

ENEA



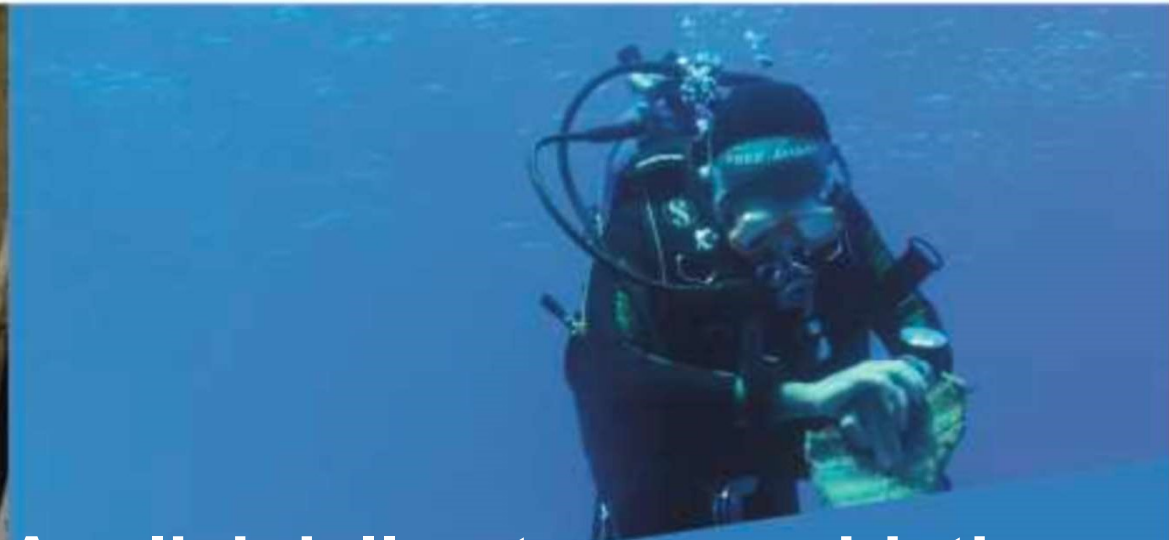
SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

INAIL
ISTITUTO NAZIONALE PER L'ASSICURAZIONE
CONTRO GLI INFORTUNI SUL LAVORO



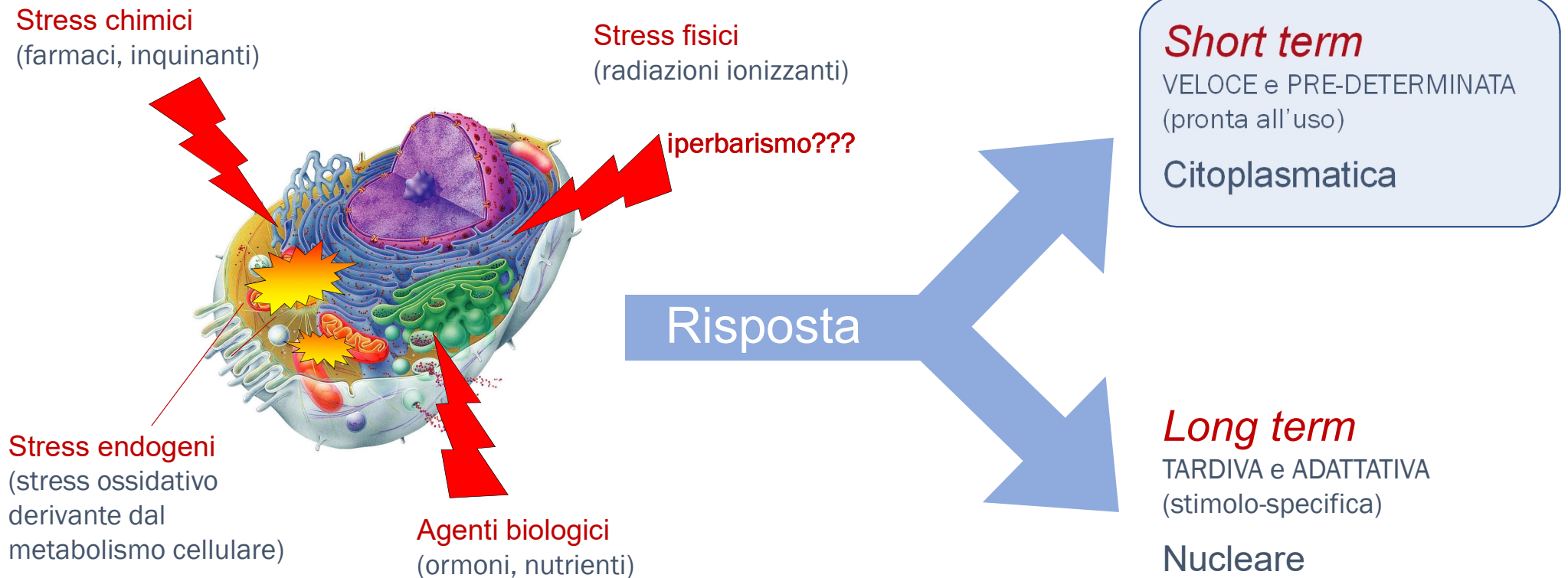
Analisi dello stress ossidativo su campioni ematici

Dr. Matteo BORDI
Università di Tor Vergata



Omeostasi: un requisito indispensabile per la vita delle cellule

Omeostasi: la tendenza e la capacità di ogni sistema vivente ad «auto-regolarsi» e, mantenere il proprio ambiente interno stabile anche in seguito a stimoli esterni nocivi.



Domanda biologica

Condizioni iperbariche
possono alterare l'omeostasi
cellulare?

...se sí,

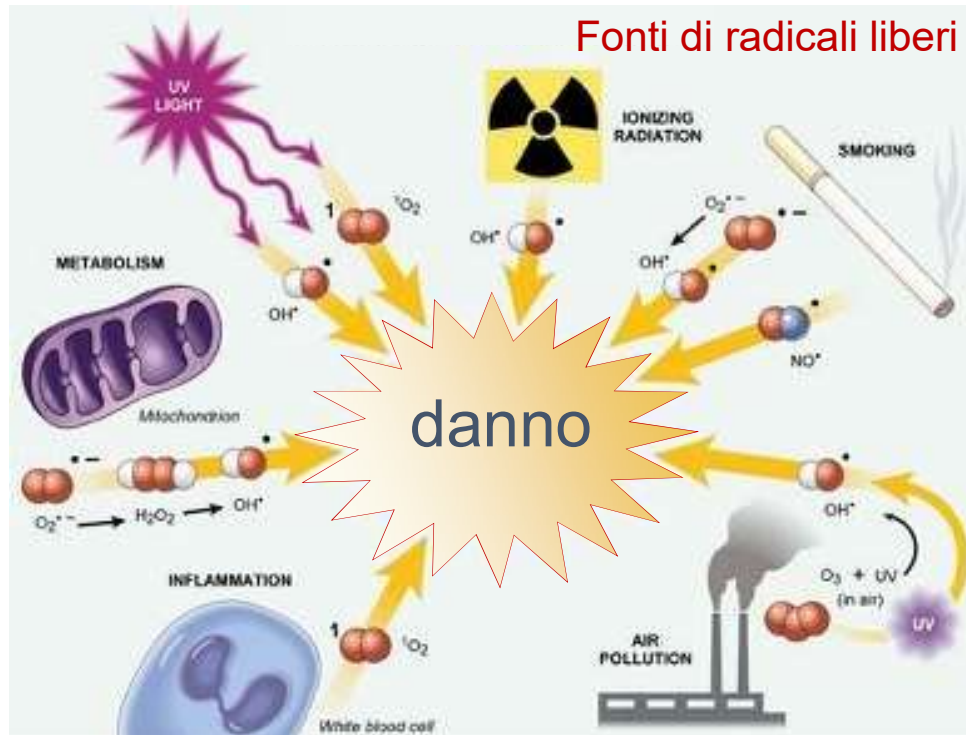
Agiscono attraverso la
produzione di stress
ossidativo?



Stress ossidativo: minaccia continua intrinseca alla vita

Esistono molte fonti di **radicali liberi** (raggi UV, fumo, inquinanti...), ma il respirare/consumare O_2 , *per sé*, determina una produzione endogena di radicali liberi (ROS) che, a sua volta, provoca danni, invecchiamento e malattie.

La condizione che ne deriva viene definita **SRESS OSSIDATIVO** e rappresenta l'effetto collaterale (*il lato oscuro*) della vita.



Quanti ROS sono prodotti dal metabolismo basale ?

1-2% dell'ossigeno che consumiamo ogni giorno

Consumo medio di O_2 /cellula: $2.5 \times 10^{-18} \text{ mol s}^{-1}$

($\sim 2.2 \times 10^{10} O_2$ /cellula/die)

...Quindi 1-2% è circa: $2-4 \times 10^8$

ROS/cellula/die

Numero di cellule nel corpo: ~ 50.000 miliardi (5×10^{13})

Produzione corporea giornaliera: $\sim 1-2 \times 10^{21}$ ROS

Domanda biologica

Se condizioni di iperbarismo
sono associati a stress
ossidativo...

...allora...

Si producono danni?

Siamo in grado di difenderci?



Risposta *short term*: riconoscimento specifico e neutralizzazione dei ROS



Sistema antiossidante: Difesa enzimatica

Gli enzimi antiossidanti sono estremamente efficienti (*quasi perfetti*) in quanto contengono elementi molto reattivi nei loro siti attivi, spesso rappresentati da metalli (*Cu, Fe, Mn*), zolfo (S) e selenio (Se)

Citosol

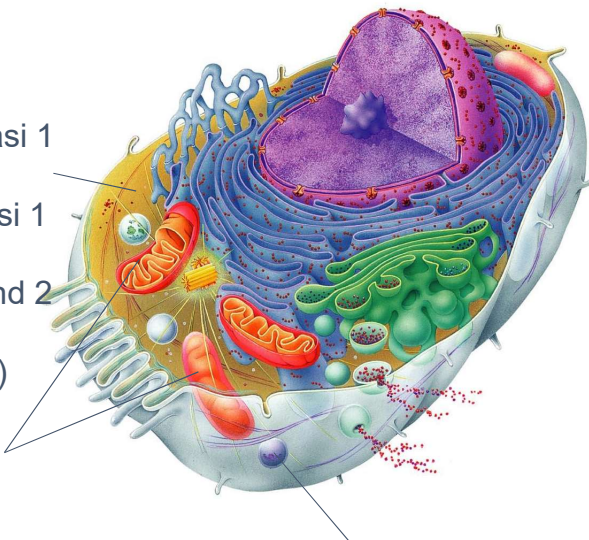
- superossido dismutasi 1 (SOD1)
- glutathione perossidasi 1 (Gpx1)
- peroxiredossina 1 and 2 (Prx1 and Prx2)
- tioredoxina 1 (Trx1)

Mitocondri

- SOD2
- Gpx2
- Prx3
- Trx2
- catalasi 2

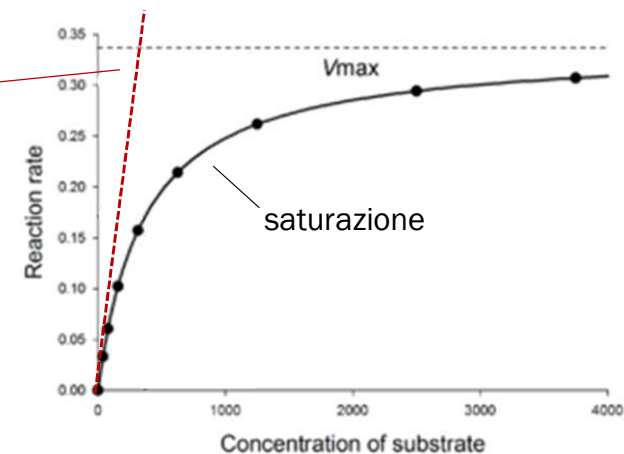
Perossisomi

- catalasi 1



Gli enzimi antiossidanti lavorano al **limite di diffusione** dell'acqua

Cinetica degli
Enzimi antiossidanti



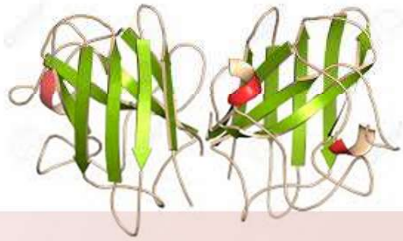
...che significa che non sono **MAI** saturati!

Enzimi antiossidanti

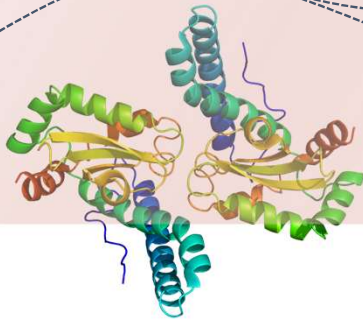


Sistema antiossidante: Difesa enzimatica

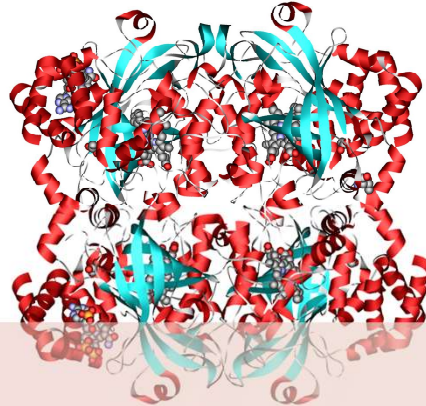
SOD1 (*Cu*)



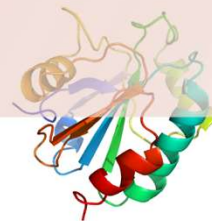
SOD2 (*Mn*)



catalasi (*Fe*)



Gpx (*Se*)



catalasi è l'enzima più veloce che si conosca

numero di turnover

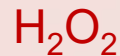
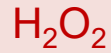
(il numero di molecole di H_2O_2 trasformate al secondo in H_2O)

4×10^7 molecules of H_2O_2 /sec

In presenza di catalasi, virtualmente,
NON C'È H_2O_2 !!!

incredibilmente

VELOCE



(costituita essenzialmente da piccole molecole tioliche e da vitamine)

(costituita essenzialmente da piccole molecole tioliche e da vitamine)

- glutatione (GSH)
- ascorbato (vit. C)

- glutatione (GSH)
- ascorbato (vit. C)

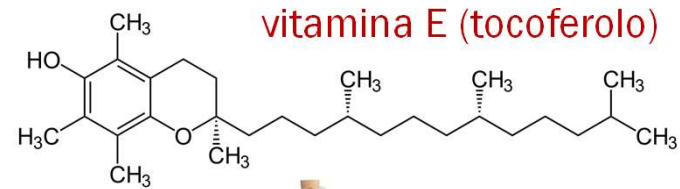
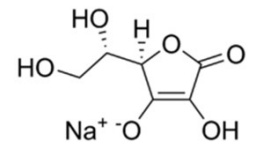
- GSH

- GSH

- Tocoferoli
(Vit. E)

- Tocoferoli
(Vit. E)

vitamina E (tocoferolo)

CC(C)CCCC[C@H](C)CCCC[C@H](C)CCCC[C@H](C)C1C(C(C(C)C1)O)COC[C@H]1C(=O)C(O)C(=O)O1[Na+]

Protocollo sperimentale e analisi

Prelievo prima dell'immersione
(**P**)



Immersione



Prelievo 90 minuti dopo
l'emersione (**90'**)



Estrazione leucociti



1. Congelamento (-80°C)

2. Processamento

- valutazione del contenuto proteico
- trattamento del campione per le analisi successive

Domanda biologica

Se condizioni di iperbarismo
sono associati a stress
ossidativo...

...allora...

Si producono danni?

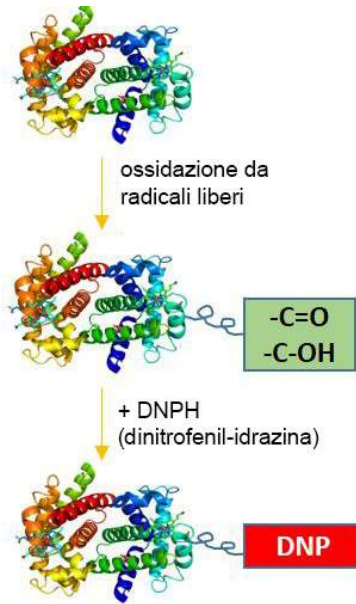
Siamo in grado di difenderci?



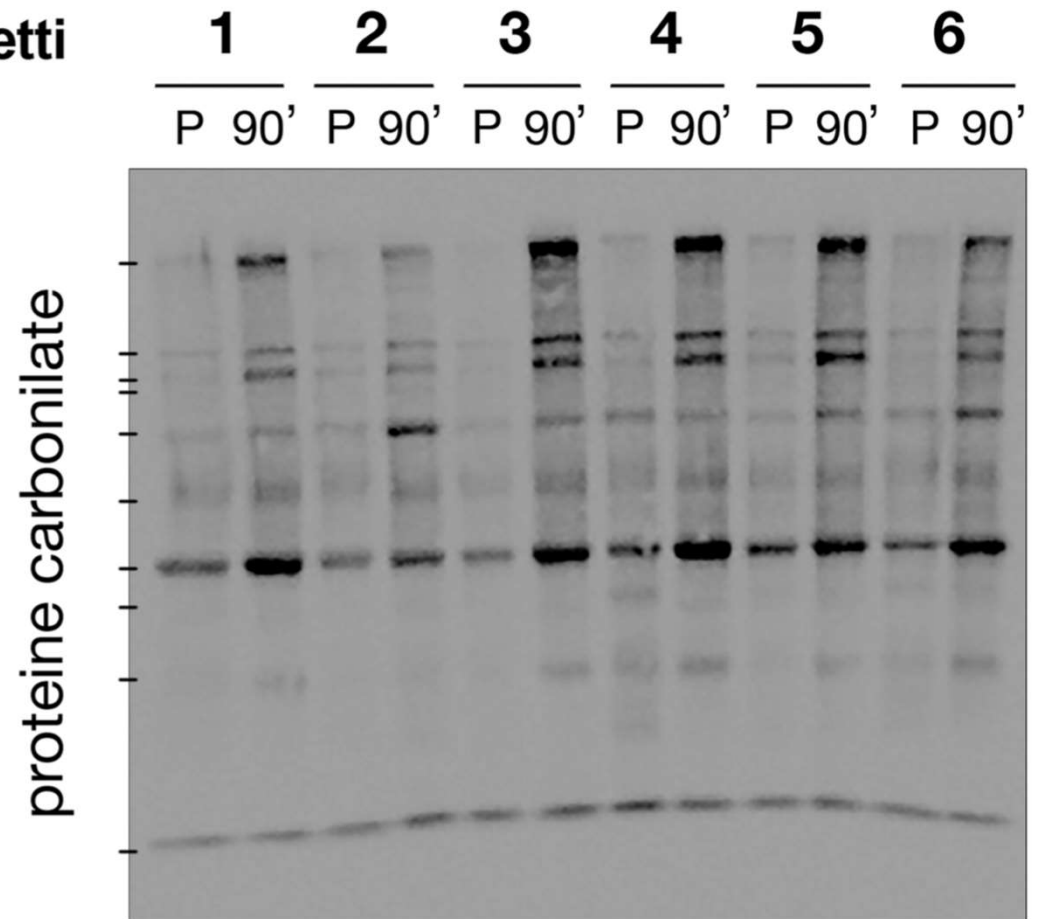
Valutazione del danno: carbonilazione delle proteine

Carbonilazione: Danno irreversibile delle proteine causato da ossidazione del $C\alpha$ dello scheletro proteico da parte dei radicali liberi.

Analisi: derivatizzazione dei gruppi $C=O$ a C-DNP in seguito a reazione con DNPH



Soggetti



Domanda biologica

Se condizioni di iperbarismo
sono associati a stress
ossidativo...

...allora...

Si producono danni?

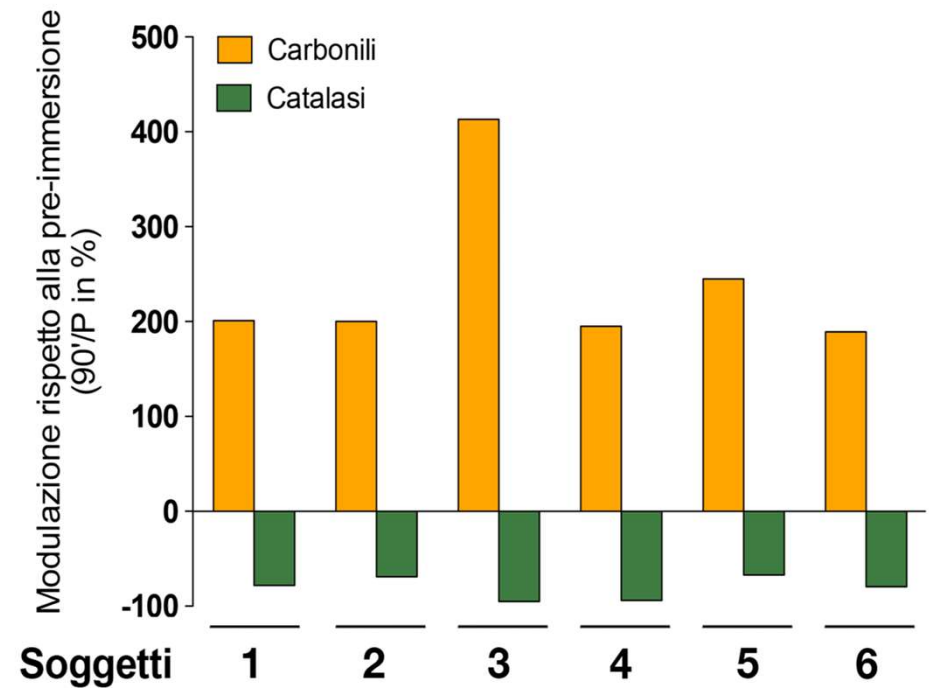
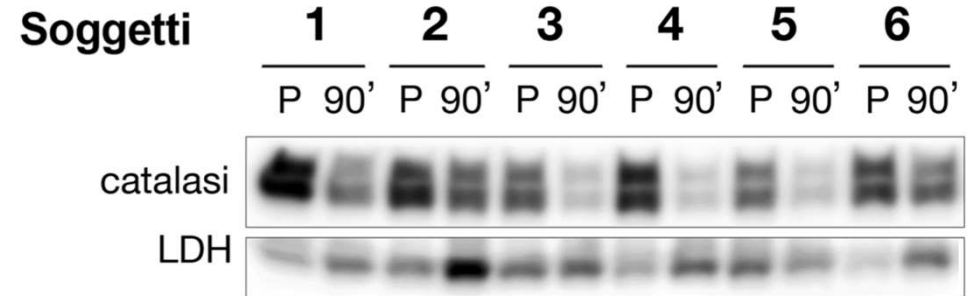
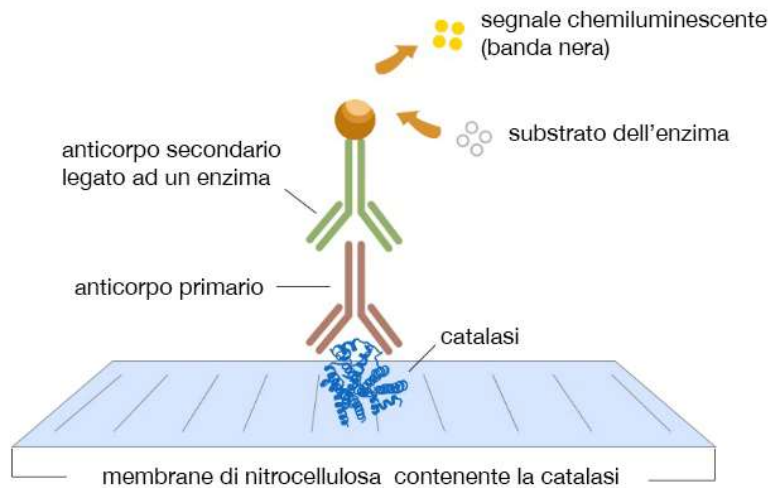
Siamo in grado di difenderci?



Domanda biologica 2

Catalasi: Enzima antiossidante che previene il danno da ROS (specificamente da H_2O_2).

Analisi: Rilevazione immunochimica tramite tecnica Western blot con anticorpi specifici che riconoscono la catalasi



Conclusioni

- Sebbene ancora parziali, nel loro insieme, i dati indicano che condizioni di iperbarismo sono associate a
 1. **diminuzione di catalasi**, non sappiamo ancora da cosa indotta
 2. **stress ossidativo** elevato a carico delle proteine (**carbonili**)
 - Un secondo set di esperimenti condotti su soggetti differenti **confermano questo trend**, indicando che l'iperbarismo può essere annoverato tra i fattori di rischio di professioni che prevedono condizioni di pressioni ambientali superiori a quelle atmosferiche (e.s., subacquei, palombari)
-
- Studi ulteriori saranno condotti per dimostrare se **l'assunzione di antiossidanti** – direttamente attraverso consumo di frutta e verdura, o per mezzo di integratori vitaminici – abbia **un'azione protettiva/preventiva** del danno ossidativo.
 - Resta inoltre da investigare la **risposta “LONG TERM”** dell'organismo, ovvero se sussista una risposta adattativa alla cronicizzazione dello stress ossidativo.