

# Perspectives & Research

## Un kit fai-da-te per il rilievo di radicali liberi nell'urina

Giorgio Valentini, Francesca Gambineri

### INTRODUZIONE

I radicali liberi dell'ossigeno più comuni sono il superossido ed il radicale idrossile, entrambi prodotti a partire da ossigeno molecolare in condizioni riducenti. Possono essere di origine endogena da processi metabolici fisiologici o fisiopatologici di varia natura e di origine esogena come avviene nel fumo di tabacco<sup>1</sup>. In particolare l'apporto endogeno di anione superossido viene formato come sottoprodotto (1-2%) nella biosintesi dell'ATP da parte dei mitocondri. A causa della loro formazione nel corso di processi metabolici, gli organismi possiedono vari meccanismi per minimizzare i possibili danni causati da reazioni indesiderate di questi intermedi. A causa della loro elevata reattività i radicali liberi, in particolare quelli centrati sull'ossigeno, non sono facilmente osservabili. Sono al contrario analizzabili alcuni loro metaboliti, in particolare gli idroperossidi<sup>2</sup>. Una possibile via metabolica per i radicali liberi prevede la reazione con esteri insaturi a formare radicali lipidici ed infine perossidi lipidici<sup>3</sup>; successive trasformazioni di questi intermedi portano alla formazione di un certo numero di metaboliti, che possono essere rinvenuti nel plasma umano o nelle urine. Tra questi prodotti metabolici finali (*markers metabolici*) i più studiati sono:

- Malondialdeide* (MDA): si trova nel plasma umano a concentrazioni dell'ordine di 1  $\mu\text{M}$  e nelle urine in concentrazioni di 0 - 3  $\mu\text{M}$  (0 - 0.2 ppm)<sup>4</sup>.
- Isoprostani*: hanno una struttura derivata dalle prostaglandine, ma sono originati secondo una via metabolica completamente differente; sembra che i radicali liberi abbiano un ruolo fondamentale nella sintesi degli isoprostani, e per questo motivo sono attualmente considerati markers di grande utilità nella determinazione non invasiva di stress ossidativi dell'organismo. L'8-isoprostano si trova in piccole quantità (10 - 20 ppt) nel plasma umano ed in quantità più rilevanti (0.5 - 3 ppb) nelle urine umane<sup>5</sup>.
- 3-nitrotirosina*: prodotto generalmente da reazione con radicali liberi del tipo  $\text{NO}\cdot$ . Sembra essere un promettente marker di stress ossidativi<sup>6</sup>. Le concentrazioni nelle urine risultano tuttavia piuttosto basse (0 - 8 ppb)<sup>7</sup>.

### MATERIALI E METODI DELLA RICERCA

All'inizio del 2006, i Laboratori ARCHA hanno svolto uno studio di ricerca volto alla messa a punto ed ottimizzazione di una miscela reattiva - di invenzione del Prof. Pera della Lloyds International Credit Bio-Chemical-Pharmaceutical Division (Florida-USA) - che potesse essere utilizzata per la rilevazione di

*Malondialdeide* (MDA) ed altri prodotti derivanti dallo *stress ossidativo* causato dai radicali liberi, e presenti nelle urine umane.

Lo studio si è articolato, dopo accurata ricerca bibliografica, in fasi successive, di seguito descritte:

- sperimentazione di laboratorio su urina sintetica.
- sperimentazione di laboratorio su urina di n. 23 volontari.

### FASE I - Sperimentazione di laboratorio su urina sintetica

Nella prima parte di questa fase è stata testata la reattività di differenti tipologie di reagenti forniti dalla Lloyds International Credit Bio-Chemical-Pharmaceutical Division, nei confronti di urina sintetica addizionata di MDA, scelta come marker della presenza di stress ossidativo. Per ciascuna tipologia di reattivi sono state condotte delle sperimentazioni volte alla individuazione delle migliori condizioni di reazione.

### Preparazione dell'urina sintetica

L'urina sintetica è una soluzione acquosa di vari componenti che tende ad approssimare la composizione dell'urina naturale; tra le varie formulazioni disponibili ne è stata scelta una che in grado di simulare, oltre alla composizione chimica, anche il colore dell'urina naturale.

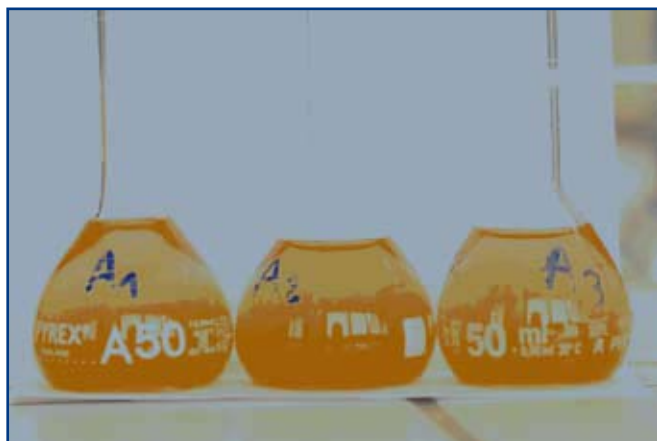


Figura 1: Urina sintetica drogata con MDA, soluzioni A1, A2, A3.

La composizione dell'urina sintetica impiegata è qui riportata:

- CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.651 g/l;
- MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.651 g/l;
- NaCl, 4.6 g/l;
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.3 g/l;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8 g/l;
- KCl, 1.6 g/l;
- NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g/l;
- urea, 25.0 g/l;
- triptone soia broth, 10.0 g/l
- acqua, 1 l.

Il pH risultava di 5.6.

La soluzione di urina sintetica è stata filtrata attraverso un filtro da 0.45 µm e conservata in frigorifero fino al momento dell'uso<sup>8</sup>. Ad una aliquota di urina sintetica (250 ml) sono stati aggiunti 10.9 mg di Malondialdeide-tetraButil-Ammonio (Fluka), in modo da ottenere una soluzione contenente 10 ppm di MDA. Aliquote di questa soluzione madre (A3) sono state diluite con urina sintetica in modo da preparare soluzioni a 1 e 5 ppm di MDA (A1 ed A2). Tutte le soluzioni presentavano visivamente la stessa colorazione (Figura 1). Sui campioni di urina sintetica, tal quale e addizionata di differenti quantità di MDA, è stata testata la reattività di n. 5 differenti tipologie di miscele reattive, in differenti condizioni di concentrazione e di condizioni al contorno (es. tempi e temperature di reazione, correttori di acidità, ecc.). Tale sperimentazione era volta alla individuazione della migliore miscela di reattivi in grado di evidenziare differenti livelli di stress ossidativo nell'urina, in

seguito alla presenza di diverse concentrazioni di MDA.

**FASE 2 – Sperimentazione su n. 23 volontari**

Dalla sperimentazione di cui alla FASE 1 è stata individuata la migliore "miscela reattiva" in grado di rispondere alle esigenze formulate di un kit fai-da-te per l'esame dei radicali liberi nelle urine. Al fine di validare tale miscela reattiva su campioni reali di urina, sono stati ingaggiati 23 soggetti volontari, i quali sono stati preventivamente informati degli scopi e finalità del test ed

ni, di età compresa tra 25 e circa 55 anni. Il contenuto di sostanze che indicano la presenza o meno di stress ossidativo è stato valutato con la miscela di reattivi messa a punto nella sperimentazione descritta in precedenza (FASE 1).

La lettura dei risultati sperimentali ottenuti si basa sulla scala cromatica schematizzata in tabella 1.

I risultati sperimentali ottenuti sui campioni reali di urina sono schematizzati nella tabella 2.

I risultati sperimentali ottenuti meritano le seguenti considerazioni:

i due soggetti che hanno mostrato uno stress ossidativo alto (color rosso-porpora) sono una donna in gravidanza e ad un atleta in piena preparazione agonistica; uno degli 11 soggetti con stress ossidativo molto basso era in terapia con antiossidanti da 3 mesi.

Colore	Stress ossidativo	
Colore chiaro	Molto basso	
Colore paglierino	basso	
Colore rosa	medio	
Colore rosso porpora	alto	
Colore rosso	Molto alto	

Tabella 1.

Colore	stress ossidativo	N° soggetti
Colore chiaro	molto basso	11
Colore paglierino	basso	9
Colore rosa	medio	1
Colore rosso porpora	alto	2
Colore rosso porpora	alto	2

Tabella 2.

hanno fornito il loro consenso formale all'iniziativa. Quindi sono stati raccolti 23 campioni di urina da tali soggetti sa-

**CONCLUSIONI**

Dalla sperimentazione commissionata dalla Lloyds International Credit alla

Laboratori ARCHA s.r.l. è stato possibile mettere a punto ed ottimizzare una miscela reattiva che può essere utilizzata per la rilevazione nelle urine di prodotti derivanti dallo *stress ossidativo*. Il kit messo a punto è stato testato prima su urina sintetica e poi su campioni reali, grazie alla adesione allo studio sperimentale di 23 volontari. Questo test per il rilevamento di stress ossidativo nelle urine e per la facilità di esecuzione, può

trovare un'utile indicazione in screening di massa e negli studi su pazienti con comportamenti e/o patologie a rischio per stress ossidativi. In particolare nei Centri per la Prevenzione e Cura del Tabagismo potrebbe trovare una collocazione parallela al rilevamento del CO nell'esprium in modo da individuare da un lato il grado di ossigenazione del sangue (HbCO) e dall'altro il grado di stress ossidativo che l'organismo ha

accumulato. Tutto ciò, eseguito in condizioni basali e dopo aver smesso di fumare, può contribuire anche ad un rinforzo motivazionale nell'iter terapeutico della smoking cessation. ■

**Disclosure:** ricerca finanziata da:

Lloyds International Credit Bio-Chemical-Pharmaceutical Division - 1400 St. Charles Pl - suite 315, Pembroke Pines, FL 33024 Country of Broward - Florida (USA)

**Bibliografia**

1. Zagà V, Gattavecchia E. Radicali liberi e fumo di sigaretta/Free radicals and cigarette smoke. *GI-MT*, 2002; 56: 5, 375-391.
2. M. Carratelli. Method for the determination of oxygen-centered free radicals. United States Patent 6.355.489, Marzo 2002
3. Per una descrizione sintetica del processo consulta: [http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_peroxidation](http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation)
4. Glogau H, Hauck RS. "Kit and method for determining redox status in urine" United States Patent 6.835.554, Dicembre 2004.
5. Isoprostani: [http://www.oxisresearch.com/app\\_faq.html?prodid=21019](http://www.oxisresearch.com/app_faq.html?prodid=21019)
6. M. Schwemmer et al. How urine analysis reflects oxidative stress-nitrotyrosine as a potential marker. *Clin. Chim. Acta*, 2000; 297: 207-216.
7. Oshima H et al. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem Toxicol*, 1990; 28(9): 647-652.
8. Torzewska A et al. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of Proteus endotoxin polysaccharides. *J Med Microbiol*, 2003; 52: 471-477.



**Meeting Satellite SITAB - SRNT**  
**Priorità ed evidenze in Tabaccologia**  
**Roma 23 settembre 2008**



Lega Italiana per la Lotta  
contro i Tumori

**PROGRAMMA**

- |   |  |   |
|---|--|---|
| <p><b>9.30</b><br/>Registrazione partecipanti</p> <p><b>10.00</b><br/>Saluti autorità e introduzione ai lavori<br/>(Schittulli, Mangiacavallo, Greco, Zuccaro)</p> <p><b>PARTE PRIMA</b><br/>Moderatori: Vincenzo Zagà - Nolita Pulerà</p> <p><b>10.30 - 10.50</b><br/>Tabaccologia, tra passato e futuro<br/>Giacomo Mangiaracina (Roma)</p> <p><b>10.50 - 11.10</b><br/>Priorità e necessità nel controllo del tabagismo<br/>Daniela Galeone (Roma)</p> <p><b>11.10 - 11.30</b><br/>Alleanze produttive e consolidamento dell'efficacia in prevenzione<br/>Elizabeth Tamang (Venezia)</p> <p><b>PARTE SECONDA</b><br/>Moderatori: Domenico Enea<br/>Mario Del Donno</p> | <p><b>11.30 - 11.50</b><br/>Le ricadute del Progetto INSPIRO<br/>Claudio Poropat (Trieste)</p> <p><b>11.50 - 12.10</b><br/>La ricerca: attualità e prospettive<br/>Christian Chiamulera (Verona)</p> <p><b>12.15 - 12.30</b><br/>L'evidenza di efficacia nel trattamento<br/>Biagio Tinghino (Monza)</p> <p><b>12.30 - 13.00</b><br/>Discussione</p> <p><b>13.00 - 14.30</b><br/>Pranzo</p> <p><b>14.30 - 16.00</b><br/>Tavola rotonda: L'efficacia dei processi: dalle speranze alle possibilità<br/>Moderatori: Mangiaracina - Martucci<br/>Intervengono: Laezza, Mangiacavallo, Nardini, Poropat, Corrado, Zuccaro.</p> <p><b>16.30 - 17.30</b><br/>Assemblea SITAB</p> | <p><b>18:30</b><br/>Welcome &amp; opening address SRNT</p> <p><b>Segreteria scientifica</b><br/>Zagà (redazione@tabaccologia.it)<br/>Tinghino (btinghi@tin.it)<br/>Pulerà (segreteria@tabaccologia.it)</p> <p><b>Comitato scientifico</b><br/>Tarsitani, Fumagalli, Mangiaracina, Chiamulera, Zuccaro, Tenconi.</p> <p><b>Segreteria</b><br/>Anteprimadue<br/>Viale del Tintoretto, 88<br/>00142, Roma<br/>tel. +39 06 5403600<br/>fax +39 06 547865<br/>info@anteprimadue.it</p> <p><b>Sede congresso:</b><br/>ATAHOTEL Villa Pamphili<br/>Via della Nocetta, 105<br/>00164 Roma<br/><a href="http://www.srnt2008rome.com">http://www.srnt2008rome.com</a></p> |
|---|--|---|