text{moli HClO/mL}$ di campione	Grado di compromissione della barriera antiossidante
350-320	Riduzione lieve
319-280	Riduzione media
279-250	Riduzione elevata
<250	Riduzione elevatissima
Range normale: >350 $\mu\text{moli HClO/mL}$ di campione	

Status pro- ed anti-ossidante negli alcolisti



Status pro- ed anti-ossidante negli obesi



BAP TEST

Nel BAP (Biological Antioxidant Potential) l'agente ossidante — è il cloruro ferrico (FeCl_3)

In questo test viene valutata la capacità del campione in esame di *ridurre* il ferro di una soluzione di cloruro ferrico da ione ferrico (Fe^{3+}) a ione ferroso (Fe^{2+}).

d-ROMs test ed attività fisica

L'attività fisica incongrua costituisce un importante fattore di rischio per lo stress ossidativo. A questo proposito bisogna distinguere tra dilettanti e professionisti e, soprattutto, fra soggetti allenati e soggetti non allenati.

Infatti, a riposo ed in condizioni di buona salute, il livello di idroperossidi sierici tende ad essere più basso che dopo un esercizio fisico moderato (condizione che non si accompagna al superamento del valore soglia di 350 U CARR o 28.00 mg H₂O₂/dL).

d-ROMs test ed attività fisica

Gli atleti correttamente allenati presentano valori di d-ROMs test mediamente più bassi di quelli rilevati nei soggetti non allenati.

L' esercizio fisico, soprattutto se sporadico ed intenso, induce un aumento indiscriminato del livello di idroperossidi sierici, indipendentemente dall' allenamento, con superamento della soglia sopra indicata di 350 U CARR.

Valori medi del d-ROMs in soggetti sani Test al cicloergometro

Timing	n	U CARR	mgH ₂ O ₂ /dL
Immediatamente dopo sforzo massimale	20	> 350*	>28.00*
Un'ora dopo sforzo massimale (soggetti non allenati)	10	> 350*	> 28.00*
Un'ora dopo sforzo massimale (soggetti allenati)	10	< 300**	< 24**
⁽¹⁾ Test al cicloergometro *Nessuno dei soggetti reclutati aveva livelli inferiori a 350 U CARR (28.00 H ₂ O ₂ /dL). ** Nessuno dei soggetti reclutati aveva livelli superiori a 300 U CARR (24.00 mg H ₂ O ₂ /dL).			

d-ROMs test ed attività fisica

Diverse discipline sportive che comportano un considerevole impegno muscolare sia per l'intensità che per la durata dello sforzo, si accompagnano costantemente all'incremento dei valori del d-ROMs test al termine della prestazione.

il d-ROMs test in Medicina dello Sport

**Football, Baseball, Triathlon, Golf,
Ciclismo, Corsa.**

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 gran fondo (150 km).

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.

Valori dello stress ossidativo in una gara ciclistica di gran fondo (150 km).

