

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE



Allevamento per la produzione di latte per Parmigiano-Reggiano a Modena

Sperimentazione
su 50 bovine in
collaborazione
con la facoltà di
Parma. Istituto di
alimentazione e
nutrizione.



VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO CON ANALISI U-FORT TEST

Il FORT (Free Oxygen Radicals Test) è un test colorimetrico basato sulla capacità dei metalli di transizione (es., il ferro) di catalizzare la scissione degli ROOH (idroperossidi, specie radicaliche) presenti nel campione biologico in derivati radicalici secondari, secondo la classica reazione di Fenton. Una volta formatosi a livello cellulare, gli ROOH mantengono la propria reattività chimica e la capacità di generare quantità proporzionali di prodotti alcossilici, RO•, e perossilici, ROO• (reazioni 1 e 2). Questi vengono, poi, intrappolati da uno specifico derivato amminico (reagente R1 del FORT test, CrNH₂) sviluppando, in una reazione cinetica lineare a 37°C, un catione radicalico (Cr-NH₂+•, reazione 3) più stabile nel tempo e colorato perciò misurabile fotometricamente. In tal modo, in base alla legge di Lambert-Beer, l'intensità del colore sviluppatosi durante la reazione correla direttamente con la quantità dei derivati radicalici e, di conseguenza, con lo stato ossidativo del campione analizzato. Reazioni coinvolte nel FORT test:



Data l'eterogeneità chimica delle specie reattive secondarie derivanti dalla scissione ferro-dipendente degli ROOH nella reazione del FORT test, è stato deciso, per semplicità d'interpretazione, di convertire i valori di assorbanza misurati in unità convenzionali chiamate unità FORT. La trasformazione viene eseguita automaticamente dallo strumento così che i risultati sono immediatamente valutabili dall'operatore e di più facile interpretazione. Per consentire una valutazione assoluta, i risultati possono essere espressi anche in concentrazioni equivalenti di H₂O₂ usato quale idroperossido di riferimento. Una unità FORT corrisponde a circa 0,25 mg/l – 7,5 μ μ μ μ mol/l di H₂O₂. I fotometri della serie CR3000/FORM sono calibrati con una curva di riferimento di diverse concentrazioni di H₂O₂ memorizzata nel microprocessore in modo tale che i valori di assorbanza vengano automaticamente convertiti in unità FORT e/o concentrazioni corrispondenti di H₂O₂.

Caratteristiche tecniche del FORT test

Intervallo di linearità: 160-600 unità FORT. Valori di riferimento: sono considerati normali valori sino a circa 310 unità FORT corrispondenti a 2,35 mmol/l H₂O₂. Ripetibilità: coefficiente di variazione intra-assay, CV < 5%. Precisione: CV < 5%. Interferenze: impiego di agenti chelanti del ferro (es., EDTA, deferoxamina, D-penicillamina, citrato) e/o disinfettanti e altre fonti artificiali di idroperossidi (es., H₂O₂) e/o conservanti con attività antiossidante (es., BHT, BHA, acido ascorbico) e/o valori anormali di ematocrito. Campione: 20µl di sangue intero. Adattabile per siero/plasma. Accessori richiesti: centrifuga, se il test viene eseguito su sangue intero.

L'intervallo di normalità del FORT deriva da anni di raccolta diretta dei dati, oltre ad essere stato confermato da uno studio di popolazione I.

| unità FORT | mmol/l H ₂ O ₂ eq. | |
|------------|--|-------------------|
| <300-310 | <2,28-2,35 | Valori Normali |
| 300-330 | 2,28-2,50 | Border line |
| >330 | >2,50 | Stress Ossidativo |

Diverse condizioni fisiologiche e/o para-fisiologiche, oltre a quelle patologiche, sono associate ad anomali valori di FORT. Tra cui:

Condizioni con livelli elevati:

- Gravidanza
- Assunzione estro-progestinici
- Terapie ormonali sostitutive
- Dialisi
- Farmacoterapie (es., antitumorali, antibiotici, analgesici, immunosoppressivi)
- Attività fisica eccessiva in soggetti non allenati
- Processi infiammatori
- Cancro
- Malattie respiratorie
- Fumo di sigaretta
- Diete sbilanciate e stili di vita non sani

Condizioni con livelli ridotti:

- Neonati
- Supplementazione e/o integrazione con antiossidanti.

Sostanze interferenti causa di risultati FORT erroneamente bassi:

- Agenti ad azione chelante (es., EDTA, desferal, citrati)
- Conservanti con potere antiossidante (es., BHT, BHA, acido ascorbico)
- Valori anormalmente alti di ematocrito.

Sostanze interferenti causa di risultati FORT erroneamente alti:

- Disinfettanti e altre fonti esterne di perossidi (es., H₂O₂, perossido benzoico)
- Valori anormalmente bassi di ematocrito.
-

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO CON ANALISI U-FORD TEST

Il FORD (Free Oxygen Radicals Defence) test determina la capacità antiossidante totale nel plasma.

L'organismo umano possiede numerosi sistemi di difesa ad azione antiossidante fondamentali per prevenire l'eccessivo innalzamento del livello di radicali liberi e, quindi, mantenere sotto controllo lo stato ossidativo. Questi antiossidanti sono in parte fisiologici, tra cui acido urico, bilirubina, ceruloplasmina, transferrina, tioli, glutazione, ecc., e in parte derivano dagli alimenti (soprattutto frutta e verdura) tra cui le vitamine E, C, ed A, polifenoli, flavonoidi, carotenoidi ect. Considerate sia la complessità e l'interdipendenza dei vari sistemi antiossidanti e la loro indispensabile funzione per limitare i danni da radicali liberi, sia l'importante influenza di abitudini, dieta, supplementazioni e stile di vita nel determinare lo stato ossidativo globale di un individuo, la possibilità di valutare le difese antiossidanti disponibili risulta di primaria rilevanza. Il FORD test è un test colorimetrico basato sulla formazione di un radicale colorato che si riduce in presenza di sostanze ad azione antiossidante. In ambiente acido (pH=5,2), un opportuno ossidante (FeCl_3) reagisce con il cromogeno non colorato (Cromogeno, reagente FORD C1) formando il corrispondente catione radicalico (Cromogeno $\bullet+$): in questa forma il cromogeno è stabile e colorato; è perciò possibile effettuare misure fotometriche a 505nm (reazione 1). I composti antiossidanti (AOH) presenti nel campione aggiunto riducono il catione radicalico determinando una scomparsa del colore della soluzione proporzionale alla loro quantità (reazione 2). I valori di assorbanza letti vengono trasformati in concentrazioni applicando la legge di Lambert Beer, facendo riferimento alla curva standard ottenuta con Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), un derivato della vitamina E permeabile alle cellule con elevate proprietà antiossidanti e perciò comunemente usato come standard.

Reazioni coinvolte nel FORD test

1. Cromogeno (incolore) + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow Cromogeno $\bullet+$ (porpora)
2. Cromogeno $\bullet+$ (porpora) + AOH \rightarrow Cromogeno $^+$ (incolore) + AO

Caratteristiche tecniche del FORD test

Intervallo di linearità: 0.25-3.0 mmol/l Trolox.

Valori di riferimento: 1.07 – 1.53 mmol/l Trolox equivalenti.

Ripetibilità: coefficiente di variazione intra-assay, CV < 5%. Precisione: CV < 8,5%.

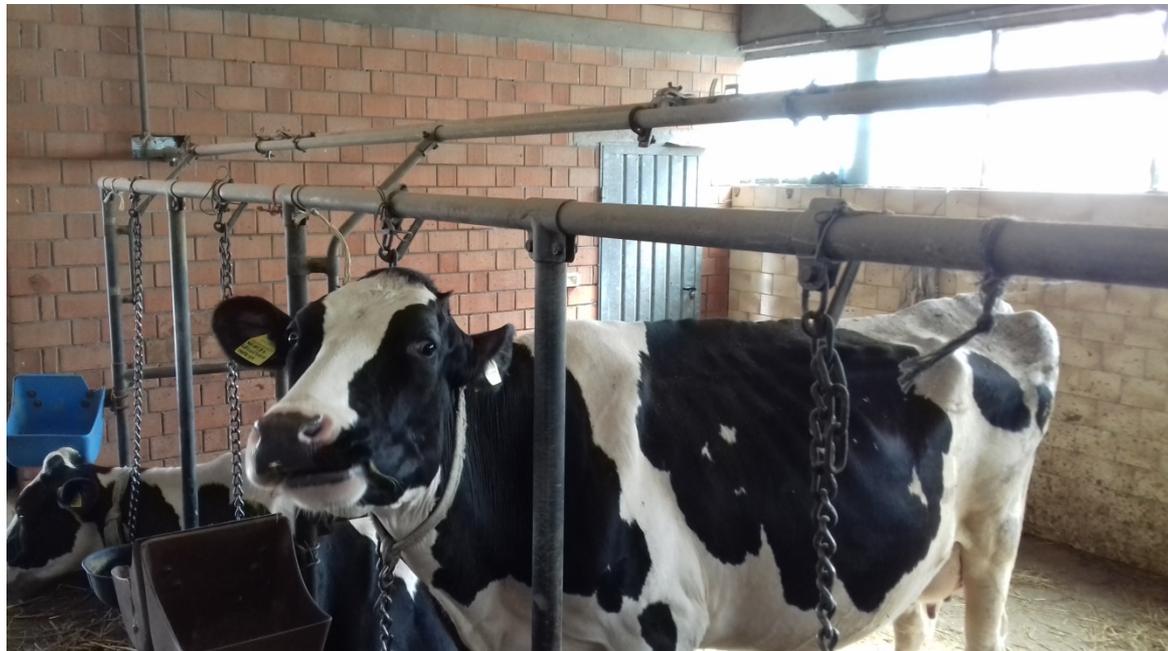
Interferenze: conservanti con attività antiossidante (es., BHT, BHA, acido ascorbico) e/o valori anormali di ematocrito.

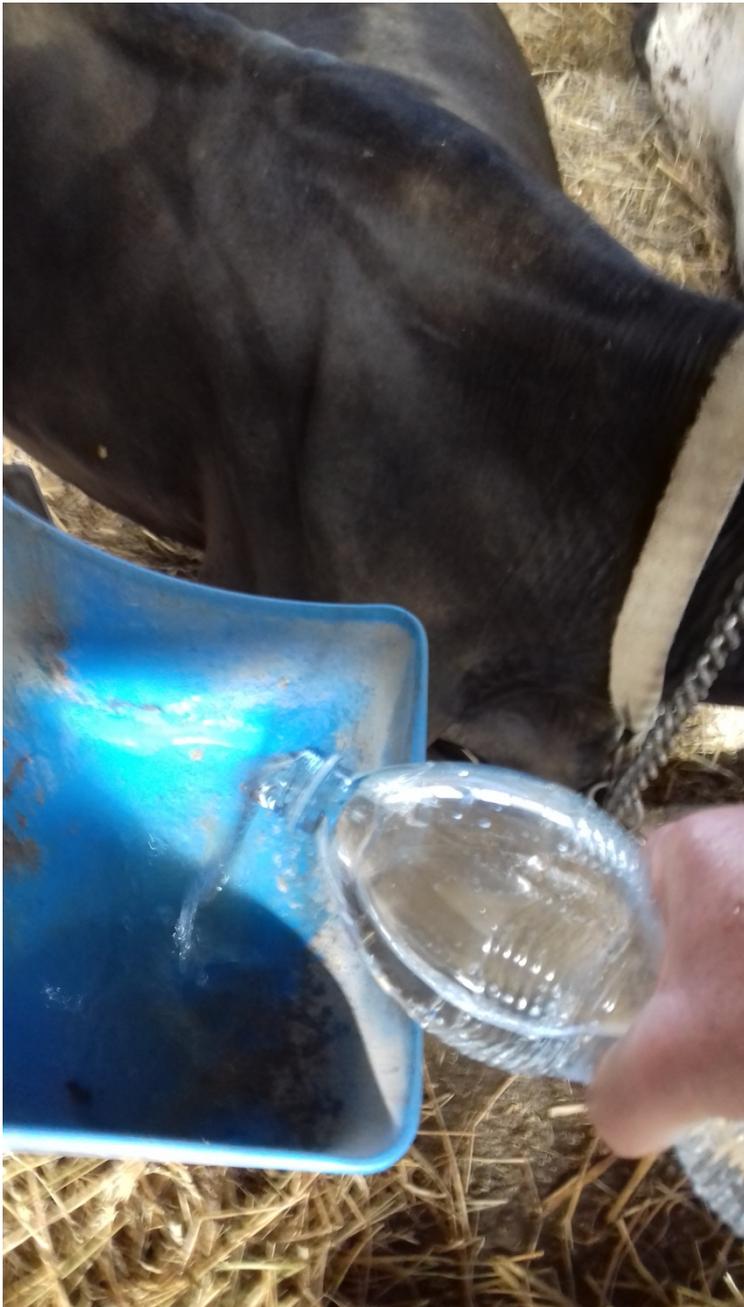
Campione: 50µl di sangue intero.

Accessori richiesti: centrifuga.

| FORD (mmol/l) | |
|---------------|---------------------|
| >1,53 | Condizione Ottimale |
| 1,07-1,53 | Valori Normali |
| <1,07 | Stato di Carenza |

Tre gruppi contraddistinti da un
segnale bianco-per il controllo,
arancione-per l'integrazione con la
vit.E, e nero-per il trattamento
omeopatico





Tre volte alla settimana viene somministrato per bocca il rimedio omeopatico del momento.

Ogni giorno viene somministrata nell'alimentazione
l'integrazione con vit.E.



Alle bovine di controllo viene
somministrata 3 volte alla settimana
acqua naturale.

STRESS OSSIDATIVO

| numero bianco (controllo) | 13/09/18 | 26/11/18 | 21/01/19 | numero nero (omeo) | 13/09/18 | 26/11/18 | 21/01/19 | numero arancione (vit.E) | 13/09/18 | 26/11/18 | 21/01/19 |
|---------------------------------|----------|----------|----------|--------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------|----------|----------|----------|
| 5073 | 130,06 | 83,69 | 90,60 | 5091 | 206,42 | 326,74 | 168,13 | 5099 | 169,30 | 230,25 | 237,30 |
| 4873 | 149,01 | 100,13 | 110,56 | 5096 | 122,96 | 53,24 | 56,96 | 5080 | 121,33 | 59,52 | 51,21 |
| 3988 | 118,27 | 131,18 | 139,07 | 4831 | 185,76 | 121,26 | 285,84 | 4868 | 140,71 | 149,97 | 199,36 |
| 4825 | 170,49 | 92,73 | 199,60 | 4839 | 169,93 | 151,77 | | 4511 | 178,86 | 24,23 | 12,85 |
| 4867 | 94,51 | 233,01 | 115,12 | 1962 | 235,58 | 200,42 | 93,30 | 6187 | 121,31 | 108,45 | 133,87 |
| 4860 | 110,47 | 111,57 | 145,42 | 7995 | 139,97 | 170,79 | 70,33 | 5078 | 159,50 | 95,05 | 223,44 |
| 5362 | 155,17 | 161,08 | 67,42 | 0325 | 149,73 | 233,44 | 189,07 | 9855 | 211,33 | 321,73 | 223,42 |
| 2821 | 133,38 | 278,51 | | 0327 | 236,45 | 282,13 | 59,37 | 0336 | 236,28 | 199,07 | 80,78 |
| 4874 | 229,58 | 100,57 | 87,69 | 3017 | 162,09 | 185,85 | 101,13 | 4838 | 157,45 | 175,43 | 123,51 |
| 2992 | 157,81 | 99,73 | | 0446 | 245,75 | 128,44 | 235,58 | 6134 | 160,35 | 154,66 | 323,86 |
| 0344 | 289,26 | 283,43 | 160,79 | 6185 | 226,88 | 111,78 | 290,60 | 4861 | 99,12 | 225,22 | 312,26 |
| 2302 | 236,98 | 346,45 | | 5074 | 155,06 | 166,07 | | 5075 | 161,44 | 166,38 | 233,02 |
| 9992 | 326,72 | | | 0361 | 186,33 | | 401,93 | 3025 | 248,15 | 143,56 | |
| 7764 | 208,93 | | | 4829 | 142,92 | 257,27 | | 2652 | 351,86 | | |
| 8664 | 209,52 | 105,20 | | 5085 | 137,00 | 298,76 | | | | | |
| | | | | 5092 | 87,88 | 187,95 | 87,69 | | | | |

- Ogni 30/50 giorni un prelievo di sangue per il laboratorio per la valutazione dello stress ossidativo.

| <u>Rossi Nasci</u> | <u>U. Fort.</u> | <u>28-04-19</u> |
|--------------------|-----------------|------------------------|
| 1 4511 | 140.45 | 28/02/2019 34.33 |
| 2 0446 | 185.78 | 192.53 |
| 3 1874 | 80.81 | 389.16 |
| 4 5075 | 225.28 | 166.38 (26-11-2018) |
| 5 2824 | 282.47 | 78.74 |
| 6 4873 | 107.90 | 123.86 |
| 7 4838 | 263.02 | 121.42 |
| 8 5099 | 202.29 | 281.22 |
| 9 9855 | 273.75 | 235.63 |
| 10 3227 | 493.33 | — |
| 11 5078 | 224.52 | 193.24 |
| 12 6182 | 170.58 | 125.63 |
| 13 4868 | 293.02 | 193.08 |
| 14 4825 | 280.15 | 338.92 (28-11-2018) |

➤ **Analisi U-Fort
in corso per i
prossimi 9/11
mesi**

Compito dello statistico la valutazione finale dei dati della prova, con durata prevista per più di 1 anno. Per valutare così anche i parametri zootecnici e altre prove correlate. Questa sperimentazione richiede la stretta collaborazione del Prof. Afro Quarantelli dell'istituto di alimentazione e nutrizione di Parma.

In oltre partecipano il Dott. Maurizio Nascimbeni come alimentarista, il Sig. Bandieri Patrizio in qualità di proprietario e allevatore dell'azienda e il Dott. Lorenzo Rossi in qualità di medico veterinario omeopata.

