



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di scienze veterinarie

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

**Lo stress ossidativo nel paziente felino ospedalizzato**

**Candidato:**

Veronica Pellegrini

**Relatore:**

Dott.ssa Veronica Marchetti

**Correlatore:**

Dott.ssa Anna Pasquini

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

*... "Fai della tua vita un sogno, e di un sogno, una realtà" ...*

*Alla mia famiglia*

---

# LO STRESS OSSIDATIVO NEL PAZIENTE FELINO OSPEDALIZZATO

---

## Indice:

<b>Riassunto:</b> .....	1
Abstract:.....	2
<b>Primo capitolo: PARTE GENERALE</b> .....	3
<b>1.1 LO STRESS OSSIDATIVO:</b> .....	3
<b>1.1.1 I radicali liberi:</b> .....	3
<input checked="" type="checkbox"/> Classificazione delle specie reattive dell'ossigeno.....	6
<b>1.1.2 Gli antiossidanti:</b> .....	7
<input checked="" type="checkbox"/> Classificazione degli antiossidanti.....	11
<b>1.1.3 Equilibrio ossidativo o stress ossidativo?</b> .....	12
<b>1.1.4 La patogenesi dello stress ossidativo</b> .....	13
<b>1.2 LO STATO OSSIDATIVO DEL GATTO SANO</b> .....	17
<b>1.2.1 Lo stato ossidativo, la dieta e il BCS:</b> .....	18
<b>1.2.2 Lo stato ossidativo e l'invecchiamento:</b> .....	23
<b>1.3 LO STRESS OSSIDATIVO DEL PAZIENTE CRITICO:</b> .....	26
<b>1.3.1 IL PAZIENTE CRITICO: il ruolo dei ROS e degli ANTIOSSIDANTI</b> .....	27
<b>1.3.2 Lo Stress Ossidativo e le patologie del paziente critico:</b> .....	32
<input checked="" type="checkbox"/> ARDS, SIRS, SEPSI, MODS .....	32
<input checked="" type="checkbox"/> DISTRESS RESPIRATORIO.....	40
<input checked="" type="checkbox"/> INSUFFICIENZA RENALE.....	43
<input checked="" type="checkbox"/> LESIONI CEREBRALI .....	46
<b>1.3.3 Lo Stress Ossidativo e il Paziente Critico Felino</b> .....	48
<input checked="" type="checkbox"/> FIV: sindrome da immunodeficienza virale felina.....	48
<input checked="" type="checkbox"/> FIP: PERITONITE INFETTIVA FELINA .....	50
<input checked="" type="checkbox"/> CHETOACIDOSI DIABETICA.....	50
<input checked="" type="checkbox"/> RETINOPATIA DIABETICA NEL GATTO .....	53
<input checked="" type="checkbox"/> PATOLOGIE EPATICHE E FARMACO TOSSICITA' .....	54
<input checked="" type="checkbox"/> IPERTIROIDISMO: EFFETTI ACUTI DELLA TERAPIA .....	57
<input checked="" type="checkbox"/> INTOSSICAZIONE DA PARACETAMOLO .....	58

☑	CISTITE IDIOPATICA ACUTA.....	59
☑	<i>BARTONELLA HENSELAE</i> .....	60
1.3.4	<b>Stress Ossidativo e N-ACETILCISTEINA: gli effetti della terapia</b> .....	62
<b>Secondo Capitolo: PARTE SPERIMENTALE</b> .....		66
<b>LO STRESS OSSIDATIVO DEL PAZIENTE FELINO OSPEDALIZZATO</b> .....		66
2.1	<b>Presupposti scientifici ed Obiettivo dello studio</b> .....	66
2.2	<b>Materiali e Metodi</b> .....	67
2.2.1	<b>Analisi statistica</b> .....	80
2.3	<b>Risultati</b> .....	81
2.4	<b>Discussioni</b> .....	113
2.5	<b>Conclusioni:</b> .....	126
<b>Bibliografia:</b> .....		127

## **Titolo: Lo stress ossidativo nel paziente felino ospedalizzato**

---

### **Riassunto:**

Parole chiave: Stress ossidativo, paziente critico felino, radicali liberi dell'ossigeno, antiossidanti, d-ROMs test, BAP test.

Lo stress ossidativo è una condizione fisio-patologica della cellula dovuta ad un'alterazione dell'equilibrio cellulare per aumento di specie chimiche reattive o per deplezione antiossidante. L'obiettivo del nostro lavoro è determinare il ruolo dello stress ossidativo in un paziente critico felino. Per farlo sono stati utilizzati test come il d-ROMs test, per la ricerca delle specie reattive, e il BAP Test, per i sistemi di difesa antiossidanti (Diacron International, Grosseto I). Per determinare l'indice di sopravvivenza, invece, è stata utilizzata la scala APPLE SCORE FULL, validata nel gatto. E' stato analizzato il siero di gatti ricoverati nell'unità di terapia intensiva dell'Ospedale Didattico del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa, prelevato all'entrata (T0, 40 soggetti), dopo 48 ore (T48, 20 soggetti), e alla dimissione (TDIM, 17 soggetti). Sono stati presi in considerazione diversi fattori come la variabilità in base al sesso e all'età, al BCS, alla presenza o meno di anoressia al tempo del prelievo, all'apparato principalmente coinvolto, allo sviluppo di SIRS ed infine in base alle informazioni sulla sopravvivenza reale dei soggetti. I risultati includono una differenza significativa dei ROS in relazione al sesso (> nel maschio), al BCS (> con l'obesità), al tempo del prelievo (> in ingresso) e all'apparato coinvolto (> Nervoso). I BAP sono risultati significativamente più bassi a T0, in relazione all'anoressia, e nelle patologie riguardanti principalmente il sistema nervoso, rispetto alle altre. Il rapporto ROS/BAP ha seguito le variazioni dipendenti dall'alterazione di entrambi i parametri. La Apple score si mostra significativa in funzione dell'anzianità e della effettiva sopravvivenza. Si osserva inoltre un aumento della mortalità nei soggetti in SIRS. Sono auspicabili ulteriori ricerche per definire un eventuale ruolo prognostico dello stress ossidativo sulla sopravvivenza di un soggetto felino ospedalizzato.

## **Abstract:**

Key words: redox balance, critically ill feline, oxygen free radicals, d-ROMs test, antioxidant, BAP test

Oxidative stress is a physio-pathological condition of the cell due to an alteration of the equilibrium cell to increase the chemical reactive species or for antioxidant depletion. The aim of the work was to determine the role of oxidative stress in a feline critical patient. To do this were used the d-ROMs test, for the detection of reactive oxygen species, and the BAP test for the antioxidant defense systems (Diacron International, Grosseto I). To determine the survival rate APPLE FULL SCORE was used. It 'been analyzed serum of cats admitted to the ICU of Teaching Hospital, Department of Veterinary Science of Pisa, taken at the entrance (T0, 40 subjects), after 48 hours (T48, 20 subjects), and discharge (TDIM, 17 subjects). Were taken into account several factors such as the variability based on gender and age, BCS, the presence or absence of anorexia, time of blood sampling, apparatus mainly involved, or to the development of SIRS, and finally information on the actual survival of the subjects.

Results include a significant difference of ROS in relation to sex (> in the male), the BCS (> with obesity), at the time of sampling (> input) and the apparatus involved (> Nervous). The BAP were significantly lower at T0, in relation to anorexia, and in diseases, mainly from the nervous system, compared to others. The report ROS / BAP has followed the changes in employees from the alteration of both parameters. Apple's score is significant exhibition in seniority and actual survival. It also notes an increase in mortality in patients in SIRS. Further research is desirable to define a possible prognostic role of oxidative stress on the survival of a feline subject hospitalized.

# **Primo capitolo: PARTE GENERALE**

## **1.1 LO STRESS OSSIDATIVO:**

Lo stress ossidativo è una condizione patologica della cellula legata all'alterazione dell'equilibrio fisiologico tra produzione e eliminazione di specie chimiche ossidanti da parte di sistemi di difesa antiossidanti. (Iorio, 2004)

Ormai da anni questo “status” cellulare è stato oggetto di innovative ricerche nel campo della medicina, sia umana che veterinaria, ed è risultato avere un ruolo determinante, direttamente o indirettamente, nella patogenesi di numerose malattie. Si è visto infatti che, nei pazienti ospedalizzati critici, i radicali liberi possono diventare un problema in caso di iperproduzione o mancata neutralizzazione e questo potrebbe, di conseguenza, comportare un peggioramento della condizione clinica dei ricoverati. Parlare dei radicali liberi, degli antiossidanti e della normale condizione di equilibrio dell'organismo stesso è il primo passo per affrontare le problematiche successive ad un eventuale alterazione che potrebbe portare a un danno strutturale dei componenti cellulari di enorme impatto sulla salute.

### **1.1.1 I radicali liberi:**

Durante un processo chimico le molecole possono essere ridotte o ossidate. Una molecola con un elettrone spaiato può combinarsi con una molecola in grado di donare un elettrone. La donazione di un elettrone è chiamato ossidazione, mentre il guadagno di un elettrone è chiamato riduzione. In corso di una reazione ossidativa possiamo definire ossidata la molecola che cede l'elettrone e ridotta la molecola che lo accetta.

Il potere ossido riduttivo di uno ione o molecola è espresso in Volt.

La riduzione e l'ossidazione possono lasciare la molecola ridotta instabile e libera di reagire con altre di diversa natura causando danni alle membrane cellulari, alle proteine e al DNA. (Goodyear-bruch and Pierce, 2002)

Le specie chimiche reattive, definite comunemente radicali liberi, sono atomi o

raggruppamenti di atomi aventi un elettrone spaiato nell'orbitale esterno che li rende instabili.

La tossicità dei radicali è data dalla loro instabilità e cioè dalla loro tendenza spontanea nel cercare di privare le molecole con cui entrano in contatto di equivalenti riducenti in modo da ossidarle. I radicali liberi hanno emivita breve e tendono a diffondersi velocemente nei tessuti vicini.

Tanto più sono reattivi, tanto più sono tossici, tanto più si diffondono facilmente, tanto più danneggiano la struttura e la funzione cellulare. (Krhre, 1993)

Le specie chimiche reattive vengono sintetizzate da siti strutturali quali mitocondri, membrana plasmatica, perossisomi, reticolo endoplasmatico.

Sulle creste dei mitocondri ci sono dei complessi enzimatici che danno luogo alla fosforilazione ossidativa con sintesi di molecole di ATP e acqua. Durante il processo possono verificarsi degli errori (2%), specialmente in caso di iperventilazione, per cui gli  $e^-$  prodotti reagiscono con ossigeno molecolare dando luogo all' anione superossido (se un solo elettrone coinvolto) o perossido di idrogeno (Liu *et al.*, 2009).

Le specie chimiche vengono prodotte anche dalla membrana plasmatica dei fagociti, che entrando in contatto con i microorganismi, consumando grandi quantità di ossigeno molecolare; grazie agli enzimi, quali NADPH e LIPOSSIGENASI, svolgono la loro azione battericida programmata, producendo anione superossido e perossido. Anche nei perossisomi si forma perossido di idrogeno, a partire da un processo di beta ossigenazione di acidi grassi in cui la flavoproteina coinvolta fa scaturire la reazione chimica. Infine i radicali possono essere prodotti dal reticolo endoplasmatico grazie all'azione del citocromo P450 che dona elettroni in corso di detossificazione epatica da xenobiotici o inattivazione di ormoni (Valko *et al.*, 2006).

L'origine dei radicali è dovuta a meccanismi enzimatici e non enzimatici, come la **scissione omolitica** (rottura di un legame covalente in una molecola che dà origine a due radicali) o **l'interazione con metalli di transizione** (reazione di Fenton: dall' interazione di ioni metallici e enzimi si generano reazioni catalitiche che rompono legami covalenti e formano radicali liberi). La propagazione dei radicali è resa poi possibile da una serie di reazioni a catena in cui il radicale ossidrilico si lega a una molecola, strappa lo ione idrogeno e dà origine all' acqua e ad un radicale alchilico.



Innescata la reazione, viene attaccato o il substrato organico (la reazione continua a propagarsi) o un altro radicale libero (la reazione si interrompe con perdita di reattività).

Esistono molte specie chimiche che interagiscono nei processi metabolici cellulari e il modo in cui vengono classificate si basa sulla natura dell'atomo coinvolto.

Tra esse ricordiamo la specie reattiva dell'azoto (RNS), del carbonio, del cloro e dello zolfo, quella dell'idrogeno (RSI) considerato un mono radicale, e quella dei metalli di transizione con ossigeno molecolare considerati bi-radicali perché aventi due elettroni spaiati. Ma la specie reattiva di maggior interesse è sicuramente quella dell'ossigeno (**ROS: reactive oxygen specie**).

L'ossigeno, infatti, è la base del metabolismo dei microorganismi aerobi ed è anche l'accettore finale della catena mitocondriale delle cellule eucariote. (Gutteridge and Mitchell, 1999).

La produzione di energia metabolica, tramite i mitocondri, comporta l'utilizzo dell'ossigeno per ossidare altre molecole e produrre adenosin-trifosfato (ATP). Alla fine del processo si ottiene riduzione di ossigeno ad acqua e produzione di ROS per via di una serie di circostanze esterne. La produzione dei radicali liberi, infatti, può venire influenzata da numerosi fattori esogeni, come radiazioni o raggi UV, che da soli o insieme, aiutano la generazione dei ROS attivando vie metaboliche e inducendo, per esempio, il fenomeno di scissione omolitica.

Tra i fattori esogeni più importanti ci sono: ozono, batteri, alcuni anticorpi, o idrocarburi aromatici policiclici.

La conversione di circa il 5% dell'ossigeno (Ogino T. *et al.*, 1999) in radicali liberi dà origine a una serie di danni al DNA, ai lipidi di membrana, alle proteine con conseguenze di mutazioni, modificazioni, neoplasie e morte cellulare.

Classificazione delle specie reattive dell'ossigeno

SPECIE RADICALICHE DELL'OSSIGENO	SPECIE NON RADICALICHE DELL'OSSIGENO
<input checked="" type="checkbox"/> RADICALE SUPEROSSIDO O <sub>2</sub> • -	<input checked="" type="checkbox"/> PEROSSIDO DI IDROGENO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<input checked="" type="checkbox"/> RADICALE OSSIDO NITRICO NO•	<input checked="" type="checkbox"/> OSSIGENO SINGLETTO
<input checked="" type="checkbox"/> RADICALE IDROSSILICO OH•	<input checked="" type="checkbox"/> ACIDO IPOCLOROSO HOCL
<input checked="" type="checkbox"/> RADICALE PEROSSICO LIPIDICO LOO•	<input checked="" type="checkbox"/> OZONO O <sub>3</sub>

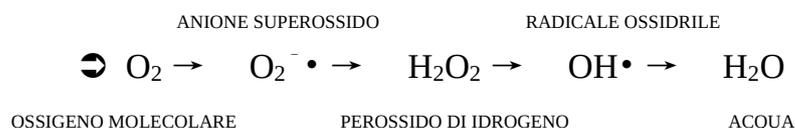
L'ossigeno singoletto è una varietà delle specie chimiche dell'ossigeno molto pericolosa perché estremamente reattiva e avente due elettroni spaiati (Scandalios, 1993). Deriva dall'eccitazione dell'ossigeno molecolare che ha assorbito una certa quota di energia tanto da diventare così tossico da essere in grado di attaccare acidi grassi polinsaturi e le LDL (perossidazione lipidica).

La formazione dell'ossigeno singoletto si ha in seguito alla seguente reazione:



Altre varietà molto pericolose sono l'anione perossido, che può trasformarsi in idroperossido nei fenomeni di ischemia-riperfusion, il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e il radicale idrossile (OH •).

Durante la riduzione dell'ossigeno molecolare, gli elettroni vengono aggiunti ad ogni passo, con conseguente creazione di queste tre specie reattive dell'ossigeno:



Tutti i radicali liberi dell'ossigeno possono determinare numerosi danni ai substrati organici e sono in grado di generare metaboliti attivi secondari, anche essi particolarmente tossici.

### 1.1.2 Gli antiossidanti:

Gli antiossidanti sono un gruppo di molecole eterogenee che esplicano diverse funzioni all'interno degli organismi viventi. Queste molecole vengono prodotte in maniera endogena o introdotte per via esogena, con l'alimentazione per esempio.

Gli antiossidanti esplicano un ruolo fondamentale, ovvero rappresentano efficienti sistemi di difesa nei confronti delle specie radicaliche. Nel plasma e nei tessuti, infatti, operano a livello primario, secondario e terziario principalmente come molecole costitutive, ma è sempre più evidente il loro ruolo chiave nella protezione del corpo. (Gutteridge and Mitchell, 1999).

Sono sostanze come enzimi, vitamine o oligoelementi in grado di legare radicali, interagire con gli altri antiossidanti recuperandone la funzione originale, chelare i metalli riducenti, avere un effetto positivo sull'espressione genica e essere quantitativamente sufficienti per svolgere la propria azione sia nei tessuti che nei liquidi organici. La loro presenza, nell'organismo, permette alla cellula di difendersi dagli insulti e mantenere l'equilibrio ossidativo. Si trovano per la maggior parte nel plasma, definito barriera antiossidante, in cui può avvenire la cessione di elettroni o atomi di idrogeno (equivalenti riducenti) in grado di stabilizzare i radicali liberi.

Gli antiossidanti sono in grado di prevenire la formazione dei ROS, inattivarli, contrastare la loro azione e ripristinare l'integrità ossidativa.

La classificazione comprende antiossidanti enzimatici e non:

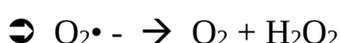
### 1. Antiossidanti preventivi:

Hanno un azione diretta “primaria” nel contrastare i radicali liberi. Sono *proteine in grado di complessare i metalli di transizione*, per contrastare la reazione di Fenton (formazione di radicali liberi), impedendone l’esistenza in forma libera e quindi l’incremento dell’azione istolesiva; In alcune condizioni fisiche o patologie, il rilascio di metalli di transizione in circolo può aumentare e in assenza di antiossidanti possono essere creati composti reattivi pericolosi come radicali alcossilici o perossilici; oppure i *quencher (SOD o CAROTENI)* in grado di neutralizzare l’ossigeno singoletto; o le *perossidasi* che attaccano i perossidi liberati dal contatto tra ROS e substrati organici impedendo la formazione di radicali più nocivi. Tra le più importanti perossidasi abbiamo la **catalasi**, ad esempio, riduce il perossido di idrogeno a una molecola d’acqua più ossigeno molecolare, e la **Glutazione perossidasi (GSH)** in grado di agire su determinati substrati, attaccare i perossidi, trasportare gli aminoacidi attraverso le membrane, rigenerare altri antiossidanti...

#### LA SUPEROSSIDO DISMUTASI

Nell’organismo vivente sono presenti tre forme di SOD: SOD rame-zinco (CuZnSOD) nel citoplasma, SOD manganese (Mn-SOD) nei mitocondri, ed SOD extracellulare (EC-SOD).

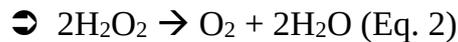
Il SOD è un antiossidante enzimatico in grado di scindere l’anione superossido in un composto più stabile, il perossido d’idrogeno, sicuramente meno tossico/reattivo, non avendo l’elettrone esterno spaiato, e in ossigeno molecolare.



Ovviamente il perossido d’idrogeno in determinate condizioni chimico-fisiche dell’organismo e in presenza di metalli di transizione, può essere trasformato in radicale perossido, molto pericoloso. (Gutteridge and Mitchell,1999).

Gli RBC hanno un canale attraverso il quale passa l’anione superossido che viene distrutto

da CuZnSOD, e possiedono inoltre catalasi (Eq.2) e GSH (Eq.3) in grado di distruggere il perossido di idrogeno.



Per molti anni in medicina umana sono state ricercate molecole in grado di contrastare gli effetti negativi dei ROS e è stato visto che la SOD (superossido dismutasi) avrebbe un ruolo competitivo nei loro confronti, anche se il suo impiego per via esogena risulta difficile.

Nessuno dei tre SOD, infatti, ha delle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche tali da riuscire ad essere metabolizzato nella giusta forma dall'organismo e renderlo clinicamente utile. Un altro ostacolo è rappresentato dal delicato equilibrio tra il radicale e il SOD: il radicale, infatti, se prodotto in quantitativo normale, è un metabolita utile e indispensabile per molti processi fisiologici. E' molecola di segnalazione nei processi di divisione cellulare e agisce come termine finale nella perossidazione lipidica. (McCord and Edeas, 2005)

Per molti anni non è emerso che la somministrazione di SOD potesse comportare degli effetti negativi: era essenziale per la vita in presenza di ossigeno. Un microorganismo come E. Coli non era in grado di sopravvivere senza, ma una sovraesposizione di 300 volte non sembrava avere nessun effetto. Al contrario nelle cellule di mammifero, una sovraesposizione di circa 6 volte in più del normale poteva comportare un aumento della perossidazione lipidica e del danno cellulare con effetti letali. Per questo è fondamentale l'equilibrio fisiologico, per questo è fondamentale che molecole pro-ossidanti e antiossidanti siano prodotti in egual misura e collaborino a mantenere un potenziale redox idoneo. (Gutteridge and Mitchell,1999).

#### ☑ TRANSFERRINA E CERULOPLASMINA:

Due degli antiossidanti più importanti nel plasma sono la transferrina e la ceruloplasmina con concentrazione del 4% sul totale. Entrambe queste proteine hanno capacità di

interagire con metalli di transizione, la transferrina ha profonda affinità con il ferro, mentre la ceruloplasmina con rame e ferro. Entrambe unendosi ai metalli di transizione tamponano la formazione di radicali. Altri ossidanti extracellulari sono l'aptoglobina, l'emopessina, l'albumina. Quest'ultima ha una grande capacità: è solubile in acqua, inibisce i danni radicalici del rame, da acido ipocloroso e da radicali perossido, ed ha inoltre, capacità di recupero dei danni strutturali.

## 2. Antiossidanti che inattivano specie già formate:

Sono antiossidanti con funzione "secondaria" tra cui vanno differenziati gli "scavenger" (spazzini) come *acido urico*, *ubichinone* (o *coenzima Q*, con attività protettiva per lipidi, proteine e DNA) e *composti tiolici* (quantitativamente presenti a livello plasmatico e intracellulare); e i "chain breaker" (spezzano le catene) come *carotenoidi* (**vitamina A**, reattiva contro i radicali perossilici), *tocofenoli* (**vitamina E**, prevenzione dei danni a carico di membrane e lipoproteine plasmatiche) e *ascorbato* (**vitamina C**). I carotenoidi possono avere entrambe le funzioni di agire come specie inattivanti o come *chain break*.

Attenzione: sia l'ubiquinone che la vitamina C possono innescare reazioni auto-ossidanti ed agire come generatori di specie reattive, le condizioni dipendono dal microambiente.

## 3. Antiossidanti che agiscono post danno radicalico:

Come l'*idrolisi*, la *transferasi* e la *polimerasi* che agiscono con meccanismo simile: individuano il frammento danneggiato, lo separano e infine sintetizzano e inseriscono il nuovo frammento.

## 4. Antiossidanti da adattamento:

Gli antiossidanti possono essere introdotti con alimentazione e esercizio fisico, potenziando la capacità antiossidante intrinseca dell'organismo.

## ☑ Classificazione degli antiossidanti

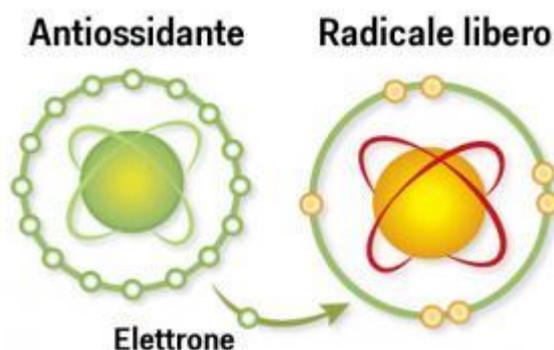
<b>ANTIOSSIDANTI ENZIMATICI</b>	<b>ANTIOSSIDANTI NON ENZIMATICI</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• SOD</li><li>• CATALASI</li><li>• PEROSSIDASI</li><li>• GLUTATIONE</li><li>• SISTEMA TIOREDOSSINA REDUTTASI</li><li>• SISTEMA LIPOAMIDE</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• TIOLI</li><li>• ACIDO ASCORBICO</li><li>• URATI</li><li>• VIT. E</li><li>• VIT. A e CAROTENI</li><li>• UBIQUINONE /UBIQUINOLO</li></ul>

Gli antiossidanti che si trovano nelle cellule e negli organuli cellulari sono sostanze enzimatiche e idrosolubili (SOD, catalasi, glutazione perossidasi), mentre quelli che si trovano nelle membrane cellulari, data la componente idrofobica, sono per lo più liposolubili (per esempio la vitamina E, estremamente efficace nella perossidazione lipidica dei PUFA che potrebbe comportare l'origine di perossidi lipidici, carbonili e carbossili).

Gli antiossidanti sono presenti anche in modo cospicuo nei fluidi extracellulari. Il sangue è un sistema buffer efficiente e trasporta soluti in grado di tamponare la tossicità dei radicali liberi.

Anione superossido, ossido nitrico e perossido di idrogeno passano attraverso i soluti e il loro potere ossidante dev'essere contrastato da molecole riducenti in modo da mantenere l'equilibrio.

### 1.1.3 Equilibrio ossidativo o stress ossidativo?



I radicali liberi, definiti “insostituibili compagni” di vita cellulare, sono il prodotto di molti meccanismi fisiologici individuali, mantenendo l’omeostasi, modulano importanti funzioni.

Finché, in condizioni di benessere, la loro produzione è tenuta sotto controllo dalla capacità antiossidante dei sistemi biologici, l’equilibrio ossidativo è mantenuto.

In condizioni patologiche invece, questo equilibrio può alterarsi.

Lo squilibrio può essere favorito da un aumento dei radicali liberi per cause fisiche, chimiche o biologiche: in corso traumi per esempio, o di infezioni, di stress, di gravidanza, o durante l’esercizio fisico... in corso di neoplasie, di errato stile di vita o anche per via di cause iatrogene (chemioterapie, radioterapie, raggi x).

Lo squilibrio può essere, però, anche determinato da una diminuzione di antiossidanti in circolo, assunti con la dieta o prodotti dall’organismo stesso. Ciò si potrebbe verificare in caso di malattie cachettiche, malassorbimento, ipovitaminosi, aumento eccessivo dei radicali liberi, o squilibri generali (Schubbel, 2010).

Di conseguenza sia la ridotta assunzione di antiossidanti, il ridotto assorbimento, oppure l’incapacità della loro utilizzazione, o la mancanza di enzimi etc. potrebbe comportare il peggioramento dello stato ossidativo cellulare.

Lo squilibrio danneggia le macromolecole (proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici) e di conseguenza l’ambiente cellulare e extracellulare. Dalla patologia cellulare è immediato il passaggio alla patologia d’organo (Scandalios, 2005).

Lo studio del soggetto e del buon funzionamento dell’organismo risulta un indicatore importante nella valutazione dello “status ossidativo” perché permette di valutare la

capacità antiossidante intrinseca (modi per combattere lo stress) e lo stress ossidativo (come entità di un eventuale danno). Lo stress indotto dal mancato equilibrio non causa direttamente una patologia ma può essere componente essenziale di molte malattie. (Abilés *et al.*,2006)

#### **1.1.4 La patogenesi dello stress ossidativo**

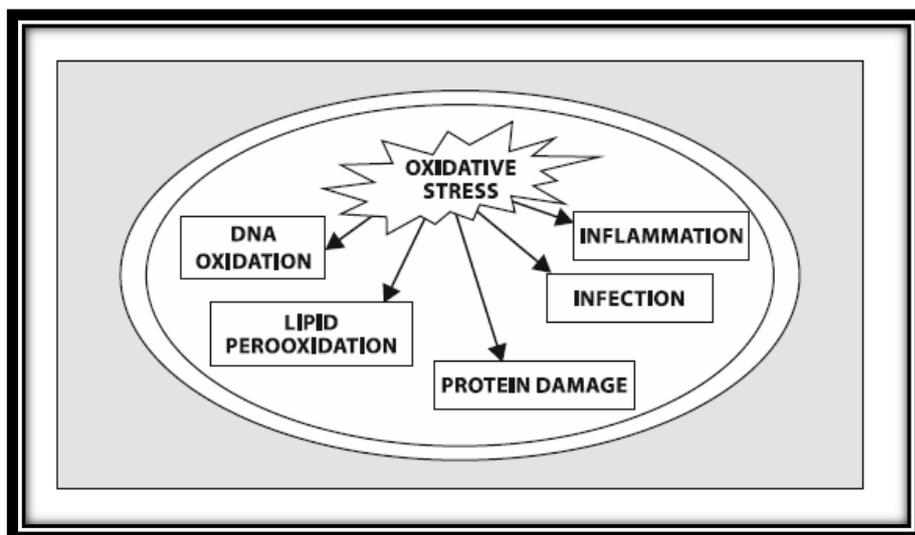
Lo stress ossidativo costituisce un grave rischio per la salute perché fortemente associato, non solo all'invecchiamento precoce, ma anche a una lunga serie di patologie. Purtroppo rispetto a queste patologie, lo stress ossidativo è molto più subdolo da diagnosticare. Esprimendosi a livello molecolare, infatti, non dà luogo a una sintomatologia caratteristica, bensì si cela dietro un quadro clinico della malattia di base. (Iorio, 2004)

Il concetto che le lesioni cellulari provocate dalla produzione dei radicali liberi, determinino la gravità di una malattia, è un fattore importante per la ricerca scientifica e terapeutica.

E' stato stimato che una cellula umana è esposta approssimativamente a 105 insulti ossidativi al giorno da parte di radicali di varia natura (Valko M. et al, 2006).

Nei pazienti in condizioni critiche lo stress ossidativo può indurre risposte infiammatorie, distruzione cellulare e comportare un aumento del tasso di mortalità.

Numerosi studi, susseguiti negli anni, hanno evidenziato una correlazione marcata tra stress ossidativo, sindromi e malattie che colpiscono i pazienti. Per questo motivo è fondamentale una profonda comprensione dei ROS e di come la loro produzione possa influenzare il potenziale redox cellulare, anche per suggerire una corretta ed efficace gestione del paziente ricoverato nell'unità di terapia intensiva. E' necessario stabilire delle misure per monitorare i danni cellulari e arrestarne la propagazione.



**Figura 1:** Meccanismo d'azione dello stress ossidativo sui tessuti (Bedreag et al., 2015)

Un disequilibrio può provare una moltitudine di danni cellulari come:

L'alterazione del DNA nucleare e mitocondriale, la perossidazione lipidica, il danno proteico, l'alterazione glicoproteica e del segnale redox cellulare: (Goodyear-bruch and Pierce, 2002)

➤ **ALTERAZIONE DNA NUCLEARE:**

L'ossidazione delle basi nucleotidiche può determinare mutazione genomica e rottura dello scheletro fosforibosolico. Mentre le rotture dei singoli filamenti possono essere riparate, quelle doppie no, per l'impossibilità della replicazione genica. Aumentano errori sull'appaiamento delle basi nucleotidiche con conseguenti fenomeni mutageni. Se la guanina cross reagirebbe con radicale idrossido darebbe origine all' idrossiguanina, ottimo marker tumorale. Oppure se il radicale idrossido attaccasse la timina la trasformerebbe in glicol-timina, rimuovendola dal DNA e provocando mutazione cellulare (cancerogenicità). Gli ossidanti prodotti dai neutrofili causano mutazioni nel DNA cellulare, aumentando la probabilità di trasformazione maligna in cellule esposte a questi ossidanti.

## ➤ ALTERAZIONE DNA MITOCONDRIALE

Il mitocondrio è un organulo molto suscettibile, in cui si verifica la conversione in anione superossido e/o in perossido di idrogeno con conseguente danno ossidativo. La riparazione è limitata.

## ➤ PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

È una reazione chimica di ossidazione dovuta a radicali liberi contenenti ossigeno molecolare che possono danneggiare le strutture biologiche. È il risultato di numerosi processi fisiopatologici (invecchiamento, ischemie, infiammazioni acute e croniche, tossicità di xenobiotici, etc.) nei quali sono coinvolti direttamente o indirettamente i ROS. Se la perossidazione coinvolge i fosfolipidi delle membrane cellulari, si verificano profonde modificazioni irreversibili nella struttura tridimensionale della membrana stessa, fino alla necrosi cellulare. La reazione che si verifica a livello degli acidi grassi insaturi e polinsaturi sui fosfolipidi di membrana con formazione di perossido di idrogeno. All'inizio si ha un evento a catena, ove il radicale ossidrilico rimuove l'idrogeno da una molecola lipidica nella membrana cellulare, rendendo il lipide un radicale libero che può quindi reagire con un ROS, creando un radicale perossidico. Il radicale perossidico interagisce poi con l'idrogeno di un'altra molecola lipidica. Il difetto di interazione tra lipidi e lipidi o lipidi e proteine potrebbero causare una diminuzione della fluidità di membrana con alterazione componente strutturale e permeabile. Il danno potrebbe essere tenuto sotto controllo se fosse somministrato SOD in giuste quantità, superate le quali si potrebbe avere un peggioramento, conseguente all'azione auto-ossidativa.

## ➤ ALTERAZIONI PER DANNO ALLE PROTEINE

Specie reattive dell'ossigeno modificano gli enzimi ossidando aminoacidi come la lisina, serina, arginina e prolina che sono gli elementi costitutivi di enzimi. Gli enzimi modificati sono inattivi e possono smettere di processi cellulari. Gli enzimi inattivi possono anche indurre lo sviluppo di autoanticorpi.

### ➤ ALTERAZIONI GLICOPROTEICHE

L'alterazione colpisce le proteine del citoscheletro e i canali del calcio e sconvolge l'omeostasi cellulare. Deriva dall'alchilazione (addizione di un gruppo alchilico) di proteine con rottura dei legami peptidici e creazione di ponti disolfuro. Provoca depolimerizzazione dei polisaccaridi di membrana e alterazione fosfolipidica.

### ➤ ALTERAZIONE DEL SEGNALE REDOX CELLULARE

In caso di squilibrio tra produzione e eliminazione di specie chimiche, l'incremento dei radicali liberi può causare cambiamenti nella segnalazione e quindi variazioni attività cellulari come la proliferazione cellulare, apoptosi, regolazione genica, e necrosi.

## 1.2 LO STATO OSSIDATIVO DEL GATTO SANO

In medicina veterinaria sono pochissimi gli studi relativi allo stress ossidativo del paziente felino. Fino ad ora i segni tipici dell'alterazione dell'equilibrio cellulare sono stati studiati solamente nel cane e i risultati ottenuti sono stati poi traslati ai gatti. Diverse ricerche, in passato, hanno dimostrato che la fisiologia e il metabolismo degli individui sono diversi in tutte le specie, perciò potrebbe essere riduttivo ritenere che i meccanismi fisiopatogenetici compresi nel cane, possano essere comparati a quelli del gatto.

È necessario, di conseguenza, conoscere il potenziale redox in un soggetto felino sano e valutarne la predisposizione individuale per poter poi stabilire la relazione tra stress ossidativo e patologia e determinarne la gravità. Al momento ci sono studi che hanno indagato sull'influenza di sesso, età e alimentazione sullo stato ossidativo di gatti sani.

Da un'analisi recente (Castillo et al., 2012), è stato visto che lo stato ossidativo nei soggetti varia rispetto al genere e all'età. Sono stati inclusi in questo studio di popolazione 38 individui sani di proprietà, ai quali è stato prelevato e valutato il siero, tramite l'ausilio del d-ROMS test e dell'OXIGEN ADSORBENT test. L'indagine ha previsto la determinazione delle specie chimiche ossidanti, della capacità antiossidante del siero e del loro rapporto. I soggetti sono stati suddivisi in due gruppi, maschi e femmine, e i due gruppi, a sua volta, in due sottogruppi in base all'età: (gruppo A: 2-7aa; gruppo B: 7-13aa; B1: 7-10aa, B2: 10-13aa = solo femmine). Sono state analizzate le condizioni di salute ed esclusi i soggetti che mostravano segni clinici patognomonic di una qualsiasi malattia. Nel contempo, tutti gli animali hanno ricevuto lo stesso alimento e stessa gestione sanitaria (vaccini, antiparassitari...). Dai risultati è stato concluso che i gatti maschi giovani sono la popolazione a maggior rischio ossidativo. Questi ultimi, infatti, hanno prodotto un maggior numero di specie reattive dell'ossigeno e hanno mostrato un aumento della perossidazione lipidica, rispetto alle femmine. La perossidazione lipidica è un fattore importante per la durata della vita, forse è per questo che nello studio non sono stati trovati maschi sani con più di dieci anni di età. In molte specie, la durata della vita delle femmine è maggiore rispetto a quella dei maschi, e questa potrebbe essere una conferma del fatto che i radicali liberi sono presenti in minor quantità nella popolazione femminile. Negli anziani non c'era differenza nel genere in base alla produzione di ROS. Nemmeno le difese antiossidanti erano molto diverse tra i gruppi, ma è stato osservato un

decremento con l'età che potrebbe influenzare un peggioramento della condizione di salute nel gruppo senior. Nel cane e nell'uomo, anche altri studi (Torodova *et al.*, 2005)(Fano *et al.*, 2001), avevano dimostrato una maggiore suscettibilità dei maschi rispetto alle femmine, ma nel gatto le differenze sono sicuramente più pronunciate.

### **1.2.1 Lo stato ossidativo, la dieta e il BCS:**

Diverse evidenze in letteratura hanno dimostrato che stress ossidativo, dieta e BCS possono essere altamente correlate. In particolar modo nei soggetti felini sia la dieta, sia la condizione di obesità possono influenzare lo stato ossidativo individuale inducendo una risposta infiammatoria. Comprendere questo meccanismo è indispensabile per metter in atto strategie alimentari future in grado di contenere l'insorgenza di anomalie ossidative.

In una ricerca del 2000 furono analizzati, per la prima volta, i livelli di perossidazione lipidica in gatti alimentati a base di pesce crudo. I dati confermavano che l'aumento della perossidazione lipidica in questi gatti era 3-4 volte maggiore di quella di altri, alimentati con mangimi diversi. Questo spiegava che l'assunzione incontrollata di acidi grassi polinsaturi poteva indurre stress ossidativo nei gatti, anche se, qualora la loro somministrazione fosse prolungata nel tempo, si sarebbe potuta instaurare una risposta antiossidante tale da controllare la produzione del radicale libero.

L'aumento di perossido e altri radicali, può essere correlato all'utilizzazione dell'acido lipidico derivato dagli acidi grassi. Nell'analisi furono inclusi 15 soggetti sani alimentati con una dieta a base di solo pesce crudo per 17-30 giorni. Furono fatte delle misurazioni seriali per la valutazione dei radicali prodotti e del potenziale di perossidazione plasmatica. La perossidazione lipidica aumentò notevolmente in questi gatti rispetto al gruppo di controllo e questo poteva essere dovuto esclusivamente alla dieta. Nei soggetti furono poi misurati i livelli di vitamina E che all'inizio della dieta erano bassissimi. In alcuni gatti fu quindi aggiunta la vitamina E, ma questo trattamento non ebbe alcun effetto. In conclusione è stato visto che il supplemento di acidi grassi polinsaturi con l'alimentazione può provocare stress ossidativo. (Momi *et al.*, 2000)

La ricerca ha dimostrato che lo stato ossidativo è influenzato, oltre che dai componenti

della dieta e dalla quantità e dalla composizione degli acidi grassi, dalla produzione di citochine infiammatorie.

In uno studio più recente, recensito dal Comitato etico della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Gand, in Belgio (Verbrugghe et al., 2014), sono stati selezionati 16 gatti sani domestici tra i 3 e i 9 anni, con un normale BCS (5-6/9). I gatti sono stati divisi in due gruppi e nutriti con due modelli dietetici differenti, studiati in precedenza nell'uomo e nei roditori (Calder, 2002) (Basu et al., 2006).

La dieta destinata al primo gruppo (MFn-3) è stata una dieta a moderato contenuto di grassi con strutto di maiale e olio di salmone e alti livelli di antiossidanti (alfa-tocofenolo e selenio). La dieta destinata al secondo gruppo, invece, (HFn-6) aveva un alto contenuto di grassi (strutto di maiale e lardo di pollo) e era povera di antiossidanti rispetto all'altra, nonostante contenesse comunque la quantità minima consigliata per gli adulti. La dieta MFn-3 risultava avere livelli elevati di n-3 PUFA, in particolare l'acido eicosapentaenoico (EPA), docosapentaenoico (DPA) e acido docosaesaenoico (DHA), mentre la dieta HFn-6 conteneva livelli elevati di n-6 PUFA, tra cui l'acido linoleico in particolare (LA).

I gatti sono stati alimentati una volta al giorno, tenendo conto delle esigenze caloriche per non farli aumentare di peso. Gli esami furono effettuati a 2, 4, 6, 8, 10, 12 settimane mediante prelievo ematico con controllo di colesterolo, trigliceridi, acido ascorbico, alfa-tocoferolo, siero amiloide A (SAA) e citochine.

I risultati attesi avrebbero dovuto dimostrare un aumento della risposta infiammatoria nei soggetti alimentati con Hfn-6. Al contrario una maggiore suscettibilità si è mostrata nel gruppo alimentato con MFn-3. Questo poiché i gatti, diversamente dalle altre specie, hanno una migliore capacità di utilizzazione degli acidi grassi e una maggiore tollerabilità per un'alimentazione ricca di questi componenti. La dieta con Hfn-6 contiene il 65% di grassi (70% valore limite ammesso e concesso nella dieta felina) che impedisce la sintesi di SAA, proteina di fase acuta responsabile dell'aumento della risposta infiammatoria. Inoltre nella dieta MNF-3 è stata visto un aumento della perossidazione lipidica, dipendente sia dalla concentrazione di PUFA sia dal tipo di acidi grassi. Questo nonostante il maggiore contenuto di sostanze antiossidanti presenti, nettamente superiori alle dosi previste nel soggetto felino.

In conclusione è stato visto che la modifica quantitativa e qualitativa di determinati componenti nella dieta, le variazioni di percentuali degli acidi grassi e degli antiossidanti possono comportare uno stato infiammatorio relativo nel gatto, grazie alla sua innata

resistenza. Sicuramente è stato visto un aumento notevole di stress ossidativo nei gatti alimentati con diete MNF-3. L'olio di pesce può aumentare la perossidazione lipidica e quindi è da usare con prudenza nelle diete per gatti.

Per quanto riguarda la condizione fisica del soggetto, recentemente in medicina umana, la prevalenza dell'obesità è stata correlata ad una diminuzione degli antiossidanti nel plasma e l'accumulo di grasso è stato equiparato all'aumento dei marcatori di stress ossidativo. A sua volta, lo stress ossidativo è stato collegato ad un alto indice di massa corporea (BCS) (Wonisch et al., 2012), correlato, al contempo, allo stato infiammatorio di un soggetto (Codoñer-Franch et al., 2011).

L'obesità è una condizione che si verifica nel 50% di cani e gatti tra i 5 e i 10 anni di età. È dovuta ad un eccesso di deposito dei grassi nel corpo per assunzione di più calorie del necessario con la normale dieta. L'obesità è correlata allo stress ossidativo nel cane (Laflamme *et al.*, 2012) e nell'uomo (Bastard *et al.*, 2002) e può portare ad una serie di patologie infiammatorie come lo sviluppo di diabete o osteoartrite, lipidosi epatica o mortalità precoce.

In generale, succede che l'incremento del ciclo di Krebs genera un eccesso di ROS in corrispondenza di un aumentato apporto calorico e di una diminuzione della spesa di energia. Questo squilibrio energetico porta allo stoccaggio di ATP in eccesso negli adipociti, con conseguente ipertrofia e iperplasia, associata ad una anomalia della loro funzione. Nel meccanismo adipogenetico è coinvolta la differenziazione dei pre-adipociti in adipociti maturi e secernenti, che rilasciano un gran numero di citochine, denominati "adipochine". Inoltre, l'ingrandimento degli adipociti nel deposito di grasso induce un'ipossia tissutale e un ulteriore aumento di secrezione di citochine infiammatorie. L'attivazione delle vie di segnalazione infiammatoria concorre ad aumentare la generazione di ROS. Anche se lo stress ossidativo è considerato il meccanismo di base con cui si verifica una disfunzione del metabolismo in soggetti obesi, ci sono ancora pochi studi sia in soggetti felini (Tanner et al., 2007) che canini (Laflamme, 2012).

In medicina veterinaria gli studi sul cane hanno evidenziato che lo squilibrio ossidativo è scaturito dall'aumento dei valori del d-ROMs e dalla riduzione di BAP e retinolo. I parametri infiammatori analizzati in 12 cani obesi, alimentati con specifiche diete, non erano cambiati in relazione al peso corporeo ma, all'alterazione dello stato ossidativo,

poteva essere concomitante all'insorgenza di infiammazione. Il ruolo dello stress ossidativo e di integrazione con antiossidanti dovrebbe essere presa in particolare considerazione nel trattamento dietetico nei soggetti in sovrappeso (Pasquini et al., 2013). Mentre nei gatti, uno studio recente, ha valutato la relazione tra dieta e stress ossidativo in individui sani che sono stati fatti volontariamente aumentare di peso e il modo in cui l'obesità in questi gatti potesse influenzare l'insorgenza di alcune patologie.

In questa ricerca sono stati arruolati venti gatti sani castrati, fatti ingrassare gradualmente, offrendo loro cibo *ad libitum*. Le analisi individuali sulla misura dei livelli di glucosio e insulina e sulle percentuali di massa grassa sono state effettuate al giorno 0, 30, 60, 100. Tutti i gatti hanno raggiunto il 60% del peso corporeo, per alcuni si è avuto un aumento del 100%. I gatti sono stati divisi in due gruppi: prima del trattamento sono stati tutti alimentati con lo stesso mangime commerciale e durante il trattamento si differenziarono in quelli a cui fu somministrata una dieta a base di antiossidanti e in quelli che non li avevano ricevuti.

La temperatura è stata mantenuta costante, i gatti sono stati fatti socializzare e il peso prima dell'inizio del trattamento era più o meno simile.

L'obiettivo dello studio è stato quello di dimostrare come i gatti differiscono dalle altre specie, in materia della loro capacità antiossidante enzimatica e del tipo di citochine durante lo sviluppo di obesità.

I gatti obesi, come le persone obese, mostrano un aumento della suscettibilità allo sviluppo di alcune malattie come, per esempio, il diabete. Nei gatti però, al contrario di quello che accade nelle persone, lo sviluppo di malattie cardiovascolari e aterosclerosi non sono correlabili a questa patologia. È stato ipotizzato che il motivo sia dovuto alla mancata stimolazione di un'adeguata risposta infiammatoria da parte degli adipociti del gatto che di conseguenza non attiva determinate citochine. Questo accade nonostante i gatti abbiano una dislipidemia caratterizzata da diverse anomalie che riguardano sia la quantità di lipoproteine, sia le dimensioni. I gatti obesi hanno più grandi particelle VLDL rispetto ai gatti magri, e hanno un numero più elevato di LDL e HDL. Nei roditori e nell'uomo l'accumulo di lipidi negli adipociti aumenta notevolmente le specie reattive dell'ossigeno (Bastard *et al.*, 2006) e questo è stato verificato anche nel gatto.

Lo stress cellulare, inoltre, comporta la secrezione di citochine pro-infiammatorie come ATNF (fattore di necrosi tumorale), IL-6 e IL-1... Nel frattempo le cellule immunitarie, tra cui monociti e macrofagi, sono reclutati dal tessuto adiposo a produrre molte delle stesse citochine, aumentando ulteriormente lo stress ossidativo e ciò permette l'instaurarsi

di un circolo vizioso. Allo sviluppo dell'obesità e alla resistenza all'insulina può essere correlata l'attività di due citochine come l'adiponectina e la lectina. Esse rappresentano il punto di partenza nella relazione tra stress ossidativo e infiammazione. La lectina ha un effetto positivo mentre l'adiponectina ha un effetto negativo sulla resistenza all'insulina. La lectina ha un effetto pro-infiammatorio, segnala la sazietà e aumenta il metabolismo basale. L'adiponectina diminuisce con l'obesità e aumenta con la perdita di peso ed ha effetti antiinfiammatori potenti.

I ROS nel tessuto adiposo contribuiscono a reprimere il gene della adiponectina (Fruebis *et al.*, 2001).

La valutazione in questi gatti delle citochine infiammatorie prodotte con l'obesità ha consentito un'indagine sull'aumento della resistenza all'insulina, l'aumento della resistenza del glucosio e la caratterizzazione del marker di stress ossidativo sono stati oggetto di questo studio. L'analisi dei lipidi della dieta non ha avuto alcun effetto sul colesterolo basale plasma, trigliceridi e NEFA. Dall'analisi di catalasi, glutazione perossidasi, e l'attività superossido dismutasi nei globuli rossi (RBC) si è visto che la dieta non ha avuto effetto sull'attività enzimatica e non vi era alcuna differenza significativa tra i gatti con l'aumento del peso corporeo. Si è visto, inoltre, aumento di lectina e diminuzione della adiponectina. La dieta non ha avuto alcun effetto sulle concentrazioni di citochine. I ROS sono stati implicati nello sviluppo di insulino-resistenza e di altre malattie metaboliche legate all'obesità delle altre specie, nelle quali l'aumento dei ROS ha comportato una diminuzione della attività di enzimi antiossidanti quali glutazione perossidasi, Cu, Zn superossido-dismutasi (SOD), e catalasi. Nei gatti questo non si è verificato. Indipendentemente dal meccanismo, l'associazione tra obesità e marcatori di stress ossidativo è stata confermata in specie diverse, tra cui cani e gatti. (Laflamme, 2012) Questo, in conclusione, è il primo studio longitudinale che esamina i cambiamenti fisiologici, ormonali e biochimici e durante lo sviluppo di obesità nei gatti. In sintesi, è stato dimostrato che lo sviluppo di obesità non porta agli stessi cambiamenti nei marcatori e l'attività degli enzimi antiossidanti che si vede in altre specie. Questo può spiegare il fatto che i gatti obesi non sviluppino problemi cardiovascolari che si trovano nelle persone. Dieta contenente antiossidanti non hanno influenzato nessuno dei parametri che sono stati studiati. Stress ossidativo e resistenza all'insulina sono estremamente correlati. (Hoenig *et al.* 2013). Recentemente è stato visto che il supplemento di vitamina E e Selenio, pari a 225 mg/kg con la dieta, sono indispensabili nel miglioramento del sistema immunitario dell'individuo felino. (O'Brien *et al.*, 2015)

### 1.2.2 Lo stato ossidativo e l'invecchiamento:

In uno studio del 2006 Campbell e Heaton hanno cercato di determinare la misura del danno ossidativo indotto dall'anzianità, delle complicanze relative all'apoptosi cellulare e ai processi mitogeni in gatti anziani.

Nello studio è stata selezionata una popolazione di 36 gatti sani dai 2 ai 14 anni. Tutti i gatti sono stati alimentati con una stessa dieta ad un livello energetico che ha permesso di mantenere costante il peso corporeo dei soggetti. Ogni gatto era sottoposto ad analisi che comprendevano la coltura dei linfociti T, la loro numerazione e la valutazione della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e della capacità di replicazione. L'analisi dei linfociti e la fenotipizzazione dei linfociti T è stata determinata con la citometria e utilizzo del marcatore CD51.

Per la coltura dei linfociti su sangue periferico è stato utilizzato il prelievo in eparina, mentre per la valutazione della proliferazione cellulare sono stati utilizzati due agenti mitogeni come la concanavalina A ottimizzata (Con A, 10 mg / L) o la fitoemoagglutinina (PHA; 9 mg / L).

I risultati hanno rilevato che il numero dei linfociti T è diminuito nei soggetti anziani rispetto agli adulti, che la risposta proliferativa agli agenti mitogeni è stata maggiore per il gruppo adulti che hanno risposto positivamente al trattamento con ConA, mentre l'apoptosi cellulare si è verificata in entrambi i gruppi allo stesso modo. In conclusione si può dire che lo stress ossidativo nel soggetto anziano lo rende maggiormente suscettibile alle patologie poiché provoca un indebolimento della risposta immuno-mediata. Questi risultati però suggeriscono solo alcune prime osservazioni di ridotta risposta proliferativa a mitogeni di cellule T con l'invecchiamento che, nei mammiferi, possono essere attribuibili ad abbassamento del numero delle cellule T piuttosto che alla senescenza replicativa o altre disfunzioni cellulari. I dati provenienti da questo studio non suggeriscono che le cellule di gatto, di 10- 14 anni, mostrano un aumento della suscettibilità all'apoptosi spontanea o ossidativa indotta. Risultati simili a quelli di questo studio sono stati descritti nei linfociti derivati da cani Labrador di dieci anni, dove si è riscontrato che, sebbene il numero dei linfociti sia diminuito con l'età, la popolazione residua continua a rispondere alla stimolazione. Molti studi erano già stati fatti nel cane, questo è il primo studio fatto sul gatto. (Campbell *et al.*, 2006).

Un'ulteriore ricerca è stata poi condotta per la valutazione del danno cellulare in leucociti

felini e canini da parte delle specie chimiche reattive in corso di infiammazione e invecchiamento. Molti processi degenerativi associati ai processi di invecchiamento cellulare, infatti, avevano implicato un coinvolgimento ossidativo da parte dei ROS con conseguenti alterazioni genetiche. Sono stati raccolti i leucociti di gatti e cani sani, regolarmente vaccinati, e sono stati sottoposti a trattamenti con perossido di idrogeno al fine di indagare sulle concentrazioni minime tollerate dall'organismo in grado di escludere il danno. La scelta dell'utilizzo di perossido di idrogeno è stata conseguente al fatto che questa molecola è potenzialmente pericolosa e comporta lesioni significative come mutazioni geniche e alterazioni cromosomiche. È stato visto che le concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grado di indurre un'alterazione significativa erano circa 100 mol/L. La determinazione di un metodo efficiente è stato un passo avanti importante nella ricerca scientifica per l'individuazione dei biomarker di stress ossidativo. Il metodo COMET (ELETTROFORESI unicellulare SU GEL) è un metodo semplice, sicuro, sensibile e rapido. Riesce a rilevare e quantificare l'eventuale danno al DNA dalla rottura dei filamenti, o dai siti di riparazione aperti, dai siti di legame di ogni singola cellula. Il test è stato studiato anche per la valutazione della dieta sul danno al DNA. Misurare con precisione il danno ossidativo da parte dei radicali liberi resta uno degli obiettivi più importanti da raggiungere per poter in seguito elaborare un intervento dietetico adeguato al fine di limitare tali danni. (Heaton *et al.*, 2002).

Il danno ossidativo ottenuto con l'invecchiamento può portare ad un peggioramento o compromissione della condizione cognitiva del soggetto, e questo è stato dimostrato nella ricerca di Landsberg nel 2012 (Landsberg *et al.*, 2012). Negli animali infatti, con il progredire dell'età, si può assistere ad un declino della salute e del benessere, che sia anche comportamentale, noto come disfunzione cognitiva. Spesso i proprietari conducono dal veterinario i loro animali che mostrano una sintomatologia aspecifica, lieve, con cambiamenti nel loro comportamento.

I sintomi clinici includono disorientamento, alterazioni nelle interazioni sociali, o dei cicli sonno-veglia, cambiamenti di abitudini, mancanza di attività fisica, deficit di apprendimento e di memoria. Questi sintomi possono essere ricondotti a quelli documentati nella malattia del Morbo di Alzheimer dell'uomo (McKhann *et al.*, 2011) a cui sono strettamente collegati.

Il trattamento ha lo scopo di rallentare l'avanzamento del danno neuronale e la morte cellulare e migliorare i segni clinici. I farmaci, dieta e integratori possono essere usati da soli o in concomitanza per migliorare la neurotrasmissione e ridurre il danno ossidativo e

l'infiammazione responsabili di tale condizione.

Nei gatti, le patologie correlate all'età includono perdita neuronale, atrofia cerebrale, ampliamento dei solchi cerebrali, etc (Gunn-Moore et al., 2007).

Cambiamenti perivascolari, comprese microemorragie o infarti nei vasi periventricolari, sono riportati in cani e gatti anziani, e possono contribuire a segni di sindrome da disfunzione cognitiva (Dobson et al., 2011). Con l'aumentare dell'età, vi è un aumento specie reattive dell'ossigeno che portano al danno ossidativo nei cani e nei gatti. Sono riportati nei cani per esempio incrementi dell'attività della mono amino-ossidasi B, un enzima che può aumentare la catalisi di dopamina con successivi aumenti di radicali liberi. (Head et al., 2002)

## 1.3 LO STRESS OSSIDATIVO DEL PAZIENTE CRITICO:

### Medicina Umana e Veterinaria a confronto

I radicali liberi prodotti dal metabolismo cellulare sono coinvolti in numerose patologie croniche e legate all'invecchiamento, ma anche in molte patologie acute, di carattere infiammatorio. (Babior, 2000)

Pazienti politraumatizzati, pazienti septic, pazienti con distress respiratorio, pazienti colpiti da ischemie come ictus o infarti miocardici, etc. possono presentare modificazioni delle sostanze pro-ossidanti e anti-ossidanti normalmente presenti in circolo. (Baror et al., 2015)

Lo stress ossidativo è stato valutato nelle persone in molte malattie tra cui l'ipertensione polmonare (Bowers *et al.*, 2004) l'ischemia e ri-perfusione (Liu et al. 1994) il trauma contusivo (Gokdemir *et al.*, 2012) la polmonite (Duflo *et al.*, 2012), l'ARDS (Quinlan *et al.*, 1997) etc. Molti degli stessi processi patologici possono essere causa di stress ossidativo anche nei cani, tra cui anemia emolitica immuno-mediata (Pesillo *et al.*, 2004), l'esercizio fisico prolungato (Baskin *et al.*, 2000) la malattia del motoneurone (Green *et al.*, 2001), le malattie del fegato (Cetner *et al.*, 2002) la GDV (Walker et al., 2007), la gastroenterite da parvovirus (Panda *et al.*, 2009), patologie infiammatorie (Pavlica *et al.*, 2004), patologie infettive (Jacobson *et al.*, 2002) (Kiral *et al.*, 2005) etc.

Per quanto riguarda il gatto, ad oggi, lo stress ossidativo è stato individuato in varie malattie croniche come il diabete mellito (Webb and Falkowski 2009), l'insufficienza renale cronica (Keegan and Webb 2010) oppure ad alcune malattie del fegato (Center *et al.*, 2002), steatosi/steatite (Fytianou *et al.*, 2006) etc.

Sul paziente critico acuto i pochi studi (Webb et al., 2008; Tecless et al., 2015; Sogawa et al., 2010; Fytianou et al., 2005; Branter et al., 2012; Varzi et al., 2007; Binder et al., 2005) finora condotti hanno analizzato il modo in cui i radicali liberi possano incidere sulla condizione morbosa individuale ed essere un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza di un soggetto felino. Il gatto è una delle specie più sensibili alla condizione di danno ossidativo e in molti hanno dedotto che il motivo sia dovuto ad una particolare struttura della milza, che poi spiegheremo in seguito (Christopher et al., 1995).

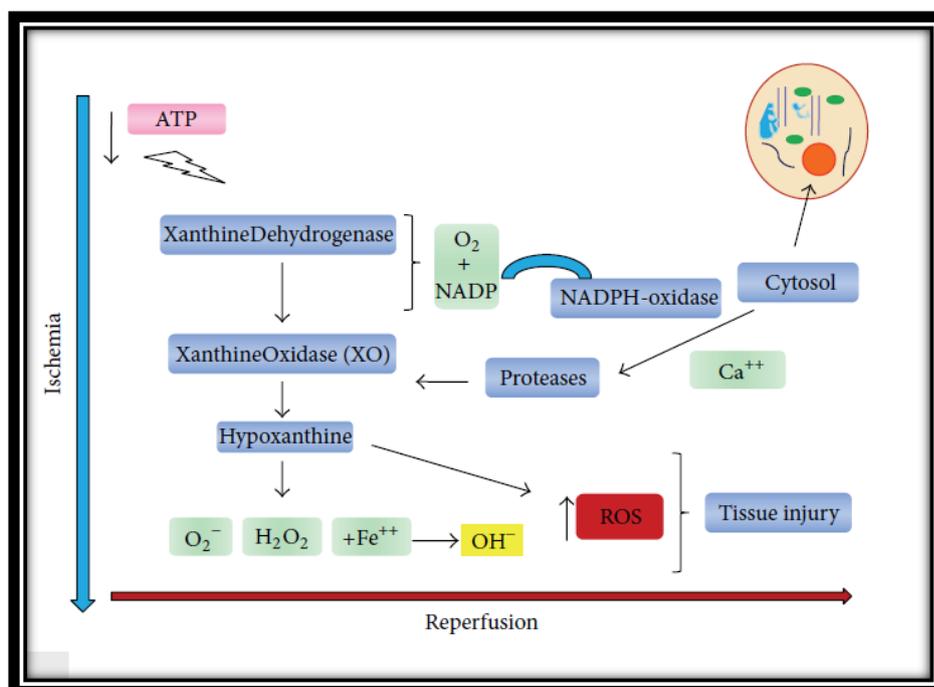
### 1.3.1 IL PAZIENTE CRITICO: il ruolo dei ROS e degli ANTIOSSIDANTI

Come precedentemente accennato, in seguito ad un danno tissutale, possono aumentare notevolmente le sostanze pro-ossidanti nel circolo sanguigno che non riescono ad essere bilanciate da quelle antiossidanti.

Nella maggior parte dei pazienti, ricoverati nell'unità di terapia intensiva, i mediatori accumulati, durante una risposta infiammatoria, possono esacerbarla ad un punto tale fino a diffonderla a tutto il corpo. Neutrofili, eosinofili, leucociti e altre cellule del sistema immunitario vengono richiamati nei tessuti danneggiati e, producendo radicali liberi, alterano l'equilibrio tissutale. In seguito ad un insulto quindi la produzione delle specie chimiche reattive è accelerata e si assiste a diversi effetti devastanti per la cellula; inoltre a seconda del tipo di mediatore che viene liberato si può valutare l'entità della risposta infiammatoria. Tale risposta diventa estremamente importante quando si studiano le relative complicanze, soprattutto in caso di pazienti politraumatizzati: l'endotossitemia, l'attivazione del complemento, le citochine, i metaboliti dell'acido arachidonico, gli enzimi lisosomiali, l'istamina, l'ossido nitrico e altri mediatori derivati dall'endotelio, sono i partecipanti più aggressivi dello scompenso dello stato clinico del paziente. (Bedreag *et al.*, 2015)

Oltre a questi anche la condizione di ischemia-riperfusionem risulta essere causa di scompenso. Durante un'ischemia, uno shock emorragico o estrema ipotensione si verifica un aumento della demolizione delle basi nucleotidiche puriniche. L'adenosina viene convertita in inosina, poi in ipoxantina, ossidata prima a xantina poi a acido urico dall'enzima xantina deidrogenasi. L'enzima xantina deidrogenasi diventa xantina ossigenasi e genera perossido di idrogeno, anione perossido e anione superossido in minima parte. Quest'ultimo attiva a sua volta citochine superossido-dipendenti che richiamano chemiotatticamente i neutrofili, responsabili dell'aumento ulteriore di ROS. (Goodyear-Bruch and Pierce, 2002)

In molti pazienti una rianimazione con fluidi aggressivi e non idonei potrebbe produrre elevate quantità di specie reattive attraverso la re-ossigenazione dei tessuti. Ogni volta, perciò, che avviene la riperfusionem del tessuto, aumentano le reazioni di xantina ossidasi. (Takasu *et al.*, 2011)



**Figura 2:** Produzione di specie chimiche reattive dell'Ossigeno in corso di Ischemia-Riperfusione (Ferrari and Andrade, 2014)

Il problema dello stress ossidativo non riguarda solo l'iperproduzione di specie chimiche reattive ma interessa anche il difetto di un loro effettivo tamponamento. Questo tamponamento deve avvenire per mezzo di sostanze antiossidanti endogene che, in genere, subiscono un decremento significativo in corso di patologia sistemica.

Nei pazienti umani, ricoverati in terapia intensiva, si assiste ad una significativa diminuzione di glutazione, cisteina, acido ascorbico e l'esaurimento antiossidante può essere correlato ad un difficile esito clinico positivo. (Cowley et al., 1996)

Il glutatione, un tiolo tri-peptide, svolge un ruolo chiave nel mantenimento dell'equilibrio intracellulare ossidativo in tutte le cellule del corpo. La forma ridotta del glutatione (GSH) determina in larga misura la capacità delle cellule di eliminare radicali liberi potenzialmente dannosi, specie reattive dell'ossigeno e sottoprodotti metabolici. (Jones, 2002)

La cisteina, un aminoacido solfuro abbondante nei liquidi extracellulari, funziona come un antiossidante diretto limitando la sintesi di GSH. (Dickinson and Forman, 2002)

L'ascorbato è un scavengers diretto, previene i danni di membrana e costituisce la prima linea di difesa per gli ossidanti derivati dai neutrofili. (Parker et al., 1979)

Lo studio della concentrazione di tali enzimi nel plasma umano ha permesso di verificare la correlazione tra deficienza antiossidante e patologie sistemiche. Deficienze di glutatione, ed esempio, sono emerse i pazienti con infezioni da retrovirus (Willcox et al., 2004), sepsi (Lyons et al., 2001) o pancreatite (Rahman et al., 2004); deficienze di cisteina sono emerse in coliti ulcerative (Ramakrishna et al., 1997) o sindromi respiratorie (White et al., 1994); deficienze di ascorbato sono emerse in patologie sistemiche e autoimmuni. (Willcox et al., 2004)

In uno studio del 2009, Viviano et al., decisero di verificare l'ipotesi anche in veterinaria e valutare se un uguale esaurimento antiossidante potesse influire negativamente sulla condizione clinica dei ricoverati.

Lo scopo dello studio fu quello di determinare le differenze specie specifiche sulla variazione di enzimi antiossidanti in cani e gatti malati rispetto ai controlli sani.

Per farlo era necessario caratterizzare le concentrazioni di antiossidanti quali GSH, cisteina plasmatica, e ascorbato per valutare l'associazione tra deplezione antiossidante con l'età, con la durata della malattia, con il grado di disappetenza, con la gravità della malattia e infine con la sopravvivenza.

Tali reperti aiuterebbero anche a discriminare tra le popolazioni di cani e gatti malati, quali sarebbero con più probabilità in grado di beneficiare di terapia antiossidante, e a fornire la base per i futuri studi prospettici.

Furono selezionati per questo studio cani (n 61) e gatti (n 37) clinicamente malati e cani (n 37) e gatti (n 33) sani.

I soggetti esclusi furono tutti quelli che avevano già ricevuto supplementi antiossidanti o che avevano avuto trasfusioni di sangue negli ultimi due mesi. Attraverso un metodo prospettico, osservazione e studio caso-controllo furono valutati, tramite cromatografia liquida (HPLC), i quantitativi antiossidanti plasmatici di glutatione, cisteina e acido ascorbico. Fu inoltre analizzata la condizione clinica generale degli animali mediante informazioni di segnalamento, anamnesi e ulteriori indagini diagnostiche. Per i cani e i gatti malati, effetti da patologie a carattere acuto e cronico, furono registrati i seguenti dati supplementari: durata della malattia, la durata di anoressia o di inappetenza, diagnosi clinica, giorni di ricovero, e l'esito clinico in termini di sopravvivenza alla dimissione dall'ospedale. Ogni animale, prima del campionamento è stato classificato in un gruppo avente malattia a carattere lieve, moderata o grave tramite sintomi, esami di laboratorio e diagnostici, il grado di coinvolgimento sistemico e complicazioni secondarie. Il gruppo

“malattia lieve” era costituito da pazienti con minima sintomatologia, assenza di segni di malattia sistemica, o complicazioni secondarie, e una prognosi eccellente a breve termine. Cani e gatti in questo gruppo sono stati trattati su una base ambulatoriale. Questo gruppo comprendeva anche i gatti FIV-positivi con gengiviti, otiti, o infezioni respiratorie autolimitanti. Il gruppo “malattia moderata” era composto da animali con segni di malattia sistemica e/o complicazioni secondarie, e una buona prognosi a breve termine, ricoverati in ospedale. Il gruppo “malati critici” era composto grave di cani e gatti con diversi segni clinici, segni di malattia sistemica e/o gravi complicazioni secondarie, con prognosi infausta a breve termine. Furono valutate le analisi emato-biochimiche e lo status individuale del paziente, il tutto fu poi correlato alla quantificazione di antiossidanti. I cani selezionati avevano malattie di diversa origine: neoplastica, infettive, cardio-circolatorie, gastro-enteriche, quadri localizzati o sistemici, quadri settici o assenza di sepsi. I gatti inclusi avevano quadri patologici simili a quelli canini, ma erano in numero nettamente inferiore.

Per quanto riguarda i pazienti sani è stato visto che nel cane sano, i livelli di tutti e tre questi antiossidanti in circolo, sono significativamente maggiori rispetto al gatto sano. L’analisi statistica su sesso, età e razza all’interno della singola specie però non aveva mostrato un coefficiente di probabilità significativo tra i gruppi, nonostante il gruppo sani fosse costituito da soggetti più giovani. Nemmeno nell’analisi tra animali castrati e interi aveva dato delle differenze significative nei pazienti di entrambe le razze.

Per quanto riguarda gli animali malati inclusi nello studio, i risultati ottenuti furono diversi nelle specie.

Nel cane malato, ad esempio, come nell’uomo, si è verificato un brusco calo dei livelli di antiossidanti. La deplezione, specialmente di glutazione, poteva essere correlata sia alla gravità della malattia, sia alla mortalità durante il ricovero. Per esempio è stato visto che nei cani con insufficienza cardiaca congestizia i livelli eritrocitari di glutazione erano statisticamente diminuiti. La concentrazione media GSH poteva essere anche correlata all’età in misura minore rispetto alla malattia.

I gatti con “malattia lieve” erano gatti clinicamente stabili con infezione da FIV, insufficienza renale cronica, ipertiroidismo, e rinite; il gruppo con “malattia moderata” includeva gatti con pancreatite, cardiomiopatia ipertrofica, linfoma, e lipidosi epatica; e quello con “malattia critica” comprendeva gatti con linfoma gastrointestinale, malattia epato-biliare, pancreatite acuta, e patologie infiammatorie gastro-enteriche. In questa

popolazione, numericamente inferiore rispetto a quella canina, sono state valutate differenze significative rispetto alle altre specie specialmente per quel che riguarda la concentrazione antiossidante: per esempio, le concentrazioni di GSH non erano diverse tra SANO/MALATO e nemmeno rispetto all'età, contrariamente a quanto si verifica nel cane e nell'uomo.

Nei pazienti felini si verificò però qualcosa di inaspettato e inspiegabile, ovvero i livelli di ascorbato furono notevolmente aumentati rispetto ai controlli. Questo nei cani si era verificato solo in quelle malattie in cui si aveva una risposta esacerbata compensatoria allo stress. L'aumento di acido ascorbico nei gatti si verificò specialmente nei FIV+, cosa che invece nelle persone HIV+ risulta diminuito significativamente. È possibile che i gatti o up-regolano la sintesi ascorbato o alterano il suo metabolismo durante la malattia.

Altri possibili meccanismi che potrebbero contribuire ad un aumento delle concentrazioni di ascorbato durante la malattia dei gatti potrebbero includere un aumento del riciclo, una diminuzione del consumo, o una diminuzione della sua degradazione.

Inoltre nei felini non c'erano differenze tra sani e malati nella concentrazione di GSH e di cisteina. Sicuramente il paziente felino risponde in modo diverso allo stress ossidativo, rispetto a cane e uomo ma tale concetto merita un approfondimento.

Questo studio è stato importante per capire la variazione antiossidante in risposta alla gravità della malattia, diversa nel soggetto felino rispetto al cane, ma altri sono indispensabili per correlarla ai marker di stress ossidativo, che qui non vengono presi in considerazione, e indagare sull'utilità della terapia antiossidante nei gatti. Infatti capire l'incidenza dello stress ossidativo sulla deplezione di glutatione e di altri antiossidanti potrebbe essere utile per spiegare le differenze specie-specifiche e i meccanismi di risposta compensatoria.

L'eterogeneità dei gruppi, il piccolo numero dei soggetti, specialmente dei gatti, ha reso difficile nello studio ottenere altre significatività statistiche, anche per i diversi gradi e le diverse durate/variabilità delle malattie stesse. Nonostante questi limiti, questo studio ha fornito un'ottima valutazione preliminare per dare il via ad altre indagini sull'argomento (Viviano *et al.*, 2009)

### 1.3.2 Lo Stress Ossidativo e le patologie del paziente critico:

## Medicina Umana e Veterinaria a confronto

#### ☑ ARDS, SIRS, SEPSI, MODS

Da uno studio in medicina umana del 1999 (Gutteridge et al., 1999), emerse che la maggior parte (circa il 50%) dei decessi di pazienti critici ricoverati nell'unità di terapia intensiva erano riconducibili alla sepsi e alle sue sequele: ARDS (sindrome distress respiratorio acuto), SIRS (sindrome da risposta infiammatoria sistemica) e shock settico. Clinicamente queste malattie si manifestano con ipotensione sistemica, vasodilatazione refrattaria, ipertensione polmonare e disordini vascolari. Molto frequentemente queste manifestazioni si trovano nei pazienti politraumatizzati.

Le patologie vascolari di ARDS, SEPSI E SIRS sono estremamente correlate allo stress ossidativo. Esse hanno inizio infatti attraverso la produzione incontrollata di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) che modulano l'adesione delle cellule infiammatorie e provocano lesioni dirette al endotelio. Qualora la risposta risultasse sovra espressa, si potrebbe avere una diffusione sistemica della patologia fino al coinvolgimento organico generale (MODS). La MODS comporta un danno endoteliale tale da attivare la cascata della coagulazione, consumarne i fattori, fino all'esaurimento e all'insorgenza di emorragie diffuse (coagulazione intravasale disseminata: CID).

(Arlati *et al.*,2007)

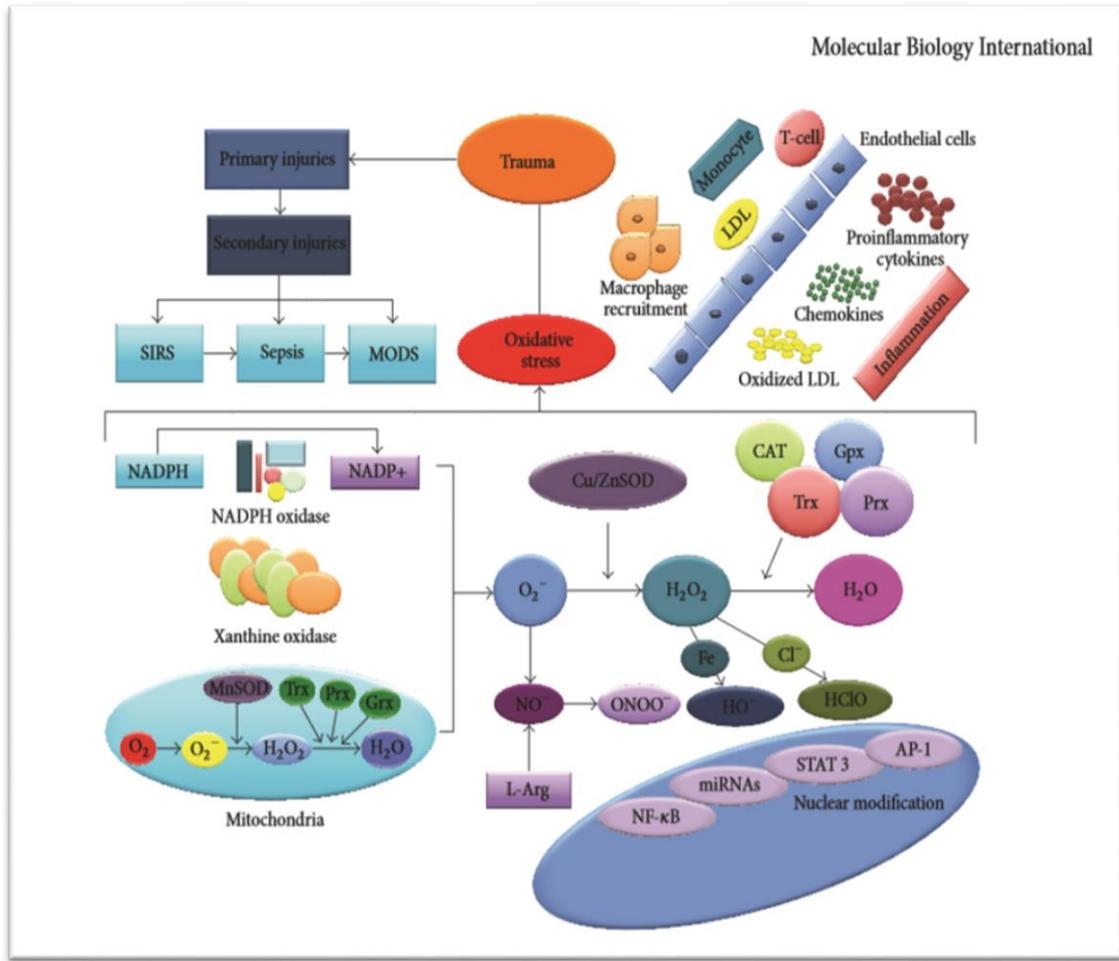


Figura 3:

Rappresentazione schematica (Pupurica et al., 2015) dello stress ossidativo nel paziente critico politraumatizzato. Il trauma primario induce una serie di lesioni secondarie dovute a squilibri biologici e biochimici. L'effetto primario comporta SIRS, seguita da sepsi, e infine da MODS.

L'inflammatione generata dall'azione dei polimorfonucleati, come conseguenza di un ipermetabolismo, mantiene e aumenta lo stress ossidativo. I mitocondri producono quantità significative di anione superossido. I radicali liberi prodotti a livello cellulare vengono neutralizzati dal numero di sistemi enzimatici antiossidanti, come SOD, CAT, Trx, Gpx, e Prx. (Nogales et al., 2013) (Lee et al., 2014)

Vediamo in seguito, quali sono i meccanismi patogenetici che correlano queste condizioni allo stress ossidativo, ampiamente studiati in umana, con accenni, ove presenti, delle ricerche effettuate a tale proposito in medicina veterinaria.

## -ARDS

Secondo la definizione OMS, la **ARDS** è un danno diffuso dell'endotelio capillare alveolare determinante una grave insufficienza respiratoria con ipossiemia arteriosa refrattaria alla somministrazione di ossigeno. Può essere associata a una molteplice varietà di concause che spesso non coinvolgono direttamente il polmone. Così, ARDS può derivare da condizioni cliniche diverse come sepsi, aspirazione gastrica, politrauma, pancreatite, emorragia, shock, ustioni gravi, tossicità da ossigeno, e bypass cardiopolmonare.

La maggior parte dei pazienti ricoverati affetti da ARDS sono individui politraumatizzati che riportano lesioni polmonari dovute a traumi toracici, a contusioni polmonari o secondari a una malattia polmonare. (Campbell, 2011)

I dati registrati nel Registro DGU (Germania), e presentati da Huber et al., (2014) evidenziano un alto tasso di mortalità con pazienti traumatizzati polmonari: 17,5% (16,5% maschi e 20,5% femmine). In studi retrospettivi di gruppo (2002-2011) il 48% erano pazienti con contusione polmonare, il 39% presentavano pneumotorace, il 28% emotorace, il 12% lacerazioni polmonari, il 3% lesioni dei vasi del torace.

In condizioni di ARDS si verifica un cambiamento dell'equilibrio redox cellulare. Avremo infatti da un lato una produzione incontrollata di ROS, RIS e RNS che porta a danno molecolare acuto accompagnato da disturbi profondi sulla biochimica cellulare come denaturazione proteica, depolimerizzazione dei polisaccaridi e destabilizzazione della struttura cellulare e interstiziale; la proliferazione, l'apoptosi e la necrosi cellulare vengono quindi compromesse. Dall'altro lato si ha una ridotta risposta antiossidante sia primaria che secondaria.

La funzione antiossidante primaria è esplicita dalla diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di transferrina e ceruloplasmina. Questi composti sono in grado di legare il ferro libero, o altri metalli, nel plasma per non farlo partecipare alle reazioni radicaliche.

I composti ferro- legati hanno potere antiossidante.

La capacità antiossidante secondaria fu valutata su glucosio, acido urico, bilirubina, acido ascorbico, vitamina E e tioli, ed anche questi composti sono stati misurati e sono diminuiti nei pazienti con ARDS. Negli stessi soggetti altri antiossidanti come la glutazione perossidasi sono rimasti invariati mentre catalasi e superossido dismutasi sono aumentate. Questi risultati erano stati dimostrati nello studio sperimentale del 2002 di Lang et al. (Lang *et al.*, 2002) in soggetti con ARDS senza insufficienza multiorgano.

Le manifestazioni di ARDS sono state studiate anche in medicina veterinaria poiché la disfunzione respiratoria si verifica comunemente pazienti critici canini e felini ed una diagnosi precoce di compromissione polmonare, accompagnata da una terapia aggressiva, può consentire un aumento della sopravvivenza. Le complicanze più comuni di ARDS includono la sindrome acuta da distress respiratorio canino, polmonite batterica, e malattia tromboembolica.

Nei cani affetti, le fasi iniziali della sindrome iniziano con una significativa perdita vascolare essudativa diffusa, con infiltrazione di neutrofili e macrofagi nel polmone. Questi cambiamenti sono accompagnati da un versamento di liquido ricco di proteine negli alveoli, e presenza di edema polmonare. Mentre l'infiammazione è in corso, iniziano i primi tentativi di riparazione da parte del tessuto polmonare, con proliferazione pneumociti di tipo II, formazione di membrane ialine all'interno alveoli, si ha inoltre consumo di surfattante, collasso e atelettasia polmonare. Dopo di che, con il progredire dell'infiammazione, si ha fibrosi interstiziale per via dei tentativi di riparare il tessuto danneggiato. Le alterazioni infiammatorie nei polmoni possono essere irregolarmente distribuite, e interessare specialmente le aree ventrali. Negli animali più gravemente colpiti, le lesioni sono profonde e conducono a ipossia grave refrattaria a somministrazione di ossigeno. (Campbell, 2011)

Attualmente non ci sono studi relativi allo sviluppo di stress ossidativo in animali con ARDS.

## -SEPSI

Una delle complicanze dell'ARDS può essere la sepsi, ma può verificarsi anche l'inverso, ovvero che la sepsi può portare ad ARDS. (Macdonald *et al.*, 2003)

La **SEPSI** è una delle maggiori cause di morte nei pazienti ricoverati in terapia intensiva che si verifica nel 2-3 % dei pazienti umani.

La sepsi è una risposta infiammatoria sistemica a qualsiasi tipo di organismo infettivo: funghi, batteri, protozoi, virus, parassiti etc... e può portare ad un'endotossitemia acuta che a sua volta può condurre ad una disfunzione miocardica. (Joshi *et al.*, 2006)

Evidenze sperimentali e cliniche dimostrano che i pazienti affetti da SEPSI soffrono di grave stress ossidativo per via dell'abnorme risposta infiammatoria responsabile della liberazione di perossidi o altri radicali durante l'instaurazione di una patologia multiorgano.

Lo stress ossidativo indotto come conseguenza di sepsi è stato ben documentato, e l'ossidazione di lipidi e di proteine è frequente in questo stato di malattia. Sono stati evidenziati aumenti fino a tre volte di perossido di idrogeno (Zang *et al.*, 2000).

Nel lavoro di Arroyo del 2014, è stato precisato che, durante una risposta infiammatoria sistemica importante, si possano alterare le funzioni di alcune proteine organiche in grado di tamponare gli effetti secondari dello stress ossidativo. Tra queste proteine vi è, senza dubbio, l'albumina sierica. L'albumina sierica, facilmente misurabile nel siero degli individui, rappresenta un ottimo marker infiammatorio. Il suo degrado viene associato alla liberazione massiva di citochine in pazienti scompensati che secondariamente destabilizza questa molecola, disattivandola e ostacolandone le funzioni. Questo spiega l'aggravamento dello stress ossidativo in pazienti con insufficienze multiorgano, come è stato visto nell'uomo in caso particolare di cirrosi epatica. (Arroyo *et al.*, 2014)

A conferma del precedente lavoro, uno studio recente del 2015 ha individuato il fattore "IMA" (ALBUMINA MODIFICATA in corso di ISCHEMIA) come marker di Sepsis e stress ossidativo. Questo per via degli alti livelli di Albumina modificata presenti nei pazienti critici patologici, in cui si è manifestata un'ischemia come infarto miocardico, embolia polmonare, occlusione cerebro-vascolare, ischemia polmonare, ischemia gastro-intestinale, ischemia del muscolo scheletrico etc. (Turedi *et al.*, 2007)

Tale studio ha voluto valutare i livelli di IMA in pazienti critici con una diagnosi di sepsi

provata. Dai risultati è emerso che i pazienti con sepsi avevano significativamente più elevati livelli di IMA. E' noto da più di un secolo che la funzione biologica di una proteina è strettamente legata alla sua architettura.

L'albumina plasmatica svolge diverse funzioni cruciali che includono il suo ruolo nella omeostasi acido-base, nonché di trasporto di diversi ligandi endogeni ed esogeni. Per citarne alcuni, acidi grassi liberi, ormoni, bilirubina e ioni calcio. L'albumina possiede anche siti di legame per farmaci come Salicilati e Diazepam. È concepibile che queste proprietà potrebbero essere influenzate e compromesse quando l'albumina viene convertita in IMA. Il cambiamento da Albumina plasmatica a Albumina modificata può essere conseguente o concomitante allo stress ossidativo.

L'evento molecolare chiave porta a un danno mediato dai ROS nei pazienti e lo sviluppo di sepsi con un interruzione dell'omeostasi infiammatoria inseguito all'infezione: i neutrofili consumando ossigeno, producono specie chimiche che, a sua volta, ossidano molecole come l'albumina, cambiandone la conformazione.

Avvenuta la modifica conformazionale all'estremità N-terminale della molecola di albumina essa non è più in grado di esplicare la propria funzione per cui alcuni ioni metallici, quali rame e cobalto, che normalmente vi si legano, non riescono più a farlo.

La formazione di IMA è perciò inevitabile, e conduce quindi alla disfunzione d'organo. (Prashanth e Anand, 2015)

Lo stesso meccanismo è stato riconosciuto da uno studio di Schnelle et al., 2015 nel gatto. Tramite lo sviluppo di un test colorimetrico cobalto vincolante infatti, eseguito su un campione di sieri felini, è stato possibile valutare la presenza di IMA anche in medicina veterinaria. Anche in questa specie infatti lo stress ossidativo inibisce la capacità dell'albumina di legarsi al complesso dei metalli di transizione (Cobalto), in seguito al cambiamento conformazionale della molecola. (Schnelle et al., 2015)

In medicina veterinaria la sepsi è stata ampiamente studiata sia nel paziente canino (Hauptman et al., 1997) che nel paziente felino (Sergeef *et al.*, 2004).

Nel gatto, in particolare, la sepsi ha un tasso di mortalità che varia da 29% e il 79% ed è associata a molte malattie, tra cui peritonite settica, ascessi epatici, piotorace, batteriemia, polmonite, endocardite, pielonefrite, e piometra etc.

Nonostante i gatti affetti sviluppino molti dei segni clinici classici associati alla sepsi come altre specie animali, essi possono anche sviluppare manifestazioni relativamente uniche, tra cui bradicardia e ipotermia, e altri tipi di infezioni.

## -SIRS

La sopravvivenza dei pazienti in condizioni critiche dipende da una complessa ed accurata risposta immunitaria dell'intero sistema biologico.

In generale, un abbassamento della risposta immunitaria, porta ad un significativo aumento nella suscettibilità alle infezioni, con maggiori probabilità di sviluppare SIRS. (Crimi et al., 2006)

La **SIRS** è una risposta infiammatoria generalizzata da parte di tutto l'organismo. Essa può derivare da cause infettive, e quindi essere associata direttamente alla sepsi, oppure può essere non infettiva. (Kaukonen et al., 2013)

Anche in condizioni di SIRS si verifica uno squilibrio redox che porta all'insorgenza di stress ossidativo. Inizialmente, l'abnorme risposta infiammatoria di fase acuta, aumenta produzione di proteina C-reattiva (CRP) dal fegato. CRP è una delle principali proteine di fase acuta utilizzata come biomarker precoce che viene liberata in risposta ad un processo infettivi o infiammatori, ed aumenta sensibilmente post infezione. Dopo di che il sistema reagisce, aumentano i mediatori infiammatori, i radicali liberi, e cala la risposta antiossidante dando origine anche in questo caso ad una condizione di stress ossidativo. (Nogueira et al., 2015)

L'incidenza di SIRS nei pazienti clinici è vicino al 50%, e al 80% nei pazienti chirurgici ricoverati in ICU. (Robertson and Coopersmith, 2006)

Essendo la SIRS una manifestazione clinica di una risposta sistemica ad un insulto, la valutazione di un paziente affetto da SIRS deve soddisfare 2 o più criteri di alcuni parametri clinici o di laboratorio, variabili nelle diverse specie e stabilite nel *Consensus Conference del 1992*. (Bone et al., 1992)

Nel gatto, i criteri per l'individuazione dei soggetti con SIRS risultano essere diversi da quelli delle altre specie.

Un gatto deve avere 2 o più dei seguenti per soddisfare i criteri SIRS (Brady et al., 2000):

- Bradicardia (HR <140 bpm) o tachicardia (HR > 225 bpm)
- Tachipnea (RR > 40 bpm)
- Ipertermia (> 39,7 °C) o ipotermia (< 37 °C)
- Leucopenia (<5000 WBC / ml) o leucocitosi (> 19.000 WBC / ml).

- Alcune fonti indicano che più del 5% o 10% di neutrofili banda dovrebbe anche essere considerato come uno dei criteri di SIRS. (Okano *et al.*, 2002)

- ARDS, SEPSI, SIRS e STRESS OSSIDATIVO in Medicina Veterinaria

In medicina veterinaria, e in particolare nel paziente felino, esistono pochi riferimenti in letteratura riguardanti la correlazione tra ARDS, SEPSI, SIRS e stress ossidativo. In un unico studio del 2011 (De Clue *et al.*, 2011) furono confrontati i risultati clinici e la produzione di mediatori infiammatori tra i gatti con sepsi (N:16), gatti con SIRS (N:19), e gatti sani (N:8). Per ogni gatto furono valutate citochine, interleuchine e il fattore di necrosi tumorale. I risultati mostrarono un aumento significativo di neutrofili banda, eosinopenia, iponatriemia, ipocloremia, ipoalbuminemia, ipocalcemia, e iperbilirubinemia nel gruppo sepsi/sirs. Quando il gruppo sepsi e il gruppo SIRS sono stati confrontati, le uniche differenze significative in CBC e plasma erano la percentuale di neutrofili banda e la concentrazione di albumina. Nei gatti con sepsi era più alta la percentuale di banda e minore la concentrazione di albumina rispetto ai SIRS non infettivi. Nei gatti con sepsi era significativamente maggiore attività del TNF plasmatico rispetto agli altri gatti. Mentre maggiori concentrazioni rilevabili di IL-6 erano state valutate in gatti con SIRS o gatti sani. L'attività di IL-1 $\beta$  non differiva tra i gruppi, e CXCL-8 (chemochina) non era rilevabile nella maggior parte (32/43) dei gatti. Il tasso di mortalità ha raggiunto più o meno le stesse percentuali per i gatti con sepsi (7/16) che per i gatti con SIRS (5/19). L'attività IL-1 $\beta$  e IL-6 e le concentrazioni di cloruro erano le sole variabili correlate con la mortalità nel gruppo sepsi e possono essere importanti fattori prognostici. Tale studio accenna che i meccanismi infiammatori della sepsi e della sirs possano scatenare uno stress ossidativo in grado di determinare la gravità della malattia (Bielsaski e McGregor, 2007) ma non li definisce.

Molte ricerche sono state fatte nei soggetti ricoverati in ICU e molte ancora dovranno essere condotte per valutare sia la presenza dei marker di stress, che la capacità antiossidante del siero e l'eventuale prognosi futura, sicuramente influenzata dal capacità dell'organismo di rispondere e tamponare la produzione radicalica (Karapetsa *et al.*, 2013).

## ☑ DISTRESS RESPIRATORIO

Già a partire dal 1990 si sono accumulate molte evidenze di ordine sperimentale e clinico che suggeriscono un ruolo cruciale del danno cellulare mediato da specie reattive nella patogenesi di svariate situazioni ed affezioni dell'apparato respiratorio. (Barnes, 1990)

Il polmone è l'organo del corpo che ha la maggiore esposizione all'ossigeno atmosferico. Grazie alla sua ampia superficie ed alla sua vascolarizzazione, il polmone è un organo suscettibile al danno ossidativo. Nonostante infatti l'ossigeno sia un prerequisito indispensabile per la vita, a concentrazioni superiori ai limiti fisiologici può essere pericoloso per le cellule e può aumentare le produzioni di miriadi di forme reattive di specie di ossigeno e radicali liberi. (Baror et al., 2015)

Specie di radicali liberi possono essere prodotti dalle reazioni metaboliche (ad esempio durante la respirazione mitocondriale) o in maniera esogena, per via di inquinanti atmosferici. Fisiologicamente nel polmone le specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto causano un rimodellamento della matrice extracellulare e dei vasi sanguigni, stimolando la secrezione di muco e le risposte di riparazione alveolare. (Folkerts et al., 2001 )

Le cellule produttrici di radicali sono i neutrofili, gli eosinofili e i macrofagi alveolari principalmente, ma anche cellule epiteliali alveolari, bronchiali e endoteliali. (Kinnula et al., 1995)

I polmoni per contrastare la produzione radicalica sono ricchi di agenti antiossidanti. I principali sono il glutatione (GSH), vitamine C ed E, beta-carotene, acido urico, superossido dismutasi (SOD), catalasi e perossidasi. Questi antiossidanti sono le prime linee di difesa contro gli agenti ossidanti. L'aberrazione dell'equilibrio tra ossidanti e antiossidanti può condurre ad una varietà di malattie respiratorie, come asma, sindrome da distress respiratorio acuto, o cronico, malattia polmonare ostruttiva e polmonite idiopatica.

(Rahman et al., 2006).

Il distress respiratorio è un sintomo di presentazione comune in medicina d'urgenza e se non trattata può portare a insufficienza respiratoria e morte (King et al., 2004) I pazienti dispnoici sono fragili e in condizioni di stress aumentano le richieste cardiovascolari e respiratorie, con conseguente e rapido scompenso. (Rozanski and Chan,2005)

Per quanto riguarda le malattie delle vie aeree superiori esistono diverse malattie in grado

di compromettere la respirazione e l'attività cardiaca con alti rischi per la sopravvivenza. L'individuazione di biomarcatori in grado di evidenziare l'insorgenza di una determinata condizione sarebbe fondamentale in clinica medica diagnostica e terapeutica ma non esistono ancora mezzi sufficienti per avere risposte più certe.

Nell'insufficienza cardiaca congestizia (CHF) i biomarcatori includono peptidi natriuretici, i più ampiamente studiati, il CTN, utile nel differenziare le cause di versamento pericardico, ma non in grado di differenziare la CHF da altre cause di distress respiratorio e l'endotelina, su cui ci sono ancora pochi studi significativi a riguardo. Questi biomarcatori vengono spesso utilizzati nell'individuazione di malattie cardiache ma non sono specifici. Ad esempio, alcuni biomarcatori cardiaci sono aumentati i casi di ipertensione polmonare (PH), ma questo non significa che siano correlati a CHF, poiché l'ipertensione può essere una combinazione di più malattie cardiache.

In questo momento, non ci sono test per i biomarcatori in grado di differenziare in modo affidabile tra le cause di dispnea di origine cardiaca in cani e gatti. (Smith et al.,2015)

Per quanto riguarda le malattie delle vie aeree inferiori i processi patologici che le coinvolgono, e che possono provocare difficoltà respiratorie, includono la bronchite cronica, la bronco-pneumopatia eosinofila, la malattia parassitaria, e l'asma felina. Ci sono stati numerosi valutazioni di biomarcatori per queste malattie nel campo umano, in via sperimentale, e in qualche raro studio in clinica veterinaria.

Lo stress ossidativo è associato ad un'enormità di condizioni di malattia e sarebbe utile individuare marcatori in grado di determinarlo. Nell'uomo sono stati studiati il monossido di carbonio (Scharte et al., 2000), tra i più efficienti biomarcatori e gli idrocarburi, aspecifici di perossidazione lipidica. Anche il perossido di idrogeno è un marker di polmonare stress ossidativo (Schleiss et al., 2000). Una porzione di perossido di idrogeno è prodotto dalle cellule epiteliali delle vie aeree nelle persone in condizioni infiammatorie. La superossido dismutasi, l'enzima responsabile per la riduzione dell'anione superossido più reattivo a  $H_2O_2$ , è presente in concentrazioni relativamente elevate negli spazi extracellulari delle vie respiratorie. La catalasi, d'altra parte, è indispensabile sulla trasformazione di  $H_2O_2$  in acqua e ossigeno ed è principalmente confinata al compartimento intracellulare. Pertanto,  $H_2O_2$  espirato ha un buon potenziale come marker di stress ossidativo nei polmoni. L'aumento delle sue concentrazioni nei pazienti con asma umani va correlato con la gravità della malattia, probabilmente a causa di un aumento dei neutrofili nelle vie aeree che generano una maggiore quantità di specie

reattive dell'ossigeno di quanto non facciano altri leucociti. Inoltre,  $H_2O_2$  è aumentato in caso di danno da riperfusione polmonare o sistemica nelle persone, suggerendo che questo indicatore può essere utile a isolare la patologia polmonare da patologie sistemiche.

Fino ad oggi non c'erano stati studi in veterinaria su biomarcatori di stress ossidativo negli animali con distress respiratorio.

Ad oggi è stato visto che  $H_2O_2$  è un aumentato nei gatti con infiammazione delle vie aeree indotta sperimentalmente ed è stato positivamente correlato con la percentuale di eosinofili nel BAL. Modelli sperimentali di asma felina hanno dimostrato che  $H_2O_2$  nel respiro esalato può essere un valido strumento diagnostico. (Kirschvink et al., 2005)

In un modello sperimentale di grave danno polmonare acuto (ALI) nei cani che mimano l'aspirazione del contenuto gastrico, vi è stato un aumento delle concentrazioni di  $H_2O_2$  esalati per diversi giorni dopo l'inspirazione di acido cloridrico nei polmoni.

In realtà anche per i cani e per i gatti esistono diversi marcatori di stress ossidativo in diversi stati di malattia. Questi includono antiossidanti come le vitamine A, C, ed E, glutazione, cisteina, oppure la capacità di assorbimento dell'ossigeno radicale, la perossidazione lipidica, il danno ossidativo al DNA, e la concentrazione degli elementi di rame, selenio, zinco, magnesio e ferro. Alcuni cani in condizioni critiche con insufficienza cardiaca congestizia hanno dimostrato avere diminuito significativamente le concentrazioni di vitamina E e minor glutazione ridotto rispetto a quello ossidato. (Freeman et al., 2005)

I cani con concentrazioni di glutazione inferiore negli eritrociti avevano una condizione di stress ossidativo maggiore strettamente correlato con la gravità e mortalità. (Viviano et al., 2009)

I gatti con condizioni critiche, d'altra parte, non hanno mostrato significative riduzioni nelle loro concentrazioni di glutazione, ma hanno mostrato di avere un aumento delle concentrazioni di vitamina C. I cani e gatti con malattia respiratoria sono stati inclusi nei gruppi di pazienti ricoverati, ma non sono stati valutati come un gruppo isolato, il che rende difficile determinare se la malattia respiratoria è significativamente diverso da altre cause di malattia. (Viviano et al., 2009)

In conclusione, Il "Sacro Graal" di biomarcatori per la diagnosi dello stato patologico che causa distress respiratorio nei cani e gatti deve ancora essere identificato. Ci sono diversi marcatori interessanti, ma ogni indicatore ha certamente ancora i suoi limiti. (Smith et al., 2015)

## ☑ INSUFFICIENZA RENALE

La Sepsi, in alcuni pazienti, è strettamente associata a Insufficienza Renale Acuta; Attualmente si pensa che il danno acuto renale derivi da un ipoperfusione renale in atto durante la sepsi.

Recenti pubblicazioni hanno migliorato la comprensione su questo argomento individuando la correlazione tra sepsi e IRA in cause circolatorie, con aumento dei marcatori di infiammazione e di stress ossidativo, e poi anche nell'attivazione della cascata della coagulazione, e nella risposta bioenergetica adattativa in grado di prevenire la morte cellulare.

Il danno renale acuto può verificarsi in molti pazienti con sepsi ricoverati in terapia intensiva, anche senza significativo squilibrio emodinamico. Microscopicamente, in questi pazienti, vi è un aumento locale e circolatorio di mediatori infiammatori, un'attivazione dei leucociti e un'alterazione dell'omeostasi dell'ossigeno per mezzo di produzione di specie reattive dell'ossigeno, e ipossiemia.

L'eziologia più comune di insufficienza renale acuta in terapia intensiva è la necrosi tubulare acuta, che è dovuta per l'80% alle specie reattive dell'ossigeno e all'infiammazione, implicate nel danno cellulare tubulo renale. (Komisaroff et al., 2007)

Il ruolo del flusso sanguigno renale (RBF) e le relative alterazioni nella patogenesi settica AKI è un argomento tuttora in dibattito. Nella sepsi, l'induzione cellulo-mediata di ossido nitrico (NO) diminuisce le resistenze vascolari sistemiche, che comportano una vasodilatazione arteriosa. Ciò può causare, a sua volta, un crollo emodinamico e una compromissione della perfusione degli organi. L'ipoperfusione dei reni è il principale segno di AKI settica, in stato di shock cardiogeno e ipovolemico. Il calo della resistenza vascolare sistemica riduce il precarico cardiaco, che poi attiva l'asse neuronale, il sistema nervoso simpatico, il sistema renina-angiotensina-aldosterone, e il rilascio osmotico di vasopressina. Queste cambiamenti portano alla vasostrizione renale, lesioni ischemiche, e AKI. (Schrier *et al.*, 2004)

In tutto questo processo si assiste alla generazione di ROS sui mitocondri che sono la forza motrice principale di stress ossidativo. Normalmente è qui che si verifica la conversione del 1-2% dell'ossigeno in anione superossido, poi convertito da superossido dismutasi in perossido di idrogeno, e da altri enzimi in radicale ossidrilico e perossido nitrico. Gli antiossidanti "spazzini", catalasi e glutazione, che dovrebbero tamponare

questa produzione da parte dei tessuti ipossici, diminuiscono notevolmente in corso di sepsi, esaurendosi. (Heyman et al., 2011)

Nel modello di sepsi ratto, Koksai et al hanno dimostrato che i ROS aumentano notevolmente nei reni, polmoni e fegato, con un calo significativo del contenuto di GSH in questi tessuti (Koksai et al., 2004) . Le disfunzioni renali possono essere correlate con riduzione della catalasi e superossido dismutasi, che contribuiscono alla AKI settica (Edremitlioglu et al., 2005) .

In medicina umana Silva et al hanno riportato che ROS è raddoppiato nel plasma dei pazienti settici AKI, rispetto al confronto con il controllo (Silva et al., 2008) . Lyons et al ha anche riferito che il consumo di GSH è aumentato nei pazienti settici e questo declino avviene anche in seguito alla somministrazione di GSH sintetico (Lyons et al., 2001). Le specie reattive dell'ossigeno possono causare lesioni dirette alle strutture endoteliali e extracellulari come membrana e glicocalice, che compromettono la vaso-reattività endotelio-dipendente (Rubio-Gayosso et al., 2006) . Essi hanno mediano l'azione vasocostrittrice di endotelina-1 e possono contribuire ad una ridotta regolazione emodinamica glomerulare (Hughes et al., 1996).

La comprensione della patogenesi dell'AKI settica e del ruolo dello stress ossidativo è indispensabile per un approccio terapeutico futuro. (Shum et al., 2016)

L'Ipotensione, che può essere risultato di sepsi, di insufficienza cardiaca, o di grave ipovolemia, è una causa comune di necrosi tubulare acuta.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati implicati come importanti effettori del danno cellulare tubulare sia ischemico che tossico. (Laurent and Ardaillou, 1986)

Il danno da ischemia-riperfusion al rene induce una risposta infiammatoria, che peggiora le lesioni tubulari e endoteliali aumentando l'espressione renale di molti citochine pro-infiammatorie e molecole di adesione che vanno a stimolare tardivamente la produzione di mediatori vasoattivi e leucociti. I leucociti attivati possono danneggiare direttamente le cellule tubulari e endoteliali rilasciando un numero di ossidanti potenti, compresi superossido e l'ossido nitrico.

Nell'uomo sono stati fatti alcuni studi concernenti gli effetti degli antiossidanti sulla IRA. Una ricerca randomizzata e prospettica che ha arruolato 30 uomini colpiti da grave ipotensione a cui è stata somministrata N-acetilcisteina (NAC; 50 mg / kg per 4 ore seguita da 100 mg / kg / die per 48 ore diluiti in 5% glucosio) e deferoxamina (DFX, in una singola dose di 1000 mg diluiti nel 5% di glucosio) o placebo.

N-acetilcisteina (NAC) è un composto contenente tiolo con effetto antiossidante, anti-infiammatorio, e effetti sul microcircolo. In questo contesto, l'uso di Deferoxamina (DFX), un chelante del ferro, sembra migliorare gli effetti del NAC.

Nella ricerca è emerso che l'uso di NAC aveva diminuito il danno renale, controllando l'ossidazione ma non i livelli di interleuchina 6, mentre al contempo nei pazienti in cui sono stati somministrati NAC e DFX i livelli di nitrati erano aumentati. In conclusione l'uso di NAC e DFX migliora lo stress ossidativo e in futuro un ampio studio dovrà essere eseguito per determinare se tali effetti potranno prevenire l'IRA dopo l'ipotensione nei pazienti critici. (Fraga et al., 2012).

In veterinaria limitati sono gli studi sull'argomento, assenti in medicina felina. In letteratura gli unici studi sulla correlazione dell'alterazione del bilancio ossidativo e patologie renali sono stati condotti nell'insufficienza renale cronica. Nel 2006 è stato visto che lo stress ossidativo può portare alla progressione di IRC. Il rene è un organo sensibile allo stress ossidativo proprio perché è a livello dei suoi tubuli che si formano i ROS, per un aumento esacerbato della fosforilazione ossidativa durante l'insufficienza renale. L'IRC è una comune patologia nei gatti anziani che colpisce circa il 3% di tutta la popolazione. Il rene consuma circa il 10% dell'ossigeno e sfruttando il metabolismo aerobio produce ROS con conseguente squilibrio, qualora le difese antiossidanti venissero a mancare. Alcuni studi hanno determinato l'attivazione del GSH come meccanismo di compensazione di stress ossidativo. (Keegan and Webb, 2010)

L'infiammazione cronica potrebbe portare ad una sovrapproduzione del radicale superossido dai neutrofili attivati, innescando processi pro-ossidanti mediati dai ROS. I neutrofili di pazienti uremici mostrano una produzione anormale di specie chimiche in risposta alla loro attivazione. Sicuramente un aumento di antiossidanti come vitamina E, C e Beta-Carotene, assunti con la dieta, potrebbero beneficiare sul danno renale. (Yu and Paetau-Robinson, 2006).

## ☑ LESIONI CEREBRALI

Il cervello è vulnerabile al danno da stress ossidativo come è alto il suo tasso di consumo d'ossigeno. Le specie radicaliche prodotte durante un insulto, avviano reazioni di perossidazione lipidica che hanno come bersaglio gli elevati livelli di acidi grassi insaturi nel cervello e causano stress ossidativo.

Nell'Ictus cerebrale si verifica un'interruzione del circolo per via di un coagulo di sangue che interrompe l'afflusso cerebrale con conseguenze drammatiche. Uno studio ha voluto misurare le specie chimiche reattive coinvolte nel processo e ha dimostrato che all'inizio esse erano notevolmente aumentate per poi diminuire nei giorni seguenti (1-7) post ictus ischemico (Tsai et al., 2014). L'ipossia è un fattore determinante per l'aumento di produzione di specie radicaliche, i cambiamenti metabolici interferiscono con la respirazione mitocondriale con maggior liberazione di anione superossido ed è per questo che nell'ictus cerebrale questa sovrapproduzione risulta così elevata. (Murphy, 2009)

Lo stesso meccanismo appena descritto si ritrova nell'infarto miocardico. (Hill et al., 1997)

Altri studi sono stati condotti in campo cerebrale per valutare il danno ossidativo neuronale soprattutto in corso di lesioni traumatiche, principale causa di morte. Come visto infatti, in uno studio in pediatria umana, le lesioni cerebrali traumatiche (TBI) possono portare ad una riduzione della riserva totale antiossidante con diminuzione di ascorbato e glutammato. In aggiunta, possono essere osservati aumenti dei livelli di prodotti della perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine (Bayir et al., 2002)

Le specie reattive dell'ossigeno possono anche promuovere la formazione di perossinitrito, che diventa nitrotirosina, presente nella maggior parte degli campioni di liquor cerebrale in pazienti con trauma cranico è stato dimostrato aver un ruolo come indicatore di scarso esito prognostico (Darwish et al., 2007). Più di recente, anche la Perossiredossina VI è diventata un ottimo indicatore in pazienti con TBI. Questo enzima ma è notevolmente diminuito nel liquor di pazienti con trauma cranico, e ciò sta a significare che l'enzima viene ossidato dopo il evento traumatico. La perossiredossina VI è un importante enzima antiossidante normalmente trovato in astrociti. (Baror et al., 2015)

Gli astrociti giocano un ruolo importante nel controllo ossidativo stress del sistema nervoso centrale (CNS), poiché aiutano a mantenere un ambiente omeostatico per i neuroni, oltre a proteggerli dalle specie reattive dell'ossigeno. Nello studio di Testa et al.

del 2011 sono state selezionate e isolate linee cellulari di astrociti felini ed è stato studiato il loro ruolo nello stress ossidativo. Tramite dei test a citofluorimetria di flusso sono stati identificati i ROS responsabili dell'alterazione dell'equilibrio cellulare e per valutare quali di questi siano coinvolti nel processo patogenetico di un soggetto felino (Testa et al., 2011).

In medicina veterinaria pochi studi sono stati condotti sulle lesioni ossidative che partecipano ad un danno neuronale acuto.

Nella ricerca di Park et al. 2012, viene eseguita una revisione letteraria su ciò che riguarda la gestione diagnostica e terapeutica di un paziente felino o canino che riporta lesioni midollari acute gravi, traumatiche o non traumatiche. Il lavoro analizza la condizione di stress ossidativo verificatasi in questi pazienti con la liberazione abnorme di ROS, instauratasi in seguito ai processi infiammatori/ischemici. I fattori che causano aumenti ROS sono: l'ischemia riperfusione, l'aumento del calcio intracellulare, l'accumulo glutammato, e la presenza di complessi di ferro e rame che si trovano in emorragie petecchiali. I ROS causano danni alle membrane ricche di lipidi del SNC con conseguente danno gliale, neuronale, e endoteliale attraverso la perossidazione lipidica. I ROS sono coinvolti anche nel danno ossidativo a proteine e acidi nucleici, che porta all'inibizione di respirazione mitocondriale che può peggiorare l'ischemia. (Park et al., 2012).

Queste lesioni possono condurre poi verso sindromi di disfunzione cognitiva. In tal proposito, la ricerca di Landsberg et al., 2012 analizza lo stato degenerativo dei pazienti canini e felini, legata all'invecchiamento o a stati patologici cronici e spiega come in queste condizioni si verifica uno stress ossidativo che interferisce con i segnali per la neurotrasmissione cerebrale. (Landsberg et al., 2012).

Ulteriori studi andrebbero condotti per determinare l'influenza dello stress ossidativo nel paziente felino critico durante la fase acuta della malattia.

### 1.3.3 Lo Stress Ossidativo e il Paziente Critico Felino

☑ FIV: sindrome da immunodeficienza virale felina

Lo stress ossidativo ha un ruolo significativo nella patogenesi e nella progressione dell'immunodeficienza virale (HIV). Studi, in medicina umana, hanno dimostrato che la capacità antiossidante endogena dei pazienti colpiti diminuisce in maniera esponenziale nei soggetti colpiti. Il virus invade le cellule del sistema immunitario, si replica e, contemporaneamente, causa una diminuzione dei livelli di GSH, in particolare nei linfociti. Il virus provoca l'apoptosi delle cellule T, un maggiore danno al DNA, e compromissione funzionale di linfociti T CD4 +. Le basse concentrazioni di GSH possono essere correlate alla minore aspettativa di vita dei soggetti HIV positivi. Quantificare la capacità antiossidante intrinseca è il primo passo per determinare la gravità dell'infezione stessa e la sua variabilità. (Losa e Graber, 2000)

Per molti anni è stato studiato il modo in cui gli antiossidanti somministrati possano influenzare la prognosi individuale. È stato visto per esempio in vitro che la glutatione perossidasi può aumentare la proliferazione delle cellule T limitando il rilascio della citochina TNF-alfa delle cellule mononucleate. (Muller *et al.*, 2000)

In medicina veterinaria alcune ricerche hanno dimostrato che i gatti con FIV sviluppano molte delle stesse anomalie immunologiche degli esseri umani HIV positivi e che tali anomalie possono variare in condizioni di stress ossidativo. Questo perché i gatti sono una specie particolarmente suscettibile a tale condizione.

In uno studio del 2008, Webb *et al.*, hanno valutato in maniera prospettica gli effetti sperimentali **dell'infezione acuta da FIV nei gatti**.

Sono stati selezionati alcuni gatti, dalle 6 alle 16 settimane di età, in una colonia felina della *Colorado State University*. Ai soggetti è stato iniettato, in modo sperimentale, un particolare ceppo FIV e l'infezione avvenuta è stata dimostrata mediante PCR nel mese successivo all'inoculazione.

In seguito, a 6, 9, 12, 16 settimane, sono state fatte delle valutazioni sulla carica virale, sul numero di neutrofili/linfociti e sulla capacità antiossidante enzimatica individuale. La carica virali è notevolmente aumentata intorno alle 6 settimane post infezione e in

corrispondenza del picco, si è avuta una netta diminuzione dei neutrofili. I neutrofili legano il virus e la loro attività è compromessa. In più essi hanno anche la capacità di trasmetterlo ai linfociti. Al contrario dei neutrofili, il numero dei linfociti T CD4+ è notevolmente diminuito. (Gabali *et al.*, 2004 ).

Per quanto riguarda la capacità antiossidante precedenti studi, (Serra *et al.*, 2001), hanno valutato che la quantificazione di superossido dismutasi in RBC è un ottimo marker di stress ossidativo. Webb *et al.*, nella loro indagine, hanno visto che le concentrazioni di SOD degli eritrociti aumentano dopo l'inoculazione di FIV, raggiungendo la più alta concentrazione a 9 e 12 settimane, prima di tornare ai livelli basali alla 16 settimana.

Anche la concentrazione dell'enzima glutatione perossidasi aumenta durante l'infezione acuta FIV come già dimostrato in umana. (Ognuro *et al.*, 2006)

La concentrazione di GSH è stata determinata anche nei linfociti CD4 + e CD8+ tramite la citometria di flusso. Il livello di CD4 + alla 9 settimana era significativamente maggiore mentre non c'era alcuna significativa nella variazione delle concentrazioni di GSH nei linfociti T CD8 + durante le 16 settimane, seguenti all'inoculazione di FIV. Tuttavia, entro le 16 settimane di infezione, molti delle anomalie nel bilancio ossidativo erano stabilizzati o tornati ai valori pre-inoculazione. Questi risultati suggeriscono che l'infezione acuta con FIV è causa di stress ossidativo nei gatti e che i linfociti T CD4 + sembrano essere preferenzialmente colpiti, specialmente se l'infezione è contratta nei primi anni di età.

La concentrazione di SOD e GSH influenzano il mantenimento dell'omeostasi cellulare e il più significativo aumento di GSH si è verificato nei linfociti CD4+.

Le variazioni di SOD e GSH mostrano un picco a 9 settimane, in ritardo rispetto al picco della carica virale, che si verifica a 6 settimane. In questo lasso di tempo i meccanismi omeostatici antiossidanti cominciano a far fronte all'insulto virale, ma nel tempo gli effetti della persistente infezione si traducono nella rottura dell'omeostasi. Ulteriori studi sarebbero necessari per determinare se il trattamento precoce con antiossidanti può contribuire a migliorare il declino del numero e della funzionalità dei linfociti T CD4 + T, associata ad infezione acuta da FIV nei gatti.

(Webb *et al.*, 2008)

## ☑ FIP: PERITONITE INFETTIVA FELINA

In uno studio recente, Tecless et al. (Tecless *et al.*, 2015), hanno ritenuto opportuno analizzare la correlazione tra stress ossidativo e **FIP**.

La peritonite infettiva felina è una malattia sostenuta da un corona-virus che dà origine ad una abnorme risposta infiammatoria. (Pedersen, 2014)

Presa visione del rapporto tra infiammazione e stress ossidativo (Montorfano *et al.* 2014), è stato ipotizzato che lo stress ossidativo potrebbe essere presente nei gatti affetti da FIP. Diversi enzimi e molecole non-enzimatiche sono inclusi all'interno del sistema antiossidante felino come la *paraoxonasi 1*(PON-1), proteina negativa di fase acuta con un ruolo protettivo contro l'ossidazione.

Questa proteina, insieme alla capacità antiossidante del siero (TAC), è stata valutata, tramite diversi substrati, in gatti con FIP (forma essudativa e forma secca) e in altri gatti sani o con diverse patologie infiammatorie (negativi a FIV, FELV, FIP, ma con elevato SAA) e sono state studiate le differenze.

Dai risultati si evinse che TAC era significativamente più bassa nei gatti con FIP rispetto ai gatti sani e gatti con altre condizioni infiammatorie; la concentrazione di SAA è stata significativamente maggiore nei gatti con FIP e con altre malattie infiammatorie rispetto in animali sani; la concentrazione di SAA era significativamente più alta in gatti con FIP che in gatti con altre malattie infiammatorie. In più i gatti con forme effusive hanno mostrato valori più bassi di PON1 e TAC e valori più alti di SAA rispetto a gatti con forme non effusive.

Questo è stato uno dei primi studi relativo all'analisi di stress ossidativo in soggetti con FIP e sicuramente molte altre ricerche dovranno essere fatte. Sarebbe opportuno avere delle applicazioni pratiche per monitorare lo stress ossidativo e indagare sulla ricerca di antiossidanti terapeutici e preventivi. (Pedersen, 2014)

## ☑ CHETOACIDOSI DIABETICA

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante le patogenesi del diabete e delle sue complicazioni. I radicali liberi sono implicati nello sviluppo di queste complicazioni in medicina umana, nel cane e anche nel gatto. Il diabete è un disturbo endocrino, comune

nel gatto domestico, caratterizzata dalla presenza di elevati livelli di glucosio nel sangue per via di una mancata produzione o una mancata risposta all'insulina. La correlazione tra diabete, stress ossidativo e dieta nel gatto è stata ampiamente ricercata e sono state evidenziate anomalie del bilancio ossidativo (Webb and Falkowski, 2009).

È stato stimato che nei gatti l'incidenza di diabete mellito raggiunge l'1,2 % dei casi (Prahl et al., 2007) e l'incidenza di stress ossidativo sia a livello sistemico che locale contribuisce al processo di disfunzione e apoptosi delle cellule B-pancreatiche. (Modak et al. 2011)

Come precedentemente accennato, l'infiammazione e la modifica ossidativa sono presenti anche nei gatti normali, ma la loro espressione aumenta molto presto durante lo sviluppo di malattia. (Herndon et al., 2014)

Una delle maggiori complicazioni del diabete, può essere la cheto-acidosi diabetica. Questa è una delle complicanze fatali, tali da renderlo un paziente critico, riscontrate in presenza di diabete di tipo 1 e 2. La mancata risposta all'insulina che comporta una risposta compensatoria dell'organismo, il cui metabolismo sfrutta i lipidi per la produzione di energia con conseguente produzione di corpi chetonici, che passano nel sangue determinando acidosi. Dalla malattia diabetica cronica, con la cheto-acidosi si passa ad una fase acuta. Sicuramente l'auto-ossidazione del glucosio, in presenza di metalli di transizione, è un importante fattore contribuente alla modificazione non enzimatica di elementi biologici. Lo stress ossidativo nei pazienti diabetici è il risultato di un compromesso sistema antiossidante, dell'ossidazione di lipoproteine plasmatiche, della liberazione di mediatori infiammatori e cambiamenti dello stato antiossidante assunto con la dieta. Nei RBC umani la perossidazione lipidica è stata fortemente associata a una modificazione strutturale della membrana del RBC per via di alterazioni del gruppo eme. L'ossidazione della molecola di emoglobina provoca la precipitazione dei gruppi di emoglobina denaturata che si fondono in punti focali all'interno del RBC formando i corpi di Heinz. Con l'utilizzo di colorazioni speciali, questi corpi possono essere visti al microscopio come inclusioni sferiche alla periferia del RBC. La loro formazione è associata all'incremento di ossigeno radicale a causa di difetti ereditari o acquisiti dell'emoglobina, di carenze nei meccanismi di difesa antiossidanti, della somministrazione di farmaci ossidanti, o ingestione di piante tossiche. Nelle varie specie l'anemia emolitica è il risultato del sequestro e lisi dei corpi di Heinz da parte dell'attività della milza. Nel gatto l'emoglobina è particolarmente sensibile allo stress ossidativo, in parte grazie alla presenza di otto gruppi sulfidrilici reattivi. I gatti quindi sono più

suscettibili all'anemia emolitica da danno ossidativo rispetto alle altre specie. Il 5 % dei corpi di Heinz si formano spontaneamente nel soggetto sano. Questo perché la struttura della milza dei soggetti felini ha un suo andamento non sinusoidale che causa una funzione non efficiente. La mancata clearance della milza comporta la persistenza dei corpi di Heinz nel sangue periferico.

In uno studio retrospettivo del 1995 erano stati analizzati 30 gatti, normo diabetici e in chetoacidosi e valutati la relazione tra il diabete e il danno ossidativo.

I risultati di questo studio indicano una chiara associazione tra l'ossidazione di emoglobina, come manifestato dalla formazione di corpi di Heinz, e chetoacidosi nei gatti con diabete mellito. Mentre il danno ossidativo negli esseri umani e altri animali con diabete è stata in gran parte attribuito a iperglicemia e autossidazione del glucosio, la chetoacidosi nel gatto sembra rappresentare uno stress metabolico aggiuntivo che può contribuire al danno ossidativo. Questi dati suggeriscono anche che la terapia antiossidante trarrebbe vantaggio gatti affetti da diabete mellito, in particolare quando sviluppa chetoacidosi.

In questi gatti le percentuali di corpi di Heinz erano negativamente correlate alle concentrazioni di glutazione negli eritrociti. La membrana eritrocitaria era modificata dalla perossidazione lipidica, leggermente ma non significativamente aumentata nei gatti diabetici. Non c'erano associazioni significative tra cento corpi di Heinz e grado di anemia, iperglicemia, o emoglobina glicata. Questi dati indicano che i chetoni sono associati ai danni ossidativi di emoglobina nei gatti, e suggeriscono che il metabolismo chetonico, cioè del citocromo P450 2E1, può essere una potenziale fonte di ossigeno in vivo per la generazione di radicale in animali con chetosi. La formazione corpo Heinz in gatti fornisce un'eccellente modello di valutazione in vivo dello stress ossidativo. È importante sottolineare che queste manifestazioni di stress ossidativo forniscono una forte indicazione per l'uso di una terapia antiossidante nei gatti diabetici. Si suggerisce anche la possibilità che la chetosi possa essere alla base della formazione di corpo Heinz associato a diete e ad altre malattie feline. (Christopher, et al, 1995)

## ☑ RETINOPATIA DIABETICA NEL GATTO

Anche la retinopatia diabetica è una grave complicanza del diabete e la principale causa di cecità tra gli adulti in tutte le specie. Il meccanismo di insorgenza della retinopatia è in realtà già stato chiarito, tuttavia necessita di un approfondimento poiché l'afflusso di sangue alla retina è compromesso nella patologia diabetica.

Nel paziente diabetico in fase acuta si può infatti verificare un aumento delle variazioni del microcircolo che dipendono dallo stato di malattia e che rendono necessario l'identificazione di un parametro specifico che stabilisca l'anormalità della funzione vascolare. Nella patogenesi della malattia stessa sono fondamentali i riscontri ottenuti sulla disfunzione endoteliale in distretti diversi dalla retina, aumentati in corso di diabete mellito. L'iperglicemia è un importante fattore di rischio e le alterazioni vascolari che ne derivano erano finora state studiate su grossi vasi come aorta (Diederich et al.,1994) e circolazione mesenterici o studi sull'avambraccio di uomo (Williams et al.,1996). Non era chiaro però il suo ruolo nella disfunzione retinica ed è per questo che è stato condotto, nel 2010, uno studio in grado di correlare iperglicemia, disfunzione vascolare e stress ossidativo. L'alterazione dello status ossidativo delle cellule endoteliali dell'occhio per aumento di anione superossido è ben noto, ma la valutazione dell'effetto dell'iperglicemia acuta e stress ossidativo in arteriole retiniche di gatti non diabetici era da chiarire. Nel presente studio sono stati arruolati circa 90 gatti sani a cui è stato indotto uno stato iperglicemico mediante infusione endovenosa di glucosio al 25%, per mantenere la concentrazione plasmatica a 30 mM. È stata utilizzata la flussimetria laser Doppler per misurare simultaneamente il diametro del vaso (D) e la velocità del sangue (V) e calcolare il flusso retinico sanguigno (RBF) nei gatti. Sono stati somministrati in camera vitrea la bradichinina, un vasodilatatore endotelio-dipendente (BK), e il sodio nitro-prussiato, come vasodilatatore endotelio-indipendente (SNP) per valutare la funzione endoteliale nelle arteriole della retina. Per controllare osmolalità, 25% mannitolo è stato somministrato allo stesso modo. È stata poi indotta un'iperossia sistemica per esaminare in maniera non invasiva la funzione endoteliale durante l'iperglicemia. Per determinare l'effetto del superossido sui cambiamenti all'iperglicemia indotte nella circolazione retinica, è stato somministrato 4-hydroxy 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) in acqua potabile per 14 giorni prima dell'esperimento. Tra i risultati è stato visto che D, V, e RBF sono aumentati con l'iperglicemia acuta e mannitolo rispetto al

basale.

È stato dimostrato che BK introdotto in camera vitrea può determinare vasodilatazione e aumentare il flusso ematico nel microcircolo retinico felino in vivo. Inoltre, i dati attuali hanno mostrato chiaramente che BK ha aumentato la RBF principalmente attraverso NO piuttosto che attraverso prostaglandine nei gatti in vivo. Questi aumenti non si sono verificati con l'uso di SNP.

In conclusione, è stato dimostrato per la prima volta che l'iperglicemia acuta aumenta la circolazione retinica probabilmente attraverso una maggiore osmolalità sierica e può causare disfunzione endoteliale a livello del microcircolo retinico nei gatti sani attraverso un aumento dello stress ossidativo. Inoltre, la valutazione dell'iperossia sistemica può essere utilizzato per l'esame clinico non invasivo per la funzione endoteliale della retina durante l'iperglicemia acuta. Gli attuali reperti suggeriscono che l'aumento della superossido è associato alla disfunzione endoteliale della retina causato da iperglicemia acuta. (Sogawa et al.,2010)

#### PATOLOGIE EPATICHE E FARMACO TOSSICITA'

Anche il fegato, nel soggetto felino, è un organo particolarmente predisposto all'insorgenza di fenomeni ossidativi che possono influenzare la prognosi della malattia. Vari disordini come la necrosi infiammatoria, l'ostruzione del dotto biliare extraepatico, le intossicazioni, le anomalie porto- sistemiche e la lipidosi epatica possono portare ad una diminuzione significativa di GSH negli epatociti con maggiori conseguenze nelle gatto rispetto alle altre specie. Questo è stato dimostrato una ricerca del 2002 (Center et al., 2002), in cui alcuni studiosi avevano indagato sulla concentrazione dell'attività antiossidante nei fegati di cani e gatti con patologie. Della funzione del Glutatione ne abbiamo già precedentemente parlato, ma è utile descriverla più dettagliatamente per avere un'idea precisa sulla sua influenza epatica. Il GSH è un composto tiolo che ha il compito di detossificare il fegato dai prodotti del metabolismo aerobio. Questo lo fa tramite un enzima, il GSH-S-TRASFERASI che comporta la sua ossidazione in GSSG, GSH disolfuro, per spiegare la sua attività antiossidante intracellulare. In seguito GSSG verrà nuovamente convertito in GSH da GSSG reductasi e NADPH. Nel fegato di animali sani, il GSH è presente nella sua forma ridotta. Gli epatociti sono le uniche cellule che

sintetizzano così tanto GSH per utilizzarlo sia localmente sia nella circolazione sistemica e bile. In condizioni patologiche quello che si verifica è una diminuzione sostanziale dell'antiossidante, come è stato verificato dallo studio in cani e gatti con patologie epatiche. Le motivazioni di questo minore quantitativo possono risalire a una riduzione nell'apporto dietetico di questo antiossidante o di altri che ne aiutano la sintesi, ad un'insufficienza attività di riciclaggio e conversione da GSSG a GSH, difetti acquisiti nella trasformazione biochimica delle sostanze, o un aumento del suo efflusso in plasma o bile. Le concentrazioni inadeguate di GSH epato-cellulare rendono il fegato più suscettibile ai danni ossidanti associati a necrosi infiammatoria e epatopatia colestatica, compresi gli effetti negativi sulla cellula e le membrane degli organelli, con maggiore vulnerabilità di enzimi essenziali per l'inattivazione, con danno metabolico e catabolico.

Nelle malattie l'importanza fisiologica di basse concentrazioni di GSH riflette l'influenza del danno ossidativo sul fegato, sia le privazioni nutrizionali, nonché una maggiore vulnerabilità dell'organo in corso di eventi ossidanti. Questo si può verificare specialmente in caso di LIPIDOSI EPATICA.

La lipidosi epatica o steatosi è una patologia molto frequente nel gatto che può verificarsi da sola o in combinazione con altre patologie morbose. Viene definita anche pannicolite del grasso giallo ed è associata ad un aumento della perossidazione lipidica in seguito a diete ad alto contenuto in PUFA e carenza di vitamina E.

Uno studio del 2005 ha analizzato l'incidenza della steatosi su gattini di razze greche siamese e razze comuni a pelo corto con una maggiore suscettibilità dei secondi rispetto ai primi, dipendente da una diversa attitudine alimentare. La perossidazione lipidica in corso di steatite avviene anche nel tessuto adiposo con conseguente infiammazione, degenerazione e necrosi degli adipociti. L'aumento della perossidazione lipidica e la carenza di antiossidanti (alfa-tocoferolo, selenio e GSH) sono fattori determinanti l'insorgenza della steatosi epatica. (Fytianou et al., 2005)

Anche nel caso di intossicazioni, specialmente quelle farmaco dipendenti, si può verificare un aumento del danno ossidativo. La tossicità di un farmaco può essere idiosincrasica o dose-dipendente, la prima si verifica solo in una piccola percentuale di pazienti che assumono il farmaco per effetti innati in individui sensibili, mentre la seconda dipende dalla dose.

Il fegato, la pelle, il midollo osseo, e le cellule circolanti del sangue sono obiettivi comuni di farmaco tossicità idiosincrasica. Il fegato è suscettibile a causa dell'alto flusso di sangue e dell'elevata concentrazione di enzimi del citocromo P450, che causano

biotrasformazione, e di altri che possono generare metaboliti reattivi. Anche le cellule del sangue e della pelle esprimono il citocromo P450, che può bioattivare alcuni farmaci. Tutte le reazioni idiosincrasiche cominciano con la generazione di un metabolita reattivo. Queste metaboliti possono essere generati dal citocromo P450 (CYP), flavinamonossigenasi (FMO), mieloperoxidasi (MPO), e cicloossigenasi (COX). Tali metaboliti, o una reazione ad essi associata, possono generare specie reattive di ossigeno causando tossicità per la cellula, oppure possono legarsi alle proteine dei tessuti e formare complessi immunogeni. Quest'ultimo meccanismo può portare di conseguenza all'amplificazione dei danni tissutali attraverso una risposta cellulo-mediata da anticorpi o T citotossicità. (Trepanier, 2013)

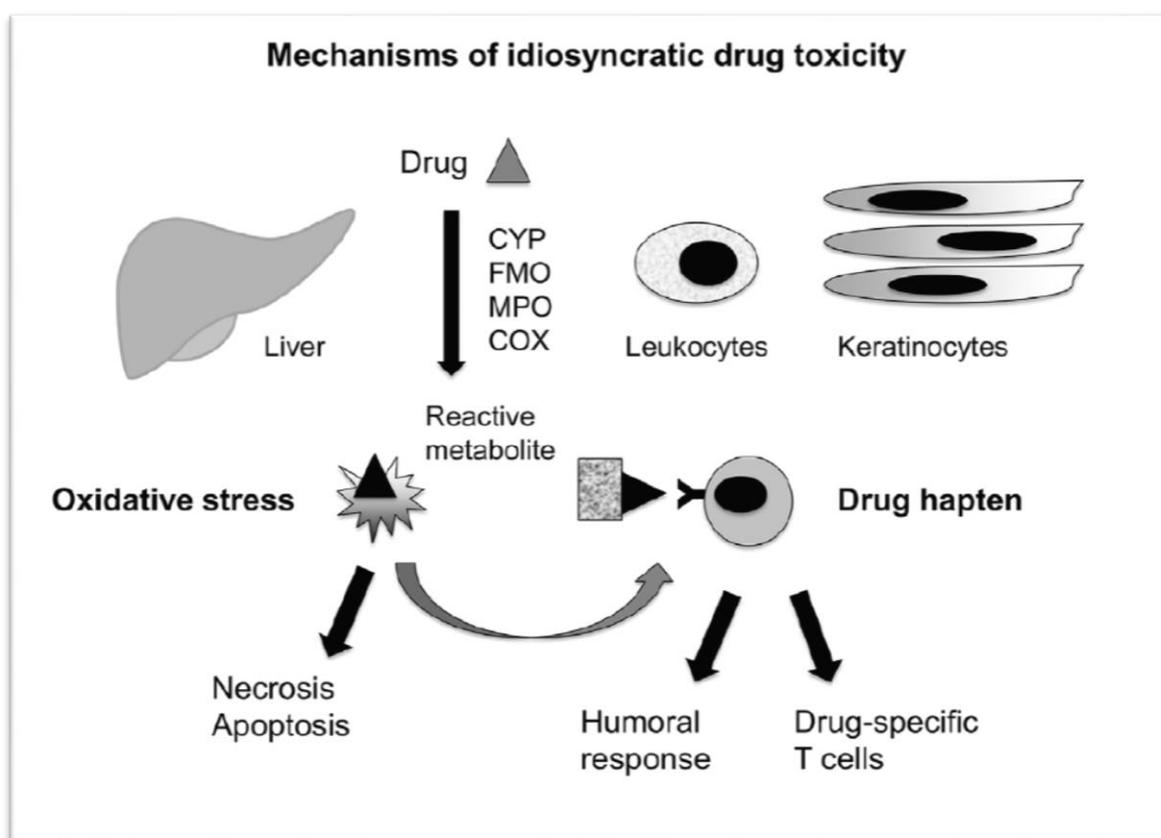


Figura 4: Meccanismi di farmaco tossicità con aumento di metaboliti reattivi responsabili del danno cellulare (Trepanier, 2013)

Molti farmaci come il Fenilbutazone, Febendanzolo, Griseofulvin, Mitotane etc. possono dare reazioni tossiche idiosincratice generalizzate in cani e gatti. Anche la tossicità da antibiotici come sulfamidici ad esempio, oppure da Fans non steroidei come il Carprofen deve essere tenuta sotto controllo e assolutamente evitata. Tra gli effetti più comuni vediamo vasculite, trombocitopenia, neutropenia transitoria, anemia, proteinuria, poliartrite degenerative, alterazioni cutanee come il pemfigo foliaceo etc. Nei gatti la tossicità da Metimazolo ad esempio, ha degli effetti acuti importanti. (Peterson et al., 1988)

### ☑ IPERTIROIDISMO: EFFETTI ACUTI DELLA TERAPIA

L'Ipertiroidismo è il disturbo endocrino più frequente nei gatti di oltre 8 anni di età, ed ha molte caratteristiche cliniche simili con ipertiroidismo umano. Il Metimazolo è il farmaco più comunemente utilizzato per trattare l'ipertiroidismo nei gatti, specialmente quando lo iodio radioattivo non è prontamente disponibile o a causa del suo costo proibitivo (Trepanier, 2007). Nel 10% dei gatti si verificano disturbi gastro enterici e neutropenia, trombocitopenia, e nel 2-7% dei gatti trattati anche escoriazioni al muso e epatotossicosi. Il farmaco provoca tossicità di cellule epatiche, del sangue e della pelle, provocando reazioni avverse. Queste reazioni idiosincratice il più delle volte richiedono il ricovero in ospedale, e quindi l'uso del farmaco è controindicato. L'ipotesi da verificare era valutare se la terapia potesse generare stress ossidativo, accompagnato da un esaurimento antiossidante in questi gatti, e se la tossicità farmacologica rappresentasse un fattore di rischio da prendere in considerazione sia negli esseri umani che in modelli animali. In uno studio del 2012 alcuni ricercatori hanno cercato di misurare lo stress ossidativo presente nei gatti con ipertiroidismo rispetto ad altri gatti di controllo adulti e di determinare se i marcatori di stress ossidativo individuali possono essere associate a reazioni avverse nella terapia con Metimazolo in gatti ipertiroidei. I risultati suggerivano innanzitutto che, a differenza di quanto si osserva negli esseri umani (Peter et al., 1991), non c'è nel gatto un deficit di GSH paragonabile. Questa apparente disparità tra le due specie potrebbe essere attribuita a differenze nella patogenesi della malattia. Comunque non sono state riscontrate evidenze relative al brusco calo di antiossidanti nel gatto ipertiroideo in trattamento come si verifica nell'uomo.

Il coinvolgimento dello stress ossidativo sulla tiroide però è stato ampiamente studiato in umana, tanto che la stessa tiroide sintetizza ROS e RNS a partire da enzimi come il DUOX, fondamentale per la generazione del perossido di idrogeno, essenziale per la tiroide perossidasi (TPO-) che catalizza la sintesi ormonale. Anche NADPH-ossidasi-4 (NOX4) è un nuovo sistema di generazione di ROS intracellulare recentemente descritto nella tiroide umana. (Mancini et al., 2016)

In conclusione, secondo i risultati di questo studio, nel gatto non si verifica un aumento dello stress ossidativo come nell'uomo e di conseguenza nell'animale ipertiroideo non è necessario un supplemento di antiossidanti con precursori GSH, ascorbato, vitamina E o vitamina A, anche se questo andrebbe verificato ulteriormente in seguito. Esami condotti sull'urina però hanno mostrato un aumento di 8-isoprostani nei gatti ipertiroidei e questo potrebbe aver un valore aggiuntivo nella loro valutazione come potenziale marker di danno renale nei gatti ipertiroidei. (Branter et al., 2012)

#### ☑ INTOSSICAZIONE DA PARACETAMOLO

Un altro farmaco in grado di provocare tossicità dose dipendente nel gatto è il paracetamolo. In genere l'intossicazione da parte di questo composto si verifica poiché i proprietari tendono a somministrarlo erroneamente in caso di febbre, stati dolorifici o altro. L'acetaminofene (APAP) è uno degli ingredienti più comuni, presente nell'armadietto dei medicinali nella maggior parte delle famiglie. L'assunzione di una grande dose di APAP può provocare necrosi epatica grave. Per diverse ragioni, i gatti, sono estremamente sensibili agli effetti tossici di paracetamolo, a causa della carenza di enzimi epatici. Nei gatti l'assunzione di paracetamolo fa formare glucuronidi e molti altri composti che lentamente, o non del tutto, vengono metabolizzati perché nel fegato ci sono minori isoforme di enzimi che mediano la coniugazione, da parte di glucoronil-transferasi (Allen, 2003). Lo stress ossidativo mediato dalla capacità ossidativa del metabolita APAP, in particolare la N -acetil- p -benzoquinoneimina, è considerato essere la causa principale di epatotossicità di APAP (Olaleye e Rocha, 2008). I gatti hanno una relativa assenza di glucoronil-transferasi che coniuga il paracetamolo con l'acido glucuronico. La capacità di detossificazione epatica è quindi inferiore nei gatti rispetto ad altre specie. Una volta che il percorso di solfatazione è saturo, l'acetaminofene persiste nel sangue e più viene

metabolizzato dal citocromo P-450 mediante enzimi NAPQI.

La sintesi del glutathione è soppressa da elevate concentrazioni di paracetamolo e presenza di NAPQI esaurisce rapidamente le riserve di glutathione (Allen, 2003). Quando il glutathione è esaurito, il metabolita reattivo provoca necrosi epatica e altri tessuti. Quindi, il trattamento con APAP comporta una tossicità acuta da gestire tramite la fornitura di gruppi sulfidrilici alternativi o l'inibizione della formazione ossidativa del metabolita reattivo.

La Silimarina, un complesso flavonoide antiossidante derivato dal erbe cardo mariano (*Silybum Marianum*), è stato a lungo utilizzato nella trattamento delle malattie del fegato (Reinhard et al, 2001). Questa proprietà sembra essere dovuta alla sua capacità di combattere i radicali liberi e di chelare ioni metallici.

N-acetilcisteina (NAC) è clinicamente utilizzato per diminuire la tossicità di paracetamolo. In uno studio del 2009 (Avizeh et al., 2009) sono stati arruolati 20 gatti e sono stati rispettivamente divisi in gruppi a cui sono stati somministrati paracetamolo, da solo o in combinazione con N-acetilcisteina o Silimarina, dopo certi tempi stabiliti. Dal presente studio è stato visto che una singola dose di Paracetamolo (150mg/kg) era tossico per i gatti. I risultati hanno mostrato che la Silimarina ha effetto protettivo simile a N-acetilcisteina, se usata nel trattamento di epatotossicità APAP indotta gatti, e potrebbe fornire una terapia utile per i pazienti intossicati. L'attività principale di entrambi i composti è la loro proprietà antiossidante, che li rende utili nella prevenzione di altre tossicità organo-specifiche relative alla induzione di ossidativo lo stress (Varzi et al., 2007).

#### ☑ CISTITE IDIOPATICA ACUTA

La cistite idiopatica acuta è una malattia comune nei gatti maschi, ma anche nelle femmine, che si manifesta attraverso sintomi clinici come ematuria, pollachiuria, disuria e può essere complicata da ostruzione uretrale. Spesso i segni clinici scompaiono dopo 2-7 giorni senza alcun trattamento qualora non ci sia ostruzione. Il problema però è che essa tende a ripresentarsi nei soggetti e quindi è indispensabile pensare ad un approccio terapeutico adeguato. Numerose ricerche, si sono susseguite negli anni ma il carattere idiopatico della patologia, a causa quindi sconosciuta, ne rende difficile la guarigione.

Sicuramente è stato visto che un approccio di natura nutrizionale potrebbe diminuire l'insorgenza della patologia. L'obiettivo sarebbe quello di eliminare i mediatori infiammatori presenti nelle urine aumentando la concentrazione di antiinfiammatori lipidici che aumenterebbero a sua volta il potere di solubilità dei cristalloidi e diminuendo la ritenzione dei cristalli. Diversi studi hanno mostrato che i cibi umidi con acidificanti urinari in scatola mostrano una diminuzione di recidive in cistite idiopatica. (Markwell *et al.*, 1999)

Ad oggi diversi alimenti sono stati formulati con lo scopo di prevenire le recidive ma effettivamente siamo in grado di valutare qualitativamente quali? Sicuramente una dieta ricca di antiossidanti, in grado di prevenire lo stress ossidativo, di omega 3, di magnesio etc. aiuterebbe ma ulteriori studi in proposito sono indispensabili. (Kruger *et al.*, 2015)

Ovviamente andrebbero anche qui caratterizzati i marker di stress ossidativo e valutare la sua incidenza sulla patogenesi della malattia. Per adesso è stato ricercato solo il ruolo sull'utilizzo di antiossidanti, altre informazioni relative alla patologia sono state studiate in ambito di cistite interstiziale, dove è stato visto che l'aumento di specie reattive come ossido nitrico ne aumentano l'insorgenza. L'alterazione della barriera della superficie uroteliale è dovuta ad un aumento dello stress ossidativo come dimostrato nello studio di Binder *et al.* (Binder *et al.*, 2005). Probabilmente questi radicali influenzano anche la patogenesi della cistite idiopatica acuta, ma questo non è stato ancora chiarito.

#### ☑ *BARTONELLA HENSELAE*

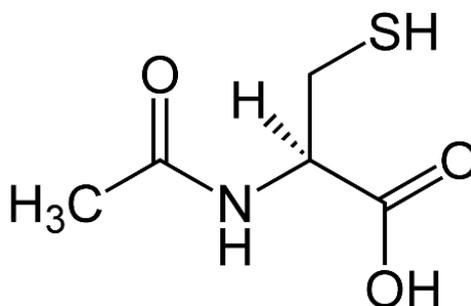
Lo stress ossidativo individuale non deve essere visto esclusivamente come fattore prognostico negativo. Molto spesso, l'invasione da parte di patogeni opportunisti può essere limitata in caso di stress ossidativo già presente nelle cellule dei nostri mammiferi. Questo è il caso di *Bartonella Henselae*, un batterio gram negativo zoonotico che possiede un ciclo di trasmissione indiretto, con l'utilizzo di vettori e provoca malattie nei gatti. Si trasmette all'uomo tramite il morso del gatto o tramite la punture della pulce infetta. Utilizza l'artropode per replicarsi e infine colonizza gli eritrociti, e le cellule endoteliali. Caratteristica di *Bartonella* è la mancanza di un genoma tale da combattere lo stress ossidativo prodotto dall'ospite sia invertebrato che non. Mancano appunto, come in *Escherichia Coli*, geni che codificano per catalasi e perossidasi e quindi la risposta allo stress ossidativo risulta nulla. In condizioni di stress ossidativo il parassitismo di questo

patogeno è dunque rallentato, anche se il batterio utilizza delle strategie per contrastare tali effetti. Innanzitutto tra questi va ricordata la presenza di ferro e manganese può proteggere il patogeno dai vari effetti negativi attivando il SitABCD, trasportatore di ATP per combattere la produzione di perossido di idrogeno. I sistemi antiossidanti che permettono Bartonella di far fronte allo stress ossidativo giocano un ruolo centrale durante il suo ciclo di infezione. E' noto però che senza la produzione di radicali liberi nel gatto, l'infezione da parte del patogeno non avrebbe alcun ostacolo. Comunque l'identificazione dei fattori coinvolti nella risposta ossidativa allo stress potrebbero fornire strategie per chiarire e controllare le infezioni e la trasmissione da Bartonella. (Liu *et al.*, 2013)

### 1.3.4 Stress Ossidativo e N-ACETILCISTEINA: gli effetti della terapia

La ricerca attuale è focalizzata sul fatto che la somministrazione di antiossidanti esogeni se corretta e adeguatamente impostata possa portare un miglioramento delle risposte cliniche nei pazienti ospedalizzati. Scavengers come acetilcisteina (Saad et al., 2013) e acido valproico (Hwabejire et al., 2014), vengono utilizzati per diminuire i livelli di ROS, RNS e RIS e limitare il danno ossidativo (Wu et al., 2009).

N-ACETILCISTEINA o NAC (formula chimica  $C_5H_9NO_3S$ ; Peso Molecolare: 163.2 g/mol) è un composto tiolico che contiene un gruppo sulfidrilico ed è ampiamente utilizzato nella medicina clinica.



NAC è innanzitutto un mucolitico e la sua azione è stata implementata per il trattamento di malattie congestizie e polmonari ostruttive con ipersecrezione.

NAC nell'uomo è utilizzata anche nel trattamento di sindrome da distress respiratorie nell'infezione da HIV, in traumi multipli e in condizioni di SEPSI/SIRS. (Najafi et al., 2014)

La sua attività antiossidante è principalmente legata a due meccanismi (Aruoma et al., 1989):

1. Riduzione diretta di  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  in specie meno reattive, formando radicali di zolfo o di cisteina;
2. Attivazione della biosintesi di GSH, che agisce come scavenger di radicali liberi

e come substrato nel ciclo redox del glutatione.

La perdita della capacità antiossidante in una cellula è dovuta principalmente ad una diminuzione del glutatione e lo stress ossidativo in vivo può essere tradotto come un deficit di glutatione o del suo precursore, la cisteina. (Zafarullah et al., 2003)

Chimicamente, NAC è simile alla molecola di cisteina, ma è meno tossico e meno suscettibile all'ossidazione e dimerizzazione. NAC è più solubile in acqua e, di conseguenza, la sua somministrazione parenterale risulta essere una fonte migliore. Molti studi hanno dimostrato gli effetti di NAC, soprattutto per quanto riguarda la modulazione dell'attività di ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS), riducendo la formazione di citochine infiammatorie e inibendo l'azione di neutrofili (Turut et al., 2009). Diversi studi hanno dimostrato che, il trattamento con NAC, prima che il danno polmonare si verifichi, attenua in modo significativo la risposta infiammatoria durante il processo di ischemia e di ri-perfusione (Geudens et al., 2007) (Forgiarini et al., 2014). Da uno studio recente è emerso che l'uso esogeno di NAC riduce la produzione di radicali ossidrilici e perossidazione lipidica e migliora la contrattilità cardiaca (Wu et al., 2013). Gli studi attuali in Medicina Umana dimostrano che NAC aumenta significativamente GSH per cui il suo uso in un paziente critico acuto è fortemente consigliato. (Ferrari and Andrade, 2015)

Anche in Medicina Veterinaria il valore terapeutico di NAC equivale alla sua attitudine a ridurre l'infiammazione, la fibrosi, l'erosione della cartilagine, e disfunzione endoteliale. (Zafarullah et al., 2003)

NAC è utilizzata per il trattamento dell'intossicazione da paracetamolo nei gatti ed inoltre, è stata usata con successo per trattare tossicosi metalli pesanti (come trattamento in aggiunta alla chelazione) e per sostenere la ripresa dopo l'avvelenamento con *Funghi Amanita spp.* (Avizeh et al., 2009)

NAC è usata anche nel trattamento dei gatti FIV positivi, allo stesso modo in cui viene impiegata nell'uomo poiché è in grado di inibire la replicazione e l'apoptosi virus indotta. (Mortola et al., 1998)

Attualmente è in corso di valutazione come precursore di cisteina e glutatione per l'uso in trattamento delle nefropatie.

NAC ha anche una miriade di altri effetti citoprotettivi, compreso un effetto sul tono vascolare che può migliorare la distribuzione di ossigeno in caso di insufficienza epatica

acuta (ALF) e i suoi effetti comprendono un aumento della pressione arteriosa media. (Schmid and Hovda, 2016)

Gli effetti della NAC sul microcircolo sono considerate correlate soprattutto ai suoi effetti antiossidanti, perché ROS sono un importante stimolo per il reclutamento delle cellule endoteliali di superficie delle cellule. NAC ha inoltre la capacità di migliorare il metabolismo energetico e di aumentare i livelli di GSH epatici. (Atkuri et al., 2007)

In veterinaria NAC veniva somministrata dal 1998 sia in formulazioni orali che endovenosa (Kelly, 1998), anche se ancora non esistevano informazioni riguardanti la sua farmacocinetica studiate sugli animali. Attualmente, essendo NAC un farmaco sicuro, nonostante sono stati segnalati nell'uomo casi di vomito e anoressia (Sandilands et al., 2009), è stato verificato il suo meccanismo d'azione anche nel gatto. (Buur et al., 2013)

L'obiettivo era caratterizzare la farmacocinetica dopo la somministrazione IV e orale di NAC nei gatti sani in modo da perfezionare i regimi di dosaggio per il trattamento di malattie acute e croniche. Dai risultati della ricerca si è potuto dedurre che sia la farmacocinetica sia la biodisponibilità del farmaco, alle dosi di 100 mg/kg per IV o per OS, erano simili ai dati riportati in umana. In entrambi i casi infatti, NAC viene metabolizzata dal fegato rapidamente e può raramente presentare effetti collaterali. Inseguito alla somministrazione parenterale, NAC sembra essere ben tollerato in veterinaria, senza eventi avversi riportati in letteratura. La Dose media Letale (LD 50 ) nei cani risulta essere maggiore di 1000 mg / kg per OS.

Le indicazioni per l'uso in medicina veterinaria di NAC includono la tossicità di acetaminofene e l'anemia con formazione di corpi di Heinz etc. (Zafarullah et al., 2003) A seconda del tipo di patologia da trattare vengono fatte formulazioni diverse: nel paziente acuto, vengono riportate concentrazioni terapeutiche del farmaco a 140mg/kg SID o 70 mg/kg BID IV. (Webster and Cooper, 2009)

Studi clinici prospettici per l'uso di NAC in malattie croniche (ad esempio, cardiomiopatia ipertrofica in gatti) dovrebbero essere condotti per stabilire l'efficacia e la sicurezza a lungo termine dei regimi di dosaggio. (Buur et al., 2013)

La molecola di N-acetilcisteina non ha effetti collaterali e in genere non ci sono limitazioni d'impiego, tuttavia bisogna fare attenzione alla somministrazione concomitante con alcuni farmaci come ad esempio il Monensin.

Il Monensin è un antibiotico ionoforo polietere in grado di uccidere *T. gondii* e cisti bradizoite in vitro e in vivo, inibendo lo spargimento di oocisti infettive da felini sperimentalmente infetti (Couzinet et al., 2000). Caratteristica di questo farmaco è il

meccanismo d'azione in quanto genera nel protozoo una condizione di stress ossidativo tale da determinare l'eccessiva depolarizzazione mitocondriale, con collasso del potenziale di membrana, ed una successivo "burst" che accelera la produzione di ROS, tramite un fenomeno conosciuto come il rilascio di ROS ROS-indotta (Biary et al., 2011). Lo stress ossidativo provoca la morte del parassita. In uno studio recente è stata studiata la farmaco dinamica del prodotto ed è stato visto che, se somministrato in animali in combinazione con NAC riduce il suo effetto antiparassitario, agendo come antagonista. Qualora si aggiunga il composto antiossidante al trattamento farmacologico è interessante notare che i vacuoli del protozoo rimangono per la maggioranza intatti e anche la morfologia dell'apparato del Golgi viene mantenuta. Il protozoo rimane vitale e il trattamento non sarebbe efficace. (Charvat and Arrizabalaga, 2016)

Altri impieghi di N-acetilcisteina in veterinaria sfruttano il suo potenziale potere terapeutico utile per il trattamento di otite esterna dei cani grazie alle sue proprietà antimicrobiche e mucolitiche, e grazie alla sua capacità di interrompere il biofilm batterico. (May et al, 2016).

Un altro studio recente del 2013, ha valutato lo stress ossidativo in soggetti canini ricoverati in terapia intensiva. I risultati in input e output hanno mostrato un evidenza significativa per quel che riguarda la terapia dei soggetti con NAC. Infatti i soggetti trattati durante il ricovero hanno subito un beneficio grazie all'utilizzazione di questa molecola che ha migliorato notevolmente il danno ossidativo (Pasquini et al., 2013). Gli stessi risultati erano stati preventivamente pubblicati dall'indagine di Viviano et al., 2009.

## **Secondo Capitolo: PARTE SPERIMENTALE**

### **LO STRESS OSSIDATIVO DEL PAZIENTE FELINO OSPEDALIZZATO**

#### **2.1 Presupposti scientifici ed Obiettivo dello studio**

In tutti gli organismi viventi esiste un “delicato equilibrio” fra la produzione e l’eliminazione delle cosiddette “specie chimiche ossidanti”. Queste specie chimiche, liberate in determinate condizioni, possono, per diverse ragioni, essere prodotte in abnormi quantità dando origine a Stress Ossidativo. Ma se da un lato, aumenta la risposta pro-ossidante, dall’altro avviene un esaurimento della risposta antiossidante, che al contempo, contribuisce a determinare la rottura dell’equilibrio fisiologico.

Lo Stress Ossidativo è per definizione una condizione patologica, localizzata o sistemica, conseguente ad un’alterazione del bilancio redox cellulare. (Iorio, 2004)

I radicali liberi vengono prodotti durante un insulto e la loro origine è prevalentemente di natura infiammatoria, ischemica o neoplastica. Essi provocano danni alle componenti strutturali delle cellule, con conseguenti manifestazioni su tessuti e organi. Grazie al loro elettrone spaiato, possono infatti ancorarsi a diversi substrati cellulari, modificandoli. Questa modifica comporta la perdita di alcune funzionalità cellulari. (Goodyear-bruch and Pierce, 2002)

I radicali liberi più comunemente prodotti sono i radicali liberi dell’ossigeno (ROS), seguiti da i radicali liberi dell’azoto (RNS) e dell’idrogeno (RIS). I primi sono le specie chimiche più reattive e più pericolose che la cellula è in grado di produrre, la loro reattività consiste nella capacità di strappare un elettrone ad una molecola vicina, ossidandola. E’ per questo che vengono definiti “sostanze pro-ossidanti”.

Finché la risposta ossidante è controbilanciata da quella antiossidante, grazie alla presenza in tutti gli individui di una barriera antiossidante plasmatica e dalla componente esogena, assunta con la dieta, la stabilità viene mantenuta. Qualora però tale risposta si esaurisca, e gli antiossidanti subiscano un significativo decremento, la stabilità viene persa con

conseguenze dannose sia per la cellula che per l'individuo stesso. Lo stress ossidativo non causa di per sé una patologia ma è coinvolto, direttamente o indirettamente, nella patogenesi di numerose malattie a carattere cronico e acuto. E' importante studiare i meccanismi che portano allo sviluppo di tale condizione nel soggetto sano, influenzati dal sesso, dall'alimentazione, dalla condizione fisica (BCS) e dall'invecchiamento cellulare, per poi comprendere il rischio ossidativo nei soggetti critici. (Abilés *et al.*, 2006) Come già precedentemente accennato, ad oggi, molti sono gli studi in Medicina Umana che valutano i cambiamenti del potenziale redox negli individui, specialmente nel paziente critico ospedalizzato (Liu *et al.* 1994; Quinlan *et al.*, 1997; Gokdemir *et al.*, 2012, Duflo *et al.*, 2012); ben pochi invece sono quelli che riguardano l'ambito veterinario. Nel gatto, fino ad oggi, l'incidenza dello stress ossidativo sul paziente felino ospedalizzato non è stata studiata; esistono alcuni lavori che valutano lo status ossidativo nel gatto sano (Castillo *et al.*, 2013; Momoi *et al.*, 2000; Verbrugge *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2015; Campbell *et al.*, 2006; Landsberg *et al.*, 2012) e che sono utili per comprendere le manifestazioni nel soggetto patologico. Inoltre ci sono studi che lo esaminano durante lo sviluppo di malattie, in particolare in quelle con manifestazioni acute quali quelli nei gatti FIV +, FIP +, nei gatti con chetoacidosi, retinopatia diabetica, cistite idiopatica acuta o che subiscono avvelenamenti da paracetamolo o più in generale farmaco tossicità.

La conclusione comune a tali studi è che lo stress ossidativo può comportare distruzione cellulare, causando un aggravamento della salute dei soggetti e un aumento del tasso di mortalità (Webb *et al.*, 2008; Tecless *et al.*, 2015; Sogawa *et al.*, 2010; Fytianou *et al.*, 2005; Branter *et al.*, 2012; Varzi *et al.*, 2007; Binder *et al.*, 2005)..

In base a questi presupposti scientifici, l'obiettivo del presente studio prospettico è stato quello di valutare lo stato ossidativo nel paziente felino ospedalizzato, individuandone la prevalenza e le correlazioni con la malattia e la sua gravità, nonché il suo possibile significato prognostico.

## **2.2 Materiali e Metodi**

### **Disegno dello studio:**

Nella nostra indagine prospettica sono stati inclusi pazienti felini ricoverati nell'Unità di Terapia Intensiva dell'Ospedale Didattico "Mario Modenato" di San Piero a Grado (PI) in un periodo di tempo compreso tra Giugno 2015 e Giugno 2016.

I soggetti rispondevano ad un criterio di inclusione, ovvero che fossero pazienti ricoverati e le cui condizioni consentissero le procedure previste dallo studio.

Ogni paziente è stato valutato al tempo T 0 (ingresso in ICU), e quando possibile, a T 48 (dopo 48 ore dal ricovero) e alle dimissioni (T DIM).

- Le valutazioni effettuate al momento del ricovero (T0) hanno previsto:
  - Il Segnalamento e la determinazione della condizione fisica del soggetto (BCS).
  - La determinazione della gravità della malattia mediante applicazione dello score clinico proprio del paziente critico felino (APPLE SCORE FULL).
  - La determinazione del tipo di patologia in base all'apparato principalmente coinvolto.
  - La determinazione della condizione SIRS/NO SIRS.
  - Lo studio dello stress ossidativo (d-ROMs Test e BAP Test).
  
- Le valutazioni effettuate dopo 48 ore dal ricovero (T48) ed al momento delle dimissioni (TDIM) hanno previsto:
  - L'applicazione della APPLE SCORE FULL.
  - Lo studio dello stress ossidativo (d-ROMs Test e BAP Test).
  
- Infine, le valutazioni effettuate al termine del ricovero, post dimissioni, hanno previsto:
  - La determinazione della presenza di anoressia, di durata variabile, durante il ricovero.
  - L'individuazione della presenza dei corpi di Heinz.
  - La determinazione della sopravvivenza ad una settimana, ad un mese e

totale di tutti i pazienti mediante Follow Up telefonico.

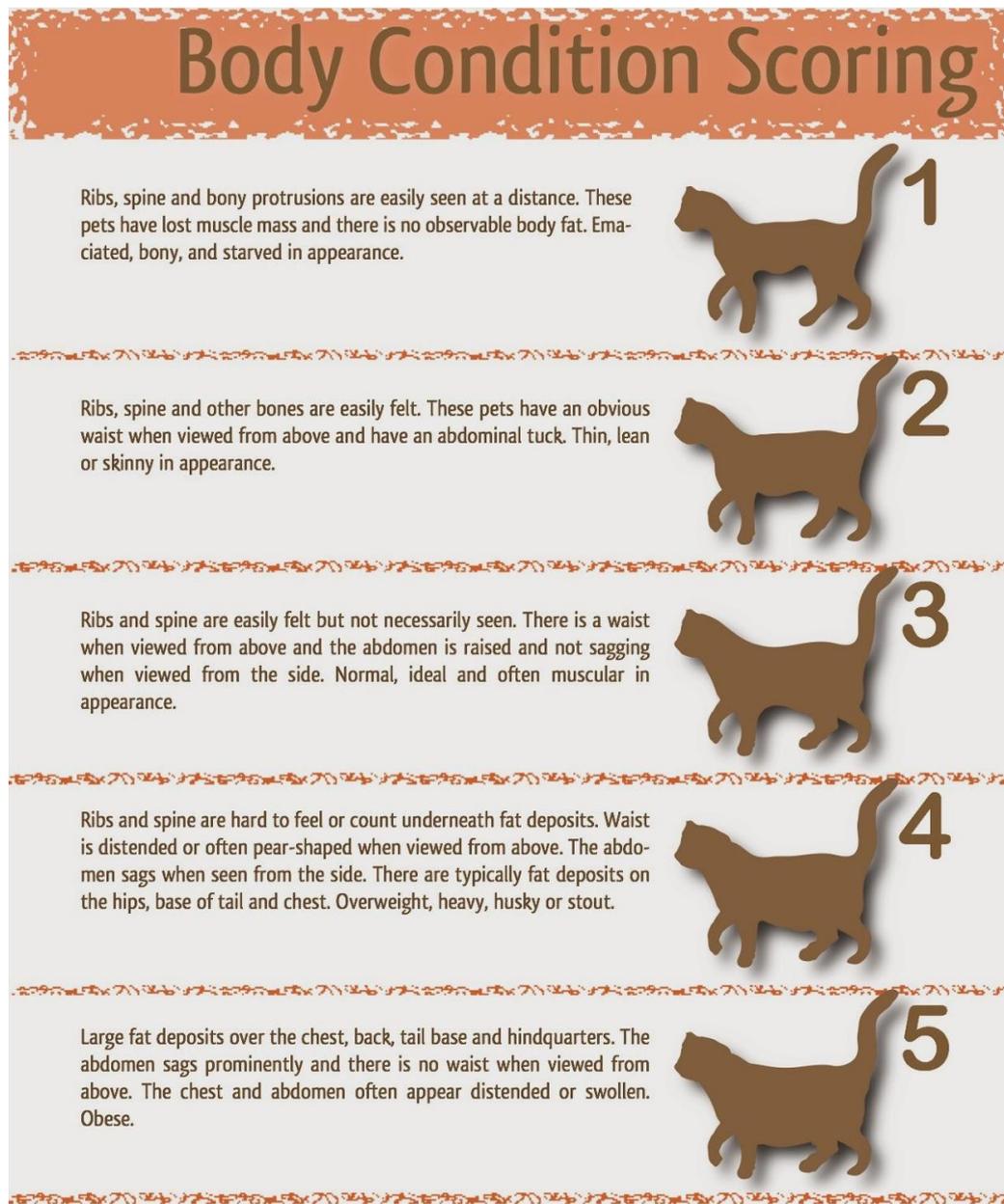
Durante la permanenza in Terapia Intensiva tutti i pazienti hanno ricevuto terapia antiossidante mediante somministrazione endovenosa di N-ACETILCISTEINA al dosaggio consigliato di 70mg/kg BID, oltre alla terapia specifica. Il gruppo di controllo sani non ha ricevuto alcuna terapia antiossidante.

## **Metodologie**

Il segnalamento prevede la raccolta dei dati “anagrafici” di un animale e viene eseguito, durante una visita clinica, per l’inquadramento del soggetto al fine di individuare, qualora ci fossero, fattori patologici predisponenti. Nella nostra analisi ogni soggetto in ingresso nell’Unità di Terapia Intensiva è stato opportunamente caratterizzato in base al sesso, maschio o femmina, ed in base all’età, adulti (1-7 aa) ed anziani (>7 aa).

Il BCS (Body Condition Score) è un metodo di valutazione visiva e tattile che dà la possibilità di valutare la condizione corporea di un animale, basandosi sulla scala da 1 a 5 punti

A prescindere dalla scala che si intende utilizzare si attribuisce generalmente un punteggio basso (vicino allo 0) per un animale emaciato, eccessivamente magro, e punteggi più alti per l’obesità grave. (Figura 5) Il metodo di valutazione si basa sull’osservazione diretta della silhouette dell’animale, in stazione quadrupedale, da un lato e dall’altro, per poi andare ad esercitare una pressione tattile su base della coda o coste per saggiare la copertura adiposa. In base alla percentuale di grasso corporeo si attribuisce il punteggio.



**Figura 5:** Body Condition Score nel gatto, scala da 1-5.

Nella nostra analisi abbiamo deciso di valutare la condizione fisica dei ricoverati considerando sottopeso i soggetti con un BCS di 1-2/5 (BASSO), normopeso i soggetti con BCS di 3/5 (NORMALE), e sovrappeso i soggetti con BCS: 4-5/5 (ALTO).

**“APPLE SCORE FULL”**

La scala Apple è un sistema randomizzato per la valutazione della gravità della malattia in un paziente felino. È la prima scala di sopravvivenza, validata nel gatto, che prende in

considerazione una serie di parametri significativi, a cui si dovrà attribuire un punteggio, il quale darà delle informazioni indispensabili per quantificare il rischio effettivo del nostro paziente. Utilizzando questa scala, potremmo ottenere dunque un punteggio con un alto grado di accuratezza predittiva, facilmente calcolabile manualmente ed in grado di fornire una misura oggettiva che riflette ogni malattia relativa a qualsiasi gatto incluso nella ricerca clinica.

Attualmente sono state elaborate due scale APPLE: La APPLE FULL che prende in considerazione otto parametri e la scala APPLE FAST che ne prende in considerazione cinque (Hayes et al., 2011).

Nella nostra indagine prospettica abbiamo utilizzato la scala APPLE FULL per la determinazione della gravità della malattia nei nostri pazienti, ritenendola più completa.

Hayes et al

			Mentation score 0	<b>4</b> 1	<b>7</b> 2	<b>8</b> 3	<b>9</b> 4		
	<b>6</b> <36.1	<b>4</b> 36.1-37.0	<b>3</b> 37.1-38.5	Temperature (C) 38.6-39.4	<b>1</b> >39.4				
<b>9</b> <61		<b>4</b> 61-100		MAP (mmHg) 101-140	<b>1</b> >140				
				lactate (mmol/L) 0-1.9	<b>5</b> 2.0-4.0	<b>6</b> 4.1-7.0	<b>9</b> >7.0		
				PCV(%) <11	<b>11</b> 11-20	<b>16</b> 21-30	<b>14</b> 31-40	<b>13</b> 41-45	<b>17</b> >45
<b>11</b> <14.9		<b>7</b> 14.9-21.3		Urea (mg/dL) 21.4-24.9	<b>12</b> 25.0-32.5	<b>7</b> 32.6-69.8	<b>6</b> >69.8		
<b>12</b> <111		<b>9</b> 111-115	<b>11</b> 116-118	Chloride (mEq/L) 119-122	<b>11</b> 123-125	<b>7</b> >125			
				Body cavity fluid score 0	<b>3</b> 1	<b>6</b> 2			

**Figura 6:** Feline Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (APPLE FULL) score. (Hayes et al., 2011)

Per l'utilizzo di questa scala abbiamo calcolato la somma di ciascun numero nella cella per ciascuno degli 8 parametri, con un valore massimo di 80.

Per i valori compresi nel range centrale abbiamo calcolato 0 punti, mentre per le celle laterali i punteggi sono diversi a seconda del range (numeri in **grassetto**). Analizziamo adesso parametro per parametro:

- Per **Mentation score** e **Body cavity fluid score** vengono utilizzati gli algoritmi sotto riportati:

- Algoritmo per la valutazione del MENTATION SCORE (dev'essere calcolato al momento del ricovero)

**0:** Normale

**1:** Responsivo, sta in stazione senza aiuto.

**2:** può stare in stazione se aiutato, responsivo ma depresso.

**3:** incapace di reggere la stazione, ma responsivo.

**4:** incapace di reggere la stazione e non responsivo.

- Algoritmo per la valutazione del BODY CAVITY FLUID SCORE:

**0:** no fluido in cavità corporea.

(Assegnare 0, qualora storia e esame fisico non riescono a stabilirlo)

**1:** presenza di fluido o addominale o toracico o pericardico.

**2:** fluido a due o più livelli: addome e/o torace e/o pericardio.

- La TEMPERATURA viene misurata mediante termometro rettale e espressa in gradi Celsius (°C)
- La MAP può essere misurata con esame manometrico indiretto o con doppler e deve essere calcolata con media di tre misurazioni consecutive.
- I LATTATI e il CLORO sono stati misurati mediante emogas venoso: un campione di sangue di vena giugulare o periferica è stato prelevato in una siringa eparinizzata ed è stato letto dall' emogasanalizzatore ABL serie 700 XP (A. De Mori)
- L'UREA e il PCV sono stati misurati mediante esame emato-biochimico, tramite lo strumento Liasys (ASSEL srl) e il contaglobuli PROCITEX (IDEXX) rispettivamente.

Una volta misurati i valori ed attribuiti i punteggi è stata applicata la formula della scala APPLE FULL per stabilire in valore percentuale la probabilità di mortalità di un soggetto: (Hayes et al., 2011)

Where p=mortality probability and R=logit p

feline APPLE<sub>full</sub> score:  $p_1 = \exp(R_1) / (1 + \exp[R_1])$

$R_1 = (0.213 \times \text{APPLE}_{full}) - 9.472$

*Figura 7: Formula di calcolo Feline Apple score (Hayes et al., 2011)*

### **APPARATI COINVOLTI nella malattia**

Sui pazienti inclusi nel nostro studio abbiamo individuato la malattia primaria, motivo del ricovero, in base all'apparato coinvolto. Il nostro gruppo includeva pazienti ricoverati in urgenza per la maggior parte scompensati, secondariamente a traumi di diversa natura o clinicamente malati, aventi diversi tipi di malattie, di variabile gravità, ognuna opportunamente diagnosticata.

Questi pazienti critici ospedalizzati sono stati divisi quindi in diversi gruppi che comprendevano la classificazione in base all'apparato prevalentemente coinvolto.

<b>APPARATO/ SISTEMA</b>	<b>ABBREVIAZIONE</b>
<b>CARDIO-CIRCOLATORIO</b>	C
<b>GASTRO-ENTERICO</b>	GE
<b>NERVOSO</b>	N
<b>URINARIO/RENALE</b>	U
<b>ALTRI APPARATI:</b>	A

*Tabella 1: legenda apparati.*

## **SIRS**

I quadri SIRS/NO SIRS sono stati classificati adottando i criteri diagnostici definiti nello studio di Okano et al., 2002 tra:

- ❖ Bradicardia (HR <140 bpm) o tachicardia (HR > 225 bpm)
- ❖ Tachipnea (RR > 40 bpm/min)
- ❖ Ipertermia (> 39,7 °C) o ipotermia (< 37 °C)
- ❖ Leucopenia (<5000 WBC / ml) o leucocitosi (> 19.000 WBC / ml).
- ❖ Più del 5% di neutrofili banda

Per dire che un paziente era in sirs doveva rispondere almeno a 2 di questi criteri.

## **STUDIO DELLO STRESS OSSIDATIVO**

### Prelievo e conservazione dei campioni:

Il prelievo ematico è stato effettuato dalla vena giugulare, previa tricotomia e disinfezione della parte, e il campione è stato inserito in provetta da siero, contenenti all'interno micro particelle di silice e granuli di polistirene. Il campione è stato poi posizionato all'interno di un termostato per 10 minuti a 37 °C, lasciato coagulare e poi centrifugato, in apposita centrifuga. Il siero ottenuto è stato diviso in due aliquote e congelato a -20°C fino al momento in cui è stato analizzato.

### ANALISI DEI CAMPIONI

I test che abbiamo effettuato per la ricerca dello stress ossidativo sui nostri campioni sono il **d-ROMS Test**, per la ricerca delle specie reattive dell'ossigeno, e il **BAP Test**, per i sistemi di difesa antiossidanti.

Il **d-ROMs Test (DIACRON INTERNATIONAL, SRL)** è un test in grado di effettuare una determinazione colorimetrica dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (derivati dei radicali liberi) sul plasma e sul siero.

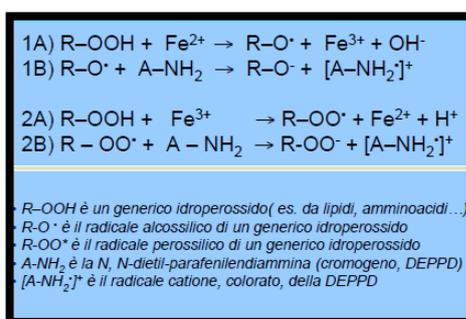
Il d-ROMs Test misura la capacità "ossidante" di un campione di siero nei confronti di una particolare sostanza (un'ammina aromatica modificata) usata come indicatore (cromogeno). Il fenomeno si associa al graduale e progressivo viraggio verso il rosa della

miscela di reazione (siero/plasma + cromogeno), dapprima incolore. La variazione cromatica è misurata attraverso un particolare dispositivo (fotometro) che, in definitiva, converte in un “numero” la capacità ossidante così determinata. Contribuiscono a determinare la capacità ossidante misurata dal d-ROMs Test soprattutto i radicali alcossili e idroperossili, derivati dagli idroperossidi (ROOH). Infatti, la sigla d-ROMs sta per “derivati” (d-) dei “ROMs” ossia dei “metaboliti reattivi dell’ossigeno” (*reactive oxygen metabolites*), la classe di cui fanno parte, appunto, gli idroperossidi.

Gli idroperossidi sono composti generati dall’ossidazione di un’ampia classe di molecole di interesse biologico (glucosidi, lipidi, amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, ecc) che, in opportune condizioni, possono generare radicali liberi. Essi sono considerati indicatori (“marker”) specifici di attività ossidante.

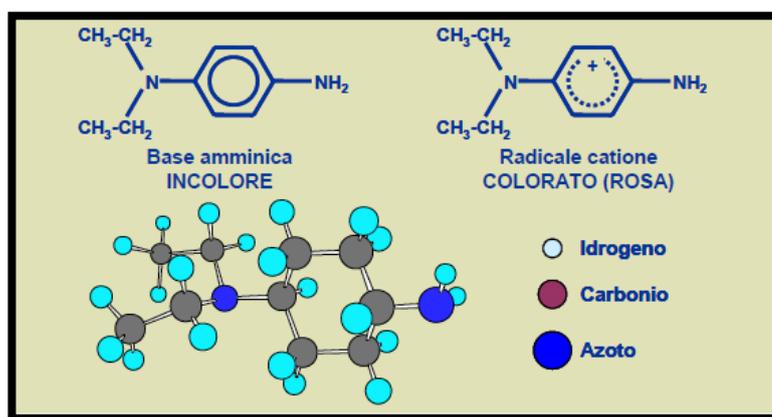
In questo test i ROM contenuti nel campione biologico da analizzare, in presenza di ferro (liberato dalle proteine plasmatiche da un tampone acido a pH 4.8, il reagente R<sub>2</sub> del kit) generano, per la reazione di Fenton, radicali alcossilici e perossilici che reagendo con l’ammina aromatica (A-NH<sub>2</sub> nel reagente R<sub>1</sub> del kit) la ossidano trasformandola in A-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> e in questo modo il derivato si colora di rosa.

Nel kit è presente anche un calibratore costituito da siero liofilo indispensabile per calibrare l’apparecchio che verrà utilizzato per la lettura fotometrica.



**Figura 8:** Reazioni radicaliche d-ROMs TEST (Iorio, 2006)

L’intensità del colore sarà direttamente proporzionale al quantitativo dei ROM presenti nell’aliquota, in accordo con la legge di Lambert-Beer.



**Figura 9:** Forme di Cromogeno d-ROMs TEST (Iorio, 2006)

Per quanto riguarda la procedura utilizzata abbiamo inserito in una cuvetta di lettura 1000  $\mu\text{l}$  di  $R_1$ , 10  $\mu\text{l}$  di  $R_2$ , e 20  $\mu\text{l}$  di siero. Le soluzioni così preparate sono state mescolate delicatamente e lasciate incubare per qualche minuto a 37°C. Finita l'incubazione, una volta sviluppatasi la colorazione rosacea, il campione è stato letto dallo spettrofotometro, misurando l'adsorbanza a 505 nm. La macchina era stata precedentemente calibrata tramite la lettura di un bianco reagente, fornito dal kit e opportunamente preparato. L'unità di misura che viene presa in considerazione in questo test è l'unità Caratelli (U CARR), in cui 1 U CARR corrisponde a 0,08 mg di  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{dl}$ . Quest'unità di misura è stata precedentemente calcolata utilizzando la formula:

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

Ove:

**$\Delta\text{abs/min}$**  sono le differenze medie dei valori di assorbanza misurati al 1°, 2° e 3° minuto.

**F** è un fattore di correzione con un valore predeterminato.

Il range normale del test, in medicina umana, disponibile anche per analizzatori multipli, è compreso fra 250 e 300 U CARR. (Gerardi et al., 2002)

Interessanti anche i dati ottenuti in medicina veterinaria da studi eseguiti su diversissime specie animali, dai pesci agli uccelli, dai cani ai maiali, dalle mucche ai cavalli etc.

Nei soggetti felini sani il d-ROMs assume un valore compreso fra 72,0 e 282,0 UNITÀ CARR (U CARR), che ne rappresenta anche l'intervallo o range di normalità. Valori

superiori a 282 U CARR sono indicativi di una condizione di stress ossidativo. I valori di riferimento riportati sui gatti sani nel lavoro di Castillo et al., 2013, sono riportati nella tabelle seguenti: **Tabella 2** (classificazione per età) e **Tabella 3** (classificazione per sesso).

Castillo et al

**Table 1** Mean values [ $\pm$  standard error (SE)] of redox balance in cats from this study grouped by age

Parameter	Group (age, years)	Mean ( $\pm$ SE)	P	Minimum	Maximum
d-ROM CarrU	2-7	155.9 $\pm$ 13.2	0.046	90.6	282.0
	>7 and <12	126.4 $\pm$ 7.6			

**Tabella 2:** Risultati d-ROMs TEST, classificazione per sesso (Castillo et al., 2013).

Castillo et al

**Table 2** Mean values [ $\pm$  standard error (SE)] of redox balance in cats from this study grouped by gender

Parameter	Group	Mean ( $\pm$ SE)	Student's t-test	Minimum	Maximum
d-ROM CarrU	FEM	123.0 $\pm$ 6.7	0.013	78.0	184.3
	MAL	158.8 $\pm$ 13.2			

**Tabella 3:** Risultati d-ROMs TEST, classificazione per età (Castillo et al., 2013).

I risultati di numerosi studi indicano che il d-ROMs test sia un test affidabile, preciso, ripetibile, con accettabili coefficienti di variazione inter- ed intra-serie, anche quando eseguito con procedure manuali (1-3%) (Hayashi et al., 2007).

In linea di massima, valori elevati del d-ROMs Test si potranno osservare in soggetti esposti a fattori di rischio per lo stress ossidativo (es. esercizio fisico inadeguato, diete quanti/qualitativamente sbilanciate ecc.) o a patologie associate ad alterazioni del bilancio ossidativo (es. malattie cardiovascolari, disordini neurodegenerativi, sindrome metabolica, tumori, ecc.) o a trattamenti in grado di aumentare il livello di specie ossidanti (es. trattamenti con radio/chemioterapici, dialisi, interventi di by-pass, ecc.). Nella nostra indagine queste affermazioni dovranno essere verificate in base ai nostri risultati.

Il **BAP Test** è un test per la determinazione colorimetrica del potenziale biologico antiossidante. La sua invenzione prende avvio da uno dei fenomeni ossidativi più comuni che si possono riscontrare in natura e cioè dalla formazione della ruggine a partire dal ferro. In questi processo il ferro passa dal suo stato metallico originale a quello di ossido

ferroso o, addirittura, ferrico. In termini tecnici si dice che il ferro si trasforma dal suo stato elementare ( $Fe^0$ ) a quello di ione ferroso ( $Fe^{2+}$ ) o ferrico ( $Fe^{3+}$ ), tipici dei rispettivi “ossidi”. Ciò accade ogni qualvolta in ferro viene a diretto contatto con un ossidante, cioè un agente in grado di strappargli due o tre elettroni, rispettivamente. Appare evidente che qualsiasi agente in grado di riportare in ferro dal suo stato ferrico a quello ferroso può essere considerato un riducente e, nel presente contesto, un antiossidante. E' su queste basi che nasce il BAP Test, come test fotometrico che consente, sostanzialmente, di determinare la concentrazione ematica delle sostanze antiossidanti nella loro azione di agenti in grado di ridurre il ferro dalla forma ferrica a quella ferrosa. Così concepito, il BAP Test fornisce una misurazione globale di molti antiossidanti, quali la bilirubina, l'acido urico, le vitamine C ed E e le proteine. Il BAP Test è utile per valutare anche l'efficacia di trattamenti specifici messi in atto in numerose patologie correlate con lo stress ossidativo. (Iris et al., 1996)

Per l'esecuzione del test abbiamo mescolato i seguenti reagenti: 1000  $\mu$ L di reagente  $R_1$  (cromogeno, tiocianato), 50  $\mu$ L di  $R_2$  (cloruro ferrico), e 10  $\mu$ L di campione di siero. Anche nel caso del BAP test è opportuno utilizzare un calibratore, fornito nel kit, come il siero liofilo umano.

L'entità della decolorazione, rilevata per via fotometrica come cambio di assorbanza, sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di agenti in grado di riportare il ferro alla sua forma ferrosa, ossia al potenziale biologicamente attivo.

Sulla base dei dati finora pubblicati, il BAP test è un test affidabile, preciso, ripetibile (<5% di errore). Con questo test è possibile misurare i componenti della barriera antiossidante plasmatica, chimicamente attivi, definiti “*scavengers*”.

Nei soggetti sani (in umana) il BAP Test assume un valore superiore a 2200  $\mu$ mol/L che viene considerato come il valore ottimale. In pratica in condizioni normali 1 ml di plasma possiede un potenziale antiossidante tale da ridurre 2.2  $\mu$ mol di ferro per litro. Valori inferiori a 2200  $\mu$ mol/L sono indicativi di una condizione di stress ossidativo da abbassamento delle difese antiossidanti.

Il limite inferiore di quantificazione è 418  $\mu$ mol/L. La linearità è massima nel range tra 800 e 10.000  $\mu$ mol/L. L'unica interferenza finora segnalata è legata alla concentrazione lipidica: un plasma iperlipemico può indurre una sottostima dei valori. Nel nostro studio segnaleremo un'ulteriore interferenza data dal campione itterico, in cui la lettura degli antiossidanti, sembra notevolmente ridotta. In assenza di malattia, i risultati del BAP test mostrano una tendenza alla riduzione, rispetto al range di normalità, negli anziani. Per il

resto, non è documentata alcuna dipendenza dei valori ottenuti dal sesso, dalla razza o da altre condizioni fisiologiche o para-fisiologiche. (Iris et al., 1996)

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

**Figura 10:** Gravità dello stress ossidativo in rapporto ai valori forniti dal BAP test nell'uomo (Iorio, 2006).

In medicina veterinaria il BAP Test è il test più utilizzato per la determinazione degli antiossidanti e viene utilizzato in larga misura in tutte le specie. Sconosciuta è la ragione per cui questo test non sia mai stato effettuato nel gatto, su cui non è stato ancora pubblicato niente in letteratura.

Avendo preso in considerazione l'idea di utilizzarlo per la determinazione antiossidante nel nostro studio, abbiamo dovuto stabilire un range di riferimento, selezionando venti gatti sani. Questi ultimi sono stati scelti previa visita clinica e profilo emato biochimico di base. Anche per i soggetti sani lo studio della capacità antiossidante plasmatica ha previsto le stesse modalità effettuate nel patologico: prelievo ematico dalla vena giugulare, centrifugazione del campione, conservazione a -20°C ed esecuzione BAP test.

### Interpretazione dei risultati

Per tale valutazione è stato utilizzato il lavoro di Iorio del 2005 in cui si studia lo stato ossidativo nella relazione dinamica di ROS e BAP, con le seguenti interpretazioni:

ROS	BAP	SIGNIFICATO CLINICO
Diminuito	Diminuito	Iporeattività organica generale
Diminuito	Ottimale	Iporeattività organica relativa
Ottimale	Ottimale	Bilancio ossidativo ottimale
Ottimale	Diminuito	Stress ossidativo relativo
Aumentato	Ottimale	Squilibrio compensato di stress ossidativo
Aumentato	Diminuito	Stress ossidativo

**Tabella 4:** Il rapporto ROS/BAP.

## 2.2.1 Analisi statistica

Per quanto riguarda l'analisi statistica sono stati analizzati diversi test statistici utilizzando il programma StatGraphics Plus. In primo luogo è stata verificata la distribuzione, normale o meno, dei valori dei parametri considerati in modo da applicare metodi parametrici o non parametrici.

Utilizzando **l'ANOVA a più fattori**, abbiamo effettuato l'analisi della varianza rispetto al tempo T0, considerando come variabile dipendente la somma APPLE SCORE, i ROS, i BAP e il loro RAPPORTO e come fattori il SESSO e l'ETA'. Lo stesso test è stato utile per determinare la varianza tra BCS, apparati coinvolti, sirs/no sirs rispetto ai ROS, ai BAP, ai ROS/BAP e alla somma APPLE. **IL TEST ANOVA** è un test parametrico che permette di individuare quali fattori hanno un effetto statisticamente significativo sulla variabile dipendente. Tale test è stato utilizzato anche come **analisi di varianza ad una via** per i ROS, per i BAP, per il loro RAPPORTO e SOMMA APPLE SCORE per i tre diversi livelli di tempo (T 0, T 48, T DIM).

Ottenuti i risultati dai test parametrici ANOVA, abbiamo verificato la loro distribuzione e l'omogeneità dei gruppi tramite il **Test dei range multipli, con la funzione LDS, tramite test di FISHER**. Questo test indica quali medie sono significativamente diverse dalle altre. La variabilità nel tempo è stata misurata anche tramite il test non parametrico della **mediana di Mood**, poiché i dati non risultavano equamente distribuiti. Qualora il P-value sia maggiore o uguale a 0,05, non c'è una differenza statisticamente significativa tra le mediane con un livello di confidenza del 95,0%.

Abbiamo poi provveduto ad effettuare test di regressione. La **regressione semplice** viene effettuata per ottenere delle informazioni sulle relazioni che intercorrono tra gli elementi selezionati come variabili dipendenti o indipendenti nelle nostre campagne di misura, ovvero tra ROS, BAP, ROS/BAP e SOMMA APPLE SCORE. Il modello lineare utilizzato nelle regressioni da noi effettuate è:

$$Y = a + b * X$$

Sono stati eseguiti anche test di **Correlazioni multiple di Pearson** tra i fattori.

Per l'indagine sulla sopravvivenza è stato effettuato il test ANOVA per ogni variabile in base al fattore tempo e il **Kaplan-Meier**, usato per stimare la funzione di sopravvivenza con dati relativi alla durata di vita tramite una funzione di distribuzione empirica.

## 2.3 Risultati

La popolazione felina inclusa nello studio è costituita da 40 gatti di varie razze, 20 femmine e 20 maschi, 20 adulti (1-7aa) e 20 anziani (7-19aa).

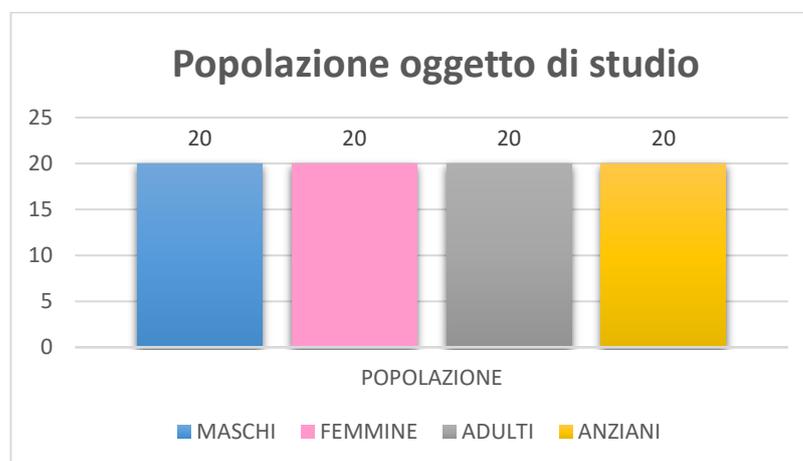


Figura 11: Popolazione oggetto di studio

Come precedentemente accennato l'analisi dei soggetti (50% femmine, 50% maschi, 50% adulti, 50% anziani) inclusi nella nostra ricerca ha previsto la determinazione della condizione fisica dei soggetti applicando il body condition score a 5 punti.

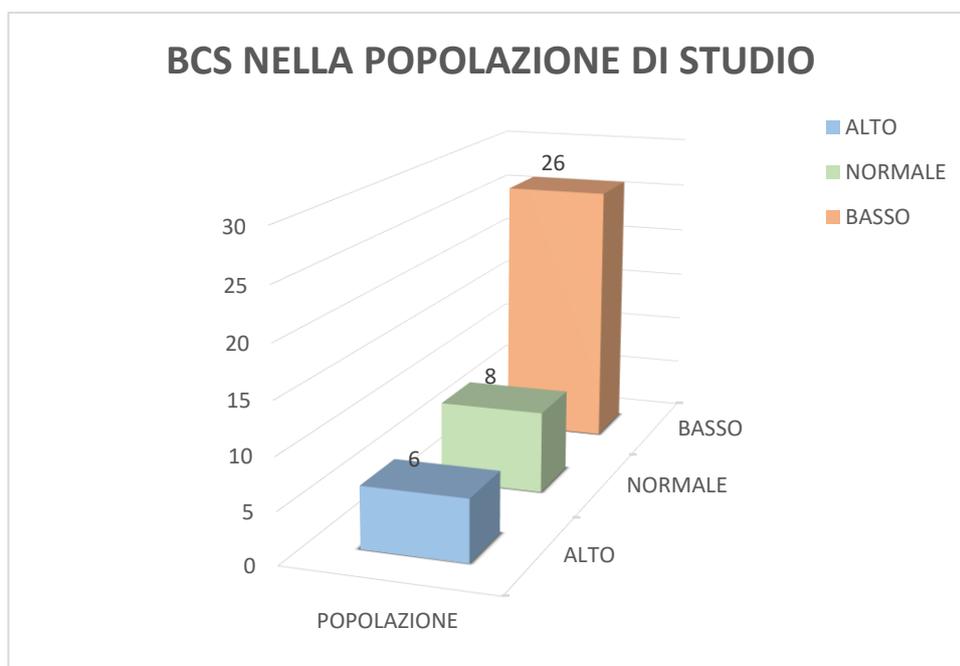


Figura 12: BCS a 5 punti

L'applicazione della scala di riferimento (APPLE SCORE FULL) per la determinazione della gravità della malattia è stata utilizzata su tutti i soggetti al tempo T0, per 20 soggetti al tempo T48 e per 17 soggetti alle dimissioni. La scala determinata sui nostri casi di studio va da un minimo di 22 ad un massimo di 58 (Tabella 5).

SOGGETTI	T°	MentationScore	T° (C°)	MAP (mmHg)	LATT (mmol/L)	PCV (%)	Urea (mg/dL)	Cl (mEq/L)	BCF	SOMMA APPLE	R1	PROBABILITA' (%)
1	T0	0	3	1	5	16	6	0	0	31	-2,869	5,4%
2	T0	0	4	0	0	16	6	7	0	33	-2,443	8,0%
3	T0	7	3	0	0	14	6	9	0	39	-1,165	23,8%
4	T0	4	6	1	5	11	6	0	0	33	-2,443	8,0%
5	T0	9	6	0	0	13	7	11	0	46	0,326	58,1%
6	T0	3	0	1	0	16	7	0	3	30	-3,082	4,4%
7	T0	8	6	4	5	14	6	12	3	58	2,882	94,7%
8	T0	0	0	0	0	14	7	11	0	32	-2,656	6,6%
9	T0	0	6	0	0	17	6	7	0	36	-1,804	14,1%
10	T0	4	3	1	6	14	7	0	0	35	-2,017	11,7%
11	T0	4	4	1	5	11	6	9	3	43	-0,313	42,2%
12	T0	0	0	0	0	16	7	11	3	37	-1,591	16,9%
13	T0	3	3	0	5	11	6	0	3	31	-2,869	5,4%
14	T0	0	3	1	0	16	7	7	3	37	-1,591	16,9%
15	T0	0	3	1	0	16	6	0	0	26	-3,934	1,9%
16	T0	7	3	4	0	16	6	9	6	51	1,391	80,1%
17	T0	0	4	0	5	17	6	11	3	46	0,326	58,1%
18	T0	0	4	4	0	14	12	7	3	32	-2,656	6,6%
19	T0	4	0	0	0	14	12	12	3	45	0,113	52,8%
20	T0	4	3	1	5	14	7	11	3	48	0,752	68,0%
21	T0	7	3	1	0	14	7	12	0	44	-0,1	47,5%
22	T0	8	3	1	0	16	6	11	0	45	0,113	52,8%
23	T0	4	3	1	5	11	7	11	0	42	-0,526	37,1%
24	T0	4	0	1	0	13	7	0	0	25	-4,147	1,6%
25	T0	9	0	1	5	16	12	11	0	54	2,03	88,4%
26	T0	0	4	4	0	14	12	11	0	45	0,113	52,8%
27	T0	0	3	1	5	16	6	0	0	31	-2,869	5,4%
28	T0	4	4	1	6	13	6	7	3	44	-0,1	47,5%
29	T0	4	3	0	5	16	6	0	0	34	-2,23	9,7%
30	T0	0	3	0	5	14	7	0	0	29	-3,295	3,6%
31	T0	0	6	0	9	14	12	0	0	41	-0,739	32,3%
32	T0	0	3	1	0	14	7	9	3	37	-1,591	16,9%
33	T0	0	0	0	5	12	6	0	3	26	-3,934	1,9%
34	T0	0	3	0	5	16	0	0	3	27	-3,721	2,4%
35	T0	0	3	0	0	14	7	9	3	36	-1,804	14,1%
36	T0	7	6	4	5	16	7	9	3	53	1,817	86,0%
37	T0	7	3	0	6	13	7	0	0	37	-1,591	16,9%
38	T0	7	3	1	5	11	12	0	0	38	-1,378	20,1%

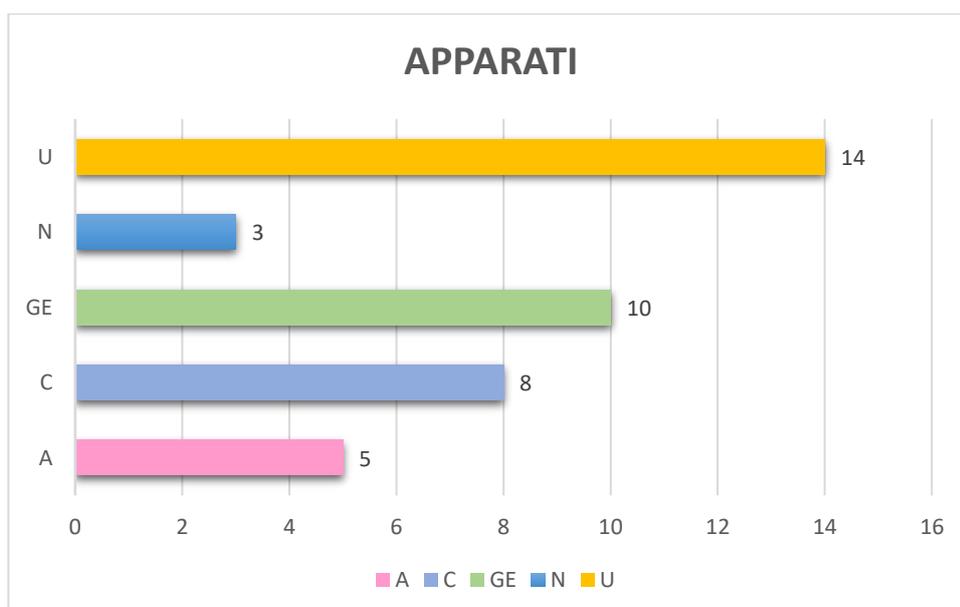
39	T0	0	0	0	0	14	7	0	0	22	-4,786	0,8%
40	T0	4	0	1	5	14	7	11	0	42	-0,526	37,1%
<b>SOGGETTI</b>	<b>T°</b>	<b>MentationScore</b>	<b>T° (C°)</b>	<b>Map (mmHg)</b>	<b>LATT (mmol/L)</b>	<b>Pcv (%)</b>	<b>Urea (mg/dL)</b>	<b>Cl (mEq/L)</b>	<b>BCF</b>	<b>SOMMA APPLE</b>	<b>R1</b>	<b>PROBABILITA' (%)</b>
1	T48	0	3	1	5	16	6	9	0	40	-0,952	27,8%
2	T48	4	0	1	0	16	7	7	0	35	-2,017	11,7%
3	T48	0	3	1	5	14	6	11	0	40	-0,952	27,8%
4	T48	0	3	1	5	13	7	0	0	29	-3,295	3,6%
5	T48	9	3	0	0	13	7	11	0	43	-0,313	42,2%
6	T48	3	3	4	0	13	6	11	0	40	-0,952	27,8%
7	T48	8	0	0	5	14	7	9	3	46	0,326	58,1%
8	T48	0	0	0	0	14	12	11	0	37	-1,591	16,9%
9	T48	0	4	0	0	17	6	7	0	34	-2,23	9,7%
10	T48	4	3	1	6	16	7	0	0	37	-1,591	16,9%
11	T48	4	4	0	6	11	6	11	3	45	0,113	52,8%
12	T48	0	0	0	5	16	7	11	0	39	-1,165	23,8%
13	T48	4	3	1	5	16	6	11	3	49	0,965	72,4%
14	T48	3	3	1	0	11	12	0	3	33	-2,443	8,0%
15	T48	0	4	1	0	16	7	11	0	39	-1,165	23,8%
16	T48	4	3	0	0	16	6	9	6	44	-0,1	47,5%
17	T48	0	3	0	5	11	6	0	3	28	-3,508	2,9%
18	T48	4	3	0	0	14	7	7	3	31	-2,869	5,4%
19	T48	4	0	0	5	16	12	12	3	52	1,604	83,3%
20	T48	4	0	0	0	13	7	0	3	27	-3,721	2,4%
<b>SOGGETTI</b>	<b>T°</b>	<b>MentationScore</b>	<b>T° (C°)</b>	<b>Map (mmHg)</b>	<b>LATT (mmol/L)</b>	<b>Pcv (%)</b>	<b>Urea (mg/dL)</b>	<b>Cl (mEq/L)</b>	<b>BCF</b>	<b>SOMMA APPLE</b>	<b>R1</b>	<b>PROBABILITA' (%)</b>
1	TDIM	4	3	1	0	16	6	11	0	41	-0,739	32,3%
2	TDIM	0	0	1	0	16	6	0	0	23	-4,573	1,0%
3	TDIM	8	3	0	5	14	7	0	0	37	-1,591	16,9%
4	TDIM	9	3	0	0	16	7	11	0	46	0,326	58,1%
5	TDIM	7	3	0	0	0	6	9	0	25	-4,147	1,6%
6	TDIM	7	0	0	0	14	7	11	3	42	-0,526	37,1%
7	TDIM	0	3	1	0	14	12	11	0	41	-0,739	32,3%
8	TDIM	0	4	0	0	17	6	11	0	38	-1,378	20,1%
9	TDIM	0	3	4	5	16	7	11	0	46	0,326	58,1%
10	TDIM	4	6	4	5	11	6	11	3	50	1,178	76,5%
11	TDIM	4	1	0	5	14	7	11	0	42	-0,526	37,1%
12	TDIM	4	3	1	5	16	6	0	3	38	-1,378	20,1%
13	TIDM	0	3	1	0	16	7	11	0	38	-1,378	20,1%
14	TDIM	4	3	1	0	16	6	12	6	48	0,752	68,0%
15	TDIM	0	4	1	5	14	6	0	3	33	-2,443	8,0%
16	TDIM	4	4	0	0	14	7	0	3	25	-4,147	1,6%
17	TDIM	4	0	0	5	16	7	11	3	46	0,326	58,1%

**Tabella 5:** Applicazione Apple score full ad ogni caso di studio nel tempo

Nella tabella seguente vengono riportati i valori di media e mediana in relazione alla Apple score e alla probabilità di sopravvivenza rispetto ai diversi tempi di ricovero. I punteggi medi si aggirano intorno al valore 38 per tutti e tre i gruppi, mentre i valori mediani tendono ad aumentare da 37 (T0), a 39 (T48), a 41 (TDIM). La probabilità di sopravvivenza dell'animale, calcolata secondo l'apposita formula (Figura 7) rispecchia i valori della Apple score.

	APPLE SCORE	PROBABILITA' (%)
<b>Media T0</b>	36,54135986	39,29%
<b>Mediana T0</b>	38,88235294	26,25%
<b>Media T48</b>	35,14796274	56,64%
<b>Mediana T48</b>	38,76470588	32,30%
<b>Media T DIM</b>	30,36543945	65,55%
<b>Mediana T DIM</b>	35,88235294	32,24%

Oltre alla determinazione della gravità della malattia i soggetti sono stati classificati in base all'apparato primariamente coinvolto in seguito alla diagnosi clinica di malattia primaria (Figura 9). Gli apparati coinvolti principalmente sono il nervoso, il cardio-circolatorio, il gastro-enterico, l'urinario/renale. La categoria "Altri apparati" indica il coinvolgimento di apparati come il respiratorio, il riproduttivo o l'endocrino per cui avevamo scarsa casistica.



**Figura 13:** Grafico conteggio apparati del caso di studio.

Legenda apparati:

U: urinario/renale

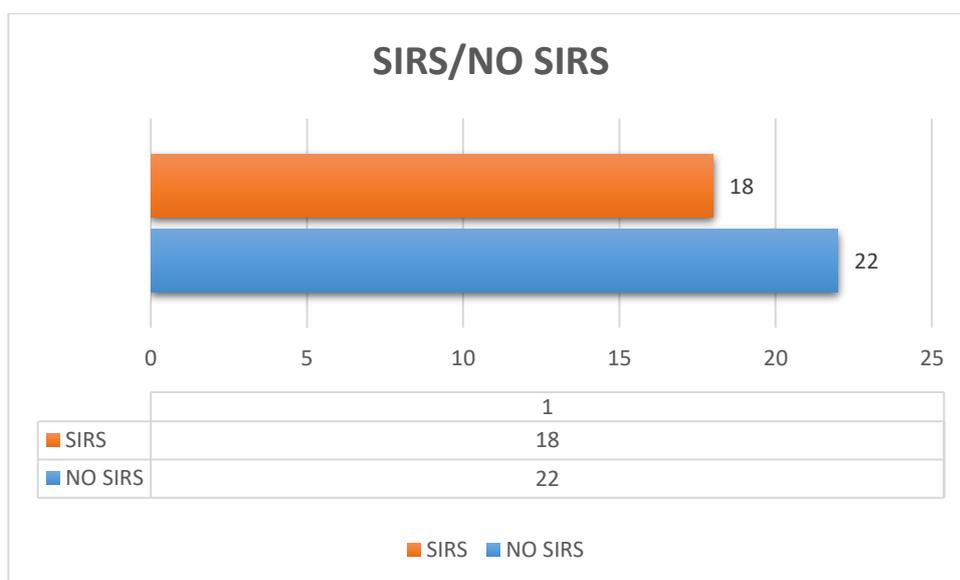
N: nervoso

GE: gastro-enterico

C: cardio-circolatorio

A: altri apparati.

In base alla condizione di SIRS, i pazienti che la hanno sviluppata sono 18/40.  
(Figura 10)



**Figura 14:** Grafico conteggio soggetti SIRS positivi e negativi del caso di studio.

○ **STUDIO DELLO STRESS OSSIDATIVO**

**Gruppo di controllo “sani”**

Sono stati selezionati 20 gatti sani in base alla clinica e ad un profilo ematobiochimico di base, 50% adulti, 50% anziani, e scelti come gruppo di controllo. Il siero di questi gatti è stato prelevato e conservato con le stesse modalità di quello dei gatti patologici ed è stato sottoposto a BAP test, per stabilire un range di riferimento da confrontare con quello ottenuto sul critico. E' stato utilizzato solo questo test sui pazienti sani poiché, per i radicali liberi, il d-ROMs test è già stato validato nel gatto. Dallo studio di Castillo et al., 2013 è stato possibile infatti ricavare il range di valori sul sano, già stabiliti.

La tabella sotto-riportata mostra risultati per il BAP TEST eseguito sui soggetti SANI.

Include le misure della tendenza centrale, della variabilità e della forma. Di particolare interesse sono l'asimmetria standardizzata e la curtosi standardizzata, che possono essere utilizzate per determinare se il campione proviene da una distribuzione normale. Il range previsto in funzione della distribuzione normale è tra +2 e -2. In questo caso, il valore dell'asimmetria standardizzata è all'interno del range previsto e anche il valore della curtosi standardizzata è all'interno del range previsto per i dati di una distribuzione normale.

BAP TEST SANI	
Conteggio	20
Media	1947,82
Deviazione standard	285,345
Coeff. di variazione	14,65%
Minimo	1584
Massimo	2398
Range	814
Asimmetria std.	<b>0,135212</b>
Curtosi std.	<b>-0,849947</b>

*Tabella 6: Test statistico per la determinazione del range di riferimento dai risultati del BAP Test sui soggetti sani.*

Per la determinazione del range abbiamo quindi effettuato il calcolo della media  $\pm$  la somma di 2 deviazioni standard.

MEDIA $\pm$ 2DEVIATIONE STANDARD	RANGE
1947,82 + (285,34 + 285,34)	<b>2518,51</b>
1947,82 - (285,34 + 285,34)	<b>1377,13</b>

*Tabella 7: Range di riferimento BAP TEST soggetti sani*

Adottando l'analisi della varianza abbiamo valutato differenze significative in base all'età e non al sesso.

BAP TEST	
<b>SESSO:</b>	
MASCHI	1902,83 ± 311,89
FEMMINE	2001,8 ± 274,37
<b>ETA':</b>	
ADULTI	<u>1690,6 ± 140,83**</u>
ANZIANI	<u>2162,17± 160,25**</u>

**Tabella 8:** Differenze in base al SESSO ed all'ETA' (Media ± Deviazione Standard)

\* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.

Differenze significative con livello di confidenza maggiore del 95% e  $P\text{-value} < 0,001$  ( $P\text{-value} = 0,0006$ ) sono state evidenziate in base alle differenze riscontrate tra i soggetti adulti e i soggetti anziani. Tra i soggetti di sesso diverso non si sono riscontrate differenze significative.

### **Gruppo in studio “ospedalizzati”**

In tabella 8 sono riportati i risultati dello studio dello stress ossidativo all'ingresso in ICU (T0) per tutti i soggetti inclusi nel nostro studio.

SOGGETTI	ROS (U CARR)	BAP (µmoli/L)	ROS/BAP
1	118	2701	0,04
2	561	3155	0,17
3	320	2538	0,12
4	268	2411	0,11
5	235	2960	0,07
6	299	2371	0,12
7	299	1889	0,15
8	266	2397	0,11
9	215	2301	0,09
10	379	2089	0,18
11	264	2593	0,10

12	365	2140	0,17
13	472	1892	0,24
14	148	2729	0,05
15	522	2168	0,24
16	449	1796	0,25
17	206	2410	0,08
18	144	2747	0,05
19	142	2159	0,06
20	571	2791	0,20
21	474	1701	0,22
22	384	2588	0,19
23	512	2030	0,15
24	315	2768	0,10
25	300	2232	0,12
26	289	2700	0,08
27	225	2618	0,18
28	495	2153	0,15
29	336	2226	0,27
30	616	2312	0,39
31	912	2846	0,14
32	403	1889	0,15
33	284	2390	0,13
34	322	2282	0,18
35	419	2204	0,11
36	244	2445	0,13
37	320	1779	0,21
38	390	2700	0,17
39	474	1701	0,22
40	390	2555	0,15
<b>MEDIA</b>	358,675	2358,9	0,15
<b>MEDIANA</b>	321	2380,5	0,15

*Tabella 9: Valori di Stress Ossidativo al tempo T0.*

Per 20 soggetti è stato possibile effettuare una rivalutazione dello stato ossidativo dopo 48 ore dal ricovero (T48).

SOGGETTI	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{moli/L}$ )	ROS/BAP
1	199	2494	0,07
2	611	2349	0,26
3	264	2601	0,1
4	268	2582	0,1
5	206	3227	0,06
6	305	2358	0,12
7	192	2695	0,07
8	200	2287	0,08
9	573	2539	0,22
10	237	2346	0,1
11	214	1699	0,12
12	405	2508	0,16
13	142	2405	0,05
14	263	2399	0,1
15	366	3044	0,12
16	637	1172	0,54
17	216	2850	0,07
18	143	2831	0,05
19	117	2531	0,04
20	499	2842	0,17
<b>MEDIA</b>	302,85	2487,95	0,07
<b>MEDIANA</b>	250	2519,5	0,1

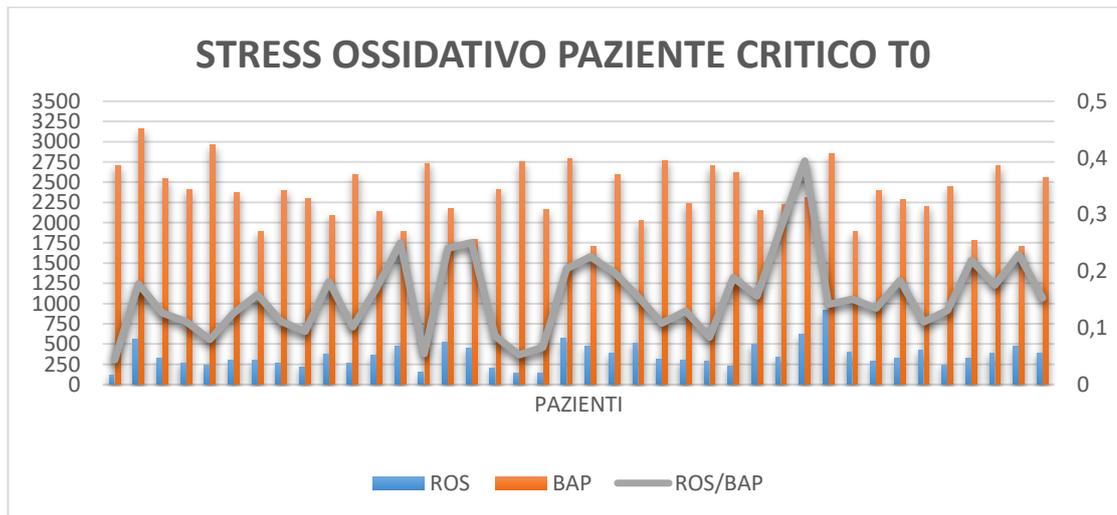
**Tabella 10:** Analisi di Stress Ossidativo al tempo T48.

Per 17 pazienti lo stato ossidativo è stato analizzato anche al momento della dimissione.

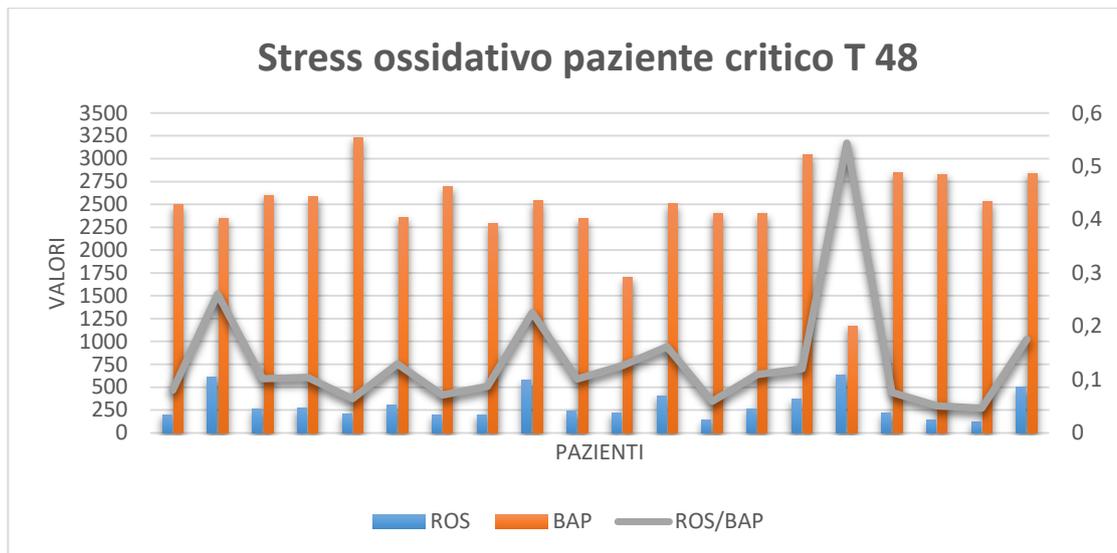
SOGGETTI	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{moli/L}$ )	ROS/BAP
1	96	2602	0,03
2	346	2551	0,13

3	237	2408	0,09
4	237	2408	0,09
5	278	2333	0,11
6	284	2398	0,11
7	285	2441	0,11
8	259	2774	0,09
9	512	3001	0,17
10	261	2260	0,11
11	172	2236	0,07
12	259	2536	0,1
13	160	2795	0,05
14	383	2710	0,14
15	323	1993	0,16
16	223	2573	0,08
17	195	2505	0,07
<b>MEDIA</b>	265,29	2501,41	0,10
<b>MEDIANA</b>	259	2505	0,1

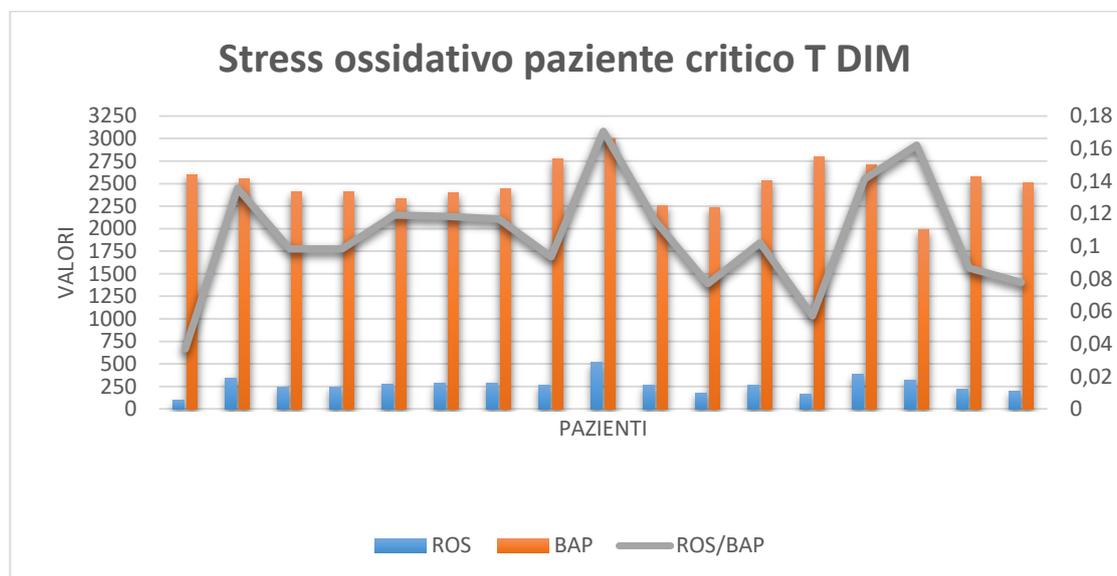
**Tabella 11:** Analisi di Stress Ossidativo alla dimissione (TDIM)



**Figura 15:** Valori di Stress Ossidativo riportati nel grafico al tempo T0.



**Figura 16:** Valori di Stress Ossidativo dopo 48 ore dal ricovero riportati nel grafico.



**Figura 17:** Valori di Stress Ossidativo alla dimissione riportati nel grafico.

Dalle informazioni ricavate da queste tabelle, e quindi dal nostro studio possiamo valutare gli andamenti di radicali liberi dell'ossigeno e degli antiossidanti, quindi i valori di stress ossidativo per il paziente critico felino.

A tal proposito c'è da dire che non è stato possibile effettuare un vero e proprio confronto statistico con lo stato ossidativo del gatto sano non conoscendo uno ad uno i valori ottenuti nello studio di Castillo et al., 2013 per i ROS e non essendo il BAP test validato nel gatto, bensì l'unica cosa possibile è stata quella di comparare i range dei risultati e fare le opportune valutazioni.

Per quanto riguarda i ROS, bisogna considerare che nel soggetto sano il range stabilito va da 72 U CARR a 282 U CARR. Quest'ultimo può essere individuato come limite massimo nel sano e limite minimo per un soggetto critico. Il range di riferimento nella nostra popolazione di studio va dai 92 ai 912 U CARR, con media in ingresso di 358 e mediana intorno a 320.

### **Risultati in base al sesso e all'età**

Mediante l'analisi della varianza siamo riusciti a determinare le differenze in base al sesso e all'età, confrontate con i valori di stress ossidativo ed Apple Score ricavati all'ingresso in terapia intensiva.

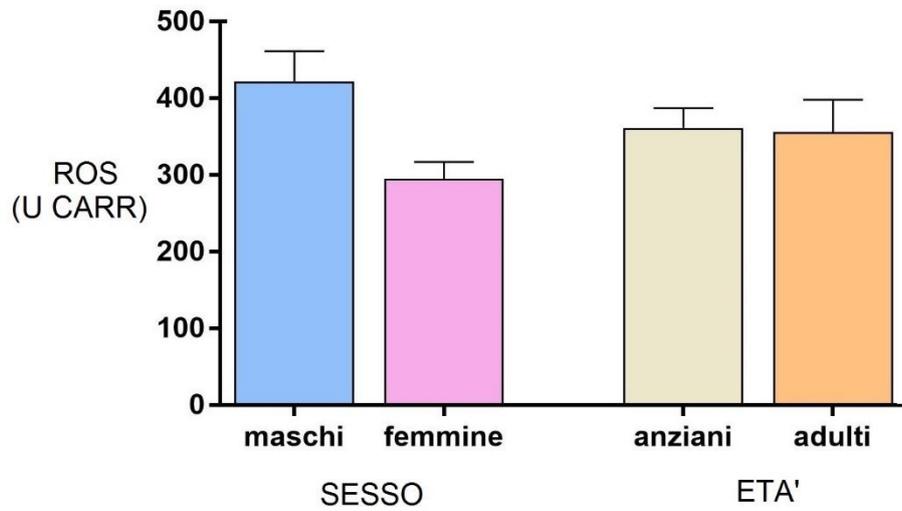
	<b>ROS (U CARR)</b>	<b>BAP (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>ROS/BAP</b>	<b>APPLE SCORE</b>
<b>SESSO:</b>				
<b>MASCHI</b>	<u>423,2 ± 174,8 ** b</u>	2384,8 ± 416,4	0,18 ± 0,07 * b	38,10 ± 9,1
<b>FEMMINE</b>	<u>294,1 ± 97,1 ** a</u>	2332,9 ± 303,7	0,13 ± 0,05 * a	38,09 ± 8,6
<b>ETA':</b>				
<b>ADULTI</b>	349,64 ± 187,0	2386,41 ± 303,2	0,15 ± 0,08	<u>34,54 ± 1,84 * a</u>
<b>ANZIANI</b>	367,70 ± 118,6	2331,39 ± 379,9	0,16 ± 0,06	<u>41,65 ± 7,1 * b</u>

*Tabella 12: Risultati: differenze in base al sesso ed all'età (Media ± deviazione standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.*

Dalla tabella sovra-riportata si evince che ci sono risultati significativi per ROS e ROS/BAP in relazione al fattore sesso: tali risultati mostrano che nei maschi i radicali liberi dell'ossigeno sono prodotti in maggiore quantità rispetto alla popolazione femminile con *P-value* = 0,0073, e che anche il Rapporto ROS/BAP mostra differenze significative (*P-value* = 0,017), influenzate dalla sovrapproduzione di ROS. I BAP e la Somma Apple Score, al contrario, non sono significativi in relazione al sesso con *P-value* > 0,05. Prendendo in considerazione il fattore ETA' si è potuto vedere al contrario che non esistono differenze significative tra le variabili, tranne che per la Somma Apple Score, più alta nei soggetti anziani con *P-value* = 0,0102.

Nei grafici seguenti verrà riportato quanto precedentemente detto:

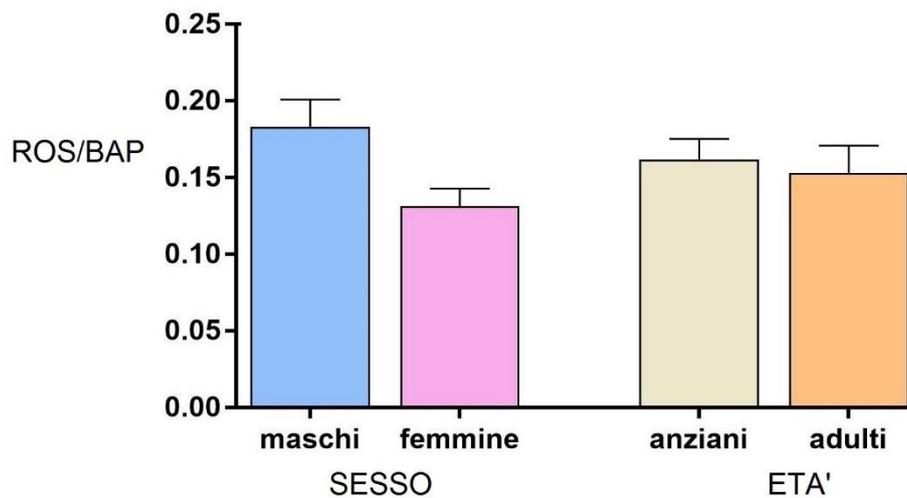
## DIFFERENZE DI ROS IN BASE AL SESSO ed all'ETA'



***p.0,007***

*Figura 18: Rappresentazione grafica della produzione di radicali liberi nella nostra popolazione di studio.*

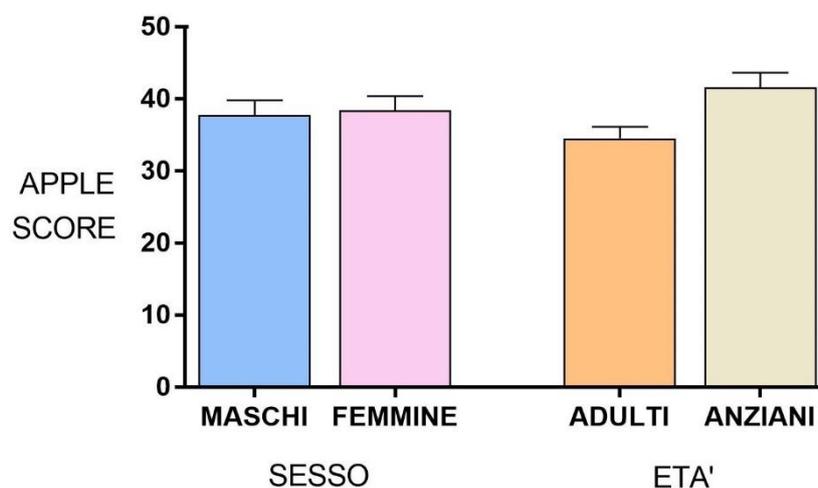
## DIFFERENZE DI ROS/BAP IN BASE AL SESSO ed all'ETA'



***p.0,01***

*Figura 19: Rappresentazione grafica del rapporto tra radicali liberi e antiossidanti nella nostra popolazione di studio.*

## DIFFERENZE APPLE SCORE IN BASE AL SESSO ED ALL'ETA'



***p.0,01***

*Figura 20: Rappresentazione grafica della variazione della APPLE SCORE FULL nella nostra popolazione di studio.*

### **Risultati in base al BODY CONDITION SCORE:**

Sempre utilizzando l'analisi della varianza abbiamo ottenuto differenze di stress ossidativo in relazione al BCS.

BCS	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS/BAP	APPLE SCORE
ALTO	$476,8 \pm 245,9$ * a	$2378,33 \pm 445,8$	$0,19 \pm 0,08$ * b	$43,66 \pm 5,5$
NORMALE	$412,7 \pm 88,3$ * ab	$2203,13 \pm 406,3$	$0,19 \pm 0,07$ * b	$34,5 \pm 9,3$
BASSO	$314,7 \pm 127,7$ * b	$2402,35 \pm 327,6$	$0,13 \pm 0,05$ * a	$37,92 \pm 8,8$

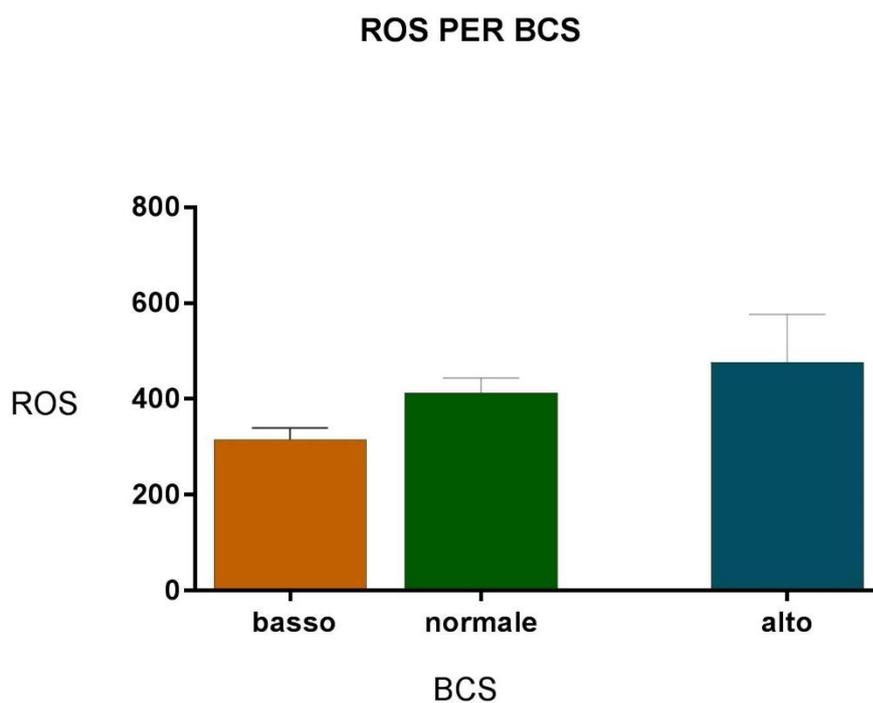
*Tabella 13: Risultati in base al Body condition score (Media  $\pm$  Deviazione Standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01 e differenze di distribuzione.*

La determinazione del BCS nel nostro caso di studio è risultata significativa (P-Value =

0,0315) sia per i ROS, che per il ROS/BAP. La tabella mostra che nei pazienti con BCS ALTO (4-5/5) i radicali liberi dell'ossigeno vengono prodotti con maggior quantità nei pazienti obesi, al contrario di quello che si verifica per i pazienti sottopeso.

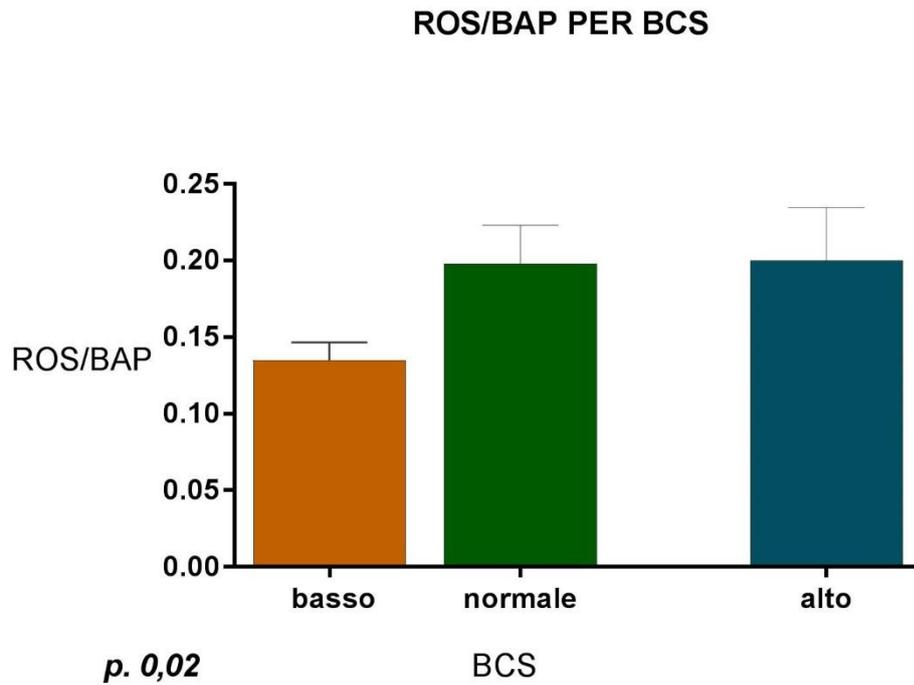
Dalla tabella si evincono differenze significative di distribuzione evidenti in base ai ROS e ai ROS/BAP. Il BCS in pazienti obesi è significativamente diverso da quello di soggetti magri in relazione ai ROS ed i soggetti normopeso hanno caratteristiche intermedie. Per quanto riguarda il rapporto ROS/BAP si osservano distribuzioni diverse tra soggetti sovrappeso e normali rispetto ai soggetti sottopeso. Per quel che riguarda i BAP e la Apple score non è emersa nessuna significatività statistica.

Le figure seguenti mostrano le relazioni tra stress ossidativo ed APPLE SCORE e BCS.



***p. 0,03***

*Figura 21: I ROS in relazione al BCS.*

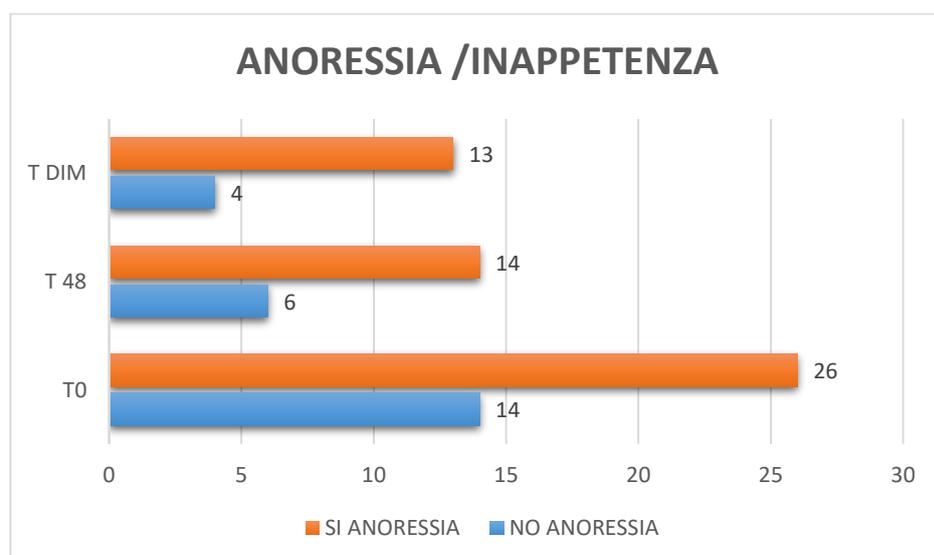


*Figura 23: Il rapporto ROS/BAP in relazione al BCS.*

### **Risultati in base allo sviluppo di ANORESSIA**

Ulteriori risultati ottenuti sulla popolazione oggetto di studio riguardano le valutazioni effettuate al termine del ricovero, post dimissioni, le quali hanno previsto la determinazione della presenza di anoressia/ inappetenza.

La figura seguente mostra la presenza di anoressia/inappetenza nel tempo:



*Figura 22: Presenza/Assenza di Anoressia nel caso di studio.*

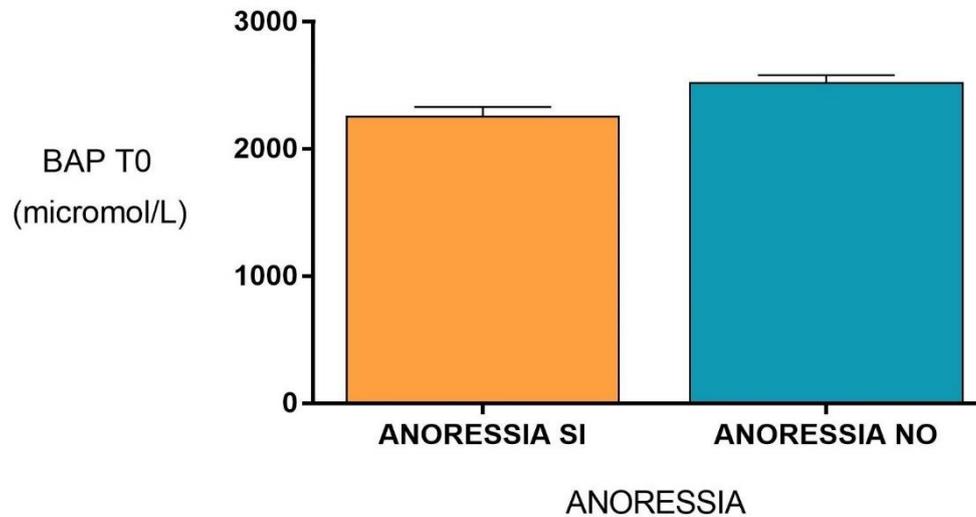
Dalla tabella seguente si evincono le variazioni di stress ossidativo e Apple Score nel tempo in base allo sviluppo di anoressia nel tempo.

	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS/BAP	APPLE SCORE
<b>ANORESSIA T0</b>				
NO	380 $\pm$ 201,9	<u>2525,5 <math>\pm</math> 208,1 *</u>	0,15 $\pm$ 0,07	38,1 $\pm$ 6,7
SI	347,1 $\pm$ 123,7	<u>2269,1 <math>\pm</math> 395,8 *</u>	0,16 $\pm$ 0,07	38 $\pm$ 9,8
<b>ANORESSIA T48</b>				
NO	262,8 $\pm$ 126,8	2477,8 $\pm$ 458,9	0,1 $\pm$ 0,04	34,6 $\pm$ 7,1
SI	320 $\pm$ 173,5	2492,2 $\pm$ 456,6	0,14 $\pm$ 0,12	40 $\pm$ 6,3
<b>ANORESSIA T DIM</b>				
NO	227,5 $\pm$ 52,6	2478,2 $\pm$ 226	0,09 $\pm$ 0,01	42 $\pm$ 3,2
SI	276 $\pm$ 102,7	2508,5 $\pm$ 252,2	0,11 $\pm$ 0,03	37,7 $\pm$ 9

**Tabella 14:** Risultati in base allo sviluppo di anoressia nel tempo (Media  $\pm$  Deviazione Standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.

I risultati mostrano significatività solo nel livello di antiossidanti al tempo T0 con P-Value = 0,03.

## DIFFERENZE DI BAP IN BASE ALL'ANORESSIA



***p.0,03***

*Figura 23: differenze tra i Bap T0 di soggetti anoressici e non.*

### **Risultati in base al tempo**

Continuando con la nostra indagine abbiamo valutato la variazione rispetto al tempo di stress ossidativo e della probabilità di sopravvivenza del nostro caso di studio utilizzando il test non parametrico della mediana di mood.

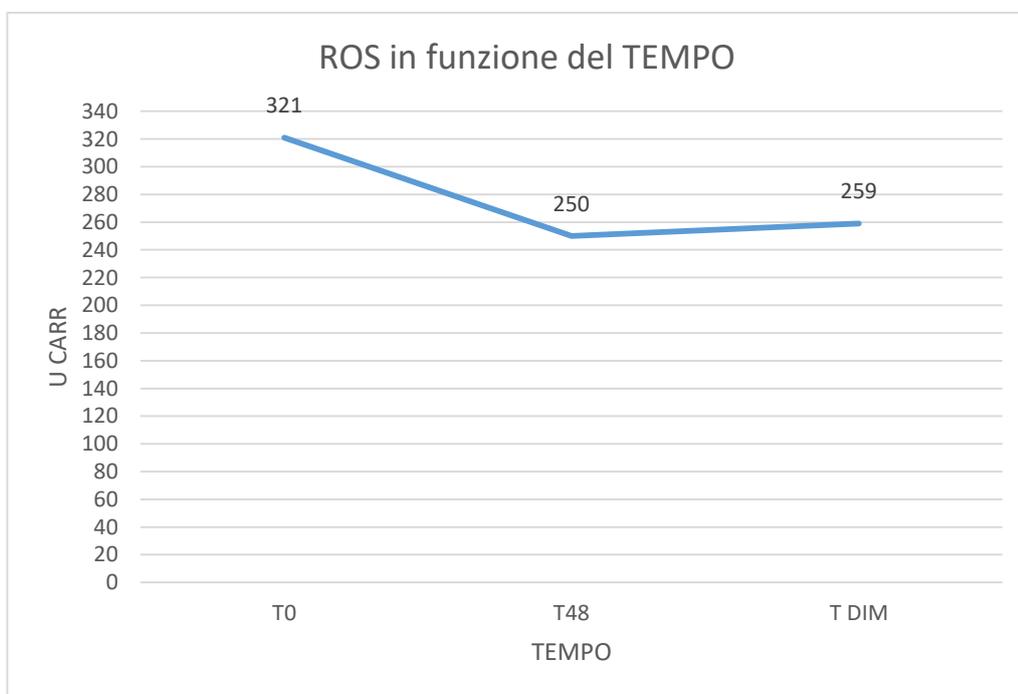
Nel grafico seguente sono riportate le mediane accompagnate dall'errore standard, e le loro significatività statistiche che interessano i ROS, il rapporto ROS/BAP.

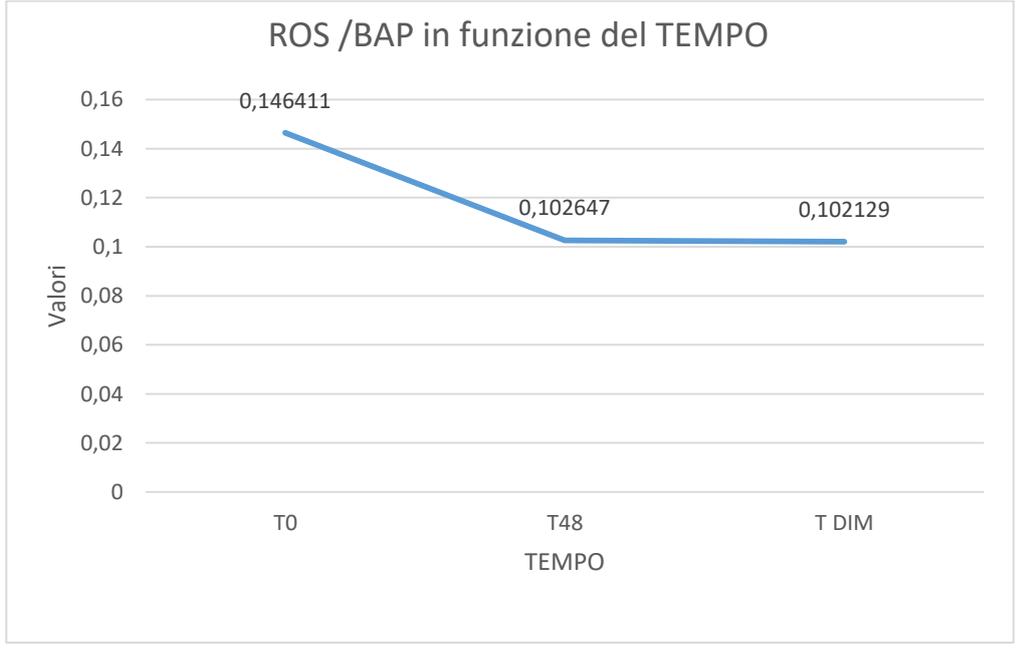
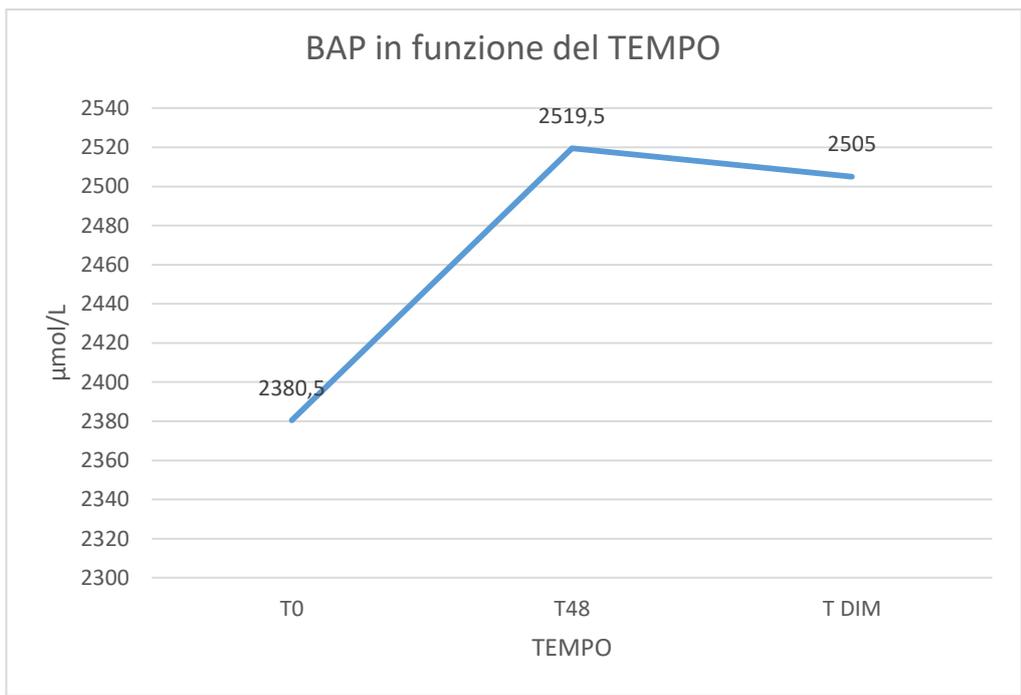
TEMPO	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS/BAP	APPLE SCORE
<b>T0</b>	<u>321 ± 22,8</u> **	2380,5 ± 57,4	<u>0,14 ± 0,01</u> *	37 ± 1,2
<b>T48</b>	<u>250 ± 32,3</u> **	2519,5 ± 81,2	<u>0,10 ± 0,01</u> *	39 ± 1,7
<b>T DIM</b>	<u>259 ± 35,1</u> **	2505 ± 88	<u>0,10 ± 0,01</u> *	41 ± 1,8

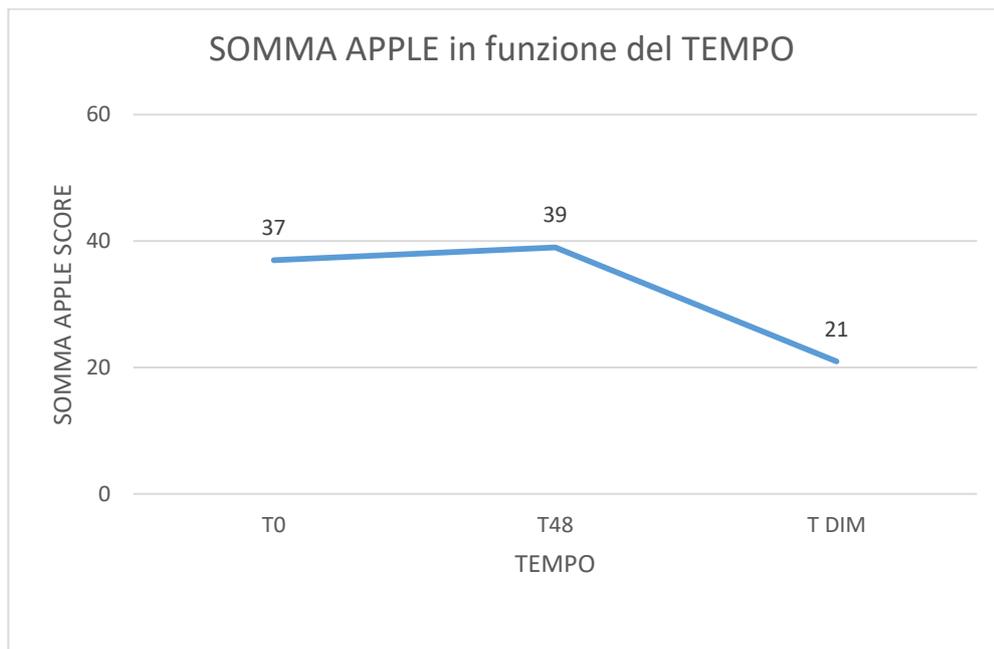
**Tabella 15:** Risultati in base al tempo (Mediana ± Errore standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.

La produzione di radicali liberi rispetto al tempo diminuisce significativamente con il

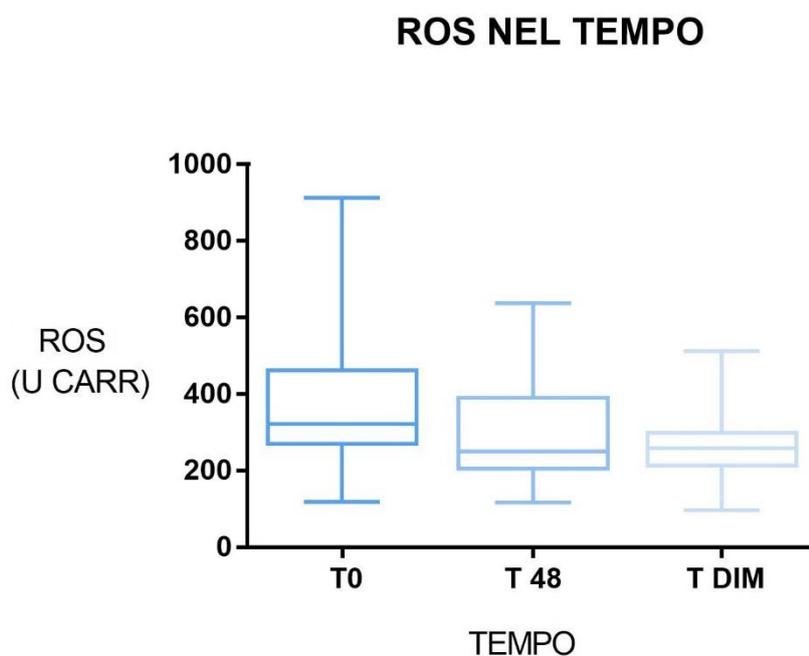
ricovero in ICU, radicalmente dopo le 48 ore, per poi ricevere un successivo incremento intorno al momento delle dimissioni. Alta significatività dei ROS rispetto al tempo con  $P\text{-value} = 0,003$ ). Anche in questo caso per i Bap non possiamo riportare alcuna significatività ( $P\text{-value}=0,23$ ) nonostante sia riconosciuta nella maggior parte dei campioni un andamento contrario a quello dei ROS, ovvero gli antiossidanti prodotti tendono ad aumentare intorno alle 48 ore per poi diminuire successivamente intorno alle dimissioni. Il rapporto ROS/BAP tende a diminuire nel tempo mostrando una significatività statistica ( $P\text{-value}= 0,04$ ). I risultati della Apple score non variano in modo significativo in funzione del tempo. Nei grafici seguenti riporteremo gli andamenti delle mediane delle nostre variabili in relazione al tempo. Le mediane significative sono statisticamente diverse tra di loro.







**Figura 24:** rappresentazione grafica ROS, BAP, ROS/BAP, SOMMA APPLE SCORE in funzione del tempo.



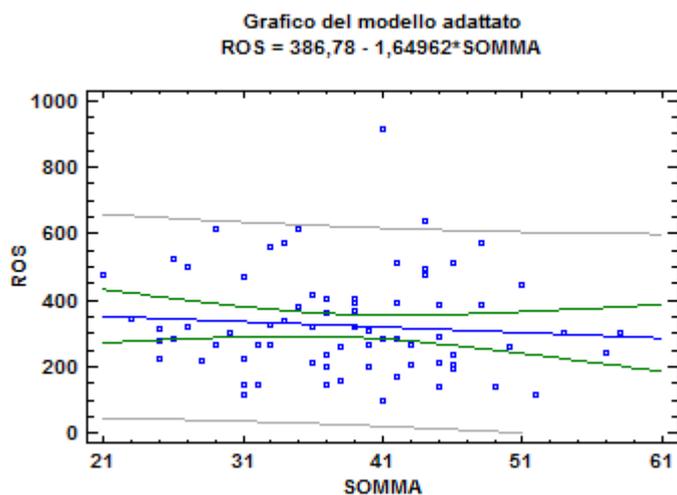
**Figura 25:** distribuzione dei ROS nel tempo.

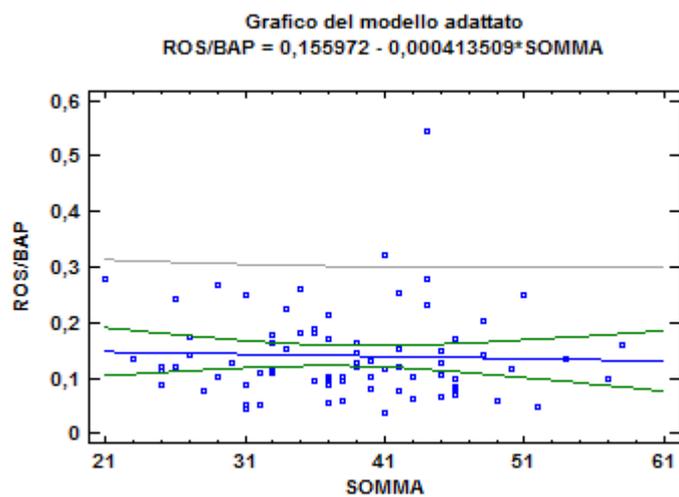
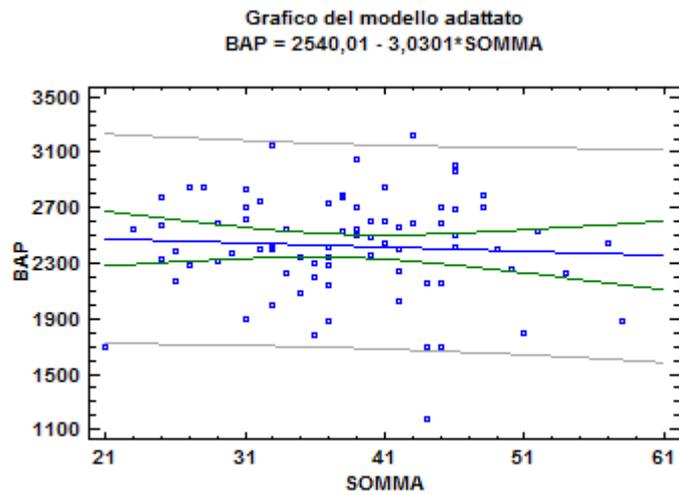
## Le relazioni tra le variabili

I risultati ottenuti tramite regressione semplice sono schematizzati nella tabella seguente:

	ROS vs BAP	ROS vs APPLE SCORE	BAP vs APPLE SCORE	ROS/BAP vs. APPLE SCORE
<b>r</b>	-0,1	-0,09	-0,06	-0,04
<b>R<sup>2</sup></b>	3,3	0,8	0,4	0,1
<b>P</b>	0,5	0,4	0,9	0,5
<b>STIMA ± ES intercetta</b>	502,8 ± 112,9	386,7 ± 82,2	2540,01 ± 203,01	0,15 ± 0,04
<b>STIMA ± ES pendenza</b>	-0,07 ± 0,04	-1,6 ± 2,09	-3,03 ± 5,1	-0,0004 ± 0,001

**Tabella 16:** Risultati di relazione tra le variabili ove  $r$  = Coefficiente di correlazione,  $R^2$  = R-quadrato ed  $P$  = Pvalue di Statistica di Durbin-Watson. (\* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01).





*Figura 26: figure di regressione lineare*

I risultati di questa regressione semplice mostrano una non significativa relazione lineare tra i modelli sopra elencati con  $Pvalue \geq 0,01$ .

E' stata quindi presa in esame la correlazione tra i parametri studiati da cui si evince evidente correlazione tra ROS e ROS/BAP e BAP e ROS/BAP.

Pvalue. <0,05* < 0,01**	BAP	ROS/BAP	APPLE SCORE	ROS
BAP		0,001**	0,87	0,55
ROS/BAP	0,001**		0,75	1,78E-015
APPLE SCORE	0,87	0,75		0,81
ROS	0,55	1,78E-015	0,81	

*Tabella 17: Correlazione di Pearson.*

### Differenze in base agli apparati e alla condizione sirs/no sirs.

Per quanto riguarda l'analisi della varianza tra stress ossidativo e conteggio apparati e presenza di sirs, abbiamo ottenuto risultati statisticamente positivi solo per quanto riguarda gli **apparati** in funzione dei **radicali liberi** generati.

APPARATI	ROS (U CARR)	BAP (µmol/L)	ROS/BAP	APPLE SCORE
ALTRI	<u>234 ± 76,5 * a</u>	2601 ± 196,5 * a	<u>0,09 ± 0,03 ** a</u>	38,3 ± 11,5
CARDIO-CIRCOLATORIO	<u>400 ± 129,1 * ab</u>	2194 ± 483 * ab	<u>0,19 ± 0,11 ** a</u>	39,8 ± 10,6
GASTRO-ENTERICO	<u>303 ± 180,1 * abc</u>	2452 ± 380,4 * bc	<u>0,12 ± 0,07 ** a</u>	40,4 ± 12,17
NERVOSO	<u>463 ± 55,3 * c</u>	1873 ± 165 * bc	<u>0,24 ± 0,03 ** b</u>	41 ± 3,06
URINARIO/RENALE	<u>318 ± 130,8 * cd</u>	2462 ± 275,8 * c	<u>0,13 ± 0,05 ** b</u>	35 ± 10,5

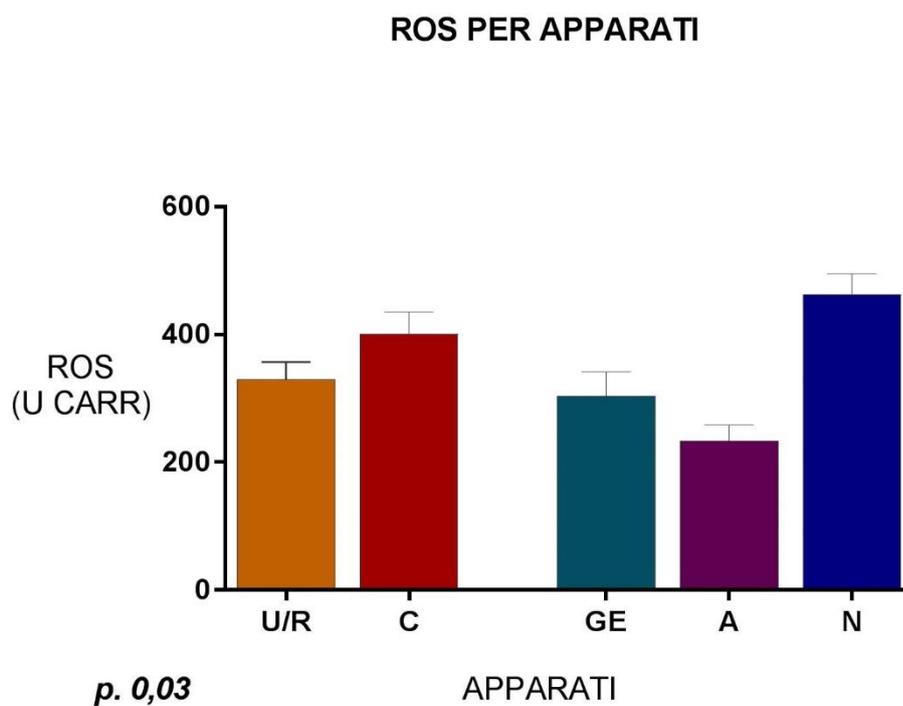
*Tabella 18: Analisi della varianza per Apparato (Media ± Deviazione standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.*

La valutazione dei ROS in base agli apparati coinvolti risulta statisticamente significativa con *Pvalue* = 0,02, tale significatività è stata riscontrata anche nei BAP con *P-value* =

0,018 e nel rapporto ROS/BAP con P-Value = 0,001. Non abbiamo trovato significatività statistiche invece per quanto riguarda i risultati della SOMMA APPLE SCORE.

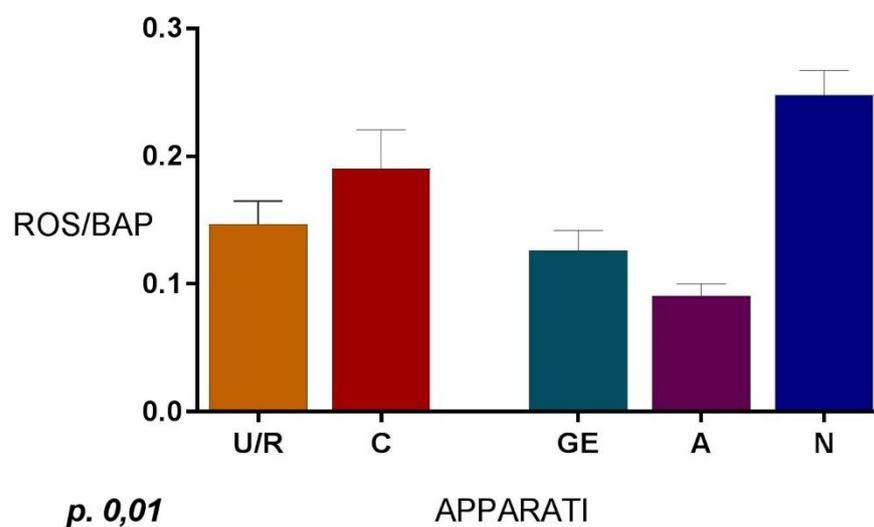
Dal Test dei range multipli è stata evidenziata una disomogeneità dei gruppi in base allo stress ossidativo mentre i risultati della Apple score sono omogenei.

Nei grafici seguenti saranno riportate le medie di stress ossidativo relative ai vari apparati.



*Figura 27: produzione di ROS per apparato.*

## ROS/BAP PER APPARATI



*Figura 28: rapporto ROS/BAP per apparato.*

L'analisi della varianza è stata applicata anche ai pazienti che hanno o non hanno sviluppato SIRS durante il ricovero in terapia intensiva.

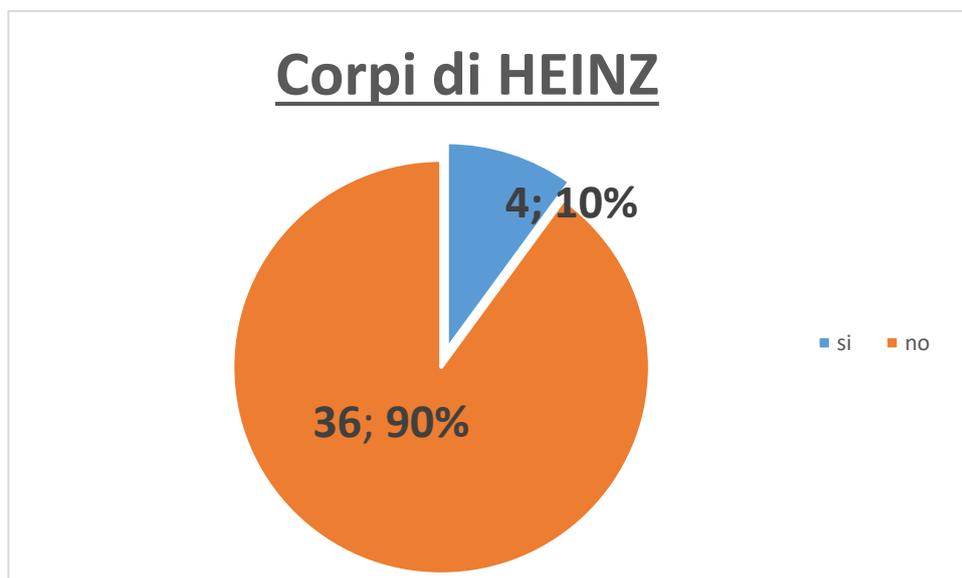
SIRS/NO SIRS	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS/BAP	APPLE SCORE
NS	303,2 $\pm$ 123,4	2382 $\pm$ 375,2	0,13 $\pm$ 0,09	37,3 $\pm$ 8,2
S	343,3 $\pm$ 167,92	2464 $\pm$ 354,6	0,14 $\pm$ 0,06	39 $\pm$ 8,3

**Tabella 19:** Risultati in base alla classificazione SIRS/NO SIRS (Media  $\pm$  Deviazione standard) \* P-value <0,05 \*\* P-value <0,01.

Non si evince nessuna significatività statistica.

### I corpi di Heinz.

Nella nostra popolazione sono stati individuati solo 4 soggetti su 40 aventi 1 o più corpi di Heinz.



*Figura 29: Conteggio corpi di Heinz nella popolazione.*

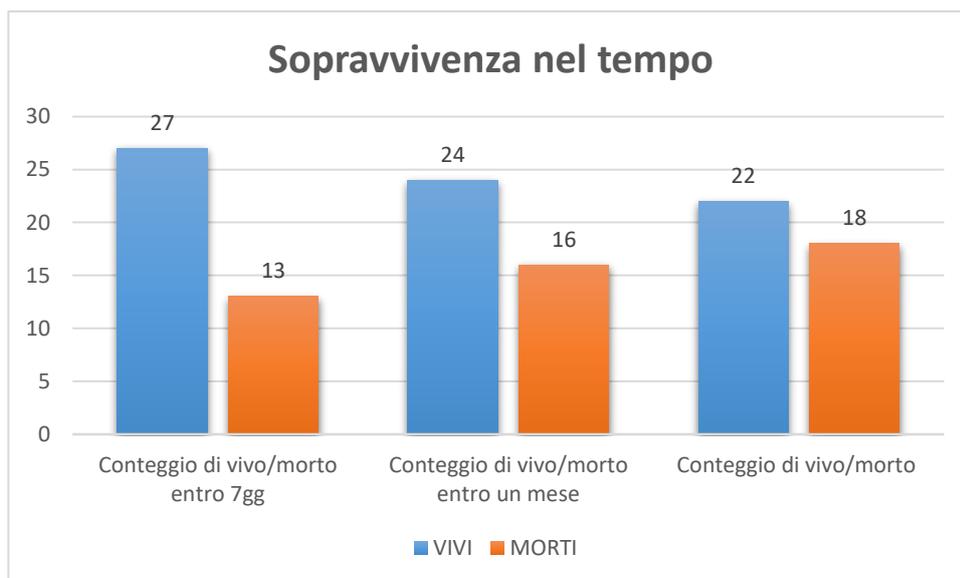
I 4 soggetti aventi corpi di Heinz, presentano anemia di vario grado (da grave a gravissima) e i valori di stress ossidativo vengono rappresentati nella tabella seguente.

POPOLAZIONE	ROS	BAP	ROS/BAP	APPLE SCORE
1	118	2701	0,043688	31
2	299	2371	0,126107	30
3	522	2168	0,240775	51
4	512	2030	0,252217	42
<b>Media</b>	<b>362,75</b>	<b>2317,5</b>	<b>0,165697</b>	<b>38,5</b>
<b>Mediana</b>	<b>405,5</b>	<b>2269,5</b>	<b>0,183441</b>	<b>40,375</b>

*Tabella 20: Valori di stress ossidativo e Apple score nei soggetti con Corpi di Heinz.*

## II FOLLOW UP

Il Follow Up telefonico ha permesso di risalire ad informazioni sull'effettiva sopravvivenza dei nostri casi di studio ad una settimana, ad un mese e ad un anno dal ricovero. Nel successivo grafico viene riportato il conteggio definitivo dei sopravvissuti/non sopravvissuti nei diversi periodi di tempo. Nel totale dei 40 pazienti inclusi 13 sono morti entro una settimana, 16 entro 30 giorni e 18 in totale.



**Figura 30:** Conteggio della mortalità nel tempo.

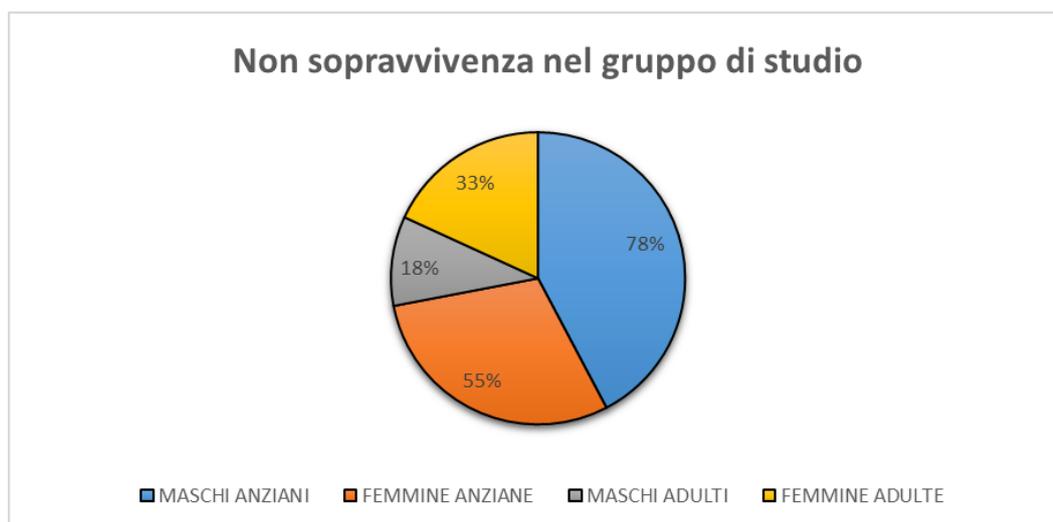
Su un totale di 40 soggetti, 18 sono deceduti (mortalità= 45%). Di questi 18, 12 sono stati sottoposti ad eutanasia per le gravi condizioni critiche, mentre gli altri 6 sono morti per morte spontanea.

Valutando le relazioni tra la mortalità di maschi e femmine, adulti e anziani è stato possibile stabilire alcune percentuali di sopravvivenza: tra i 20 maschi, sono morti 7/9 soggetti anziani (mortalità=78%) e 2/11 soggetti giovani (mortalità=18%). Tra le 20 femmine si ha una prevalenza di mortalità nelle anziane 6/11 (mortalità=55%) rispetto che nelle adulte 3/9 (33%).

La tabella e il grafico riportati qui sotto, mostrano tali risultati.

	TOTALI	MASCHI ANZIANI	FEMMINE ANZIANE	MASCHI ADULTI	FEMMINE ADULTE
NON SOPRAVVISSUTI	45%	78%	55%	18%	33%
SOPRAVVISSUTI	55%	22%	45%	82%	67%

**Tabella 21:** distribuzione dei sopravvissuti e non sopravvissuti tra i vari gruppi.



**Figura 31:** Rappresentazione schematica del gruppo non sopravvissuti.

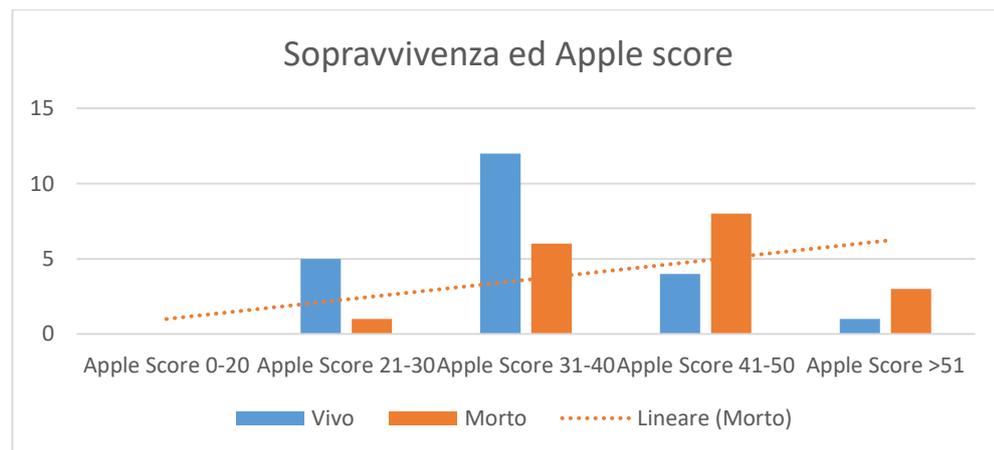
Per quanto riguarda la sopravvivenza dei nostri pazienti si è potuto applicare il modello ANOVA per valutare le relazioni che intercorrono tra le nostre variabili e il tempo di sopravvivenza con mortalità entro 7 giorni, entro 30 giorni e mortalità totale.

	ROS (U CARR)	BAP ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS/BAP	APPLE SCORE
<b>SOPRAVV 7 giorni</b>				
<b>MORTI</b>	369,7 $\pm$ 211,6	2409 $\pm$ 379,6	0,15 $\pm$ 0,08	<u>43 <math>\pm</math> 8,6 *</u>
<b>VIVI</b>	353,3 $\pm$ 12,2	2334,7 $\pm$ 356,3	0,15 $\pm$ 0,06	<u>35,7 <math>\pm</math> 8 *</u>
<b>SOPRAVV 30 giorni</b>				
<b>MORTI</b>	378,2 $\pm$ 195	2345,8 $\pm$ 381,6	0,16 $\pm$ 0,08	<u>42,3 <math>\pm</math> 9 *</u>

<b>VIVI</b>	345,6 ± 121,9	2367,6 ± 354,4	0,15 ± 0,06	<u>35,2 ± 7,5 *</u>
<b>SOPRAVV TOT</b>				
<b>MORTI</b>	388,4 ± 188,2	2376,5 ± 412,2	0,16 ± 0,07	<u>41,4 ± 9 *</u>
<b>VIVI</b>	334,318 ± 117,8	2344,5 ± 322,2	0,14 ± 0,06	<u>35,3 ± 7,8 *</u>

**Tabella 22:** Risultati in base ai tempi di sopravvivenza (Media ± Deviazione standard); \* P-value <0,05  
\*\* P-value <0,01.

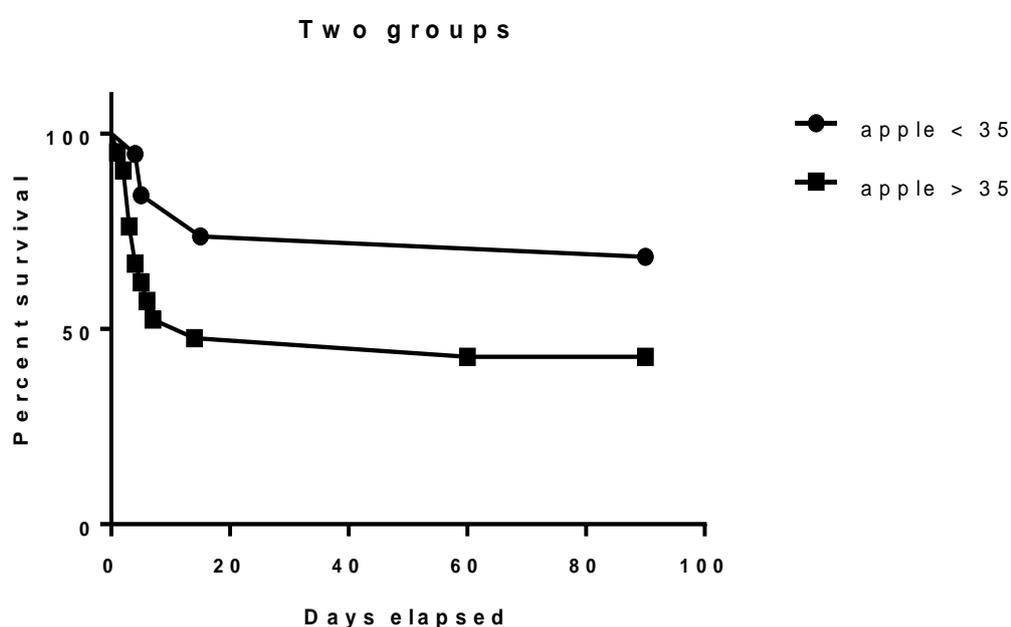
Dalla tabella precedente si evince una significatività statistica nel tempo con P-value < 0,05 relativa ai risultati della somma Apple score. Al contrario nessuna significatività statistica relativa alle variabili di stress ossidativo con P-value sempre > 0,05, sebbene ci sia un trend all'aumento dei ROS nei soggetti che sono morti.



**Figura 32:** linea di tendenza della relazione tra sopravvivenza ed apple score.

## Il tempo di sopravvivenza

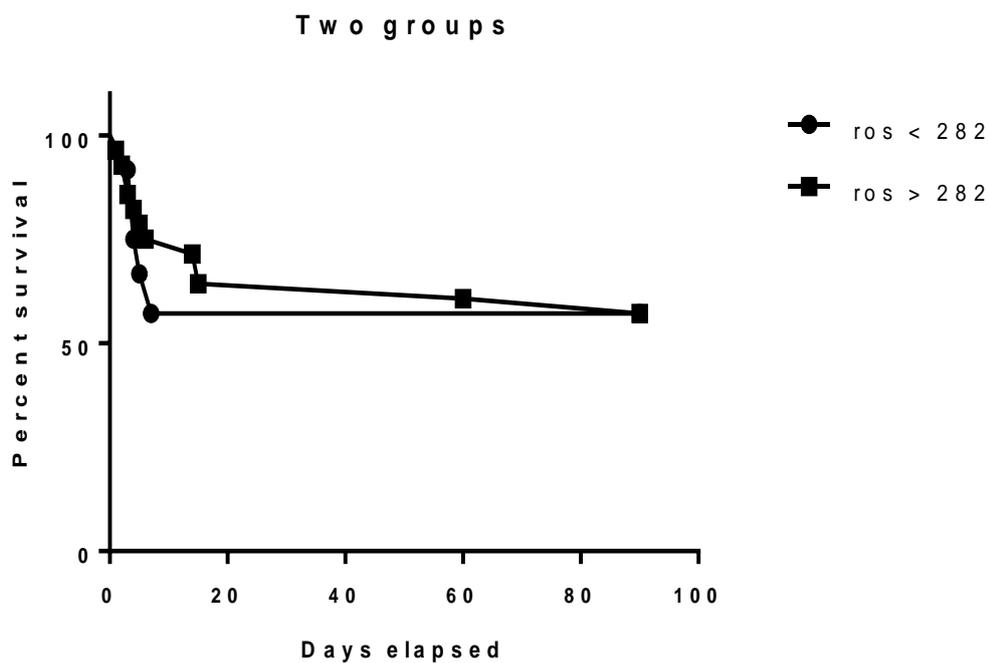
Tramite il test di Kaplan Meier, uno stimatore delle probabilità di sopravvivenza sono stati confrontati più gruppi, a coppie di due, in base al numero dei giorni in cui i soggetti sono deceduti oppure no. I gruppi sono stati confrontati con lo scopo di indagare le relazioni che intercorrono tra il tempo di sopravvivenza ed alcune variabili. Abbiamo in primo luogo verificato il tempo di sopravvivenza nei soggetti con Apple score > o < di 35.



**Figura 33:** Curva di sopravvivenza Kaplan Meier in base alla Apple Score.

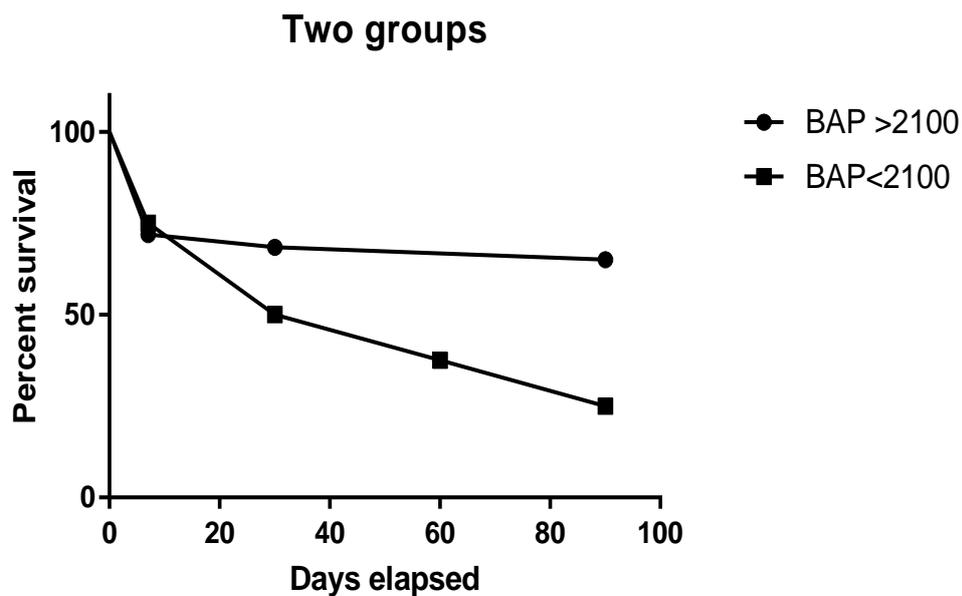
La figura precedente mostra significatività statistiche in base al tempo di sopravvivenza in relazione alla Apple score. Sono stati considerati valori over e under 35 per stabilire la gravità della malattia ed è stato applicato il test di *Gehan- Breslow- Wilcoxon* che individua un  $P\text{-Value} = 0,03$ . Abbiamo inoltre deciso di verificare se effettivamente i ROS del nostro caso di studio possano interferire con il tempo i sopravvivenza dell'animale. Abbiamo quindi suddiviso in due gruppi i pazienti con i ROS < 282 (Valore limite per il sano nell'analisi di Castillo et al., 2013) e > 282 e creato la curva di

sopravvivenza da cui non si evince alcuna significatività statistica.



*Figura 34: Curva di Sopravvivenza Kaplan Meier in base alla produzione di ROS.*

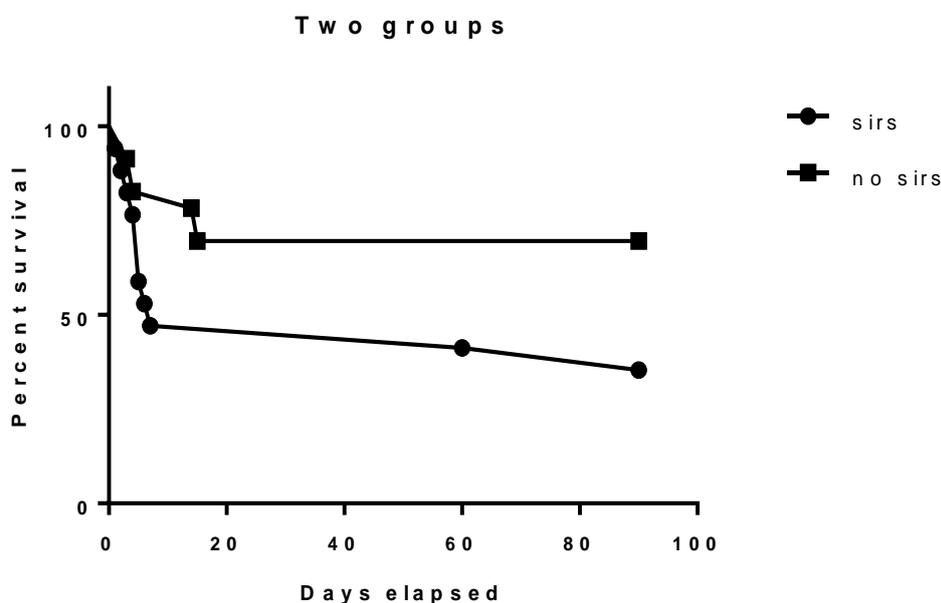
Abbiamo poi deciso di applicare il Kaplan Meier per verificare gli antiossidanti, scegliendo un range < o > di 2100  $\mu\text{mol/L}$ .



*Figura 35: Curva di Sopravvivenza Kaplan Meier in base alla produzione dei BAP*

Il *Mantel-Cox test* non è significativo con  $P\text{-value} = 0,06$ .

Infine abbiamo applicato il Kaplan Meier per verificare la mortalità del gruppo *Sirs/No Sirs*.



**Figura 36:** Curva di sopravvivenza Kaplan Meier per soggetti *Sirs/No Sirs*.

Dalla precedente figura di evincono risultati significativi sia al test statistico di *Mantel-Cox Test* ( $P\text{-Value} = 0,03$ ) sia al *Gehan- Breslow- Wilcoxon Test* ( $P\text{-Value} = 0,03$ ). La mortalità dei soggetti che hanno sviluppato *sirs* è quindi maggiore rispetto ai soggetti che non la hanno sviluppata.

## 2.4 Discussioni

Il presente studio ha previsto l'indagine dello stress ossidativo nel paziente felino ospedalizzato con l'obiettivo di determinarne la prevalenza e le correlazioni con la malattia e la sua gravità, nonché il suo possibile significato prognostico. L'idea iniziale da cui questo lavoro ha preso forma è stata delineata nella pubblicazione del saggio di Castillo et al., 2013. Quest'ultimo è stato il primo studio ad aver definito i parametri di stato ossidativo nel gatto sano, suggerendo inoltre le basi per una futura indagine sul

paziente critico felino ospedalizzato. Fino ad ora infatti la ricerca medica veterinaria si era limitata ad applicare nel gatto, i risultati ottenuti nelle altre specie animali, senza tenere conto della diversità dei meccanismi fisio-patogenetici di questa specie. Prima però di discutere, uno ad uno, i risultati della nostra ricerca, ritengo opportuno delineare i vantaggi e gli svantaggi dei test utilizzati sul siero dei nostri pazienti, specialmente relativamente al Bap test, mai utilizzato prima nel gatto, e confrontare i risultati ottenuti negli individui sani.

Per lo studio dello stress ossidativo abbiamo analizzato i **radicali liberi** dell'ossigeno tramite l'ausilio del **d-ROMs test**, l'unico test attualmente disponibile per la valutazione dello stress ossidativo che sia validato nel gatto. Il d-ROMs test si è presentato affidabile e di facile utilizzo. I risultati del d-ROMs test sono stati confrontati con quelli ottenuti nel gatto sano dall'analisi di Castillo et al., 2013. Dal confronto tra i dati di riferimento del sano e i dati medi e mediani ottenuti nella nostra popolazione si evince che, nel paziente felino critico ospedalizzato, le specie chimiche reattive dell'ossigeno prodotte sono più elevate del gatto sano, specialmente al momento dell'ospedalizzazione (T0). Osservando i ROS possiamo vedere che, all'ingresso in ICU solo il 30% dei pazienti non ha superato il limite massimo stabilito da Castillo et al, 2013, ed è quindi possibile affermare che la nostra popolazione di gatti ospedalizzati si trova in una condizione di stress ossidativo fino ad oggi solo segnalata in altri studi (Webb et al., 2008), (Tecless et al., 2015), (Sogawa et al.,2010), (Christopher, et al, 1995), (Branter et al., 2012), (Varzi et al., 2007), (Binder et al., 2005) ma mai stata ancora del tutto delineata per il paziente felino. I nostri risultati possono fornire le basi per un miglior approccio futuro al clinico, che potrà in questo modo essere in grado di riconoscere l'alterazione redox per cercare di limitarne il più possibile i danni. Nell'uomo (Gerardi et al., 2002) e nel cane (Pasquini et al., 2013) altri studi avevano definito l'aumento dei radicali liberi nel paziente critico, e avevano evidenziato un aumento delle specie chimiche reattive dell'ossigeno in seguito all'instaurarsi della patologia.

Per quanto riguarda la valutazione del **potenziale antiossidante** intrinseco dei soggetti utilizzando il **BAP TEST**. Il BAP è uno dei migliori test per la quantificazione degli antiossidanti in circolo, ed è usato in larga misura in tutte le specie. Sconosciuta è la ragione per cui esso non sia mai stato utilizzato nel gatto, su cui ancora non è stato pubblicato niente in letteratura.

Nell' analisi di Castillo et al., 2013 la quantificazione antiossidante, infatti, era stata fatta

mediante l'utilizzo dell'OXI-ADSORBENT TEST. Esso valuta il potere antiossidante della barriera plasmatica misurando la capacità di quest'ultima di opporsi all'azione ossidante massiva dell'acido ipocloroso (HClO) (Carratelli et al., 2001). Normalmente, 1 ml di plasma umano è in grado di “adsorbire” almeno 350  $\mu$ mol di HClO.

I valori di riferimento riportati sui gatti sani nel lavoro di Castillo et al., 2013, sono riportati nella tabelle seguenti: **Tabella 22** (classificazione per età) e **Tabella 23** (classificazione per sesso).

Castillo et al

**Table 1** Mean values [ $\pm$  standard error (SE)] of redox balance in cats from this study grouped by age

Parameter	Group (age, years)	Mean ( $\pm$ SE)	P	Minimum	Maximum
SAC $\mu$ mol HClO/ml	2-7	384.2 $\pm$ 25.1	0.166	269.5	664.9
	>7 and <12	346.8 $\pm$ 13.9			

**Tabella 23:** Analisi antiossidanti e classificazione per ETA' (Castillo et al., 2013)

Castillo et al

**Table 2** Mean values [ $\pm$  standard error (SE)] of redox balance in cats from this study grouped by gender

Parameter	Group	Mean ( $\pm$ SE)	Student's t-test	Minimum	Maximum
SAC $\mu$ mol HClO/ml	FEM	350.2 $\pm$ 15.6	0.315	269.5	575.1
	MAL	377.2 $\pm$ 22.7			

**Tabella 24:** Analisi antiossidanti e classificazione per SESSO (Castillo et al., 2013)

Dai risultati appariva evidente che nel sano non c'erano differenze significative nella quantificazione degli antiossidanti in relazione a sesso ed età.

In realtà l'OXI-Adsorbent test misura il quantitativo antiossidante plasmatico, ma quello che a noi interessava era avere una valutazione complessiva della potenzialità antiossidante biologica di un individuo, motivo per cui abbiamo deciso di utilizzare il BAP TEST.

Studi (Dohi et al., 2005) infatti hanno dimostrato che BAP TEST è il migliore test in commercio per la valutazione degli antiossidanti poiché misura la componente “dinamica”, “biologicamente attiva” della barriera antiossidante plasmatica ed è in grado di rilevare e quantificare in maniera specifica ed affidabile attività scavenger/antiossidanti. Per questa ragione, esso trova una valida applicazione nella valutazione dell'efficacia dell'attività antiossidante di sostanze a più basso peso molecolare o, comunque, a più

rapido ricambio, quali l'acido ascorbico, l'acido urico, la bilirubina, etc. Altri test come il noto TAS o il simile OXI-Adsorbent Test (*Total Antioxidant Status*, determinazione dello stato totale antiossidante), pur validi sotto il profilo metodologico, al contrario del BAP test, restano ancora confinati a fini squisitamente di ricerca o non sono stati sufficientemente validati con tecniche ritenute *gold standard*. Essi si basano sulla capacità di un campione di siero/plasma di inibire l'azione ossidante, esercitata nei propri confronti, da un sistema generatore di specie ossidanti (Prior et al., 1999). Il TAS, e altri test similari, forniscono un'informazione sulla componente "strutturale" della barriera antiossidante (proteine ed altri composti ad alto peso molecolare) il cui tempo di "ricostituzione" è relativamente lento.

Volendo ricorrere ad un paragone per spiegare in maniera visiva i concetti sopra esposti, se i radicali liberi rappresentano i "nemici" che attaccano una fortezza difesa da guerrieri, che a sua volta rappresenta la barriera antiossidante plasmatica nel suo complesso, il TAS misura la capacità di difesa delle mura, mentre il BAP test quantifica i guerrieri che si difendono scagliando i propri dardi dalle finestre e dall'alto delle mura stesse contro gli aggressori (Iorio, 2006). Il BAP test è sostanzialmente una variante semplificata del metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) per la determinazione dell'attività plasmatica ferro-riducente e risulta molto simile al PAT Test che sfrutta lo stesso meccanismo fotometrico ma, al contrario dei precedenti fornisce una sottostima di valori poiché non rileva i fosfati (Benedetti et al., 2013). In prove di laboratorio si è dimostrato che i risultati del BAP test correlano in maniera soddisfacente con quelli del FRAP. Il FRAP mostra una debole ma significativa relazione con il saggio ORAC, uno dei test più sensibili nello studio del potere antiossidante (Cao and Prior, 1998).

Il saggio ORAC è stato applicato in 12 specie: ma volatili e gatto risultano quelle con valori di antiossidanti più alti. (Ninfali and Aloigi, 2009) Sarebbe molto interessante andare a verificare se nel gatto sano i valori antiossidanti ottenuti tramite BAP TEST sono più alti rispetto a quelle delle altre specie per effettuare dei parallelismi tra i test.

Nel nostro studio ci siamo limitati ad individuare il potenziale antiossidante biologico in un gruppo di controllo di gatti sani ed a valutarne le eventuali differenze con il critico acuto. Arruolando 20 soggetti è stato possibile calcolare un range di riferimento che rientra per il gatto sano tra i 2518,5 e 1377,13  $\mu\text{mol/L}$ . Questo range significativo per asimmetria e curtosi è stato confrontato con i valori ottenuti nel critico e sembrerebbe, che in una valutazione globale, non si evidenzino sui BAP differenze tra sano e malato al contrario di quanto verificato nell'uomo (Iris et al., 1996) e nel cane (Pasquini et al., 2013)

in cui le differenze apparivano marcate. La presenza di un range simile tra sano e malato potrebbe essere dovuta all'esistenza di una riserva endogena intrinseca antiossidante del gatto, in grado di contrastare l'iperproduzione radicalica ed impedendo la deplezione antiossidante almeno sino all'esaurimento totale.

Ovviamente queste sono solo supposizioni poiché per verificare che quanto detto sia vero, sarebbe stato utile avere una validazione del BAP test sul gatto sano per poi confrontare i valori con quello patologico. Tale ipotesi però trova una valida spiegazione nella ricerca di Viviano et al., 2009, in cui dall'analisi antiossidante sul siero di pazienti felini e canini, si era accennato ad alcune differenze sostanziali tra le due specie ed altre differenze in relazione al confronto sani e malati. Nel gatto sano infatti il quantitativo endogeno antiossidante era più basso di per sé rispetto a quello del cane sano, ma in quest'ultima specie, in seguito all'instaurarsi della patologia, esso subiva un crollo notevole correlato sia alla malattia sia alla mortalità durante il ricovero. Ciò era stato dimostrato in precedenza anche nell'uomo (Cowley et al., 1996). Nel gatto al contrario, le differenze antiossidanti non erano così molto diverse tra sano e malato. Il quantitativo di GSH era invariato e i livelli di ascorbato, ad esempio, apparivano aumentati in questa specie sia durante lo sviluppo della patologia, specialmente nei FIV + (Webb et al., 2008), sia in relazione all'anzianità. Tale condizione ha fatto ipotizzare una risposta esacerbata compensatoria allo stress in cui sia probabile che i gatti aumentino il riciclo, diminuiscano il consumo o la degradazione di antiossidanti. E' inoltre possibile che i gatti up-regolino la sintesi di ascorbato o alterino il suo metabolismo durante la malattia. Anche le mancate differenze con GSH e cisteina supportano tale ipotesi. Tutte queste considerazioni, evidenziate nello studio di Viviano et al., 2009, trovano riscontro anche nel nostro, sia in relazione al rapporto sano patologico, sia in relazione all'età, con aumento dello stato antiossidante nei soggetti aventi più di 7 anni. Arruolando la nostra popolazione di controllo, abbiamo solamente calcolato dei range, i cui risultati vanno però considerati preliminari, e sarebbe necessaria la validazione del BAP test nel gatto, ampliando anche la casistica.

Sarebbe inoltre molto interessante tenere in considerazione la componente antiossidante esogena, al fine di verificare quanto la dieta possa influenzare la potenzialità antiossidante. Nello studio di Verbrugge et al., 2014 era, infatti, stato visto che anche la composizione della dieta e presenza percentuale di acidi grassi avrebbe potuto comportare una limitata risposta infiammatoria nel gatto, grazie alla sua innata resistenza tale da ostacolare la deplezione antiossidante.

Durante l'analisi dello stato ossidativo individuale è necessario focalizzare la nostra attenzione, non solo sullo studio di radicali e antiossidanti, ma anche sul loro "effettivo rapporto". Il **rapporto ROS/BAP** infatti trova una valida spiegazione clinica poiché da informazioni sul mantenimento o meno dell'equilibrio cellulare, inteso come capacità intrinseca dell'organismo di combattere lo stress. In seguito ad un insulto, l'organismo generalmente risponde ad un aumento di radicali liberi con una deplezione antiossidante, ma spesso si possono creare delle situazioni compensatorie intermedie, in cui le difese dell'organismo riescono a far fronte allo stress, o situazioni in cui vi può essere un'iporeattività organica generale, così grave da far crollare troppo velocemente le difese (Iorio, 2005). Questo rapporto, in letteratura, è stato preso in considerazione solamente nello studio di Castillo et al., 2013 ove è stato definito come "indice di stress ossidativo", poiché è in grado di quantificarne la gravità. La valutazione di questo indice potrebbe essere un'importante risposta prognostica in termini di stress ossidativo. Sebbene non sia stato possibile confrontarne i risultati per la diversa unità di misura associata ai BAP, possiamo senza dubbio affermare che, anche nel precedente studio, i risultati significativi apparivano secondari all'iperproduzione radicalica piuttosto che alla deplezione antiossidante.

Passando alla discussione dei risultati del paziente felino ospedalizzato, mettiamo in evidenza innanzitutto che sono stati arruolati 40 gatti ospedalizzati critici, omogenei rispetto a sesso ed età, diversi sulla base del BCS, e aventi le più svariate patologie: da soggetti politraumatizzati a soggetti scompensati, cachettici, con svariate malattie a carattere sistemico, tutti quadri acuti o quadri derivati da acutizzazione di processi cronici. Dall'analisi dello stato ossidativo di questi individui si osserva che siamo di fronte ad una condizione di stress ossidativo, influenzata dall'aumento delle specie reattive dell'ossigeno, ma con un evidente tentativo compensatorio da parte di innati meccanismi di difesa propri dei soggetti felini. Per quel che riguarda i risultati ottenuti sui nostri campioni, omogenei in base al sesso ed all'età, essi hanno mostrato variazioni significative dei ROS in base al sesso, ove si è vista una maggiore suscettibilità dei maschi rispetto alle femmine. Quest'ultimo può essere considerato un dato ormai certo poiché è stato verificato, oltre che nel gatto sano (Castillo et al., 2013), anche nell'uomo e nel cane (Torodova et al., 2005)(Fano et al., 2001). In base all'età stranamente non sono emerse invece differenze per quel che riguarda la produzione di ROS, questo nonostante il precedente studio avesse dimostrato una tendenza dei giovani ad una maggiore liberazione di radicali liberi rispetto agli anziani. Tale dato potrebbe essere in seguito

verificato, ampliando il numero di casi.

Dai nostri risultati in realtà si è vista la tendenza (seppur non significativa) degli anziani ad un'iperproduzione di radicali. Ciò era già stato precedentemente confermato in altri lavori in medicina umana (McKhann *et al.*, 2011) e su cane e gatto (Campbell *et al.*, 2006; Heaton *et al.*, 2002; Landsberg *et al.*, 2012), in cui con l'anzianità aumentava la probabilità di produzione di specie chimiche reattive. L'aumento dei ROS era stato visto conseguire all'anzianità, nella popolazione canina, per via dell'incremento della monoamino-ossidasi B, con successivo aumento della catalasi della dopamina. (Head *et al.*, 2002) Questo perché lo stress ossidativo nel soggetto anziano provoca un indebolimento della risposta immuno-mediata rendendolo maggiormente suscettibile alle patologie (Campbell *et al.*, 2006) come per esempio può portare ad un peggioramento o compromissione della condizione cognitiva del soggetto (Landsberg *et al.*, 2012). Per quanto riguarda la determinazione del potenziale biologico antiossidante non ci sono differenze tra sesso ed età, con presenza plasmatica in media di 2300  $\mu\text{mol/L}$ . Anche nell'analisi di Castillo *et al.*, 2013 seppur gli autori abbiano utilizzato l'OXY Adsorbent test, il potenziale antiossidante nei sani non era significativamente diverso in relazione a sesso ed età.

Per quanto riguarda il succitato rapporto ROS/BAP, esso è risultato significativo alto esclusivamente in seguito alla significatività dei ROS. Quindi sembrerebbe che la riserva endogena antiossidante sia sufficiente e non si sia ancora esaurita in questi soggetti. Probabilmente la somministrazione di una terapia di supporto esogena, quale la NAC, e il tipo di dieta assunta dagli animali riesce, in un certo senso, a tamponare l'aumento della risposta ossidante radicalica. Altri studi in futuro saranno necessari per approfondire la questione.

Per continuare la nostra analisi abbiamo deciso di valutare se anche la condizione fisica del soggetto, determinata con il body condition score, potesse in qualche modo influire sullo stato ossidativo dell'animale. Abbiamo in questo modo potuto osservare uno stress ossidativo nei pazienti ospedalizzati fortemente correlato all'obesità (Wonisch *et al.*, 2012), come avviene nei pazienti sani, sia nel cane (Laflamme *et al.*, 2012) sia nell'uomo (Bastard *et al.*, 2002) ma anche nel gatto (Tanner *et al.*, 2007). Questi studi hanno evidenziato che lo squilibrio ossidativo è scaturito dall'aumento dei valori dei d-ROMs. In generale, succede che l'incremento del ciclo di Krebs genera un eccesso di ROS in corrispondenza di un aumentato apporto calorico e di una diminuzione della spesa di energia. Uno squilibrio energetico che favorisce l'iperplasia e ipertrofia di adipociti per

accumulo ATP e rilascio di adipochine (citochine del tessuto adiposo) che inducono stress ossidativo (Hoenig *et al.* 2013). Anche nei nostri risultati sul gatto ospedalizzato si apprezza un significativo aumento dei radicali liberi con l'aumento della condizione di obesità. La risposta antiossidante al contrario sembra subire solo lievi variazioni non significative, quindi la significatività dell'analisi sul rapporto ROS/BAP è strettamente correlata ai ROS. Anche in questo caso la variazione dello stato ossidativo del gatto in base al BCS cerca di essere compensata da un controllo della risposta antiossidante. Da uno studio in medicina veterinaria (O'Brien *et al.*, 2015), in cui furono analizzati diversi antiossidanti come catalasi, glutazione perossidasi, superossido dismutasi nei globuli rossi (RBC), non era emersa alcuna differenza significativa nei gatti con l'aumento del peso corporeo. Questo a differenza di quanto è stato dimostrato in medicina umana, ove l'aumento del BCS del soggetto è stato correlato ad una diminuzione degli antiossidanti nel plasma; l'accumulo di grasso è stato equiparato all'aumento dei marcatori di stress ossidativo (Wonisch *et al.*, 2012), e correlato, al contempo, allo stato infiammatorio di un soggetto (Codoñer-Franch *et al.*, 2011). La condizione fisica dei soggetti non è stata valutata solamente in funzione del BCS a cinque punti, ma anche in funzione della presenza/assenza di anoressia nei soggetti. Il nostro scopo è stato quello di valutare se nei nostri pazienti si sono verificate alterazioni ossidative in relazione all'inappetenza. La determinazione della condizione e durata dell'anoressia è servita a determinare se la deplezione antiossidante può essere influenzata dalla mancata alimentazione e se l'integrazione di n-acetilcisteina somministrata alla dose di 70 mg/kg BID EV sia sufficiente a soddisfare l'esaurimento della riserva endogena plasmatica di antiossidanti anche nei soggetti che non si sono alimentati per un determinato periodo di tempo. Nella nostra popolazione l'unico dato rilevante nella relazione tra anoressia e stress ossidativo è stato la significatività dei livelli bassi di BAP al tempo T0. Questo dato può essere spiegato dal momento che all'ingresso i soggetti anoressici/disoressici che non si nutrivano, avevano delle carenze antiossidanti significative rispetto a quelli che si alimentavano, senza particolari differenze nella produzione radicalica. Alle 48 ore dal ricovero ed alla dimissione non c'erano differenze relative al potenziale biologico antiossidante. Questo potrebbe significare che la terapia ha avuto il suo effetto ed ha migliorato lo standard antiossidante dei soggetti anoressici, come verificato in altri studi nel cane (Pasquini *et al.*, 2013) e nel gatto (Viviano *et al.*, 2009). La nostra è solo un'ipotesi dal momento che non sappiamo se è stata veramente l'integrazione con N-acetilcisteina ha implementare lo standard antiossidante o la terapia generale mirata a

controllare la patologia sottostante allo stress ossidativo. Non possiamo valutare l'effetto specifico della NAC, in quanto non abbiamo arruolato nel nostro studio una popolazione di controllo di gatti ospedalizzati critici non trattati.

Proseguendo con la nostra indagine ci siamo interessati di verificare se anche nel gatto lo stress ossidativo poteva insorgere in maniera diversa in seguito al tipo di patologia e all'apparato principalmente coinvolto, motivo del ricovero. Questo lo abbiamo fatto tenendo in considerazione risultati ottenuti in precedenza, ove era stato visto il coinvolgimento dei radicali in numerose manifestazioni morbose, a carattere acuto o cronico (Babior, 2000). Recentemente nello studio di Baror et al., 2015 era stato evidenziato che nei pazienti politraumatizzati, pazienti settici, pazienti con distress respiratorio, pazienti colpiti da ischemie come ictus o infarti miocardici, etc. potevano presentare modificazioni delle sostanze pro-ossidanti e anti-ossidanti normalmente presenti in circolo. Nella nostra popolazione il paziente con patologie interessanti il sistema nervoso sembra essere il più suscettibile allo stress ossidativo, seguito dai pazienti con interessamento del cardio-circolatorio, del gastro-enterico e infine dell'urinario sia in termini di produzione di ROS sia in termini di deplezione antiossidante (con un'alta significatività nel loro rapporto. Il fatto che il sistema nervoso sia il sistema più colpito da stress ossidativo è in accordo sia con la medicina umana (Bayir et al., 2002) (Murphy, 2009) (Tsai et al., 2014) sia con la medicina veterinaria (Park et al., 2012) (Landsberg et al., 2012). Dalla letteratura era emerso che gli astrociti nel paziente felino giocavano un ruolo importante nel controllo dello stress ossidativo (Testa et al., 2009) perché produttori di perossiredossina VI, importante enzima antiossidante. In questo contesto però sembra che la risposta antiossidante subisca un crollo notevole nei pazienti con coinvolgimento cerebrale, e questo può essere dovuto, come spiegato da Baror et al., 2015, al fatto che i nostri pazienti, essendo per lo più soggetti politraumatizzati, possano avere subito dei traumi che hanno ossidato l'enzima. Anche il cardio circolatorio risulta essere uno degli apparati principalmente coinvolti nel processo ossidativo per quel che dimostrato in umana (Hill et al., 1997), anche se mancano studi in veterinaria. Procedendo in ordine, sul gastroenterico evidenti manifestazioni di stress ossidativo riguardano il fegato (Cetner et al., 2002) (Fytianou et al., 2006) e la gastroenterite da parvovirus (Panda et al., 2009). Sul coinvolgimento del sistema urinario/renale si hanno in letteratura ricerche prevalentemente in umana che descrivono il danno tubulare acuto (Komisaroff et al., 2007) e AKI (Schrier et al., 2004) (Heyman et al., 2011) ma anche in veterinaria, nonostante siano limitati (Keegan and Webb, 2010). I pazienti con accezione "altri" sembrano

manifestare lieve stress ossidativo ma essendo molteplici gli apparati coinvolti (tra respiratorio, riproduttivo e endocrino) e limitato il numero di casi questo dato non è facilmente spiegabile. Probabilmente ampliando la casistica e effettuando ulteriori valutazioni potremmo approfondire meglio la questione.

Per quanto riguarda i pazienti con SIRS, non abbiamo ottenuto alcun risultato significativo, sebbene sembra esserci una lieve tendenza dei soggetti in sirs ad una maggiore produzione di ROS e probabilmente, ampliando il numero di casi, la statistica potrebbe risultare rilevante. Attualmente ci sono poche indagini sulla relazione tra stress ossidativo e sirs in medicina veterinaria; in medicina umana (Nogueira et al., 2015), è stato visto che in condizioni di SIRS lo squilibrio redox che si instaura porta all'insorgenza di stress ossidativo, in seguito all'abnorme risposta infiammatoria di fase acuta, che aumenta la produzione di proteina C reattiva dal fegato; da quest'evento aumentano i mediatori infiammatori, e di conseguenza i radicali liberi. Neutrofili, eosinofili, leucociti e altre cellule del sistema immunitario vengono richiamati nei tessuti danneggiati e, producendo radicali liberi, alterano l'equilibrio tissutale con diversi effetti devastanti per la cellula.

In medicina umana, l'incidenza di SIRS nei pazienti clinici è vicino al 50%, e all'80% nei pazienti chirurgici ricoverati in ICU (Robertson and Coopersmith, 2006). La condizione di stress ossidativo è stata associata alla sirs in diversi studi in medicina umana (Nogueira et al., 2015) in seguito alla pubblicazione del saggio di Bielsaski e McGregor, 2007, in cui fu delineato che lo stress ossidativo è implicato nel processo di sepsi e sirs ed è lui stesso a determinarne gravità. Molti studi sono stati fatti nei soggetti ricoverati in ICU e molti ancora dovranno essere condotti per valutare sia la presenza dei marker di stress, che la capacità antiossidante del siero e l'eventuale prognosi futura, sicuramente influenzata dal capacità dell'organismo di rispondere e tamponare la produzione radicalica (Karapetsa et al., 2013).

Ma come varia la condizione ossidativa nel tempo e quali sono i veri motivi perché tale condizione dovrebbe essere tenuta sotto controllo?

Durante il ricovero si assiste ad un'alterazione del bilancio redox dei nostri pazienti in cui si osservano alti livelli di radicali all'ingresso in terapia intensiva, che subiscono un decremento significativo, e bassi livelli di antiossidanti che subiscono un lieve incremento non significativo intorno alle dimissioni. Si osserva nella figura 23 un andamento a "V" dei radicali liberi e a "V rovesciata" degli antiossidanti che sembra dimostrare un tentativo di riequilibrio fisiologico organico non adeguatamente compensato. Questo tentativo può

essere dimostrato nell'analisi del rapporto ROS/BAP, con un valore che tende a diminuire nel tempo. Questo rapporto ci fornisce informazioni concrete sulle variazioni del meccanismo compensatorio allo stress nel tempo ed indica che all'ingresso in ICU sembra esserci una vera condizione di stress ossidativo, che diventa più lieve alla fine del ricovero. Considerando i valori ricavati da quest'analisi sembrerebbe che al momento del ricovero i pazienti abbiano un quadro di stress ossidativo più critico, rispetto alla dimissione. L'ipotesi più ovvia per spiegare questo andamento trova spiegazione nel probabile effetto benefico dato dalla stabilizzazione del paziente o dalla somministrazione della terapia antiossidante (N-acetilcisteina). Osservando la produzione antiossidante nel tempo, si percepisce un lieve aumento intorno alle 48 ore, e un nuovo decremento al termine del ricovero. Nonostante questo minimo decremento la terapia continua ad essere suggerita, poiché sulla base di quanto precedentemente detto, limita la deplezione antiossidante e incoraggia il controllo dello stress ossidativo, compensando l'aumento radicalico. E' possibile che con la sospensione della somministrazione si possa ottenere un esaurimento della riserva antiossidante endogena e un peggioramento dello stato ossidativo dell'individuo. Attualmente altri studi sono necessari per verificare l'effetto benefico del farmaco antiossidante sulla popolazione critica, con confronto effettivo con soggetti non trattati anche in termini di sopravvivenza. L'analisi della sopravvivenza infatti si colloca tra gli obiettivi cardini del nostro lavoro poiché è in grado di fornire un presupposto scientifico importantissimo: incoraggiare il clinico a valutare lo stato ossidativo dell'animale per controllarne lo sviluppo ed arrestarne la propagazione qualora questo dimostri di essere un marker prognostico. Nella valutazione della sopravvivenza individuale si è vista la tendenza, seppure non significativa, dei soggetti morti ad aver sviluppato maggiore stress ossidativo, sia in termini di aumento radicalico, sia in termini di deplezione antiossidante (Figure 38,39). La popolazione anziana maschile è risultata essere quella caratterizzata da una maggiore mortalità e questo è in accordo con il fatto che i soggetti hanno prodotto un abnorme quantità di specie chimiche reattive durante il ricovero. Questo è un dato importantissimo poiché trova conferma anche in precedenti lavori in medicina umana e veterinaria sia per quanto riguarda il sesso (Torodova et al., 2005) (Fano et al., 2001) (Castillo et al., 2013), sia per quanto riguarda l'età (McKhann et al., 2011) (Campbell et al., 2006; Heaton et al., 2002; Landsberg et al., 2012). In particolare nei soggetti in SIRS, in cui avevamo visto una tendenza allo stress ossidativo, si verifica un aumento di mortalità confermato dal lavoro in medicina umana del 1999 (Gutteridge et al., 1999), in cui era specificato che la maggior parte dei decessi ottenuti

in terapia intensiva erano riconducibili alla sepsi ed alle sue sequele tra cui appunto la SIRS. Quanto appena detto potrebbe avvallare il significato prognostico dello stress ossidativo nel paziente critico ed rappresenta una base fondamentale per la ricerca futura. Certo è che l'analisi dello stress ossidativo necessita di una valutazione più approfondita in funzione dell'indice di gravità della patologia stessa. Per determinare la gravità della patologia in un soggetto felino ospedalizzato, abbiamo deciso di utilizzare uno score clinico, la scala Apple score full, validata nel gatto. Questa scala non è mai stata utilizzata prima d'ora ed è l'unica attualmente in uso per la valutazione della probabilità di sopravvivenza nel paziente felino. La Apple score nel nostro studio è stata applicata in funzione di sesso ed età, BCS e anoressia, in funzione dell'apparato coinvolto, dello sviluppo di sirs e del tempo di ricovero. Dai risultati le uniche differenze significative sono emerse in seguito all'anzianità e alla sopravvivenza, relativamente al tempo. Osservando la tabella 21 si può notare che i soggetti con Apple score di circa 41 punti sono morti, mentre quelli con Apple score intorno a 35, sono sopravvissuti. La Apple score rispecchia in modo significativo la gravità della malattia in quanto individua una correlazione marcata tra mortalità e soggetti con Apple score maggiore di 35 punti. I soggetti con coinvolgimento del sistema nervoso sembrano aver minor probabilità di sopravvivenza rispetto agli altri pari ad un 32,2 %, ma i risultati non sono nemmeno qui significativi. Seppure essendo validata, questa scala non è mai stata utilizzata in altri lavori, quindi non è stato possibile confrontare i risultati ottenuti nel nostro studio con altri.

L'ultima valutazione sulla nostra popolazione è stata eseguita a posteriori, considerando il lavoro di Christopher, et al, 1995 in cui era stato dimostrato che lo stress ossidativo e la formazione di **corpi di Heinz** erano fortemente correlati, è stata la ricerca di quest'ultimi in strisci ematici per verificare questa ipotesi anche nel nostro studio.

I corpi di Heinz, anche chiamati corpi di Heinz-Ehrlich sono inclusioni di emoglobina denaturata localizzate negli eritrociti (Jacon and Winterhalter, 1970) descritte per la prima volta da Robert Heinz un medico tedesco che individuò la presenza di queste inclusioni in casi di anemia emolitica. I corpi di Heinz si formano in seguito al danneggiamento delle componenti molecolari dell'emoglobina, generalmente per danno ossidativo o in seguito a una mutazione genetica. Ne risulta che un elettrone dell'emoglobina sia trasferito a una molecola di ossigeno, creando una specie reattiva dell'ossigeno che può provocare danno cellulare con conseguente lisi. Le cellule danneggiate sono rimosse dai macrofagi nella milza, dove le membrane sono rimosse generando le cosiddette "cellule

dentellate", echinociti. Il processo di denaturazione proteica è irreversibile e la continua eliminazione delle cellule danneggiate che porta all'anemia. Nel nostro studio abbiamo visto che la maggior parte dei soggetti era anemica (per diversi gradi) ma che i corpi di Heinz sono stati segnalati solo in un 10% della popolazione (4 soggetti su 40). E' difficile fare una valutazione a riguardo con un così basso numero di segnalazioni, tuttavia si può dedurre che la presenza di corpi di Heinz avvalora l'ipotesi di stress ossidativo, ma la loro assenza non ne esclude la presenza. (Christopher, et al, 1995)

Questo studio ha presentato alcuni limiti tra cui il limitato numero di pazienti a cui è stato possibile effettuare il prelievo alle 48 ore e alle dimissioni per diversi motivi: alcuni soggetti erano poco collaborativi e/o troppo aggressivi, molti di questi non potevano nemmeno essere sedati per la grave condizione in cui versavano, oppure alcuni soggetti sono stati soppressi o dimessi prima delle 48 ore, altri presentavano crisi convulsive e si stressavano particolarmente per l'esecuzione del prelievo. Un numero maggiore di pazienti, specialmente alle 48 ore e alle dimissioni, ci avrebbe permesso di indagare più in dettaglio lo stress ossidativo in funzione di tutti i fattori che abbiamo analizzato.

Uno dei limiti più grossi di questo studio è stata l'omogeneità dei gruppi nell'utilizzo dello score clinico di gravità nel paziente felino. Lo score infatti ha dato risultati simili per ogni paziente (con valori di somma in media da 25 a 40), che non ha permesso di trovare delle differenze sostanziali nei gruppi in correlazione con lo stress ossidativo, dando al contrario risultati positivi solo in relazione all'anzianità e alla sopravvivenza. Ci ha sorpreso non trovare una correlazione marcata tra mortalità e stress ossidativo, che forse potrebbe trovare un riscontro con un ampliamento della casistica.

Uno dei risultati sicuramente non attesi è stata la non significatività nei soggetti in SIRS, nonostante gli studi precedenti abbiamo dimostrato una correlazione evidente con lo stress ossidativo. Probabile che il numero non elevato di pazienti in SIRS possa aver condizionato il risultato così come avrebbe potuto fare la differenza considerare la gravità della SIRS, intesa come numero di criteri di SIRS presenti nei pazienti.

Altro limite potrebbe essere riferibile al fatto di non avere un gruppo di controllo che non abbia ricevuto la somministrazione di N-acetilcisteina, al fine di confrontare i successi del trattamento.

## **2.5 Conclusioni:**

I nostri risultati supportano la presenza di uno stress ossidativo nei pazienti ospedalizzati, soprattutto maschi e obesi, e sebbene debba ancora essere confermato, un ruolo prognostico dello stress ossidativo in ICU.

In conclusione i risultati ottenuti nella nostra ricerca hanno fornito spunti interessanti e di riflessione per ricerche future. Altri studi sarebbero auspicabili soprattutto sugli aspetti terapeutici nella gestione dello stress ossidativo e sul suo significato prognostico.

## **Bibliografia:**

1. Abilés, J; De la Cruz, A; Pérez Castaño, J; Rodríguez-Elvira, M; Aguayo, E; Moreno-Torres, R; Llopis, J; Aranda, P; Argüelles, S; Ayala, A; de la Quintana, A. M; Planells, E. M. “*Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study*” (*Critical Care* 2006; 10: pp 146).
2. Allen, A.L. “*The diagnosis of acetaminophen toxicosis in a cat*” (*Canadian Veterinary Journal*, 2003; 44: pp 509–510).
3. Arlati, S; Storti, E; Pradella, V; Bucci, L; Vitolo, A; Pulici, M; “*Decreased fluid volume to reduce organ damage: a new approach to burn shock resuscitation? A preliminary study.*” (*Resuscitation* 2007; 72: pp 371–378).
4. Arroyo, V; García-Martinez, R; Salvatella, X; “*Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis.*” (*J Hepatol* 2014; 61: pp 396–407).
5. Aruoma, O.I; Halliwell, B; Hoey, B.M; Butler, J. “*The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid*” (*Free Radical Biology&Medicine*, 1989; 6: pp 593–597).
6. Atkuri, KR; Mantovani, JJ; Herzenberg, LA; “*N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency*”. (*Curr Opin Pharmacol*, 2007; 7: pp 355–359).
7. Avizeh, R; Najafzadeh, H; Razijalali, M; Shirali, S. “*Evaluation of prophylactic and therapeutic effects of Silymarin and N-acetylcysteine in acetaminophen induced hepatotoxicity in cats*” (*J. vet. Pharmacol. Therap.*, 2009; 33: pp 95–99).
8. Babior, Bernard M. “*Phagocytes and Oxidative Stress*” (*Am J Med.* 2000; 109: pp 33–44).
9. Barnes PJ. “*Reactive oxygen species and airway inflammation*”. (*Free Rad Biol Med.* 1990; 9: pp 235-243).
10. Baror, D; Baror, R; Rael, L.T; Brody, E.N; “*Oxidative stress in severe acute illness*”. (*Redox Biology*, 2015; 4: pp 340–345).
11. Baskin, CR; Hinchcliff, KW; DiSilvestro, RA; et al. “*Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs*” (*Am J Vet Res*, 2000; 61(8): pp

886–89)1.

12. Bastard, JP; Maachi, M; Lagathu C, et al. “Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance”. (*Eur Cytokine Netw* 2006; 17: pp 4–12.)
13. Bastard, JP; Maachi, M; Van Nhieu, JT; et al. “Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro.” (*J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: pp 2084–208)
14. Basu, A; Desvaraj, S; Jilal, I; “Dietary factors that promoter or retard inflammation” (*Arterioscler Thrombe Vasc Bio*, 2006; 26: pp 995-1001)
15. Bayir, H; Kagan, V.E; Tyurina, Y.Y; Tyurin, V; Ruppel, R.A; Adelson, P.D; Graham, S.H; Janesko, K; Clark, R.S; Kochanek, P.M; “Assessment of antioxidant Reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children (*Pediatric Research*, 2002; 51(5): pp 571–578).
16. Bedreag, O.H; Rogobete, A.F ; Sarandan, M; Cradigati, A.C; Papurica, M; Dumbuleu, M.C; Mihai Chira, A.; Rosu, O.M; Sandesc, D; “Oxidative stress in severe pulmonary trauma in critical ill patients. Antioxidant therapy in patients with multiple trauma — a review” (*Anesthesiology Intensive Therapy*, 2015; vol. 47: pp 351–359).
17. Benedetti, S; Primitera, M; Catani, S; Finco, A; Canestrari, F; Cornelli,U; “Performance Evaluation of the Innovative PAT Test, Comparison with the Common BAP Test and Influence of Interferences on the Evaluation of the Plasma Antioxidant Capacity”(Clin. Lab. 2013; 59: pp 1091-1097).
18. Biary, N; Xie, C; Kauffman, J; Akar, F. G; “Biophysical properties and functional consequences of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in intact myocardium”. (*J Physiol*, 2011; 589: pp 5167–5179).
19. Bielsasky, H.K; McGregor, G.P; “Antioxidant therapy in critical care-is the circular microcirculation the primary target?” (*Crit. Care Med*, 2007; 35: pp 577-583).
20. Binder, L.A; Wolf- Jonston, A, Buffington, C.A; Roppolo, J.R; DeGroat, W.C; Kanai, A.J; “Altered inducible nitric oxide syntetase expression and nitric oxide production in the bladder of cats with feline interstitial cystitis” (*The Journal of Urology*, 2005; 173: pp 625–629).
21. Bone, RC; Balk, RA; Cerra ,FB, Dellinger, RP; Fein, AM; Knaus, WA;

Schei, RM; Sibbald, WJ. "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." (*Chest.*, 1992; 101: pp 1644-55.)

22. Bowers, R; Cool, C; Murphy, RC; et al. "Oxidative stress in severe pulmonary hypertension" (*Am J Respir Crit Care Med*, 2004; 169(6): pp 764–769).

23. Brady, CA; Otto, CM; Winkle, TJ et al. "Severe sepsis in cats: 29 cases (1986–1998)". (*J Am Vet Med Assoc*, 2000; 217: pp 531–535).

24. Branter, E; Drescher, N; Padilla, M; Trepanier, L.A; "Antioxidant Status in Hyperthyroid Cats before and after Radioiodine Treatment" (*J Vet Intern Med*, 2012; 26: pp 582–588).

25. Buur, J.L; Diniz, P.V.P; Roderick, K.V; KuKanich, B; Tegzes, J.H. "Pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral and intravenous administration to healthy cats" (*AJVR*, 2013; Vol 74, No. 2).

26. Calder, PC; "Dietary modification of inflammation with lipid" (*Proc Nutr Soc*, 2002; 61: pp 345-358).

27. Campbell, DJ; Heaton, PR. "Assessment of ex vivo responses to T-cell mitogens and oxidative stress in lymphocytes from healthy adult and senior cats" (*The Journal of nutrition*, 2006, 136: 2084–2086).

28. Campbell, V.L; "Respiratory complications in critically illness of small animals" (*Vet Clin Picc Anim*, 2011; 41: pp 709-716).

29. Cao, G; Prior, R.L; "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum" (*Clinical Chemistry*, 1998; 44 no. 6: pp 1309-1315).

30. Carratelli, M; Porcaro, R; Ruscica, M; De Simone, E; Bertelli, AAE; Corsi, MM. "Reactive Oxygen Metabolites (ROMs) and prooxidant status in children with Down Syndrome". (*International Journal of Clinical Pharmacology Research*. 2001; 21 (2): pp 79–84).

31. Castillo, C; Pereira, V; Abuelo, A; Guimarey, R; Garcia-Vaquero, M; Benedito, J L; Hernández, J. "Preliminary results in the redox balance in healthy cats: influence of age and gender" (*Journal of feline Medicine and Surgery*, 2012; 15: pp 328-332).

32. Center, S a; Randolph, J F; Warner, K L; McCabe-McClelland, J;

- Fouremant, P; Hoffmann, W E; Erb, H N. “*The effects of S-adenosylmethionine on clinical pathology and redox potential in the red blood cell, liver, and bile of clinically normal cats.*” (*Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 2005; 19: pp 303–314).
33. Cetner, SA; Warner, KL; Erb, HN; “*Liver glutathione concentrations in dogs and cats with naturally occurring liver disease*”. (*Am J Vet Res*, 2002; 63(8): pp 1187–1197).
34. Charvat, R.A; Arrizabalaga, G. “*Oxidative stress generated during monensin treatment contributes to altered Toxoplasma gondii mitochondrial function*” (*Scientific Reports*, 2016; 6: 22997).
- Chelkeba, L; Najmeddin, F; Ahmadi, A; “*The immunological benefit of higher dose N-acetyl cysteine following mechanical ventilation in critically ill patients*” (*Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 22: pp 57).
35. Christopher, M.M; Broussard, J.D; Peterson, M.E; “*Heinz body formations associated with ketoacidosis in diabetic cats*” (*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1995; 9: pp 24- 31).
36. Codoñer-Franch, P; Valls-Bellés, V; Arilla-Codoñer, A and Alonso-Iglesias, E. “*Oxidant Mechanisms in Childhood Obesity: The Link between Inflammation and Oxidative Stress*” (*Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2011; Vol. 158: pp. 369-384)
37. Couzinet, S; Dubremetz, J. F; Buzoni-Gatel, D; Jeminet, G; Prensier, G. “*In vitro activity of the polyether ionophorous antibiotic monensin against the cyst form of Toxoplasma gondii*”. (*Parasitology*, 2000; 121 (Pt 4): pp 359–365).
38. Cowley, HC; Bacon, PJ; Goode, HF; et al. “*Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivors and non survivors.*” (*Crit Care Med*, 1996; 24: pp 1179–1183)
39. Crimi, E; Sica, V; Williams-Ignaro, S; Zhang, H; Slutsky, AS; Ignarro, L; et al. “*The role of oxidative stress in adult critical care*”. (*Free Radic Biol Med.*, 2006; 40(3): pp 398-406).
40. Darwish, R.S; Amiridze, N; Aarabi, B; “*Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury*” (*Journal of Trauma*, 2007; 63(2): pp 439–442).
41. De Clue, Amy E; Delgado, C; Chang, CH; Sharp, C L; “*Clinical and immunologic assessment of sepsis and the systemic inflammatory response*

- syndrome in cats*” (*J Am Vet Med Assoc*, 2011; 238: pp 890–897).
42. Dickinson, DA; Forman, HJ. “*Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol*”. (*Ann NY Acad Sci*, 2002; 973: pp 488– 504).
43. Diederich, D; Skopec, J; Diederich, A; Dai, FX. “*Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals*.” (*Am J Physiol*, 1994; 266: pp 1153–1161).
44. Dobson; H; Denenberg, S. “*Ageing and imaging based neuropathology in the cat*” (*In: Programs and abstracts of the 17th Congress of ESVCE and 1st Congress of ECAWBM. Avignon: 2011*)
45. Dohi, K; Satoh, K; Ohtaki, H; Shioda, S; Miyake, Y; Shindo, M; Aruga T. “*Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging*”. (*In Vivo*, 2005; 19 (5): pp 855–860).
46. Duflo, F; Debon, R; Goudable, J; et al. “*Alveolar and serum oxidative stress in ventilator associated pneumonia*” (*Br J Anaesth*, 2002; 89(2): pp 231–236).
47. Edremitlioglu, M; Kilic, D; Oter, S; Kisa, U; Korkmaz, A; Coskun, O; et al. “*The effect of hyperbaric oxygen treatment on the renal functions in septic rats: relation to oxidative damage*.” (*Surg Today*, 2005; 35: pp 653–61).
48. Fano, G; Mecocci, P; Vecchiet, J; Belia, S; Fulle, S; Polidori, MC et al. “*Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle*” (*Muscle Res cell Motility*, 2001; 22: pp 345-351).
49. Ferrari, R.S; Andrade, C.F. “*Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury*” (*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015; Article ID 590987, 14 pages)
50. Folkerts, G; Kloek, J; Muijsers, R.B.R.; Nijkamp, F.P; “*Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation*”. (*Eur. J. Pharmacol*, 2001; 429: pp 251–262).
51. Forgiarini, L. F; Forgiarini, F.A. Jr., da Rosa, D.P; Silva, M.B; Mariano, R; Paludo, A.D. “*N-acetylcysteine administration confers lung protection in different phases of lung ischemia-reperfusion injury*” (*Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 2014; 19: pp. 894–899).
52. Fraga, C.M; Tomasi, C-D; Biff, D; MSc, Topanotti, M.F.S; Felisberto, F; Vuolo, F; Petronilho, F; Dal-Pizzol, F; Ritter, C. “*The Effects of N-Acetylcysteine*

*and Deferoxamine on Plasma Cytokine and Oxidative Damage Parameters in Critically Ill Patients With Prolonged Hypotension: A Randomized Controlled Trial*” (*Journal of Clinical Pharmacology*, 2012; 52: pp 1365-1372).

53. Freeman, LM; Rush, JE; Milbury, PE; et al. “Antioxidant status and biomarker of oxidative stress in dogs with congestive heart failure”. (*J Vet Intern Med*, 2005; 19: pp 537–541).

54. Fruebis, J; Tsao, TS; Javorschi, S; et al. “Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.” (*Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: pp 2005–2010).

55. Fytianou, A; Koutinas, AF; Saridomichelakis, MN; et al. “Blood alpha-tocopherol, selenium, and glutathione peroxidase changes and adipose tissue fatty acid changes in kittens with experimental steatitis (yellow fat disease)”. (*Biol Trace Elem Res*, 2006; 112: pp 131–143).

56. Gabali, A.M; Anzinger, J.J; Spear, G.T; Thomas, L.L; “Activation by inflammatory stimuli increases neutrophil binding of HIV type 1 and subsequent infection of lymphocytes” (*J Virol* 78, 2004; pp 10833-10836).

57. Gerardi, G. M; Usberti, M; Martini, G; Albertini, A; Sugherini, L; Pompella, A; Di, LD. “Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationships to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation.” (*Clin Chem Lab Med*, 2002; 40(2): pp 104-10).

58. Geudens, N; van de Wauwer, C; Neyrinck, A.P. et al., “N-acetylcysteine pre-treatment attenuates inflammatory changes in the warm ischemic murine lung” (*Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2007; 26: pp. 1326–1332).

59. Gokdemir, MT; Sogut, O; Kaya, H; et al. “Role of oxidative stress in the clinical outcome of patients with multiple blunt trauma” (*J Int Med Res*, 2012; 40(1): pp 167–173).

60. Goodyear-bruch, C; Pierce, J. “OXIDATIVE STRESS IN CRITICALLY ILL PATIENTS” *University of Kansas, Kansas City, Kan. American Journal of Critical Care*. 2002; 11: pp 543-551).

61. Green, SL; Bouley, DM; Pinter, MJ; et al. “Canine motor neuron disease: clinicopathologic features and selected indicators of oxidative stress” (*J Vet Intern Med*, 2001; 15: pp 112–119).

62. Gunn-Moore, D; Moffat, K; Christie, LA; et al. “Cognitive dysfunction

- and the neurobiology of ageing in cats” (*J Small Anim Pract*, 2007; 48: pp 546–53).
63. Gutteridge, J M; Mitchell, J. “Redox imbalance in the critically ill” (*British Medical Bulletin* 1999; 55: pp 49-75).
64. Hauptman, JG; Walshaw, R; Olivier, NB “Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs” (*Vet Surg.* 1997; 26(5): pp 393-7
65. Hayashi, I; Morishita, Y; Imai, K; Nakamura, M; Nakachi, K; Hayashi, T. “High-through put spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum”. (*Mutat Res.* 2007; 631(1): pp 55–61).
66. Hayes, G; Mathews, K; Doig, G; Kruth, S; Boston, S; Nykamp, S; Poljak, Z. and Dewey, C; “The Feline Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (Feline APPLE) Score: A Severity of Illness Stratification System for Hospitalized Cats” (*J Vet Intern Med*, 2011; 25: pp 26–38 )
67. Heaton, Paul R; Ransley, Raymond; Charlton, Chris J; Mann, Sarah J; Stevenson, Joy; Smith, Brigitte H E; Rawlings, John M; Harper, E Jean “Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay for Assessing Levels of DNA Damage in Canine and Feline Leukocytes” (*J.Nutr.* 2002; 132: pp 1598–1603).
68. Herndon, A.M; Breshears, M.A; McFarlane, D; “Oxidative Modification, Inflammation and Amyloid in the Normal and Diabetic Cat Pancreas” (*Comp. Path.*, 2014; 151, pp 352 e 362).
69. Heyman, SN; Rosen, S; Rosenberger, C; “A role for oxidative stress” (*Contrib Nephrol*, 2011; 174: pp 138–48).
70. Hill, M.F; Singal, P.K; “Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure sub sequent to myocardia linfarction”. (*Circulation*, 1997; 96(7): pp 2414–2420).
71. Ho, E., Bray, T.M.; “Antioxidants NF-kB activation, and diabetogenesis.”(*Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 1999; 222, pp 205–213).
72. Hoenig, M; Pach, N; Thomaseth, K; Le, A; Schaeffer, D; Ferguson, D.C. “Cats differ from other species in their cytokine and antioxidant enzyme response when developing obesity” (*Obesity*, 2013; 21, 407-414).
73. Huber, S; Biberthaler, P; Delhey, P et al.; “Predictors of poor outcomes after significant chest trauma in multiply injured patients: a retrospective

- analysis from the German Trauma Registry (Trauma Register DGU®).” (*Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2014; 22: pp 52).
74. Hughes, AK; Stricklett, PK; Padilla, E; Kohan, DE. “Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells.” (*Kidney Int*, 1996; 49: pp 181–9).
75. Hwabejire, JO; Lu, J; Liu, B; Li; Halaweish, I; Alam, HB; “Valproic acid for the treatment of hemorrhagic shock: a dose-optimization study.” (*J Surg Res*, 2014; 186: pp 363–370).
76. Iorio, E.L, “La valutazione globale dello stress ossidativo” (*Diacron International*, 2004).
77. Iorio, E.L; “La gestione dello stress ossidativo nella pratica clinica”. (2005)
78. Iorio, E.L; “La misurazione dello stress ossidativo” (*Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo*, 2006)
79. Iorio, E.L; “Lo stress ossidativo. Aspetti fisiopatologici e clinici”. (2003)
80. Iris, F; Benzie, F; Strain, J.J; “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay” (*Anal Biochem*, 1996; 239: pp 70-76).
81. Jacon, H; Winterhalter, K; “Unstable Hemoglobins: The Role of Heme Loss in Heinz Body Formation” (*National Academy of Sciences*, 1970; 64: pp 697-701)
82. Jones, DP; “Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance”. (*Methods Enzymol*, 2002; 348: pp 93–112)
83. Joshi, M.S; Julian, M.W; Huff, J.E; Bauer, J.A; Xia, Y; Crouser, E.D; “Calcineurin Regulates Myocardial Function during Acute Endotoxemia” (*Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 173: pp 999–1007).
84. Karapetsa, M; Pitsika B, M; Goutzourelas B, N; Stagos B, N; Tousia Becker B, A; Zakyntinos, P. “Oxidative status in ICU patients with septic shock” (*Food and chemical toxicology*, 2013; pp 61: pp 106-111).
85. Kaukonen, K.M; Bailey, M; Pilcher, Cooper, J; Bellomo, R. “Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis” (*The new england journal o f medicine*, 2013; 17: pp 372)
86. Keegan, R.F; Webb, C.B “Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure.” (*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2010; 24:

pp 514-519).

87. Kelly, GS. "Clinical applications of N-acetylcysteine". (*Altern Med Rev*, 1998; 3: pp 114–127).
88. King LG. "Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats" (Elsevier, 2004; pp. 1–11).
89. Kinnula, V.L; Crapo, J.D; Raivio, K.O; "Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung". (*Lab. Invest*, 1995; 73: pp 3–19).
90. Kiral, F; Karagenc, T; Pasa, S; Yenisey, C; Seyerek, K. "Dog with Hepatozoon Canis respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide" (*Veterinary parasitology*, 2005; 131 (1-2): pp 15-21).
91. Kirschvink, N; Marlin, D; Delvaux, F, et al. "Collection of exhaled breath condensate and analysis of hydrogen peroxide as a potential marker of lower airway inflammation in cats" (*Vet J*, 2005; 169: pp 385–396).
92. Koksall, GM; Sayilgan, C; Aydin, S; Oz, H; Uzun, H. "Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis." (*J Surg Res*, 2004; 122: pp 180–3).
93. Komisarof, JA; Gilkey, GM; Peters, DM; et al. "N-acetylcysteine for patients with prolonged hypotension as prophylaxis for acute renal failure." (*Crit Care Med*, 2007; 35: pp 435-441).
94. Krhre, J; "Free radicals as mediators of tissue injury and disease" (*Critical reviews toxicology*. 1993; 21: pp 21-48).
95. Kruger, J.M; Lulich, J.P; MacLeay, J; Merrills, J; Paetau-Robinson, I; Brejda, J; Osborne, C.A; "Comparison of foods with differing nutritional profiles for long-term management of acute nonobstructive idiopathic cystitis in cats" (*JAVMA*, 2015; Vol 247).
96. Laflamme, D.P. "COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat?" (*J. Anim. Sci*, 2012; 90: pp 1653–1662).
97. Landsberg, G.M; Nichol, J; Araujo, J.A; "Cognitive Dysfunction Syndrome A Disease of Canine and Feline Brain Aging" (*Vet Clin Small Anim*, 2012; 42: pp 749–768).
98. Lang, John D; Mcardle, Philip J; Oreilly, Philip J; Matalon, Sadis.

“Oxidant-Antioxidant Balance in Acute Lung Injury” (*CHEST JOURNAL*, 2002; pp 232-235).

99. Laurent, B; Ardaillou, R; “Reactive oxygen species: production and role in the kidney”. (*Am J Physiol*. 1986; 251: pp 765-776).

100. Lavrovsky, Y.; Chatterjee, B.; Clark, R. A.; Roy, A. K. “Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases” (*Experimental Gerontology*, 2000; 35: pp 521–532).

101. Lee, B-J; Lin, J-S; Lin, Y-C; Lin, P-T. “Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial,” (*Nutrition Journal*, 2014; 13: article 79).

102. Liu, CY; Lee, CF; Wei, YH; “Role of Reactive Oxygen Species-elicited Apoptosis in the Pathophysiology of Mitochondrial and Neurodegenerative Diseases associated with mitochondrial DNA mutations.” (*J Formos Med Assoc*, 2009; 108 (8): pp 599–611).

103. Liu, M.F; Bouhsira, E; Boulouis, H-G; b, Biville, F; “The Bartonella Henselae SitABCD transporter is required for confronting oxidative stress during cell and flea invasion” (*Research in Microbiology*, 2013; 164: pp 827 e 837).

104. Liu, PT; Symons, AM; Howarth, JA; et al. “Studies in surgical trauma: oxidative stress in ischaemia-reperfusion of rat liver” (*Clin Sci* 1994; 86(4): pp 453–460).

105. Losa, G.A; Graber, R; “Spontaneous apoptosis, oxidative status and immunophenotype markers in blood lymphocytes of AIDS patients.” (*Anal Cell Pathol*, 2000; 21: pp 11-20).

106. Lyons, J; Rauh-Pfeiffer, A; Ming-Yu, Y; Lu, XM; Zurakowski, D; Curley, M; et al. “Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. (*Crit Care Med*, 2001; 29: pp 870–7).

107. Macdonald, J.; Galley, H. F.; Webster, N. R. “Oxidative stress and gene expression in sepsis” (*British journal of Anesthesia*, 2003; 90, 2: pp 221-232).

108. Mancini, A; DiSegni, C; Raimondo, S; Olivieri, G; Silvestrini, A; Meucci, E; Currò, D; “Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation” (*Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, 2016; Article ID 6757154, pp 12).

109. Markwell, PJ; Buffington, CA; Chew, DJ; et al. “Clinical evaluation of commercially available urinary acidification diets in the management of idiopathic cystitis in cats” (*J Am Vet Med Assoc*, 1999; 214: pp 361–365).
110. May, ER; Conklin, KA; Bemis, DA. “Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates”. (*Vet Dermatol*, 2016; 27(3): pp 188-47).
111. McCord, Joe M.; Edeas, Marvin A. “SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision (*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005; 59: pp 139–142).
112. McKhann, GM; Knopman, DS; Chertkow, H; et al. “The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease” (*Alzheim Dem*, 2011; 7: pp 263–9).
113. Modak, MA; Parab, PB; Ghaskadbi, SS; “Control of hyperglycemia significantly improves oxidative stress profile of pancreatic islets” (*Islets*, 2011; 3: pp 234 e 240).
114. Momoi, Y; Goto, Y; Tanide, K; Takahashi, N; Watari, T; Yamazo, K; Tsujimoto, H; Kudo, T “Increase in plasma lipid peroxide in cats fed a fish diet” (*The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 2000-2001; 63: pp 1293, 1296).
115. Montorfano, L; Becerra, A; Cerro, R; Echeverria, C; Saez, E; Morales, M.G; et al., “Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2 dependent pathway” (*Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology*, 2014; 94: pp 1068-1082).
116. Mortola, E; Okuda, M; Ohno, K; Watari, T; Tsujimoto, H; Hasegawa, A; “Inhibition of apoptosis and virus replication in Feline Immunodeficiency Virus infected cells by N-acetylcysteine and Ascorbic Acid” (*J. Vet. Med. Sci*, 1998;60: pp 1187-1193)
117. Muller, F; Svardal, A.M; Nordoy, I; Berge, R.K; Aukrust, P; Froland, S.S; “Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. (*Eur J. Clin. Invest*, 2000; 30: pp 905-914).
118. Murphy, M.P; “How mitochondria produce reactive oxygen species” (*Biochemical Journal*, 2009; 417(1): pp 1–13).

119. Naisbitt; DJ; Vilar, FJ; Stalford, AC; et al. “*Plasma cysteine deficiency and decreased reduction of nitrososulfamethoxazole with HIV infection*”. (*AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000; 16: pp 1929–1938).
120. Najafi, A; Mojtahedzadeh, M; Ahmadi, KH; Abdollahi, M; Mousavi, M;
121. Nash, SL; Savides, MC; Oehme, FW; et al. “*The effect of acetaminophen on methemoglobin and blood glutathione parameters in the cat*” (*Toxicology*, 1984; 31: pp 329–334).
122. Ninfali, P, Aloigi, G “*Variability on oxygen radicals adsorbance capacity (ORAC) in different animal species*”. (*Free Radical Research*, 2009; 29(5): pp 399-408).
123. Nogales, F; Ojeda, M.L; Fenutria, M; Murillo, M.L; Carreras, O. “*Role of selenium and glutathione peroxidase on development, growth, and oxidative balance in rat offspring*” (*Reproduction*, 2013; 146: pp.659–667).
124. Nogueira, C; Borges, F; Lameu, E; Franca, C; da Silva Rosa, C.L; Ramalho, A; “*Retinol,  $\beta$ -carotene and oxidative stress in systemic inflammatory response syndrome*” (*Rev Assoc Med Bras*, 2015; 61: pp 116-120)
125. O’Brien, T; Thomas, D.G; Morel P.C.H; Rutherford-Markwick, K.J; “*Moderate dietary supplementation with vitamin E enhances lymphocyte functionality in the adult cat*” (*Research in Veterinary Science*, 2015; 99: pp 63–69).
126. Ogino T., Packer L., Traber M.G. “*Oxidant stress and host oxidant defense mechanism.*”(*Nutritional oncology*, 1999; pp 253-268).
127. Ognuro, P.S; Ogungbamiqbe, T.O; Elemie, P.O; Egbewale, B.E; Adewole, T.A “*Plasma selenium concentration and glutathione peroxidase activity in HIV-1/AIDS infected patients: a correlation with the disease progression*” (*Niger Postgrad Med J*, 2006; 13: pp 1-5).
128. Okano, S; Yoshida, M; Fukusima et al., “*Usefulness of sistemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgment.*” (*Vet Rec*, 2002; 150: pp 245-246).
129. Olaleye, M.T. and Rocha, B.T. “*Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system*” (*Experimental and Toxicologic Pathology*, 2008; 59: pp 319–327).
130. Packer, JE; Slater TF; Willson, RL. “*Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C.*” (*Nature*, 1979; 278: pp 737–738).

131. Panda, D; Patra, RC; Nandi, S; et al. “Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection” (*Res Vet Sci*, 2009; 86: pp 36–42).
132. Papurica, M; Rogobete, A.F; Sandesc, D; Dumache, R; Nartita, R; Sarandan, M; Cradigati, A.C; Luca, L; Vernic, C; Bedreag, O.H. “Redox Changes Induced by General Anesthesia in Critically Ill Patients with Multiple Traumas.” (*Molecular Biology International*, 2015; pp 11).
133. Park, E.H; White, G.A; Tieber, L.M; “Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats”. (*Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2012; 22(2): pp 160–178).
134. Pasquini, A; Cordischi, S; Ceccherini, G; Guidi, G; Marchetti, V; “Oxidative stress and Survival Prediction Index (SP12) in critically ill dogs” (*Ospedale didattico Mario Modenato, Università di Pisa*)
135. Pasquini, A; Luchetti, E; Marchetti, V; Cardini, G. “Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of normal range in healthy Labrador dogs” (*Vet res comm*, 2008; 32: pp 137-143).
136. Pasquini, A; Roberti, S; Meucci, V; Luchetti, E; Canello, S; Giudetti, G; Biagi, G. “Association between Body Condition and Oxidative Status in Dogs ” (*Food and Nutrition Sciences*, 2013; pp 191-196).
137. Pavlika, Z; Petelin, M; Nemeč, A; Erzen, D; Skaleric, U.” Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. (*American journal of veterinary research*, 2004; 65: pp 1584-8.)
138. Pedersen, N.C; “An update on feline infections peritonitis: diagnostic and therapeutic” (*The Veterinary Journal*, 2014; 201: pp 133-141).
139. Pedersen, N.C; “An update on feline infections peritonitis: virology and immunopathogenesis” (*The Veterinary Journal*, 2014; 201: pp 123-132).
140. Pesillo, SA; Freeman, LM; Rush, JE. “Assessment of lipid peroxidation and serum vitamin E concentration in dogs with immune-mediated hemolytic anemia” (*Am J Vet Res*, 2004; 65(12): pp 1621–1624).
141. Peter, HJ; Gerber, H; Studer, H; et al. “Autonomous growth and function of cultured thyroid follicles from cats with spontaneous hyperthyroidism” (*Thyroid*, 1991; 1: pp 331–338).
142. Peterson, ME; Kintzer, PP; Hurvitz, AI. “Methimazole treatment of 262

- cats with Hyperthyroidism” (*J Vet Intern Med*, 1988; 2: pp 150–7).
143. Prah, A; Guptill, L; Glickman, NW; Tetrick, M; Glickman, LT; “Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals” (*Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2007; 9: pp 351e358).
144. Prashanth, A.K; Anand, U. “Clinical Significance of Ischemia Modified Albumin in Critically Ill Patients with Sepsis” (*Ind J Clin Biochem*, 2015; 30: pp 194–197).
145. Prior, RL; Cao, G. “In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods”. (*Free Radic Biol Med*. 1999; 27(11–12): pp 1173–1181).
146. Quinlan, GJ; Lamb, NJ; Tilley, R; et al. “Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality” (*Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155(2): pp 479–484).
147. Rahman, I; Biswas, SK; Kode, A; “Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases” (*European Journal of Pharmacology*, 2006; 533: pp 222–239).
148. Rahman, SH; Ibrahim, K; Larvin, M; et al. “Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis”. (*Gastroenterology*, 2004; 126: pp 1312–1322)
149. Ramakrishna, BS; Varghese, R; Jayakumar, S; et al. “Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity.” (*J Gastroenterol Hepatol*, 1997; 12: pp 490–494).
150. Reinhard, S; Remy, M; Reto, B. “The use of Silymarin in the treatment of liver diseases. (*Drugs*, 2001; 61: pp 2035–2063).
151. Robertson, CM; Coopersmith, CM. “The systemic inflammatory response syndrome.” (*Microbes Infect*. 2006; 8(5): pp 1382-89).
152. Roth, E; Manhart, N; Wessner, B. “Assessing the antioxidative status in critically ill patients” (*Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2004; 7: pp 161-168).
153. Rozanski, E; Chan, DL. “Approach to the patient with respiratory Distress” (*Vet Clin Small Anim*, 2005; 35(2): pp 307–317).
154. Rubio-Gayosso, I; Platts, SH; Duling, BR; “Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury.” (*Am J*

- Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 290: pp 2247–56).
155. Saad, KR; Saad, PF; Dantas Filho, L et al.; “Pulmonary impact of N-acetylcysteine in a controlled hemorrhagic shock model in rats”. (*J Surg Res*, 2013; 182: pp 108–115).
156. Sandilands, EA; Bateman, DN. “Adverse reactions associated with Acetylcysteine”. (*Clin Toxicol*, 2009; 47: pp 81–88).
157. Scandalios, J. G. “Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses” (*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005; 38: pp 995-1014).
158. Scandalios, J. G. “Oxygen Stress and Superoxide Dismutase” (*Plant Physiology*, 1993; 101: pp 7-1).
159. Scharte, M; Bone, HG; VanAken, H; et al. “Increased CO in exhaled air of critically ill patients” (*Biochem Biophys Res*, 2000; 267: pp 423–426).
160. Schleiss, MB; Holz, O; Behnke, M; et al. “The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate”. (*Eur Rep J*, 2000; 16: pp 1115–1118).
161. Schmid, RD; Hovda LR. “Acute Hepatic Failure in a Dog after Xylitol Ingestion”. (*J Med Toxicol*, 2016; 12(2): pp 201-5).
162. Schnelle, AN; Barger, AM; MacNeill, AL; Mitchell, MM; Solter, P. “Characterization of feline serum-cobalt binding”. (*Vet Clin Pathol*, 2015; 44(2): pp 275-86).
163. Schrier, RW; Wang, W. “Acute renal failure and sepsis.” (*N Engl J Med*, 2004; 351: pp 159–69).
164. Schubbel, C. “Valutazione dello stato di stress ossidativo in 50 cani in età avanzata prima e dopo somministrazione di un antiossidante” (*SUMMA*, vol. 27, 2010; 9: pp 9-15).
165. Sergeeff, J; Armstrong, PJ; Bunch, SE. “Hepatic abscesses in cats: 14 cases (1985–2002)”. (*J Vet Intern Med*, 2004; 18: pp 295–300).
166. Serra J.A; Dominiques, R.O; De Lusting, E.S; Guareschi, E.M; Famulari, A.L; Bartolome, E.L; Marschoff, E.R; “Parkinson’s disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profile in living Parkinson’s, Alzheimer’s and vascular dementia patients.” (*J. Neural. Transm.* 108, 2001; pp 1135-1148).
167. Shum, H.P; Yan, W-W; Chan, T-M; “Recent knowledge on the

*pathophysiology of septic acute kidney injury: A narrative review*” (*Journal of Critical Care*, 2016; 31 82–89).

168. Silva, S; de Cal, M; Cruz, D; Lentini, P; Corradi, V; Gallo et al. “Oxidative stress and ‘monocyte reprogramming’ in septic patients with acute kidney injury requiring CRRT.” (*Blood Purif*, 2008; 26: pp 188–92).

169. Slutsky, A S. “Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction” (*Intensive Care Med*, 2000; 26: pp 472-474).

170. Smith, KF; Quinn, RL; Rahilly, LJ. “Biomarkers for differentiation of causes of respiratory distress in dogs and cats. Part 1--Cardiac diseases and pulmonary hypertension.” (*J Vet Emerg Crit Care*, 2015; 25: pp 311-29).

171. Smith, KF; Quinn, RL; Rahilly, LJ. “Biomarkers for differentiation of causes of respiratory distress in dogs and cats: Part 2--Lower airway, thromboembolic, and inflammatory diseases”(J Vet Emerg Crit Care, 2015; 25: pp 330-48).

172. Sogawa, K; Nagaoka, T; Izumi, N; Nakabayashi, S; Yoshida, A. “Acute Hyperglycemia-Induced Endothelial Dysfunction in Retinal Arterioles in Cats” (*Investigative Ophthalmology & Visual Science*, May 2010; Vol. 51).

173. T̄ur̄ut, H; Ciralik, H; Kilinc, M; Ozbag, D; Imrek, S.S; “Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidantantioxidant status after lung contusion in rats” (*Injury*, 2009; 40: pp. 521–527).

174. Takasu, A; Shibata, M; Uchino, S; Nishi, K; Yamamoto, Y; Sakamoto, T; “Effects of arterial oxygen content on oxidative stress during resuscitation in a rat hemorrhagic shock model”. (*Resuscitation*, 2011; 82: pp 110–114).

175. Tanner, A.E; Martin, J; Saker, K.E. “Oxidative Stress and Inflammatory State Induced by Obesity in the Healthy Feline,” (*Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl.)*,2007; 91 pp. 163-166).

176. Tecles, F; Caldín, M; Tvarijonaviciute, A; Escribano, D; Martínez-Subiela, S; Cerón , J.J; “Serum biomarkers of oxidative stress in cats with feline infectious peritonitis” (*Research in Veterinary Science*, 2015).

177. Testa, M.P; Alvarado, O; Wournell, A., Lee, J; Guilford, F.T., Henriksen S.H; Phillips, T.R. “Screening Assay for Oxidative Stress in a Feline Astrocyte Cell Line, G355-5”. (*Journal of Visualized Experiments*, 2011; 53).

178. Torodova, I; Simeonova, G; Dinev, D; Gadjeva V; “Reference values of

*oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats” (Comp Clin Path, 2005; 13: pp190-194).*

179. Trepanier, LA “*Idiosyncratic Drug Toxicity Affecting the Liver, Skin, and Bone Marrow in Dogs and Cats” (Vet Clin Small Anim,2013; 43: pp 1055–1066).*

180. Trepanier, LA. “*Pharmacologic management of feline hyperthyroidism” (Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2007; 37: pp 775–778).*

181. Tsai, N.W; Chang, Y.T; Huang, C.R; Lin, Y.L; Lin, W.C; Cheng, B.C; Su, C.M; Chiang, Y.F; Chen, S.F; Huang, C.C; Chang, W.N; Lu, C.H “*Association between Oxidative stress and outcome indifferent subtypes of acute ischemic stroke” (Bio Med Research International 2014).*

182. Turedi, S; Gunduz, A; Mentese, A; Karahan, SC. “*Value of ischemia modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism.” (Am J Emerg Med., 2007; 25: pp 770–3).*

183. Valko, M; Rhodes, C.J; Moncol, J; Izakovic, M; Mazur, M; “*Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”.* (Chemico-Biological Interactions, 2006; 160: pp1–40).

184. Varzi, H.N; Esmailzadeh, S; Morovvati, H; Avizeh, R; Shahriari, A; Givi, M.E. “*Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin induced nephrotoxicity in dogs” (Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2007; 30: pp 477–481).*

185. Verbrugghe, A; Janssens, PJ G; Van De Velde, H; Cox, E; De Smet, S; Vlaemink, B; Hesta, M; “*Failure of a dietary model to affect markers of inflammation in domestic cat” (BMC veterinary research, 2014; 10: pp 104.)*

186. Viviano, K.R; Lavergne, S.N; Goodman, L; VanderWielen, B; Grundahl, L; Padilla, M; and Trepanier, L.A; “*Glutathione, Cysteine, and Ascorbate Concentrations in Clinically Ill Dogs and Cats” (J Vet Intern Med 2009; 23: 250-257).*

187. Webb, C.B; Falkowski, L. “*Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. (Journal of feline medicine and Surgery, 2009; 11: pp 271-276).*

188. Webb, C; Lehman B ,T; McCord, K; Avery B, P; Dow, D. “ *Oxidative stress during acute FIV infections cat” (Veterinary immunology and immunopathology, 2008, 122: pp 16-24).*

189. Webster, C.R.L; Cooper, J; “*Therapeutic Use of Cytoprotective Agents in*

*Canine and Feline Hepatobiliary Disease*” (*Vet Clin Small Anim*, 2009; 39: pp 631–652)

190. White CW, Stabler SP, Allen RH, et al. “Plasma cysteine concentrations in infants with respiratory distress”. (*J Pediatr* 1994; 125: pp 769–777.)

191. Willcox, JK; Ash, SL; Catignani, GL. “*Antioxidants and prevention of chronic disease*”. (*Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004; 44: pp 275–295).

192. Williams, SB; Cusco, JA; Roddy, MA; Johnstone, MT; Creager, MA. “*Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus.*” (*J Am Coll Cardiol*, 1996; 27: pp 567–574).

193. Wonisch, W; Falk, A; Sundl, I; Winklhofer-Roob, B.M; Lindschinger, M. “*Oxidative Stress Increases Continuously with BMI and Age with Unfavourable Profiles in Males,*” (*Aging Male*, 2012; 15: pp. 159-165.)

194. Wu, J; Hecker, JG; Chiamvimonvat, N; “*Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases.*” (*Adv Drug Deliv Rev*, 2009; 61: pp 351–363).

195. Wu, N.C; Chen, T.H; Yang, Y.C; Liao, F.T; Wang, J.C; Wang, J.J. “*N-acetylcysteine improves cardiac contractility and ameliorates myocardial injury in a rat model of lung ischemia and reperfusion injury*” (*Transplantation Proceedings*, 2013; 45: pp. 3550–3554).

196. Yu, S; Paetau-Robinson; “*Dietary supplements of vitamins E and C and B-carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency*” (*Veterinary Research Communications*, 2006; 30: pp 403-413).

197. Zafarullah, M; Li, W.Q; Sylvester, J; Ahmad, M. “*Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions*” (*Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003; 60: pp. 6–20).