

# VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE



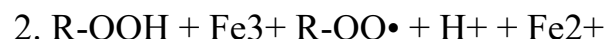
# **Allevamento per la produzione di latte per Parmigiano-Reggiano a Modena**

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, CrNH<sub>2</sub>) sviluppando, in una reazione cinetica lineare a 37°C, un catione radicalico (Cr-NH<sub>2</sub>+•, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usato quale idroperossido di riferimento. Una unità FORT corrisponde a circa 0,25 mg/l – 7,5 µµ µmol/l di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I fotometri della serie CR3000/FORM sono calibrati con una curva di riferimento di diverse concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> memorizzata nel microprocessore in modo tale che i valori di assorbanza vengano automaticamente convertiti in unità FORT e/o concentrazioni corrispondenti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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<sup>1</sup>.

unità FORT	mmol/l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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, glutathione, 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 ( $\text{FeCl}_3$ ) reagisce con il cromogeno non colorato (Cromogeno, reagente FORD C1) formando il corrispondente catione radicalico ( $\text{Cromogeno}^{\bullet+}$ ): 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.  $\text{Cromogeno (incolore)} + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Cromogeno}^{\bullet+}(\text{porpora})$
2.  $\text{Cromogeno}^{\bullet+}(\text{porpora}) + \text{AOH} \rightarrow \text{Cromogeno}^+(\text{incolore}) + \text{AO}$

## 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 Nesei</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 4874	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 4895	280.15	338.92 (26-11-2018)

➤ **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.

