

ATTIVITÀ ANTIRADICALICA TOTALE NEL SANGUE: DETERMINAZIONE DEI VALORI DI RIFERIMENTO NELLE SCROFETTE

TOTAL ANTIRADICAL ACTIVITY IN GLITS BLOOD: REFERENCE VALUES

PASTORELLI, G., CORINO, C., ROSSI, R., FAUSTINI, M.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano

Parole chiave: valori di riferimento, scrofette, KRL test; stress ossidativo

Key word: reference values, gilts, KRL test; oxidative stress

RIASSUNTO:

I radicali liberi sono delle specie chimiche altamente reattive e continuamente prodotte in condizioni normali. Una volta formati possono attaccare tutte le strutture all'interno dell'organismo. Un eccesso di radicali liberi può provocare disequilibri nel metabolismo cellulare e importanti danni ai tessuti. Nel test biologico KRL, tutto il potenziale antiossidante di un individuo può essere valutato sottoponendo il sangue intero o le emazie ad uno stress ossidativo. Tutti i sistemi enzimatici e chimici del campione vengono attivati per proteggere l'integrità delle cellule fino alla loro lisi. I risultati sono espressi come tempo di semi emolisi ($T_{1/2}$), cioè come tempo, espresso in minuti (min), necessario alla lisi del 50% delle cellule ematiche. Il KRL test è stato finora ampiamente utilizzato in vitro e in ambito umano; in campo veterinario sono pressoché assenti applicazioni nella specie suina; di qui la necessità di stabilire prima di tutto dei valori di riferimento per i diversi stadi fisiologici di questa specie. Sono stati effettuati dei prelievi ematici da 100 scrofette nel range di peso vivo compreso tra i 50 e i 150 kg e analizzati per l'attività antiradicalica totale. I dati sono stati sottoposti al test di normalità e quindi calcolati i valori di riferimento. I valori trovati del $T_{1/2}$ per sangue intero ed emazie sono rispettivamente compresi nel range di 66.8 – 94.80 e 42.6 – 56.4 minuti rispettivamente.

ABSTRACT

Free radicals are highly reactive chemical species continuously produced under normal biological conditions. Once formed these very reactive radical species can attack all structures within the body. So, an excess of free radicals may induce a pronounced impairment of the cellular metabolism and an important damage of tissues. In biological KRL Test the overall antioxidant potential of an individual is evaluated by submitting whole blood (or erythrocytes) to an oxidant stress. Both extracellular and intracellular antioxidant defense contributes, as inside the body, in maintaining the cell integrity until hemolysis.

Results are expressed as the half-hemolysis time ($T_{1/2}$), which is referred to the blood susceptibility to freeradical attack. The analysis is tested and successfully applied in vitro, on humans, but are lacking data on pig; firstly there is the necessity to establish reference values for KRL test in the different physiological period of this specie. In the present work, blood samples from 100 gilts in the range of 50-150 kg body weight were collected and analysed for total antiradical activity in order to determine reference intervals. Data were tested for normality and then submitted to reference limit evaluation. The reference values found in gilts, expressed as $T_{1/2}$ were 66.8 – 94.80 and 42.6 – 56.4 min for blood and red blood cell, respectively.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è fortemente cresciuta la sensibilità dell'opinione pubblica alle modalità dell'allevamento intensivo ed al benessere animale. Da un punto di vista metodologico il benessere può essere valutato attraverso differenti tipi di approccio; nella valutazione del benessere della specie suina l'approccio funzionale sembra essere quello che maggiormente si presta ad essere sviluppato.. Secondo un approccio funzionale le condizioni iniziali di squilibri fisiologici, di differente origine, in grado di condurre verso gravi condizioni di malessere e patologie di diverso tipo possono essere evidenziate attraverso la valutazione dello stress ossidativo in accordo con quanto riportato da Brambilla et al. (2002) secondo il quale la risposta allo stress ossidativo può essere considerata un parametro efficace di valutazione del benessere nel suino. Si è registrato negli ultimi 20 anni un interesse crescente nei confronti della biologia dei radicali liberi (Machlin e Bendich, 1987). I radicali liberi sono composti caratterizzati da una struttura elettronica sbilanciata che conferisce loro una grande reattività sui costituenti organici e sulle strutture cellulari. In condizioni normali la produzione di radicali liberi nell'organismo è bilanciata da una serie di fattori di protezione utilizzati per il loro controllo. I radicali liberi esercitano il loro effetto negativo a livello cellulare: con perossidazione degli acidi grassi polinsaturi delle membrane fosfolipidiche da cui la formazione di perossidi citotossici che determinano fenomeni infiammatori e morte cellulare. Inoltre, i radicali intermedi ossigenati rappresentano gli attivatori della carcinogenesi e delle malattie cardiovascolari.

La misura della capacità antiradicalica totale del sangue è utilizzata in ambito umano come indicatore dello stress e può essere determinata attraverso il test KRL (Kit radicali liberi) (Prost, 1989, 1992). Il test KRL misura il tempo necessario ad emolizzare il 50% dei globuli rossi esposti ad un attacco controllato di radicali liberi. Il principio del test è quello di sottoporre il sangue intero ad un'aggressione termocontrollata di radicali liberi in modo che tutti i sistemi antiossidanti presenti naturalmente nel sangue vengano mobilitati per contrastare tale attacco antiossidante (Girodon et al., 1997; Lesgards et al., 2002; Pieri et al., 1996; Prost, 1989 e 1992; Stocker et al., 2003). Questa misura del potenziale di difesa antiradicalica globale tiene conto di tutta la complessità dei sistemi di difesa attivati dalle cellule.

Il test KRL ha diverse applicazioni in vivo, soprattutto in ambito umano o in vitro. Sull'uomo è stato utilizzato per valutare l'efficacia di trattamenti farmacologici e non, al fine di individuare processi acuti quali trauma o ischemia o malattie infiammatorie (Lesgards et al., 2002); inoltre ha permesso di discriminare tra condizioni di benessere e di stress di medio o elevato livello.

In vitro è stata valutata la determinazione della capacità antiossidante totale di alcuni composti quali le vitamine (Stocker et al., 2003), il beta idrossitoluene, carotenoidi, (Blache et al., 1991; Blache e Prost., 1992) ed antiossidanti naturali (Rossi et al., 2009a).

Poiché il suino data la particolare condizione d'allevamento intensivo è sottoposto a diversi fattori stressanti, la determinazione della capacità antiradicalica totale può rappresentare un valido strumento d'aiuto per monitorare lo stato clinico e il benessere. La prima necessità è tuttavia quella dell'individuazione dei valori normali della capacità antiradicalica totale in questa specie.

Il presente lavoro ha l'obiettivo di fornire un primo contributo alla definizione dei valori di riferimento della capacità antiradicalica totale del sangue intero e delle emazie nelle scrofette.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate 100 scrofette (Dalland), provenienti da due differenti siti del medesimo allevamento, con peso vivo compreso tra 50 e 150 kg, valutate clinicamente in buono stato di salute, per la determinazione della misura del potenziale globale di difesa antiradicali liberi. Dopo aver immobilizzato la testa dell'animale sono state prelevate, dalla vena cava anteriore, due provette di sangue contenenti EDTA destinate una alla determinazione della capacità antiradicalica totale sul sangue intero e l'altra sull'emazie. Tutti i campioni sono stati quindi refrigerati, inviati al laboratorio e processati entro due ore dal prelievo. I campioni di sangue diluiti con la soluzione fisiologica 1/50 e 1/25 rispettivamente per l'emazie e per il sangue intero, sono stati dispensati nella micropiastra KRL nei cui pozzetti precedentemente è stato aggiunto il generatore di radicali liberi rappresentato dal 2,2'-azobis (2-amidinpropane) dihydrochloride (Spiral, Dijon, France). Quindi la piastra è stata inserita nel lettore di micro piastra programmato alla temperatura di 37°C.

Per ogni pozzetto sono eseguite 75 misure di assorbanza a 620 nm, ogni 150 secondi per seguire la cinetica di lisi delle cellule ematiche. La velocità massima di diminuzione dell'assorbanza (V_{max} in mUA/min), il tempo di latenza (lag-time in min) e il tempo di semi-lisi ($T_{1/2}$ in min) caratterizzano la cinetica di emolisi del campione e sono calcolati automaticamente. La misura della diminuzione dell'assorbanza permettere di seguire la progressiva lisi cellulare. I risultati sono espressi come tempo necessario alla lisi del 50% delle cellule ematiche ($T_{1/2}$ in min).

Le prestazioni dello strumento fornite dalla ditta indicano un coefficiente di variazione dei valori del tempo di semi-emolisi inferiore al 4% (riproducibilità) e un coefficiente di variazione dei valori del tempo di semi-emolisi su una piastra completa inferiore al 2,5% (ripetibilità). Poiché il tempo di semi-emolisi varia in modo lineare con la concentrazione in Trolox è possibile esprimerlo in equivalenti Trolox e convertirlo in efficacia antiradicali liberi (EAR); 1 unità EAR per litro di sangue o di sospensione di emazie al 50% corrisponde alla potenza antiradicali liberi di una mmole di Trolox per litro di sangue di controllo.

Sulla piastra contenente i campioni, viene dosato anche un campione di sangue di controllo caratterizzato da di semi-emolisi noto.

I dati grezzi relativi al $T_{1/2}$ nel sangue e nei globuli rossi sono stati sottoposti al test di D'Agostino-Pearson per la normalità: in seguito si sono calcolati i valori di riferimento sulla distribuzione normale (test di D'Agostino-Pearson non significativo) o con metodo robusto non parametrico (test di D'Agostino-Pearson significativo), secondo le direttive NCCLS e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A2 and C28-A3. Le direttive prevedono il calcolo del 95% centrale della distribuzione e dell'intervallo di confidenza al 90% di ciascun limite. Per valutare la capacità antiradicalica nel sangue e negli eritrociti in relazione al peso, i soggetti sono stati suddivisi in due classi di peso (50-60 kg (n=65) e 150 kg (n=35)); per ciascuna classe si è provveduto al calcolo della differenza dei valori medi per ciascun gruppo (analisi della varianza ad una via seguita dal test di Student-Neuman-Keuls per confronti multipli) e alla determinazione dei valori di riferimento. In tal caso, essendo la numerosità campionaria ridotta il calcolo dei limiti è stato eseguito prendendo in considerazione il minimo e il massimo di ciascun gruppo, in quanto considerato la migliore stima dell'intervallo 95%.

RISULTATI

La media per $T_{1/2}$ sangue sul totale dei soggetti è risultata pari a 80.81 ± 7.13 min, e per gli eritrociti 49.97 ± 3.77 min. I valori di riferimento per il totale dei suini sono riportati in tabella 1, insieme ai limiti fiduciali degli stessi.

Parametro (n)	Norm	Limiti	CI90% l.i.	CI90% l.s.
T _{1/2} sangue, min (100)	Sì	66.8-94.8	65.0-68.9	92.7-96.8
T _{1/2} eritrociti, min(100)	Sì	42.6-56.4	41.5-43.7	56.3-58.4

Tabella 1- valori di riferimento per il T_{1/2} in sangue ed eritrociti; CI90%l.i.: intervallo di confidenza al 90% per il limite inferiore; CI90%l.s.: intervallo di confidenza al 90% per il limite superiore. Norm: risultato del test di normalità secondo D'Agostino-Pearson.

Table 1. T_{1/2} reference values in blood and red blood cell; CI90%: 90% confidence interval for lower limit (l.i.) and upper limit (l.s.). Norm.: normality of distribution (D'agostino-Pearson test)

I risultati relativi alla suddivisione dei suini in base al peso vivo sono riportati in tabella 2. L'analisi della varianza ha evidenziato differenze significative tra gruppi sia per il T_{1/2} sangue (p<0.01) che per il T_{1/2} emazie (p<0.01). In particolare, si nota che con l'aumentare del peso il T_{1/2} tende a diminuire significativamente, lasciando supporre una correlazione negativa tra variabili.

	Media ± ds	Limiti	n
50-60 kg			
T _{1/2} sangue (min)	82.52 ± 6.43	69.42-98.17	65
T _{1/2} RBC (min)	51.13 ± 3.32	45.26-60.81	65
150 kg			
T _{1/2} sangue (min)	77.63 ± 7.37	63.90-95.25	35
T _{1/2} RBC (min)	47.82 ± 3.65	41.19-59.84	35

Tabella 2. T_{1/2} in sangue ed eritrociti relative ai due gruppi di peso. Si riportano anche i valori di riferimento per i due gruppi, calcolati come minimo e massimo di ciascun gruppo. Differenza p<0.001 per T_{1/2} sangue; differenza p<0.001 per T_{1/2} per le emazie.

Table 2. T_{1/2} in blood and erythrocytes in the two groups of subjects. The reference values are reported, calculated as minimum-maximum of the distribution. Means differ either for blood (p<0.001) or erythrocytes (p<0.001)

DISCUSSIONI

In letteratura sono scarsi i dati relativi al potere antiradicalico totale del sangue ed eritrociti nella specie suina: in questa prova si sono valutati i valori di riferimento di scrofette di peso 50-150 kg, con l'obiettivo di identificare tale parametro nelle categorie di suini in differenti periodi fisiologici.

L'analisi sul sangue intero permette di misurare sia le difese intracellulari che extracellulari, tenendo conto degli effetti di sinergia tra le due azioni. L'analisi sulle emazie permette di conoscere

specificamente lo stato delle difese intracellulari. Le due informazioni sono complementari. Poiché la durata di vita media delle emazie nella specie suina è di 60-85 giorni, il valore del $T_{1/2}$ relativo a questo parametro deve essere interpretato come un riflesso storico dell'equilibrio tra aggressioni e difese dell'organismo su un lungo periodo fisiologico. L'analisi KRL sul sangue intero dà al contrario una indicazione più immediata dello stato fisiologico dell'individuo.

I limiti rilevati sono sensibilmente più bassi di quelli riportati per la specie umana (84-101 min per il sangue; 66-75 min per gli eritrociti), e simili a quelli determinati in suinetti maschi castrati di peso compreso tra i 10 e 30 kg (59.34 - 93.6 min per il sangue e 43.94 e 66.9 min per le emazie) (Pastorelli et al., 2009). Le differenze significative riscontrate nelle due classi di peso esaminate sono verosimilmente riconducibili al peso differente, come già riscontrato nel suinetto in post svezzamento, in cui il trend negativo è probabilmente dovuto al particolare momento fisiologico e al rapido accrescimento (Rossi et al., 2009b). Nel caso specifico, le differenze riscontrate tra le due classi di peso potrebbe essere collegato al momento fisiologico, in quanto le scrofette del gruppo 150 kg si trovavano in attesa di fecondazione ed avevano inoltre subito uno spostamento di settore che potrebbe avere influito sul parametro indagato.

CONCLUSIONI

I parametri relativi all'attività antiradicalica totale potranno trovare un utilizzo nella valutazione del benessere nell'allevamento del suino in funzione del sistema di allevamento e/o di trattamenti alimentari.

Potrebbe essere utile indagare ulteriormente sulla differente attività antiradicalica totale valutando le fonti possibili di variazione e di influenza di tale parametro, come ad esempio l'età, il ceppo genetico, e il management.

RINGRAZIAMENTI

Attività svolta nell'ambito del progetto di ricerca “*Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina*” finanziato dalla Regione Lombardia - D.G. Agricoltura nell'ambito del Piano per la ricerca e lo sviluppo “2008”.

BIBLIOGRAFIA

Blache, D., Prost M., Raffi J. (1991). In vitro biological test of resistance to oxidation: Application to identification of irradiated food. In Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Commission of the European Communities, Luxembourg, pp. 105-116.

Blache, D., Prost. M. (1992). Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution: A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL). C. Ponnampereuma and C. W. Gehrke, editors. NASA, Washington D.C., pp. 82-98. Brambilla G., Civitareale, C., Ballerini, A., Fiori, M., Amadori, M., Archetti, L. I., Regini, M., Betti, M. (2002). Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine. Redox Rep., 7 (3): 159-163.

Girodon, F., Blache, D., Monget, A. L., Lombart, M., Brunet-Lecompte, P., Arnaud, J., Richard, M. J., Galan P. (1997). Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. J. Am. Coll. Nutr. 16: 357-365.

Lesgards, J. F., Durand, P., Lassarre, M., Stocker, P., Lesgards, G., Lanteaume, A., Prost, M., Lehucher-Michel, M.-P. (2002). Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. Environ. Health Perspect., 110: 479-487.

Machlin, L., Bendich, A. J. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The FASEB J., 1: 441-445.

- Pastorelli, G., Rossi R., Cannata, S., Corino, C. (2009). Total antiradical activity in male castrated piglets blood: reference values. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,*Ital. J. Anim. Sci.* 8 (suppl. 2):640-642.
- Pieri, C., Moroni, F., Marra, M. (1996). Food restriction increases the protection of erythorocytes against the hemolysis induced by peroxy radicals. *Mech. Ageing Dev.* 87:15-23.
- Prost M. (1989). Utilisation de générateur de radicaux libres dans le domaine des dosages biologiques. French patent no. 2, 642,526.
- Prost, M. (1992). Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of living organism or potentially aggressive agents. US patent, 5, 135, 850.
- Rossi, R., Corino, C., Pastorelli, G., Durand, P., Prost M. (2009a). Assessment of antioxidant activity of natural extracts. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,*Ital. J. Anim. Sci* 8 (suppl. 2): 655-657.
- Rossi, R., Pastorelli, G., Cannata, S., Corino, C. (2009). Effect of weaning on total antiradical activity in piglets. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,*Ital. J. Anim. Sci.* 8 (suppl. 2):673
- Stocker, P., Lesgards, J. F., Vidal, N., Chalier, F., Prost M. (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochem Biophys. Acta* 1621:1-8.