

RADICALI LIBERI e STRESS OSSIDATIVO

Il laboratorio: Metodi di valutazione

Introduzione

Risale al 1900 la scoperta, da parte di Gomberg, dell'esistenza dei Radicali Liberi negli esseri viventi, ma è soprattutto negli ultimi anni che il ruolo clinico dei radicali liberi ha assunto grande rilievo, come fattore causale o esacerbante, nella patogenesi di molte malattie.

Si definisce radicale libero "ogni specie chimica che contenga uno o più elettroni spaiati".

Secondo questa definizione sono da considerarsi Radicali Liberi numerosissime specie chimiche, tuttavia per quantità ed effetti sull'organismo vivente i Radicali Liberi più importanti sono quelli connessi con il metabolismo dell'ossigeno **ROS** (Reactive Oxygen Species), soprattutto il radicale idrossilico **OH•** ed il radicale superossido **O₂•**

L'estrema reattività che caratterizza i Radicali Liberi li porta a combinarsi, con le biomolecole dell'organismo per raggiungere una stabilità energetica ossidandole o riducendole con conseguenze che varieranno secondo il tipo di bersaglio biologico attaccato.

Per contrastare l'azione dannosa dei Radicali Liberi gli esseri viventi hanno sviluppato un potente e multiforme sistema di difesa:

il SISTEMA ANTIOSSIDANTE che è costituito da:

➤ antiossidanti preventivi: proteine in grado di legare e quindi inattivare i metalli di transizione necessari alla formazione dei radicali.

Ferritina, Transferrina, Ceruloplasmina, Albumina.

➤ enzimi antiossidanti: enzimi in grado di catalizzare la conversione dei radicali già formati in molecole meno reattive.

*Superossido-dismutasi (SOD)
Glutazione perossidasi (GPx),
Catalasi*

➤ antiossidanti sacrificali: molecole in grado di reagire con i radicali liberi prima che questi danneggino i bersagli biologici.

*Vitamina E, Vitamina C,
β-carotene.*

➤ enzimi di riparazione: interven-

gono quando il danno biologico è ormai avvenuto.

Enzimi di riparazione del DNA.

In condizioni normali esiste un equilibrio dinamico fra produzione di radicali liberi e antiossidanti. Un aumento patologico dei radicali liberi (per fumo, inquinamento, malattie, dieta incongrua, stress) e/o una diminuzione assoluta o relativa della barriera antiossidante (per diminuito apporto dietetico, malassorbimento, diminuita produzione endogena) può portare ad un forte sbilanciamento creando una situazione che va sotto il nome di **STRESS OSSIDATIVO**, che è causa di danni cellulari che contribuiscono al processo d'invecchiamento ed allo sviluppo di patologie degenerative e croniche.

Dosare i radicali liberi è sempre stato molto problematico dal momento che la loro alta reattività ne rende difficile una loro determinazione diretta.

Oggi sono disponibili test applicabili alla routine di laboratorio per la determinazione dei parametri dello stress ossidativo e del potere

antiossidante di un paziente, mediante un semplice prelievo di sangue.

I LIVELLO

Determinazione di base

ROS Test per la valutazione dei radicali liberi

PAO Test per la valutazione della barriera antiossidante

II LIVELLO

Test specifici di approfondimento

- **ROS settici** (d-ROMs test septic) per la valutazione dei radicali di natura reattiva da stimoli infiammatori
- dosaggio degli antiossidanti preventivi: **ferritina, ceruloplasmina, albumina.**
- dosaggio degli enzimi antiossidanti endogeni: **SOD, catalasi, glutatione perossidasi**
- dosaggio degli antiossidanti esogeni: **Vitamine E, C** e **β -carotene** (Vitamina A)

VITAMINA A

Parlando della Vitamina A, in realtà si deve parlare dei carotenoidi che, della Vitamina A, sono i precursori.

I carotenoidi, potenti sequestratori di radicali dell'ossigeno, costituiscono una famiglia di centinaia di molecole, tra cui una delle più importanti ed attive biologicamente è il β -carotene, che viene assunto attraverso la dieta (verdure verdi, carote, albicocche).

Tra i carotenoidi di grande importanza, quale antiossidante, anche il **LICOPENE**, quasi esclusivamente presente nei pomodori e loro derivati.

III LIVELLO

Test per valutare l'entità del danno biologico ormai avvenuto come

- dosaggio **Anticorpi anti LDlossidate**
- **PerOx**, dosaggio dei lipoperossidi

ROS Test Determinazione dei Radicali Liberi, dell'Ossigeno e dei loro derivati nel siero

Il test, denominato anche d-ROMs, sfrutta la capacità dei radicali di formare nel plasma dei derivati (idroperossidi) dotati di alta reattività chimica ed alto potere ossidante. Questi derivati reagendo con una particolare sostanza sviluppano un complesso colorato misurabile fotometricamente.

I risultati vengono espressi in unità convenzionali arbitrarie U.C.

In base a studi effettuati su soggetti sani si è stabilito che l'intervallo di riferimento, valori normali, varia da 250 a 320 U.C.

È possibile quindi stratificare lo stress ossidativo in classi di rischio:

1. **stato ossidativo normale** 250 - 320 U.C.
2. **lieve stress ossidativo** 321 - 340 U.C.
3. **medio stress ossidativo** 341 - 400 U.C.
4. **forte stress ossidativo** 401 - 500 U.C.
5. **fortissimo stress ossidativo** > 500 U.C.

PAO Potere AntiOssidante o TAS Total Antioxidant Status

Un altro esame, di recente introduzione, e altrettanto importante per l'inquadramento dello stress ossidativo è il **PAO** o **TAS** test.

Questo test valuta, in un soggetto, l'efficacia della barriera antiossidante, globalmente considerata, che è in grado di opporsi all'azione lesiva dei radicali.

ACIDO ASCORBICO (Vitamina C)

La Vitamina C è una vitamina idrosolubile del compartimento plasmatico che assunta attraverso la dieta (alimenti vegetali) viene assorbita a livello intestinale.

La vitamina C ha diverse proprietà antiossidanti grazie alla sua capacità di essere un agente riducente "riciclabile".

La vitamina C funziona da "scavenger" (spazzino) per il radicale superossido e quello idrossilico e si comporta da antiossidante sacrificale nella catena di perossidazione lipidica.

Inoltre la Vitamina C è in grado di rigenerare nella forma attiva la Vitamina E, dopo che questa ha reagito con un radicale libero.

Il principio del test è basato sulla rilevazione della capacità del siero in esame di opporsi ed inibire una cascata di reazioni che portano alla formazione di Radicali Liberi.

L'intervallo di riferimento è compreso tra **1.30 - 1.77 mmol/l**.

Una riduzione al di sotto di questi valori può indicare una diminuzione quantitativa di uno o più componenti del sistema antiossidante, oppure una diminuita funzionalità globale del sistema stesso.

Il dato fornito da questo test se da un lato può essere interpretato come un maggior rischio di andare incontro a determinate patologie; per altri versi permette di identificare stati nutrizionali inadeguati o determinare l'efficacia terapeutica di supplementazioni farmacologiche ad azione antiossidante.

PerOx

L'ossidazione degli acidi grassi negli organismi viventi è nota come LIPOPEROSSIDAZIONE.

Dal momento che i lipidi sono molto suscettibili a questo fenomeno, il danno che deriva dall'azione dei Radicali Liberi può essere massiccio, sia a carico dei lipidi della membrana cellulare, che a carico di alcuni componenti intracellulari (ad esempio: gli acidi nucleici) con conseguente morte della cellula stessa.

La misura dei Lipoperossidi plasmatici è utile per valutare lo stato del danno ossidativo prodotto dai Radicali Liberi.

Mediante un test biochimico effettuato su campioni di siero o plasma è possibile determinare il carico di lipoperossidi circolanti il cui valore di riferimento è stato calcolato **< 350 µmoli/l**

Determinazione degli ANTICORPI anti LDL-OSSIDATE

L'ipercolesterolemia come fattore associato al rischio aterosclerotico è un fenomeno ben documentato.

Il colesterolo che viene accumulato nelle placche ateromatose deriva principalmente dalle lipoproteine a bassa densità (LDL)

Tuttavia recenti studi indicano che nel processo aterosclerotico giocano un ruolo fondamentale le LDL modificate per ossidazione.

L'ossidazione delle LDL è ormai accettata come uno degli eventi critici del processo aterogenetico.

Esistono molte vie biochimiche che danno luogo all'ossidazione delle LDL, tra queste vanno sicuramente annoverati i meccanismi scatenati dai Radicali Liberi.

Una volta ossidate le LDL ven-

RUOLO delle LDL OSSIDATE nella FORMAZIONE della PLACCA ATEROSCLEROTICA

- ❶ Le **LDL** si insediano nello spazio sottoendoteliale delle arterie e subiscono una leggera ossidazione.
- ❷ Le **LDL** così modificate, attraverso chemiotattici stimolano, nella parete dell'arteria, il reclutamento di monociti e la differenziazione in macrofagi.
- ❸ **LDL** subiscono un'ulteriore ossidazione ad opera dei macrofagi.
- ❹ Le **LDL ossidate** vengono internalizzate dai macrofagi dove rilasciano il colesterolo dando origine alle "foam cell" che sono uno degli elementi rappresentativi della lesione aterosclerotica.
- ❺ Le **LDL ossidate** inoltre promuovono la formazione di anticorpi specifici ed i complessi **Anticorpo-LDL ossidate** potenziano la progressione della lesione aterosclerotica.

gono sequestrate più avidamente dai macrofagi dando il via ad una serie di eventi con coinvolgimenti cellulari che portano alla formazione della placca aterosclerotica.

Inoltre le LDL ossidate sono in grado di stimolare una risposta immunitaria specifica dal momento che anticorpi circolanti anti LDL ossidate sono stati dimostrati in molte patologie e soprattutto in pazienti a rischio di aterosclerosi.

Pertanto la determinazione degli anticorpi anti LDL ossidate costituisce un utile strumento di supporto al clinico per una corretta valutazione del contributo delle LDL ossidate in alcune patologie, tra cui quelle cardiovascolari.

Il test viene eseguito su un campione di siero attraverso una metodica ELISA.

I valori di riferimento, suggeriti quale interpretazione dei risultati di laboratorio sono:

< 20 EU/ml Negativo
20-25 EU/ml Indeterminato
>25 EU/ml Positivo

Soggetti a Rischio

I due test di base (ROS e PAO) dovrebbero essere proposti a tutti, in condizione di buona salute, come una sorta di check-up metabolico; chi comunque dovrebbe sistematicamente controllare il suo stato ossidativo sono i pazienti affetti da:

diabete, artrite reumatoide, patologie cardiovascolari, dislipidemie, ipertensione,... inoltre dovrebbero effettuarlo regolarmente i soggetti sottoposti a massivo sforzo muscolare, i forti fumatori, le donne che assumono estroprogestinici.

Dr.ssa M. Razzano
*Laboratorio Analisi
Ospedale di Merate*

Radicali Liberi e Capelli

La crescita ed il ricambio dei capelli è regolato da cicli di *mitosi* ed *apoptosi* che avvengono a livello delle cellule germinative del bulbo pilifero.

L'eccesso di Radicali Liberi può determinare una significativa azione tossica a carico di componenti cellulari.

Sono soprattutto la perossidazione dei lipidi della membrana e le

modifiche delle basi puriniche e pirimidiniche del DNA che hanno effetti sulla vita media delle cellule.

In particolare i radicali $O_2\bullet$ e $OH\bullet$ danneggiano le strutture proteiche e lipidiche del bulbo dando inizio ad una serie di reazioni a catena che determinano processi degenerativi a carico del follicolo del capello.

La somma dei danni da Radicali Liberi, interferendo pesantemente sulla ciclicità delle mitosi, danno

origine a capelli deboli, sofferenti, poco elastici e che si sfibrano facilmente; oltre che rendere i capelli vulnerabili ad aggressioni esterne e a squilibri organici e metabolici.

Uno studio condotto dalla Clinica Dermatologica dell'Università di Bologna ha evidenziato che integrare la dieta con aminoacidi solforati ed oligoelementi può portare ad una significativa protezione del capello contro gli stress ossidativi.

α -TOCOFEROLO (Vitamina E)

Il maggior costituente del gruppo di composti ad attività biologica che va sotto il nome di Vitamina E.

Captatore di radicali liberi a livello delle membrane e delle lipoproteine ne previene il danno ossidativo

Principale fonte di Vitamina E sono i grassi, gli oli ed in misura minore alcuni vegetali.

La Vitamina E è un potente antiossidante sacrificale che dopo la reazione con i ROS viene rigenerata nella forma attiva iniziale per opera del Glutatione e della Vitamina C.

Tè verde La leggenda narra che un giorno un imperatore della Cina fece preparare dell'acqua calda per cercare di alleviare dei terribili dolori addominali; alcune foglie di tè caddero da un vicino cespuglio dentro l'acqua in ebollizione: l'imperatore rimase colpito in un primo momento dal gusto delizioso di quell'acqua e poi dal fatto che i suoi dolori erano magicamente scomparsi; fu dimostrata così, per la prima volta, l'efficacia terapeutica del tè verde!

Il tè verde è una sostanza millenaria originaria della Cina e deriva dalla stessa pianta da cui deriva anche il più noto (per noi occidentali) tè nero: la *camellia sinensis*. Le foglie di tè verde, a differenza di quanto accade per il tè nero, vengono sottoposte ad un procedimento che impedisce la fermentazione e quindi la perdita di un particolare gruppo di sostanze ad elevato potere antiossidante denominate **catechine**.

Queste sostanze hanno una capacità antiossidante 100 volte superiore a quella della vitamina C. Oggi, numerose ricerche in vitro e sull'animale, nonché studi epidemiologici prospettici, hanno dimostrato i benefici effetti di queste sostanze ed in particolare dell'*epigallocatechin-gallato* nella prevenzione delle malattie cardiovascolari (soprattutto attraverso un meccanismo di inibizione dell'ossidazione delle LDL) e tumorali (con un pronunciato effetto di inibizione della crescita ed induzione dell'apoptosi nelle cellule cancerose).

Centro Analisi Monza

MONZA:

Laboratorio analisi, piazza Trento e Trieste, 11 (tel. 0392397350)

Centro polidiagnostico, via Missori, 9 (tel. 0392397.1)

Sezione ecologia, via Missori, 12 (tel. 0392397247)

BRESSO: via XXV Aprile, 16 (tel. 026104946)

CESANO MADERNO: via Como, 4 (tel. 0362540550)

DESIO: via Pozzo Antico, 24 (tel. 0362623156)

SEREGNO: piazza Risorgimento, 21 (tel. 0362234251)

VAREDO: via Italia angolo S. Aquilino (tel. 0362582945)

VILLASANTA: piazza Giovanni XXIII, 12 (tel. 039302366)