

La misurazione dello stress ossidativo

Guida ragionata ed illustrata alla valutazione globale dello stress ossidativo attraverso le risposte alle domande più frequenti (FAQ)

A cura di Eugenio Luigi Iorio

INDICE

I	1 – 9. Lo stress ossidativo. Un fattore emergente di rischio per la salute.	Pagina 2
II	10 – 19. Lo stress ossidativo. Aspetti diagnostici generali.	Pagina 5
III	20 – 52. La valutazione della capacità ossidante: il d-ROMs test.	Pagina 7
IV	53 – 79. La valutazione della capacità antiossidante: il BAP test.	Pagina 14
V	80 – 94. La gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica	Pagina 18
VI	Considerazioni conclusive	Pagina 24

I. Lo stress ossidativo. Un fattore emergente di rischio per la salute.

Definizione, eziopatogenesi ed aspetti clinici.

In tutti gli organismi viventi e, in particolare, nell'Uomo, esiste un delicato equilibrio fra la produzione e l'eliminazione – ad opera dei sistemi di difesa antiossidanti – dei cosiddetti radicali liberi. La rottura di questo equilibrio, indicata come stress ossidativo, provoca l'insorgenza di lesioni cellulari che, se gravi e protratte nel tempo, conducono ad un'accelerazione del processo dell'invecchiamento e all'insorgenza di numerosissime malattie.

1. Che cosa è lo stress ossidativo?

Lo stress ossidativo è una condizione patologica provocata dall'azione lesiva, sulle cellule e sui tessuti del nostro organismo, di quantità anormalmente elevate di radicali liberi. Esso viene a determinarsi perché la produzione di tali specie chimiche è aumentata e/o perché la fisiologica capacità di difesa nei loro confronti, ad opera dei sistemi antiossidanti, è ridotta (figura 1. 1.).



Figura 1. 1. Lo stress ossidativo. La rottura di un equilibrio.

2. Che cosa sono i radicali liberi?

I radicali liberi sono atomi o raggruppamenti di atomi nei quali almeno un orbitale esterno è "occupato" non da una coppia ma da un solo elettrone, detto, appunto, "spaiato" (figura 1. 2.).

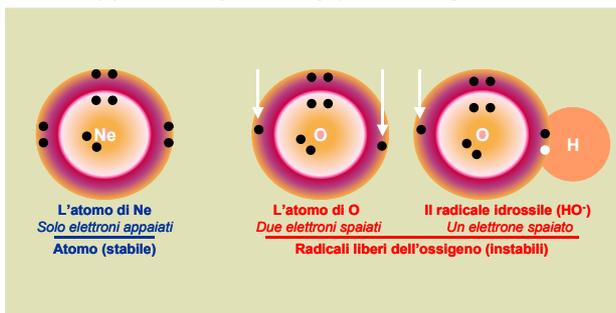


Figura 1. 2. Atomi e radicali.

3. Che cosa sono gli antiossidanti?

Gli antiossidanti sono agenti in grado di neutralizzare l'azione potenzialmente lesiva dei radicali liberi (figura 1. 3.). Alcuni di essi (es. sistemi enzimatici della superossidodismutasi e della catalasi) sono endogeni, cioè vengono prodotti dal nostro organismo di cui sono parte integrante. Altri, invece, quali ad esempio le vitamine C ed E, sono esogeni, cioè devono essere introdotti dall'esterno, per esempio con una corretta alimentazione.

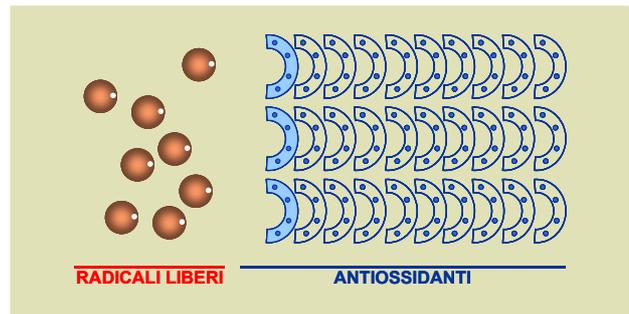


Figura 1. 3. Il sistema di difesa antiossidante.

4. Quali sono le cause che provocano un aumento della produzione dei radicali liberi?

L'organismo, già in condizioni normali, produce una determinata quota di radicali liberi, per effetto del fisiologico metabolismo cellulare. La sintesi di alcuni ormoni, per esempio, implica la generazione di radicali liberi mentre i leucociti polimorfonucleati sfruttano la produzione di questi agenti per uccidere i batteri, aiutando, in tal modo, il nostro organismo a difendersi dalle infezioni. Altri radicali liberi, quali l'ossido nitrico (NO) sono indispensabili per l'omeostasi dell'intero organismo, in quanto modulano importanti funzioni, quali la contrattilità della muscolatura liscia vascolare, l'aggregazione piastrinica, l'adesione cellulare, etc. Da questo punto di vista, i radicali liberi sono stati giustamente definiti "insostituibili compagni" della vita cellulare. Le cause ritenute responsabili di un aumento della produzione dei radicali liberi possono essere di svariata natura, fisica, chimica o biologica (tabella 1. 1.).

Tabella 1. 1. Cause di aumentata produzione di radicali liberi

Eziologia	Esempi
Fattori ambientali	Radiazioni, inquinamento
Stati fisiologici	Gravidanza (?)
Stile di vita	Alimentazione, alcool, fumo, esercizio fisico incongruo
Fattori psicologici	Stress psico-emotivo (?)
Malattie	Traumi, infiammazioni, infezioni, vasculopatie, neoplasie
Fattori iatrogeni	Farmacoterapia, radioterapia, raggi X

5. Quali sono le cause che provocano un abbassamento delle difese antiossidanti?

In condizioni di buona salute, il nostro organismo riesce a prevenire il danno da radicali liberi grazie al sistema naturale di difesa costituito dall'insieme degli antiossidanti, chiamati così proprio perché contrastano l'azione, appunto, ossidante, dei radicali liberi (vedi più avanti). Una ridotta efficacia di tale sistema è da imputarsi sostanzialmente ad un deficit assoluto o relativo di antiossidanti, comunque determinatosi (tabella 1. 2.).

Tabella 1. 2. Cause di riduzione delle difese antiossidanti

Eziologia	Esempi
Ridotta assunzione di AO	Ipovitaminosi, diete monotone
Ridotto assorbimento di AO	Sindromi da malassorbimento, celiachia
Ridotta capacità di utilizzazione di AO	Deficit dei mec. di captazione e/o trasporto
Insufficienza dei sistemi enzimatici AO	Fattori genetici e/o iatrogeni
Eccessivo consumo di AO	Eccessiva produzione di specie reattive
Assunzione di farmaci	Sovraccarico del sistema microsomiale
Malattie	Vari

AO: antiossidanti

6. Perché i radicali liberi sono potenzialmente dannosi?

I radicali liberi sono potenzialmente dannosi perché tendono spontaneamente a riempire con un altro elettrone l'orbitale con l'elettrone spaiato, essendo la condizione di massima stabilità per queste specie occupare gli orbitali con coppie di particelle negative. Pertanto, quando viene a trovarsi nelle vicinanze di una molecola "bersaglio" (avente elettroni in qualche modo "disponibili", come un acido grasso con doppi legami) il radicale libero repentinamente "strappa" ad essa l'elettrone (figura 1. 3).

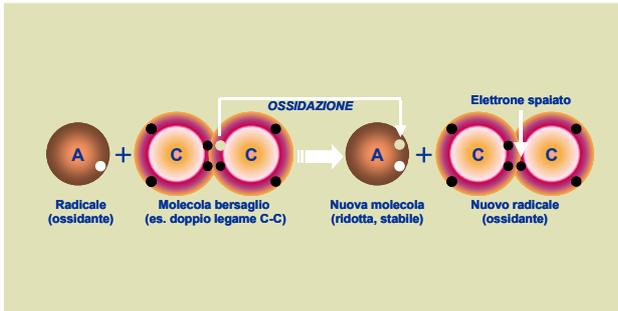


Figura 1. 4. Meccanismo d'azione dei radicali liberi.

In conseguenza di tale azione – definita "ossidante" – il radicale libero perde la sua potenziale pericolosità, mentre la molecola, privata di un elettrone, ne subisce un danno e diviene a sua volta un radicale libero, perpetuando, in assenza di controllo, la reazione precedentemente innescata a danno di altre molecole (glicidi, lipidi, amminoacidi, peptidi, proteine, acidi nucleici, etc.).

7. Qual è il meccanismo più comune attraverso il quale i radicali liberi inducono le caratteristiche alterazioni molecolari e cellulari tipiche dello stress ossidativo?

Uno dei meccanismi più diffusi, attraverso il quale i radicali liberi, una volta superate le difese antiossidanti, attaccano le varie componenti biochimiche cellulari ed extracellulari dell'organismo, è quello legato alla produzione dei cosiddetti idroperossidi (figura 1. 4).

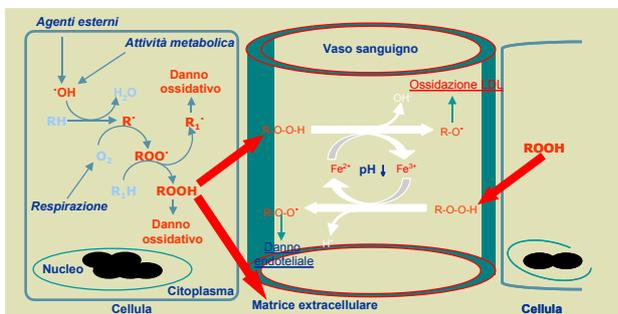


Figura 1. 5. Modello di danno da idroperossidi.

In questo modello fisiopatologico, una cellula, sia per effetto di stressori esogeni (agenti fisici, chimici e biologici) che per la sua stessa attività metabolica (soprattutto a livello della plasmamembrana, dei mitocondri, del reticolo endoplasmatico e del citosol) inizia a produrre quantità elevate di radicali liberi, tra cui il temibilissimo radicale idrossile (HO•),

una delle più istolesive specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS). Infatti, il suddetto radicale può "attaccare" qualsiasi substrato molecolare (glicidi, lipidi, amminoacidi, peptidi, proteine, acidi nucleici, etc.) e, strappando un elettrone (sotto forma di atomo di idrogeno), radicalizzarlo. Dalla reazione a catena che ne deriva, in presenza di ossigeno molecolare, sono, infine, generati gli idroperossidi (ROOH), agenti relativamente stabili ma dotati di potenzialità ossidanti. Per tale motivo, la cellula espelle al suo esterno questi metaboliti reattivi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Metabolites), i quali, a loro volta, diffondono, attraverso le pareti del microcircolo, sia nella matrice che nei liquidi extracellulari, quali il sangue. Qui, in condizioni di ischemia anche lieve, l'attivazione del metabolismo anaerobio induce un rilascio di cataboliti acidi che, provocando un lieve abbassamento del pH, inducono, tra l'altro, una modifica della conformazione della transferrina, che viene così costretta a rilasciare il ferro in forma libera. Sarà questo elemento di transizione, poi, a provocare per via catalitica (reazione di Fenton) la scissione degli idroperossidi in radicali alcossilici (RO•) e perossilici (ROO•), in definitiva responsabili di lesioni ossidative a carico sia dell'endotelio che di componenti plasmatiche, quali le LDL. E' evidente, quindi, che gli ROOH rappresentano non solo i "testimoni" ma anche i potenziali "amplificatori" del danno ossidativo a tutte le cellule dell'organismo.

8. Esiste una correlazione tra alterazioni biochimiche e quadri clinici?

In linea di massima, all'attivazione di specifici siti cellulari corrispondono altrettanti possibili quadri fisiopatologici e, quindi, clinici (tabella 1.3).

Tabella 1. 3 Pattern fondamentali dello stress ossidativo (SO)

SO*	Sito†	Meccanismo†	ROS/ROM	Correlazioni
I	Membrana	Generazione ac. arachidonico	Idroperossidi	Processi reattivi (infiammazione)
		Attivazione NADPH ossidasi	An. superossido	Processi reattivi (infiammazione)
II	Mitocondri	Attivazione metabolica	An. superossido Perossido di H	Ipernutrizione, es. inadeguato
		Disfunzione mitocondriale	An. superossido Perossido di H	Mitocondriopatie (prim. o sec.)
III	Microsomi	Attivazione citocromi P ₄₅₀ /b ₅	Vari	Alcol, farmaci, xenobiotici
IV	Citosol	Attivazione xantina ossidasi	An. superossido Perossido di H	Malattie da ischemia-riperfusion
V	Almeno due	Multipli	Variabilmente centrati‡	Fumo, inquinanti, radiazioni

*I: SO prevalentemente da modifiche reattive della superficie cellulare; II: SO prevalentemente da ridotta efficacia della respirazione cellulare; III: SO prevalentemente da induzione farmaco-metabolica; IV: SO prevalentemente da variazioni intracellulari della pO₂; V: SO da meccanismi multipli. † Prevalente. ‡ Carbonio, azoto, cloro ecc

9. Come si manifesta, clinicamente, lo stress ossidativo?

Lo stress ossidativo, essendo una condizione squisitamente biochimica, non dà luogo a manifestazioni cliniche proprie, né soggettive né oggettive. Pertanto, esso rimarrà sconosciuto, con inevitabile danno del paziente, fino a quando il medico non ne sospetterà l'esistenza (tabella 1. 4) e deciderà di sottoporre il suo assistito a dei test specifici, quali il d-ROMs test ed il BAP test.

Tabella 1. 4. Patologie più frequentemente associate allo stress ossidativo

1. Aceruloplasminemia	32. Disfunzione erettile	61. Obesità
2. Amiloidosi sistemica	33. Dislipidemie	62. Osteoartrite
3. Anemia falciforme	34. Displasia broncopulmonare grave neonatale	63. Osteoporosi
4. Angina instabile	35. Eclampsia/pre-eclampsia	64. Pancreatite
5. Apnea notturna	36. Epatite cronica C	65. Photoageing
6. Arteriopatia coronarica	37. Epatopatia alcolica	66. Pneumopatie interstiziali
7. Artrite cronica giovanile	38. Fibroplasia retroreticolare	67. Progeria
8. Artrite psoriasica	39. Fibrosi cistica	68. Psoriasi
9. Asbestosi	40. Fibrosi polmonare idiopatica	69. Retinopatia dei prematuri
10. Asma	41. Infarto del miocardio	70. Sarcoidosi
11. Atassia di Friedreich	42. Infertilità maschile	71. Sclerodermia
12. Atassia teleangiectasia	43. Infezione ed infiammazione da Helicobacter pylori	72. Sclerosi Laterale Amiotrofica
13. Aterosclerosi	44. Insufficienza renale cronica/emodialisi	73. Sclerosi multipla
14. Atrite Reumatoide	45. Insufficienza venosa	74. Scompenso cardiaco
15. Baropatie	46. Iper-omocisteinemia	75. Sepsis
16. Broncopneumopatia cronica ostruttiva	47. Ipertensione arteriosa	76. Sferocitosi
17. Broncopneumopatie professionali	48. Ipertensione polmonare	77. Sindrome da distress respiratorio
18. By-passo cardiopolmonare	49. Ischemia/ictus cerebrale	78. Sindrome da fatica cronica
19. Cancro del polmone	50. Leismaniosi cutanea	79. Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS)
20. Carcinoma a cellule renali	51. Leucemia	80. Sindrome di Down
21. Cataratta	52. Lupus Eritematoso Sistemico	81. Sindrome di Menière
22. Cellulite	53. Malattia di Alzheimer	82. Sindrome di Werner
23. Cirrosi biliare primitiva	54. Malattia di Creutzfeldt-Jakob	83. Sindrome di Zellweger
24. Cirrosi epatica	55. Malattia di Parkinson	84. Sindromi mielodisplastiche
25. Colite	56. Malattia parodontale	85. Sinucleinopatie
26. Compromissione cognitiva minima	57. Malattia Reumatica	86. Taupatie
27. Corea di Huntington	58. Meningite	87. Trapianto renale
28. Danno da ischemia-riperfusion	59. Miocardite	88. Tubercolosi
29. Degenerazione maculare	60. Morbo di Crohn	89. Uremia
30. Dermatite atopica		90. Ustioni
31. Diabete mellito		

Glossario

Antiossidante: agente in grado di ridurre il livello o l'attività di agenti ossidanti.

Elettro spaiato: ogni orbitale disposto intorno al nucleo di un atomo può possedere al massimo due elettroni, evento che corrisponde alla massima stabilità; quando in un orbitale è presente un solo elettrone, quest'ultimo viene detto spaiato e conferisce all'atomo che lo possiede (radicale libero) caratteristiche di reattività. Queste ultime sono legate, appunto, al tentativo di completare "la coppia".

Idroperossido: metabolita reattivo dell'ossigeno, a formula di struttura generale R-OOH, generato nelle cellule dall'ossidazione di una vasta classe di composti organici (glucosidi, amminoacidi, peptidi, proteine, lipidi, acidi nucleici, etc.); come tale, è affidabile marcatore di danno ossidativo; tuttavia, essendo suscettibile di decomposizione in radicali liberi (alcolessili e perossili), ad opera dei metalli di transizione, è anche un temibile amplificatore sistemico del danno ossidativo tissutale.

Lipoperossido: metabolita reattivo dell'ossigeno, a formula di struttura generale L-OOH, generato nelle cellule dall'ossidazione specifica di lipidi (L).

Metallo di transizione: metallo appartenente alle serie, interposte fra il II ed il III gruppo della tabella periodica degli elementi, accomunate dal possedere l'ultimo livello energetico identico, con minime differenze chimiche legate al diverso grado di riempimento degli orbitali dei livelli energetici sottostanti; ne costituiscono esempi il ferro (disponibile nella forma ferrosa, ridotta, Fe²⁺, e nella forma ferrica, ossidata, Fe³⁺) ed il rame (disponibile nella forma rameosa, ridotta, Cu⁺, e nella forma rameica, ossidata, Cu²⁺) che, in forma libera, scindono gli idroperossidi generando radicali liberi (alcolessili e perossili).

Omeostasi: capacità di un organismo di adattarsi alle mutevoli condizioni ambientali.

Orbitale: area circostante il nucleo di un atomo in un cui si ha una predefinita, generalmente alta, probabilità di trovare un elettrone.

Ossidante: agente chimico in grado di acquistare elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti).

Ossidazione: cessione di elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti) da una specie chimica ad un'altra in grado di accettarli.

Perossido: metabolita reattivo dell'ossigeno, a formula di struttura generale R-OO-R, generato nelle cellule dall'ossidazione di una vasta classe di

composti organici; ne esistono due tipi principali seconda della natura del radical R-, idroperossido e lipoperossido.

Plasmamembrana: sinonimo di membrana cellulare.

Radicale alcossile: radicale altamente reattivo centrato sull'ossigeno derivante generalmente dalla decomposizione ferro-catalizzata di un idroperossido.

Radicale idrossile: radicale altamente reattivo centrato sull'ossigeno derivante dalla decomposizione ferro-catalizzata del perossido di idrogeno o dalla scissione emolitica dell'acqua per effetto di radiazioni UV o gamma; è uno dei più potenti radicali istolesivi.

Radicale libero: atomo o raggruppamento di atomi con uno o più elettroni liberi/spaiati in uno degli orbitali esterni.

Radicale perossile: radicale altamente reattivo centrato sull'ossigeno derivante generalmente dalla decomposizione ferro-catalizzata di un idroperossido.

Reactive Oxygen Metabolites: sta per metaboliti reattivi dell'ossigeno, classe di agenti chimici reattivi derivati dalle specie reattive centrate sull'ossigeno; comprendono, tra l'altro, gli idroperossidi.

Reactive Oxygen Species: sta per specie reattive dell'ossigeno e comprendono specie sia radicaliche (es. radicale idrossile) che non radicaliche (es. perossidodi idrogeno); alcuni le omologano ai metaboliti reattivi dell'ossigeno.

Riducente: agente chimico in grado di cedere elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti).

Riduzione: acquisto, da parte di una specie chimica, di elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti) resi disponibili da parte di un'altra specie chimica.

Scavenger: antiossidante in grado di inattivare un radicale libero per interazione diretta (il termine deriva dall'inglese e significa "spazzino")

Specie Chimiche Ossidanti o Specie Chimiche Reattive: insieme di specie chimiche reattive in grado di ossidare, cioè di strappare uno o più elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti) ad un determinato substrato organico (es. amminoacidi, lipidi, etc.).

Stress ossidativo: condizione patologica dovuta ad uno squilibrio tra produzione ed eliminazione, da parte delle difese antiossidanti, di specie chimiche ossidanti. Costituisce un fattore di rischio emergente per la salute.

II. Lo stress ossidativo. Aspetti diagnostici generali.

La diagnosi di stress ossidativo si basa esclusivamente sull'esecuzione di test biochimici specifici, in grado di evidenziare lo squilibrio determinatosi nell'organismo tra produzione ed eliminazione di radicali liberi, che è alla base di questa condizione patologica.

10. Ai fini di una corretta diagnosi, lo stress ossidativo va considerato come una comune malattia?

Lo stress ossidativo non è una "malattia" nel senso tradizionale del termine, ma l'effetto della rottura di un equilibrio biochimico e, come tale, può influenzare, spesso in maniera subdola, l'insorgenza e/o il decorso di un gran numero di condizioni morbose o patologie di base. Ovviamente, non essendo una "malattia", non dà luogo ad un proprio quadro clinico ma si nasconde dietro ai sintomi ed ai segni della patologia di base e può venire alla luce solo se il clinico, sospettandone l'esistenza, sottopone il soggetto che ne soffre a specifiche indagini biochimiche.

11. Le classiche analisi di laboratorio (es. uricemia, albuminemia, colesterolemia, VES, PCR, etc.) possono consentire al clinico di porre una diagnosi di stress ossidativo?

Nel corso degli anni, sono stati proposti vari test per avere un'idea, seppur indiretta, del bilancio ossidativo; tutti, però, si sono rivelati inaffidabili "surrogati". Per esempio, l'acido urico, pur essendo dotato di attività antiossidante, non può assolutamente essere assunto come marcatore affidabile della funzionalità delle difese antiossidanti del sangue, alla cui costituzione partecipano numerosissime altre sostanze (es. vitamina C, vitamina E, carotenoidi, polifenoli alimentari, etc.). Lo stesso discorso vale per l'albumina, pur importante per la sua funzione di "shock-adsorber" nei confronti dei radicali liberi generati nel comparto ematico. Il livello di colesterolo nel siero costituisce un buon marker di rischio cardiovascolare ma non è necessariamente associato allo stress ossidativo: in maniera solo apparentemente paradossale soggetti con colesterolemia normale possono avere un livello elevato di radicali liberi; ciò che rende pericoloso il colesterolo è la sua ossidazione da parte dei radicali liberi, per cui la classica distinzione tra colesterolo "buono" (HDL) e "cattivo" (LDL) dovrebbe essere rivista, essendo "cattivo", cioè aterogeno, tutto il colesterolo ossidato, sia esso LDL che HDL. La velocità di eritrosedimentazione (VES) e la proteina C reattiva (PCR) sono affidabili indicatori di condizioni infiammatorie, caratterizzata da un aumentato livello di radicali liberi, ma la loro negatività non esclude una condizione di stress ossidativo in atto. Pertanto, ai fini di una corretta diagnosi di stress ossidativo, le comuni indagini di laboratorio sono inappropriate e del tutto insufficienti. Esse diventano utili al clinico solo dopo che questi, diagnosticata una condizione

di stress ossidativo, intende risalire alla possibile causa o al possibile meccanismo implicato nell'aumento della produzione dei radicali liberi.

12. I comuni test per le intolleranze alimentari possono fornire indicazioni sull'esistenza di una condizione di stress ossidativo?

I comuni test proposti per la diagnosi delle intolleranze alimentari, spesso privi – peraltro – di qualsiasi fondamento scientifico, almeno nelle versioni usualmente proposte, non forniscono alcuna valida indicazione circa l'esistenza di una specifica condizione di stress ossidativo.

13. Qual è l'indagine più specifica e affidabile, in assoluto, per dimostrare, in un organismo vivente, la presenza di radicali liberi e quantificarne i livelli?

L'indagine elettiva per misurare i radicali liberi in un organismo vivente è la spettroscopia di risonanza magnetica o di spin dell'elettrone (EPR o ESR). Sfortunatamente, però, questa implica una tecnica piuttosto complessa, richiede una strumentazione e delle professionalità non disponibili in tutti i laboratori, ed è particolarmente costosa, per cui viene utilizzata non per indagini di routine o studi di screening, quanto, piuttosto, per scopi di ricerca e per validare gli altri metodi di laboratorio (golden standard). Anche quando correttamente eseguita, inoltre, l'ESR fornisce informazioni solo sulla produzione di radicali liberi non sugli antiossidanti, mentre lo stress ossidativo è la conseguenza della rottura di un equilibrio tra produzione di specie ossidanti ed efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti.

14. Su quale principio generale si basano i test attualmente disponibili (EPR/ESR esclusa) per valutare specificamente lo stress ossidativo?

La maggior parte dei test specifici per lo stress ossidativo si basano sul principio generale secondo cui lo squilibrio tra produzione ed eliminazione di radicali liberi si rende evidente nel nostro organismo con l'aumento dei livelli di concentrazione e/o attività di una serie di sostanze "reduci" dall'attacco ossidativo da un lato e, dall'altro, con una riduzione dei livelli di concentrazione/attività dei componenti il sistema antiossidante (vitamine, oligoelementi, enzimi), a livello dei tessuti e/o dei liquidi extracellulari.

In particolare, l'esistenza in un organismo vivente di radicali liberi, non altrimenti misurabili routinariamente, viene valutata attraverso la documentazione (nei tessuti e/o nei liquidi extracellulari) della presenza di specie molecolari variamente modificate dall'attacco ossidativo. In tale contesto, poiché la perossidazione è uno dei più comuni meccanismi del danno indotto dai radicali liberi, il dosaggio degli idroperossidi (ROOH) fornisce un'indicazione molto affidabile dell'entità del danno ossidativo subito dall'organismo, ovvero "l'impronta digitale" più o

meno accurata e fedele della componente ossidante dello stress ossidativo di ciascun individuo.

D'altra parte, essendo la formazione della ruggine – passaggio del ferro dallo stato ferroso (Fe^{2+}) a quello ferrico (Fe^{3+}) – una delle reazioni di ossidazione più diffuse in Natura, ed essendo il ferro fisiologicamente presente nel nostro organismo, appare evidente che la capacità di un campione di plasma di riportare una soluzione di questo metallo di transizione dallo stato ferrico a quello ferroso può essere chiaramente assunta come un'indicazione della capacità antiossidante del campione biologico in esame.

15. Quali sono i test specifici attualmente disponibili in commercio per la valutazione dello stress ossidativo?

Coerentemente con i principi sopra esposti, i test di laboratorio attualmente disponibili esplorano o la componente pro-ossidante (produzione di radicali liberi) o la componente anti-ossidante (attività antiossidante) dello stress ossidativo (*tabella 2. 1*).

Tabella 2. 1. Comuni metodi per valutare lo stress ossidativo.

Status proossidante	Status antiossidante
d-ROMs test	BAP test
TBAR test (MDA)	OXY-Adsorbent test
Dosaggio lipoperossidi (LPO)	Total antioxidant status (TAS)
Dosaggio isoprostani	-SHp test
Chemiluminescenza	Dosaggio singoli antiossidanti

Ovviamente, non tutti i test hanno la stessa valenza diagnostica, per cui bisognerebbe distinguere i test di prima linea da quelli di seconda linea e, in particolare, per la valutazione dello status antiossidante, i test per determinazioni di parametri intracellulari (es. saggi enzimatici, come quello della glutatione perossidasi) dai test per determinazioni di parametri extracellulari (es. dosaggio di vitamine).

16. Per un'affidabile valutazione dello stress ossidativo è preferibile effettuare i test su sangue oppure su urina?

In linea di massima è sempre preferibile eseguire i test su sangue perché è in questo fluido che si accumulano inizialmente i prodotti derivanti dall'ossidazione delle cellule e si dispiega la barriera antiossidante. Il passaggio di "marcatori" biochimici dal sangue alle urine comporta ulteriori trasformazioni chimiche che possono non essere diretta espressione di un danno ossidativo, sicché nelle urine questi ulteriori derivati possono perdere in parte il loro significato di affidabili indicatori di stress ossidativo. Inoltre, tra i test attualmente disponibili, alcuni sono del tutto grossolani (es. valutazione "visiva" della concentrazione di un ossidante sulla base dell'intensità della colorazione sviluppata dopo aggiunta in un reattivo), altri non hanno ancora raggiunto una sufficiente specificità (es. immunodosaggio degli isoprostani urinari), altri ancora espri-

mono un danno tardivo (es. MDA-TBAR). Infine, il prelievo di sangue è generalmente meno problematico e meglio accettato dal paziente, rispetto alla raccolta delle urine, che, tra l'altro, implica l'impegno di un'intera giornata (campione delle 24 ore).

17. Quali sono le caratteristiche del test ideale per la valutazione dello stress ossidativo?

Il test ideale per la valutazione dello stress ossidativo dovrebbe essere adeguatamente validato per confronto con altre metodiche di riferimento universalmente riconosciute dalla comunità scientifica. Tra i principali requisiti, dovrebbe possedere sufficienti livelli di sensibilità, specificità e precisione. Dovrebbe riferirsi a marker sufficientemente stabili, in grado di: a) consentire un'accurata valutazione del livello di stress ossidativo, b) fornire indicazioni affidabili già in una fase precoce della condizione morbosa, c) anticipare la progressione o l'aggravamento della malattia nel corso di un monitoraggio sistematico e, infine, d) modificarsi con adeguata sensibilità in rapporto ad eventuali trattamenti specifici per la malattia di base o terapie antiossidanti. Infine, dovrebbe essere basato su procedure minimamente invasive, ben accette dal paziente, veloci, ed esibire un rapporto ottimale costo/benefici.

18. Quali sono i criteri di massima da seguire nella scelta dei test più idonei – nel panorama dell'attuale offerta commerciale – per la valutazione dello stress ossidativo?

Nella scelta dei test più idonei, è opportuno che la valutazione dello stress ossidativo sia "globale", cioè tenga conto sia della componente pro-ossidante che di quella anti-ossidante. Pertanto, bisognerebbe selezionare almeno due test, uno in grado di misurare il livello di produzione di radicali liberi, l'altro atto a determinare la capacità o potenzialità antiossidante.

19. Qual è il panel di test che si sta dimostrando particolarmente utile nella valutazione routinaria dello stress ossidativo?

Esistono numerosi test per la valutazione dello stress ossidativo, alcuni dei quali stanno progressivamente entrando nella pratica clinica. Tra questi il panel messo a punto dal chimico pientino Mauro Carratelli prevede la determinazione per via fotometrica sia della capacità ossidante totale (d-ROMs test) sia della barriera antiossidante plasmatica (BAP test, anti-ROMs test, OXY-Adsorbent test e -SHp test) in campioni biologici (a seconda dei casi, sangue intero, plasma, siero, estratti tissutali o cellulari). Questi test possono essere eseguiti non solo con un comune fotometro (manualmente) ma anche con un analizzatore multiplo (in automatico).

3. La valutazione dello stato ossidante: il d-ROMs test.

Il concetto di valutazione globale dello stress ossidativo impone, anzitutto, un'accurata determinazione del livello di radicali liberi prodotti in un organismo vivente. In realtà, i radicali liberi sono solo una parte delle specie chimiche responsabili dello stress ossidativo. Alla patogenesi di quest'ultimo, infatti, concorrono anche numerosi altri agenti, quali, ad esempio, il perossido di idrogeno e l'acido ipocloroso. Per questo motivo, tutte le specie chimiche – radicaliche e non – responsabili dello stress ossidativo vengono raggruppate in un'unica grande famiglia, quella delle specie chimiche ossidanti. Pertanto, il primo passo della valutazione globale dello stress ossidativo implica la determinazione del livello globale di specie chimiche ossidanti – status ossidante o pro-ossidante – obiettivo che può essere agevolmente raggiunto grazie al d-ROMs test, inventato dal chimico pientino Mauro Carratelli.

20. Che cosa è il d-ROMs test?

Il d-ROMs test è un test fotometrico, ossia eseguibile nei laboratori d'analisi attraverso uno strumento analitico denominato fotometro. Per valutazioni ambulatoriali e routinarie esso viene proposto con sistemi fotometrici dedicati, quali il CARPE DIEM, che contiene, oltre al dispositivo ottico di lettura, anche una centrifuga incorporata nello strumento per la separazione della componente fluida da quella corpuscolata del sangue.

21. Che cosa misura il d-ROMs test?

Il d-ROMs test consente, sostanzialmente, di determinare la capacità ossidante del plasma dovuta in primis agli idroperossidi (ROOH), sostanze appartenenti all'ampia classe dei cosiddetti metaboliti reattivi dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Metabolites, ROMs*).

22. Che cosa sono gli idroperossidi?

Gli idroperossidi sono composti generati dall'ossidazione di un'ampia classe di molecole di interesse biologico (glucosidi, lipidi, aminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, ecc) che, in opportune condizioni, possono generare radicali liberi. Essi sono considerati non solo "testimoni" ma anche indicatori ("marker") specifici di attività ossidante.

23. Su quali campioni biologici si può eseguire il d-ROMs test?

Il d-ROMs test si può eseguire su campioni di sangue intero (generalmente capillare, ottenuto per digitopuntura, ma anche per via endovenosa), su siero, su plasma eparinato e su alcuni fluidi extracellulari.

24. E' consentito l'uso di anticoagulanti al momento del prelievo?

Solo l'eparina. I chelanti in genere, quali EDTA e citrato, sono assolutamente da evitare perché interferiscono con i risultati del test (sottostima dei valori).

25. Per quanto tempo può essere conservato il sangue fresco prima di essere sottoposto al d-ROMs test?

Indicativamente 1-2 ore, secondo le norme della buona prassi di laboratorio per prelievi su sangue intero, avendo cura di usare delle provette eparinate e di evitare ogni possibile traumatismo, causa di emolisi e, quindi, di invalidazione dei risultati per sottostima. Importante è anche la temperatura, che non deve essere né troppo bassa né troppo elevata.

26. E' possibile effettuare il d-ROMs test su campioni di siero o plasma congelati e, eventualmente, dopo aver ripetutamente congelato e scongelato i campioni?

Secondo i dati forniti dalla letteratura scientifica, il d-ROMs test può essere eseguito su campioni congelati di siero o plasma, anche dopo più cicli di congelamento-scongelo, senza incorrere in errori statisticamente significativi.

27. Su quali campioni biologici NON VA ESEGUITO il d-ROMs test?

Il d-ROMs test non può essere eseguito sulle urine.

28. Qual è la procedura più comune per eseguire il d-ROMs test?

La procedura più comune impiegata per eseguire il d-ROMs test prevede la diluizione di una piccola quantità di sangue intero (generalmente di origine capillare, prelevato per digitopuntura) in una soluzione tampone acida, l'aggiunta di un'ammina aromatica ossidabile incolore (cromogeno) (*figura 3. 1*), la centrifugazione della miscela così ottenuta (per separare la componente corpuscolata del sangue da quella liquida) e, infine, la misura per via fotometrica della variazione dell'assorbanza (espressione del viraggio del cromogeno verso il rosa) nell'unità di tempo. Una variante di questa procedura prevede l'aggiunta della soluzione tampone acida, prima, e del campione di sangue, dopo, al cromogeno precedentemente condensato sul fondo di una provetta (d-ROMs test CON).

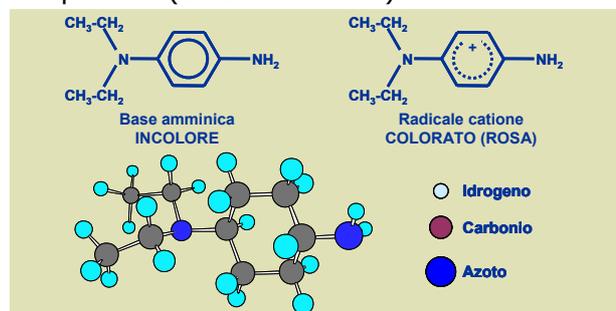


Figura 3. 1. Le due forme del cromogeno del d-ROMs test.

29. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del d-ROMs test?

All'utente viene reso disponibile uno specifico documento che illustra come prevenire e correggere i più comuni errori che possono essere compiuti dall'operatore prima (fase preanalitica), durante (fase analitica) e dopo (fase post-analitica) l'esecuzione del d-ROMs test.

30. Qual è il principio del d-ROMs test?

Il d-ROMs test si basa sull'applicazione "in provetta" di quello che si osserva nel vivente, a livello del microcircolo (vedi figura 1. 4). Infatti, la diluizione del campione di sangue in una soluzione tampone acida (il reagente R₂) induce – come si osserva in condizioni di ischemia-microacidosi *in vivo* – il rilascio dalla transferrina del ferro che, in questo modo, è libero di catalizzare la decomposizione degli idroperossidi presenti in radicali liberi (alcossili e perossili). Questi ultimi, essendo instabili, appena giunti a contatto con il cromogeno (il reagente R₁, un'ammina aromatica, la N,N-dietilparafenilendiammina, DEPPD), successivamente aggiunto, lo ossidano, ossia "strappano" ad esso un elettrone, trasformandolo nello ione positivo corrispondente, che è anche un radicale (radicale catione), ma relativamente stabile, al contrario dei comuni radicali (figura 3. 2).

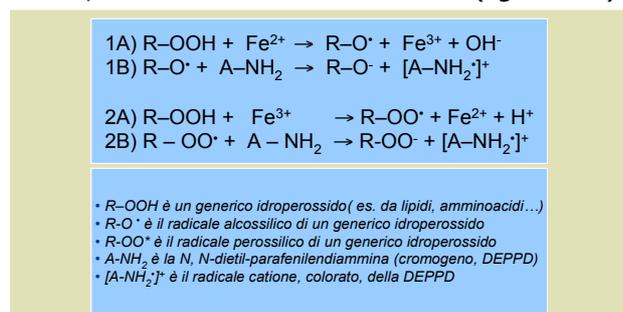


Figura 3. 2. Il principio biochimico su cui si basa il d-ROMs test.

Poiché il cromogeno è originariamente incolore e assume una colorazione rosa nel momento in cui cede un elettrone, dall'intensità del colore rosa sviluppato (proporzionale alla concentrazione del radicale catione generato) si risale, per via fotometrica (calcolo della variazione di assorbanza nel tempo a 505 nm) alla concentrazione dei radicali generati e, quindi, alla concentrazione degli idroperossidi presenti inizialmente nel campione ematico, ovviamente usando un adeguato standard (siero di siero di controllo a titolo noto).

31. Quali sono le evidenze a favore del meccanismo di reazione proposto per il d-ROMs test ovvero con quale tecnica è stato validato il test?

Le evidenze a favore del fatto che il d-ROMs test è un affidabile metodica in grado di quantificare effettivamente gli idroperossidi circolanti sono state fornite dal CNR fin dal 1997 dalla spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone (ESR o EPR), universalmente considerata la tecnica "golden standard" per lo studio *in vitro* dei radicali liberi (figura 3. 3).

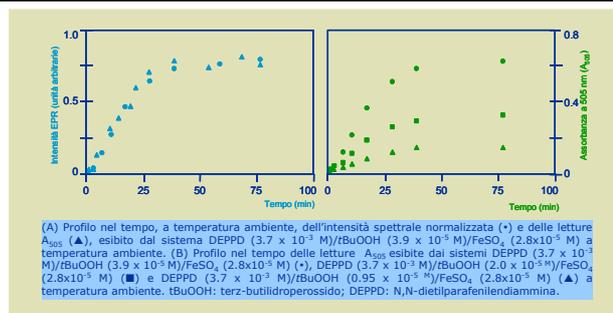


Figura 3. 3. Evidenza conclusiva di validazione del d-ROMs mediante spettroscopia di risonanza dell'elettrone (ESR/EPR): il radicale catione della N,N-dietilparafenilendiammina, responsabile dello spettro ESR, è anche responsabile dell'assorbimento nel visibile a 505 nm rilevato per via fotometrica.

Grazie a questo approccio è stato dimostrato che il segnale ottenuto eseguendo il test nella cellula di uno spettrometro EPR/ESR è del tutto sovrapponibile a quello ottenuto eseguendo, in parallelo, lo sviluppo della medesima reazione per via fotometrica (figura 3. 3).

32. E' possibile che il segnale fotometrico (variazione di assorbanza a 505 nm) sviluppato nel corso dell'esecuzione del d-ROMs test sia dovuto ad altri agenti/attività ossidanti, oltre che ai radicali liberi, alcossilici e idroperossilici, generati dalla scissione ferro-dipendente degli idroperossidi?

Il pre-trattamento del campione di siero con agenti chelanti, quali l'EDTA, rendendo inutilizzabile il ferro per la catalisi, riduce l'intensità del segnale fotometrico/ESR ma non lo annulla completamente. Questo dato sperimentale indica che, almeno una parte della variazione di assorbanza rilevata dal d-ROMs test non è dovuta agli idroperossidi. Per esempio, le cloroammine, marcatrici del danno ossidativo indotto dall'acido ipocloroso sui gruppi amminici di peptidi e proteine, possono contribuire alla variazione di assorbanza del d-ROMs test. Inoltre, poiché il pretrattamento del campione biologico con sodio azide, agente descritto come inibitore dell'attività (ferr)ossidasi della ceruloplasmina, provoca un abbassamento della variazione di assorbanza, è probabile che il d-ROMs test misuri, sebbene in minima misura, anche l'ossidazione della DEPPD attribuita alla ceruloplasmina a pH acido. In ogni caso, la possibilità di rilevare grazie al d-ROMs test più agenti ossidanti, derivanti da differenti vie metaboliche rinforza il significato clinico della metodica come idonea a fornire una valutazione quantitativa globale dello stato ossidante del siero.

33. Come vengono espressi i risultati del d-ROMs test e qual è il loro range di normalità?

La variazione di assorbanza ($\Delta A_{505/min}$) osservata eseguendo il d-ROMs test sul siero di un campione di circa 5000 soggetti clinicamente sani ha mostrato una distribuzione simil-gaussiana (figura 3. 4.).

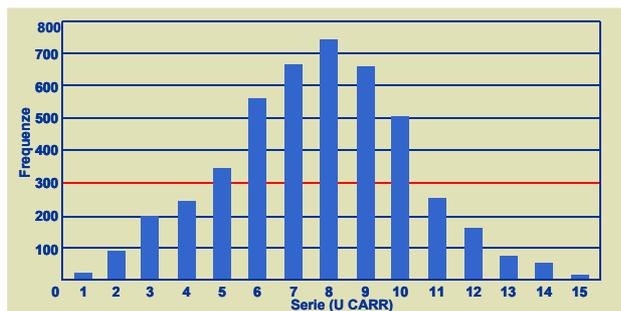


Figura 3. 4. Distribuzione dei valori del d-ROMs test in un campione di soggetti adulti clinicamente sani.

Su queste basi, valori di $\Delta A_{505/min}$ compresi tra 0.025 e 0.030 sono stati assunti come intervalli di riferimento del test nella popolazione normale (figura 3. 5).

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	25.68-26.40	80	98.5
14	331-340	26.48-27.20	57	99.7
15	341-350	27.28-28.00	13	100.0
Totale			4547	100.0

Figura 3. 5. Valori del d-ROMs test in un campione di soggetti adulti clinicamente sani.

Ovviamente, per disporre di un range di misura adeguatamente ampio, il valore di $\Delta A_{505/min}$ viene automaticamente moltiplicato dall'analizzatore per un fattore di correzione (circa 10.000) generando così le unità di misura del test, espresse in U. CARR, dalle iniziali del cognome del chimico pientino, Mauro CARRATELLI, inventore del d-ROMs test. Ciò giustifica il range di normalità stabilito in via definitiva come compreso fra 250 e 300 U CARR.

34. A quanto equivale UNA UNITA' CARR?

Una U CARR equivale a 0.08 mg/dL di una soluzione di perossido di idrogeno.

35. Qual è il significato delle unità CARR del d-ROMs test?

Le UNITA' CARR rappresentano sostanzialmente l'etichetta di riconoscimento del d-ROMs test e l'espressione più alta di assunzione di responsabilità, da parte dell'inventore Mauro Carratelli, nei confronti degli utenti del d-ROMs test. In altri termini, per il modo con cui sono state concepite, le UNITA' CARR contraddistinguono il d-ROMs test rispetto ad altri test, come il FORT TEST, che è un'evidente "copia", peraltro mal riuscita, dell'originale test messo a punto da Carratelli.

A tal riguardo è importante sottolineare che le U CARR sono unità convenzionali originali, che hanno un loro ben preciso fondamento scientifico e che

possono essere in qualsiasi momento convertite in unità chimiche (basta moltiplicare il loro valore per 0.08 per ottenere lo stesso risultato in mg/dL di perossido di idrogeno). Altri test hanno tentato di copiare il principio delle U CARR generando, ad esempio, le UNITA' FORT, le quali, però non sono né originali né trovano alcuna corrispondenza biochimico-clinica.

36. Sulla base del concetto di U CARR, un siero normale (300 U CARR) dovrebbe avere una concentrazione di perossido di idrogeno pari a 24 mg/dL. Ma non è una concentrazione incompatibile con la vita?

Molti di coloro che utilizzano i kit disponibili in commercio, associando i risultati del test agli idroperossidi, continuano a trovare molto più conveniente indicare i risultati del d-ROMs test in termini di concentrazione di idroperossidi. Gli esperimenti di calibrazione, d'altra parte, indicano che 1 U CARR equivale a 0.08 mg/dL di una soluzione di perossido di idrogeno. Ovviamente, si tratta di una equivalenza, il che non significa affatto che un siero normale (300 U CARR) contenga realmente 7054 µmoli/L o 24 mg/dL di H₂O₂/L. Tale livello sarebbe incompatibile con la vita. D'altro canto, esprimere i risultati del test con unità convenzionali (di cui si conosce comunque l'equivalenza con unità chimiche) risulta molto più vantaggioso nella pratica clinica rispetto ad altre modalità – variazione di assorbanza, $\Delta A_{505/min}$, o equivalenti di terz-butilididroperossido – lontane dai range usuali delle analisi chimico-cliniche (es. glicemia e colesterolemia).

37. Differenti valori del d-ROMs test corrispondono ad altrettanti differenti livelli di stress ossidativo?

Sì, secondo una ben precisa scalata di valori (tabella)

Tabella 3. 1. Gravità dello stress ossidativo (SO) sulla base dei valori del d-ROMs test

ROM (U CARR)	ROM (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		

38. Quali sono le performance analitiche del d-ROMs test?

I risultati di numerosi studi, anche recentissimi, indicano che il d-ROMs test è un test affidabile, preciso, ripetibile, con un CV inter ed intra-serie assolutamente accettabile, anche con metodica manuale (1-3%). Il limite inferiore di sensibilità è mediamente 17 U CARR. La linearità è massima nel range tra 50 e 500 U CARR. Il test non subisce interferenza analitica da parte dei più comuni analiti sierici, quali, ad esempio, trigliceridi (fino a 28.2

mmoli/L), emoglobina (fino a 0.068 mmoli/L), bilirubina (fino 171 mmoli/L), etc. (figura 3.6)

Parametri valutati	Siero a basso livello di ROM	Siero ad alto livello di ROM
Media (mAbs/min)	21.0 + 21.5	28.9 + 29.7
Coefficiente di variazione intraserie (%)	1.00 + 1.30	0.73 + 1.75
Coefficiente di variazione interserie (%)	0.67 + 1.28	1.27 + 1.60
Coefficiente di variazione totale (%)	1.46 + 1.63	1.76 + 2.09

Figura 3. 6. Performance analitiche del d-ROMs test in uno degli studi disponibili in letteratura.

39. I risultati del d-ROMs test variano in funzione del tipo di prelievo?

No. Non sono state finora dimostrate differenze significative tra prelievo capillare, venoso o arterioso.

40. Quale volume di campione di sangue è generalmente richiesto per effettuare il d-ROMs test?

In caso di sangue intero, sono sufficienti 20 microlitri. Se si usa il siero o il plasma, a seconda delle diverse metodiche e delle diverse applicazioni, sono richiesti da 3 a 20 microlitri.

41. I risultati del d-ROMs test variano in funzione dell'età, del sesso, della razza o di altre condizioni, fisiologiche o para-fisiologiche?

In assenza di malattia, i risultati del d-ROMs test non variano in funzione dell'età, con l'unica eccezione per quella neonatale; infatti, fino alla prima settimana dalla nascita il valore rilevato è circa la metà di quello dell'adulto; eventuali valori più elevati riscontrati nella popolazione anziana sono da attribuirsi alle diverse comorbidità associate alla senescenza. Lo stesso discorso vale per il sesso; l'apparente discrepanza tra uomini e donne (valori più alti) talvolta riscontrata in ampie casistiche, è da attribuirsi al tipo di prelievo (è evidente che un prelievo di sangue intero in una donna con ematocrito al di sotto dei limiti inferiori della norma può fornire valori apparentemente più alti, semplicemente perché c'è più plasma). E', invece, reale e del tutto attesa la significativa differenza riscontrabile nella donna gravida (valori più elevati) rispetto a quella non gravida. Differenze in funzione della razza di appartenenza sono state anche osservate, con i negri d'America a valori mediamente più alti ed i soggetti di razza orientale a valori mediamente più bassi, rispetto a quelli riscontrati nella popolazione umana; pertanto, vale il principio generale che ogni utente dovrebbe stabilire il proprio range di normalità nell'ambito della popolazione oggetto di studio. Infine, inducono un aumento "fisiologico" dei risultati del d-ROMs test uno sforzo fisico intenso o l'assunzione di alcoolici, ambedue recenti, ossia poco prima di sottoporsi alla valutazione.

42. I risultati del d-ROMs test nel corso della giornata o, comunque, nel medio-lungo termine?

In assenza di malattia e di altri eventi fisiologici o para-fisiologici in grado di provocare un significativo aumento dello stress ossidativo, il risultato del d-ROMs test, rispettando tutte le precauzioni indicate dal produttore, non subisce oscillazioni significative né nel corso della giornata né nel corso di settimane/mesi. Si può, quindi, dedurre, che ogni individuo possiede un proprio valore "basale" o di riferimento, che, pur nella sua variabilità, rientra nell'ambito del range della normalità (250-300 U CARR), con possibili "code" al di sopra o al di sotto di tale limite, data la distribuzione di tipo unimodale del valore della popolazione clinicamente sana. Ognuno dovrebbe, quindi, effettuare il test in condizioni di apparente buona salute e riferirsi al valore così ottenuto in occasione di controlli successivi, ogniqualvolta insorgono condizioni in grado di indurre stress ossidativo. In tali casi fa fede non l'incremento assoluto ma quello relativo (es. il passaggio da 240 a 300 U CARR può essere indicativo del sopraggiungere di una condizione di stress ossidativo).

43. Il d-ROMs test deve essere effettuato a digiuno?

E' preferibile eseguire il d-ROMs test a digiuno o, almeno, dopo un congruo intervallo di tempo rispetto ad un pasto copioso, all'assunzione massiva di alcoolici o antiossidanti (es, somministrazione EV di vitamina E), all'esecuzione di un intenso sforzo fisico.

44. Esistono dati relativi ai valori di normalità in specie animali?

Si, una lunga serie di studi ha consentito di stabilire il range di normalità del d-ROMs test in diversi animali, dai pesci agli uccelli, dai Roditori ai Bovini, dagli Ovini ai Suini e persino agli Equini. Per esempio, i Canidi hanno valori che sono mediamente il 25% di quelli dell'Uomo, probabilmente per il fatto che essi producono acido ascorbico, una funzione che gli Umani hanno perso nel corso dell'evoluzione. Valori finora tra i più bassi sono stati rilevati finora nei pesci (spigola), più alti nei maiali.

45. A quali principi generali bisogna fare riferimento nell'interpretazione dei risultati del d-ROMs test?

I principi generali sono contenuti in apposite linee-guida, dove l'utente ha la possibilità sia di rapportare il valore ottenuto ad una scala di gravità dello stress ossidativo sia di risalire, con apposito algoritmo diagnostico, alla possibile causa del risultato anormale ottenuto. A questo proposito, va ricordato che valori leggermente al di sotto di 250 U CARR possono essere ancora considerati "normali" in soggetti di razza orientale o che seguono uno stile di vita ottimale o, ancora, negli atleti ben allenati,

ma, eccettuati questi casi, occorre essere particolarmente cauti nell'interpretazione dei risultati, che possono sottendere un abuso di antiossidanti, un trattamento cortisonico non dichiarato in atto, un deficit delle risposte immunitarie (es. diabete tipo I) ovvero un ipotiroidismo, etc. Viceversa, condizioni patologiche che più frequentemente inducono un innalzamento del d-ROMs test sono i processi infiammatori, le turbe della respirazione cellulare, le oscillazioni della pressione parziale di ossigeno e le intossicazioni in generale.

46. A quale dei test attualmente disponibili nell'uso clinico routinario può essere in qualche modo ricondotto o assimilato il d-ROMs test?

Il d-ROMs test è un test originale che consente di determinare lo stato ossidante, ossia la capacità globale del plasma di indurre un'ossidazione, rilevata mediante il cambio di colore di un substrato ossidabile (il cromogeno). Pertanto, esso è un test specifico utile per la valutazione dello stress ossidativo che non trova alcun equivalente, neppure concettuale, con i comuni test della biochimica clinica, nemmeno in quelli utilizzati come predittori di rischio cardiovascolare, quali colesterolo, omocisteina e proteina C reattiva (PCR). A proposito di quest'ultima, va rilevato che in condizioni di manifesta infiammazione, come la malattia reumatica, i livelli di PCR rientrano nei valori della norma, prima di quelli del d-ROMs test, che resta, da solo, a testimoniare l'esistenza di un danno ancora in atto, quello da insulto ossidativo.

Il clinico, pertanto, dovrebbe familiarizzare con il d-ROMs test come un test specifico che fornisce indicazioni preziosissime, altrimenti non ottenibili, su un fattore di rischio indipendente che è, appunto, lo stress ossidativo. A tal riguardo sono paradigmatici i risultati di alcuni studi i quali hanno rilevato un d-ROMs test elevato in soggetti con livelli normali o solo lievemente aumentati di colesterolo totale, ad ulteriore dimostrazione che è l'ossidazione di questo lipide, nel contesto sia delle LDL sia delle HDL, e non solo il suo livello ematico, il vero fattore di rischio.

47. Qual è l'informazione principale che il d-ROMs test fornisce al clinico?

Il d-ROMs test, attraverso una misura accurata dello stato ossidante, fornisce al clinico un'informazione, non acquisibile con lo studio di nessun altro dei test biochimici attualmente disponibili, sullo stato generale di benessere dell'organismo, stato che dipende ampiamente, appunto, dal ritmo con cui avvengono le ossidazioni biologiche. I suoi valori, pertanto, sono uno specchio fedele dello stato di attività dei processi ossidativi endogeni (respirazione cellulare) e reattivi (infiammazione) e, quindi, della velocità con cui sta procedendo in quel determinato momento il fisiologico processo di invecchiamento.

Spetta al clinico, grazie alle specifiche linee-guida, interpretare e gestire correttamente i risultati ottenuti. Per esempio, un'ipertensione trattata farmacologicamente che si accompagna a valori elevati del d-ROMs test è, probabilmente, un'ipertensione non ben controllata, che può suggerire al clinico l'uso di un differente antiipertensivo, dotato anche di attività antiossidanti (es. un calcio-antagonista) o l'aggiunta di un integratore antiossidante al protocollo terapeutico in atto al fine di riportare nella norma il d-ROMs test.

Ovviamente, avere i valori del d-ROMs test nella "norma" non significa essere esente da malattie, ma semplicemente avere un rischio trascurabile di stress ossidativo. Infatti, le malattie che possono colpire l'Uomo sono ben più numerose di quelle (circa un centinaio, sebbene importanti) esplicitamente associate ad un'alterazione del bilancio ossidativo.

48. Come si colloca il d-ROMs test nel contesto dell'attuale offerta di metodiche per la valutazione dello stress ossidativo?

Sicuramente il d-ROMs test rappresenta l'unico test affidabile attualmente disponibile per la valutazione dello stato ossidante nella pratica clinica. Infatti, esso variamente diffuso in circa 30 differenti Paesi, ove viene effettuato in prestigiose istituzioni sanitarie (università, centri di ricerca, cliniche, ospedali) e semplici ambulatori a scopo non solo di ricerca ma anche per trarre da esso utilissime informazioni nella diagnosi medica. Altri test, pur validi sotto il profilo metodologico, restano ancora confinati a fini squisitamente di ricerca.

49. Sono state osservate correlazioni tra i risultati del d-ROMs test e quelli di altri test proposti per la valutazione dello status ossidante?

Tra tutti i test, il d-ROMs test è uno dei pochissimi test i cui risultati hanno dimostrato una correlazione strettissima con i risultati forniti dalla EPR/ESR, considerata la tecnica "golden standard" per lo studio dello stato ossidante. Inoltre, il d-ROMs test correla abbastanza bene, tra gli altri, con i test della malonildialdeide (MDA) e degli isoprostani, la cui validità scientifica è dimostrata da centinaia di studi. Rispetto alla MDA, tuttavia, il d-ROMs test fornisce risultati più precoci ed affidabili, mentre rispetto agli isoprostani, almeno quando determinati per via immunologica, esso appare più specifico.

50. Quali sono le "indicazioni" ovvero quali soggetti il Clinico deve sottoporre al d-ROMs test?

Secondo i dati tratti dalla letteratura scientifica, sono ormai ben individuabili sia i soggetti candidati che le relative finalità dei test del pannello per la valutazione globale dello stress ossidativo sviluppato da Mauro Carratelli. Appare evidente che al d-ROMs test dovrebbero sottoporsi periodicamente

tutti i soggetti sani, perché non esiste individuo che non sia esposto al rischio di produrre – in senso assoluto o relativo – quantità eccessive di specie reattive. La finalità primaria del test, infatti, è quella di identificare e prevenire lo stress ossidativo e le sue conseguenze indesiderate (invecchiamento, malattie).

A maggior ragione il d-ROMs test andrebbe eseguito sistematicamente su tutti i soggetti, apparentemente sani dal punto di vista clinico, ma che sono esposti per varie ragioni a fattori in grado di aumentare la produzione (radiazioni, inquinanti, fumo, ecc.) e/o ridurre l'inattivazione di specie reattive (es. regimi alimentari squilibrati). La finalità del test è, anche in questo caso, identificare e prevenire lo stress ossidativo e le sue conseguenze.

Il d-ROMs test, inoltre, andrebbe eseguito su tutti i soggetti affetti da patologie – almeno un centinaio – che risultano in qualche modo correlate con lo stress ossidativo, dalla demenza senile al m. di Parkinson, dall'ictus all'infarto, dal m. di Crohn all'artrite reumatoide, dall'AIDS ad alcune neoplasie e così via. In tutti questi casi le finalità del d-ROMs test sono monitorare lo stress ossidativo e prevenirne le sue conseguenze, monitorare l'efficacia della terapia specifica sulla patologia in atto e, aspetto non trascurabile, monitorare l'efficacia della terapia specifica, in associazione con l'eventuale trattamento antiossidante integrativo, sullo stress ossidativo associato alla patologia in atto. Riguardo a quest'ultima finalità, occorre sottolineare che in molte delle patologie sopra elencate, quasi tutte ad andamento cronico, lo stress ossidativo tende a configurarsi come un fattore di rischio aggiuntivo e, come tale, deve essere controllato per rendere ottimali i risultati della terapia.

In altri termini, l'evidenza, attraverso il d-ROMs test, di una condizione di stress ossidativo costituisce un indice di controllo incompleto della malattia e, pertanto, suggerisce al clinico un approccio terapeutico integrato ove trovino adeguata collocazione non solo i farmaci o gli interventi chirurgici tradizionali, ma anche la correzione dello stile di vita e, eventualmente, l'assunzione di antiossidanti.

Infine, sono candidati al d-ROMs test tutti quei soggetti sottoposti ad interventi terapeutici sia di tipo farmacologico (es. antiblastici, pillola, ecc.) sia di tipo chirurgico (es. trapianti di organo, interventi di rivascularizzazione, ecc.), compresa la dialisi, in grado di compromettere il bilancio ossidativo in senso proossidante. La finalità è quella di identificare e prevenire lo stress ossidativo e le sue conseguenze e, in particolare, monitorare l'efficacia di eventuali misure messe in atto per prevenire il danno tissutale da stress ossidativo.

51. Il d-ROMs test può essere considerato un test "predittivo" di malattia?

Si, per esempio per le malattie cardiovascolari. Infatti, un recente studio condotto presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche di Pisa ha inequivocabilmente dimostrato che, pazienti con valori elevati di d-ROMs test, monitorati per 2 anni di seguito, hanno presentato una più elevata morbilità e mortalità cardiovascolare rispetto a quelli i cui valori del test erano nella norma (figura 3. 7). Inoltre, il d-ROMs test è risultato prezioso indicatore predittivo nel trattamento dell'epatite virale C. Su questa base, non si esclude che il d-ROMs test possa essere predittivo di altre patologie che, come la malattia cardiovascolare o l'epatite virale C, sono correlate con lo stress ossidativo.

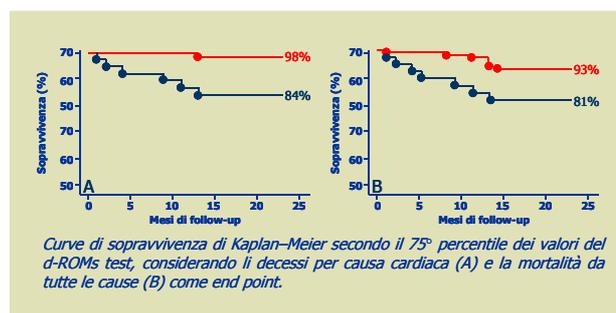


Figura 3. 7. Significato predittivo del d-ROMs test: ridotta sopravvivenza da cause cardiovascolari e non nei soggetti con elevati valori di d-ROMs test rispetto ai soggetti con valori del test nella norma.

52. In quali condizioni cliniche o patologie il d-ROMs test si è dimostrato finora utile?

Sulla base della letteratura scientifica disponibile (diverse centinaia di lavori), il d-ROMs test si è rivelato utile, nell'ambito delle finalità a cui esso è preposto, in quasi tutti i campi della Medicina Umana.

L'utilità del d-ROMs test in medicina estetica è apparsa evidente nel monitoraggio di trattamenti indirizzati a rallentare l'invecchiamento cutaneo e a ridurre la gravità della cellulite. Il d-ROMs test è stato applicato con successo nel monitoraggio dello stress ossidativo anche nelle cosiddette medicine alternative, secondo quanto riportato in tre studi clinici effettuati allo scopo di valutare l'efficacia di alcuni trattamenti, rispettivamente, l'ozono-terapia, la terapia iperbarica e la somministrazione transcutanea di un estratto di ginkgo biloba. Nel campo dell'andrologia, il d-ROMs test si è dimostrato un metodo promettente nella valutazione del livello di idroperossidi nel liquido seminale e, in particolare, nel monitorare l'efficacia di trattamenti antiossidanti nell'infertilità. Le broncopneumopatie croniche ostruttive (BPCO) ed altre malattie dell'apparato respiratorio costituiscono anch'esse interessanti aree di applicazione del test. Il medesimo discorso vale, classicamente, per le malattie cardiovascolari. Infatti, il d-ROMs test si è dimostrato estremamente utile nel monitoraggio dello stress ossidativo associato all'ipertensione arteriosa, alla stenosi carotidea,

all'endoarterectomia carotidea, all'angioplastica coronarica, alle malattie vascolari periferiche, all'insufficienza venosa, e ad altre vasculopatie, secondo quanto riportato dai numerosi trial clinici. Secondo l'autorevole rivista *Circulation* il d-ROMs test rientra tra i marker emergenti predittivi di primo evento aterotrombotico. Molto recentemente, il test si è dimostrato estremamente affidabile nell'individuare una condizione di stress ossidativo latente in pazienti in remissione clinica affetti da malattia di Chron, una patologia cronica intestinale particolarmente grave. Come atteso, il d-ROMs test è apparso utile nel monitoraggio dello stress ossidativo e della terapia antiossidante nell'invecchiamento. Le sindromi mielodisplastiche e le condizioni di trombofilia sono i campi maggiormente studiati dell'ematologia, nei quali lo stress ossidativo è stato valutato mediante il d-ROMs test. Lo stress ossidativo associato ad epatopatie è stato recentemente valutato con successo mediante il d-ROMs test. Recentemente, il test ha consentito anche di valutare l'efficacia di un rimedio omeopatico nel linfedema primario degli arti inferiori. Significativi i risultati ottenuti in pazienti affetti da AIDS, notoriamente ad alto rischio di stress ossidativo. Per quanto concerne la neonatologia e la pediatria, si è visto che i neonati, indipendentemente dal sesso presentano valori del d-ROMs test significativamente più bassi di quelli riscontrati negli adulti; inoltre, è stato riscontrato un alterato bilancio ossidativo (elevati valori del d-ROM test e ridotti livelli dell'OXY-adsorbent e dell'-SHp test) nei bambini affetti da sindrome di Down; infine, la fototerapia si è dimostrata efficace nel ridurre sia i livelli di bilirubina che di d-ROMs test in neonati itterici. Ed ancora, il test si è dimostrato particolarmente utile nella valutazione dello stress ossidativo associato a malattie renali e, in particolare, nell'insufficienza renale cronica così come la dialisi ed il trapianto renale. Nel campo della neurologia e della psichiatria, un trial caso-controllo ha dimostrato, mediante il d-ROMs test, che la terapia antiossidante riduce significativamente i livelli di stress ossidativo in pazienti affetti da demenza senile. Un altro trial controllato mediante placebo ha evidenziato che il trattamento chelante con D-penicillamina è in grado di ridurre i livelli sierici di ROM nella malattia di Alzheimer. Più recentemente, si è anche osservato che pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica hanno valori di d-ROMs test più elevati dei soggetti normali di controllo, suggerendo che le specie reattive dell'ossigeno possono giocare un ruolo importante nella patogenesi della perdita neuronale in questa grave malattia. Numerosissimi studi hanno dimostrato l'utilità pratica del d-ROMs test nel monitoraggio dello stress ossidativo nel campo della nutrizione, del metabolismo e del ricambio; in particola-

re, un alterato bilancio ossidativo è stato riscontrato nei forti bevitori, negli obesi, nei diabetici, e nei dislipidemicici (*figura 3. 8*).

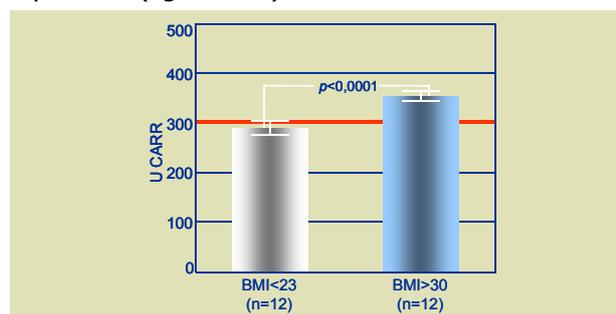


Figura 3. 8. Valori del d-ROMs test significativamente più elevati negli obesi, rispetto ai controlli normopesi (BMI, Body Mass Index, indice di massa corporea).

Lo stesso test è stato applicato con risultati estremamente interessanti nella valutazione di efficacia di formulazioni antiossidanti e negli studi di correlazione fra stress ossidativo ed iperomocistemia. In campo oncologico, un incremento marcato e significativo dei valori del d-ROMs test è stato osservato dopo chemio- o radio-terapia, rispetto ai livelli pre-trattamento. Tuttavia, alcune formulazioni antiossidanti si sono dimostrate efficaci – sulla base della riduzione dei valori del d-ROMs test – nel ridurre il livello di stress ossidativo in pazienti oncologici. Una condizione di stress ossidativo, valutata mediante d-ROMs test, è apparsa evidente anche nella maculopatia associata all'età, una condizione responsabile di cecità negli anziani. In otorinolaringoiatria, è da segnalare uno studio sulla valutazione dello stress ossidativo nella sindrome di Ménière mediante il d-ROMs test. Pazienti affetti da artrite reumatoide hanno presentato livelli particolarmente elevati di ROM rispetto ai controlli sani. Diverse discipline sportive, richiedenti un considerevole impegno muscolare, a causa dell'intensità e/o della durata dello sforzo, quali foot-ball, si sono accompagnate generalmente ad un aumento dei livelli del d-ROMs test dopo la prestazione; inoltre, il d-ROMs test si è dimostrato utile nel monitorare l'efficacia di trattamenti antiossidanti negli atleti.

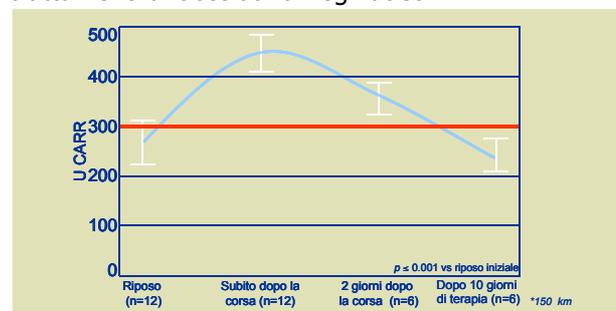


Figura 3. 9. Cinetica del d-ROMs test in una gara ciclistica di gran fondo (terapia: AR₀ Stenovit, flaconcini orali, UID).

IV. La valutazione dello stato antiossidante: il BAP test.

A livello ematico, la difesa nei confronti dell'attacco lesivo delle specie reattive, e in particolare modo, dei radicali liberi, è garantita dalla cosiddetta barriera antiossidante plasmatica. Ne fanno parte sostanze sia di natura esogena (es. ascorbato, tocoferoli, carotenoidi, bioflavonoidi, ecc.) che endogena (es. proteine, bilirubina, acido urico, colesterolo, GSH, ecc.). Ciascuna di queste sostanze possiede un proprio potere o capacità antiossidante, cioè è in grado di opporsi più o meno efficacemente, in funzione del proprio potenziale di ossidoriduzione, all'azione "ossidante" ascrivita ai radicali liberi. Tale potere è legato alla proprietà dei componenti della barriera di cedere "equivalenti riducenti" (ossia elettroni o atomi di idrogeno) alle specie reattive, evitando che queste li sottraggano a componenti biochimici essenziali e prevenendo, in questo modo, l'innescamento di pericolose reazioni a catena. Ovviamente, qualsiasi "insulto" alla barriera antiossidante plasmatica favorisce l'insorgenza delle alterazioni tipiche dello stress ossidativo. Dal punto di vista metodologico, partendo dal concetto che la più semplice forma di ossidazione in natura è la trasformazione ferroso-ferrico, che presiede alla generazione della ruggine, si può considerare antiossidante una soluzione, come il plasma, in grado di riportare il ferro dalla forma ferrica a quella ferrosa. E' su queste basi che è stato sviluppato il BAP test.

53. Che cosa è il BAP test?

Il BAP test, ossia test per la determinazione del potenziale biologico antiossidante (Biological Antioxidant Potential), è un test fotometrico, ossia eseguibile attraverso uno strumento analitico denominato fotometro. Per valutazioni ambulatoriali e routinarie esso viene proposto con il sistema FRAS, che contiene, oltre al dispositivo ottico di lettura anche una centrifuga incorporata nello strumento per la separazione della componente fluida da quella corpuscolata del sangue.

54. Che cosa misura il BAP test?

Il BAP test consente, sostanzialmente, di determinare la concentrazione ematica delle sostanze antiossidanti nella loro accezione di agenti in grado di ridurre il ferro dalla forma ferrica a quella ferrosa. Sebbene al momento non sono disponibili dati sui singoli antiossidanti rilevati e quantificati dal BAP test, per analogia con altri test che misurano la capacità di ridurre metalli di transizione (es. FRAP, CuRAP, etc.), il BAP test fornisce una misurazione globale di molti antiossidanti, quali acido urico, acido ascorbico, proteine, α -tocoferolo, bilirubina ed altri. In altre parole, come per altri test per la misurazione dello stato antiossidante (per esempio TAS, della Randox, o l'ORAC test), il BAP test non è stato progettato per fornire alcuna informazione circa la concentrazione di un singolo antiossidante perché questa da sola avrebbe scarsissimo valore clinico.

55. Su quali campioni biologici si può eseguire il BAP test?

Il BAP test va eseguito su plasma o siero, eparinato o meno, anche a partire da un prelievo di sangue capillare.

56. E' consentito l'uso di anticoagulanti al momento del prelievo?

Solo l'eparina. I chelanti in genere, quali EDTA e citrato, sono sconsigliati perché potrebbero interferire con i risultati del test (sottostima dei valori).

57. Per quanto tempo può essere conservato il sangue fresco prima di essere sottoposto al BAP test?

Indicativamente 1-2 ore, secondo le norme della buona prassi di laboratorio per prelievi su sangue intero, avendo cura di usare delle provette eparinate (peraltro fornite nel kit, nel caso del FRAS4) e di evitare ogni possibile traumatismo, causa di emolisi e, quindi, di invalidazione dei risultati per sottostima. Importante è anche la temperatura, che non deve essere né troppo bassa né troppo elevata.

58. E' possibile effettuare il BAP test su campioni di siero o plasma congelati e, eventualmente, dopo aver ripetutamente congelato e scongelato i campioni?

Sebbene non esistano dati specifici in merito, a causa della facile ossidabilità di alcune componenti della barriera antiossidante plasmatica, si suggerisce di effettuare il BAP test su campioni di sangue fresco, comunque da processare in giornata, previa separazione della parte corpuscolata e conservazione secondo le norme della buona pratica di laboratorio.

59. Su quali campioni biologici NON VA ESEGUITO il BAP test?

Il BAP test non può essere eseguito sulle urine.

60. Qual è la procedura più comune per eseguire il BAP test?

La procedura più comune impiegata per eseguire il BAP test prevede la diluizione di una piccola quantità di plasma (ottenuto dal sangue intero mediante centrifugazione) in una soluzione colorata preparata al momento mescolando due reagenti in fase liquida, un sale ferrico ed un tiocianato. L'aggiunta del campione di plasma provoca una decolorazione più o meno intensa in funzione del potenziale biologico antiossidante, che viene misurata per via fotometrica a 505 nm per confronto con il valore di assorbanza della soluzione colorata da sola.

61. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del BAP test?

All'utente viene reso disponibile uno specifico documento che illustra come prevenire e correggere i più comuni errori che possono essere com-

più dall'operatore prima (fase preanalitica), durante (fase analitica) e dopo (fase post-analitica) l'esecuzione del BAP test.

62. Qual è il principio del BAP test?

Il BAP test si basa sull'applicazione "in provetta" di quello che si osserva in Natura, cioè la formazione della ruggine. Come è noto, l'ossidazione del ferro provoca il passaggio del metallo dalla sua forma ferrosa a quella ferrica. Poiché, il ferro è anche un elemento fisiologicamente ben rappresentato nell'organismo, esso è stato prescelto come indicatore redox nel test in questione. Pertanto, misurata l'assorbanza di una soluzione colorata, preparata al momento dal mescolamento dei reagenti R₁ (cromogeno, tiocianato) ed R₂ (cloruro ferrico), l'entità della decolorazione - rilevata per via fotometrica come cambio di assorbanza - in seguito all'aggiunta del campione di plasma sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di agenti in grado di riportare il ferro alla sua forma ferrosa, ossia al potenziale biologicamente attivo.

63. Quali sono le evidenze a favore del meccanismo di reazione proposto per il BAP test ovvero con quale tecnica è stato validato il test?

Il BAP test fornisce una valutazione quantitativa della capacità antiossidante complessiva del plasma, misurata come potenzialità riducente nei confronti del ferro ferrico. A tale "potenziale biologico antiossidante" contribuiscono varie sostanze, alcune delle quali esibiscono un'attività di tipo scavenger, ossia neutralizzano i radicali liberi interagendo direttamente con essi. Su queste basi, un recente studio condotto presso l'Università di Tokyo, in Giappone, ha dimostrato, mediante impiego della spettroscopia di risonanza dell'elettrone (EPR/ESR) che la bilirubina - prodotto "naturale" del catabolismo dell'emoglobina presente normalmente nel plasma - possiede "in vitro" attività scavenger diretta nei confronti dei radicali idrossile (il più temibile radicale istolesivo) e 1,1-difenil-2-picrilidrazile già a concentrazioni fisiologiche. In esperimenti condotti in parallelo con il BAP test si è visto che i risultati ottenuti dalle due metodiche erano sovrapponibili (figura 4. 1).

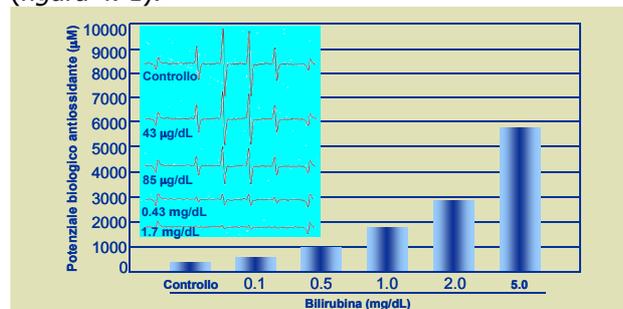


Figura 4. 1. Esperimento di validazione del BAP test mediante spettroscopia di risonanza dell'elettrone (ESR/EPR): all'aumentare della concentrazione aumenta sia il valore del BAP, misurato fotometricamente (istogrammi) sia la capacità scaven-

ger della bilirubina nei confronti del radicale idrossile, misurata mediante ESR/EPR (riquadro all'interno del box).

In considerazione del fatto che l'EPR/ESR è la tecnica "golden standard" per lo studio dei radicali liberi, il BAP test è da considerarsi, grazie a questa autorevole validazione, un test realmente in grado di rilevare e quantificare in maniera specifica ed affidabile attività scavenger/antiossidanti, a conferma del principio proposto essere alla sua base.

D'altro canto, il BAP test è sostanzialmente una variante semplificata del ben noto e diffuso FRAP assay, ossia la determinazione dell'attività plasmatica ferro-riducente. In prove di laboratorio, si è dimostrato che i risultati del BAP test correlano in maniera soddisfacente con quelli del FRAP, che rappresenta il metodo di confronto più affine al test in questione, nel vasto panorama dei test proposti per misurare l'attività o capacità antiossidante totale del plasma.

64. Come vengono espressi i risultati del BAP test e qual è il loro range di normalità?

I risultati del BAP test vengono espressi in micromoli di ferro ridotto per L di campione esaminato. La variazione di assorbanza ($\Delta A_{505/min}$) osservata eseguendo il BAP test sul plasma di un campione cospicuo di soggetti clinicamente sani ha dimostrato che la maggior parte degli individui reclutati ha valori che si posizionano al di sopra di 2200 mmoli/L, valore che stato assunto come cut-off. Pertanto, valori al di sotto di questo limite indicano una riduzione patologica del livello di antiossidanti "biologicamente attivi".

65. Differenti valori del BAP test corrispondono ad altrettanti differenti livelli di compromissione della barriera antiossidante plasmatica?

Sì, secondo una ben precisa scalata di valori (tabella 4. 1)

Tabella 4. 1. Gravità dello stress ossidativo in rapporto ai valori forniti dal BAP test

µmoli di ferro ridotto/L di campione	Grado di compromissione della barriera antiossidante
2200 – 2000	Condizione border-line
2000 – 1800	Compromissione lieve
1800 – 1600	Compromissione di medio grado
1600 – 1400	Compromissione di elevato grado
< 1400	Gravissima compromissione
Valore ottimale: >2200 µmoli/L	

66. Quali sono le performance analitiche del BAP test?

Sulla base dei dati finora pubblicati, il BAP test è un test affidabile, preciso, ripetibile, con un CV inter ed intra-serie assolutamente accettabile, anche con metodica manuale (<5%). Il limite inferiore di quantificazione è 418 micromoli/L. La linearità è massima nel range tra 800 e 10.000 micromoli/L. L'unica interferenza finora segnalata è legata alla concentrazione lipidica: un plasma iperlipemico può indurre una sottostima dei valori.

67. I risultati del d-BAP test variano in funzione del tipo di prelievo?

No. Non sono state finora dimostrate differenze significative tra prelievo capillare, venoso o arterioso.

68. Quale volume di plasma/siero è generalmente richiesto per effettuare il BAP test?

A seconda delle diverse metodiche e delle diverse applicazioni, sono richiesti da 5 a 20 microlitri.

69. I risultati del BAP test variano in funzione dell'età, del sesso, della razza o di altre condizioni, fisiologiche o para-fisiologiche?

In assenza di malattia, i risultati del BAP test mostrano una tendenza alla riduzione, rispetto al range di normalità, negli anziani. Per il resto, non è documentata alcuna dipendenza dei valori ottenuti dal sesso, dalla razza o da altre condizioni fisiologiche o para-fisiologiche.

70. Il BAP test deve essere effettuato a digiuno?

E' praticamente obbligatorio eseguire il BAP test a digiuno o, comunque, dopo un congruo intervallo di tempo rispetto ad un pasto copioso o all'assunzione massiva di antiossidanti per os.

71. Esistono dati relativi ai valori di normalità in specie animali?

Sì, alcuni recenti studi hanno consentito di stabilire il range di normalità del BAP test in diversi animali, tra cui alcune varietà di pesci, cani, gatti e i Bovini.

72. A quali principi generali bisogna fare riferimento nell'interpretazione dei risultati del BAP test?

I principi generali sono contenuti in apposite linee-guida, dove l'utente ha la possibilità sia di rapportare il valore ottenuto ad una scala di gravità dello stress ossidativo sia di risalire, con apposito algoritmo diagnostico, alla possibile causa del risultato anormale ottenuto.

73. A quale dei test attualmente disponibili nell'uso clinico routinario può essere in qualche modo ricondotto o assimilato il BAP test?

Il BAP test è un test che consente di determinare il potenziale biologico antiossidante, ossia l'insieme delle sostanze attive in senso biologico in grado di ridurre il ferro allo stato ferroso. Pertanto, esso è un test specifico utile per la valutazione dello stress ossidativo che non trova alcun equivalente, neppure concettuale, con il dosaggio isolato di analiti, quali l'albumina e l'acido urico, come "surrogati" per la valutazione della capacità antiossidante del plasma. In realtà, sia l'albumina, in modo aspecifico, che l'acido urico, in modo specifico, contribuiscono a costituire la barriera eretta dal plasma contro gli ossidanti, ma il loro dosaggio quantitativo non è congruo con la valutazione di una capacità o attività. Pertanto, il loro contributo non può essere praticamente "scorporato" dal contesto dell'intera barriera.

74. Qual è l'informazione principale che il BAP test fornisce al clinico?

Il BAP test, attraverso una misura accurata dello stato antiossidante, fornisce al clinico un'informazione, non acquisibile con lo studio di nessun altro dei test biochimici attualmente disponibili, sullo stato generale di benessere dell'organismo, stato che dipende anche dall'efficienza dei fisiologici sistemi di difesa antiossidanti. Spetta al clinico, grazie alle specifiche linee-guida, interpretare e gestire correttamente i risultati ottenuti. In tale contesto occorre rilevare che il BAP test rappresenta il test esattamente complementare al d-ROMs test: così la loro contemporanea determinazione fornisce un quadro preciso del bilancio ossidativo, dal quale partire per eventuali interventi terapeutici correttivi. Infatti, qualsiasi trattamento antiossidante non può prescindere da un'esecuzione preliminare del BAP test, secondo lo stesso principio per cui si assume un ipocolesterolemizzante solo dopo che un test biochimico ha dimostrato che il livello ematico del lipide ha superato il range fisiologico di variabilità. A questo proposito, va rilevato che il BAP test si sta rivelando preziosissimo nel monitoraggio di efficacia di trattamenti antiossidanti, essendo estremamente sensibile all'apporto di antiossidanti con la dieta. Ovviamente, come per il d-ROMs test, avere i valori del BAP test nella "norma" non significa essere esente da malattie, ma semplicemente avere un rischio trascurabile di stress ossidativo. Infatti, le malattie che possono colpire l'Uomo sono ben più numerose di quelle (circa un centinaio, sebbene importanti) esplicitamente associate ad un'alterazione del bilancio ossidativo.

75. Come si colloca il BAP test nel contesto dell'attuale offerta di metodiche per la valutazione dello stato antiossidante?

Dopo una fase di impiego sperimentale, il BAP test sta rapidamente guadagnando una posizione di tutto rispetto nell'ambito dei test per la valutazione dell'attività o capacità antiossidante nella pratica clinica routinaria. Infatti, altri test, come il noto TAS (Total Antioxidant Status, determinazione dello stato totale antiossidante), pur validi sotto il profilo metodologico, al contrario del BAP test, restano ancora confinati a fini squisitamente di ricerca o non sono stati sufficientemente validati con tecniche ritenute il golden standard come l'EPR/ESR.

Da un punto di vista concettuale, BAP e TAS misurano la capacità antiossidante del plasma attraverso due differenti modalità, per cui essi hanno differenti indicazioni. In particolare, il BAP misura la componente "dinamica" o "biologicamente attiva" della "barriera antiossidante plasmatica" e, per questa ragione, esso trova una valida applicazione nella valutazione dell'efficacia dell'attività antiossidante di sostanze a più basso peso molecolare o, comunque, a più rapido ricambio, quali l'acido ascorbico, l'acido

urico, la bilirubina, etc. Il TAS, e altri test simili invece, forniscono un'informazione sulla componente "strutturale" della barriera antiossidante (proteine ed altri composti ad alto peso molecolare) il cui tempo di "ricostituzione" è relativamente lento. Per questo motivo, il TAS fornisce una valutazione affidabile delle difese antiossidanti "strutturali" nel loro complesso. Sulla base di quanto detto, i vantaggi immediati offerti dal BAP test al Clinico sono evidenti: possibilità di valutare in tempi brevi l'efficacia di eventuali trattamenti (specifici e/o antiossidanti), perché questi ultimi influenzeranno per prima le componenti "dinamiche" del sistema di difesa antiossidante plasmatici e, solo in un secondo tempo, quelle "strutturali". Così il Clinico può "calibrare", personalizzandolo, il proprio trattamento al paziente, con risposte in tempi ragionevolmente brevi. Volendo ricorrere ad un paragone per spiegare in maniera visiva i concetti sopra esposti, se i radicali liberi rappresentano i nemici che attaccano una fortezza difesa da guerrieri, questa rappresenta la barriera antiossidante plasmatica nel suo complesso, il TAS misura la capacità di difesa delle mura, mentre il BAP test quantifica i guerrieri che si difendono scagliando i propri dardi dalle finestre e dall'alto delle mura stesse contro gli aggressori.

76. Sono state osservate correlazioni tra i risultati del BAP test e quelli di altri test proposti per la valutazione dello status ossidante?

Il BAP test mostra una buona correlazione positiva con il FRAP.

77. Quali sono le "indicazioni" ovvero quali soggetti il Clinico deve sottoporre al BAP test?

L'indicazione principale del BAP test è la valutazione dello stato antiossidante, che può essere alterato per una carenza assoluta o relativa di principi antiossidanti. Per questa sua peculiarità, esso si

integra bene con il d-ROMs test al quale è complementare e del quale condivide le indicazioni.

78. In quali condizioni cliniche o patologie il BAP test si è dimostrato finora utile?

In pazienti con neurotrauma il BAP test si è rivelato un metodo attendibile per dimostrare le attività antiossidanti della bilirubina anche a concentrazioni fisiologiche, con risultati perfettamente sovrapponibili a quelli ottenuti mediante spettroscopia di risonanza dell'elettrone (EPR/ESR). Inoltre, l'utilità clinica del BAP test è stata documentata in medicina iperbarica e subacquea e, più recentemente, in pazienti con malattie croniche e degenerative, in atleti e persino in soggetti sottoposti ad agopuntura. Analoghi promettenti risultati sono stati ottenuti in cani Labrador, ove il BAP test si è rivelato utilissimo per dimostrare l'efficacia di specifici integratori antiossidanti. L'apparente discrepanza nella mole di lavori tra BAP test e d-ROMs test che caratterizza l'attuale stato della ricerca è semplicemente dovuta al fatto che il BAP test è entrato nella routine solo da un paio d'anni. Ma si è convinti che anche il BAP test sta aprendo la strada alla valutazione routinaria dello stress ossidativo in medicina sia umana che veterinaria.

79. In sintesi, quali sono i punti di forza del BAP test?

Anche se entrato da poco nella routine clinica, L'Osservatorio, sulla base dei dati disponibili in letteratura e dei report clinici che man mano si stanno accumulando, suggerisce l'inserimento a pieno titolo del BAP test come unico test complementare al d-ROMs test per la valutazione dello stress ossidativo nella routine clinica. Infatti, il BAP è un test con buone performance analitiche, di semplice esecuzione, rapido, utilissimo nel monitoraggio di trattamenti antiossidanti e di favorevole rapporto costo-benefici.

V. La gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica.

In perfetta sintonia con l'obiettivo primario dell'Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo, è finalmente possibile, oggi, iniziare a trasferire nella pratica clinica e, più in generale, in tutti i campi delle scienze applicate, dalla medicina alla veterinaria dalla botanica all'ecologia, l'enorme potenziale dei risultati di studi che la ricerca biochimica di base ha accumulato nel corso degli ultimi 50 anni sul ruolo dei radicali liberi e degli antiossidanti.

In questo percorso, costellato, come tutti i percorsi della scienza, da errori e incomprensioni, ma anche coronato da singolari successi – come, ad esempio, l'attribuzione del premio Nobel per la scoperta delle proprietà biologiche del radicale libero "ossido d'azoto" (NO) – si sta finalmente affermando la tendenza a "sfruttare" la ricerca di base per "produrre" tecnologie innovative in grado di migliorare la qualità e/o la durata della vita dell'Uomo.

80. Qual è il razionale che è alla base della valutazione dello stress ossidativo?

I radicali liberi hanno un'emivita brevissima, dell'ordine dei nanosecondi, per cui non possono essere quantificati usando le comuni tecniche di laboratorio. Tuttavia, quando la loro concentrazione aumenta al punto da indurre un danno, nei tessuti e, in particolare, nei liquidi biologici, quali il sangue, si accumulano alcuni "sottoprodotti" derivati, appunto, da quelle molecole, originariamente integre, che hanno subito l'attacco radicalico. Tali sottoprodotti, molto più stabili dei radicali, possono essere più agevolmente quantificati per via fotometrica. In tal senso, il rilievo, mediante d-ROMs test, di un'elevata concentrazione ematica di idroperossidi è segno inequivocabile che l'organismo ha subito e potrà ancora subire un danno ossidativo (in questo specifico caso perché gli idroperossidi sono non solo marcatori ma anche potenziali amplificatori del danno ossidativo). Analogamente, nel plasma esiste una barriera che si oppone al possibile attacco dei radicali liberi. Pertanto, il riscontro, mediante il BAP test, di una riduzione del potenziale biologico antiossidante indica in modo altrettanto inequivocabile che le "difese" antiossidanti sono in qualche modo carenti (figura 6. 1).

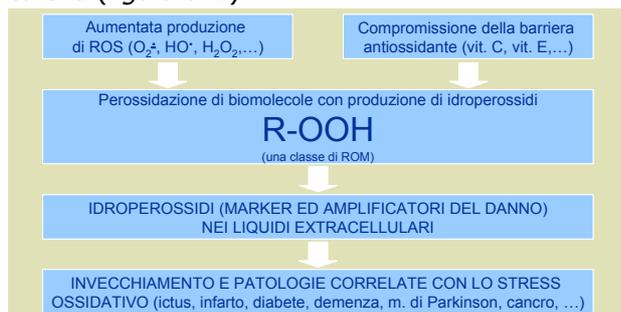


Figura 6. 1. Razionale per la valutazione dello stress ossidativo.

Con la determinazione contemporanea del d-ROMs test e del BAP test, finalmente resa possibile grazie anche a sistemi analitici dedicati, il Clinico ha, dunque, nelle mani uno strumento formidabile per affrontare in maniera non più empirica e grossolana ma razionale e rigorosamente scientifica il problema dello stress ossidativo nel suo stesso ambulatorio.

81. Qual è l'iter iniziale che il clinico deve seguire - disponendo della possibilità di sottoporre il proprio paziente al d-ROMs test ed al BAP test – per passare dall'ipotesi alla formulazione di una diagnosi di stress ossidativo?

L'iter che il clinico deve seguire – sospetto, anamnesi, esame obiettivo, valutazione biochimica – non differisce da quello classico, descritto per qualsiasi condizione morbosa (figura 6. 2), con l'aggravante che lo stress ossidativo, al contrario di una comune malattia, non dà luogo ad un proprio corteo sintomatologico . . . ed è sistematicamente escluso dai tradizionali trattati di Clinica Medica!



Figura 6. 2. Iter diagnostico dello stress ossidativo (parte I).

Il punto di partenza è sempre il sospetto clinico, che nasce, a sua volta, dalla conoscenza del problema: se il Clinico non sa dell'esistenza dello stress ossidativo non potrà porre i quesiti idonei a metterlo in luce! Di qui l'importanza dell'anamnesi che dovrà ricercare l'esistenza o meno di fattori di "rischio" per lo stress ossidativo, quali età, stato fisiologico (gravidanza, allattamento, menopausa), sovrappeso/obesità, eccesso calorico, carenza alimentare micronutrienti, abuso alcolici, fumo di sigaretta, attività fisica incongrua, stress psico-fisico, esposizione significativa a radiazioni UV, esposizione significativa a radiazioni elettromagnetiche, esposizione significativa ad inquinanti ambientali, assunzione estrogeni in atto, chemioterapia in atto, assunzione altri farmaci in atto, radioterapia in atto, dialisi in atto, assunzione corticosteroidi in atto, etc. Relativamente più semplice, il compito del Clinico, in presenza di un paziente affetto da patologia nota: in tal caso sarà di orientamento rintracciare tale patologia nell'elenco di quelle associate allo stress ossidativo. A tal proposito si accompagnano ad un alterato bilancio ossidativo le seguenti condizioni: trauma recente, infezione virale recente, infezione batterica recente, infezione da altro agente, malat-

tia infiammatoria non infettiva recente, sindrome da iperfunzione tiroidea, ipertensione arteriosa, manifestazione clinica da aterosclerosi, dislipidemia, diabete mellito complicato, disfunzione epatica, malattia neoplastica, malassorbimento, etc. In ogni caso un accurato esame obiettivo dovrà confermare il sospetto di eventuali patologie misconosciute ipotizzate in base all'anamnesi. La prima parte dell'iter si conclude con la determinazione e, quindi, con l'analisi biochimica dello stress ossidativo mediante d-ROMs test e BAP test. E, qui, si prospettano ben 6 possibilità.

82. Caso 1: i risultati di ambedue i test, d-ROMs e BAP test, sono al di sotto della norma. Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi della condizione di iporeattività assoluta. In pratica, valori del d-ROMs test al di sotto della norma suggeriscono una capacità ossidante del siero inferiore a quella attesa, mentre valori del BAP test al di sotto di quelli ottimali indicano una riduzione del potenziale antiossidante. Pertanto, è possibile che la capacità complessiva dell'organismo di reagire e adattare il proprio bilancio ossidativo a stimoli endogeni e/o esogeni non sia ottimale.

83. Caso 2: il risultato del d-ROMs test è al di sotto della norma mentre quello del BAP test risulta ottimale. Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi della condizione di iporeattività relativa. In pratica, nonostante il valore ottimale del BAP test, che indica un potenziale biologico antiossidante adeguato, il valore del d-ROMs test al di sotto della norma suggerisce una capacità ossidante del siero inferiore a quella attesa. Pertanto, è possibile che la capacità dell'organismo di reagire e adattare il proprio bilancio ossidativo a stimoli endogeni e/o esogeni non sia ottimale.

84. Caso 3: i risultati di ambedue i test, d-ROMs e BAP test, sono nei limiti della norma (caso). Qual è la possibile interpretazione?

Il bilancio ossidativo è ottimale. In pratica, valori del d-ROMs test nella norma suggeriscono una capacità ossidante del siero nei limiti di quella attesa, mentre valori del BAP test ottimali indicano un potenziale antiossidante congruo. Questi elementi sono in genere sufficienti ad escludere una condizione di stress ossidativo in atto, fermo restando che avere i risultati di ambedue i test "nella norma" non esclude l'esistenza di patologie in atto ma indica solo la presenza di un livello ematico di marcatori biochimici di stress ossidativo nella media rilevata nella popolazione clinicamente asintomatica ed apparentemente sana.

85. Caso 4: il risultato del d-ROMs test è nella norma mentre quello del BAP test è inferiore alla norma? Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi di una condizione di stress ossidativo relativo. In pratica, valori del d-ROMs test nella

norma suggeriscono una capacità ossidante del siero nei limiti di quella attesa, mentre valori del BAP test al di sotto di quelli ottimali indicano una riduzione del potenziale antiossidante. Questi elementi vanno interpretati come una condizione a rischio. In altri termini, il soggetto, pur non avendo una positività per marcatori biochimici di danno tissutale in atto (d-ROMs test normale), risulta predisposto allo stress ossidativo perché le sue ridotte capacità difensive (BAP test basso) potrebbero non consentirgli di fronteggiare in maniera ottimale un'eventuale aggressione radicalica. In altri termini, un qualsiasi fattore, esogeno o endogeno, potenzialmente in grado di aumentare la capacità ossidante del siero riuscirà più facilmente, che non in un soggetto con bilancio ossidativo normale, a indurre un danno tissutale da radicali liberi.

86. Caso 5: il risultato del d-ROMs test è al di sopra della norma mentre quello del BAP test risulta ottimale. Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi della condizione di stress ossidativo potenziale. In pratica, nonostante il valore ottimale del BAP test, che indica un potenziale biologico antiossidante adeguato, un valore del d-ROMs test al di sopra della norma suggerisce una capacità ossidante del siero superiore a quella attesa. Questi elementi vanno interpretati come una condizione a rischio, ossia una sorta di squilibrio "compensato" del bilancio ossidativo. In altri termini, è verosimile che esista una causa responsabile "a monte" della produzione di radicali liberi (es. fumo di sigaretta, ipertensione arteriosa non diagnosticata, sovrappeso, ecc.) che "impegna" le difese antiossidanti, ma queste ultime sono ancora in grado di controllare il danno ossidativo in atto. Tuttavia, se la causa responsabile dell'aumentata produzione di radicali liberi non viene tempestivamente rimossa (es. abolizione del fumo, adozione di un adeguato regime dietetico, intervento farmacologico ecc.), essa porterà, in un intervallo variabile di tempo, alla progressiva riduzione delle difese antiossidanti, fino al realizzarsi di un quadro conclamato di stress ossidativo (squilibrio palese fra produzione ed eliminazione di radicali liberi).

87. Caso 6: il risultato del d-ROMs test è al di sopra della norma mentre quello del BAP test è al di sotto della norma. Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi della condizione di stress ossidativo assoluto. In pratica, valori del d-ROMs test al di sopra della norma suggeriscono una capacità ossidante del siero superiore a quella attesa, mentre valori del BAP test al di sotto di quelli ottimali indicano una riduzione del potenziale antiossidante.

E' il classico quadro dello stress ossidativo, nel quale la produzione di radicali liberi è tale da superare le capacità difensive del sistema antiossidante. Il rischio di lesioni ossidative tissutali è variamente

elevato, in funzione del livello di innalzamento del d-ROMs test e/o di riduzione del BAP test.

88. In che modo il clinico può gestire ciascuna delle 6 situazioni indicate?

La risposta è nelle apposite Linee Guida, alle quali si rimanda. In generale, la strategia da seguire deve tener conto del peso relativo dei fattori di rischio, delle eventuali patologie in atto e dei risultati dei test (livello di ossidazione e grado di compromissione della barriera antiossidante).

89. Qual è la strategia generale che il Clinico dovrà seguire nei casi di palese stress ossidativo?

Nei casi di stress ossidativo, sulla falsariga di uno specifico ed originale algoritmo diagnostico, il Clinico dovrà cercare di individuare il possibile o i possibili meccanismi patogenetici responsabili dell'alterato bilancio ossidativo (figura 6. 3).

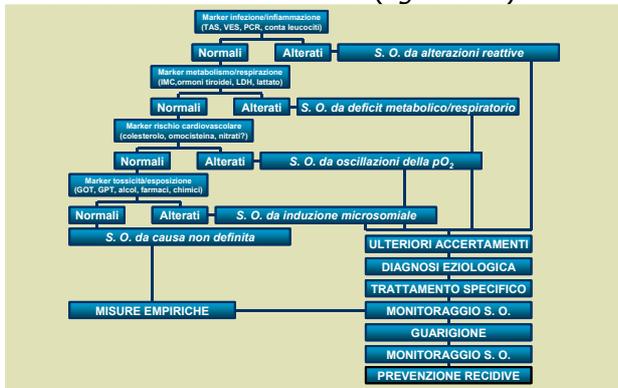


Figura 6. 3. Iter diagnostico dello stress ossidativo (parte II).

Egli, quindi, dovrà cercare di stabilire, mediante opportune indagini di laboratorio e/o strumentali (conta leucocitaria, VES, PCR, TAS, esame impedenziometrico, marker tiroidei, lattato sierico, profilo lipemico, omocisteinemia, marker funzionalità epatica, marker tumorali, etc.) se alla base dello stress ossidativo vi sia uno o più dei 4 classici meccanismi proposti (infiammazione, deficit respirazione mitocondriale, ischemia-riperfusion, induzione farmaco-metabolica).

Sulla scorta del meccanismo prevalente, egli potrà prescrivere, finalmente, un trattamento mirante, a seconda dei casi, a ridurre lo stato ossidante (terapia causale) e/o potenziare le difese antiossidanti (terapia integrativa).

90. Quali sono le attuali tendenze in tema di prevenzione e trattamento dello stress ossidativo?

La prevenzione o la terapia delle patologie da stress ossidativo impongono, accanto a provvedimenti specifici in funzione del meccanismo patogenetico prevalentemente coinvolto, un approccio integrato, secondo i canoni di quella che oggi viene definita la rivoluzione antiossidante. In tale contesto assume notevole importanza, una volta eseguiti i test, migliorare il proprio stile di vita, adottando il

modello alimentare della dieta mediterranea e svolgendo una regolare attività fisica.

91. Per il clinico è spesso difficile mettere a punto una "dieta" su misura che tiene conto non solo della distribuzione dei nutrienti e dell'apporto calorico ma anche del fabbisogno di antiossidanti. Esistono linee guida in proposito?

Le linee guida americane, fatte proprie anche dagli oncologi italiani per la prevenzione dei tumori, parlano esplicitamente della necessità di assumere ogni giorno 5-8 porzioni di frutta, verdure ed ortaggi, preferibilmente freschi e di stagione.

A questo suggerimento, del tutto "empirico", altri Studiosi preferiscono un criterio più oggettivo, basato sul cosiddetto punteggio ORAC, che quantifica in apposite "unità assorbenti i radicali liberi" la capacità antiossidante "in vitro" di tutta la frutta e le verdure più comuni (tabella 6. 1).

Tabella 6. 1.. Apporto di antiossidanti di alcuni comuni alimenti in unità ORAC per 100 g

FRUTTA	UNITA' ORAC	VERDURA	UNITA' ORAC
Prugne secche	5770	Cavolo	1770
Uvetta	2830	Spinaci	1260
Mirtilli	2400	Cavoli di bruxelles	980
More	2036	Germogli di alfalfa	930
Fragole	1540	Fiori di broccoli	890
Lamponi	1220	Barbabietola	840
Susine	949	Peperone rosso	710
Arance	750	Cipolla	450
Uva nera	739	Grano	400
Ciliegie	670	Melanzana	390

Per esempio, 100 grammi di prugne secche equivalgono a 5770 UNITA' ORAC, mentre 100 grammi di spinaci equivalgono a 1260 UNITA' ORAC.

Attingendo dalle varie TABELLE ORAC, distinte per colore dei vegetali, il clinico suggerirà un cocktail quotidiano di frutta e verdura di diversi colori, in funzione anche della stagionalità, atto a coprire, con il punteggio totale ottenuto, il fabbisogno di antiossidanti naturali, calcolato, a sua volta, sulla base del livello di deficit del potenziale biologico antiossidante misurato attraverso il BAP test. Per deficit di media gravità si suggerisce di raggiungere, combinando i vari vegetali, i 3000-5000 punti ORAC.

Alternativamente, fanno testo, per i fabbisogni nutrizionali le tabelle dei cosiddetti LARN, cioè i livelli minimi raccomandati di nutrienti, che variano in funzione della popolazione, dell'età e del sesso (tabella 6. 2)

Tabella 6.2. LARN dei comuni antiossidanti

Vitamina A	1 mg/die LARN
β-carotene	5 mg/die
Vitamina C	60 mg/die LARN
Coenzima Q10	5 mg/die LARN

Selenio	50 – 200 µg/die
Manganese	5 mg/die LARN
Rame	2-3 mg/die LARN
Zinco	55 mg/die LARN

92. “Una mela al giorno toglie il medico di turno?”

In linea teorica, questo vecchio aforisma resta valido. Tuttavia, non si può escludere che i livelli di nutrienti attesi, sulla base delle tabelle nutrizionali, siano effettivamente presenti nel momento in cui viene assunto un determinato frutto o una determinata verdura. Infatti, l'impoverimento dei suoli (legati allo sfruttamento eccessivo dei terreni, alle piogge acide, alla desertificazione, all'inquinamento, etc.), l'uso, spesso indiscriminato, dei pesticidi, i processi di raffinamento dei vegetali, i processi di trasformazione, conservazione, stoccaggio e persino la cottura possono in varia misura abbattere l'originario patrimonio di antiossidanti di qualsiasi alimento di origine vegetale. Pertanto, in via precauzionale, molti nutrizionisti oggi suggeriscono l'uso indiscriminato di integratori. Secondo le linee guida dell'Osservatorio, invece, l'uso di queste sostanze andrebbe limitato ai casi effettivamente documentati mediante almeno una coppia di test in grado di valutare globalmente lo stress ossidativo, quali, ad esempio, il d-ROMs test ed il BAP test.

93. Dinanzi ad una condizione di stress ossidativo diagnosticata mediante d-ROMs test e BAP test, ponendosi la necessità di suggerire al paziente l'assunzione di un integratore, quali sono i criteri cardine che il Clinico dovrebbe seguire nella scelta del prodotto o dei prodotti più idonei?

Premesso che ogni sforzo del Clinico deve essere sempre orientato a rimuovere la causa responsabile dell'aumento della produzione di radicali liberi, quando si pone la reale necessità di un'integrazione antiossidante (valori del BAP test ampiamente inferiori alla norma) bisogna attenersi ad alcuni principi di massima, che tengono conto della natura e della quantità del micronutriente proposto, della possibile insorgenza di eventi indesiderati, della via di somministrazione, delle condizioni del paziente, della concomitante assunzione di altri farmaci, e così via.

In linea di massima, la grande varietà di sostanze ossidanti responsabili dello stress ossidativo e la loro distribuzione ubiquitaria nell'organismo implica la necessità di poter disporre di una formulazione a spettro d'azione antiossidante quanto più ampio o completo possibile. E siccome un antiossidante in formulazione unica in grado di rispondere ai requisiti necessari non è ancora disponibile, risulta indispensabile ricorrere a veri e propri cocktail. Infatti, è noto che la vitamina E è un potente antiossidante, ma la sua attività si riduce quando la tensione di ossigeno è bassa, come avviene ad esem-

pio nei tessuti ischemici. Così, in condizioni di bassa tensione di ossigeno è il β -Carotene ad avere un'azione antiossidante più spiccata. D'altro canto, la vitamina C, di cui è ampiamente nota l'azione antiossidante, esibisce una spiccata capacità di rigenerare la vitamina E. La vitamina C, però, al contrario della E, non è liposolubile e, quindi, non riesce a raggiungere i tessuti e/o le lesioni che necessitano di sostanze liposolubili, cosa che risulta più agevole al coenzima Q₁₀. Da questo esempio si comprende come la vitamina E, il β -Carotene, la vitamina C ed il coenzima Q₁₀ possano essere complementari, giustificando una loro assunzione combinata.

Stabilito che più antiossidanti insieme sono, in linea di principio, più efficaci di un antiossidante da solo, resta il problema dei dosaggi. E qui, i pareri degli studiosi appaiono completamente divisi, attendendosi su due linee di pensiero, quella delle macrodosi, affine alla mentalità americana, e quella delle microdosi, affine alla mentalità europea, ovviamente con le dovute eccezioni e i distinguo. Così, una formulazione antiossidante messa a punto da Kenneth H Cooper, in grado di garantire, tra l'altro un apporto quotidiano di 1000 mg di vitamina C, 5000 UI di b-carotene, 400 UI di vitamina E, 800 µg di acido folico, 25 mg di vitamina B₆, 400 µg di vitamina B₁₂ è stata in grado di ridurre il livello di ossidazione delle LDL del 14.6%, i livelli di omocisteina del 17.2% ed i livelli di proteina C reattiva del 24.5%. D'altro canto, una formulazione contenente principi attivi antiossidanti a dosaggi decisamente più bassi è risultata in grado di abbassare i livelli di stress ossidativo misurati mediante d-ROMs test in pazienti affetti da vasculopatie periferiche (claudicatio intermittens) (tabella 6. 3). In epoca più recente, si stanno diffondendo sempre di più le formulazioni officinali che consentono una più adeguata "personalizzazione del trattamento" ed una maggiore "compliance" del paziente (tabella 6. 4).

Tabella 6.3. Esempio di formulazione antiossidante non officinale.

Principio attivo	Quantità
Vitamina A	0.4 mg
β -carotene	0.05 mg
Vitamina C	30 mg
Vitamina E	5 mg
Coenzima Q 10	20 mg
Selenio	48 mcg
Zinco	5 mg
Vitamina B6	1 mg
L-cisteina	10 mg
Flavonoidi (Citrus)	30 mg

Tabella 6. 4. Esempio di formulazione officinale

L- cisteina mg 100	Nicotinico (Vit. PP) mg 6,75
Ac. alfa-lipoico mg 100	Piridossina (Vit. B ₆) mg 0,3
Magnesio mg 37,5	Riboflavina (VitB ₂) mg 0,2
Selenio mg 0,01375	Tiamina (Vit B ₁) mg 0,21

Stabilito il dosaggio, un aspetto non trascurabile è la forma farmaceutica. A tal proposito è stato

dimostrato che le formulazioni fluide sono più efficaci di quelle solide.

Anche la via di somministrazione ha il suo ruolo: per esempio, molti principi attivi assunti per bocca sono neutralizzati nel tubo digerente ed attivamente captati dal fegato, rendendosi scarsamente biodisponibili per gli altri organi e tessuti. Uno di questi è il glutatione ridotto.

Alcune condizioni del paziente, inoltre, possono rendere proibitiva la via orale, per esempio in caso di celiachia.

Allora si possono prendere in considerazione altre possibilità, quali la via IM o la via EV. Più recentemente si stanno rendendo disponibili formulazioni spray per l'assorbimento sublinguale (Cellfood® multivitamine 100% RDA, Cellfood® Vitamina C) che garantiscono una pronta immissione nel grande circolo degli antiossidanti evitando il primo passaggio epatico. In altri casi, come per il glutatione, quando la via endovenosa non è praticabile, si può ricorrere a precursori assunti sotto forma di peptidi ad elevato contenuto di cisteina, uno degli amminoacidi di questo tripeptide (es. PROTER).

In ogni caso non bisogna trascurare la possibile tossicità, poiché in certe condizioni, spesso anche in funzione del dosaggio, alcuni antiossidanti, come la vitamina C, possono esibire proprietà proossidanti, mentre altri, come i caroteni possono dare accumulo a causa della loro lipofilia. Infine, in pazienti, specialmente con comorbilità in atto, si tenga conto sempre delle possibili interazioni con farmaci, in particolare, con gli ipocoagulanti orali (es. dicumarinici), che possono essere "scalzati" dalle proteine da diverse vitamine liposolubili con aumento del rischio di emorragie.

94. Se, nonostante tutti gli accorgimenti, un trattamento "antiossidante" sembra non in grado di abbassare i livelli di stress ossidativo, cosa può fare il Clinico?

Può capitare che, a fronte di una terapia apparentemente eseguita in maniera impeccabile, uno o ambedue i test in precedenza alterati, non rientrino nei valori attesi. In questi casi, prima di concludere che il trattamento è stato inefficace e tentare di sostituirlo con uno più idoneo, occorrerà verificare una serie di ipotesi.

La più scontata, almeno in apparenza, è che l'operatore, nel corso dell'analisi, sia incorso in un qualche errore (es. uso di reattivi scaduti o non correttamente conservati, mancata aggiunta del cromogeno, regolazione del K factor, ecc.). In questi casi è opportuno rivedere la procedura ed eventualmente ripetere il test o i test eseguiti in maniera non corretta.

La seconda eventualità è che l'antiossidante sia stato somministrato ad un dosaggio inadeguatamente basso o, comunque, non in grado di raggiungere la concentrazione plasmatica sufficiente

per svolgere la sua azione "farmacologica". Nel primo caso occorre utilizzare il dosaggio prescritto. Se, invece, il dosaggio effettivamente impiegato è quello prescritto, è consigliabile, ove possibile, effettuare la determinazione dei livelli plasmatici dell'antiossidante (es. dell'ascorbato o della vitamina E). Infatti, se questi sono ridotti è da sospettare l'esistenza di una condizione in grado di ostacolare l'assorbimento di nutrienti (es. celiachia), la quale va immediatamente rimossa (es. eliminazione del glutine dalla dieta).

La terza eventualità è che sia intervenuto un evento accessorio in grado di aumentare, in maniera non immediatamente evidente, la produzione di radicali liberi attribuita alla condizione di base (es. sovrapposizione di un'infezione batterica criptogenica dopo un intenso sforzo muscolare in un atleta). In questi casi è indispensabile identificare e trattare specificamente l'evento accessorio e, se indicato, aumentare il dosaggio dell'integratore.

La quarta ed ultima eventualità è che sia intervenuto un fenomeno di pro-ossidazione. Tale fenomeno non è infrequente, per esempio, in seguito ad elevate somministrazioni di ascorbato. In questi casi è generalmente sufficiente ridurre la posologia del preparato.

Se, dopo ogni ragionevole tentativo, il livello di stress ossidativo e, in particolare, il valore del d-ROMs test resta ancora di difficile controllo, in linea di massima occorre continuare a ricercare le cause e, nel frattempo, garantire sempre al paziente un'adeguata copertura antiossidante, pari almeno alla razione quotidiana indicata dai LARN, invitandolo a tenere sotto controllo i fattori di rischio implicati nello stress ossidativo attraverso un adeguato stile di vita.

Se è forte il sospetto di una condizione reattiva, non ancora evidente sotto il profilo ematochimico, può trovare, secondo alcuni, indicazione un blando trattamento con cortisone fino a normalizzazione dei livelli del d-ROMs test, sempre secondo il classico protocollo scalare crescente-decrescente, sempre che non esistano controindicazioni, e sotto rigoroso controllo medico.

Alla ricerca di una possibile interpretazione non sono da escludersi, comunque, casi di soggetti in apparente buona salute, peraltro giunti anche alla nostra osservazione, con valori persistentemente elevati del d-ROMs test: essi potrebbero rientrare nella popolazione di soggetti con valori fisiologicamente elevati del test, che occupano una delle due "scodature" della curva di Gauss di distribuzione dei valori di normalità. Essi – che rappresentano come l'eccezione del gigante in una popolazione con altezza nella media – vanno monitorati a frequenza tri- o semestrale.

Purtroppo, è probabile che il Clinico si imbatta in casi che non rispondono adeguatamente al trattamento e che non trovano spiegazione in nessuna

delle ipotesi fin qui riassunte. E' verosimile, allora, che il trattamento non sia stato efficace, non che la valutazione biochimica sia stata inadeguata. E questo apre un capitolo nuovo le cui pagine sono ancora in gran parte bianche. Infatti, non esiste una soluzione valida per tutti, per quanto efficace per molti. Così il discorso si sposta verso la personalizzazione del trattamento, che oggi è relegata all'esperienza del terapeuta ma che in un immediato futuro sarà affidata alla cosiddetta nutrigenomica. Così, con un semplice prelievo salivare sarà possibile estrarre il DNA del soggetto e stabilire se esso

potrà o meno rispondere ad un determinato antiossidante. In attesa della validazione di questo approccio, resta al Clinico, sulla base della sua esperienza clinica, secondo scienza e coscienza, trovare la soluzione più idonea, come del resto previsto nelle nostre linee guida (*stress ossidativo non determinato*), cercando di individuare tra gli innumerevoli trattamenti proposti, quello adatto al suo paziente. Non importa se ciò richiederà del tempo e degli "aggiustamenti" del protocollo terapeutico con sostituzioni o aggiunte di principi attivi nonché modifiche posologiche.

VI. Considerazioni conclusive

E' finalmente disponibile, per medici ed altri operatori sanitari, un innovativo panel che consente di valutare in maniera globale lo stress ossidativo attraverso l'esecuzione di due test, il d-ROMs test ed il BAP test.

Il d-ROMs test consente di determinare la concentrazione ematica dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) e, in particolare, degli idroperossidi, marcatori ed amplificatori del danno cellulare da radicali liberi.

Il BAP test consente di determinare l'efficienza della barriera antiossidante plasmatica in termini di attività ferro-riducente.

Grazie a questi due test, oggi eseguibili anche presso l'ambulatorio medico attraverso sistemi analitici dedicati (es. CARPE DIEM), è possibile porre una diagnosi di stress ossidativo estremamente precisa ed affidabile, ove le due componenti contrapposte, quella pro- ed anti-ossidante possono essere valutate distintamente. In altri termini, è possibile stabilire in tempo reale se lo stress ossidativo è do-

vuto ad un aumentata produzione e/o ad una ridotta capacità di eliminazione dei radicali liberi. In questo modo anche il monitoraggio della terapia antiossidante può poggiarsi su basi più solide e uscire dalla fase empirica in cui spesso viene a trovarsi.

Tutti dovrebbero sottoporsi alla valutazione dello stress ossidativo, anche in condizioni di buona salute e, a maggior ragione, se si è esposti in maniera non episodica a fattori pro-ossidanti (es. stili di vita non corretti, inquinanti nell'ambiente di lavoro ecc.) o si è affetti da patologie croniche degenerative (es. diabete, aterosclerosi, neoplasie, demenza, artrite reumatoide, ecc.) o, infine, si è costretti a subire determinati trattamenti (es. dialisi, by-pass, trapianto d'organo, pillola, radioterapia, chemioterapia, ecc.).

Solo grazie a questa valutazione sarà possibile ottimizzare terapie specifiche e monitorare la reale efficacia di formulazioni antiossidanti, troppo spesso assunte senza che un test ne abbia documentato la reale necessità.

Per ulteriori informazioni contattare

*dr. **Eugenio Luigi Iorio**, MD, PhD al seguente indirizzo:*

eugenioluigi.iorio@alice.it

L'Autore non risponde di eventuali errori presenti in questo volume né dell'uso improprio del suo contenuto