

H&D srl

La misurazione dello stress ossidativo

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

Gennaio, 2016



FRAS 5

INDICE

1 Lo stress ossidativo. Un nuovo fattore di rischio per la salute.	Pagina 7
1. Che cosa è lo stress ossidativo	Pagina 7
2. Che cosa sono i radicali liberi?	Pagina 7
3. Che cosa sono gli antiossidanti?	Pagina 7
4. Quali sono le cause che provocano un aumento della produzione dei radicali liberi?	Pagina 7
5. Quali sono le cause che provocano un abbassamento delle difese antiossidanti?	Pagina 7
6. Perché i radicali liberi sono potenzialmente dannosi?	Pagina 8
7. Qual'è il meccanismo più comune attraverso il quale i radicali liberi inducono le caratteristiche alterazioni molecolari e cellulari tipiche dello stress ossidativo?	Pagina 8
8. Esiste una correlazione tra alterazioni biochimiche e quadri clinici?	Pagina 8
9. Come si manifesta, clinicamente, lo stress ossidativo?	Pagina 9
2 Lo stress ossidativo. Aspetti diagnostici generali.	Pagina 11
10. Ai fini di una corretta diagnosi, lo stress ossidativo va considerato come una comune malattia?	Pagina 11
11. Le classiche analisi di laboratorio (es. Uricemia, albuminemia, VES, PCR, ect.) possono consentire al clinico di porre una diagnosi di stress ossidativo?	Pagina 11
12. I comuni test per le intolleranze alimentari possono fornire indicazioni sull'esistenza di una condizione di stress ossidativo?	Pagina 11
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?	Pagina 11
14. Su quale principio generale si basano i test attualmente disponibili (EPR/ESR esclusa) per valutare specificamente lo stress ossidativo?	Pagina 11
15. Quali sono i test specifici attualmente disponibili in commercio per la valutazione dello stress ossidativo?	Pagina 12
16. Per un'affidabile valutazione dello stress ossidativo è preferibile effettuare i test su sangue oppure su urina?	Pagina 12
17. Quali sono le caratteristiche del test ideale per la valutazione dello stress ossidativo?	Pagina 12
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?	Pagina 12
19. Qual'è il panel di test che si sta dimostrando particolarmente utile nella valutazione routinaria dello stress ossidativo?	Pagina 13
20. Qual'è l'aspetto più innovativo del d-ROMs test e del PAT test?	Pagina 13
3 La valutazione dello stato antiossidante: il d-ROMs test.	Pagina 14
21. Che cosa è il d-ROMs fast test?	Pagina 14
22. Che cosa misura il d-ROMs fast test?	Pagina 14
23. Che cosa sono i ROMs?	Pagina 14
24. Su quali campioni biologici si può eseguire il d-ROMs fast test?	Pagina 14
25. E' consentito l'uso di anticoagulanti al momento del prelievo?	Pagina 14
26. Per quanto tempo può essere conservato il sangue fresco prima di essere sottoposto al d-ROMs test?	Pagina 14
27. E' possibile effettuare il d-ROMs fast test su campioni di siero o plasma congelati e, eventualmente, dopo aver ripetutamente congelato e scongelato i campioni?	Pagina 14
28. Su quali campioni biologici NON VA ESEGUITO il d-ROMs fast test?	Pagina 14
29. Qual'è la procedura più comune per eseguire il d-ROMs fast test?	Pagina 14
30. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del d-ROMs test?	Pagina 15
31. Qual'è il principio del d-ROMs fast test?	Pagina 15
32. Quali sono le evidenze a favore del meccanismo di reazione proposto per il d-ROMs fast test ovvero con quale tecnica è stato validato il test?	Pagina 15
33. E' possibile che il segnale fotometrico (variazione di assorbanza a 505 nm) sviluppato nel corso dell'esecuzione del d-ROMs fast test sia dovuto ad altri agenti/attività ossidanti, oltre che ai radicali liberi, alcoxilici e idroperossilici, generati dalla scissione ferro-dipendente degli idroperossidi?	Pagina 15
34. Come vengono espressi i risultati del d-ROMs fast test e qual'è il loro range di normalità?	Pagina 16
35. A quanto equivale UNA UNITA' CARR?	Pagina 16
36. Qual'è il significato delle unità CARR del d-ROMs fast test?	Pagina 16
37. 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?	Pagina 16
38. Differenti valori del d-ROMs fast test corrispondono ad altrettanti livelli di stress ossidativo?	Pagina 16
39. Quali sono le performance analitiche del d-ROMs fast test?	Pagina 17
40. I risultati del d-ROMs fast test variano in funzione del tipo di prelievo?	Pagina 17
41. Quale volume di campione di sangue è generalmente richiesto per effettuare il d-ROMs fast test?	Pagina 17
42. I risultati del d-ROMs fast test variano in funzione dell'età, del sesso, della razza, o di altre condizioni, fisiologiche o parafisiologiche?	Pagina 17

43. I risultati del d-ROMs fast possono cambiare nel corso della giornata o, comunque, nel medio-lungo termine?	Pagina 17
44. Il d-ROMs fast test deve essere effettuato a digiuno?	Pagina 18
45. Esistono dati relativi ai valori di normalità in specie animali?	Pagina 18
46. A quali principi generali bisogna fare riferimento nell'interpretazione dei risultati del d-ROMs test?	Pagina 18
47. A quale dei test attualmente disponibili all'uso clinico routinario può essere in qualche modo ricondotto o assimilato il d-ROMs fast test?	Pagina 18
48. Qual'è l'informazione principale che il d-ROMs fast test fornisce al clinico?	Pagina 18
49. Come si colloca il d-ROMs fast test nel contesto attuale dell'offerta di metodiche per la valutazione dello stress ossidativo?	Pagina 19
50. Sono state osservate correlazioni tra i risultati del d-ROMs fast test e quelli di altri test proposti per la valutazione dello stress ossidativo?	Pagina 19
51. Quali sono le "indicazioni" ovvero quali soggetti il clinico deve sottoporre al d-ROMs fast test	Pagina 19
52. Il d-ROMs fast test può essere considerato un test "predittivo" di malattia?	Pagina 19
53. In quali condizioni cliniche o patologiche il d-ROMs fast test si è dimostrato finora utile?	Pagina 20
54. In sintesi, quali sono i punti di forza del d-ROMs fast test, secondo l'Osservatorio Internazionale dello Stress ossidativo, dei radicali Liberi e dei Sistemi Antiossidanti?	Pagina 21
4 Valutazione del potenziale antiossidante: il PAT test	Pagina 22
55. Che cosa è il PAT test?	Pagina 22
56. Che cosa misura il PAT test?	Pagina 22
57. Su quali campioni biologici si può eseguire il PAT test?	Pagina 22
58. E' consentito l'uso di anticoagulanti al momento del prelievo?	Pagina 22
59. Per quanto tempo può essere conservato il sangue fresco prima di essere sottoposto al PAT test?	Pagina 22
60. E' possibile effettuare il PAT test su campioni di siero o plasma congelati e, eventualmente, dopo aver ripetutamente congelato e scongelato i campioni?	Pagina 22
61. Su quali campioni NON VA ESEGUITO il PAT test?	Pagina 22
62. Qual'è la procedura più comune per eseguire il PAT test?	Pagina 23
63. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del PAT test?	Pagina 23
64. Qual'è il principio del PAT test	Pagina 23
65. Quali sono le evidenze a favore del meccanismo di reazione proposto per il PAT test ovvero con quale tecnica è stato validato il test?	Pagina 23
66. Come vengono espressi i risultati del PAT test e qual'è il loro range di normalità?	Pagina 23
67. Differenti valori del PAT corrispondono ad altrettanti differenti livelli di compromissione della barriera antiossidante plasmatica?	Pagina 24
68. Quali sono le performance analitiche del PAT?	Pagina 24
69. I risultati del PAT test variano in funzione del tipo di prelievo?	Pagina 24
70. Quale volume di plasma/siero è generalmente richiesto per effettuare il PAT test?	Pagina 24
71. I risultati del PAT test variano in funzione dell'età, del sesso, della razza o di altre condizioni fisiologiche o para-fisiologiche?	Pagina 24
72. Il PAT test deve essere effettuato a digiuno?	Pagina 24
73. Esistono dati relativi ai valori di normalità in specie animali?	Pagina 24
74. A quali principi generali bisogna fare riferimento nell'interpretazione dei risultati del PAT test?	Pagina 24
75. A quale dei test attualmente disponibili nell'uso routinario può essere in qualche modo ricondotto o assimilato il PAT test?	Pagina 24
76. Qual'è l'informazione principale che il PAT test fornisce al clinico?	Pagina 25
77. Come si colloca il PAT test nel contesto dell'attuale offerta di metodiche per la valutazione dello stato antiossidante	Pagina 25
78. Sono state osservate correlazioni tra i risultati del PAT test e quelli di altri test proposti per la valutazione dello status antiossidante?	Pagina 25
79. Quali sono le "indicazioni" ovvero quali soggetti il clinico deve sottoporre al PAT test?	Pagina 25
80. In quali condizioni cliniche o patologie il PAT test si è dimostrato finora utile?	Pagina 25
81. In sintesi, quali sono i punti di forza del PAT test, secondo l'Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo, dei Radicali Liberi e dei Sistemi antiossidanti?	Pagina 26
5 La valutazione del potenziale antiossidante: il SAT test	Pagina 27
82. Che cosa è il SAT test?	Pagina 27
83. Cosa misura il SAT test?	Pagina 27
84. Qual'è la procedura più comune per eseguire il SAT test?	Pagina 27
85. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del PAT test?	Pagina 27
86. Qual'è il principio del SAT test?	Pagina 27

87. Quali sono le evidenze a favore del meccanismo di reazione proposto per il SAT test, ovvero con quale tecnica è stato validato il test?	Pagina 27
88. Come vengono espressi i risultati del SAT test e qual è il loro range di normalità?	Pagina 28
89. Differenti valori del SAT test corrispondono ad altrettanti differenti livelli di compromissione della barriera antiossidante della saliva?	Pagina 28
90. Quali sono le performance analitiche del SAT test?	Pagina 28
91. Quale volume di saliva è generalmente richiesto per effettuare il SAT test?	Pagina 28
92. Il SAT test deve essere effettuato a digiuno?	Pagina 28
6 OSI e Index	Pagina 29
93. Cos'è OSI Redox?	Pagina 29
94. A cosa serve OSI Redox?	Pagina 29
95. Su quale principio di basa OSI Redox?	Pagina 29
96. Perché è necessario tener conto dell'assunzione di integratori in caso di valori elevati di PAT?	Pagina 29
97. Quali sono i valori ideali di OSI Redox?	Pagina 29
98. Come si calcola il valore di OSI Redox?	Pagina 30
99. OSI Redox sostituisce la valutazione dei valori d-ROMs e PAT?	Pagina 30
7 La strumentazione dedicata: il sistema FRAS 5.	Pagina 31
103. Che cosa è il FRAS 5?	Pagina 31
104. Quali sono le principali caratteristiche del FRAS 5?	Pagina 31
105. Qual'è l'aspetto tecnologico più innovativo del FRAS 5?	Pagina 31
106. In che modo il FRAS 5 gestisce le varie fasi delle procedure analitiche?	Pagina 31
107. Il FRAS 5 prevede operazioni di taratura per il mantenimento degli standard di precisione e di ripetibilità?	Pagina 31
108. In che modo il FRAS 5 gestisce la presentazione dei risultati?	Pagina 31
109. Esistono studi scientifici eseguiti con il FRAS 5?	Pagina 31
110. In sintest, quali sono i punti di forza del sistema FRAS 5, secondo l'Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo, dei Radicali Liberi e dei Sistemi antiossidanti?	Pagina 31
8 La gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica	Pagina 33
111. Qual'è il razionale che è alla base della valutazione dello stress ossidativo?	Pagina 33
112. Qual'è l'iter iniziale che il clinico deve seguire – disponendo della possibilità di sottoporre il proprio paziente al d-ROMsfast test e al PAT test – per passare dall'ipotesi alla formulazione di una diagnosi di stress ossidativo?	Pagina 33
123. Caso 1: i risultati di ambedue i test, d-ROMs fast e PAT test, sono al di sotto della norma. Qual'è la possibile interpretazione?	Pagina 34
114. Caso 2: il risultato del d-ROMs fast è al di sotto della norma mentre quello del PAT test risulta ottimale. Qual'è la possibile interpretazione?	Pagina 34
115. Caso 3: i risultati di ambedue i test, d-ROMs fast e PAT test, sono nei limiti della norma. Qual'è la possibile interpretazione?	Pagina 34
116. Caso 4: il risultato del d-ROMs fast è nella norma mentre quello del PAT test è inferiore alla norma. Qual'è la possibile interpretazione??	Pagina 34
117. Caso 5: il risultato del d-ROMs fast è al di sopra della norma mentre quello del PAT test risulta ottimale. Qual'è la possibile interpretazione?	Pagina 34
118. Caso 6: il risultato del d-ROMs fast è al di sopra della norma mentre quello del PAT test è al di sotto della norma. Qual'è la possibile interpretazione?	Pagina 34
119. Caso 7: il risultato del d-Roms fast è al di sopra della norma e anche il risultato del PAT è al di sopra della norma. Qual è la possibile interpretazione?	Pagina 34
120. In che modo il clinico può gestire ciascuna delle 6 situazioni?	Pagina 34
121. Qual'è la strategia generale che il clinico dovrà seguire nei casi di palese stress ossidativo?	Pagina 35
122. Quali sono le attuali tendenze in tema di prevenzione e trattamento dello stress ossidativo?	Pagina 35
123. Quali sono i criteri fondamentali per la scelta di una corretta supplementazione	Pagina 35
124. Esistono, come nella moderna dietologia, software in grado di aiutare il clinico nella gestione del paziente con stress ossidativo?	Pagina 35
125. Qual'è il core di OB MANAGER?	Pagina 35
126. OB MANAGER dispone di particolari utility?	Pagina 36
127. OB MANAGER si può installare su qualsiasi PC senza particolari accorgimenti?	Pagina 36
128. Se, nonostante tutti gli accorgimenti, un trattamento "antiossidante" sembra non in grado di abbassare i livelli di stress ossidativo, cosa può fare il clinico?	Pagina 36
9 Considerazioni conclusive	Pagina 37

1. Lo stress ossidativo. Un nuovo fattore 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 abnormemente 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.).

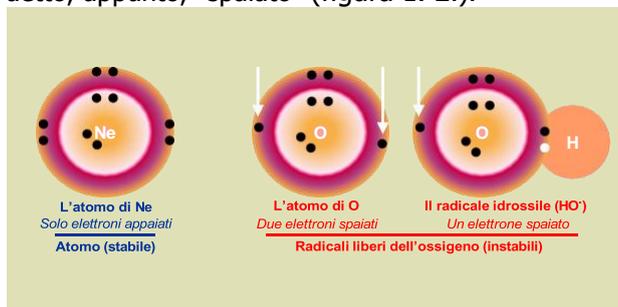


Figura 1. 2. Atomi e radicali.

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, inve-

ce, quali ad esempio le vitamine C ed E, sono esogeni, cioè devono essere introdotti dall’esterno, per esempio con una corretta alimentazione.

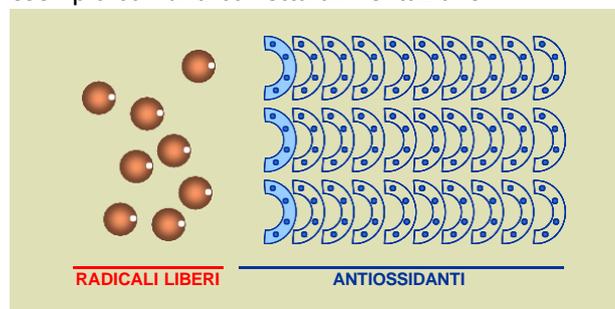


Figura 1. 3. Il sistema di difesa antiossidante.

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, comunemente 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.).

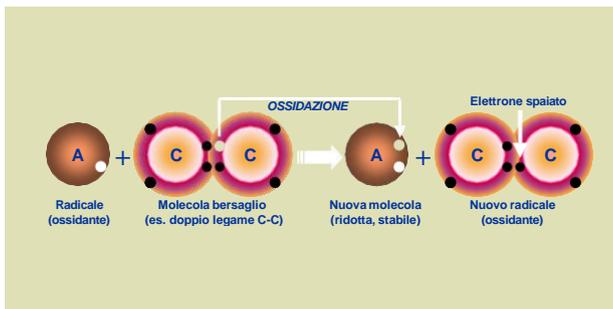


Figura 1. 4. Meccanismo d'azione dei radicali liberi.

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.).

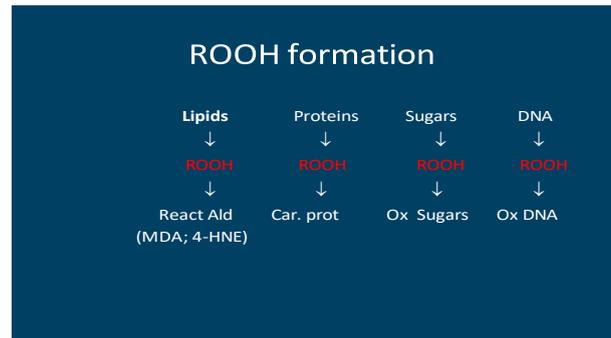


Figura 1. 5. Modello di danno da idroperossidi.

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^\bullet), 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^\bullet) e perossilici (ROO^\bullet), in definitiva responsabili di lesioni ossidative a carico sia dell'endotelio che di componenti plasmatiche, quali le LDL. È 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.).

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

Lo stress ossidativo, essendo una condizione squisitamente biochimica, non dà luogo a manife

stazioni 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 fast test ed il PAT test.

Tabella 1. 3. Patologie più frequentemente associate allo stress ossidativo

1. Aceruloplasminemia	32. Disfunzione erettile	61. Obesità
2. Amiloidosi sistemica	33. Dislipidemie	62. Osteoartrosi
3. Anemia falciforme	34. Displasia broncopolmonare 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 retrolenticolare	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 teleangectasia	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-pass cardiopolmonare	49. Ischemia/ictus cerebrale	78. Sindrome da fatica cronica
19. Cancro del polmone	50. Leishmaniosi 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.

Elettrone 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 (alcossili 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 co-



stiscono esempi il ferro (disponibile nella forma ferrosa, ridotta, Fe^{2+} e nella forma ferrica, ossidata, Fe^{3+}) ed il rame (disponibile nella forma rameosa, ridotta, Cu^+ , e nella forma rameica, ossidata, Cu^{2+}) che, in forma libera, scindono gli idroperossidi generando radicali liberi (alcoossile e perossile).

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 predeterminata, 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: metabolico 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 dei radicali $R\cdot$, idroperossido e lipoperossido.

Plasmamembrana: sinonimo di membrana cellulare.

Radicale alcoossile: radicale altamente reattivo centrato sull'ossigeno derivante generalmente dalla decomposizione ferrocatalizzata 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.

2. 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 fast test	PAT test
TBAR test (MDA)	BAP 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 esprimono 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. E' possibile misurare lo stress ossidativo nella saliva?

E' stato ideato recentemente un test denominato SAT (Salivary Antioxidant Test) che permette di valutare gli antiossidanti nella saliva in un tempo molto breve.

20. Qual è l'aspetto più innovativo del d-ROMs fast test, del PAT test e del SAT?

L'aspetto più interessante e innovativo consiste nel fatto che è possibile eseguire questi test grazie ad apparecchi dedicati di facile uso, quali il sistema FRAS (sviluppato da H&D s.r.l., Parma) ideato da Fabrizio Callegari.

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

21. Che cosa è il d-ROMs fast test?

Il d-ROMs fast 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 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.

22. Che cosa misura il d-ROMs test?

Il d-ROMs fast test consente, sostanzialmente, di determinare la concentrazione ematica di tutte le sostanze appartenenti all'ampia classe dei cosiddetti metaboliti reattivi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Metabolites, ROMs).

23. Che cosa sono i ROMs?

I ROMs sono composti generati dall'ossidazione di un'ampia classe di molecole di interesse biologico (glucosidi, lipidi, amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, ecc) che, in opportune condizioni, possono generare radicali liberi.

Per questo motivo, essi sono considerati non solo "testimoni" ma anche indicatori ("marker") specifici di attività ossidante.

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

Il d-ROMs fast 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.

25. 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).

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

12 ore a temperatura ambiente e 48 ore in frigo (4°C), 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.

27. E' possibile effettuare il d-ROMs fast 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 fast test può essere eseguito su campioni congelati di siero o plasma, anche dopo più cicli di congelamento-scongelo, senza incorrere in errori statisticamente significativi.

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

Il d-ROMs fast test non può essere eseguito sulle urine né sulla saliva.

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

La procedura più comune impiegata per eseguire il d-ROMs fast test prevede la diluizione di una piccola quantità di plasma sanguigno (generalmente di origine capillare, prelevato per digitopuntura) in una soluzione di lavoro composta da un tampone acido e da una soluzione catalizzante. A questa soluzione di aggiunge un'ammina aromatica ossidabile (condensata) incolore (cromogeno) e, infine, viene eseguita la misura per via fotometrica della variazione dell'assorbanza (espressione del viraggio del cromogeno verso il rosa) nell'unità di tempo.

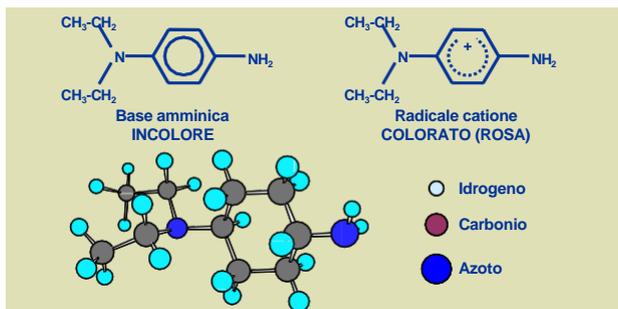


Figura 3. 1. Le due forme del cromogeno del d-ROMs fast test.

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

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

31. Qual è il principio del d-ROMs fast test?

Il d-ROMs fast test si basa sull'applicazione "in provetta" di quello che si osserva nel vivente, a livello del microcircolo (vedi figura 3.1). 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).

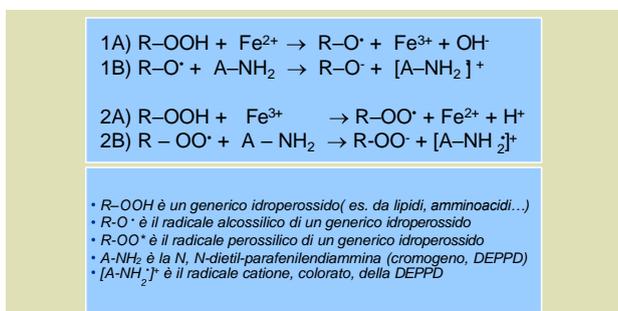


Figura 3. 2. Il principio biochimico su cui si basa il d-ROMs fast test.

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).

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

Le evidenze a favore del fatto che il d-ROMs fast 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 da Alberti e collaboratori (www.isof.cnr.it/radpol/personale/alberti_ita.pdf) (figura 3. 3).

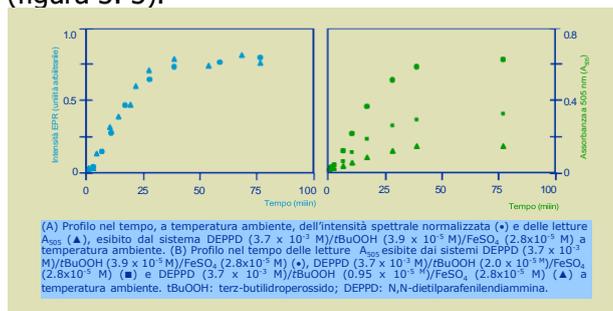


Figura 3. 3. Evidenza conclusiva di validazione del d-ROMs mediante spettroscopia di risonanza dell'elettrone (ESR/EPR): il radicale catione della N,N-dietilparafenilendiammina, responsabile dello spettro ESR, è anche responsabile dell'assorbimento nel visibile a 505 nm rilevato per via fotometrica.

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.

33. E' possibile che il segnale fotometrico (variazione di assorbanza a 505 nm) sviluppato nel corso dell'esecuzione del d-ROMs fast 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 fast 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 fast 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 fast 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 fast 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.

34. 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 fast test sul siero di un campione di circa 5000 soggetti clinicamente sani ha mostrato una distribuzione simil-gaussiana (figura 3. 4.).

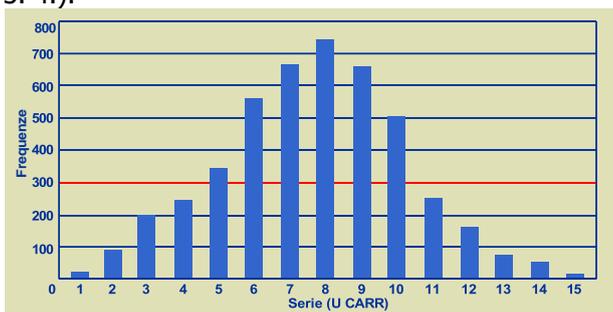


Figura 3. 4. Distribuzione dei valori del d-ROMs fast test in un campione di soggetti adulti clinicamente sani.

Su queste basi, valori di $\Delta A_{505/min}$ compresi tra 0.020 e 0.024 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 (%)
-				
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
Tota			4547	100.0

Figura 3. 5. Valori del d-ROMs fast 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. Ciò giustifica il range di normalità stabilito in via definitiva come compreso fra 250 e 300 U CARR.

35. A quanto equivale UNA UNITA' CARR?

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

36. 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 e tali unità sono state adottate da migliaia di ricercatori nel mondo, diventando l'unità di misura della comunità scientifica internazionale.

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 troverebbero alcuna corrispondenza biochimico-clinica.

37. 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 fast 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 μ mol/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 terzbutilidroperossido – lontane dai range usuali delle

analisi chimico-cliniche (es. glicemia e colesterolemia).

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

Sì, secondo una ben precisa scala 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		

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

I risultati di numerosi studi, anche recentissimi, indicano che il d-ROMs fast test è un test affidabile, preciso, ripetibile, con un CV inter ed intraserie 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.

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

Evidenze di laboratorio hanno dimostrato che, nel caso di prelievo venoso in assenza di anticoagulanti, si osserva una sovrastima dei risultati ottenuti con il d-ROMs test ed una potenziale sottostima dei valori di PAT. Se non si vuole procedere con il prelievo capillare, si consiglia di effettuare il prelievo venoso in eparina e centrifugare direttamente il sangue per ottenere il plasma da impiegare nelle analisi dello status redox. Si ricorda che l'unico anticoagulante consentito è l'eparina, in quanto citrati ed EDTA interferiscono con le reazioni..

41. 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.

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

In assenza di malattia, i risultati del d-ROMs fast 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 comorbilità associate alla senescenza. Lo stesso discorso vale per il sesso; la discrepanza tra uomini e donne, (valori più alti) talvolta riscontrata in ampie casistiche, è da attribuirsi a varie cause; prima di tutte il ciclo mestruale. Infatti è stato riscontrato in donne sane eumenorroidiche un aumento di stress ossidativo che raggiunge il picco massimo in corrispondenza del massimo livello raggiunto dagli estrogeni. Inoltre un'altra significativa differenza si riscontra nella donna gravida (valori più elevati) rispetto a quella non gravida. Differenze in funzione della razza di appartenenza sono state anche osservate, con i neri 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.

43. I risultati del d-ROMs fast test possono cambiare nel corso della giornata o, comunque, nel medio-lungo termine?

In assenza di malattia e di altri eventi fisiologici o parafisiologici in grado di provocare un significativo aumento dello stress ossidativo, il risultato del d-ROMs fast 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).

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

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

45. 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 fast 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.

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

I principi generali sono contenuti in apposite linee-guida, dove l'utente ha la possibilità sia di riportare 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 fast test sono i processi infiammatori, le turbe della respirazione cellulare, le oscillazioni della pressione parziale di ossigeno e le intossicazioni in generale.

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

Il d-ROMs fast 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 fast 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 fast 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 fast 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.

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

Il d-ROMs fast 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 fast 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 antiossi-

dante al protocollo terapeutico in atto al fine di riportare nella norma il d-ROMs fast test.

Ovviamente, avere i valori del d-ROMs fast 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.

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

Sicuramente il d-ROMs fast test si presenta come il test più affidabile attualmente disponibile per la valutazione dello stato ossidante nella pratica clinica. Infatti, esso è variamente diffuso in circa 50 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.

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

Tra tutti i test, il d-ROMs fast 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 fast 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 fast test fornisce risultati più precoci ed affidabili, mentre rispetto agli isoprostani, almeno quando determinati per via immunologica, esso appare più specifico.

51. Quali sono le "indicazioni" ovvero quali soggetti il Clinico deve sottoporre al d-ROMs fast 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. Appare evidente che al d-ROMs fast 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 fast 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 fast 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 fast 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 fast 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 fast 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. Le 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.

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

Sì, per esempio per le malattie cardiovascolari. Infatti, uno studio condotto presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche di Pisa ha inequivocabil-

mente 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 fast test possa essere predittivo di altre patologie che, come la malattia cardiovascolare o l'epatite virale C, sono correlate con lo stress ossidativo.

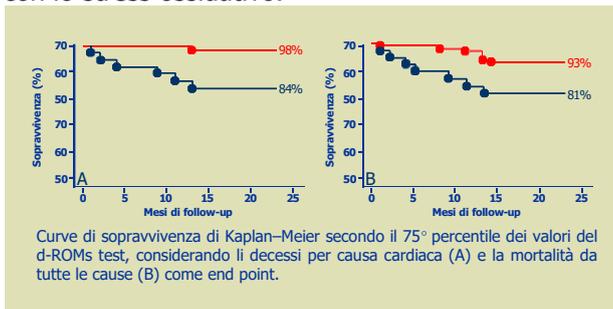


Figura 3. 7. Significato predittivo del d-ROMs fast test: ridotta sopravvivenza da cause cardiovascolari e non nei soggetti con elevati valori di d-ROMs fast test rispetto ai soggetti con valori del test nella norma.

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

Sulla base della letteratura scientifica disponibile (centinaia di lavori), il d-ROMs fast 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 fast 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 fast 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'ozonoterapia, la terapia iperbarica e la somministrazione transcutanea di un estratto di ginkgo biloba. Nel campo dell'andrologia, il d-ROMs fast 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 fast 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 va-

scolari periferiche, all'insufficienza venosa, e ad altre vasculopatie, secondo quanto riportato dai numerosi trial clinici. Secondo l'autorevole rivista *Circulation* il d-ROMs fast 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 fast 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 fast test. Lo stress ossidativo associato ad epatopatie è stato recentemente valutato con successo mediante il d-ROMs fast 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 fast 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 fast 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 fast 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 fast 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 fast test nel monitoraggio dello stress ossidativo nel campo della nutrizione, del metabolismo e del ricambio; in particolare, un alterato bilancio ossidativo è stato riscontrato nei forti bevitori, ne-

gli obesi, nei diabetici, e nei dislipidemici (figura 3.8).

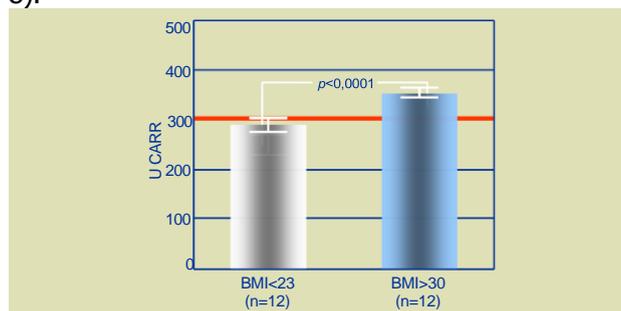


Figura 3. 8. Valori del d-ROMs fast test significativamente più elevati negli obesi, rispetto ai controlli normopesi (BMI, Body Mass Index, indice di massa corporea).

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 fast 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 fast 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 fast 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 football, si sono accompagnate generalmente ad un aumento dei livelli del d-ROMs fast test dopo la prestazione; inoltre, il d-ROMs fast test si è dimostrato utile nel monitorare l'efficacia di trattamenti antiossidanti negli atleti.

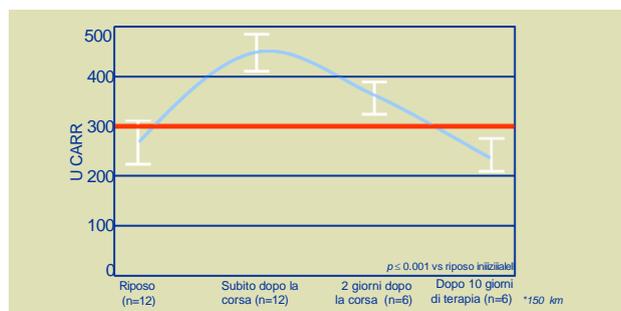


Figura 3. 9. Cinetica del d-ROMs test in una gara ciclistica di gran fondo (terapia: AR_D Stenovit, flaconcini orali, UID).

54. In sintesi, quali sono i punti di forza del d-ROMs fast test?

Dopo un'analisi accurata della letteratura scientifica disponibile e dell'esperienza clinica accumulata negli ultimi 15 anni, riteniamo che il d-ROMs fast test deve entrare a far parte dell'armamentario del clinico con la finalità di aiutare questi a migliorare la qualità e, eventualmente, la durata della vita, dei suoi pazienti. Infatti, contrariamente a qualsiasi altro test disponibile attualmente in commercio, il d-ROMs fast test è l'unico che:

- consente di valutare il livello di idroperossidi, marcatori e amplificatori del danno ossidativo, prodotti dall'attacco da parte dei radicali liberi, di un'ampia classe di sostanze (non solo i lipidi, ma anche i glucosidi, gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi, etc.);
- è stato validato con la spettroscopia di risonanza dell'elettrone (ESR/EPR), ritenuta la tecnica "golden standard" per lo studio dei radicali liberi;
- esibisce eccellenti performance analitiche, in termini di precisione, accuratezza, sensibilità, specificità, ripetibilità;
- esprime i risultati in unità specifiche ed originali, le UNITA' CARR, universalmente riconosciute dalla comunità scientifica internazionale, e accette dai clinici per la loro estrema utilità pratica;
- è di semplice esecuzione, richiede pochi minuti ed un'attrezzatura semplicissima (un semplice fotometro) ed è il test più veloce esistente, con **un tempo di lettura di 2'30"**.
- ha un solidissimo back-ground scientifico, documentato da circa 700 articoli, molti dei quali su riviste peer-reviewed;
- è utilizzato in oltre 50 Paesi del Mondo, presso importanti strutture sanitarie e accademiche (in Italia, esso è in uso, tra l'altro, presso le Università di Milano, Siena, Roma, Napoli, Catania etc., presso l'Istituto Superiore di Sanità, il Consiglio Nazionale delle Ricerche, etc.);
- ha ricevuto apprezzamenti dalla Comunità Scientifica Internazionale, al punto di essere stato inserito nella prestigiosa rivista *Circulation* fra i marker emergenti di primo evento aterotrombotico e di essere stato scelto come test di riferimento dall'International Union of Angiology;
- è realmente in uso nella pratica clinica in numerosissime strutture sanitarie, anche ambulatoriali, sia in Italia che all'Estero;
- offre al clinico la possibilità di gestire concretamente il suo uso mediante specifiche linee guida, ora rese disponibili sotto forma di software (OB MANAGER®);
- ha un rapporto costo-benefici decisamente favorevole.

4. La valutazione del potenziale antiossidante: il PAT test.

A livello ematico, la difesa nei confronti dell'attacco lesivo delle specie reattive (SR), e in particolar modo, delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), 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 ossido-riduzione, all'azione "ossidante" ascritta alle SR. 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'insorgere 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 del ferro dallo stato ferroso a 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 il Prof. Umberto Cornelli ha sviluppato il PAT test.

55. Che cosa è il PAT test?

Il PAT test, test per la determinazione del potere antiossidante plasmatico (Plasma Antioxidant Test), 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.

56. Che cosa misura il PAT test?

Il PAT test consente, sostanzialmente, di determinare la concentrazione ematica delle sostanze antiossidanti idrosolubili nella loro accezione di agenti in grado di ridurre il ferro dalla forma ferrica a quella ferrosa. Il PAT test è un test innovativo che sfrutta la medesima reazione utilizzata nel FRAP test e nel BAP test, ma che è stata opportunamente migliorata in termini di: tempo di esecuzione (1 minuto), precisione (maggiore) e basso costo. Il nuovo test permette quindi una valutazione della capacità antiossidante del plasma in maniera semplice, precisa e veloce. Il PAT test, con la sua specifica

formulazione, permette di eliminare l'interferenza dei fosfati presenti nel sangue e di rilevare la quantità reale di antiossidanti. Il test è estremamente sensibile alle variazioni di AOs legati ad una patologia di interesse clinico ma, come per altri test per la misurazione dello stato antiossidante (per esempio TAS, CUPRAC, TRAP o l'ORAC test), il PAT test non è stato progettato per fornire alcuna informazione circa la concentrazione di un singolo antiossidante perché questa da sola avrebbe scarsissimo valore clinico, ma per quantificare la riserva antiossidante.

57. Su quali campioni biologici si può eseguire il PAT test?

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

58. 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).

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

12 ore a temperatura ambiente, 48 ore in frigorifero (+4°C), secondo le GMP di laboratorio per prelievi su sangue intero, avendo cura di usare delle provette eparinate (fornite nel kit del FRAS 5) 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.

60. E' possibile effettuare il PAT 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 PAT 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.

61. Su quali campioni biologici NON VA ESEGUITO il PAT test?

Il PAT test non può essere eseguito sulle urine.

62. Qual è la procedura più comune per eseguire il PAT test?

La procedura più comune impiegata per eseguire il PAT 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 (presenti come soluzioni predosate e monouso nel kit dedicato per FRAS). 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.

63. Esistono particolari accorgimenti da usare per evitare alcuni errori nel corso dell'esecuzione del PAT 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 PAT test.

64. Qual è il principio del PAT test?

Il PAT 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. Queste sostanze non sono altro che gli antiossidanti (ed in particolare gli antiossidanti idrosolubili) presenti nel campione biologico in esame.

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

Il PAT test fornisce una valutazione quantitativa della capacità antiossidante complessiva del plasma, misurata come potenzialità riducente nei confronti dello ione ferrico. Il "potere antiossidante" è garantito da varie sostanze, alcune delle quali esibiscono

un'attività di tipo scavenger, ossia neutralizzano i radicali liberi interagendo direttamente con essi.

D'altro canto, il PAT test è sostanzialmente una variante semplificata dei ben noti e diffusi BAP test e FRAP assay, test comunemente usati per la determinazione dell'attività plasmatica ferro-riducente. In prove di laboratorio, si è dimostrato che le differenze osservate tra BAP e PAT derivano fondamentalmente dall'interferenza dei fosfati (che non hanno azione antiossidante), tanto che i valori misurati col BAP test sono sovrastimati e direttamente correlati con la concentrazione dei fosfati stessi. Un aumento del valore di BAP causato dai fosfati corrisponde ad un aumento della differenza tra i valori di BAP e quelli di PAT (coefficiente di correlazione $R=0.812$, $p=0.001$). **Per permettere un confronto tra i dati di BAP presenti in letteratura e quelli ottenuti con il PAT test è stato applicato un opportuno algoritmo di calcolo ed è stata inoltre introdotta una nuova unità di misura, la U Cor.** Le U Cor (Unità Cornelli) sono state determinate considerando la media dei livelli dei fosfati plasmatici (media tra 2.6 e 4.5 mg/dL) che portano a una sovrastima pari a circa 700 umol/L di Vit C. Una U Cor corrisponde a 1.4 umol/L di Vit C. Il fattore di moltiplicazione di 1.4 (corrispondente a un aumento del 40%) è stato determinato eseguendo **contemporaneamente** la valutazione dei fosfati e del BAP test. E' stato infatti dimostrato che i valori di BAP sono sovrastimati in media del 40%, con oscillazioni tra 25 e 55%. Proprio per questa variabilità, è possibile che in soggetti con alti valori di fosfati, la percentuale sia > 40% e vice versa. In altri termini, è possibile che i valori di BAP e PAT non corrispondano, ma questa differenza dipende dal contenuto in fosfati del plasma. In conclusione, il PAT test permette di ottenere un risultato più preciso e in un tempo molto inferiore (1 minuto anziché 5 minuti). Il PAT test può essere considerato a tutti gli effetti un test innovativo e predittivo per la valutazione del potere antiossidante sistemico.

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

I risultati del PAT test vengono espressi in micromoli di vitamina C per litro. La vitamina C è usata come standard di riferimento (agente ferro-riducente). Per permettere un confronto tra i dati di BAP presenti in letteratura e quelli ottenuti col PAT test, e quindi per potere intercambiare i valori ottenuti con i due test, è stato applicato un opportuno algoritmo di calcolo ed è stata introdotta una nuova unità di misura, la U Cor. Per poter verificare l'esattezza dell'algoritmo è stato condotto il seguente esperimento: negli stessi soggetti e sullo stesso campione di sangue e di soluzione di vitamina C a concentrazione nota, sono stati condotti entrambe i test, BAP test (espresso in umol/L di vitamina C) e

PAT test (espresso in U Cor; dove 1 UCor corrisponde alle umoli/L di vitamina C ottenute con la seguente formula: valore di **PAT x 1.4**). I valori di BAP e PAT sono così risultati comparabili. I valori di normalità per il PAT test sono gli stessi del BAP test e quindi valori che si posizionano tra 2200-2800 umoli/L o U Cor, valore che è stato assunto come cut-off. Pertanto, valori al di sotto di questo limite indicano una riduzione patologica del livello di antiossidanti "biologicamente attivi"; mentre valori superiori indicano uno stato di eccesso.

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

Sì, secondo una ben precisa scalata di valori. Al fine di potere confrontare i dati presenti in letteratura (BAP test) con quelli ottenuti col PAT test è stato necessario aggiungere una nuova unità di misura: le UCor, dove 1 UCor corrisponde alle umol/L di Vit C ottenute con l'algoritmo: **valori di PAT x 1.40**. Applicando tale algoritmo è possibile mantenere come valori di riferimento di normalità i valori del BAP test (tabella 4.1)

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

	Grado di compromissione della barriera antiossidante
> 2800 U Cor	Valori molto elevati*
2800 – 2200 U Cor	Valori normali
2200 – 2000 U Cor	Limite minimo border line
2000 – 1600	Stato di moderata carenza
1600 - 1400	Stato di elevata carenza
< 1400 U Cor	Stato di estrema carenza

*impiego di antiossidanti e/o danno cellulare (cellule endoteliali, emolisi eritrocitaria) attivazione della reattività cellulare (aumento acido urico e fosfati)

68. Quali sono le performance analitiche del PAT test?

Sulla base dei dati finora pubblicati, il PAT 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 600 micromoli/L. La linearità è massima nel range tra 600 e 10.000 micromoli/L.

69. I risultati del PAT test variano in funzione del tipo di prelievo?

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

70. Quale volume di plasma/siero è generalmente richiesto per effettuare il PAT test?

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

71. I risultati del PAT test variano in funzione dell'età, del sesso, della razza o di altre condizioni, fisiologiche o parafisiologiche?

In assenza di malattia, i risultati del PAT 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 parafisiologiche. E' comunque consigliato che ogni laboratorio/ospedale crei i propri valori di normalità in base alle popolazioni in esame.

72. Il PAT test deve essere effettuato a digiuno

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

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

Sì, ma gli studi non sono stati effettuati con il PAT test, in quanto test di recente invenzione. In letteratura si ritrovano alcuni studi che 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.

74. A quali principi generali bisogna fare riferimento nell'interpretazione dei risultati del PAT 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.

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

Il PAT test è un test che consente di determinare il potere antiossidante plasmatico, ossia l'insieme delle sostanze attive in senso biologico in grado di ridurre lo ione ferro. Pertanto, 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.

Il PAT test è l'innovazione del BAP test. Il PAT è un test molto preciso, semplice e specifico per la valutazione del potere antiossidante del plasma.

76. Qual è l'informazione principale che il PAT test fornisce al clinico?

Il PAT 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 PAT test rappresenta il test esattamente complementare al d-ROMs fast 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 PAT 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 PAT 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 fast test, avere i valori del PAT 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 (Tabella 1.4).

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

Dopo una fase di impiego sperimentale, il PAT 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. Esistono svariati test pensati per la valutazione del potere antiossidante che vengono classificati in base alla reazione chimica. Ci sono infatti dei test che applicano uno schema di reazioni competitive in cui l'antiossidante e il substrato competono, come ad esempio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e TRAP. C'è poi un'altra categoria di test che si basa invece su comuni reazioni colorimetriche; sfruttano la capacità di una soluzione colorata di decolorarsi in presenza di antiossidanti. L'entità della variazione di colore è correlata

con la concentrazione di antiossidanti nel campione. Questo gruppo comprende i tests: FCR, TEAC, FRAP, CUPRAC e BAP. Tra tutti i più utilizzati sono il FRAP e BAP test, saggi colorimetrici che si basano sulla capacità riducente del ferro nel plasma. In questa categoria si colloca anche il PAT test: test innovativo che si basa sulla stessa reazione del FRAP e del BAP test, ma migliorato in termini di: tempo di esecuzione (1 minuto), precisione (maggiore) e basso costo. Il PAT test permette la valutazione della capacità antiossidante del plasma in maniera semplice, precisa e veloce, inoltre, con la sua specifica formulazione, permette di eliminare l'interferenza dei fosfati presenti nel sangue e di rilevare la quantità reale di AOs. Il PAT test è estremamente sensibile alle variazioni di AOs legati ad una patologia di interesse clinico.

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

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

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

L'indicazione principale del PAT 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 fast test al quale è complementare e del quale condivide le indicazioni. Il PAT test è stato pensato come test routinario da eseguire su ogni soggetto (sano o malato), per la prevenzione e il controllo delle patologie sistemiche croniche e/o per monitorare l'efficacia di un trattamento ambulatoriale e/o terapeutico.

80. In quali condizioni cliniche o patologie il PAT test si è dimostrato finora utile?

Il PAT test è un test innovativo di ultima generazione, e per questo motivo ci sono poche esperienze documentate in cui è stato applicato il test. Il PAT è un test colorimetrico che si pone allo stesso livello dei comuni test attualmente utilizzati per la valutazione della capacità antiossidante e dello status ossidativo, ma risulta migliorato in termini di precisione, accuratezza, robustezza, semplicità e tempo di esecuzione. Lo stress ossidativo può essere considerato a tutti gli effetti una "patologia asintomatica" ed è quindi necessario poterlo monitorare e prevenire. Lo squilibrio ossidativo può manifestarsi in svariate patologie e in diversi campi clinici.

81. In sintesi, quali sono i punti di forza del PAT test?

Il PAT test è un test complementare al d-ROMs fast test per la valutazione dello stress ossidativo nella routine clinica. Infatti, il PAT è un test innovativo, con buone performance analitiche, di

semplice esecuzione, rapido, utilissimo nel monitoraggio di trattamenti antiossidanti e di favorevole rapporto costo-benefici. E' il test più veloce per la determinazione degli antiossidanti richiedendo **un tempo di lettura di un solo minuto.**

5. La valutazione del potenziale antiossidante: il SAT test.

A livello buccale la difesa nei confronti dell'attacco lesivo causato dalle specie reattive, ed in particolare dei radicali liberi, è garantita dalla barriera antiossidante costituente principale della saliva. Ne fanno parte sostanze di natura esogena ed endogena che hanno una propria "capacità antiossidante", in relazione al loro potenziale di ossidazione. Tale capacità antiossidante è legata alla proprietà dei componenti della barriera di cedere "equivalenti riducenti" alle specie reattive.

82. Che cosa è il SAT test?

Il SAT, test per la determinazione del potere antiossidante nella saliva (Saliva Antioxidant Test), è un test fotometrico, ossia eseguibile attraverso uno strumento analitico denominato fotometro. Per valutazioni ambulatoriali e routinarie esso viene proposto con il sistema FRAS.

83. Che cosa misura il SAT test?

Il SAT test consente di determinare la concentrazione salivare delle sostanze antiossidanti.

Il test si basa sulla capacità di una soluzione rosso-bruna di ferrocianato di decolorarsi in presenza di antiossidanti presenti nella saliva. Inoltre il SAT, con la sua specifica formulazione, permette di eliminare l'interferenza dei fosfati presenti nella saliva e di rilevare la quantità reale di antiossidanti. Il nuovo test permette quindi una valutazione della capacità antiossidante della saliva in maniera semplice, precisa e veloce.

84. Qual è la procedura più comune per eseguire il SAT test?

La procedura più comune impiegata per eseguire il SAT test prevede la diluizione di una piccola quantità di saliva in una soluzione colorata preparata al momento mescolando due reagenti in fase liquida, un sale ferrico ed un tiocianato (presenti come soluzioni predosate e monouso nel kit dedicato per FRAS). L'aggiunta del campione di saliva provoca una decolorazione più o meno intensa in funzione del potenziale biologico antiossidante, che viene misurata per via fotometrica a 505 nm. L'esecuzione del test è velocissima, richiedendo **un tempo di lettura di un solo minuto**.

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

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

86. Qual è il principio del SAT test?

Il SAT test utilizza un metodo specifico per la determinazione degli antiossidanti (AOs). Negli organismi aerobi la produzione di SR ed in particolare di ROS, è sotto il controllo della rete di antiossidanti (RAO). Gli AOs possono essere sia di natura esogena sia endogena ed hanno il compito principale di controbilanciare la produzione di ROS (in particolare idroperossidi). Alti livelli di ROS e conseguenti bassi livelli di AOs conducono ad una condizione di stress ossidativo (SO), fattore di rischio per l'insorgenza di svariate patologie.

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

Il SAT test permette di valutare la capacità AOs salivare basandosi sulla capacità di un campione di saliva di ridurre ioni ferrici (Fe^{3+}) a ioni ferrosi (Fe^{2+}). Il quantitativo di AOs è da attribuirsi alle maggiori componenti della barriera salivare (vitamina C, vitamina E, acido urico, bilirubina) [3,7-9].

Una reazione standard aspecifica, quale quella tra il Fe^{3+} ed il tiocianato è stata spesso usata in passato per la valutazione del potere antiossidante di vari fluidi [3]. **Tuttavia, il contenuto in fosfati dei campione può interferire nella reazione creando dei "falsi positivi"**.

La concentrazione dei fosfati (PO_4^{3-} , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) nella saliva è compresa tra 1.9-22.9 mg/dL [10,11], senza differenze legate a sesso. Tuttavia, in soggetti normali questo range oscilla tra 1 e 50 mg/dL.

I fosfati salivari, hanno la capacità di legare il ferro presente e di creare dei complessi, di conseguenza, tutti i metodi fino ad ora utilizzati per la determinazione del potere antiossidante dei fluidi biologici, si basavano su reazioni di riduzione del ferro.

Per ovviare a questo problema, nella miscela di reazione è stato aggiunto ad una precisa concentrazione, uno specifico sale di zirconio in grado di legare specificatamente i fosfati senza causarne la precipitazione.

SAT test contiene infatti il quantitativo di zirconio necessario ad abbattere i fosfati presenti in grandi concentrazioni nella saliva. Il contenuto in antiossidanti è così realmente proporzionale alla loro capacità di ridurre il Fe^{3+} e di decolorare il complesso ferro-tiocianato, la soluzione passa da un colore rosso-bruno a incolore.

Inoltre la comune reazione del ferro con il tiocianato alla base del SAT test è stata stabilizzata. Gli stabilizzanti permettono di evitare le reazioni incontrollate, di rendere la reazione indipendente

dalle variazioni di polarità dell'ambiente di reazione e dalle variazioni di pH e di evitare la precipitazione delle proteine.

In questo modo viene garantita la formazione del complesso prevalente e più stabile, ovvero $\text{Fe}(\text{SCN})_3$. Questa specie ha il caratteristico colore rosso-bruno, rilevabile a 505 nm.

La metodica del SAT test prevede l'aggiunta di 40 μl di R2 (soluzione di ferro) ad una cuvetta contenente la soluzione predosata R1 (tiocianato) e successivamente 10 μl di campione. La lettura fotometrica viene effettuato a 505 nm dopo un minuto di incubazione a 37° C e il valore viene generalmente modificato di 2-3°C rispetto alla temperatura ambiente (pari a 20-25 °C).

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

I risultati del SAT test vengono espressi in micromoli di vitamina C per litro. La vitamina C è usata come standard di riferimento (agente ferro-riducente).

I campioni di saliva analizzati presentano una distribuzione normale con un range per i soggetti sani pari a 1000-1500 $\mu\text{mol/L}$ di Vit C.

Valori inferiori a 1000 indicano una riduzione patologica di antiossidanti "biologicamente attivi", mentre valori superiori a 2500 indicano uno stato di eccesso.

89. Differenti valori del SAT test corrispondono ad altrettanti differenti livelli di compromissione della barriera antiossidante della saliva?

Sì, secondo una ben precisa scalata di valori (tabella 5.1)

Tabella 5. 1. Gravità dello stress ossidativo

Valori di riferimento	Spiegazione
< 1000 μM	Forte carenza
1000 – 1500 μM	Valori ottimali
1500 – 2000 μM	Valori normali
2000 – 2500 μM	Valori borderline
> 2500	Possibili processi infiammatori in corso

90. Quali sono le performance analitiche del SAT test?

Sulla base dei dati finora pubblicati, il SAT test è un test affidabile, preciso e ripetibile. Il test è lineare per valori tra 500 e 6000 $\mu\text{mol/L}$ di Vit C ($R=0.9994$), presenta un CV inter e intra-assay accettabile (CV 4.39%).

91. Quale volume di saliva è generalmente richiesto per effettuare il SAT test?

Sono richiesti 10 microlitri di saliva.

92. Il SAT test deve essere effettuato a digiuno?

È necessario eseguire il test su un paziente a digiuno dalla sera precedente e ad almeno 30 minuti dalla normale e quotidiana procedura di igiene orale.

6. OSI index

L'indice **OSI** (Oxidative Stress Index) REDOX è stato sviluppato per riassumere in un unico valore le informazioni derivanti dall'analisi d-ROMs e dall'analisi PAT e quindi semplificare almeno in prima battuta l'analisi della situazione dello stato ossidativo da parte dell'utente finale..

93. Cos'è OSI Redox?

OSI REDOX non è una semplice formula aritmetica ma un complesso algoritmo logico-matematico in grado di ponderare le informazioni derivanti dai valori d-ROMs e PAT congiuntamente alla presenza o meno di integrazione di antiossidanti per quantificare in un unico valore quanto lo stato ossidativo sia distante dalle condizioni di normalità. Maggiore è il valore dell'indice OSI maggiore è lo scostamento dell'equilibrio redox dalla normalità.

94. A cosa serve OSI REDOX?

OSI REDOX è indicato come ottimo punto di partenza per la valutazione globale dello stress ossidativo da parte del medico e di più facile comprensione da parte dello stesso e del paziente. L'indice OSI REDOX non è diagnostico di per sé ma un suo innalzamento è da intendersi come campanello d'allarme e dovrebbe spingere ad una più attenta analisi dei risultati ottenuti. L'indice OSI REDOX è ottimo per monitorare nel tempo le variazioni di status ossidativo di un paziente dovendo valutare l'andamento di un solo valore invece che l'interazione reciproca di più valori e informazioni. OSI REDOX può essere utilizzato per due finalità: per la valutazione immediata dello stato ossidativo del paziente, e per il confronto dello stato ossidativo attuale del paziente con le precedenti valutazioni

95. Su quale principio si basa OSI REDOX?

OSI REDOX si innalza proporzionalmente in risposta ad un qualsiasi scompensamento dell'equilibrio redox. Le cause dell'innalzamento dell'indice possono essere l'aumento o diminuzione della concentrazione sia di perossidi che di antiossidanti rispetto ai valori normali, tenendo conto del fatto che anche valori eccessivamente bassi di perossidi o eccessivamente elevati di antiossidanti sono indice di scompensamento nell'equilibrio redox. Più elevato sarà lo scostamento dalla normalità più elevato sarà il valore OSI REDOX. Logicamente sia i valori

di PAT che di d-ROMs agiscono contemporaneamente quindi lo scostamento di entrambi i valori dalla normalità farà innalzare l'indice OSI REDOX maggiormente che non quando sarà uno solo dei due test a dare risultati esterni all'intervallo di normalità. Inoltre esiste la possibilità di indicare, in presenza di valori PAT superiori a 2800 U.Cor, ossia della soglia di normalità, l'eventuale assunzione di integratori di antiossidanti, in questo caso l'algoritmo è in grado di ponderare questa informazione, correggendo il valore finale.

96. Perché è necessario tener conto dell'assunzione di integratori in caso di valori elevati di PAT?

Elevati valori di PAT in presenza di un'integrazione di antiossidanti non sono indice di uno squilibrio patologico dell'equilibrio redox quindi OSI REDOX considera l'elevato valore di PAT non come sola indicazione di squilibrio dello stato ossidativo ma anche come derivante dall'assunzione di integratori a base di antiossidanti ed eseguirà le adeguate correzioni.

97. Quali sono i valori ideali di OSI REDOX?

Sulla base delle correnti linee guida è stata elaborata la seguente scala di valori di riferimento.

Tabella 6.1 Valori OSI

<40	<i>Valori normali</i>
41-65	<i>Stato di allerta, primi sintomi di un probabile scompensamento</i>
66-120	<i>Situazione critica, scompensamento ormai conclamato</i>
121<	<i>Situazione molto critica</i>

Osì Redox non ha unità di misura essendo riferito come valore assoluto.

98. Come si calcola il valore OSI REDOX?

Gli strumenti FRAS5 e FRAS Bravo sono in grado di calcolare automaticamente OSI REDOX scegliendo il test "REDOX O.B. FAST" nel menù "Esami" ed eseguendo sequenzialmente i test d-ROMs e PAT secondo le istruzioni fornite a schermo. Se il valore di PAT sarà superiore a 2800 U.Cor, lo strumento richiederà di confermare o meno l'assunzione di integratori a base di antiossidanti per poter ponderare adeguatamente tale informazione.

99. OSI REDOX sostituisce la valutazione dei valori d-ROMs e PAT?

OSI REDOX non sostituisce l'analisi dei valori d-ROMs e PAT ma è da intendersi come una valida

agevolazione della stessa specialmente nel confronto tra dati.

5. La strumentazione dedicata: il sistema FRAS 5



E' finalmente disponibile per medici ed altri operatori sanitari il FRAS 5, un sistema integrato inventato dal dr Fabrizio Callegari

di Parma, che consente di valutare in maniera globale lo stress ossidativo attraverso l'esecuzione di due test, il d-ROMs fast test, il PAT test, il SAT test e OSI ndex, distribuiti da H&D srl, Parma, Italy.

100. Che cosa è il FRAS 5?

Il FRAS 5 è un nuovo sistema analitico integrato costituito da un fotometro dedicato con centrifuga incorporata progettato per consentire la valutazione globale dello stress ossidativo attraverso l'esecuzione del d-ROMs fast test e del PAT test, su un piccolo campione di sangue capillare, ottenuto mediante digitopuntura di un polpastrello e del SAT test su un piccolo campione di saliva.

Fornisce inoltre l'indice di Stress Ossidativo (OSI). La sigla FRAS sta per Free Radical Analytical System, ossia sistema per lo studio analitico dei radicali liberi.

101. Quali sono le principali caratteristiche tecniche del FRAS 5?

Sono riportate in tabella 5. 1.

Tabella 5. 1. Caratteristiche tecniche del FRAS 5

Caratteristiche generali	
Dimensioni	40 x 26,5 x 13 cm
Peso	Circa 2,6 kg
Alimentazione	100 ÷ 240 VAC, 50 ÷ 60 Hz
Consumo	60 W
Sistema fotometrico	
Campo spettrale	505 nm wavelenght
Principio di misura	Assorbanza. Legge di Lambert e Beer.
Vano lettura	37°C
Centrifuga	
Velocità di rotazione	6000 rpm ± 5%
Capacità	2 - 4 posti
Display	
	Touch screen retroilluminato
Stampante	
Tipologia	Grafica, termica, con 384 dots per linea
Emissione risultato	Stampa automatica del risultato
Autodiagnosi	
	Automatica con visualizzazione degli errori
Condizioni di esercizio	
Temperatura	Ambiente, 15 ÷ 35°C
Sicurezza	DIRETTIVA 2014/35/UE
Compat. elettromag.	DIRETTIVA 2014/30/UE
⁽¹⁾ NORME: CEI-EN 61010-1, CLASSE I; CATEGOR. INSTALLAZIONE II	

102. Qual è l'aspetto tecnologico più innovativo del FRAS 5?

L'aspetto tecnologico maggiormente innovativo del FRAS 5 è l'integrazione della centrifuga nel modulo analitico, che consente all'operatore di disporre di un unico strumento in grado di svolgere sia la lettura fotometrica che la centrifugazione del campione di sangue.

E' inoltre l'unico strumento in grado di calcolare l'algoritmo di OSI.

103. In che modo il FRAS 5 gestisce le varie fasi delle procedure analitiche?

Benché le procedure del d-ROMs fast, del PAT e del SAT test siano molto semplici, il FRAS 5 dispone di un display auto-istruente che fornisce, oltre alle temperature del fotometro, anche i messaggi operativi (in varie lingue). Ciò è possibile grazie al particolare software che gestisce la strumentazione e che può essere aggiornato attraverso il collegamento con un normale PC.

104. Il FRAS 5 prevede operazioni di taratura per il mantenimento degli standard di precisione e di ripetibilità?

Il FRAS 5 viene commercializzato già "tarato". L'utente deve solo inserire nello strumento, al momento dell'apertura di ogni nuovo kit, il cosiddetto "K" factor, stampato sulla confezione, che consente di adattare le letture fotometriche alle caratteristiche del cromogeno di volta in volta usato. A richiesta, comunque, è disponibile un calibratore, ossia un siero a titolo noto.

105. In che modo il FRAS 5 gestisce la presentazione dei risultati?

Il FRAS 5 consente, grazie alla sua piccola stampante, l'emissione di uno scontrino con intestazione, data e valori ottenuti dei test.

106. Esistono studi scientifici eseguiti con il FRAS 5?

Si. Numerosi di essi sono stati pubblicati su riviste altamente quotate di settore, come Free Radical Research in Biology and Medicine.

107. In sintesi, quali sono i punti di forza del sistema FRAS 5?

Sulla base dei dati disponibili in letteratura e dei report clinici, l'uso del sistema FRAS 5 nella pratica clinica, grazie alla sua affidabilità e precisione, ma anche alla sua estrema semplicità d'uso, consente una valutazione oggettiva ed affidabile, oltre che in tempo reale, del bilancio ossidativo di qualsiasi soggetto, ponendo le giuste premesse per efficaci strategie di prevenzione e terapia dello stress ossidativo. I risultati vengono forniti in tempi brevissimi,

vale a dire in 2'30" il d-ROMs fast, in 1 minuto il PAT test e in un minuto il SAT test.

E' l'unico sistema in grado di fornire l'indice OSI. Le sue performance sono rese ancora più straordi-

narie grazie al recente sviluppo del software OB MANAGER®.

8. La gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica. Le linee guida ed il software OB MANAGER®

E' 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.

Più recentemente, H&D srl, Parma, Italy, si è fatto carico di mettere a disposizione una serie di linee-guida e di mettere a punto uno specifico software (OB MANAGER®) per aiutare il clinico a gestire nella pratica quotidiana il paziente a rischio stress ossidativo, dal momento della formulazione dell'ipotesi diagnostica fino alla proposta di trattamento.

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

Le RS (Specie Radicaliche) hanno un'emivita brevissima, dell'ordine dei nanosecondi, per cui non possono essere quantificati usando le comuni tecniche di laboratorio. Tuttavia le RS con emivita più lunga sono egualmente dannose poiché possono trasferire l'ossidazione lontano dal punto da dove sono state originate, come è il caso degli idroperossidi (ROOH). In tal senso, il rilievo, mediante d-ROMs test, di un'elevata concentrazione ematica di RS è segno inequivocabile che l'organismo ha subito e potrà ancora subire un danno ossidativo. In questo specifico caso le RS sono non solo marcatori ma anche potenziali amplificatori del danno ossidativo. Analogamente, nel plasma esiste una barriera che si oppone al possibile attacco di RS. Pertanto, il riscontro, mediante il PAT 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 fast test e del PAT test, finalmente resa possibile grazie al sistema analitico FRAS 5, il Clinico ha, dunque, nelle mani uno strumento formidabile per affrontare in maniera non più empirica e gros-

solana ma razionale e rigorosamente scientifica il problema dello stress ossidativo nel suo stesso ambulatorio.

109. Qual è l'iter iniziale che il clinico deve seguire - disponendo della possibilità di sottoporre il proprio paziente al d-ROMs fast test ed al PAT 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 ancora sistematicamente escluso dai tradizionali trattati di Clinica Medica!

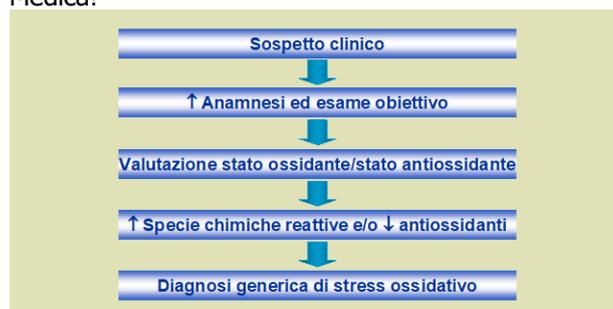


Figura 6. 2. Iter diagnostico dello stress ossidativo (parte I).

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 alto bilancio ossidativo le seguenti condizioni: trauma recente, infezione virale recente, infezione

batterica recente, infezione da altro agente, malattia 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 fast test e PAT test. E, qui, si prospettano ben 7 possibili combinazioni.

110. Caso 1: i risultati di ambedue i test, d-ROMs fast e PAT test, sono al di sotto della norma.

Questa condizione viene chiamata di "iporeattività assoluta". 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.

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

Questa condizione viene chiamata di "iporeattività relativa". Pertanto, anche in questo caso è possibile che la capacità dell'organismo di reagire e adattare il proprio bilancio ossidativo a stimoli endogeni e/o esogeni non sia ottimale.

112. Caso 3: i risultati di ambedue i test, d-ROMs fast e PAT test, sono nei limiti della norma. Qual è la possibile interpretazione?

Il bilancio ossidativo è ottimale. In pratica, valori del d-ROMs fast test nella norma suggeriscono una capacità ossidante del siero nei limiti di quella attesa, mentre valori del PAT 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 in un range di normalità.

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

Trattasi di una "condizione di stress ossidativo relativo" e può essere interpretato come una condizione di rischio.

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

Trattasi della "condizione di stress ossidativo potenziale". In pratica il valore del d-ROMs fast test al di sopra della norma suggerisce una capacità ossidante del siero superiore a quella attesa. E' quindi 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.

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

Trattasi della "condizione di stress ossidativo assoluto".

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

116. Caso 7: il risultato del d-ROMs fast test è al di sopra della norma e anche il risultato del PAT test è al di sopra della norma. Qual è la possibile interpretazione?

Trattasi di "condizione redox infiammatoria (RI)". Infatti l'incremento del PAT è dovuto al danno endoteliale e/o all'emolisi degli eritrociti. Il danno fa rilasciare nel plasma il citosol delle cellule. L'aumento del d-ROMs fast test indica una reattività del tessuto (infiammazione). Questo quadro può essere confermato dall'incremento del hs-CRP (C-reactive protein). L'RI tipicamente può essere trovato a seguito dello sforzo prolungato negli atleti.

117. In che modo il clinico può gestire ciascuna delle situazioni sopra 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).

118. 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).

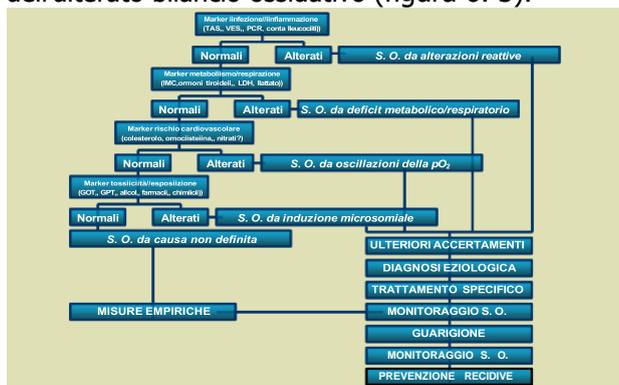


Figura 6. 3. Iter diagnostico dello stress ossidativo (parte II).

Egli, quindi, dovrà cercare di stabilire, mediante opportune indagini di laboratorio e/o strumentali (conta leucocitaria, VES, PCR, 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/eziologica) e/o potenziare le difese antiossidanti (terapia integrativa).

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

La prevenzione e/o il trattamento delle patologie associate allo stress ossidativo richiede sia una modificazione della dieta e/o l'apporto di antiossidanti (modulatori fisiologici con attività antiossidante).

120. Quali sono i criteri fondamentali per la scelta di una corretta supplementazione?

Ridotti valori di PAT suggeriscono la reale necessità di una supplementazione antiossidante e i medici dovrebbero seguire alcuni criteri generali tenendo presente che un unico antiossidante è efficace soltanto parzialmente. A seguito di ciò è indispensabile che il medico consideri una combinazione di antiossidanti, per esempio che contenga mol-

teplici componenti. Un aspetto importante è il dosaggio che per ciascun componente dovrebbe essere mantenuto entro l'RDA (Dose Giornaliera Raccomandata). Nel caso questi valori non siano disponibili, la dose raccomandata dovrebbe essere compresa nella quantità eliminabile giornalmente. Un esempio è nella tavola 6.1 dove viene riportato un prodotto usato per il trattamento dello stress ossidativo nella patologia cardiovascolare.

Tabella 6.1. Esempio di formulazione antiossidante non officinale (AR_D Stenovit).

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

121. Esistono, come nella moderna dietologia, software in grado di aiutare il clinico nella gestione del paziente con stress ossidativo?

L'unico attualmente disponibile è OB MANAGER®, un software originale proposto da H&D srl, Parma, Italy, la cui specifica finalità è quella di aiutare i professionisti che lavorano in campo sanitario a gestire nella pratica clinica lo stress ossidativo.

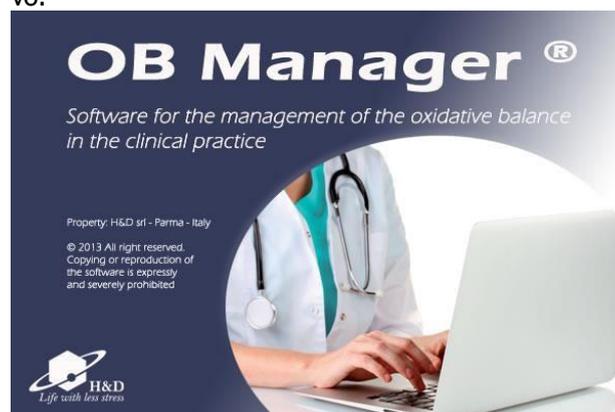


Figura 6. 4. Schermata iniziale del software OB MANAGER®, per la gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica.

122. Qual è il core di OB MANAGER®?

Il "core" di OB MANAGER è uno specifico algoritmo che consente all'operatore, sulla base dei dati inseriti, di ordine sia clinico (profilo anagrafico, anamnesi ed esame obiettivo) che biochimico (risultati del d-ROMs fast test e del PAT test e di OSI), di ottenere report diversificati, per il sanitario e per il paziente, nei quali sono indicati per ciascun indivi-

duo sottoposto a valutazione: il giudizio globale sulla situazione attuale in rapporto allo stress ossidativo (con la relativa spiegazione), il profilo di rischio per lo stress ossidativo, una serie di suggerimenti generali (ovvero in rapporto a condizioni fisiologiche, allo stile di vita, a potenziali stressogeni esogeni, a fattori iatrogeni, ad altri eventuali fattori), indicazioni e posologie di eventuali trattamenti farmacologici e/o antiossidanti, eventuali indagini strumentali e di laboratorio suggerite per l'approfondimento etiopatogenetico del caso e, infine, data del successivo controllo.

123. OB MANAGER® dispone di particolari utility?

Si. Completano il software alcune "utility", che offrono all'operatore la possibilità di consultare (ed eventualmente stampare) le valutazioni pregresse ed alcuni documenti sussidiari, quali uno specifico algoritmo diagnostico, il fabbisogno in vitamine ed antiossidanti, etc.

124. OB MANAGER® si può utilizzare da qualsiasi dispositivo?

Praticamente sì. L'operatore, dopo essersi registrato sul sito di H&D, può utilizzare il software sul proprio computer o tablet, personalizzandolo con i propri dati e proteggendone l'accesso mediante PASSWORD.

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

Potrebbe accadere che, nonostante il trattamento, i valori non ritornino alla normalità. In questi casi occorrerà verificare una serie di ipotesi.

La prima ipotesi 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 ipotesi è che l'antiossidante non abbia raggiunto la concentrazione plasmatica sufficiente per svolgere la sua azione. In questo caso occorre aumentare il dosaggio.

La terza ipotesi è che sia intervenuto un evento in grado di aumentare la produzione di RS. Ad esempio, in un atleta soggetto a stress ossidativo causato da uno strenuo esercizio fisico (evento primario), può avere luogo una infezione batterica occulta (EVENTO ACCESSORIO). In questi casi è indispensabile identificare e trattare specificamente l'evento accessorio.

Se, dopo ogni ragionevole tentativo, il livello di stress ossidativo e, in particolare, il valore del d-ROMs test resta ancora di difficile controllo occorre continuare a ricercare le cause.

Se è forte il sospetto di una condizione reattiva (infiammazione con o senza infezione), non ancora evidente sotto il profilo emato-chimico, può trovare 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 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.

9. 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 dei test d-ROMs fast, PAT e SAT e l'indice OSI in tempi di esecuzione brevissimi.

Il d-ROMs fast test consente di determinare la concentrazione ematica degli idroperossidi, marcatori ed amplificatori del danno cellulare da RS.

Il PAT test consente di determinare l'efficienza della barriera antiossidante plasmatica in termini di attività ferro-riducente **in 1 minuto**.

Il SAT test consente di terminare il potenziale antiossidante del cavo orale **in 1 minuto**.

Grazie a questi test, oggi eseguibili anche presso l'ambulatorio medico attraverso il sistema FRAS 5, è possibile porre una diagnosi di stress ossidativo estremamente precisa ed affidabile in tempo reale. 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. Inoltre, grazie all'indice **OSI**, l'interpretazione

e la valutazione dello Stress Ossidativo diventa facile perché espressa con un solo valore come avviene ad esempio per il colesterolo. In questo modo il paziente può verificare il proprio andamento Redox mediante l'innalzamento o l'abbassamento dell'OSI.

Tutti dovrebbero sottoporsi alla valutazione dello stress ossidativo, anche in condizioni di buona salute e, a maggior ragione, se si è esposti a fattori pro-ossidanti (es. stili di vita non corretti, inquinanti nell'ambiente di lavoro ecc.). Il controllo del bilancio ossidativo riveste particolare importanza in chi è affetto da patologie croniche degenerative (es. diabete, aterosclerosi, neoplasie, demenza, artrite reumatoide, ecc.) o, infine, in chi è sottoposto a 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

H&D srl

Strada Langhirano 264/1A
43124 Parma, Italy
to the following address:

info@hedsrl.it

Telefono: 0039.0521.462607