



UNIVERSITA' DI PISA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

*La valutazione dello stato ossidativo nel
paziente critico*

Candidato:
Sandy Cordischi

Relatore:
Dott.ssa Veronica Marchetti

Correlatore:
Dott.ssa Anna Pasquini

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

*... Non c'è momento migliore di questo per essere felice.
La felicità è un percorso, non una destinazione. Lavora come se non avessi bisogno di denaro,
ama come se non ti avessero mai ferito e balla, come se non ti vedesse nessuno.
Ricordati che la pelle avvizzisce,
i capelli diventano bianchi e i giorni diventano anni.
Ma l'importante non cambia: la tua forza e la tua convinzione non hanno età.
Il tuo spirito è il piumino che tira via qualsiasi ragnatela.
Dietro ogni traguardo c'è una nuova partenza. Dietro ogni risultato c'è un'altra sfida.
Finché sei vivo, sentiti vivo...*

..Al mio papà..

INDICE

Riassunto	Pag. 4
Capitolo 1. Lo stato ossidativo	Pag. 5
1.1 I radicali liberi	Pag. 5
1.2 Siti biologici di formazione dei radicali liberi	Pag.7
1.3 I meccanismi di produzione delle specie reattive	Pag.10
1.4 Il sistema antiossidante	Pag.12
1.5 Lo stress ossidativo	Pag.17
Capitolo 2. Stress ossidativo e Insufficienza Renale	Pag.20
Capitolo 3. Stress ossidativo e Diabete Mellito	Pag.27
Capitolo 4. Stress ossidativo e Malattie Cardiovascolari	Pag.31
Capitolo 5. Stress ossidativo e Neoplasia	Pag.36
Capitolo 6. Lo Stato ossidativo nel paziente critico	Pag.43
6.1 Cosa si intende per paziente critico	Pag.43
6.2 Lo stato ossidativo nel paziente critico	Pag.46
6.3 Il trattamento antiossidante	Pag. 49
Parte Speciale	Pag.54
Capitolo 7. Materiali e Metodi	Pag.55
7.1 Popolazione in studio	Pag.55
7.2 Survival Prediction Index 2	Pag.55
7.3 Valutazione dello stato ossidativo	Pag.56
7.3.1 Il d-ROMs test	Pag.57
7.3.2 Il BAP test	Pag.58
7.4 Lattati	Pag.60
7.5 Proteina C Reattiva	Pag. 60
7.6 Analisi statistica Proteina C Reattiva	Pag.61
Capitolo 8. Risultati	Pag.63
Capitolo 9. Discussione	Pag.67
Capitolo 10. Conclusioni	Pag.75
Bibliografia	Pag.76

Riassunto

Parole chiave: d-ROMs, BAP, SPI2, paziente critico.

Lo stress ossidativo dovuto ad una sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno e ad una alterata capacità antiossidante, risulta implicato nella patogenesi di molteplici malattie, incluse quelle che ritroviamo maggiormente nel paziente critico.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di comparare la capacità ossidoriduttiva del plasma, nel paziente critico canino all'arrivo, con quella al momento delle dimissioni, dopo la permanenza in terapia intensiva. Inoltre abbiamo cercato una correlazione tra i valori dello stato ossidativo e indici di gravità del paziente. Ai 34 cani inclusi nello studio è stato valutato, sia in entrata che in uscita, lo stato ossidativo con i test d-ROMs e BAP; è stato quindi calcolato, tramite la raccolta di parametri clinici e ematobiochimici, l'indice di gravità (SPI2), un sistema sviluppato per ottenere una previsione della sopravvivenza. Sono stati inoltre determinati i valori serici di Lattati e PCR. I risultati mostrano che tutti i soggetti ricoverati sono in una condizione di stress ossidativo i cui valori cambiano significativamente durante il ricovero con un aumento dei d-ROMs e dei BAP. Le differenze nei valori di d-ROMs tra entrata e uscita risultano influenzate dall'assunzione di antiossidanti durante il ricovero. È inoltre emersa una correlazione significativa tra i valori di BAP e SPI2.

Dallo studio emerge l'opportunità della valutazione dello stato ossidativo del paziente critico e della somministrazione di antiossidanti, al fine di migliorare i parametri clinici.

Abstract

Keywords: d-ROMs , BAP , SPI2 , the critically ill patient .

Oxidative stress, due to an overproduction of reactive oxygen species and to altered antioxidant capacity, is implicated in the pathogenesis of multiple diseases, including those that we find the most critical patients.

The aim of our study was to compare the redox capacity of plasma, in the critical ill canine arrival, with that at the time of the resignation, after the hospitalization in the ICU. In addition, we looked for a correlation between the values of the oxidative status and the clinical severity index of our patient. In this study were enrolled 34 dogs and oxidative state was assessed with the d-ROMs and BAP, both incoming and outcoming. After that was calculated the severity index (SPI2), obtained by the evaluation of clinical variables and laboratory parameters, developed to asses a prediction of survival. In addition, serum lactate and PCR were determined. The results show that all subjects were hospitalized in a state of oxidative stress and their result change significantly during hospitalization with an increase in d-ROMs and BAP. The differences in the results of d-ROMs between incoming and outcoming are probably related to the use of antioxidant during hospitalization. Additionally a significant correlation between BAP and SPI2 was found.

The study show the importance of assessing the oxidative status of the critically ill patient and the administration of antioxidants, to improve the clinical conditions of our patient.

Capitolo 1: Lo stato ossidativo

1.1- I Radicali liberi

I radicali liberi sono atomi o raggruppamenti di atomi aventi, in uno degli orbitali esterni delle specie che li costituiscono, uno o più elettroni spaiati indipendentemente dalla carica elettrica espressa. Alla capacità ossidante, più o meno spiccata a seconda delle varie specie chimiche, si riconduce l'attitudine degli agenti in questione a indurre un danno a carico di componenti strutturali e funzionali degli organismi viventi.

I radicali liberi vengono classificati sulla base della natura dell'atomo al quale appartiene l'orbitale con l'elettrone spaiato; assumono particolare rilevanza biologica i radicali liberi centrati sull'ossigeno, sull'azoto, sul carbonio e sul cloro (Ilorio et al., 2004; Gutteridge et al., 1999).

SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO ROS

Radicaliche	Radicale idrossilico	OH•
	Radicale superossido	O ₂ ^{•-}
	Radicale ossido nitrico	NO•
	Radicale perossido lipidico	LOO•
Non radicaliche	Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂
	Ossigeno singoletto	O ₂
	Acido ipocloroso	HOCL
	Ozono	O ₃

Tra le specie reattive dell'ossigeno, l'*ossigeno singoletto* rappresenta la varietà radicalica che può originarsi per eccitazione dell'ossigeno molecolare o per combinazione di radicali perossilici.

La formazione dell'*anione superossido* è molto più complessa, infatti è il risultato dell'addizione di una molecola di ossigeno con un elettrone proveniente da diverse vie

metaboliche, quali la catena respiratoria, il “respiratory burst” e in condizioni di ischemia-riperfusione, il catabolismo dei nucleotidi purinici. L’anione superossido può andare incontro alla reazione di Fenton generando il radicale altamente istolesivo idroperossido, oppure dismutare a perossido di idrogeno (meno tossico) per azione della SOD.

Il *radicale ossidrilico*, noto per la sua potenzialità istolesiva, può derivare da un’ampia serie di reazioni come la catena respiratoria, la fotolisi dell’acqua, la decomposizione del perossido di idrogeno e la reazione dell’ozono con i nitriti. Infine, il *perossido di idrogeno* viene generato prevalentemente attraverso meccanismi di tipo enzimatico.

Le specie reattive dell’ossigeno possono colpire qualsiasi substrato organico, generando specie reattive secondarie (Goodyear-Bruch et al., 2014).

SPECIE REATTIVE DELL’AZOTO RNS

Radicaliche	Ossido nitrico
	Diossido nitrico
Non radicaliche	Acido nitroso
	Tetrossido di azoto
	Triossido di azoto
	Perossinitrito
	Acido perossinitroso

Tra le specie reattive di maggiore rilevanza biomedica incentrate sull’azoto ricordiamo tra le radicaliche l’ossido di azoto, impropriamente detto *ossido nitrico* (NO*), e il *biossido nitrico* (NO₂*); e tra le non radicali, piuttosto numerose, *l’acido nitroso* e il *perossinitrito*.

L’ossido nitrico viene prodotto in una reazione catalizzata dall’enzima ossido nitrico sintetasi (NOS), il quale ha sulla stessa catena polipeptidica due domini di azione catalitica, uno reduttasico e uno ossigenasico, e richiede come cofattori il NADPH e pteridina ridotta.

La NOS esiste in almeno due isoforme, una costitutiva (cellule endoteliali, piastrine, neuroni) e una inducibile (cellule infiammatorie). Nei sistemi biologici, NO agisce come un importante messaggero intra- e inter-cellulare regolando molte funzioni, quali la pressione arteriosa, la respirazione, la coagulazione del sangue e alcune attività cerebrali; tuttavia, se generato in grandi quantità, esso è anche un potente killer cellulare.

In quanto radicale libero, NO reagisce rapidamente con altre specie aventi elettroni spaiati. Riveste particolare importanza nella patogenesi dello stress ossidativo la reazione dell'ossido nitrico con l'anione superossido, dalla quale viene generato l'anione altamente reattivo perossinitrito (ONOO). Quando la produzione di superossido aumenta, questo reagisce massivamente con l'ossido nitrico, trasformandolo in perossinitrito. Come conseguenza negativa si ha la riduzione della biodisponibilità dell'ossido nitrico, il quale esercita un'azione fisiologica protettiva (vasodilatazione, riduzione dell'adesività leucocitaria e dell'aggregabilità piastrinica, etc.) ed innesco di effetti tossici, con alterazioni funzionali e/o strutturali (Iorio, 2004)

1.2- Siti biologici di formazione dei radicali liberi

Negli organismi viventi le specie chimiche reattive sono generate nel corso della normale attività metabolica cellulare. È possibile individuare almeno 5 fonti metaboliche primarie di radicali liberi:

- membrana plasmatica
- mitocondri
- reticolo endoplasmatico liscio
- citosol
- perossisomi

A livello della **membrana plasmatica**, particolarmente in quella dei leucociti polimorfo nucleati (PMN), c'è un'elevata produzione di ROS. Infatti nella membrana di queste cellule sono localizzati diversi enzimi, quali la NADPH ossidasi e lipossigenasi, la cui attivazione porta alla produzione rispettivamente di anione superossido e di intermedi metabolici con caratteristiche chimiche di perossidi. Il ruolo

batterricida dei radicali e dei loro metaboliti (H_2O_2 e $HOCl$) si basa su di una NADPH ossidasi, l'unico enzima dell'organismo a produrre superossido in modo non casuale ma programmato, che catalizza la formazione di anione superossido da $NADPH(H^+)$ e ossigeno molecolare, in seguito a stimolazione dei polimorfonucleati da parte di endotossine batteri.

La produzione di ROS a livello della membrana plasmatica dei PMN avviene, tipicamente, nel corso di processi reattivi quali infezioni, immunoreazioni patogene, infiammazioni (Iorio, 2004).

La fonte primaria di produzione di ROS è rappresentata dai **mitocondri**, perché sulle loro creste sono localizzati i complessi enzimatici della catena respiratoria deputati alla fosforilazione ossidativa. In tale processo c'è il trasferimento di elettroni da molecole ricche di energia, quali il NAD ridotto, al citocromo C con la produzione di H_2O e la sintesi di ATP (Van Holde, 1998). Tuttavia, già in condizioni fisiologiche, questo processo non è perfetto perché in maniera non controllabile, una certa quantità di elettroni sfugge al sistema di trasporto dei vari coenzimi, andando a reagire direttamente con l'ossigeno molecolare, generando anione superossido e/o perossido di idrogeno (riduzione uni-bivalente dell'ossigeno). È stato riscontrato che durante un esercizio fisico intenso nei muscoli scheletrici, a causa dell'intensa stimolazione metabolica cellulare, la quota di questo shunt può raggiungere indicativamente il 15% dell'ossigeno utilizzato nei mitocondri (Iorio, 2004).

Oltre alla membrana plasmatica e ai mitocondri anche i **perossisomi** rappresentano una fonte di ROS. In questi organuli cellulari avviene un particolare processo di β -ossidazione degli acidi grassi diversa da quella convenzionale; in tale reazione una flavo proteina estrae una coppia di atomi di idrogeno da una molecola di acido grasso attivato (acil-CoA) trasferendola direttamente all'ossigeno molecolare, con formazione di perossido di idrogeno (Iorio, 2004).

Nel **reticolo endoplasmatico** la produzione di specie reattive passa attraverso il citocromo P450; quest'ultima è una proteina a ferro eminico che agisce come donatore immediato di elettroni in molte reazioni di idrossilazione. A livello degli epatociti partecipa ai processi finalizzati all'inattivazione degli ormoni steroidei e ai composti non fisiologici (xenobiotici, quali tossici e farmaci idrofobici che vengono in tal modo resi più solubili e meno tossici). Il citocromo P450 agisce in un processo molto

complesso anche a livello della corticale del surrene, dove fa da unione tra un donatore di elettroni come il NADPH(H⁺) e il substrato da idrossilare (Iorio, 2004).

A livello del **citosol** la produzione di radicali liberi avviene nel corso di numerose reazioni biochimiche fisiologiche, ad esempio nella sintesi delle catecolamine, ma soprattutto durante la ri-perfusione post ischemica e nello shock emorragico a causa dell'estrema ipotensione.

In corso di ischemia, a causa della limitata disponibilità di ossigeno, la produzione di ATP diminuisce ed aumenta quella di AMP che è metabolizzato ad adenosina, ad inosina e quindi a ipoxantina. A causa del danno alle membrane cellulari, si verifica inoltre un aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio che causa l'attivazione di alcune proteasi che trasformano la xantina deidrogenasi, enzima coinvolto nel catabolismo dei nucleotidi purinici, in xantina ossidasi. Durante la ri-perfusione aumenta improvvisamente la disponibilità di ossigeno e l'ipoxantina viene ossidata e si ha la produzione di anione superossido. L'anione superossido, oltre a causare direttamente un danno tissutale diretto, attiva delle chemochine superossido dipendenti che attraggono i neutrofilo nel sito di ri-perfusione con ulteriore rilascio di perossidi da parte di questi ultimi.

Sempre a livello citoplasmatico è prodotto un altro radicale libero: l'ossido nitrico. La reazione è catalizzata dall'enzima ossidonitrico sintetasi (NOS) che ha come substrato l'aminoacido L-arginina. L'ossido nitrico agisce come messaggero intra ed intercellulare ed è prodotto a livello dei macrofagi, dei neuroni e delle cellule dell'endotelio vascolare. Ad elevate concentrazioni, a causa della sua natura radicalica, può reagire con altre specie chimiche. Se sono elevate anche le concentrazioni di anione superossido, questo reagisce con l'ossido nitrico e si ha la formazione di perossinitriti (ONOO⁻) altamente istolesivi. Dai perossinitriti si può formare l'acido perossinitroso e da questo il radicale idrossile ed altri intermedi reattivi. I perossinitriti sono inoltre responsabili della nitratura dei residui fenolici delle tiroxine e le nitrotirosine sono infatti considerate marker della tossicità tissutale dell'ossido nitrico.

1.3- Meccanismi di produzione delle specie chimiche reattive

L'origine dei radicali liberi può avvenire tramite due meccanismi fondamentali quali la *scissione omolitica* e *l'interazione con i metalli di transizione*.

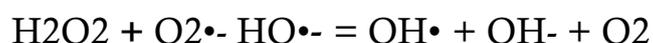
Scissione omolitica: Si assiste alla divisione di una molecola, a livello di uno dei suoi legami covalenti, per effetto della somministrazione di energia, con la generazione di due nuove specie chimiche, ciascuna con un elettrone spaiato tipico dei radicali.

Un esempio di scissione omolitica è la radiolisi o la fotolisi dell'acqua che genera un atomo di idrogeno e un radicale idrossile (Iorio, 2004).

Interazione con metalli di transizione: Il secondo meccanismo con cui si ottengono radicali liberi è l'interazione di molecole con metalli di transizione (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , ecc.). È necessario ricordare che quasi tutti gli enzimi conosciuti richiedono la presenza di ioni metallici per esprimere la propria attività catalitica.

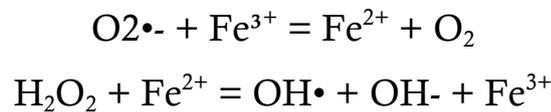
Gli ioni metallici partecipano, infatti, a reazioni di ossido-riduzione modificando in modo reversibile il loro numero di ossidazione. In questo modo si ottengono elettroni in grado di spezzare il legame covalente di una molecola bersaglio che si separa in un radicale libero e in un anione.

Alternativamente il metallo di transizione può ridursi in forma ionica, richiedendo un elettrone che viene estratto dal legame covalente di una molecola che si separa in un radicale libero e in un catione. Tra i metalli di transizione, ricopre notevole rilevanza biologica il ferro. Un esempio di questo meccanismo, si osserva nella reazione di Haber Weiss, attraverso la quale, a partire da un radicale perossido e dal perossido di idrogeno, derivato dalla propria dismutazione (reazione intramolecolare nella quale avviene un'ossido-riduzione interna, con la formazione interna di due distinti prodotti da un unico substrato) si ottiene una molecola di radicale idrossilico ($\text{HO}\bullet$) ad alto potere ossidante.



Fortunatamente la velocità di questa reazione è molto scarsa, tale da precludere una rilevanza biologica. A questo punto entra in gioco il ferro, che è in grado di catalizzare la reazione con un meccanismo che fu descritto per la prima volta da Fenton.

Lo ione ferroso (Fe^{2+}), ossidandosi a ione ferrico (Fe^{3+}), cede il suo elettrone ad una molecola di perossido di idrogeno (H_2O_2) e ne scinde uno dei legami covalenti, generando un radicale libero (il radicale idrossilico, $\text{HO}\cdot$) e un anione, ione ossidrilico (Verna F. *et al.*, 2003). A sua volta lo ione ferrico si riduce, rigenerandosi come qualsiasi catalizzatore, a ione ferroso, strappando un elettrone da una seconda molecola di perossido di idrogeno, che è scissa in un radicale libero (un radicale peridrossilico $\text{HOO}\cdot$) e un catione (uno ione idrogeno).



Il ferro, negli organismi superiori in buona salute, non è mai ferro libero o debolmente legato. Esso viene trasportato nello stato ferrico dalla transferrina, in un complesso difficilissimo da ridurre. Allo stesso modo viene depositato nello stato ferrico mediante la ferritina, una proteina ubiquitaria nei tessuti e nel plasma. Il radicale superossido è in grado di ridurre allo stato ferroso il ferro legato alla ferritina, che viene così rilasciato. E' questo ferro liberato dalla produzione patologica di superossido, che è ora in grado di catalizzare la reazione di Haber Weiss. Il radicale idrossilico così prodotto può iniziare la perossidazione lipidica, che porta alla modificazione strutturale e funzionale delle membrane o può attaccare macromolecole e causare rotture del DNA. Se il ferro liberato può esacerbare la parte di danno tissutale dovuta alla produzione di radicali liberi, ha senso chiedersi se lo stato nutrizionale del ferro corporeo possa essere un fattore predisponente nelle patologie legate allo stress ossidativo (Flora *et al.*, 2007).

Una volta innescata una reazione radicalica a catena questa tende a propagarsi attraverso alcuni meccanismi fondamentali. Di questi, quello più comune, è caratterizzato dal trasferimento del sito radicalico ad una molecola alla quale viene sottratto uno dei suoi atomi. Con questo meccanismo, ad esempio, il radicale ossidrilico

(HO•) attaccando una molecola organica (R-H), strappa a questa un atomo di idrogeno, generando, accanto ad una molecola d'acqua, un radicale alchilico (R•).

Infine una reazione a catena può arrestarsi per disproporzione o per combinazione in cui si assiste alla reazione tra due radicali liberi che, interagendo, danno origine ad una molecola non più reattiva. In questo modo il primo radicale agisce da ossidante, mentre il secondo da antiossidante (Iorio, 2004).

1.4 – Il sistema di difesa antiossidante

Gli organismi viventi per difendersi dai danni potenzialmente causati dalle specie reattive, in particolare quelle dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), hanno sviluppato nel corso di millenni di evoluzione un complesso sistema di difesa costituito dall'insieme degli antiossidanti. Il sistema di difesa antiossidante è regolarmente distribuito nell'organismo, sia a livello extracellulare che a livello intracellulare.

Gli antiossidanti sono agenti chimicamente eterogeni (enzimi, vitamine, sostanze simil-vitaminiche, ecc.) in grado di prevenire o annullare l'azione ossidante delle specie chimiche reattive. Considerando solo gli antiossidanti di natura fisiologica possono essere distinti, sulla base del meccanismo di azione prevalente, in quattro classi principali: antiossidanti preventivi, scavenger e chain breaker, agenti di riparo e agenti di adattamento (Iorio, 2004)

ANTIOSSIDANTI PREVENTIVI

Gli antiossidanti preventivi sono agenti che prevengono la formazione di specie reattive attraverso vari meccanismi, quali la chelazione dei metalli di transizione, il "quenching" o l'inattivazione dei perossidi.

Agenti sequestranti i metalli di transizione: l'organismo ha affidato la difesa antiossidante ad una serie di proteine aventi la capacità più o meno specifica di complessare i metalli di transizione, ed impedire a quest'ultimi di esistere in forma libera e esercitare la loro azione lesiva. Un esempio di metalli di transizione sono il rame e il ferro, che allo stato libero, possono agire da catalizzatori nella scissione dei perossidi (perossido

di idrogeno, H_2O_2 , e idroperossidi, R-OOH), che porta alla generazione di radicali liberi estremamente reattivi e istolesivi, quali l'idrossile, l'alcoossile e il perossile. Per ovviare al problema l'organismo, sia in ambito cellulare che extracellulare, presenta varie proteine ad azione "chelante"; il ferro si lega alla ferritina all'interno delle cellule, mentre si lega alla transferrina e alla lattoferrina nei liquidi extracellulari come sangue e secrezioni. Inoltre nei processi emolitici, il ferro liberato sottoforma di eme, viene bloccato da proteine specifiche come l'aptoglobulina e l'emopessina.

Invece il rame viene chelato da una proteina specifica quale la ceruloplasmina, e in parte anche da una meno specifica rappresentata dall'albumina.

Purtroppo, alcune condizioni patologiche, quali per esempio l'acidosi possono indurre una modificazione nella sintesi di tali proteine impegnate nel sequestro dei metalli di transizione, provocando il rilascio di quest'ultimi in forma libera. Una volta liberati, il ferro o il rame innescheranno la reazione di Fenton che porterà alla formazione di radicali estremamente reattivi. Dall'azione di questi dipenderà il danno dell'endotelio ed il processo di perossidazione di componenti plasmatiche chiave (Iorio, 2004).

"Quencher" dell'ossigeno singoletto: gli antiossidanti che agiscono limitando l'azione potenzialmente ossidante dell'ossigeno singoletto vengono detti "quencher" (smorzanti) e ne sono importanti esempi i caroteni e la superossidodismutasi.

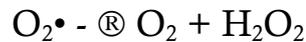
I caroteni sono lipidi poliisoprenoidi polinsaturi a lunga catena carboniosa e tra le numerose specie in natura la più studiata è il β -carotene, presente nei vegetali sotto forma di pro-vitamina A. Nei vegetali i caroteni, abbondantemente distribuiti nei cloroplasti, esercitano un'importante funzione di "quencing" nei confronti dell'ossigeno singoletto che si crea nel corso della fotosintesi; nello stesso modo il β -carotene agisce negli animali come antiossidante.

È stato calcolato che una molecola di β -carotene è in grado di neutralizzare 1000 molecole di ossigeno singoletto e ciò è determinante se si considera che il 20% dell'ossigeno molecolare consumato nel corso della "respiratory burst" dei leucociti PMN, è convertito in tale specie reattiva dalla mieloperossidasi.

Inoltre pare che l'inattivazione dell'ossigeno singoletto generato nel torrente circolatorio sia da attribuire per il 40% ai carotenoidi plasmatici.

La superossidodismutasi è un enzima presente praticamente in tutte le cellule, la cui attività catalitica consiste nella dismutazione di due molecole di anione superossido in

perossido di idrogeno (ossidante più debole rispetto al precursore) ed ossigeno molecolare, secondo la reazione:



Questo è il motivo per cui la SOD rientra fra gli enzimi ad azione antiossidante.

All'interno delle cellule sono state identificate due isoforme della SOD, la Cu-Zn-SOD e la Mn-SOD. La Cu-Zn-SOD è una proteina dimerica nella quale gli ioni Cu probabilmente giocano un ruolo chiave nella catalasi, consentendo all'enzima di convertirsi nelle due isoforme (ossidata e ridotta), mentre gli ioni Zn hanno il ruolo di stabilizzare l'enzima dal punto di vista conformazionale.

La Mn-SOD è una metalloproteina il cui esatto meccanismo d'azione si basa su modifiche redox del manganese (Iorio, 2004).

Agenti inattivanti i perossidi: Del primo gruppo di antiossidanti fanno parte anche le perossidasi che esercitano la loro azione nei confronti dei perossidi, sostanze radicaliche relativamente deboli derivanti dall'attacco dei ROS sui substrati organici come carboidrati, lipidi, amminoacidi. In particolare esistono gli idroperossidi (R-OOH) e il perossido di idrogeno (H₂O₂) i quali, in ambiente acido e in presenza di metalli di transizione dissociati, possono dare origine a radicali molto più nocivi, come l'alcossile, il percossile, l'idrossile. Le perossidasi hanno un principio d'azione comune che prevede la demolizione del perossido con liberazione di una molecola di ossigeno molecolare e una di alcool, se il substrato è un idroperossido, oppure di acqua, se il substrato è perossido di idrogeno.

In quest'ultimo caso la perossidasi viene chiamata catalasi, ed esiste nelle maggior parte delle cellule animali e vegetali in cui svolge la funzione di inattivare il perossido di idrogeno.



Le perossidasi in grado di agire anche su altri tipi di perossidi organici presentano come cofattore il glutatione e pertanto sono chiamate glutatione perossidasi.

Queste hanno una diffusione ubiquitaria nei tessuti e aumentano fortemente in presenza di elevati livelli di perossidi. La glutazione perossidasi compete con le catalasi per il substrato H_2O_2 ed è la risorsa protettiva maggiore contro bassi livelli di stress ossidativi.

Il ruolo protettivo del glutazione (GSH) nei confronti dello stress ossidativo è svolto attraverso diversi meccanismi:

1. Come suddetto il glutazione è un cofattore di diversi enzimi detossificanti, quali la glutazione perossidasi, la glutazione transferasi e altri.
2. Il GSH partecipa nel trasporto degli aminoacidi attraverso le membrane cellulari.
3. Il GSH è capace di rigenerare i più importanti antiossidanti, come la vitamina C ed E, nelle loro forme attive.

GLI SCAVENGER E I CHAIN BREAKER

Il secondo gruppo di antiossidanti comprende una serie di sostanze generalmente a basso peso molecolare, chimicamente eterogenee, dette scavenger e chain breaker.

Gli *scavenger* (“spazzini”) riducono la concentrazione di radicali liberi rimuovendoli dal mezzo in cui si trovano, grazie alla loro capacità di interagire direttamente con essi e quindi di inattivarli. Tra questi, l’ubichinone, i composti tiolici e l’acido urico.

L’ubichinone è una sostanza liposolubile, presente in tutti i sistemi di accoppiamento di energia legati alle membrane; è conosciuto anche come coenzima Q. È un importante trasportatore di elettroni e rientra in un complesso sistema di ossidoriduzioni a livello mitocondriale. In realtà l’ubichinone può comportarsi sia da scavenger che da generatore di specie reattive, attraverso il fenomeno di autoossidazione, mediante una reazione il cui equilibrio dipende dalle condizioni chimiche del microambiente. In particolare, a livello delle membrane biologiche prevale l’attività antiossidante nei confronti della lipoperossidazione. Pertanto l’ubichinone possiede effetti protettivi nei confronti del danno ossidativo verso i lipidi, le proteine e il DNA.

Tra gli scavenger idrosolubili, i tioli rappresentano una componente quantitativamente significativa della barriera antiossidante sia intracellulare che plasmatica. Di questi fa parte il sistema della tireodossina (TRX) che è attiva nella sua forma ridotta TR-(SH)₂ (in seguito all’azione della tireodossina riduttasi).

L'acido urico, prodotto in seguito all'ossidazione dell'ipoxantina e della xantina, è una molecola idrosolubile che si accumula nei liquidi corporei e, a pH fisiologico, è presente in forma completamente ionizzata (urato). È stato appurato che l'urato è un potente antiossidante ad azione scavenger nei confronti del radicale idrossile, dell'acido ipocloroso, dell'ossigeno singoletto e dell'ozono. Inoltre esso è in grado di chelare ioni di metalli di transizione.

I *chain breaker* ("che spezzano la catena") sono agenti in grado di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena. Tra queste sono da citare i carotenoidi, i tocoferoli (liposolubili) e l'ascorbato (idrosolubile). I caroteni, oltre che agire da "quencher", possono agire anche da chain breaker, formando complessi con il radicale idroperossilico e bloccandone l'azione spiccatamente elettrofila che determina la lipoperossidazione.

Tra i caroteni va considerata a parte la **vitamina A** che, essendo fortemente insatura, risulta molto reattiva nei confronti dei radicali perossilici; questi vengono intrappolati nella sua molecola, la quale funziona principalmente da chain breaker piuttosto che da donatrice di equivalenti riducenti.

I tocoferoli, riuniti in otto principali isomeri sotto la denominazione di **vitamina E**, sono ampiamente distribuiti in natura. In particolare, la forma alfa agisce come un antiossidante catturando i radicali lipoperossilici prima che interagiscano con il substrato, prevenendo, in questo modo, il danno a carico di strutture lipidiche complesse e delicate quali le membrane biologiche e le lipoproteine plasmatiche.

La **vitamina C** è una vitamina idrosolubile, la cui attività antiossidante, in vivo, è legata alla capacità di esistere in forma ridotta e ossidata tra loro interconvertibili. Essa è in grado di agire come scavenger nei confronti dei radicali superossido e idrossilico e di intrappolare i radicali idroperossilici nella fase acquosa, prima che diffondano nei lipidi della membrana, prevenendo così la lipoperossidazione. Come l'ubichinone, anche la vitamina C può agire da agente proossidante, anche se tale azione è meno rilevante (Iorio, 2004).

AGENTI DI RIPARO

Alcuni enzimi agiscono dopo che il danno da specie reattive si è instaurato e sono chiamati *agenti di riparo*. Appartengono agli agenti di riparo le idrolasi (glicosidasi,

lipasi, proteasi), le trasferasi e le polimerasi e il loro meccanismo prevede l'identificazione del segmento molecolare ossidato, la separazione del segmento ormai inutilizzabile e infine, la sintesi e l'inserimento di un nuovo segmento. Sono tutte indispensabili per la riparazione di importanti molecole e strutture danneggiate (Iorio, 2004).

AGENTI DI ADATTAMENTO

Infine gli agenti di adattamento comprendono tutte le sostanze o tecniche attraverso le quali è possibile potenziare il sistema antiossidante fisiologico di un organismo. Per esempio, un corretto esercizio fisico o l'adozione di un'alimentazione corretta ed equilibrata sono in grado, di per sé, di controllare il metabolismo ossidativo attraverso la riduzione della produzione di specie reattive e l'induzione di enzimi ad attività antiossidante. Un esempio sono i *flavonoidi*, assunti con una dieta ricca di vegetali, che hanno dimostrato di possedere attività antiossidanti e di chelazione dei metalli (Iorio, 2004).

1.5-Lo Stress Ossidativo

Lo stress ossidativo è una particolare condizione patologica che ritroviamo in un organismo quando viene a mancare l'equilibrio tra la produzione di specie reattive e la difesa antiossidante, messa in atto dall'organismo stesso. Questo può avvenire o per eccessiva produzione di radicali liberi o per una ridotta capacità di smaltire tali quantità prodotte.

Le cause sono le seguenti:

- 1- Aumentata produzione di radicali liberi:
 - radiazioni, inquinamento
 - gravidanza
 - alimentazione, alcool, fumo, esercizio fisico intenso
 - stress psicoemotivo
 - traumi, infiammazioni, infezioni, vasculopatie, neoplasie

- Farmacoterapia, radioterapia, raggi x

2- Riduzione delle difese antiossidanti:

- ipovitaminosi, diete squilibrate
- sindromi da malassorbimento
- fattori genetici o iatrogeni
- eccessiva produzione di specie reattive
- sovraccarico del sistema microsomiale

3- Aumento dei radicali liberi e riduzione degli antiossidanti

I radicali liberi prodotti in eccesso agiscono come endotossine e possono danneggiare tutti i tipi di macromolecole come le proteine, i lipidi, i carboidrati e gli acidi nucleici (Valko *et al.*, 2007).

Vengono anche prodotti danni extracellulari consistenti principalmente in perossidazione dell'acido arachidonico e depolimerizzazione di glicosamminoglicani del glicocalice e degli interstizi, degradazione del collagene con aumento della permeabilità vascolare e destabilizzazione dei tessuti, inibizione di proteine difensive fisiologiche come l' α -1-antitripsina e la fibronectina, alterazione dell'omeostasi ionica. Sul piano generale queste lesioni, dapprima cellulari e poi tissutali, saranno responsabili, infine, di patologie d'organo.

Come già descritto in precedenza, i danni provocati dallo stress ossidativo nei vari siti cellulari è indotto da varie situazioni fisiopatologiche diverse, che portano a fenomeni biologici che si possono riassumere così:

- Stress ossidativo indotto prevalentemente da modificazioni reattive della superficie cellulare: un'attivazione massiva si ha a carico dei leucociti polimorfonucleati in corso di infiammazioni e infezioni.
- Stress ossidativo indotto prevalentemente da una ridotta efficienza della respirazione cellulare, data da un'alterazione della funzionalità dei mitocondri in corso di un' aumentata attività metabolica (sforzo fisico, iperalimentazione, ecc.).

- Stress ossidativo secondario prevalentemente ad un induzione farmaco metabolica è provocato da un'attivazione del sistema di idrossilazione a funzione disintossicante del citocromo P450.
- Stress ossidativo indotto prevalentemente da variazioni della tensione intracellulare di ossigeno, tipico delle lesioni da ischemia-riperfusion che si osservano nell'infarto o in seguito a rivascolarizzazione chirurgica (Iorio, 2004).

Ancora non è stato possibile chiarire con certezza se lo stress ossidativo possa essere considerato una causa primaria o solo l'effetto della malattia stessa, ma, anche in quei casi in cui le specie reattive si sviluppano secondariamente alla patologia, l'innescò di reazione a catena può comunque contribuire ad aggravare il danno cellulare.

Risulta chiaro quindi che, la valutazione del patrimonio antiossidante e dello stato ossidativo del soggetto, rappresenta un indicatore importante del buon funzionamento dell'organismo, in quanto il primo permette di monitorare i mezzi a disposizione per far fronte ad una eventuale situazione di stress ossidativo, mentre il secondo ci fornisce le indicazioni per valutare un eventuale danno cellulare (Langhseth *et al.*, 1995).

Capitolo 2: Stress Ossidativo e Insufficienza renale

Il termine insufficienza renale indica una condizione di disfunzione d'organo, rilevabile dalle alterazioni dei parametri di funzionalità renale, in cui più dei due terzi della capacità funzionale dei reni è stata persa (Nelson & Couto, 2010).

La perdita di funzionalità del rene può essere improvvisa e reversibile, come nel caso dell'insufficienza renale acuta (AKI), oppure può insorgere lentamente ed avere il carattere dell'irreversibilità come nel caso dell'insufficienza renale cronica (CKI) (Nelson & Couto, 2010).

Per distinguere una forma di insufficienza renale acuta da una forma cronica è stata proposta da Vaden S.L. e collaboratori la misurazione dell'emoglobina carbamilata. Questo parametro è risultato un indice diagnostico altamente sensibile e specifico poiché la sua concentrazione nei pazienti con IRC risulta infatti due volte e mezzo maggiore rispetto ai pazienti con ARF (Vaden et al., 1997; Tasanarong et al., 2001). Un'indicazione sulla cronicità della patologia è comunque fornita nel paziente con IRC da altri rilievi di laboratorio che si manifestano con l'aggravarsi dell'insufficienza: acidosi, anemia, iperamilasemia, iperlipasemia, iperinsulinemia, iperglicemia, ipercalcemia/ipocalcemia, ipermagnesemia, iperfosfatemia, ipopotassiemia, iperlipemia, iperomocisteinemia e proteinuria. Gli esami radiologici ed ecografici mostrano inoltre un quadro caratterizzato da una diminuzione delle dimensioni dei reni che risultano di forma irregolare, diffusamente ecogenici con perdita dei normali margini cortico-midollari. Questa ecogenicità è riferibile alla presenza di tessuto connettivo fibroso che va a sostituire i nefroni irrimediabilmente danneggiati ed alla mineralizzazione causata dalla precipitazione di sali di calcio e fosforo (Nelson & Couto, 2010).

Dalla letteratura relativa alla medicina umana risulta che lo stress ossidativo svolge un ruolo importante in molte patologie renali sia spontanee che indotte sperimentalmente. Sono stati condotti studi su pazienti affetti da malattie glomerulari, pielonefriti, su pazienti con insufficienza renale acuta o cronica, pazienti dializzati e pazienti sottoposti a trapianto.

Gli studi che sono stati compiuti su pazienti con diversi gradi di insufficienza renale mostrano che questi soggetti sono in una condizione di stress ossidativo rispetto ai soggetti sani e che il grado di stress ossidativo è correlato con il grado di insufficienza renale (Mimic-Oka et al., 2009; Ceballos-Picot et al., 2009; Annuk et al., 2001).

È stato osservato che la produzione di ROS varia nei diversi compartimenti del rene (glomerulo, tubulo, interstizio) (Gwinner et al., 2000); a seconda della patologia renale possono essere prodotti da cellule diverse, ad esempio dai podociti nelle glomerulonefriti membranose, dalle cellule del mesangio nelle nefriti ad eziologia immunomediata, dalle cellule tubulari nelle nefriti tubulo-interstiziali. La NADPH ossidasi, la xantina ossidasi, le ciclossigenasi, le lipossigenasi, l'eossigenasi sono gli enzimi più coinvolti nella produzione di ROS a questo livello. Per quanto riguarda l'enzima NADPH-ossidasi è stato dimostrato che è presente non solo nei leucociti e nei macrofagi, ma due sue isoforme, NOX-1 e RENOX, sono espresse nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce vasali e nelle cellule epiteliali tubulari (Vaziri, 2004).

La maggiore produzione delle specie ossidanti si forma in corso di insufficienza renale cronica, infatti essi partecipano sia alla patogenesi del danno renale sia alla progressione della malattia, attraverso diversi meccanismi.

L'eterogenicità dei radicali liberi e la loro varietà di azione si manifesta a livello renale influenzandone l'emodinamica, causando la perdita del fenotipo cellulare e quindi la lisi cellulare e l'apoptosi, inducendo risposte di crescita cellulari aberranti e promuovendo risposte infiammatorie acute e croniche (Haugen et al., 1999).

Lo stress ossidativo può determinare la produzione di sostanze vasoattive che attraverso gli effetti vasocostrittivo o vasodilatatorio possono influenzare l'emodinamica renale (Katusic, 1996). I radicali liberi possono agire come regolatori del tono vascolare sia direttamente che indirettamente tramite l'induzione della sintesi di mediatori intracellulari. Alcuni ossidanti come ad esempio il perossido di idrogeno, a basse dosi, possono favorire la vasodilatazione stimolando la produzione di guanilato ciclasi e di cGMP (inibitore della contrazione della muscolatura vasale) oppure indurre la produzione di prostaciline o prostaglandine ad azione vasodilatatoria (Haugen et al., 1999).

Il radicale libero più importante per gli effetti vasodilatatori risulta essere comunque l'ossido nitrico. L'ossido nitrico è sintetizzato in condizioni fisiologiche ed è il principale fattore di rilascio dell'endotelio vasale; la sua azione a livello renale consiste

nell'aumentare il flusso plasmatico nei capillari glomerulari e nel promuovere la natriuresi. A concentrazioni basali agisce inoltre da scavenger nei confronti di piccole concentrazioni di ROS e da chain breaker bloccando la catena di perossidazione lipidica (Ilorio et al., 2004).

Tra i fattori responsabili dell'ipertensione glomerulare nell'insufficienza renale cronica oltre all'ipertensione sistemica ed all'iperfunzionalità dei nefroni intatti, hanno importanza anche la diminuita attività dell'ossido nitrico e la sintesi di sostanze ad azione vasocostrittrice. L'anione superossido ed il radicale idrossile reagiscono con l'ossido nitrico inattivandolo. Dalla reazione con l'anione superossido si forma poi il perossinitrito (ONOO⁻), un potente ossidante che attacca i lipidi, il DNA e le proteine e che svolge anche un'azione vasocostrittrice.

Alte dosi di radicali liberi determinano un'azione vasocostrittrice attraverso la stimolazione della produzione di trombossani e di isoprostani, a partire dall'acido arachidonico, o di endotelina-1 (Haugen et al., 1999).

Pertanto sia l'effetto vasodilatatorio eccessivo che la vasocostrizione sono implicate nella progressione del danno renale; infatti un'eccessiva vasodilatazione dell'arteriola afferente associata ad un effetto vasocostrittivo sull'arteriola efferente può contribuire all'iperfiltrazione e quindi all'ipertensione glomerulare e un'azione vasocostrittrice può causare, oltre ad ipertensione, ischemia, necrosi e danno endoteliale con liberazione di citochine infiammatorie e fibrogenetiche (Haugen et al., 1999).

Oltre ad agire sull'emodinamica i ROS possono determinare un danno tissutale mediante meccanismi di ossidazione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici. Oltre a questi danni diretti nei confronti delle componenti cellulari, i radicali liberi possono agire tramite un meccanismo indiretto, possono cioè comportarsi da messaggeri inter ed intracellulari ed attivare o inattivare proteine chinasi o fosfatasi, determinando un'alterata fosforilazione di recettori e di fattori di trascrizione coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'espressione di molecole di adesione e di citochine infiammatorie e nell'induzione dell'apoptosi. Il perossido di idrogeno, ad esempio, induce un aumento del calcio libero citoplasmatico che causa l'attivazione di una polimerasi che determina morte cellulare (Verna et al., 2003). È stato dimostrato che lo stesso TNF α aumenta il livello intracellulare di intermedi reattivi dell'ossigeno attraverso i quali induce la morte cellulare programmata e che l'attività del TNF α può essere inibita da antiossidanti tiolici e dall'enzima superossidodismutasi (Verna et al., 2003). L'induzione di apoptosi da parte di ossidanti è una causa dell'atrofia tubulare e

della riduzione della massa renale durante la progressione dell'insufficienza renale cronica (Gwinner et al., 2000).

In letteratura è riportato che in corso di patologie renali gravi i ROS inducono gravi alterazioni a carico del tubulo, della vascolarizzazione interstiziale e del glomerulo (Diez Brasilia Gonzales, 2003).

Queste alterazioni strutturali determinano un'alterata permeabilità del glomerulo che comporta prima proteinuria poi atrofia glomerulare.

La proteinuria risulta essere la conseguenza della lisi delle cellule che costituiscono la barriera di filtrazione glomerulare e del danneggiamento della membrana basale del glomerulo: più precisamente il danno ossidativo risulta a carico delle integrine che tengono unite le cellule epiteliali alla membrana basale. Se, da una lato, la proteinuria può essere vista come la conseguenza di un danno ossidativo glomerulare, dall'altro anch'essa contribuisce alla produzione di ROS a livello tubulare dove comporta infatti un incremento dell'attività di riassorbimento con un aumentato consumo di ossigeno (Nath K.A. et al.; Haugen et al., 1999).

È stato dimostrato che le specie reattive dell'ossigeno possono inoltre indurre l'attivazione di segnali di trascrizione che stimolano la sintesi di DNA con un effetto ipertrofizzante e mutageno. Uno dei meccanismi principali di induzione della mitogenesi a livello renale consiste nella stimolazione dell'espressione della citochina fibrogenetica TGF β 1. È stato dimostrato che nei reni di ratti alimentati con una dieta carente in antiossidanti l'espressione del mRNA di questa citochina è aumentata di tre volte (Haugen et al., 1999). I ROS sono inoltre capaci di attivare l'NF-kB (nuclearfactor kB), l'AP-1(activator protein-1) e l'HIF-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α) che inducono ipertrofia delle cellule muscolari lisce vasali (VSMC) (Modlinger et al., 2004). Tramite questi fattori di trascrizione lo stress ossidativo contribuisce all'ipertrofia tubulare che si osserva nei nefroni intatti, alla proliferazione delle cellule del mesangio con conseguente glomerulosclerosi, alla fibrogenesi interstiziale.

Lo stato infiammatorio nei pazienti con IRC è rilevabile dall'aumento della concentrazione plasmatica di proteine della fase acuta, soprattutto della proteina C reattiva. Lo stress ossidativo e lo stato infiammatorio sono strettamente correlati: se è vero che numerose citochine come il PDGF (platelet-derived-growth-factor) ed il TNF α possono stimolare la produzione di specie ossidanti come meccanismo di difesa, è stato dimostrato che sia i radicali liberi che alcuni loro metaboliti contribuiscono ad indurre uno stato infiammatorio a livello renale (Conner, 1996).

Lo stress ossidativo nel cane affetto da patologie renali è stato fino ad oggi valutato principalmente su animali da laboratorio in cui il danno renale organico veniva indotto sperimentalmente attraverso la somministrazione di sostanze tossiche, la nefrectomia monolaterale, il clampaggio delle arterie renali. La maggior parte di questi studi aveva lo scopo di indagare l'efficacia della somministrazione di antiossidanti esogeni in modelli sperimentali di insufficienza renale. Dal punto di vista medico veterinario questi esperimenti forniscono delle indicazioni di base da cui partire per approfondire lo studio dello stato ossidativo nel cane affetto da patologie renali.

Le ricerche svolte negli ultimi anni hanno confermato la presenza, negli animali da compagnia come nell'uomo, di una forte correlazione tra stress ossidativo e patologia renale; anche nel cane i reni sono organi in cui c'è un'alta produzione di radicali liberi prodotti dalle cellule glomerulari, dalle cellule tubulari e dai macrofagi attivati durante la respirazione ossidativa (Locatelli et al., 2003); in caso di IRC, nei nefroni rimasti c'è un aumento della produzione di radicali liberi causata da un iperfunzionalità degli stessi, e quindi un ulteriore peggioramento dello stress ossidativo (Locatelli et al., 2003).

Inoltre le patologie croniche renali spesso sono accompagnate da condizioni concomitanti che possono aumentare la produzione di ROS e diminuire la barriera antiossidante, come per esempio l'età avanzata, l'attivazione del sistema renina-angiotensina con conseguente ipertensione a livello renale e uno stato infiammatorio renale e sistemico (Locatelli et al., 2003).

Uno studio condotto da Kargin et al. ha analizzato i valori plasmatici di malonildialdeide, i valori degli enzimi SOD, CAT e GSH-Px in emolisi di globuli rossi ed i livelli sierici di beta-carotene ed acido ascorbico in un gruppo di 15 cani con CKD; hanno rilevato un'aumentata concentrazione di malonildialdeide nel gruppo studio rispetto al gruppo controllo e una ridotta concentrazione di livelli di antiossidanti endogeni come acido ascorbico, di SOD, CAT e GSH-Px suggerendo così una correlazione positiva tra intensità dello stress ossidativo e gravità della patologia (Kargin et al., 2001).

Sono stati svolti studi che hanno dimostrato, ad esempio, che nel cane, a seguito di un danno da ischemia/riperfusion, risultano elevati i valori di malonildialdeide, indice di perossidazione lipidica, e che la somministrazione di acido ascorbico e di superossido dismutasi riduce la concentrazione di radicali liberi limitando il danno ossidativo all'endotelio tubulare (Geene et al., 1991; Lee Joe-il et al., 2006).

Uno studio del 2008 mette in relazione lo stress ossidativo con le caratteristiche dei globuli rossi in cani con azotemia renale, evidenziando che i livelli di RBC-CAT, RBC-GHS e MDA plasmatici risultano inalterati e quindi non correlabili al grado di azotemia renale; questo indica che non c'è nessun danno a carico dei globuli rossi, e quindi l'anemia che accompagna i cani con azotemia renale è causata da una soppressione della produzione piuttosto che da un maggior suscettibilità e emolisi (Buranakarl et al., 2008).

Lo stesso studio ha dimostrato che nei cani con azotemia renale il parametro biochimico U-MDA/Cr è risultato sensibile e correlabile con la gravità della patologia (Buranakarl et al., 2008).

Come confermato da studi svolti in medicina umana (Galle et al., 2003; Herrera et al., 2001; Luciak M. 2004; Mashiach E. 2001; Massy Z. A. 2001; Santangelo et al., 2004; Willkox et al., 2004), anche negli animali è molto importante in caso di patologie renali, la somministrazione di antiossidanti esogeni per migliorare la barriera antiossidante e quindi prevenire e ridurre le complicazioni di tale malattia.

Yu, Gross e Allen hanno studiato l'effetto della somministrazione di un mangime integrato con vitamina A, C ed E sullo stato ossidativo e sugli indici di funzionalità renale in un campione di 10 cani che presentavano un'insufficienza renale cronica di stadio 2 o 3 (con valori di creatinina tra 2 e 5 mg/dl e di urea > 35 mg/dl). Dopo 4 settimane di trattamento è stata osservata una diminuzione dei livelli di creatinina sierica, di MDA e di urea ed un aumento del peso specifico urinario e del peso corporeo (Yu. et al., 2006).

Un altro studio condotto da Pasquini et al. ha confrontato i livelli di d-ROMs in due gruppi di cani con CKI; il primo alimentato con una dieta clinica commerciale (basso contenuto di fosfati, ridotto tenore di proteine ad alto valore biologico, ad alto contenuto energetico derivato da fonti non proteiche, alti livelli di vitamine del gruppo B e arricchito con antiossidante come Vit. A, Vit. E, Vit. C) e il secondo gruppo alimentato con una dieta casalinga. I risultati hanno mostrato che il primo gruppo aveva valori di d-ROMs più bassi rispetto al secondo, ribadendo che un utilizzo di diete specifiche e con l'integrazioni adeguata di antiossidanti migliora lo stato clinico del soggetto. Inoltre hanno evidenziato che i d-ROMs sono risultati significativamente più elevati nei cani che sono morti entro due settimane rispetto a coloro che sono sopravvissuti più di due settimane. Questi risultati preliminari mostrano il possibile utilizzo prognostico del d-ROMs test nei cani con CKI (Pasquini et al., 2007).

Da alcuni studi svolti da Brown e collaboratori è emerso che, associata ad una terapia con antiipertensivi, calcio-antagonisti e ad una dieta povera di proteine, l'uso di acidi grassi polinsaturi omega 3-6 e l'uso di antiossidanti specifici, come vit E, luteina e carotenoidi, riduce la produzione di ROS a livello renale e quindi la progressione della malattia (Brown et al. 2000; Brown et al., 2007; Brown et al., 2008).

Un recente studio ha dimostrato l'efficacia dell' N-acetilcisteina nella prevenzione dei danni alle cellule renali causati dallo stress ossidativo in presenza di calcoli renali (Fihman et al., 2013).

Capitolo 3: Stress ossidativo e diabete mellito

Il diabete mellito è una patologia che può affliggere sia l'uomo che gli animali come cane e gatto; viene classificato in Diabete di tipo 1 (insulino- dipendente) e Diabete di tipo 2 (insulino-indipendente).

Nei cani è molto frequente che si presenti la forma insulino-dipendente; essa è caratterizzata da ipoinsulinemia e mancato aumento della concentrazione di insulina endogena anche dopo la somministrazione di sostanze insulino-stimolanti (per esempio glucosio o glucagone) (Nelson & Couto 2010). Le cause di questa patologia non sono ancora chiare ma sicuramente sono multifattoriali: per esempio sono considerati elementi scatenanti la predisposizione genetica, le infezioni, i farmaci antagonisti dell'insulina, l'obesità, le ileiti immunomediate e le pancreatiti (Nelson & Couto 2010).

Il risultato finale è comunque un'ipofunzionalità delle cellule β , ipoinsulinemia, insufficiente trasporto di glucosio nella maggior parte delle cellule e aumento di gluconeogenesi e glicogenolisi.

Lo stato di iperglicemia, secondario al deficit di insulina, porta ad un'eccessiva produzione di radicali liberi e ad una ridotta capacità cellulare di difendersi da essi in quanto c'è una riduzione delle difese antiossidanti (Acharya et al., 2014).

L'eccessiva produzione di radicali liberi in uno stato di iperglicemia persistente è attribuita ad alcuni processi quali l'autossidazione del glucosio, la glicazione non enzimatica delle proteine, l'attivazione della NAD(P)H ossidasi e ossido nitrico sintetasi; questo stimola diverse vie biochimiche tra le quali ritroviamo l'attivazione intracellulare via dei polioli, la via delle esosamine, delle proteina c kinasi e la formazione degli AGE (advanced glycation end products) (Brownlee, 2001).

La glicazione non enzimatica è legata alle proprietà chimiche intrinseche del glucosio; quest'ultimo, infatti, è una poliossialdeide e come tale, conserva la reattività del suo gruppo carbonilico nei confronti dei gruppi amminici di amminoacidi, proteine e nucleotidi. Gli AGE sono i prodotti di tale reattività, favoriti dalle specie reattiva dell'ossigeno (Iorio et al., 2004). Inoltre il glucosio, sempre per le sue intrinseche proprietà chimiche, può auto-ossidarsi, generando direttamente radicali liberi e altre sostanze ossidanti. Come altri monosaccaridi, infatti, esso può subire l'azione catalitica di tracce di metalli di transizione allo stato libero (es. ferro e rame)

generando radicale ossidrilico, anione superossido, perossido di idrogeno e derivati carbonilici tossici; questi ultimi contribuiscono notevolmente ad amplificare il danno ossidativo a carico di altri target molecolari, quali le proteine (Iorio et al., 2004).

L'attivazione intracellulare della via dei polioli è secondaria all'aumentata disponibilità di glucosio intracellulare libero che, non potendo essere metabolizzato attraverso la glicolisi a causa del deficit insulinico, è trasformato dall'aldoso reduttasi in sorbitolo; quest'ultimo si accumula nella cellula e, convertito in fruttosio dalla sorbitolo-deidrogenasi, provoca un aumento del rapporto NADH/NAD⁺ citosolico. L'alterazione del bilancio redox che ne consegue (pseudoipossia iperglicemica) favorisce la produzione di anione superossido attraverso la riduzione della PGG₂ a PGH₂ da parte della prostaglandina idroperossidasi NADH-dipendente (Iorio et al., 2004).

È documentato in medicina umana il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi delle complicanze micro e macrovascolari date dal diabete mellito che portano a nefropatie, retinopatie, cardiomiopatie e neuropatie (El Boghdady et al., 2012; Colak et al., 2005; Kesavulu et al., 2001; Bhatia et al., 2003; Gallan et al., 2010).

Oltre che a essere implicato negli effetti a lungo termine della malattia, lo stress ossidativo partecipa alla patogenesi del diabete mellito influenzando la sensibilità dell'insulina e la funzionalità delle cellule β del pancreas. Recenti studi in animali ed esseri umani pre-diabetici hanno suggerito un ruolo dei radicali liberi nella patogenesi dell'insulino-resistenza (Houstis et al., 2006; Meigs et al., 2007). Le cellule β pancreatiche, deputate alla produzione di insulina, sono vulnerabili al danno ossidativo perché presentano basse concentrazioni di difese antiossidanti; infatti è dimostrato come il sinergismo di glucotossicità, stress endoplasmatico e stress ossidativo porti ad una degenerazione e morte di tali cellule (Poitout et al., 2002; Eizirik et al., 2008; Robertson et al., 2004).

Uno studio molto recente ha voluto indagare meglio su questo aspetto, misurando i marcatori dello stress ossidativo e i livelli di antiossidanti nei pazienti diabetici sia al momento della diagnosi sia durante il trattamento (con valutazioni periodiche) e confrontarli con pazienti sani non diabetici. Nei loro risultati si nota come livelli elevati di stress ossidativo al momento della diagnosi siano correlabili ad una ridotta funzione delle cellule β e che le misurazioni svolte durante la terapia anti-diabetica (qualsiasi essa sia) dimostrino una riduzione dei marker dello stress ossidativo collegabile ad una migliore funzionalità delle cellule β (Acharya et al., 2014).

In un altro studio hanno cercato di investigare il ruolo dello stress ossidativo nelle complicazioni del diabete di tipo 1 in giovani pazienti; gli autori hanno preso in considerazione, in base a studi svolti precedentemente, i livelli di metalli sierici, quali rame e zinco (Chasapis et al., 2012; Malavolta et al., 2010), i livelli della SOD (enzima antiossidante) (Martin-Gallan et al., 2003; Suys et al., 2007), livelli di marker di perossidazione lipidica MDA (Martin-Gallan et al., 2003) e livelli di marker ossidativi del DNA (8-OHdG)(Goodarzi et al., 2006; Hata et al., 2006) in giovani malati di diabete di tipo 1 con differenti stati del controllo glicemico. Attraverso l'elaborazione dei risultati è emerso che livelli alti di stress ossidativo e rame sierico sono correlabili ad un minore controllo glicemico e che un apporto esogeno di zinco può ridurre gli effetti nocivi del rame sulla formazione dei radicali liberi. I suddetti studi hanno dimostrato che attraverso il controllo rigoroso della glicemia,, una riduzione dello stress ossidativo e una concentrazione minore di rame, si può prevenire e diminuire le complicanze diabetiche negli adolescenti con diabete mellito di tipo 1 (Ching-Ciangh et al., 2013).

Il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi delle complicazioni, date dal Diabete Mellito, in medicina veterinaria è dimostrato da studi scientifici che hanno evidenziato una maggiore concentrazione di malondialdeide (un marcatore di perossidazione lipidica) e una riduzione dello stato antiossidante in cani malati rispetto ai cani sani (Gardiner et al., 2003; Dineli et al., 2007).

Su cani affetti da Diabete Mellito insulino-dipendente trattati con terapia insulinica, alcuni studi hanno valutato la funzionalità degli eritrociti facendo particolare attenzione allo stato antiossidante, alla resistenza di membrana, all'attività enzimatica e alla concentrazione di 2,3-difosfoglicerato. Da questi studi è emerso che non vi era rilevanza di fragilità osmotica e che la concentrazione di GSH e di Piruvato- chinasi (PK) era la stessa tra il gruppo di cani con IDDM e i cani sani, mentre i valori di 2,3 DPG e 6GPD erano statisticamente più elevati nei cani malati (Comazzi et al., 2002). Questi risultati sono contrastanti rispetto agli studi svolti in umana e sul gatto che evidenziano invece una diminuzione della concentrazione di GSH e una maggior fragilità osmotica degli eritrociti causata dalla perossidazione lipidica data dai radicali liberi (Gandhi e Chowdhury 1979; Konukoglu et al., 1999; Zaltzberg et al., 1999; Jain, 1989).

Un altro studio del 2009, analizzando gli enzimi eritrocitari quali RBC-TBARS, RBC-CAT (catalasi), e la concentrazione interna di RBC-GSH (glutazione) ed elettroliti

come il Na⁺ e il K⁺, ha evidenziato che alte concentrazioni di tali enzimi e di RBC-K erano proporzionali alla gravità della patologia e quindi lo stress ossidativo può essere considerato un fattore rilevante nelle complicanze del diabete mellito nel cane (Chansaisakorn et al., 2009).

In uno studio del 2010 Ojaimi e collaboratori hanno indotto il diabete di tipo I con alossana monoidrato in gruppo di cani per studiarne i cambiamenti globali dell'espressione genica cardiaca; i risultati hanno evidenziato che nei cani malati, rispetto ai sani, vi era una down regulation dell'espressione di SOD-1 e un decremento di un grande numero di enzimi mitocondriali e di proteine strutturali. Di interesse particolare sono i geni coinvolti nel metabolismo del glutatione (glutatione perossidasi 1, glutatione reduttasi e glutatione S-tranferasi) che risultano marcatamente ridotti.

Il profilo di espressione genica, dedotta dallo studio, suggerisce un effetto diretto del diabete di tipo I sul cuore alterando la biodisponibilità di ON attraverso lo stress ossidativo, compromette l'assorbimento del calcio del sistema di trasporto mitocondriale, la perossidazione lipidica, la regolazione dell'acido citrico e la catena respiratoria indicativi di una disfunzione mitocondriale nei cani con DM (Ojaimi et al., 2010).

Capitolo 4: Stress ossidativo e malattie

cardiovascolari

Molti studi svolti negli ultimi anni, nel campo della medicina umana hanno dimostrato un coinvolgimento dei radicali liberi nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari (Griendling et al., 1998). Tali patologie rappresentano la principale causa di morte nei paesi Occidentali, in particolare in Europa e in Nord America.

Alla base della maggior parte delle malattie cardiovascolari vi è l'arterosclerosi; tale patologia è generalmente a distribuzione sistemica ed è caratterizzata da un ispessimento dell'intima o, in generale, dello strato dell'arteria prospiciente il lume vasale. Sono stati descritti tre tipi di ispessimento o "placche" di gravità crescente: placche ateromasiche, placche fibrose e placche complicate (Ilorio et al. 2004).

Le placche ateromasiche sono costituite da "foam cells", cellule ricche di lipidi che possono derivare sia dalle cellule della muscolatura liscia che dai macrofagi, e si presentano come sollevamenti più o meno pronunciati dell'intima, disposti lungo l'asse maggiore del vaso. Le placche fibrose consistono in una degenerazione delle precedenti e appaiono con lesioni rotondeggianti di circa 1 cm; una tipica placca fibrosa consiste di un "tappo" fibroso, costituito da cellule della muscolatura liscia e tessuto connettivo contenente collagene, elastina e proteoglicani che ricoprono un'area ricca di macrofagi, cellule muscolari lisce, linfociti T e da un centro necrotico che contiene detriti cellulari, deposito lipidici extracellulari e cristalli di colesterolo. Ed infine le placche complicate sono probabilmente placche fibrose alterate da necrosi, deposizione di calcio, emorragie e trombosi, fenomeni nei quali gioca un ruolo fondamentale la cascata infiammatoria (Ilorio et al. 2004).

I radicali liberi sono rilevanti nella patogenesi delle lesioni arterosclerotiche attraverso il processo che porta all'ossidazione delle LDL. L'ossidazione delle LDL porta alla degradazione degli acidi grassi polinsaturi con la coniugazione dei corrispondenti frammenti ai fosfolipidi e all'apoproteina B; quest'ultima successivamente va incontro a frammentazione e, modificando la sua conformazione, viene riconosciuta come non-self dai recettori scavenger presenti sulla membrana dei monociti/macrofagi e quindi fagocitata da quest'ultimi. L'espressione di tali recettori non è modulata da alcun meccanismo di down-regulation, a differenza dei comuni recettori e di conseguenza i

macrofagi inglobano progressivamente LDL ossidate trasformandosi in foam cells ricche di grassi. Le LDL ossidate hanno delle proprietà che le rendono molto più aterogenetiche rispetto alle LDL normali: sono citotossiche, inducono l'espressione di molecole di adesione e la produzione di sostanze chemio tattiche, inibiscono l'attività di fattori di rilascio endotelio-dipendenti, incrementano l'espressione di fattori tissutali, attivano le piastrine e le cellule T, stimolano la crescita delle cellule muscolari lisce e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno e, in generale, della reazione immunitaria.

La maggior parte delle malattie coronariche nell'uomo derivano da complicazioni dell'arterosclerosi, lo stress ossidativo e l'infiammazione sono associati positivamente con l'instabilità della placca aterosclerotica e con l'incidenza della Sindrome Coronarica Acuta (ACS) (Teodora et al. 2013). Uno studio condotto da Ehara et al. ha dimostrato un aumento dei livelli plasmatici di LDL ossidati in corso di ACS (Ehara et al. 2001). Mentre un altro studio condotto da Kaneda et al. ha messo in evidenza che i livelli plasmatici di AOPP (advanced oxidative protein product) siano significativamente più alti in pazienti con malattia coronarica rispetto ad altri (Kaneda et al., 2002).

Un altro studio ha osservato che anche quando non vi era alcuna differenza significativa nel grado di stenosi angiografica, la generazione di ROS era significativamente maggiore nei pazienti con angina pectoris instabile rispetto ai pazienti con angina stabile (Azumi et al., 2002).

Un'ulteriore ricerca conferma lo studio di Azumi e collaboratori in quanto stabilisce che i livelli di tioredossina, una proteina stress inducibile che contiene una parte redox-attiva nel suo sito attivo che fornisce una protezione cellulare contro lo stress ossidativo, sono significativamente aumentati nei pazienti con angina non stabile rispetto a quelli con angina stabile (Hokamaki et al., 2005).

Un'ulteriore studio conferma che i pazienti con angina pectoris spastica avevano livelli di tioredossina sierica significativamente più alti, associati a livelli sierici inferiori di Vit. E antiossidante (Miwa et al., 2003).

L'assunzione di Vit. E è consigliata ai pazienti con aterosclerosi come antiossidante per prevenire la perossidazione lipidica (Schoonover et al., 2001).

In uno studio eseguito recentemente in umana, hanno cercato di valutare il potere antiossidante di un enzima chiamato paraxonase-1 (PON1) nei pazienti con malattie coronariche (CAD). In corso di stress ossidativo, non solo le LDL sono suscettibili alla

perossidazione lipidica, ma anche tutti gli altri lipidi sierici, comprese le HDL, sono soggette a ossidazione. È stato dimostrato che le HDL modificate dal danno ossidativo hanno una ridotta capacità di promuovere un efflusso di colesterolo; quindi l'attività di protezione della PON1 nei confronti dell'ossidazione delle HDL può conservare le funzioni antiaterogeniche di quest'ultime nel trasporto inverso del colesterolo. Questo studio ha dimostrato che può essere promettente valutare la funzione della PON1 per emettere una prognosi e impostare una terapia nei pazienti soggetti a malattie coronariche (Shekhanawar et al., 2013).

Lo stress ossidativo ha un ruolo fondamentale anche nel danno da ischemia-riperfusion e successiva riparazione cardiaca. L'interruzione del flusso sanguigno nelle arterie coronarie provoca ischemia dei tessuti adiacenti, portando a danno cellulare, che può provocare necrosi e apoptosi. La durata dell'ischemia determina l'entità del danno al miocardio e ai tessuti correlati. Durante l'ischemia, le difese cellulari contro il danno ossidativo sono compromesse, con attività ridotte di antiossidanti come la superossido dismutasi e glutatione perossidasi; inoltre viene prodotta una maggiore quantità di ROS, un esempio è la conversione della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi, un potente attivatore dell'ossigeno, e perossido di idrogeno (Ferrari et al., 2004). Il brusco ripristino dell'afflusso sanguigno nel tessuto ischemico, sebbene sia essenziale per il recupero funzionale del miocardio, provoca un aumento sostanziale dei livelli di ROS che paradossalmente provoca danni peggiori. Dopo la riperfusion i ROS e le citochine infiammatorie partecipano al danno tissutale e al rimodellamento cardiaco nel periodo postinfartuale (Zhao et al., 2002).

Sebbene in Medicina Veterinaria ci siano molti meno studi, ci sono già alcune evidenze che dimostrano, come in Medicina Umana, la correlazione tra stress ossidativo e malattie cardiovascolari.

Lo stress ossidativo può essere considerato un fattore scatenante della dilatazione ventricolare e quindi dell'insufficienza cardiaca, perché porta le cellule a morte per apoptosi. Come da studi svolti precedentemente in Medicina Umana (Guerra et al., 1999; Ide et al., 2000; Rossig et al., 2000; Haustetter et al., 1998; Narula et al., 1999; Narula et al., 2000) in uno studio del 2001 svolto sui cani, è stato visto come l'accumulo di prodotti reattivi dell'ossigeno come la nitrotirosina, la formazione di frammenti p53, il rilascio del citocromo c, l'attivazione della caspasi 9 e 3 e il potenziamento dell'espressione dello stress ossidativo mediante espressione del p66Shc sia evidenziabile in corso di morte cellulare per apoptosi di miociti, fibroblasti

e cellule endoteliali (Ceselli et al., 2001; Ling Gao et al., 2008). Questi studi hanno evidenziato che la morte cellulare era maggiore per i miociti, probabilmente causata dall'ipossia dovuta alla scomparsa dei vasi per morte delle cellule endoteliali; ecco perché lo stress ossidativo può aggravare ulteriormente un cuore scompensato (Ceselli et al., 2001). Uno studio correlato ha sperimentato gli effetti benefici della metformina in casi di insufficienza cardiaca; infatti questo farmaco stimolando l'azione della proteina chinasi attivata AMPK attenua lo stress ossidativo che induce apoptosi dei cardiomiociti, prevenendo la progressione dell'insufficienza cardiaca (Hideyuki et al., 2009).

Nel 2008 Ling Gao e collaboratori hanno evidenziato come sia importante il ruolo dei radicali liberi prodotti a livello mitocondriale nella patogenesi del rimodellamento miocardico e dello scompenso; gli autori hanno sottolineato e confermato uno studio svolto in umana (Rosemberger et al., 2006) che dimostra che i ROS inducono ipertrofia e apoptosi dei miocardiociti e che stimolano la produzione di metalloproteinasi di matrice; le quali inducono un rimodellamento del ventricolo sinistro e una ridotta attività enzimatica mitocondriale con conseguente insufficienza cardiaca (Ling Gao et al., 2008).

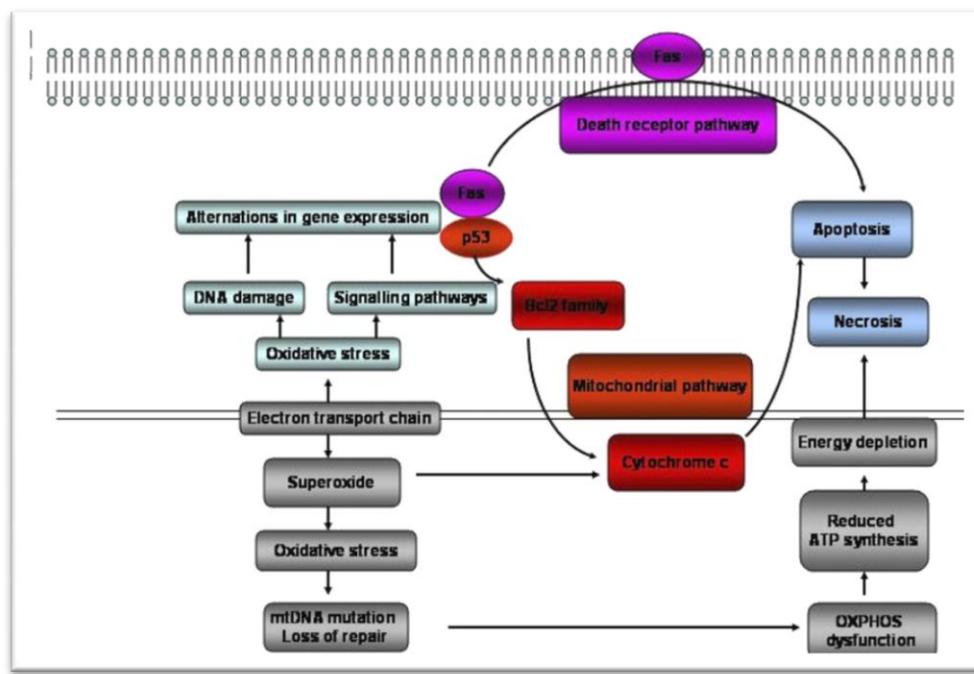


Figura 4.1: Generazione di Ros a livello mitocondriale e apoptosi cellulare (Lee HC et al., 2007).

Uno studio condotto da Moe et al. su cani con grave insufficienza cardiaca, ha evidenziato la correlazione tra stress ossidativo e un recettore di tipo I dell'angiotensina (AT1R), evidenziando che un blocco di tale recettore (da parte di un farmaco antiipertensivo che agisce sui AT1R) riduce lo stress ossidativo vascolare, attenuando il deterioramento emodinamico e riducendo il rimodellamento dei margini ventricolari. Inoltre inverte la down regulation dei recettori di tipo II, che si oppongono agli effetti ipertensivi dei recettori di tipo I (Moe et al., 2008).

In un altro studio sono stati documentati alterazioni dello stato antiossidante e dello stress ossidativo in cani con cardiomiopatia dilatativa Idiopatica (DCM) (Freeman et al., 1999). In uno studio successivo hanno voluto approfondire e documentare il rapporto dello stress ossidativo con la malattia nei cani affetti da insufficienza cardiaca congestizia (CHF) (Freeman et al., 2005).

In uno studio svolto, Hetyey et al. hanno voluto confrontare i livelli plasmatici di antiossidanti, misurando l'attività antiossidante totale (TAS) e la capacità plasmatica di riduzione del ferro (FRAP), in cani sani e cani affetti da cardiomiopatia dilatativa o da endocardiosi mitrale, arrivando alla conclusione che vi è una maggiore reattività antiossidante rilevata dal FRAP ma che non ci sono differenze significative con il test TAS tra i cani sani e i cani malati. L'entità di questo aumento sembra sia dato dalla gravità della insufficienza cardiaca e/o della frequenza cardiaca o disturbi del ritmo, che dalla sottostante malattia cardiaca stessa (Hetyey et al., 2007).

In un lavoro sperimentale Qanud et al. hanno voluto testare la ripresa della normale attività cardiaca in cani dopo aver indotto in essi un insufficienza cardiaca; gli autori hanno misurato l'utilizzo del substrato per la ripresa del normale metabolismo energetico. Con un precedente studio avevano già evidenziato che i cani con grave HF indotta spostavano il muscolo cardiaco a utilizzare maggiormente il glucosio come substrato energetico e riducevano il consumo di FFA e quindi il superossido generato dalla NADPH ossidasi era uno stimolo che portava a ipertrofia del muscolo cardiaco (Byrne JA et al., 2003). Dallo studio è emerso che le alterazioni nell'ossidazione del substrato energetico, durante la ripresa della normale attività cardiaca, ritornavano normali; infatti l'ossidazione del glucosio ritornava ai valori di controllo e la produzione di superossido in eccesso, che era risultata elevata come nei precedenti studi (Gupte et al., 2006; Gupte et al., 2007), si riduceva fino ai valori normali in 10 giorni (Qanud et al., 2008).

Capitolo 5: Stress Ossidativo e Neoplasia

L'oncogenesi è un processo complesso costituito da una sequenza di eventi che portano una cellula sana ad evolvere ad uno stadio intermedio pre-tumorale, per poi passare a quello neoplastico vero e proprio (Valko et al., 2006).

Sono stati individuati due meccanismi chiave nell'induzione del tumore:

1. Secondo il primo, la presenza di sostanze cancerogene di varia natura indurrebbe un aumento nella frequenza delle mutazioni del DNA.

In seguito ad errori nella riparazione delle alterazioni che si verificano, queste mutazioni, poi, si trasmetterebbero, attraverso la clonazione cellulare, determinando il passaggio da uno stato preneoplastico ad uno stato neoplastico vero e proprio con l'insorgenza di mitosi cellulari incontrollate (Guyton K.Z. et al., 1993) (Trush et al., 1991). Negli ultimi trent'anni sono state compiute intense ricerche per identificare i geni mutati ("geni cancerogeni") che sono più direttamente implicati nell'oncogenesi. Questi studi indicano che mutazioni in più dell'1% dei geni, nell'uomo, contribuiscono all'insorgenza del tumore.

2. Il secondo meccanismo prende in considerazione l'equilibrio che fisiologicamente esiste tra la proliferazione cellulare e la morte cellulare.

Quando si verifica un danno al DNA troppo grave per essere riparato, esiste un importante meccanismo di eliminazione selettiva delle cellule danneggiate. Questo processo è chiamato apoptosi, o morte cellulare programmata. Durante l'apoptosi, che è un processo fisiologico, le cellule vanno incontro ad un "suicidio programmato" che determina alcuni sostanziali cambiamenti morfologici e strutturali. Durante la proliferazione cellulare, la proteina p53 riveste un ruolo preminente nel controllo dell'integrità del DNA (Oren et al., 2003); questa, ad esempio, controlla l'eliminazione delle basi di DNA ossidate che causano mutazioni.

Quando invece il danno cellulare non è riparabile la proteina p53 induce l'apoptosi. L'apoptosi incontrollata può essere dannosa per tutto l'organismo, portando alla distruzione di cellule sane (Hussain et al., 2003). Esiste un sottile sistema di regolazione tra i fattori che inducono l'apoptosi e altri che la inibiscono. Più della metà dei tumori presentano difetti nell'espressione del gene che controlla la proteina

p53 (Valko, 2006). In conclusione i processi oncogenetici possono essere descritti come uno squilibrio tra la proliferazione cellulare e la morte cellulare, “shiftato” verso la proliferazione cellulare.

La biologia molecolare ha dimostrato che esistono geni i quali quando “attivati” (oncogeni) o “inattivati” (geni soppressori del tumore), contribuiscono all’espansione del clone di una cellula originaria (teoria “*oncogene/gene soppressore del tumore*”). Con il termine oncogene si intende ogni gene la cui attivazione può indurre trasformazioni di tipo proliferativo/neoplastico. Questa definizione rischia di essere fuorviante, poiché non prende in considerazione che l’espressione di questi geni si verifica normalmente in corso di rigenerazione tissutale. I geni soppressori del tumore, invece, possono essere classificati in due sottocategorie: “caretaker” (“geni controllori”), incaricati di riparare il DNA, e “gatekeepers” (“geni blocco”), che inibiscono il ciclo cellulare (Shinya, 2006). Molti esperimenti hanno dimostrato che le cellule tumorali con oncogeni attivati presentano disfunzioni a livello delle gap junction (GJIC).

Queste scoperte suggeriscono che le comunicazioni intercellulari presentano un ruolo rilevante nella biologia molecolare del tumore influenzando la crescita, la differenziazione e l’apoptosi cellulare (Trosko, 2003).

Lo sviluppo del tumore è un processo che passa attraverso tre stadi principali: inizio, promozione e progressione (Valko et al., 2006).

Nella fase di *inizio* dell’oncogenesi si assiste ad una mutazione non letale del DNA che dà origine ad una cellula alterata la cui successiva replicazione tende a perpetuare la mutazione all’interno di un clone cellulare. Le cellule, però, normalmente sono in grado di interrompere temporaneamente il loro ciclo cellulare allo stadio G1, S o G2 (“checkpoints”), riparare il danno e riprendere la replicazione (Loft et al., 1996).

I ROS possono provocare un danno ossidativo del DNA in questa fase; in particolare il radicale idrossilico è in grado di reagire con tutti i componenti della molecola del DNA, interessando una sola catena o entrambe le catene della doppia elica, provocando alterazioni delle basi azotate o cross-links (Dizdaroglu et al., 2002). Inoltre i danni del DNA provocati dallo stress ossidativo possono esitare nell’arresto o nell’induzione della trascrizione del materiale genetico, possono indurre le vie dei segnali di trasduzione o provocare instabilità genomica e errori di replicazione. Tutte queste situazioni sono correlate con lo sviluppo del tumore (Marnett et al., 2000) (Cooke et al., 2003).

Diversi studi sui tumori benigni rilevano un'interessante correlazione tra la dimensione della massa neoplastica e lo stress ossidativo dell'organismo; quest'ultimo è stato correlato anche con la trasformazione stessa del tumore da benigno a maligno (Loft et al., 1996).

La fase detta di *promozione* del tumore è caratterizzata da una espansione del clone cellulare danneggiato in seguito ad una anomala induzione della proliferazione cellulare o a un'inibizione dell'apoptosi. Questo processo esita nella comparsa di una lesione focale ben identificabile di tipo preneoplastico. Questo stadio necessita della persistenza dei fattori di promozione tumorale e in ogni caso è un processo ancora reversibile (Loft et al., 1996). Molti di questi fattori di promozione del tumore esercitano un forte effetto inibitorio sui sistemi di difesa antiossidante della cellula, come la SOD, il glutatione, le catalasi.

La *progressione* è il terzo ed ultimo stadio del processo oncogenetico. In questo stadio si verificano quei cambiamenti molecolari e cellulari che conducono dallo stato preneoplastico a quello neoplastico vero e proprio. Si tratta di un processo irreversibile caratterizzato da instabilità genetica e distruzione del materiale cromosomico, in cui si assiste all'accumulo di alterazioni genetiche che determinano la trasformazione della cellula da benigna a maligna.

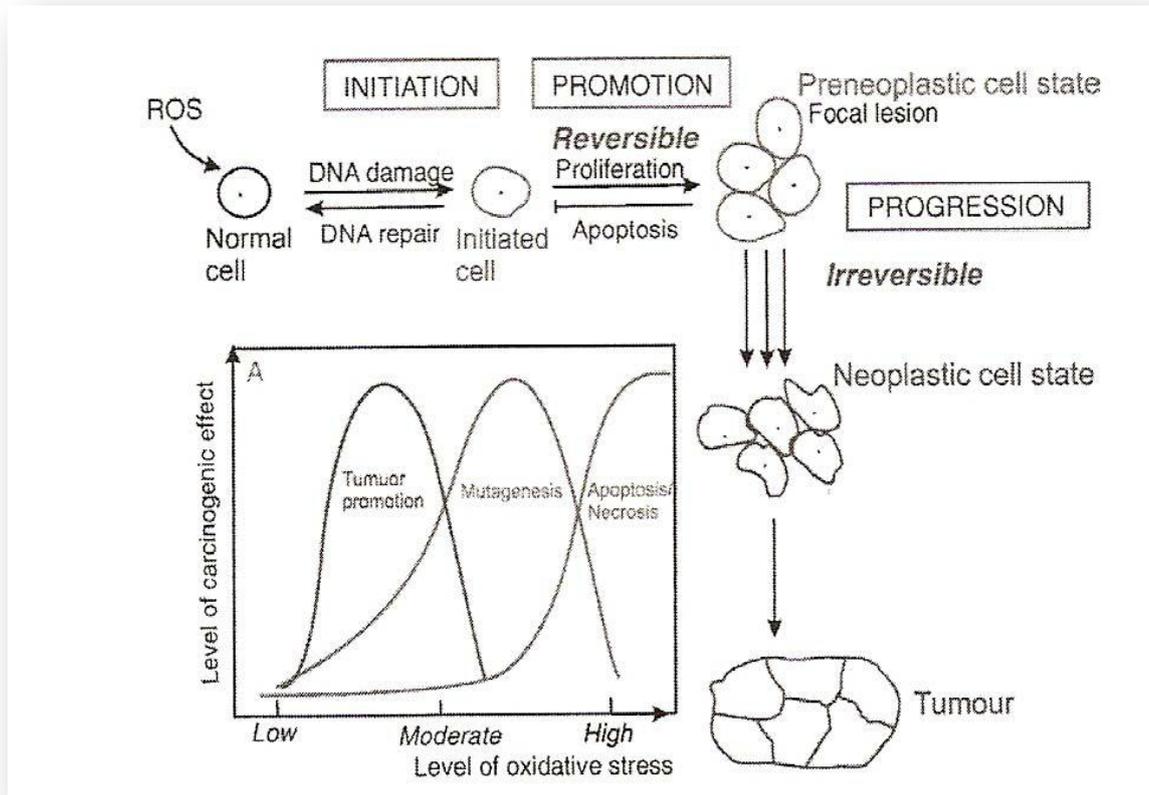


Figura 6.1- Tre stadi dell'oncogenesi e correlazione con i livelli di radicali liberi.

Numerosi studi hanno permesso di dimostrare che i ROS possono intervenire in tutti gli stadi della carcinogenesi (Moller et al., 1998) determinando o aggravando le condizioni che portano al verificarsi dei meccanismi oncogenetici sopradescritti, comportandosi sia come agenti epigenetici (modulano la crescita e la morte cellulare) che genotossici (che mutano direttamente il DNA) (Valko et al., 2006) (Storz, 2005).

I radicali liberi sono in grado di modulare l'espressione genica stimolando o inibendo i segnali di trasduzione cellulare e i fattori di trascrizione cellulare (Erhola et al., 1996); le cellule comunicano, le une con le altre e rispondono agli stimoli esterni attraverso meccanismi biologici chiamati *segnali di trasduzione*. Questi permettono all'informazione di essere trasmessa dall'esterno della cellula ai vari elementi interni alla cellula stessa (Valko et al., 2006).

È stato chiaramente dimostrato che i ROS interferiscono con l'espressione di numerosi segnali di trasduzione: possono agire a livello della cellula come secondi messaggeri, mediatori intracellulari del messaggio ormonale ricevuto dall'esterno (Palmer et al., 1997); possono, insieme agli ioni metallici, inibire alcuni enzimi come le fosfatasi,

molto probabilmente interagendo con i gruppi sulfidrici, inducendo dei cambiamenti strutturali che alterano la conformazione delle proteine determinando l'up-regulation di specifiche cascate di segnali di trasduzione. Infine partecipano alla regolazione del metabolismo degli esseri viventi influenzando la concentrazione del calcio intracellulare, la fosforilazione delle proteine e l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione (Storz, 2005).

Oltre al ruolo che i radicali liberi assumono nell'insorgenza nella malattia, i ROS intervengono anche nella progressione del tumore attraverso due meccanismi: nel primo, una mancanza di assunzione di glucosio, proteine e vitamine causata da vomito anoressia e nausea, provoca un'alterazione del metabolismo energetico con un conseguente accumulo di ROS (radicale ossidrilico, radicale superossido o altri). Il secondo meccanismo è correlato ad un'attivazione cronica, non specifica, del sistema immunitario con un'eccessiva produzione di citochine proinfiammatorie che, a loro volta, possono incrementare la produzione di ROS (Mantovani et al., 1998).

Da uno studio svolto da Mantovani. è emerso che lo stress ossidativo esercita un ruolo regolatorio nella crescita e nella progressione del tumore, includendo l'instabilità genomica, l'attivazione di oncogeni e l'angiogenesi, come confermato da precedenti dati bibliografici Blackburn R.V. *et al.*, 1999, Jaruga P. *et al.* 1994, Sun Y. *et al.*, 1996 (Mantovani et al., 2002).

Anche l'utilizzo di farmaci chemioterapici e la radioterapia inducono un aumento eccessivo della produzione di radicali liberi da parte delle cellule tumorali; tale aumento può essere spiegato da diversi meccanismi quali l'alterazione della catena respiratoria o dei meccanismi ossidoriduttivi, o un'attivazione dell'ossidazione mitocondriale mediata dal gene p-53 (Conklin, 2000).

Molti farmaci antitumorali come gli agenti alchilanti e soprattutto il cisplatino sono composti elettrofilici altamente reattivi. Altri, invece, come la doxorubicina, legano il ferro nei tessuti e quindi producono ROS e possono indurre cardiotossicità (Ertola et al., 1996).

Inoltre molti studi confermano una riduzione significativa nella concentrazione di antiossidanti nel plasma e nei tessuti in seguito ad una terapia con chemioterapici; dovuto sia ad eccessivo consumo, sia ad una perdita renale in seguito ad un'alterazione di filtrazione dovuta all'uso di chemioterapici (Wejil et al., 1998).

Il legame tra insorgenza e prevenzione del tumore e il sistema antiossidante è ormai oggetto di studio da diversi anni; molti studi mostrano il ruolo degli antiossidanti

enzimatici come le SOD (Beherend L., 2003; Valko et al., 2006), le catalasi (Mates et al., 1999) e degli antiossidanti esogeni come la Vit C (You et al., 2000), Vit E (Miller et al., 2005) e selenio (Trueba et al., 2004) e Glutazione (Pastore et al., 2003; Masella et al., 2005) nella progressione del tumore.

Come in medicina umana, anche in medicina veterinaria sono stati svolti degli studi per analizzare il ruolo dello stress ossidativo nei tumori che ritroviamo nel cane.

Nella cagna è molto frequente il tumore del tessuto mammario, interessa tutte le razze e la percentuale delle forme maligne è sovrapponibile a quelle benigne.

Uno studio del 2005 svolto su un gruppo di 25 cagne affette da tumore mammario ha analizzato i marker di stress ossidativo, con esami istopatologici, sui tessuti tumorali e sani dopo la chirurgia. Gli autori hanno valutato i prodotti della perossidazione lipidica e la concentrazione di antiossidanti enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutazione per ossidasi, glutazione S-trasferasi) e non enzimatici (vitamina C).

I risultati hanno evidenziato valori di MDA significativamente più alti nei tessuti neoplastici rispetto ai sani e anche i valori di difesa antiossidante erano aumentati (Kumaragurupan et al., 2005); questo può indicare che nelle cellule tumorali si può instaurare un equilibrio tra la produzione di ROS e la difesa antiossidante che favorisce una rapida proliferazione cellulare (Das, 2002). Gli stessi risultati erano emersi da uno studio condotto su cagne affette da neoplasia alla ghiandola mammaria (Szcubai et al., 2004), mentre si discostano in parte da quelli di Abiaka che evidenziava invece una riduzione dell'attività enzimatica antiossidante nelle cellule tumorali di cani malati (Abiaka et al., 2002). Uno studio del 2013 condotto su 16 cani malati ha confermato un aumento dei TBARS e una diminuzione dell'a-tocoferolo nel tessuto neoplastico rispetto a quello sano, ma non aveva evidenziato differenze significative nei livelli di marker di stress ossidativo tra i cani sani e quelli malati (Karayannopoulou et al., 2013).

Questi risultati confermano quelli già emersi in studi fatti in medicina umana (Karihtala et al., 2005) (Brown et al., 2001) che evidenziano un aumento dei ROS collegato non solo alla carcinogenesi del tumore, ma anche alla sua progressione.

In uno studio del 2004 la presenza di stress ossidativo è stata valutata in pazienti affetti da linfoma prima e dopo la cura con chemioterapici. I risultati ottenuti hanno mostrato un'alterazione significativa a livello della concentrazione di SOD e di GSH

nei globuli rossi emolisati. Entrambi i parametri risultano ridotti se comparati con i soggetti di controllo. Anche l'attività della superossido dismutasi, la concentrazione di GSH e il rapporto GSH/GSSG nei linfonodi neoplastici mostra valori ridotti rispetto al tessuto sano. Tutte le misurazioni eseguite sul plasma, invece, non hanno rivelato differenze significative tra soggetti sani e malati. Infine la concentrazione di radicali liberi nel tessuto tumorale è risultata più alta che nel corrispondente tessuto sano (Vadjovich et al., 2004).

Questi risultati sono confermati da uno studio del 2009, nel quale venivano evidenziati un abbassamento dei livelli di a-tocoferolo e g-tocoferolo e un innalzamento dei marker di perossidazione lipidica e di glutatione perossidasi al momento della diagnosi (Winter et al., 2009).

Una relazione interessante è emersa tra lo stress ossidativo cellulare e il periodo di sopravvivenza dei cani dopo il trattamento; i risultati dello studio di Vadjovich indicano che i cani con linfoma che presentano uno stato ossidativo ridotto e alti valori di GSH/GSSG a livello linfonodale rispondono meglio alla chemioterapia rispetto agli altri e quindi vanno incontro ad una prognosi più favorevole. Da qui la possibilità di conferire un ruolo prognostico allo stato ossidativo valutato su biopsie linfonodali in caso di approccio chemioterapico al tumore (Vajdovich et al., 2004).

Uno studio recente ha voluto analizzare le concentrazioni di antiossidanti e di marker di stress ossidativo nei cani con diagnosi di Mastocitoma e confrontarli con cani sani; sono stati misurati i livelli di d-ROMs, di BAP e di a-tocoferolo. I risultati hanno evidenziato una differenza significativa tra la concentrazioni di ROMs e BAP nei cani malati rispetto al gruppo di controllo, con valori di stress ossidativo aumentati e i livelli di antiossidanti diminuiti rispetto ai cani sani (Finotello et al., 2013). Questi risultati confermano quelli avuti nello studio sul linfoma nel cane. Sarebbe interessante approfondire tali studi per valutare l'impatto dei vari approcci terapeutici come la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia sullo stato ossidativo del paziente con mastocitoma (Finotello et al., 2013).

Uno studio recentissimo ha voluto analizzare il ruolo dello stress ossidativo nei cani con tumore al sistema nervoso, valutando i livelli di acido urico nel liquido cerebrospinale. I risultati hanno evidenziato un aumento del livello di acido urico nei cani con meningioma intracranico, confermando gli studi già svolti in umana (Landolt

et al., 1994; Stover et al., 1997; Cornwell et al., 2000). Sarebbe interessante approfondire tali studi per cercare una correlazione tra i livelli di marker di stress ossidativo e la gravità della patologia, e quindi anche della prognosi (Platt et al., 2014).

Capitolo 6: Lo stress ossidativo nel paziente critico

6.1 Definizione di paziente critico

Un paziente si definisce *critico* quando presenta una o più alterazioni d'organo che necessitano una correzione in tempi più o meno brevi per evitare un peggioramento clinico che potrebbe degenerare in un arresto cardio-respiratorio (Parra et al., 2005).

Per la gestione e il trattamento del paziente critico in emergenza è essenziale riuscire ad agire in tempi brevi per raggiungere l'obiettivo, ovvero risolvere lo stato di emergenza del paziente e stabilizzarlo.

È molto importante avere un'equipe ben affiatata e organizzata, è essenziale che tra i vari componenti della squadra ci sia collaborazione e fiducia e che ognuno abbia chiaro il proprio compito. Inoltre è molto importante che l'Unità di emergenza o di Terapia intensiva sia provvista di tutta l'attrezzatura e dei farmaci necessari per affrontare ogni tipo di emergenza (Aldrich, 2005).

Al momento dell'arrivo del soggetto in ospedale viene fatta una prima valutazione che permette la classificazione del paziente a seconda della gravità: Triage (Crowe, 2003).

Il triage è l'attribuzione della priorità ai pazienti e ai loro problemi al loro arrivo presso la struttura; è un sistema utilizzato per selezionare i soggetti coinvolti secondo classi di urgenza/emergenza crescenti, in base alla gravità delle lesioni riportate o del loro quadro clinico. I pazienti vengono suddivisi in quattro classi a cui vengono attribuiti dei codici (Rudloff, 2010):

- Codice rosso: “paziente critico”, deve essere trattato entro pochi secondi/minuti, es. arresto cardiaco, arresto respiratorio, dissanguamento.
- Codice giallo: “paziente molto grave”, deve essere trattato entro un ora, es. trauma, emorragia, assunzione di sostanza tossiche.
- Codice verde: “paziente grave”, deve essere visitato entro poche ore, es. ostruzione delle vie urinarie, fratturare esposte, ustioni.
- Codice blu: “paziente meno grave”, deve essere curato entro 24 ore, es. ostruzioni intestinali, corpi estranei esofagei.

In medicina d'urgenza la regola d'oro è *"treat the most life-threatening problem first"* ovvero curare per prima il problema che mette in pericolo il paziente. Per evitare le perdite di tempo e non dimenticare le priorità in medicina d'urgenza è stato creato l'Alfabeto dell'Emergenza, che permette il controllo delle funzioni vitali e l'eventuale applicazione delle tecniche salvavita qualora ve ne sia la necessità (Crowe, 2003).

- **A** "air way" pervietà delle vie aeree: un primo soccorso consiste nell'assicurarsi che l'animale respiri, che le vie aeree siano pervie e nella somministrazione di ossigeno. Se l'animale respira da solo l'ossigeno gli viene somministrato direttamente tramite mascherina o sondino nasale; se invece la funzionalità respiratoria è compromessa o assente, è necessario intubare il paziente e attuare la respirazione assistita attraverso un pallone ambu. L'intubazione oro-tracheale è indicata quando le vie aeree sono ostruite o se il paziente non ha il riflesso della deglutizione. Nel caso il tubo endotracheale non riesca a passare si attua una tracheotomia d'urgenza.
- **B** "breathing" ventilazione: valutare se il soggetto è in grado di effettuare movimenti respiratori autonomi, sufficienti in qualità e quantità a mantenere una corretta ventilazione polmonare; se l'animale non respira autonomamente può essere stimolato aprendo la bocca e tirando fuori la lingua, o mediante la stimolazione con un ago di un punto di agopuntura a livello del tartufo. Nel caso non si abbia una risposta positiva alle tecniche descritte il modo migliore per assicurare una adeguata ventilazione è il posizionamento di un tubo endotracheale e la somministrazione di ossigeno attraverso una ventilazione assistita/controllata con tecnica manuale o automatica. La somministrazione di ossigeno è importante per contrastare lo stato di ipossia e acidosi e può essere verificata attraverso l'applicazione del pulsossimetro (di solito alla lingua) e con un emogas arterioso.
- **C** "circulation" circolazione: le emorragie visibili possono essere fermate attraverso una compressione manuale nella zona interessata compiendo così un'emostasi diretta, nel caso questa non sia sufficiente è necessario fermare la circolazione a monte attraverso legature. La perfusione tissutale viene controllata attraverso la misurazione di alcuni parametri come il livello di coscienza, la forza del polso, il colore delle mucose, il tempo di riempimento capillare, la distensione della vena giugulare e la frequenza cardiaca. Quando il polso non è percepibile e il battito cardiaco è assente è necessario attuare immediatamente la rianimazione cardio-polmonare; è importante iniziare subito il massaggio cardiaco (che può essere fatto in decubito laterale destro o in decubito dorsale), intubare l'animale e iniziare la ventilazione manuale e

somministrare i farmaci adeguati. Ottundimento del sensorio, mucose pallide, tempo di riempimento capillare ritardato, polso debole sono tutti segni di ridotta perfusione tissutale o shock. Le tre principali cause di shock sono ipovolemia, vasodilatazione o insufficienza cardiaca; l'ipovolemia che si può presentare nel paziente critico è data da grave perdita di sangue, perdita di plasma ed eccessiva disidratazione dovuta specialmente da perdita nel tratto gastroenterico. La vasodilatazione può essere conseguenza di gravi risposte infiammatorie sistemiche con o senza sepsi, di anafilassi o da danno da ischemia-riperfusion. È di vitale importanza mettere subito un catetere venoso per ristabilire il volume ematico necessario per assicurare un'adeguata perfusione tissutale.

- **D** “disability”: consiste nell'esaminare il livello di coscienza dell'animale, l'abilità di muoversi e la presenza di dolore. Vengono usate delle lettere per categorizzare A = alert, V = responsive to verbal stimulation, P = responsive to painful stimulation, U = unresponsive to painful stimulation.
- **E** “external assessment” aspetto esteriore: l'aspetto esteriore è molto importante nei traumi acuti; l'animale deve essere valutato interamente e guardare se sono presenti lacerazioni, punture, abrasioni, contusioni, crepitii, dolore alla palpazione, ernie, fratture esposte, angolazioni, deformità. La regione ombelicale deve essere esaminata accuratamente e la presenza di ecchimosi potrebbe indicare emorragia nel peritoneo o nel retroperitoneo (Crowe, 1992; Viganò, 2004).

Una volta eseguite le manovre salva-vita e stabilizzato il paziente possiamo procedere con gli approfondimenti diagnostici, che consistono in una integrazione adeguata dei dati dell'animale con approfondimenti sull'anamnesi e sulle patologie passate dell'animale, con esami di laboratorio che comprendono un esame emocromocitometrico completo, emogas arterioso/venoso (che permettono la valutazione della glicemia, dei lattati e degli elettroliti) e un biochimico e con esami di diagnostica per immagine quali radiografie (RX), ecografia e tomografia computerizzata (TC).

I punti chiave per il successo nella medicina d'urgenza sono:

- Identificare e curare in ordine di importanza il problema che mette in pericolo il paziente.

- Stabilizzare il paziente.
- Monitorare in modo intensivo e con continue rivalutazioni il paziente critico perché è soggetto a peggioramenti improvvisi.
- Anticipare le complicazioni ed avviare procedure di monitoraggio per la diagnosi precoce.
- Valutare il trend dei vari parametri nel loro insieme rispetto al singolo valore.
- È molto importante che tra i colleghi ci sia una comune interpretazione dei dati e che ognuno abbia chiaro il lavoro e la strada da intraprendere per salvare il paziente.
- Considerare che le complicazioni post-traumatiche possono non essere evidenti per almeno 48-72 ore successive.

6.2 Lo stato ossidativo nel paziente critico

Nel paziente critico il mantenimento dell'equilibrio tra difese antiossidanti e produzione di radicali liberi è fondamentale, in quanto questi soggetti hanno una riduzione delle difese in uno stato pro ossidante. I radicali liberi prodotti reagiscono con le componenti dell'organismo mutandone la forma e la funzione, provocando patologie o aggravandone di già esistenti. Essi interagiscono con il DNA, con gli acidi grassi polinsaturi e con le proteine portando, in seguito, alla morte cellulare (Crimi et al., 2006).

Sia da studi condotti in umana che dagli studi condotti in medicina veterinaria è emersa una forte correlazione tra patologia e stress ossidativo, gli effetti dei radicali liberi sono coinvolti direttamente nel danno cellulare e tissutale che si riscontra nelle malattie cardiovascolari, nel diabete mellito, nelle malattie su base infiammatoria, in corso di tumori e in alcune epato-broncopneumopatie. Non vi è patologia umana nella quale non sia documentabile un qualche ruolo patogeno delle specie reattive dell'ossigeno (endocrinopatie, malattia di Alzheimer, malattia di Parkinson, colite ulcerosa, pancreatite ecc.) (Ilorio et al., 2004).

Molti studi svolti in medicina umana affrontano lo stress ossidativo nel paziente critico; molte malattie critiche come sepsi/shock settico, danno polmonare acuto (ALI) e sindrome respiratoria acuta da distress (ARDS) sono caratterizzate da una grave produzione di ROS e altre specie di radicali liberi, i quali, aumentano la percentuale di insuccesso terapeutico (Gutteridge et al., 1999). Lo stress ossidativo nel

paziente critico è correlabile con l'attivazione dei fagociti (neutrofili, monociti, macrofagi, eosinofili), la produzione dei NO, rilascio di ferro, di ioni rame e metalloproteine (Oldham et al., 1998).

Diversi studi hanno evidenziato un ruolo del disequilibrio ossidativo nella patogenesi di malattie infiammatorie come la ALI e la ARDS (Zhang et al., 2000; Lang et al., 2002). La presenza di un'alta concentrazione di perossidi di idrogeno, di isoprostani e di prodotti di perossidazione di fosfolipidi di membrana nel condensato di respiro esalato di pazienti affetti da ARDS è stata ampiamente confermata (Szajder et al., 1989; Baldwin et al. 1986; Carpenter et al., 1998).

Uno studio condotto da Kumar et al. ha dimostrato che, in pazienti con ARDS conclamata, i livelli di perossidazione lipidica sono significativamente maggiori rispetto ai casi controllo (Kumar et al., 2000). Nel medesimo studio è stata vista una diminuzione dei livelli di NO (Kumar et al., 2000); mentre in altri studi hanno dimostrato l'effetto nocivo dei RNS dalla rilevazione di proteine nitate e livelli aumentati di nitrato e nitrato della proteina A tensioattiva nel lavaggio broncoalveolare di pazienti con ARDS e ALI (Lamb et al., 1999; Sittipunt et al., 2001; Zhu et al., 2001). Dalle ricerche si evince che la presenza di NO potrebbe essere sia utile che dannosa nell'evoluzione della ARDS, infatti può agire come specie protettore o può agire da pro-ossidante come precursore del perossinitrito; ecco perché una modulazione farmacologica della produzione di NO sarebbe utile a scopo terapeutico (Anggard, 1994; Kooy et al., 1995; Ignarro et al., 2002).

Nella patogenesi delle malattie polmonari acute gioca un ruolo fondamentale anche l'accumulo di neutrofili (Gadek et al., 1996); infatti un'efficace neutralizzazione della proteasi dei neutrofili e dei radicali liberi da parte rispettivamente di antiproteasi (α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina) e di antiossidanti (glutazione) previene il danno polmonare (Lee et al., 2001). Un altro studio conferma il ruolo dello stress ossidativo misurando una riduzione della concentrazione degli antiossidanti idrosolubili, come urati, glutazione e ascorbato, nello spazio distale di aria di pazienti con ALI (Bowler et al., 2003).

Lo stress ossidativo è stato studiato anche in pazienti con la Sindrome da risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS), sepsi e insufficienza multiorgano (MOF).

La perossidazione lipidica data dai radicali liberi danneggia i fosfolipidi, sia della membrana cellulare, che delle membrane degli organelli presenti all'interno della cellula; così facendo libera all'interno della cellula sostanze citotossiche

(malondialdeide) che attivano la risposta infiammatoria anche in cellule circostanti a quella colpita (Tsukahara, 2007; El Mezayen et al., 2007). Inoltre i radicali liberi, causando variazioni dei gruppi tiolici critici o residui di amminoacidi di protein chinasi attivate da mitogeni, mediano la trasduzione dei segnali extracellulari ai recettori dei fattori di trascrizione cellulare come AP-1 e NF- κ B che attivano un gran numero di geni proinfiammatori. L'attivazione o l'attenuazione di questi due fattori sembra dipendere dallo stato redox della cellula, infatti uno stato pro-ossidante attiva l' NF- κ B e attenua l' AP-1, mentre uno stato anti-ossidante agisce al contrario (Victor et al., 2004). Una grande quantità di prove dirette e indirette evidenzia l'attivazione della via del NF- κ B a base della risposta infiammatoria smisurata che avviene nello Shock Settico (Zingarelli , 2005; Hazelzet et al., 2007; Zingarelli et al., 2003; Abraham et al., 2003).

Nei pazienti con sepsi è stato osservato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di marker di perossidazione lipidica, malondialdeide, TBARS (sostanze tiobarbituriche acido reattive) e xantina ossidasi (Ogilvie et al., 1991; Gallery et al 1996; Goode et al., 1995). Una maggiore concentrazione di marker di stress ossidativo sono state ritrovate in pazienti che sviluppano MOF e quindi è possibile correlarlo ad una prognosi più o meno infausta; valori aumentati della potenzialità plasmatica antiossidante sono stati ritrovati in pazienti sopravvissuti, a differenza di quelli trovati in quelli morti (Borelli et al., 1996; Cowley et al., 1996).

Un aumento della concentrazione dei prodotti di reazione dell'ossido nitrico, nitriti e nitrati, sono stati evidenziati nei pazienti con shock settico e la presenza di nitrotirosina sembrano essere correlate alla prognosi di tale malattia nell'uomo (Strand et al., 2000; Ohya et al., 2001). In uno studio hanno evidenziato un'aumentata attività della xantina ossidasi, elevata sintesi di NO e un alterato metabolismo dell'arginina in pazienti pediatrici con sepsi (Batra et al., 2000; Nemeth et al., 2001; Argaman et al., 2003).

Diversi studi confermano la presenza di un grave stress ossidativo in pazienti con SIRS confermato da un'alta concentrazione plasmatica di malondialdeide, 4-idrossinonenale e TBARS e dai valori ridotti della barriera antiossidante (Tsai et al., 2000; Motoyama et al., 2003; Alonso de Vega et al., 2002).

Un altro esempio di paziente critico è quello che ha subito un trauma e un esempio di trauma è l'ustionato. Le ustioni gravi sono ferite devastanti che colpiscono quasi tutti gli organi e portano a morbilità e mortalità in un'alta percentuale di casi; uno stato di

iperglicemia e insulino-resistenza sono sintomi fisiopatologici nei pazienti critici post-ustione e questo è dovuto ad un aumento della produzione di glucosio e da un rilascio di glucosio da parte dei tessuti colpiti (Gore DC et al., 2001). Nei pazienti con scarso controllo glicemico c'era una maggiore incidenza di complicazioni batteriche e fungine (Hemmila et al., 2008).

Uno studio svolto da Jeschke et al. ha dimostrato che nei pazienti che hanno subito un'ustione grave avvengono variazioni genomiche a livelli di sangue, tessuto adiposo e tessuto muscolare che attivano uno stato di stress persistente a livello del reticolo endoplasmatico (RE) e una risposta proteica (URP) con repressione del recettore per l'insulina che è alla base dell'insulino resistenza e dell'iperglicemia (Jeschke et al., 2012).

Un altro studio ha dimostrato che l'utilizzo di insulina associato alla glutammina è una terapia vincente nei pazienti con sepsi; infatti l'uso combinato riduce maggiormente la risposta infiammatoria data dalla stimolazione dell' IL-8, TNF-alpha e ON-1 stimolata dallo stato iperglicemico in cui si trovano i pazienti critici, rispetto ai risultati avuti quando si usavano singolarmente (Muniandy et al., 2009).

6.3 Il trattamento antiossidante

Nel corso degli ultimi anni sono stati svolti numerosi studi riguardo la somministrazione di antiossidanti nel paziente critico. La terapia antiossidante può essere realizzata ripristinando antiossidanti endogeni (antiossidanti o scavenger SOD o SOD mimetici) o completandolo attraverso agenti esogeni con proprietà antiossidanti (N-acetilcisteina) o somministrando farmaci che riducono la produzione ossidante (allopurinolo, inibitore della xantina, desferoxamina e scavenger del ferro) (Rostein, 2001; Bulger et al., 2001; Furhman, 2000).

L'N-acetilcisteina (NAC) è il farmaco di scelta perché ha varie proprietà farmacologiche che portano benefici al paziente critico: restaura il potenziale antiossidante cellulare reintegrando il glutatione, ha attività di scavenger sia direttamente che come precursore di GSH, agisce come vasodilatatore e inibisce l'aggregazione piastrinica aumentando i livelli di monofosfato e guanina ciclica, e rigenerando ossido nitrico come donatore solfidrile (Cotgrave, 1997; Walsh et al., 1999). Inoltre il NAC può ridurre l'attivazione dell' NF- κ B con riduzione di citochine pro infiammatorie quali IL-8 e il TNF (Paterson et al., 2003).

Gli studi svolti sull'utilizzo del NAC nelle gravi patologie che si ritrovano nei pazienti critici quali ARDS, SIRS e sepsi hanno dei risultati contrastanti: nei pazienti con ARDS è stato dimostrato che il NAC ha un'azione protettiva reintegrando i livelli di GSH nei granulociti polmonari e in lavaggi bronco alveolari, ma non è stata rilevata differenza significativa nei punti chiave della clinica del paziente quali lunghezza del supporto ventilatorio, miglioramento del rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ o tasso di mortalità (Lurent et al., 1996; Ortolani et al., 2000; Jepsen et al., 1992; Domenighetti et al., 1997).

Nei pazienti con sepsi è stato visto che l'utilizzo del NAC migliora la funzionalità respiratoria e diminuisce la degenze in ospedale, riduce l'attivazione dell'IL-8, diminuisce lo stress perossidativo e migliora i punteggi clinici nei pazienti con shock settico, aumenta la perfusione epatica e la funzionalità del fegato con una ridotta produzione di lattati (Spapen et al., 1998; Endo et al., 1995; Ortolani et al., 2000). Inoltre la somministrazione di NAC aumenta l'attività fagocitaria con una ridotta attività ossidativa sui neutrofilo in pazienti con SIRS/sepsi (Rank et al., 2000).

In letteratura ci sono molti studi che analizzano l'uso di selenio e di micronutrienti come le vitamine C, A, E e glutammina per combattere i danni causati dai radicali liberi nel paziente critico. Ci sono studi che evidenziano come la somministrazione di selenio, come terapia adiuvante, aiuti a promuovere lo stato antiossidante del paziente critico, a difendere dalle infezioni, a prevenire l'insufficienza d'organo e a ridurre il tasso di mortalità; infatti sembra avere effetti benefici sulla mortalità a 28 giorni nel paziente critico (Zimmerman et al., 1997; Forceville et al., 2007; Angstwurm et al., 2007; Andrew et al., 2011; Manzanares et al., 2011).

Anche la somministrazione di micronutrienti come le vitamine è stata affrontata in molti studi; alcuni autori hanno evidenziato che l'uso di terapia con una singola vitamina (Seeger et al., 1987) non dava risultati significativi in pazienti con ARDS. In seguito sono state verificate associazioni con diversi antiossidanti, e quindi diverse vitamine e minerali avendo risultati molto diversi. Uno studio ha evidenziato gli effetti della somministrazione endovenosa di NAC, acido ascorbico e α -tocoferolo nei pazienti con shock settico mostrando cambiamenti emodinamici positivi (Galley et al., 1997), un altro studio ha dimostrato che i pazienti con ARDS, a cui erano stati somministrati vit C, h-carotene e acido linoleico, avevano un ridotto numero di giorni di ricovero nell'unità di terapia intensiva e avevano una percentuale più bassa di insufficienza d'organo rispetto al gruppo di controllo (Gadek et al., 1999).

Ulteriori studi confermano i risultati precedenti, indicando che “cocktail” di diversi antiossidanti migliorano le condizioni cliniche dei pazienti critici, riducendo le concentrazioni di TBARS e isoprostani PGF2a nel plasma, abbreviando il soggiorno in ICU e riducendo la mortalità a 28 giorni (Nathens et al., 2002; Crimi et al., 2004).

I trattamenti più efficaci si basano su una combinazione di antiossidanti e immunostimolanti. Nuovi approcci terapeutici sono basati su composti antiossidanti di nuova concezione come la SOD (Salvemini et al., 2003), TEMPOL (Thiemermann et al., 2003), e farmaci che modulano la via NO (Ignarro et al., 2002), nonché nuove composizioni farmacologiche come antiossidanti liposomiali (Fan et al., 2000).

Un'altra questione importante è la dose giusta da utilizzare; non ci sono linee guida definitive, né per la somministrazione endovenosa (NAC), né per la somministrazione enterale (per esempio, le vitamine C ed E) e, cosa più importante, non esistono studi di farmacocinetica eseguiti nei pazienti critici. Un esempio potrebbe essere l'utilizzo del NAC ponendo attenzione all'importanza del dosaggio e della somministrazione: considerando che una somministrazione in bolo o una breve infusione continua di una dose bassa di NAC migliora ossigenazione e valori cardiovascolari, mentre una lunga e continua infusione di una dose elevata, provoca l'accumulo del farmaco che induce una depressione cardiaca con un aumento della mortalità.

Pertanto, il supplemento con livelli molto elevati di antiossidanti dovrebbe essere utilizzato con cautela a causa del rischio di tossicità e, soprattutto in caso di nutrizione enterale, è importante conoscerne l'interazione (Jackson et al., 1999).

Uno studio condotto da Mishra et al. aveva come scopo cercare la correlazione tra l'incremento dei marker dello stress ossidativo e la conseguente deplezione dello stato antiossidante e la sopravvivenza del paziente critico; gli autori hanno evidenziato che nei pazienti ricoverati presso la Terapia Intensiva, divisi tra medici e chirurgici, i parametri clinici conteggiati secondo le scale di gravità e i marker di stress ossidativo (MDA, F2isoPs) all'ammissione in ospedale erano significativamente più alti nei pazienti non sopravvissuti rispetto a quelli sopravvissuti e che successivamente nei pazienti sopravvissuti miglioravano (Mishra et al., 2005).

In medicina veterinaria non vi sono molti studi che analizzano il ruolo dello stress ossidativo nel paziente critico o l'uso di antiossidanti come terapia adiuvante.

Viviano e collaboratori con due studi, uno del 2009 e uno del 2013, hanno cercato di correlare il grado di stress ossidativo, calcolando la concentrazione di marker di

perossidazione lipidica e i livelli di antiossidanti, con la gravità della patologia e la sopravvivenza del paziente (Viviano et al., 2009; Viviano et al., 2013).

Nel prima pubblicazione lo scopo dello studio era verificare se esisteva un'effettiva deplezione dei livelli di antiossidanti come la cisteina, l'acido ascorbico e il glutatione nei pazienti malati e correlarlo alla gravità della patologia.

Hanno incluso nel lavoro un eterogeneo gruppo di 61 cani malati e 37 gatti e li hanno confrontati con un gruppo di controllo composto da 37 cani e 33 gatti sani; a entrambi i gruppi hanno calcolato la concentrazione di GSH nei globuli rossi e i livelli di cisteina e acido ascorbico nel plasma.

Dai risultati è emerso che: nei cani malati i livelli di glutatione erano significativamente più bassi rispetto al gruppo di controllo, mentre nei gatti non vi era variazione. Mentre nei gatti malati avevano trovato livelli alti di acido ascorbico rispetto al gruppo di controllo di gatti sani.

Studiando i risultati hanno constatato che il GSH in esaurimento nei cani malati è correlabile con la gravità della patologia e l'aumento della mortalità, quindi il valore GSH può essere un marker di gravità della malattia e può essere prognostico di esito clinico nei cani malati. Questo fattore indica che i cani in condizione critiche possono trarre beneficio da una terapia antiossidante.

I gatti malati sorprendentemente non hanno avuto una deplezione dei livelli di GSH, ma un innalzamento dei valori di AA forse dovuto ad una up-regulation della sintesi o ad anomalie del metabolismo nel paziente critico.

Nel secondo studio Viviano et al. hanno voluto valutare se la somministrazione dell'antiossidante N-acetilcisteina (NAC) nei cani malati ospedalizzati migliorava i livelli di antiossidanti endogeni e diminuiva i marker di perossidazione lipidica.

Nella sperimentazione hanno incluso 60 cani malati ospedalizzati suddivisi in due gruppi. Al primo gruppo (30 cani) hanno somministrato NAC con il seguente protocollo: inizialmente una dose di carico 140 mg/Kg in infusione continua per 60 min e successivamente davano 7 dosi consecutive da 70 mg/Kg ogni 6 ore. Al secondo gruppo (30 cani) hanno dato placebo e un poi hanno incluso un gruppo di controllo composto da 14 cani sani.

Per entrambi i gruppi sono stati misurati i valori di RBC glutatione, cisteina e Vit E plasmatiche e il rapporto 8-isoprostano/creatinina (IP/Cr) nelle urine (marker di perossidazione lipidica). Inoltre veniva calcolato la gravità dello stato clinico, con un

clinical score (SPI2) (Figura 6.1), sia all'ammissione nell'unità di Terapia Intensiva, sia dopo il trattamento con NAC.

$$\text{SPI2} = \frac{e^{\text{Logit P}}}{(1 + e^{\text{Logit P}})}$$

Figura 6.1- Calcolo del Survival prediction Index 2 (SPI2).

Dai risultati era emerso che i cani malati presentavano concentrazione di Vit E significativamente più bassi e valori di IP/Cr più alti rispetto ai cani sani; inoltre avevano visto che i cani che avevano ricevuto il NAC presentavano un innalzamento dei valori di cisteina, mentre i valori di glutathione rimanevano inalterati. Invece i cani che avevano ricevuto il placebo avevano un significativo abbassamento dei valori di glutathione.

Dallo studio dei risultati si può evidenziare che dopo la breve durata di somministrazione di NAC ha permesso un mantenimento dei valori di glutathione e un innalzamento dei valori di cisteina, ma sono rimasti invariati i valori di Vit E, IP/Cr e punteggio di gravità della malattia (SPI2) tra gruppo trattato e gruppo placebo.

Sono necessari ulteriori studi per verificare se una durata maggiore della terapia con NAC o un supplemento di antiossidanti combinati possa migliorare i valori di antiossidanti e diminuire i marker di stress ossidativo, quindi migliorare la clinica del paziente critico e la sua prospettiva di vita.

Parte Speciale

Dai capitoli precedenti si evince come negli ultimi anni, attraverso numerosi studi, principalmente in ambito umano ma anche in ambito veterinario, la valutazione dello stato ossidativo sia importante per affrontare molte patologie in modo completo, dal punto di vista clinico e terapeutico.

Infatti lo stress ossidativo è implicato nella patogenesi e nelle complicazioni di molteplici malattie, incluse quelle che ritroviamo maggiormente nel paziente critico. In questa tipologia di paziente, il mantenimento dell'equilibrio tra difese antiossidanti e produzione di radicali liberi è fondamentale, in quanto questi soggetti hanno una riduzione delle difese in uno stato pro-ossidante. I radicali liberi prodotti reagiscono con le componenti dell'organismo mutandone la forma e la funzione, provocando patologie o aggravandone di già esistenti. Essi interagiscono con il DNA, con gli acidi grassi polinsaturi e con le proteine portando, in seguito, alla morte cellulare (Crimi et al., 2006).

In medicina veterinaria vi sono pochi studi che analizzano il ruolo dello stress ossidativo nel paziente critico canino, e il monitoraggio di esso durante l'ospedalizzazione.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, con l'ausilio del d-ROMs test e del BAP test, la capacità ossidoriduttiva del plasma nel paziente critico canino e di comparare i risultati di tali test al momento dell'arrivo con quelli al momento delle dimissioni, dopo la permanenza in Terapia Intensiva. Inoltre abbiamo cercato una correlazione tra i valori dello stato ossidativo e gli indici di gravità calcolati attraverso l'uso del Survival Prediction Index 2 (SPI2).

Capitolo 7: Materiali e Metodi

7.1 Popolazione in studio

Sono stati presi in esame campioni di sangue prelevati da 34 pazienti canini condotti presso l'Ospedale Didattico Veterinario "M. Modenato" dell'Università di Pisa, nel periodo compreso tra Agosto 2013 e Gennaio 2014.

Sono stati inclusi cani arrivati in urgenza presso il Pronto Soccorso dell'Ospedale, con codice Rosso o Giallo e quindi ricoverati nel reparto della Terapia Intensiva.

Al momento del ricovero, ad ogni soggetto è stato attribuito un indice di gravità, SPI2 ["Survival Prediction Index" (King et al., 1995; King et al., 2001)] ed è stato eseguito un prelievo di sangue per la valutazione dello stress ossidativo, tramite i test del d-Roms e BAP, per la misurazione dei lattati e della proteina C reattiva (PCR) sierici; le medesime valutazioni venivano eseguite anche al momento delle dimissioni.

Oltre alla terapia specifica in funzione della patologia in atto, tutti i pazienti assumevano giornalmente terapia multivitaminica di supporto (Metabolase®, 2 ml/Kg) ed alcuni pazienti anche un terapia endovenosa con acetilcisteina (50-100 mg/Kg/die).

7.2 Survival Prediction Index 2 (SPI2)

Il calcolo dell'Indice di gravità SPI2 "Survival Prediction Index" è un sistema che è stato sviluppato per avere una previsione oggettiva della sopravvivenza e che può essere applicato a tutti i pazienti criticamente malati, indipendentemente dalla malattia, in una fase iniziale di ospedalizzazione (King et al., 1995; King et al., 2001); così è stata creata un'equazione, espressa con le seguenti formule:

$$\begin{aligned} \text{Logit P} = & 0,3273 + (0,0108 * \text{MAP}) - (0,0102 * \text{FR}) - \\ & (0,2183 * \text{creatinina}) + (0,0164 * \text{Hct}) + \\ & (0,3553 * \text{albumina}) - (0,1184 * \text{età}) \\ & - (0,8069 * \text{medico vs chirurgico}) \end{aligned}$$

dove: MAP = Pressione Arteriosa Sistemica Media (mmHg), FR = Frequenza Respiratoria (atti respiratori/min), Hct = Ematocrito (%), medico = 1 e chirurgico = 0.

$$SPI2 = \frac{e^{\text{Logit P}}}{(1 + e^{\text{Logit P}})}$$

Il risultato di questa equazione è un numero compreso tra 0 e 1, dove 1 corrisponde al 100% di probabilità di sopravvivenza.

Per la raccolta dei parametri da inserire nel calcolo dell'SPI2 è stata misurata la MAP, Pressione Arteriosa Sistemica Media, attraverso un metodo non invasivo, metodica oscillometrica (Monitor Multiparametrico EDAN M50).

La Frequenza Respiratoria è stata misurata contando le escursioni della gabbia toracica dell'animale nell'arco di un minuto (10-30 atti/min); i valori di creatinina (0,8-1,5 mg/dL) e albumina (2,5-4 mg/dL) misurati su campione eparinizzato (Liasys, Assel s.r.l); l'ematocrito, calcolato su campione in EDTA, come rapporto tra il valore del volume medio dei globuli rossi (MCV, *mean corpuscular volume*) e il numero degli stessi dove il valore di riferimento è stabilito per 37,3 - 61,7% (Procyte DX, IDEXX Laboratories).

Infine l'età è stata ricavata dai dati del segnalamento del paziente che viene eseguito al momento dell'arrivo.

7.3 Valutazione dello stato ossidativo

Lo stato ossidativo è stato valutato tramite:

- un test che permette la valutazione della capacità ossidante del plasma attraverso la quantificazione dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (d-ROM test, Diacron International, Grosseto, IT), (Iorio, 2004).

- un test che permette di valutare l'attività della barriera antiossidante del plasma attraverso la quantificazione della sua capacità riducente (BAP Test, Diacron, Grosseto, IT), (Iorio., 2004).

Entrambi i test sono stati eseguiti su campioni di plasma raccolti in provette contenenti litio-eparina e centrifugati e congelati a -20°C entro 30 minuti dal prelievo. Le analisi sono state svolte presso il laboratorio di Patologia Clinica del suddetto Ospedale e per eseguire i test è stato utilizzato lo spettrofotometro Slim (SEAC, Calenzano, FI).

7.3.1 Il d-ROMs test

Il d-ROM test consente di determinare la concentrazione dei ROMs (reactive oxygen metabolites), in particolare degli idroperossidi (ROOH), generati nelle cellule dall'attacco ossidativo dei ROS su lipidi, glucidi, aminoacidi, proteine e nucleotidi. Il dosaggio degli idroperossidi fornisce un'indicazione molto affidabile dello status pro-ossidante di un individuo.

Attraverso il d-ROMs test, i ROMs contenuti in un campione biologico, quale, ad esempio il siero, dopo aver reagito con un idoneo cromogeno sviluppano un derivato colorato (dal rosa al rosso) rilevabile e quantificabile per via fotometrica. Lo svolgimento del test prevede che un'aliquota di siero venga diluita in una soluzione tampone (acetato) a pH 4,8. In queste condizioni il ferro ionico legato alle sieroproteine si rende disponibile in forma libera catalizzando la scissione degli idroperossidi in radicali idroperossilici e alcossilici. A questa soluzione viene aggiunto un cromogeno che ha la proprietà di cambiare colore nel momento in cui viene ossidato (N,N-dietil-parafenilendiammina) dai radicali alcossilici ed idroperossilici. Il catione derivato dal cromogeno, pur essendo un radicale, è abbastanza stabile per cui è possibile determinarne la concentrazione per via fotometrica.

La concentrazione del complesso colorato risulta proporzionale al livello degli idroperossidi inizialmente presenti nel campione.

Procedura analitica:

- 1- Preparare lo standard fornito con il kit sotto forma di siero liofilo a titolo noto.
- 2- Portare i reagenti
 - R1 miscela cromogena
 - R2 soluzione tamponealla temperatura di lavoro.
- 3- Preparare 3 soluzioni

- a. Il bianco R1 + R2 + H₂O distillata
- b. Il campione campione R1 + R2
- c. Il calibratore R1 + R2 + calibratore.

Queste soluzioni devono essere mescolate delicatamente e lasciate ad incubare a 37 °C per 1 minuto. Terminata l'incubazione vanno sottoposte immediatamente a lettura fotometrica a 505 nm e successivamente, sempre a 37 °C, vanno ripetute le letture dopo 1, 2 e 3 minuti.

Ai valori di assorbanza ottenuti per il campione ed il calibratore si sottrae il valore di assorbanza del bianco reagente.

I risultati sono espressi in U CARR applicando la seguente formula :

$$U \text{ CARR} = \Delta \text{abs}/\text{min} \times F$$

in cui $\Delta \text{abs}/\text{min}$ sono le differenze medie dei valori di assorbanza misurati al 1°, 2° e 3° minuto e F è un fattore di correzione con un valore predeterminato.

L'unità Caratelli (U CARR) corrisponde a 0,08 mg di H₂O₂/dl. Per la valutazione del risultato si fa riferimento all'intervallo di valori fisiologici nella specie canina determinato da G Cardini et al. Nei soggetti sani i valori dei ROMS risultano compresi tra 56,4 e 91,4 UCARR.

7.3.2 Il BAP test

Il BAP test valuta il potere antiossidante del plasma misurando la capacità del campione in esame di ridurre il ferro di una soluzione di cloruro ferrico da ione ferrico (Fe³⁺) a ione ferroso (Fe²⁺).

Il cromogeno impiegato è il tiocianato, una sostanza in grado di legarsi agli ioni ferrici formando un complesso colorato che adsorbe a 505 nm. Nel momento in cui gli ioni ferrici sono ridotti a ioni ferrosi il suddetto complesso si decolora. Dopo una breve incubazione a 37°C, valutando per via fotometrica l'entità della decolorazione è possibile risalire alla quantità di ioni ferrici ridotti e in definitiva alla capacità riducente, ossia antiossidante del plasma testato.

Il kit contiene:

- 1- una soluzione di tiocianato R1
- 2- una soluzione di cloruro ferrico R2

3- un calibratore (siero umano liofilizzato)

Procedura analitica:

1. Portare i reagenti

R1 miscela cromogena

R2 soluzione di cloruro ferrino (FEC13)

R3 calibratore (siero liofilizzato)

alla temperatura di lavoro (37°)

2. Preparare 3 soluzioni

a. il bianco R1+ R2 + H2O distillata

b. il campione R1 + R2 + campione

c. il calibratore R1 + R2 + R3

Queste soluzioni devono essere mescolate delicatamente e lasciate ad incubare a 37° per 5 minuti. Terminata l'incubazione si esegue la lettura fotometrica a 505 nm.

I risultati del test, cioè il potere antiossidante ferro-riducente del plasma, sono espressi in μ Equivalenti di antiossidanti riducenti il ferro ferrino per litro di campione, secondo la formula:

$$\frac{Abs\ bianco\ reagente - Abs\ campione}{Abs\ bianco\ reagente - Abs\ calibratore} \cdot [calibratore]$$

dove:

- [Abs] sono i valori di assorbenza delle soluzioni misurati a 505nm
- [calibratore] è la concentrazione del calibratore espressa in μ mol/L

L'intervallo di riferimento nella specie canina è stato determinato da G. Cardini et al. ed è compreso tra 2069- 2554 micromoli/l.

7.4 Lattati

La misurazione dei lattati è un parametro importante per valutare la perfusione tissutale e calcola la concentrazione dell'acido lattico nel sangue; tale dato lo ricaviamo dall'esecuzione di un emogasanalisi.

Per tale misurazione è stato utilizzato l'Analizzatore ABL 800 FLEX che è un'unità completa costituita da differenti moduli con funzioni specifiche, controllata da un software completo. I moduli sono compresi in sezioni ben definite in base alla funzione specifica.

Per la misurazione specifica dei lattati viene utilizzato il modulo elettroliti /metaboliti composto da:

- Valvole a membrana che controllano il flusso di gas e soluzioni all'interno dei moduli di misurazione
- Pompe del modulo elettrodi che servono per trasportare le soluzioni e le miscele di gas attraverso i moduli di misurazione
- Fermo che stabilisce il contatto elettrico tra l'elettrodo e la camera di misura e il relativo amplificatore
- Modulo EI/ MET costituito dalle camera di misura con elettrodi cCa^{2+} , cK^+ , cNa^+ , $cGlu$, $cLat$ (per gli elettrodi $cGlu$ e $cLat$ è installato un filtro)

Procedura Manuale:

- Attraverso il modulo di ingresso viene ricevuto il campione mediante l'inserimento di una siringa /provetta con l'aliquota di sangue.
- Attraverso lo schermo touchscreen si possono seguire tutti i passaggi dell'analisi e inserire tutte le informazioni relative al paziente (ID paziente, età, T° corporea) e al tipo di campione (venoso/arterioso).
- L'aspirazione del campione avviene attraverso la sonda che entra automaticamente all'interno della siringa.
- Una volta effettuata l'analisi, i risultati compaiono sullo schermo e/o è possibile stamparli.

L'intervallo dei valori fisiologici per i lattati è 0,50-2,50 mmol/L.

7.5 Proteina C reattiva

La proteina C reattiva è una proteina non specifica reattiva della fase acuta che compare nel sangue nel processo infiammatorio.

Il metodo utilizzato per valutare la concentrazione della PCR consiste nella misurazione della reazione antigene-anticorpo con reazione end point.

Il Kit contiene (Liasys, Assel s.r.l):

- Antisiero: soluzione tamponata salina Fosfato (pH 7.43)
Anti CRP umana da capra policlonale (variabile)
Sodio azide (0,95 g/L)
- Tampone: soluzione salina tamponata Fosfato (pH 7.43)
Polyethyene glicol (40 g/L)
Sodio azide (0,95 g/L)

Inoltre sono necessari Cloruro di Sodio 0,9 g%, calibratori e controlli.

Se il campione (siero) non può essere analizzato subito e quindi viene conservato per periodi più o meno lunghi deve essere congelato.

Procedura Manuale:

- Costruire una curva di calibrazione diluendo lo standard 1:2 in soluzione salina o utilizzare una curva già pronta.
- Usare soluzione salina come std zero
- Miscelare 60 µl di campione, standard e controlli con 1000 µL di Tampone e leggere la densità ottica a 340 nm.
- Aggiungere 100 µL di anticorpo CRP, mescolare e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Leggere la densità ottica (OD₂) a 340 nm.
- Calcolare ΔOD , tracciare una curva di calibrazione e leggere le concentrazioni di controlli e campioni.

I valori di riferimento normali sono 0-1 mg/dL (IFCC), comunque questo valore è solo orientativo, ciascun laboratorio stabilisce i propri valori di riferimento.

Il Laboratorio di Patologia Clinica del nostro Ospedale ha come intervallo di valori fisiologici 0-0.30 mg/dL.

7.6 Analisi Statistica

È stato applicato il Test T Student per dati appaiati per i seguenti dati:

- ROMs in entrata e ROMs in uscita
- BAP in entrata e BAP in uscita
- SPI2 in entrata e SPI2 in uscita
- Lattati in entrata e Lattati in uscita
- PCR in entrata e PCR in uscita
- i valori di SPI2 in entrata e SPI2 in uscita nel gruppo di cani non sopravvissuti
- i valori di SPI2 in entrata e SPI2 in uscita nel gruppo di cani sopravvissuti

L'Analisi della varianza ad una via (ANOVA) è stata eseguita per valutare:

- l'influenza della somministrazione degli antiossidanti sulle differenze evidenziate tra i valori di d-Roms e BAP in entrata e uscita,
- l'influenza del fattore sopravvivenza entro 7-14 giorni sui valori dell'indice di gravità SPI2 sia in entrata che in uscita

L'analisi LSD è stata applicata per evidenziare ulteriori differenze tra i cani sopravvissuti, deceduti naturalmente o tramite eutanasia.

L'analisi di Regressione multipla di Pearson è stata eseguita per verificare eventuali correlazioni tra i seguenti parametri sia in entrata che in uscita:

- ROMs
- BAP
- SPI2
- PCR
- Lattati

L'ipotesi è considerata nulla per $P < 0,05$.

Capitolo 8: Risultati

I pazienti inclusi nello studio sono risultati in totale 34, tutti arrivati presso il pronto soccorso dell'Ospedale dell'Università di Pisa con Codice Giallo e, successivamente, ricoverati presso il reparto di Terapia Intensiva.

Il periodo di ricovero di ciascun soggetto varia a seconda della gravità della patologia, dello stato clinico del paziente e da fattori legati al proprietario. La media dei giorni di permanenza presso il reparto di Terapia Intensiva è $2,5 \pm 1,69$ giorni e la mediana è 2,5.

Il confronto dei risultati del test d-ROMs eseguito sui campioni raccolti all'arrivo e all'uscita dei pazienti della Terapia Intensiva ha mostrato una differenza altamente significativa ($p < 0,01$); i campioni in entrata avevano dei valori dei ROMs inferiori rispetto ai campioni in uscita ($172,40 \pm 58,27$ vs $266,77 \pm 51,77$) (Tabella 8.1).

Lo stesso risultato è stato ottenuto dal confronto dei risultati del test BAP eseguito sui campioni in entrata e in uscita ($p < 0,01$) con valori in entrata inferiori rispetto all'uscita ($1778,45 \pm 210,39$ vs $2096 \pm 349,57$) (Tabella 8.1).

Anche l'esame dei lattati ha evidenziato valori più alti all'arrivo del paziente rispetto ai valori al momento delle dimissioni ($3,92 \pm 2,46$ vs $2,77 \pm 2,12$) (Tabella 8.1).

I valori di SPI2, ($0,66 \pm 0,17$ vs $0,65 \pm 0,16$), e quelli della PCR ($1,34 \pm 0,86$ vs $1,05 \pm 0,60$) non hanno invece mostrato differenze significative tra il momento del ricovero e quello delle dimissioni (Tabella 8.1).

		Entrata	Uscita
Parametri	Intervallo di riferimento	M±SD	M±SD
SPI2	0,0-1 %	0,67±0,17	0,65±0,16
d-ROMs*	56,4-91,4 U-CARR	158,01±54,60	266,77±51,77
BAP*	2069-2554 $\mu\text{mol/L}$	1840,81±227,29	2096±349,57
PCR	0,0-0,30 mg/dL	1,34±0,86	1,05±0,60
Lattati**	0,50-2,50 mmol/L	3,97±2,51	2,77±2,12

Tabella 8.1- Valori di SPI2, d-ROMs, BAP, PCR e lattati (M±SD) in entrata e in uscita, (*p<0,01;**p<0,05).

I risultati del calcolo di SPI2 eseguito in entrata e in uscita mostrano una differenza significativa ($0,58 \pm 0,17$ vs $0,51 \pm 0,15$) ($p<0,05$) per i cani deceduti entro 7-14 giorni, mentre non ci sono differenze tra i cani sopravvissuti ($0,72 \pm 0,15$ vs $0,71 \pm 0,13$).

Le differenze nei valori di d-ROMs tra entrata e uscita risultano influenzate dall'assunzione di antiossidanti durante il ricovero nei soggetti che avevano assunto antiossidanti rispetto agli altri ($42,48 \pm 34,45$ vs $111,82 \pm 61,14$) (Tabella 8.2).

Non sono invece emerse differenze significative nei valori delle differenze dei BAP valutati in entrata e in uscita in seguito alla somministrazione di acetilcisteina ($322,0 \pm 336,3$ vs $374,0 \pm 403,5$) (Tabella 8.2).

Acetilcisteina	d-ROMs (M±SD)	BAP (M±SD)
SI (n=7)	42,48±34,45	322,0±336,3
NO (n=13)	111,82±61,14	374,0 ± 403,5

Tabella 8.2- Influenza degli antiossidanti su d-ROMs e BAP.

I valori di SPI2 in uscita risultano influenzati da fattore sopravvivenza entro 7-14 giorni, infatti i valori di SPI2 in uscita nei soggetti sopravvissuti sono superiori a quelli dei deceduti ($0,71 \pm 0,13$ vs $0,52 \pm 0,15$); non sono emerse differenze di SPI2, rispetto alla sopravvivenza, tra i soggetti morti naturalmente o in seguito a eutanasia (Tabella 8.3).

Soggetti	SPI2 (M \pm SD)
E	0,51 \pm SD ^a
M	0,57 \pm SD ^{ab}
V	0,71 \pm SD ^b

Tabella 8.3- Analisi LSD, E = eutanasia, M = morte naturale, V = sopravvissuti, le lettere in apice segnalano una differenza significativa per $p < 0,05$.

I valori di SPI2 in entrata non risultano predittivi circa la futura sopravvivenza entro 7-14 giorni dei cani ricoverati.

È stata individuata una correlazione significativa ($p < 0,05$) tra i valori di SPI2 e i valori di BAP in entrata, mentre non si sono evidenziate correlazioni significative tra i diversi parametri in uscita (Tabella 8.4).

	d-ROMs	BAP	SPI2	CRP	Lattati
d-ROMs	r	-0,23	0,15	-0,07	0,21
<i>U-CARR</i>	p	0,20	0,42	0,67	0,24
BAP <i>μmol/L</i>	r		0,41	-0,33	0,08
	p		0,01*	0,06	0,64
SPI2 %	r			-0,33	0,15
	p			0,06	0,39
CRP <i>mg/dL</i>	r				0,20
	p				0,26

Tabella 8.4-Risultati Relativi alla Regressione Multipla di Pearson tra d-ROMs, BAP, SPI2, PCR e Lattati, (r = coefficiente di correlazione; p = P-value; *= $p < 0,05$).

Dalla correlazione parziale, tra ciascuna coppia di variabili in entrata, è emerso che vi è una correlazione significativa ($p < 0,05$) tra i valori di d-ROMs e i valori di BAP, con un coefficiente di correlazione negativo, il quale indica che all'aumentare dell'uno diminuisce l'altro (Tabella 8.5) .

	d-ROMs	BAP	SPI2	CRP	Lattati
d-ROMs <i>U-CARR</i>	r	-0,37	0,20	-0,18	0,26
	p	0,04*	0,29	0,34	0,17
BAP <i>μmol/L</i>	r	0,36	-0,28	0,17	
	p	0,05	0,13	0,36	
SPI2 %	r	-0,22	0,14		
	p	0,24	0,47		
CRP <i>mg/dL</i>	r	0,32			
	p	0,09			

Tabella 8.5- Correlazioni Parziali tra ciascuna coppia di variabili, (r = coefficiente di correlazione; p = P-value; *= $p < 0,05$).

Capitolo 9: Discussione

Dalle ricerche svolte negli ultimi anni sia in medicina umana che veterinaria è emerso come sia importante conoscere e studiare lo stato ossidativo. È importante analizzare i meccanismi che portano alla formazione dei radicali liberi, all'utilità che possono avere quest'ultimi nelle reazioni di difesa dell'organismo, ma anche ai gravi danni che possono provocare se non mantenuti sotto controllo.

Molti studi svolti affrontano la valutazione dello stress ossidativo nelle singole patologie, analizzando il ruolo dei radicali liberi nella patogenesi della malattia e nella sua progressione. La quasi totalità dei lavori evidenzia un aumento dei marker di stress ossidativo nei pazienti affetti da una malattia, sia essa acuta, nella quale lo stress ossidativo concorre in alterazioni metaboliche e funzionali, o cronica, in cui possono essere indotti anche cambiamenti strutturali dell'organo colpito dalla patologia.

Il paziente critico si trova in uno stato morbosissimo che può essere causato da un evento acuto, da una riacutizzazione di una patologia cronica o dagli stadi terminali della stessa; gli studi svolti in umana sul ruolo dello stress ossidativo, in questo tipo di pazienti, indicano una rottura dell'equilibrio ossidativo con un relativo aumento dei marker di perossidazione lipidica (Gutteridge et al., 1999; Oldham et al., 1998; Zhang et al., 2000; Lang et al., 2002; Tsukahara M., 2007; El Mezayen et al., 2007).

In linea con quanto emerge dai lavori presenti in letteratura umana e veterinaria, i risultati ottenuti in questo studio circa lo stato ossidativo nel paziente critico canino, confermano il dato che in condizioni di criticità si ha un aumento dei radicali liberi con valori in entrata di *d-ROMs* e di *BAP* rispettivamente superiori e inferiori rispetto al range di riferimento (Pasquini et al., 2008) attestando uno stato di stress ossidativo.

Il *d-ROMS test* quantifica i metaboliti reattivi dell'ossigeno a livello del plasma e questi sono il risultato dell'equilibrio ossidoriduttivo a livello di tutto l'organismo; il *BAP test* misura la capacità totale riducente del plasma e pertanto non riflette l'attività dei singoli antiossidanti. È necessario puntualizzare che nei vari studi eseguiti sul cane e sull'uomo le metodologie applicate per valutare l'equilibrio ossidoriduttivo sono diverse e, in quanto tali, rilevano aspetti diversi dello stress ossidativo.

Infatti negli studi effettuati sul paziente critico, la valutazione dello stress ossidativo è stata eseguita attraverso la misurazione dei prodotti della perossidazione lipidica;

Viviano et al., nel cane, usano la concentrazione del marker 8-isoprostano nelle urine, Cheng et al. e Karapetsa et al., nell'uomo, misurano rispettivamente i livelli di MDA e TBARS nel sangue. Tutte queste metodiche misurano e inquadrano l'ultimo stadio della cascata di reazioni indotte dai radicali liberi e quindi sono marker di un danno avvenuto; mentre la valutazione attraverso il test d-ROMs, usata nel nostro lavoro e utilizzata da Koutsokera e coll., consente di determinare la concentrazione dei ROM (reactive oxygen metabolites) in un campione biologico (Iorio, 2004), e quindi permette di eseguire una valutazione della potenziale capacità del plasma di sviluppare gli idroperossidi. Le diverse metodiche, mostrando momenti diversi della cascata di reazioni biochimiche indotte dallo stress ossidativo, possono spiegare perché nel nostro studio e in quello di Koutsokera, nell'uomo, c'è un aumento della componente ossidante, mentre negli altri studi rimane invariata.

Dal confronto eseguito tra i valori dei d-ROMs e BAP al momento del ricovero e al momento delle dimissioni è emersa una differenza significativa, con un incremento di entrambi alla fine del periodo di ricovero, a prescindere dal miglioramento clinico del paziente. Questo risultato non si discosta molto dall'unico lavoro svolto precedentemente in medicina veterinaria su cani ospedalizzati, in cui i valori di 8-isoprostano/creatinina (IP/Cr), un marker di perossidazione lipidica, rimanevano invariati dopo l'ospedalizzazione (Viviano et al., 2013).

Analogamente gli studi svolti in medicina umana riportano risultati molto simili; Cheng et al. non aveva riscontrato differenze significative a distanza di 7 giorni nei valori di MDA (Marker di perossidazione lipidica) nei pazienti ricoverati (Cheng et al., 2013). Ugualmente Koutsokera e collaboratori avevano evidenziato che, in pazienti ricoverati con COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), i valori dei d-ROMs, peggioravano leggermente nel tempo (Koutsokera et al., 2009) e in un altro gruppo di pazienti critici ricoverati, la concentrazione dei TBARS (thiobarbituric-acid reactive substances) rimaneva invariata (Karapetsa et al., 2013).

È importante puntualizzare che nel nostro studio il tempo di permanenza dei cani ricoverati è ridotto con una media di $2,5 \pm 1,69$ giorni, che potrebbe essere troppo breve per vederne un miglioramento.

Analizzando questi risultati dobbiamo prendere in considerazione anche la componente comportamentale. Ci sono diversi studi in medicina veterinaria che analizzano il comportamento degli animali ricoverati e, quindi, costretti a stare in

gabbia e lontani dalla famiglia. Tali studi evidenziano che sono presenti comportamenti legati allo stress e il disagio nei cani ricoverati, come abbaiare frequentemente, piangere, rifiutare il cibo, tremare per la paura e uno stato di continua allerta. Questi segni più comuni sono associati a dolore, privazione del sonno, urinazione e defecazioni frequenti ed eccessivo lambimento (Beerda et al., 1999; Bradshaw et al., 2002; Mills et al., 2006; Tod et al., 2005; Kim et al., 2010). Non si può escludere che tali comportamenti possano influire negativamente sul disequilibrio ossidativo presentato nel paziente critico canino.

Anche i valori del Survival Prediction Index (SPI2) non sono cambiati significativamente tra il momento del ricovero e quello delle dimissioni confermando i risultati avuti da Viviano et al. nei quali si evidenziava che i valori del SPI2 non variavano dopo il periodo di ospedalizzazione, né nel gruppo trattato con NAC (N-Acetilcisteina) né in quello a cui avevano somministrato il placebo (Viviano et al., 2013). In entrambi gli studi, il nostro e quello di Viviano, il periodo di ricovero preso in considerazione è breve e potrebbe essere insufficiente a verificare un effettivo cambiamento. Inoltre i valori di d-ROMs nei nostri pazienti venivano presi in entrata al pronto soccorso, quindi in pazienti che spesso stavano male solo da poche ore; la dinamica di formazione degli idroperossidi nel cane potrebbe giustificare l'incremento di questi nelle ore e giorni successivi a prescindere da un eventuale miglioramento clinico.

Anche l'aumento dei valori dei BAP è in linea con lo studio svolto in umana da Cheng et al. nel quale, viene misurata la componente antiossidante il primo giorno di ricovero e dopo sette giorni in pazienti critici, evidenziando un aumento significativo della capacità antiossidante totale e in particolare un aumento del Glutathione S-tranferasi (Cheng et al., 2013). L'aumento della capacità antiossidante potrebbe essere supportata dalla correlazione significativa trovata tra aumento dei BAP e aumento dei valori di SPI2. Un miglioramento della clinica del paziente canino porta ad un aumento dell'appetito e, quindi, l'assunzione tramite un cibo di qualità, di micronutrienti come sali minerali e vitamine che costituiscono la barriera antiossidante esogena. Inoltre, essendo pazienti critici ricoverati, ricevono una terapia eziologica e sintomatica adeguata con supporto vitaminico, che concorre a ridurre lo

stato pro ossidante ed aumentare la componente antiossidante esogena, ristabilendo un equilibrio dello stato ossidativo dell'organismo.

La somministrazione degli antiossidanti risulta influenzare significativamente la differenza dei d-ROMs tra entrata e uscita, infatti dai risultati emerge che nei pazienti a cui viene somministrata NAC i valori dei d-ROMs aumentano molto meno rispetto a quelli a cui non è stata somministrata ($42,48 \pm 34,45$ vs $111,82 \pm 61,14$)($p < 0,05$).

In letteratura vi sono molti studi che confermano l'utilizzo del NAC come antiossidante grazie alle sue molteplici azioni: restaura il potenziale antiossidante cellulare reintegrando il glutatione, ha attività di scavenger sia direttamente che come precursore di GSH, agisce come vasodilatatore e inibisce l'aggregazione piastrinica aumentando i livelli di monofosfato e guanina ciclica, e rigenerando ossido nitrico come donatore solfidrile (Cotgrave, 1997; Walsh et al., 1999).

Nei pazienti con sepsi è stato visto che l'utilizzo del NAC riduce l'attivazione dell' IL-8, diminuisce lo stress perossidativo e migliora i punteggi clinici nei pazienti con shock settico, aumenta la perfusione epatica e la funzionalità del fegato con una ridotta produzione di lattati (Spapen et al., 1998; Endo et al., 1995; Ortolani et al., 2000). Inoltre la somministrazione di NAC aumenta l'attività fagocitaria con una ridotta attività ossidativa sui neutrofilii in pazienti con SIRS/sepsi (Rank et al., 2000).

Per quanto riguarda la differenza dei valori dei BAP tra entrata e uscita non sembra essere influenzata dalla somministrazione di antiossidanti, infatti non vi sono differenze significative tra il gruppo trattato con NAC e il gruppo non trattato. Questo risultato conferma in parte lo studio di Viviano nel quale i valori di glutatione rimanevano invariati nel gruppo trattato con NAC e diminuivano in quello placebo (Viviano et al., 2013). È importante sottolineare che i nostri casi non trattati con il NAC assumevano tutti complessi multivitaminici per via endovenosa e questo potrebbe aver fornito un contributo all'incremento dei BAP a prescindere dal NAC.

È inoltre necessario precisare che la durata della somministrazione del NAC coincide con la durata del ricovero, che nel nostro caso e nel caso di Viviano è di media 2-3 giorni, forse insufficienti per un'adeguata valutazione dell'azione di questa. Infine un'altra questione importante è la dose giusta da utilizzare; nel nostro studio è stato somministrato a boli con un dosaggio di 50-100 mg/Kg/die, mentre nell'altro studio veniva utilizzata una dose di attacco di 140 mg/Kg per 60 min e poi 7 dosi

consecutive da 70 mg/Kg ogni 6 ore. Non ci sono linee guida definitive per la somministrazione endovenosa (NAC) e cosa più importante non esistono studi di farmacocinetica eseguiti nei pazienti critici.

Se prendiamo in considerazione la SPI2, il nostro studio non ha evidenziato correlazioni significative tra i valori di d-ROMs e quelli del SPI2, confermando i risultati già presenti in letteratura, nei quali non viene evidenziata correlazione tra i marker di stress ossidativo TBARS e la sopravvivenza (Karapetsa et al., 2013).

In compenso analizzando i valori della scala SPI2 in entrata e in uscita dei nostri pazienti nei due sottogruppi, i sopravvissuti e i non, si evidenzia una differenza significativa nei cani deceduti entro 7-14 giorni ($0,58 \pm 0,17$ vs $0,51 \pm 0,15$) ($p < 0,05$), mentre tale differenza non c'è nei cani sopravvissuti ($0,72 \pm 0,15$ vs $0,71 \pm 0,13$).

I valori del SPI2 in uscita sono risultati anche influenzati dal fattore sopravvivenza entro 7-14 giorni; infatti i valori risultano notevolmente più alti nei cani che sono sopravvissuti rispetto a quelli non sopravvissuti. Questo dato ci conferma che i valori al momento delle dimissioni della scala SPI2 hanno un buon valore predittivo sulla sopravvivenza o meno del paziente, dato già evidenziato da Whittemore, che nel suo studio mostra come ci sia una differenza altamente significativa tra i valori di SPI2 tra i cani sopravvissuti e quelli non sopravvissuti a 7 e 30 giorni (Whittemore et al., 2011) e da Chan che mette in correlazione i risultati del calcolo dell'SPI2 evidenziando che i valori dei sopravvissuti erano maggiori rispetto a quelli dei non sopravvissuti (Chan et al., 2009).

Per quanto riguarda la valutazione dei lattati, i valori al momento dell'arrivo sono risultati aumentati rispetto al range fisiologico, indicando uno stato di ipossia dovuto a problemi di ipoperfusione che si possono instaurare in molteplici patologie ritrovate nel paziente critico. Inoltre il confronto tra i valori dei lattati in entrata e uscita mostrano delle differenze significative, con una significativa diminuzione di questi alla dimissione.

Non sono emerse correlazioni significative i valori dei lattati e i valori del SPI2 al momento del ricovero. Questo risultato si discosta in parte dai lavori precedentemente eseguiti in umana e in veterinaria, i quali avevano evidenziato che valori della lattatemia a T_0 si presentavano più alti nei pazienti che non riuscivano a sopravvivere (Hajjar et al., 2011; Lagitchick et al., 1998); ugualmente altri studi sia in

umana (Sharkey et al., 2013; Rishu et al., 2013; Kopterides et al., 2012) che in veterinaria (dePapp et al., 1998; Nel et al., 2004; Jacobson et al., 2005) correlavano i livelli alti di lattati nel sangue con una prognosi infausta; anche se in quest'ultimi venivano presi in considerazione animali colpiti da una singola patologia e non da più patologie come il nostro studio.

In umana nel 2012 hanno effettuato uno studio, nel quale venivano affiancati i valori della lattatemia ai risultati del Pediatric Index of Mortality 2 (PIM2) per valutarne una migliore efficacia nella valutazione della sopravvivenza in bambini malati, raggiungendo dei risultati positivi (Morris et al., 2012). Sarebbe interessante approfondire, anche in medicina veterinaria con ulteriori studi e con una casistica molto più ampia rispetto alla nostra, la valutazione dell'efficacia della Scala SPI2 con l'aggiunta della lattatemia col fine di migliorare la predizione della prognosi.

Per quanto riguarda la valutazione della proteina C reattiva, una proteina di fase acuta dell'infiammazione, i valori al momento dell'arrivo sono risultati aumentati rispetto al range di riferimento normale; ciò indica uno stato di infiammazione presente nel paziente canino critico. Nel nostro studio non sono emerse differenze significative tra le valutazioni eseguite in entrata e al momento delle dimissioni, confermando i risultati avuti in umana da Cheng et al. in cui i valori della PCR non variavano significativamente nel periodo di ricovero.

Inoltre dai nostri risultati non sono emerse correlazioni significative tra i valori della PCR e il tasso di sopravvivenza (SPI2), confermando i dati presenti in letteratura di Whittemore e Chan, i quali, nei rispettivi studi eseguiti sul paziente canino, non avevano trovato differenze significative tra i valori della PCR nei pazienti sopravvissuti e quelli non sopravvissuti (Whittemore et al., 2011; Chan et al., 2009).

Ugualmente anche Gebhardt, analizzando l'andamento della PCR in cani con sepsi e SIRS, non aveva trovato nessuna correlazione tra i valori in entrata e il tasso di sopravvivenza (Gebhardt et al., 2009).

Un ulteriore studio condotto in umana conferma che non vi sono correlazioni tra l'andamento della PCR e la sopravvivenza, sebbene in tale studio, a differenza dei precedenti, avevano evidenziato un abbassamento significativo dei valori di PCR dopo 3 giorni di ricovero. Però in quest'ultimo lavoro, a differenza del nostro e dei precedenti in cui è presente un'eterogeneità di patologie, vengono presi in considerazione solo pazienti con COPD (Koutsokera et al., 2009).

Tutti gli studi citati valutano un tempo di ricovero abbastanza breve, che varia dai 3 giorni a una settimana, compreso il nostro studio che ha una media del tempo di ricovero di $2,5 \pm 1,69$ giorni; tale tempo potrebbe essere insufficiente, in pazienti critici, per valutare il cambiamento reale dei valori della PCR. Sarebbe interessante approfondire tale aspetto, valutandone l'andamento a lungo termine.

La proteina C reattiva è un importante marker di infiammazione e ci può dare informazioni sull'andamento e sulla gravità dello stato infiammatorio del paziente canino, al fine di assicurare ad esso la giusta terapia, ma non può essere considerato un indice di sopravvivenza se preso singolarmente (Gebhardt et al., 2009). Potrebbe essere interessante in futuro valutare una modifica del Survival Prediction Index 2 (SPI2) aggiungendo la valutazione della PCR.

Non sono emerse correlazioni significative tra i valori di d-ROMs con i lattati né con la PCR al momento dell'arrivo. In letteratura, sia umana che veterinaria, non ci sono lavori che osservano tale tipo di correlazione nel paziente critico e possiamo ipotizzare, che sebbene ci sia un innalzamento di tutti e tre i parametri al momento della criticità, essi si comportino diversamente nelle varie malattie che possiamo ritrovare in questo tipo di pazienti. Infatti, come abbiamo già detto in precedenza, nel paziente critico possiamo ritrovare un'eterogeneità di patologie nelle quali i vari parametri possono avere un andamento diverso; infatti in una patologia cronica, come può essere la neoplasia (Moller et al., 1998; Valko et al., 2006) o un'insufficienza renale cronica (Locatelli et al., 2003) ritroviamo valori dello stress ossidativo al massimo della loro espressione, mentre la PCR, essendo una proteina di fase acuta, la possiamo trovare molto alta in caso infezioni (Gebhardt et al., 2009), pancreatite acuta (Mansfield et al., 2008). Anche i lattati possono essere aumentati in patologie nelle quali c'è ipoperfusione da una riduzione della volemia o da patologie che causano danni da ischemia-riperfusione come volvoli e dilatazione gastrica (Monnet et al., 2003), nelle quali inizialmente aumenta la lattatemia data da una mancanza dell'ossigenazione dei tessuti, mentre secondariamente c'è un aumento dei radicali liberi, provocato dalla riattivazione della respirazione aerobica dopo la riperfusione.

Capitolo 10:Conclusioni

La valutazione dello stato ossidativo nel campione in studio ha confermato che, come avviene nell'uomo, i pazienti canini critici si trovano in una condizione di stress ossidativo e che l'alterazione dell'equilibrio è dovuta sia ad un incremento della concentrazione dei radicali liberi che ad una diminuzione dell'attività della barriera antiossidante. È stato utile anche constatare come ad un livello più alto di antiossidanti corrisponde una maggiore percentuale di sopravvivenza e che la somministrazione di antiossidanti in questi pazienti, possa migliorare la clinica e la prognosi.

Sarebbe interessante approfondire gli studi sulla valutazione dei d-ROMs e BAP nei pazienti canini ospedalizzati e il loro andamento nel tempo, per valutarne l'utilità come indice prognostico.

Bibliografia

- Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H, Gulshan S, Behbehani A, Farghally M, *Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients*. Journal of clinical laboratory annals 2002, 16 pp 167-171.
- Abraham E. *Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure*. J Infect Dis. 2003; 187:S364–S9.
- Alonso de Vega, JM; Diaz, J; Serrano, E; Carbonell, LF *Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome*. Crit. Care Med. 30:1782–1786; 2002
- Andrews PJ, Avenell A, Noble DW, et al. *Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients*. BMJ 2011;342: d1542.
- Koutsokera Angela, Theodoros S. Kiropoulos, Dimitrios J. Nikoulis, Zoe D Daniil, Vassiliki Tsolaki, Kalliopi Tanou, Andriana I. Papaioannou, Anastasios Germenis, Konstantinos I. Gourgoulianis, Konstantinos Kostikas *Clinical, functional and biochemical changes during recovery from COPD exacerbations* Respiratory Medicine (2009) 103, 919e926
- Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, et al. *Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock*. Crit Care Med 2007;35(1):118–26.
- Angstwurm, Matthias WA MD; Schottdorf, Juergen MS; Schopohl, Jochen MD; Gaertner, Roland MD *Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome* Critical Care Medicine: September 1999 - Volume 27 - Issue 9 - pp 1807-1813
- Annuk Margus, Mihkel Zilmer, Lars Lind, Torbjörn Linde and Bengt Fellström. *Oxidative Stress and Endothelial Function in Chronic Renal Failure*. Journal of the American Society of Nephrology. Vol. 12 (2001) : pp. 2747-2752.
- Argaman Z; Young VR; Noviski N; Castillo-Rosas L; Lu X M; Zurakowski D; Cooper M; Davison C; Tharakan JF; Ajami A; Castillo L *Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients*. Crit. Care Med. 31:591– 597; 2003.

- Baldwin SR; Simon RH; Grum CM; Ketai LH; Boxer LA; Devall LJ *Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome*. Lancet 1:11 – 14; 1986.
- Batra S; Kumar R; Seema; Kapoor AK; Ray G. *Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis*. Ann. Trop. Paediatr. 20:27– 33; 2000.
- Beckman KB, Ames BN: *The free radical theory of ageing matures*. Physiol Re 1998;78: 547–581.
- Beerda B, Schilder MB, Van Hoff JH, et al. *Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction*. Physio Behav. 1999;66:243–254.
- Beherend L, Henderson G, Zwacka RM, *Reactive oxygen species in oncogenic transformation*, Biochemical society transaction 2003, 31 pp 1441-1444.
- Borrelli E; Roux-Lombard P; Grau GE; Girardin E; Ricou B; Dayer J; Suter P M *Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk*. Crit. Care Med. 24:392– 397; 1996.
- Bowler RP; Velsor LW; Duda B; Chan ED; Abraham E; Ware LB; Matthay, M A; Day BJ *Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury*. Crit. Care Med. 31:2309– 2315; 2003
- Bradshaw JW, Mcpherson JA, Casey RA, et al. *Aetiology of separation-related behaviour in domestic dogs*. Vet Rec. 2002;151:43–46.
- Brown NS, Bicknell R, *Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer*. Breast cancer research 2001, 3 (5) pp 323-7.
- Brown SA, Brown CA, CrowellWA, et al. *Beneficial effects of chronic administration of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency*. J Lab Clin Med 1998;131(5):447–55.
- Brown SA, Brown CA, CrowellWA, et al. *Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs*. J Lab Clin Med 2000;135(3):275– 86.
- Bulger EM, Maier RV. *Antioxidant in critical illness*. Arch. Surg. 136:1201–1207; 2001.

- Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM. *Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure- overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. *Circ Res* 93: 802–805, 2003.
- Buranakarl C, Trisiriroj M, S Pondeenana, T Tungjitpeanpong, P Jarutakanon *Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs*
- Carpenter CT; Price PV; Christman BW *Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS*. *Chest* 114:1653– 1659; 1998.
- Ceballos-Picot Irène, V Witko-Sarsat. *Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure*. *Free Radical Biology and Medicine*. (1996) Vol.21, No 6 pp.845-853 *clinico* 2003, (3-4) pp 62-72.
- Cheng Chien-Hsiang, Shih-Chien Huang, Ting-Yu Chiang, Yueching Wong, and Yi-Chia Huang *Higher Plasma Pyridoxal Phosphate Is Associated with Increased Antioxidant Enzyme Activities in Critically Ill Surgical Patients* *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 572081, 7 pages.
- Conklin KA, *Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects*. *Nutrition and cancer* 2000, 37 pp 1- 18.
- Conner EM *Inflammation, free radicals and antioxidants*. *Nutrition* 1996, Vol.12 pp. 274-277.
- Gebhardt Constance, Johannes Hirschberger, Stefanie Rau, Gisela Arndt, Karen Krainer; Florian J. Schweigert, Leo Brunnberg, Bernd Kaspers, and Barbara Kohn *Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis* *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 19(5) 2009, pp 450–458
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, J Lunec, *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*, *FASEB Journal* 2003, 17 pp 1195-1214.
- Cotgreave IA *N-Acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications*. *Adv. Pharmacol.* 38:205– 227; 1997.
- Cowley HC; Bacon PJ; Goode HF; Webster NR.; Jones JG.; Menon, DK *Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors*. *Crit. Care Med.* 24: 1179–1183; 1996
- Crimi E; Liguori A; Condorelli M; Cioffi M; Astuto M; Bontempo P; Pignatola O; Vietri MT; Molinari AM; Sica V; Della Corte F; Napoli C *Beneficial effects of*

antioxidant supplementation in enteral feeding in critically ill patients: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Anesth. Analg. 99:857– 863; 2004.

- Chan DL, EA Rozanski, and LM Freeman *Relationship among Plasma Amino Acids, C-Reactive Protein, Illness Severity, and Outcome in Critically Ill Dogs* J Vet Intern Med 2009;23:559–563
- Das UN, *A radical approach to cancer.* Medical science monitor 2002, 8 pp 79-92.
- Diez Basilia González. *Progression of chronic renal failure and oxidative stress.* Electron Journal of Biomedicine 2003;1(1):5-11.
- Bras Dineli, Carmen MH Colitz, Donna F Kusewitt, Heather Chandler, Ping Lu, Anne J Gemensky-Metzler, David A. Wilkie *Evaluation of advanced glycation end-products in diabetic and inherited canine cataracts.*
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, H Rodriguez, *Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement .* Free radical biology and Medicine 2002, 32 pp 1102-1115.
- Domenighetti G; Suter PM; Schaller MD; Ritz R; Perret C *Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study.* J. Crit. Care 12:177–182; 1997.
- El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, Nicolls MR. *Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin.* Immunol Lett. 2007; 111:36–44.
- Endo S; Inada K; Ceska M; Takakuwa T; Yamada Y; Nakae H; Kasai T; Yamashita H; Taki K; Yoshida M *Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock.* J. Inflammation 45:136–142; 1995
- Erhola M, Kellokumpu-Lehtinen P, Metsa-Ketela T, *Effect of anthracyclin-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small lung cancer patients.* Free radicals and biological medicine 1996, 21 pp 383-90.
- Fan J; Shek PN; Suntres ZE; Li YH; Oreopoulos GD; Rotstein OD *Liposomal antioxidants provide prolonged protection against acute respiratory distress syndrome.* Surgery 128:332– 338; 2000.
- Flora SJ, *Role of free radicals and antioxidants in health and disease.* Cellular and molecular biology 2007, 53(5) pp 1-3.

- Forceville X, Laviolle B, Annane D, et al. *Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study.* Crit Care 2007;11(4):R73.
- Furhman MP *Antioxidant supplementation in critical illness: what do we know?* Nutrition 16:470– 471; 2000.
- Gadek JE; DeMichele SJ; Karlstad MD.; Pacht ER.; Donahoe M; Albertson T E; Van Hoozen C; Wennberg AK; Nelson JL; Noursalehi M *Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome: Enteral Nutrition in ARDS Study Group.* Crit. Care Med. 27:1409–1420; 1999.
- Gadek JE; Pacht, ER *The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS.* Chest 110:273S– 277S; 1996.
- Galle Jan and Stefan Seibold. *Has the time come to use antioxidant therapy in uraemic patients?* Nephrology Dialysis Transplantation (2003) 18: 1452-1455.
- Galley HF; Davies MJ.; Webster NR *Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome.* Crit. Care Med. 24:1649–1653; 1996.
- Galley HF; Howdle PD; Walker BE; Webster NR *The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock.* Free Radic. Biol. Med. 23:768– 774; 1997.
- Gandhi CR & Chowdhury DR (1979) *Effect of diabetes mellitus on sialic acid and glutathione content of human erythrocytes of different ages.* Indian Journal of Experimental Biology 17, 585±587
- Gao_L, Laude K, Cai H *Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases.*
- Goode HF; Cowley HC; Walker BE; Howdle PD; Webster NR *Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction.* Crit. Care Med. 23:645– 646; 1995
- Gore DC, Chinkes D, Heggers J, et al. *Association of hyperglycemia with increased mortality after severe burn injury.* J Trauma. 2001; 51:540–544.
- Gore DC, Chinkes DL, Hart DW, et al. *Hyperglycemia exacerbates muscle protein catabolism in burn-injured patients.* Crit Care Med. 2002; 30:2438–2442.
- Greene Eddie L, Mark S.Paller. *Oxygen Free Radicals in Acute Renal Failure.* Miner Electrolyte Metab. 1991

- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. *Myocyte death in the failing human heart is gender dependent*. *Circ Res*. 1999;85:856–866.
- Gupte RS, Vijay V, Marks B, Levine RJ, Sabbah HN, Wolin MS, Recchia FA, Gupte SA. *Upregulation of glucose-6-phosphate dehydro-genase and NAD(P)H oxidase activity increases oxidative stress in failing human heart*. *J Card Fail* 13: 497–506, 2007.
- Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, Young ME, Lionetti V, Labinsky V, Floyd BC, Ojaimi C, Bellomo M, Wolin MS, Recchia FA. *Glucose-6- phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart*. *J Mol Cell Cardiol* 41: 340–349, 2006.
- Gutteridge JM; Mitchell J. *Redox imbalance in the critically ill*. *Br. Med. Bull*. 55:49– 75; 1999
- Guyton KZ, Kensler TW, *Oxidative mecanisms in carcinogenesis*. *British medical bullettin* 1993, 49 pp 523-544.
- Gwinner Wilfried and Hermann-Josef Gröne. *Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis*. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2000) 15: 1127-1132.
- Haugen Eric, Karl A Nath. *The Involvement of Oxidative Stress in the Progression of Renal Injury*. *Blood Purif*. 1999; 17; 58-65.
- Haunstetter A, Izumo S. *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular diseases*. *Circ Res*. 1998;82:1111–1129.
- Hazelzet J; Driessen GJA; Abboud P; Wheeler DS; Shanley TP; Wong HR Sepsis. In: Wheeler DS; Wong HR; Shanley TP, editors. *Pediatric Critical Care Medicine: Basic Science and Clinical Evidence*. London, UK: Springer-Verlag London Limited; 2007. p. 1421-44.
- Hemmila MR, Taddonio MA, Arbabi S, et al. *Intensive insulin therapy is associated with reduced infectious complications in burn patients*. *Surgery*. 2008; 144:629–637.
- Herrera J, Nava M, Romero F, Rodriguez-Iturbe B. *Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration*. *American Journal of Kidney Diseases* (2001). Vol. 37(4) : pp. 750-757
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC, *Radical causes of cancer*. *Natural Review Cancer* 2003, 3 pp 276-285.

- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A. *Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium*. *Circ Res*. 2000;86:152–157.
- Ignarro LJ; Napoli C; Loscalzo J *Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview*. *Circ. Res*. 90:21– 28; 2002.
- Iorio EL, *La valutazione globale dello stress ossidativo*, Diacron International, marzo 2004.
- Jackson NC; Carroll PV; Russell-Jones DL; Sonksen PH; Treacher DF; Umpleby AM *The metabolic consequences of critical illness: acute effect on glutamine and protein metabolism*. *Am. J. Physiol*. 276:E163– E170; 1999.
- Jain s. K. (1989) *Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells*. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 21340±21345
- Jepsen S; Herlevsen P; Knudsen P; Bud MI; Klausen NO *Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study*. *Crit. Care Med*. 20:918– 923; 1992.
- Jeschke MG, Finnerty CC, Herndon DN, Song J, Boehning D, Tompkins RG, BakerHV, Gauglitz.GG. *Severe injury is associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress response, and unfolded proteinresponse* *Ann Surg*. 2012 Feb;255(2):370-8.
- Viviano KR, SN Lavergne, L Goodman, B VanderWielen, L Grundahl, M Padilla, and LA Trepanier *Glutathione, Cysteine, and Ascorbate Concentrations in Clinically Ill Dogs and Cats*. *J Vet Intern Med* 2009;23:250–257
- Viviano KR and B VanderWielen *Effect of N-Acetylcysteine Supplementation on Intracellular Glutathione, Urine Isoprostanes, Clinical Score, and Survival in Hospitalized Ill Dogs*. *J Vet Intern Med* 2013
- Kargin Funda, Ulvi Reha Fidanci. *Kidney diseases and antioxidative metabolism in dogs*. *Turk J Vet Anim Sci* 25 (2001) 607-613;17: 124-132
- Karihatala P, Winqvist R, Syvaioia JE, Kinnula LK., Soini Y, *increasing oxidative damage and loss of mismatch repair anzymes during breast carcinogenis*, *European journal of cancer* 2006, 42 (15) pp 2653-9.
- Katusic ZS: *Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone*. *Free Rad Biol Med*1996;20:443–448.
- Konukoglu D, Akcay T, Dincer Y, Hatemi H (1999) *The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type 2 diabetic patient with angiopathy*. *Metabolism* 48, 205±299

- Kooy NW; Royall JA; Ye YZ; Kelly DR; Beckman JS. *Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151:1250– 1254; 1995.
- Kumaraguruparan R, Balachandran C, Murali Manohar B, Nasini S, *Altered oxidant – antioxidant profile in canine mammary tumours*, Veterinari research communications 2005, pp 287-296
- Lamb N J; Gutteridge JM; Baker C; Evans TW; Quinlan GJ *Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination*. Crit. Care Med. 27:1738– 1744; 1999.
- Landolt H, Langemann H, Probst A, Gratzl O. (1994) *Levels of water-soluble antioxidants in astrocytoma and in adjacent tumor-free tissue*. Journal of Neuro-oncology 21, 127-133
- Lang JD; McArdle P J; O Reilly PJ; Matalon S *Oxidant/antioxidant balance in acute lung injury*. Chest 122:314S– 320S; 2002.
- Langhseth L, *Oxidants, antioxidants and disease prevention*. International life sciences institute europe, Bruxelles 1995, pp. 1-7.
- Laurent T; Markert M; Feihl F; Schaller MD; Perret C *Oxidant– antioxidant balance in granulocytes during ARDS: effect of NAcetylcysteine*. Chest 109:163– 166; 1996.
- Lee HC, Wei YH. *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging*. Exp Biol Med (Maywood) 2007;232:594; with permission Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2008 Jan;38(1):137-55
- Lee Jae-il, Myung-jim Kim, Chang-sik Park, Myung-keol Kim. *Influence of ascorbic acid on BUN, creatinine, resistive index in canine renal ischemia-reperfusion injury*. Journal of Veterinary Science (2006), 7(1), pp. 79-81.
- Lee WL; Downey, GP. *Neutrophil activation and acute lung injury*. Curr. Opin. Crit. Care. 7:1 –7; 2001.
- Lieberthal W, Levine JS: *Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury*. Am J Physiol 1996;271: F477–F88
- Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-E, et al. *Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome*. Nephrol Dial Transplant 2003;18:1272–80
- Loft S, Poulsen HE; *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*, Journal of Molecular 1996, 74 pp 297-312.

- Luciak M. *Antioxidants in the treatment of patients with renal failure*. Roczn. Akad. Med. Białymst. 2004 n° 49 pp.157-61.
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu c, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, Mulas C, Mudo MC, Murgia V, Camboni P, Massa E, Ferreli L, Contu P, Rinaldi A, Sanjust E, Atsei D, Elsener B, *Quantitative evaluation of oxidative stress , Chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: correlation with stage and performance status*. International journal of cancer 2002, 98 (1) pp 84-91
- Mantovani G, Macciò A, Lai P, *Cytokine activity in cancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate*. Seminars in oncology 1998, 25 pp 45-52.
- Manzanares W, Biestro A, Torre MH, et al. *High-dose selenium reduces ventilator-associated pneumonia and illness severity in critically ill patients with systemic inflammation*. Intensive Care Med 2011;37(7):1120–7.
- Karapetsa Maria, Marina Pitsika, Nikos Goutzourelas, Dimitrios Stagos, Aphrodite Tousia Becker, Epaminondas Zakynthinos *Oxidative status in ICU patients with septic shock* Food and Chemical Toxicology 61 (2013) 106–111
- Karayannopoulou Maria, Anna Fytianou, Nikolaos Assaloumidis, Dimitra Psalla, Theodoros C. Constantinidis, Eleni Kaldrymidou, Alexander F. Koutinas *Markers of lipid peroxidation and a-tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors*
- Marnett LJ, *Oxyradicals and DNA damage*. Carcinogenesis 2000, 21 pp 361-370.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filasi C, Giovannini C, *Novel Mechanisms of natural Antioxidants compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes* The Journal of Nutritional Biochemistry 2005, 16 pp 577-586.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filasi C, Giovannini C, *Novel Mechanisms of natural Antioxidants compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes* . The Journal of Nutritional Biochemistry 2005, 16 pp 577-586.
- Mashiach E *Mesna: a novel renoprotective antioxidant in ischaemic ARF*. Nephrol. Dial. Transp. 2001 Vol. 16 pp.542-551.
- Massy ZA *Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management*. J. Nephrology 2002 n° 15 pp.336-341.

- Mates JM, C. Perez Gomez, I.N. De Castro, *Antioxidant enzymes and human disease*. Clinical Biochemistry 1999, 32 pp 595-603
- Miller ER, Pastor Barriuso R, Dalal D, Riemersa RA, Appel L, Guallar J, *Meta-Analysis: high-dosage Vitamin E supplementations may increase all-cause mortality*, Annals of internal medicine 2005, 142 pp 37-46.
- Mills DS, Ramos D, Gandia Estelles M, et al. *A triple blind placebo-controlled investigation into the assessment of the effect of Dog Appeasing Pheromone (DAP) on anxiety related behaviour of problem dogs in the veterinary clinic*. Appl Anim Behav Sci. 2006;98:114–126.
- Mimic-Oka J, T Simic, L Djukanovic, Z Reljic and Z Davicevic. *Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure*. Clinical Nephrology, Vol 51 – No 4/1999 pp. 233-241.
- Modlinger Paul S., Christopher S. Wilcox, and Shakil Aslam. *Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Progression of Chronic Renal Failure*. Seminars in Nephrology, Vol 24, No 4 (July), 2004 : pp. 354-365.
- Moller P, Wallin H, *Adduca formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product*. Mutation research 1998 , 410 pp 271-90.
- Motoyama T; Okamoto K; Kukita I; Hamaguchi M; Kinoshita Y; Ogawa H *Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome*. Crit. Care Med. 31:1048–1052; 2003.
- Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. *Apoptosis and cardiomyopathy*. Curr Opin Cardiol. 2000;15:183–188
- Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballaster M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. *Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96: 8144–8149.
- Nath KA, A J Croatt and TH Hostetter. *Effect of dietary protein restriction on oxygen consumption (QO₂) and Oxidant stress in the remnant nephron*. Kidney international. Vol. 33. pag. 381.

- Nathens AB; Neff MJ; Jurkovich GJ; Klotz P; Farver K; Ruzinski JT; Radella F; Garcia I; Maier RV *Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients.* Ann. Surg. 236:814–822; 2002.
- Nelson JL; DeMichele SJ; Pacht ER; Wennberg AK *Enteral Nutrition in ARDS Study Group. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants on antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome.* J. Parenter. Enteral Nutr. 27:98–104; 2003.
- Nemeth I; Boda D *Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome.* Intens. Care Med. 27:216–221; 2001.
- Ogilvie AC; Groeneveld AB; Straub JP.; Thijs LG *Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock.* Intens. Care Med. 17:40–44; 1991.
- Ohya M; Marukawa S; Inoue T; Ueno N; Hosohara K; Terada N; Kosaka H *Plasma nitrotyrosine concentration relates to prognosis in human septic shock.* Shock 18:116–118; 2002.
- Ojaimi et al.
- Oldham K M; Bowen EP *Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?* J. Am. Diet. Assoc. 98: 1001– 1008; 1998.
- Oren M, *Decision making by p53: life ,death and cance.* Cell Death and Differentiation 2003, 10 pp 431-442.
- Ortolani O; Conti A; De Gaudio AR; Masoni M; Novelli G *Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome.* Shock 13:14– 18; 2000.
- Ortolani O; Conti A; Gaudio DeAR; Moraldi E; Cantini Q; Novelli G *The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161:1907– 1911; 2000.
- Pacht ER; DeMichele SJ; Nelson JL; Hart J; Wennberg AK; Gadek JE *Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gammalinolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome.* Crit. Care Med. 31:491– 500; 2003.
- Palmer HJ, Paulson KE, *Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression,* Nutrition Reviews 1997, 55 pp 353-361.
- Pasquini A, Guidi G, Marchetti V, Simoni S, Lubas G, Cardini G *Use of d-roms assay in dogs affected by chronic renal failure to evaluate prognosis: preliminary results* 17th

Congress European Society of Veterinary Internal Medicine (Budapest), settembre 2007

- Pastore A, Federici C, Bestini E, Piemonte F, *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*, Clinica chimica acta 2003, 333 pp 19-39.
- Paterson, RL; Galley HF.; Webster NR *The effect of Nacetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis*. Crit. Care Med. 31:2574–2578; 2003
- Preiser JC; Van Gossum A; Berre J; Vincent JL; Carpentier Y *Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamins A, C and E enhances the resistance to oxidative stress*. Crit. Care Med. 28:3828– 3832; 2000
- Finotello R, A Pasquini, V Meucci, I Lippi, A Rota, G Guidi and V Marchetti *Redox status evaluation in dogs affected by mast cell tumour*.
- Rank N; Michel C; Haertel C; Lenhart A; Welte M; Meier- Hellmann A; Spies, C. *N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study*. Crit. Care Med. 28:3799–3807; 2000
- Rosenberger D, Moshal KS, Kartha GK, et al. *Arrhythmia and neuronal/endothelial myocyte uncoupling in hyperhomocysteinemia* Arch Physiol Biochem 2006;112(4):219–27.
- Rossig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet JM, Tedgui A, Dimmeler S, Zeiher AM. *Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol*. J Am Coll Cardiol. 2000; 36:2081–2089.
- Rotstein OD *Oxidants and antioxidant therapy*. Crit. Care Clin. 17:239– 247; 2001.
- Platt SR, D Marlin, N Smith, V Adams *Increased cerebrospinal fluid uric acid concentrations in dogs with intracranial meningioma*
- Salvemini D; Cuzzocrea S *Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine*. Crit. Care Med. 31:S29– S38; 2003.
- Santangelo Francesco, Véronique Witko-Sarsat, Tilman Drüeke and Béatrice Descamps-Latscha. *Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease*. Nephrol Dial. Transplant (2004) Vol. 19 No 8 : 1951-1955.
- Schwartzbaum JA & Cornwell DG (2000) *Oxidant stress and glioblastoma multiforme risk: serum antioxidants, gamma-glutamyl transpeptidase, and ferritin*. *Nutrition and Cancer* 38, 40-49

- Seeger W; Ziegler A; Wolf HR *Serum alphas-tocopherol levels after high-dose enteral vitamin E administration in patients with acute respiratory failure.* Intens. Care Med. 13:395–400; 1987.
- Shinya Toyokuni, *Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis, Antioxidants and redox signaling* 2006, 8 pp 1373-1377
- Sittipunt C; Steinberg K P; Ruzinski JT; Myles C; Zhu S; Goodman RB; Hudson LD; Matalon, S; Martin, TR *Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:503– 510; 2001.
- Spapen H; Zhang H; Demanet C; Vleminckx W; Vincent JL; Huyghens L *Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock?* Chest 113:1616–1624; 1998.
- Storz P, *Reactive oxygen species in tumor progression.* Frontiers of Biosciences 2005, 10 pp 1881-1896.
- Stover JF, Lowitzsch K & Kempinski OS (1997) Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases. *Neuroscience Letters* 238, 25-28
- Strand OA; Leone A; Giercksky KE; Kirkeboen KA *Nitric oxide indices in human septic shock.* Crit. Care Med. 28:2779– 2785; 2000.
- Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z: *Apoptosis in glomerular sclerosis.* Kidney Int 1996;49:103–111.
- Szczubial M, Kankofer M, Lopuszynsky W, Dabrowski R, Lipko J, *Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours.* Journal of veterinar medicine. A, physiology, pathology clinical medicine 2004, 51 (7-8) pp 336- 40.
- Sznajder JJ; Fraiman A; Hall JB; Sanders W; Schmidt G; Crawford G; Nahum A; Factor P; Wood LD *Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure.* Chest 96:606– 612; 1989.
- Gardiner TA, Anderson HR, Degenhardt SR, Thorpe JW, Baynes DB, Archer AW, Stitt1 *Prevention of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic dogs by a non-steroidal anti-inflammatory drug.*
- Tasanarong A, Seublinvong T, Eiam-Ong S. *The role of carbamylated hemoglobin in identifying acute and chronic renal failure.* J Med Assoc Thai. 2002 Apr;85(4):462-9.

- Thiernemann C. *Membrane-permeable radical scavengers (Tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation*. Crit. Care Med. 31:S76–S84; 2003.
- Tod E, Brander D, Waran N. *Efficacy of dog appeasing pheromone in reducing stress and fear related behaviour in shelter dogs*. Appl Anim Behav Sci. 2005;93:295–308.
- Trosko JE, Ruch RJ, *Gap junctions as targets for cancer chemioprevention and chemotherapy*. Current drugs target 2002 3 pp 465-482.
- Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A, *Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer*, Frontiers of Bioscience 2004, 9 pp 2029-2044.
- Trush MA, Kenler TW, *an overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis*. Free radical biology and Medicine 1991, 10 pp 201-209
- Tsai K; Hsu T; Kong C; Lin K; Lu F *Is the endogenous peroxyradical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans?* Free Radic. Biol. Med. 28:926– 933; 2000.
- Tsukahara H. *Biomarkers for oxidative stress: Clinical applications in pediatric medicine*. Curr Med Chem. 2007; 14:339–51.
- Vaden SL, Gookin J, Trogdon M, Langston CE, Levine J, Cowgill LD. *Use of carbamylated hemoglobin concentration to differentiate acute from chronic renal failure in dogs*. Am J Vet Res. 1997 Nov;58(11):1193-6.
- Vajdovich P, Kriska T, Mezes M, Szabo pR, Balogh N, Banfi A, Arany-toth A, Gaal T, Jakus J, *Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study*. Cancer letters 2005, 224 (2) pp 339-46.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J, *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Molecular and cellular biochemistry 2004, 266 (1-2) pp 37-56.
- Van Holde M., *Biochimica* 1998, pp 549-550.
- Vaziri N.D. *Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms and potential consequences*. Seminars in Nephrology (2004) Vol. 24 pp. 469-473
- Verna F, Di Giuli M *Radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno in patologia umana ed in diagnostica di laboratorio*. Il Patologo clinico No 3-4 , 2003, pp 62-72.
- Verna F, Di Giuliani M, Venditti A, Corsi MM, Verna R, *Radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno in patologia umana e in diagnostica di laboratorio*. Il patologo
- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. *Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis*. Int Immunopharmacol. 2004; 4:327–47.

- Mishra Vinita, Malcolm Baines, Richard Wenstone and Alan Shenkin *Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients*. Ann Clin Biochem 2005; 42: 269–276.
 - Walsh TS; Lee A *N-Acetylcysteine administration in the critically ill*. Intens. Care Med. 25:432–434; 1999
 - Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S, *Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity*. Cancer Treatment Reviews 1997, 23 pp 209-40.
 - Whittemore JC, BA Marcum, DI Mawby, MV Coleman, TB Hacket, and MR Lappin *Associations among Albuminuria, C-Reactive Protein Concentrations, Survival Predictor Index Scores, and Survival in 78 Critically Ill Dogs* J Vet Intern Med 2011;25:818–824
- Willkox JK, Ash SL *Antioxidants and prevention of chronic disease*. Crit. Rev. Food Science Nutrition. 2004 n° 44 pp.257-95.
- Chansaisakorn Winai, Prarom Sriphavatsarakorn, Pisit Sopakdittapong, Monkon Trisiriroj, Somchai Pondeenana, Chollada Buranakarl *Oxidative stress and intraerythrocytic concentrations of sodium and potassium in diabetic dogs*.
 - You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, JL Ma , JyLi, ML Jin, YRHu, CS Yang, MJ Blaser, P Correa, WJ Blot, JF Fraumeni, GW Xu, *Gastric cancer: Helicobacter pilori, serum vitamin C, and other risk factor*, Journal of the national cancer institute 2000, 92 pp 1607-1612.
 - Young-Mee Kim, Jong-Kyung Lee, A.M. Abd el-aty, Sung-Hee Hwang, Jae-Hoon Lee, and Sang-Mok Lee *Efficacy of dog-appeasing pheromone (DAP) for ameliorating separation-related behavioral signs in hospitalized dogs* The Canadian Veterinary Journal. Apr 2010; 51(4)380.
 - Yu S, Gross KL *A renal food supplemented with vitamins E, C and beta-carotene reduces oxidative stress and improves kidney function in client-owned dogs with stages 2 or 3 kidney disease*. European Society of Veterinary Clinical Patology, Amsterdam September 14-16 2006.
 - Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M & Levy Y. (1999) *Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM*. Israel Medical Association Journal 1, 228±231
 - Zhang H; Slutsky AS; Vincent JL. *Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction*. Intens. Care Med. 26:474– 476; 2000.

- Zhu S; Ware LB; Geiser T; Matthay MA.; Matalon S *Increased levels of nitrate and surfactant protein A nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:166– 172; 2001 Anggard, E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. Lancet 343:1199– 1206; 1994.
- Zimmermann T, Albrecht S, Kühne H, et al. *Substitution of selenium in septic patients. A prospective randomized study.* Med Klin 1997;3:3–4.
- Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. *Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine.* Crit Care Med. 2003; 31:S105–S11.
- Zingarelli B. *Nuclear factor-kappaB.* Crit Care Med. 2005; 33:S414–S6.
- Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL. *Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs* Vet Res Commun. 2008 Feb;32(2):137-43. Epub 2007 Sep 11.

Ringraziamenti

E' difficile scrivere anche i ringraziamenti, quindi vi potrei salutare tutti con un "grazie e ciao"ma invece no, voglio essere noiosa e prolissa per un ultima volta!!

Il primo ringraziamento va alla mia famiglia, senza il vostro sostegno non avrei potuto affrontare questo percorso!! Grazie mamma, per tutto quello che hai fatto per me da sempre, perché mi hai cresciuto in modo splendido e devo ringraziare solo te per la persona che sono diventata!!Grazie a Renzino, sei riuscito ad essere il papà che non abbiamo potuto avere, e grazie perché ad ogni passo di questo lungo percorso mi hai dimostrato quanto fossi fiero di me!! Grazie alle mie sorelle, Sara e Erika, siamo così diverse una dall'altra, vi voglio bene e so di poter contare su di voi sempre e per qualsiasi cosa!!

Grazie a Veronica Marchetti, perche con i tuoi insegnamenti e il tuo lavoro sei riuscita a trasmettermi la passione per questa splendida professione, grazie perché la prima volta che ci siamo viste, mi hai dato una spilletta fatta a smile e mi hai detto "l'importante è sorridere sempre"!!

Grazie alla Dott.ssa Anna Pasquini, perché mi ha aiutato nella stesura della tesi e a capire l'astruso mondo della statistica! Grazie per la pazienza e la disponibilità!

Grazie Alessio Pierini, o meglio Piero, perché con il tuo aiuto e la tua pazienza ora riesco a capire "qualcosa" del mondo della citologia.

Grazie alla Dott.ssa Gianila Ceccherini, senza il suo prezioso aiuto non sarei riuscita a raccogliere tutti i casi della tesi!! Grazie per la disponibilità e grazie per gli insegnamenti che mi hai dato!

Grazie a Camilla, per aver condiviso con me questa esperienza sin dal primissimo giorno, grazie per le risate, per la gioia, per i pianti, per le interminabili chiacchierate al telefono, per i messaggi al momento giusto! Grazie per la tua amicizia vera, di quelle che vanno oltre l'essere compagni di Università, grazie per esserci stata sempre

anche in quest'ultimo periodo di pazzia pre-tesi! Sono sicura che ci saremo sempre l'una per l'altra!

Grazie a Gaia, per aver condiviso interminabili ore di studio e ansie pre-esame, per le risate, per i momenti trascorsi insieme in questi anni e per esserci stata quando avevo bisogno di condividere gioie e paure! Grazie a Dani, perché sei riuscito a strapparmi sempre un sorriso!

Un grazie va anche agli altri, a Davide, Edoardo, Francesco, Chiara! Ognuno a modo suo è riuscito a rendere l'Università un'esperienza anche divertente, piena di risate, scherzi, "versi", viaggi interminabili, ore di studio, code alla mensa! Grazie veramente a tutti, siete fantastici!!

Grazie a tutti i "Marchettini" per avermi aiutato nella raccolta dei campioni per la tesi e soprattutto grazie per l'amicizia e l'aiuto in questi due anni!

Grazie alle amicizie di sempre, quelle che non passeranno mai, quelle che fanno parte dei ricordi ma che comunque riescono a essere importanti anche nel presente, quindi grazie Letizia, Irene, Balda, Serena, Benedetta, Rema, Eli, Palla, Magi, Robi e Spè! Un grazie speciale è per la Silvia, grazie per tutto quello che condividiamo, dalla nostra passione per il cibo, alla riluttanza a qualsiasi forma di esercizio fisico! Grazie per le infinite chiacchiere su qualsiasi cosa, per i consigli, grazie perché con te mi posso lamentare di tutti e tutto senza problemi!! Siamo molto diverse e forse è questo che rende la nostra amicizia così speciale!

E infine grazie a Francesco, la mia persona speciale, grazie di essermi sempre accanto, di riuscire a capire quello che penso con uno sguardo, grazie di spronarmi a fare sempre meglio dicendomi "la mia bimba genio"!! Grazie per tutto quello che condividiamo insieme, grazie di amarmi e farmi sentire importante, con te accanto riesco ad essere una persona migliore!!

.... grazie a tutti quelli che mi vogliono bene!!

