

Stress ossidativo nell'insufficienza renale: uno studio sperimentale

Loretta DIANA (a), Rita Di GIOVANNANDREA (a), Mauro VALERI (b),
Valentina MAZZARELLA (c), Antonino BELLA (d) e Giancarlo SEVERINI (a)

(a) *Laboratorio di Biochimica Clinica, (b) Servizio Qualità e Sicurezza Sperimentazione Animale,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Consiglio Nazionale delle Ricerche, L'Aquila*

(d) *Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Riassunto. - Numerosi studi indicano come la iperproduzione radicalica sia la causa di molte malattie. È stato studiato lo stato di salute di ratti con danno renale indotto chirurgicamente e sottoposti a dieta ricca di sostanze antiossidanti. Sono stati studiati tre gruppi di 25 ratti Wistar: uno di controllo alimentato con dieta standard, due alimentati con dieta potenziata somministrata prima e dopo l'intervento chirurgico. La risposta allo stress ossidativo è stata valutata attraverso la determinazione delle attività della superossido dismutasi (SOD), della glutatione-perossidasi (GPX) e della glutatione-s-transferasi (GST). Lo stato di salute dei ratti è stato controllato, inoltre, tramite monitoraggio di alcuni parametri chimico-clinici più in uso. I risultati del presente studio mostrano differenze significative tra i gruppi pre e post-alimentati verso i controlli per tre parametri: azoto uremico, colesterolo e proteine. Inoltre si evidenzia una differenza significativa anche tra i gruppi pre e post-alimentati. Per quanto riguarda gli enzimi si osserva un più rapido ritorno a valori di normalità della GPX nei ratti pre e post-alimentati. Questo enzima mostra una significatività già a partire dal tempo T0 dei pre-alimentati verso i controlli.

Parole chiave: malattie renali, stress ossidativo, enzimi.

Summary (*Oxidative stress in renal failure: an experimental study*). - We studied the activity of some enzymes directly involved in the endogenous antioxidative defense system: glutathione-peroxidase (GPX), glutathione s-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD). We have investigated the effects of selenium and vitamin E diet supplementation, in form of selenium-vitamin E enriched yeast, in Wistar rats that were undergone to surgical right nephrectomy and 30 minutes of hypoxia. Blood samples were tested for several parameters as glucose, cholesterol, etc. to assess the general health conditions. The protocol consisted of 3 groups of 25 Wistar rats: a control group, a pre-fed group and a post-fed group. The results showed a significant difference in the behaviour of azotemia, proteins and cholesterol. In the control group the activity rapidly increased, then the values decreased slowly and differently for each substance. The pre and post-fed group showed a pronounced increase after 48 h but the normal values are reached more rapidly. We observed an increase in the activity of the GPX and GST after surgical operation and ischemia, but the GPX in pre-fed group reached the normal value before the other groups.

Key words: renal diseases, oxidative stress, enzymes

Introduzione

I radicali liberi (RL) sono atomi o molecole provvisti di un elettrone spaiato nell'orbitale periferico e pertanto caratterizzati da una spiccata reattività. Questi complessi di valenza anormale hanno generalmente vita breve per la loro tendenza a completare il proprio insieme elettronico o per dimerizzazione o captando un atomo d'idrogeno che può fornire l'elettrone mancante.

La formazione di RL può avvenire nelle cellule e nei tessuti sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In particolare vengono generati dai macrofagi e dai polinucleociti nel momento in cui si verifica la fagocitosi, nonché durante il metabolismo di farmaci e tossici nel corso di processi infiammatori.

I danni maggiormente riscontrabili da iperproduzione di RL si verificano a discapito delle membrane cellulari, le quali per la presenza di acidi grassi polinsaturi, vanno incontro a processi di perossidazione. Si verificano quindi effetti che culminano nella produzione di sostanze quali aldeidi, gas idrocarburi nonché residui chimici come la malondialdeide. Tutto ciò comporta una perdita di fluidità della membrana, un danneggiamento dei gradienti ionici transmembrana, edemi cellulari e tutta una sequenza di alterazioni metaboliche che portano alla morte cellulare. Quest'ultima deve essere intesa pertanto non come causa diretta, bensì come conseguenza di un attacco multifattoriale a differenti strutture o macromolecole vitali.

Due categorie di composti, diversi tra loro per struttura e composizione, svolgono nell'insieme una sinergica azione di difesa cellulare e tissutale dai RL: i sistemi antiossidanti enzimatici e quelli non enzimatici.

Tra i primi sono da segnalare la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPX) e la glutazione transferasi (GST). Questi tre enzimi svolgono una importante funzione nei processi di detossificazione, intercettando un gran numero di composti elettrofilici altamente reattivi prima che questi si leghino covalentemente ai componenti nucleofili dei tessuti, avviando così un'azione di eliminazione delle sostanze estranee.

Tra i sistemi non enzimatici sono da ricordare la vitamina E, la vitamina C e il selenio. Anch'essi bloccano le reazioni dei RL donando elettroni. I RL hanno un ruolo importante nella patogenesi di molte malattie [1, 2] ed è stato suggerito un loro ruolo anche in alcune patologie renali [3].

Al fine di valutare lo stress ossidativo nel danno renale e le possibilità di una sua prevenzione, abbiamo ritenuto opportuno studiare il comportamento dei più comuni parametri chimico-clinici e di alcuni sistemi antiossidanti enzimatici (SOD, GPX, GST) nella risposta al danno renale prodotto nei ratti da ischemia indotta chirurgicamente e di valutare se una dieta potenziata nella concentrazione di sostanze con attività antiossidante come il selenio e la vitamina E facilitasse la capacità di recupero del rene.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 75 ratti Wistar del peso di circa 300 g forniti dalla Charles River Animal, Calco (Lecce), Italia. Gli animali sono stati mantenuti in un ciclo costante luce-buio di 12 h (7.00-19.00) ad una temperatura controllata di 22 ± 2 °C negli stabulari del Servizio Qualità e Salute per la Sperimentazione Animale dell'Istituto Superiore di Sanità. Prima dell'esperimento gli animali avevano libero accesso alla dieta e all'acqua.

Durante il periodo di studio, gli animali sono stati tenuti in accordo con le linee guida fornite dalla commissione per la cura degli animali in sperimentazione secondo la legislazione italiana (D. lgs. n. 116,2; 27 gennaio 1992).

I ratti sono stati divisi in tre gruppi:

1) gruppo di controllo: sottoposti ad una dieta standard per tutto il tempo della sperimentazione;

2) gruppo pre-alimentati: sottoposti ad una dieta standard per una settimana dall'arrivo negli stabulari, sono stati alimentati due settimane prima dell'intervento con una dieta arricchita di vitamina E e selenio (100 mg/kg, 500 µg/kg);

3) gruppo post-alimentati: ratti sottoposti ad una dieta standard fino al giorno dell'intervento, successivamente alimentati con una dieta arricchita di vitamina E (100 mg/kg) e selenio (500 µg/kg) fino alla fine dell'esperimento.

Dopo 16 h di digiuno, tutti i ratti venivano sottoposti ad anestesia generale con una iniezione intraperitoneale di medetomidina cloridrato 0,03 g/kg (Dormitor, Vetem srl, Italia da Orion Corporation Espoo, Finlandia) più 0,03 g/kg di ketamina cloridrato al 10% (Ketavet 100, Farmaceutici Gelloni SpA Aprilia (Lt), Italia). Durante l'anestesia i ratti sono stati posti su di una piastra scaldante a 40 °C.

Dopo un'incisione addominale lungo la linea mediana, l'arteria renale sinistra era occlusa con una clamp vascolare per 30 minuti.

Quindi la clamp era rimossa permettendo la riperfusione del rene. Il rene destro era rimosso. Prima dell'ischemia e della nefrectomia chirurgica sono stati prelevati 2 ml di sangue in provette addizionate con EDTA. Ulteriori campioni di sangue sono stati prelevati dopo 2, 8, 15 e 30 giorni dall'intervento. Anche questi prelievi sono stati eseguiti sotto anestesia generale.

Dopo l'intervento i ratti sono stati risvegliati con una iniezione intraperitoneale di Antisedam Antipamezolo 0,03 mg/kg (Vetem, Italia da Orion Corporation Espoo, Finlandia). I campioni di sangue erano quindi centrifugati a 420 g per 10 min. Il plasma così ottenuto veniva immediatamente analizzato. La determinazione della creatinina, del glucosio, dell'azoto uremico, del colesterolo e delle proteine totali è stata effettuata mediante un analizzatore automatico Technicon-RA 1000 usando reagenti della ditta Bayer (MI, Italia).

La determinazione dell'attività della SOD è stata effettuata mediante spettrofotometro Beckman DU-640 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) secondo il metodo di Nebot e Moutet [4], usando reagenti della ditta Oxis (Prodotti Gianni, Milano, Italia).

Le determinazioni delle attività della GPX e della GST sono state effettuate sempre con uno spettrofotometro Beckman DU-640, usando reagenti forniti dalla ditta FAR (Settimo di Pescantina, VE, Italia), rispettivamente secondo il metodo di Paglia e Valentine [5], e secondo il metodo di Habig [6].

Al fine di valutare la significatività tra i tre gruppi di ratti in trattamento è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute con fattore raggruppante il trattamento (gruppo di controllo, gruppo pre-alimentato e gruppo post-alimentato) e misure ripetute delle rilevazioni effettuate ai tempi T0, T1, T2, T3, T4.

Per valutare la significatività delle differenze osservate tra gruppi di trattamento, in ciascun tempo, sono stati condotti confronti multipli con il test di Tukey. In tutte le analisi condotte il livello di significatività fissato è $\alpha = 0,05$.

Risultati

In Fig. 1 e 2 è riportato l'andamento dei valori medi nel tempo di tutti i parametri ematochimici e enzimatici esaminati nei gruppi di ratti di controllo, pre-alimentati e post-alimentati. L'esame dei dati mostra un significa-

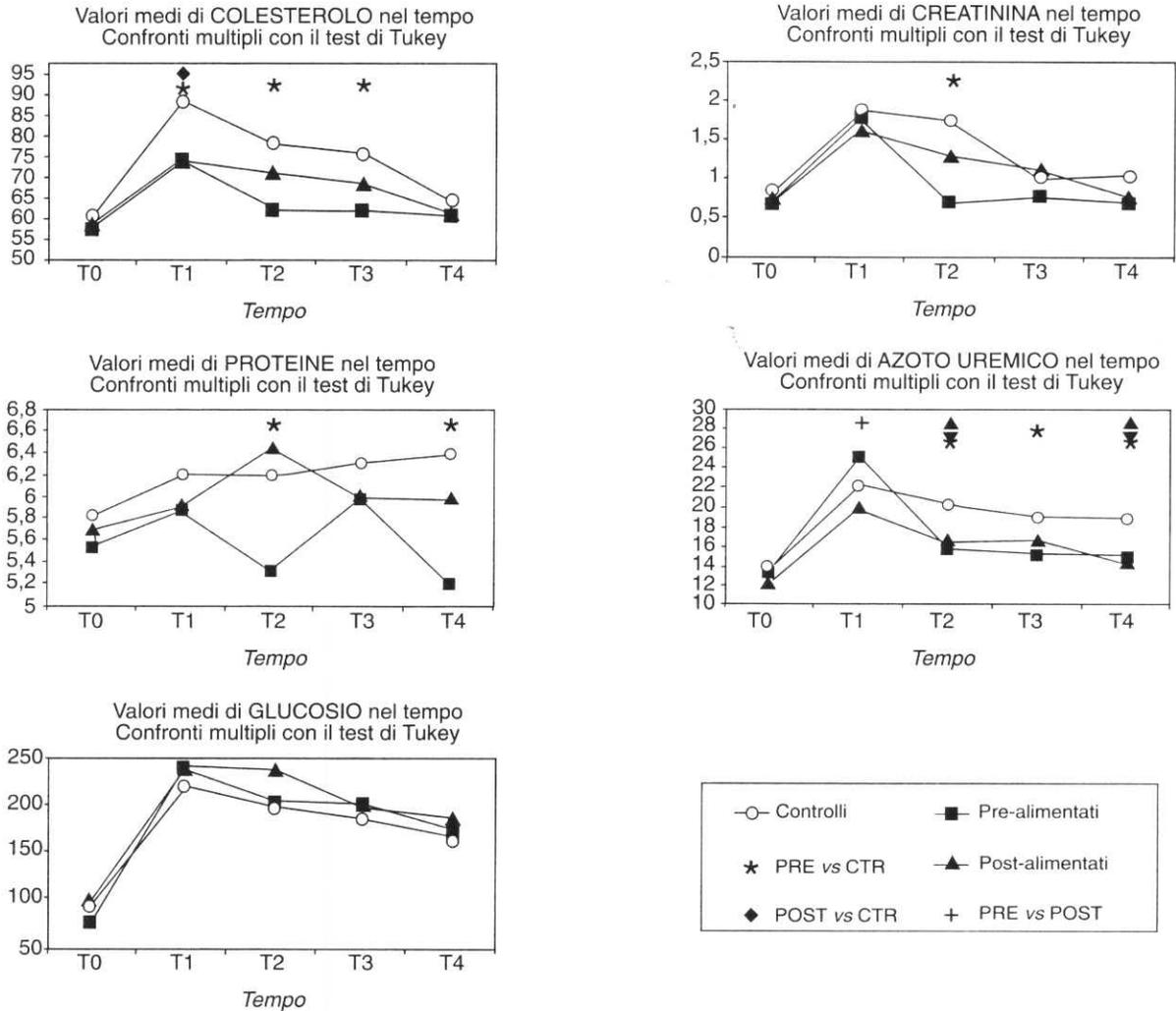


Fig. 1. - Andamento dei valori medi dei parametri ematochimici nel tempo; significatività del test di Tukey.

tivo aumento, a 48 h (T1) dall'intervento, di quasi tutti i parametri ematochimici analizzati. L'andamento dopo 8 giorni (T2) mostra, nei controlli, una diminuzione dei valori rispetto a quelli delle 48 h (T1), ma ancora sensibilmente più elevati rispetto a quelli basali (T0). Il ritorno ai valori normali si rileva dopo 30 giorni (T4). Nei gruppi pre-alimentati si può osservare un differente comportamento: dopo 8 giorni (T2) si ha generalmente un ritorno a valori molto vicini a quelli basali (T0), che vengono raggiunti dopo 15 giorni (T3). I post-alimentati pur evidenziando una diminuzione rispetto ai controlli mantengono valori superiori ai livelli basali (T0) e si approssimano ai normali solo dopo 30 giorni (T4).

I risultati dell'analisi della varianza per prove ripetute mostrano per quasi la totalità dei parametri ematochimici presi in considerazione un'interazione altamente significativa tra trattamento (dieta) e tempo (ripetuta) evidenziando differenze tra i tre gruppi di trattamento di entità diverse nei diversi tempi. La Tab. 1 mostra i risultati dell'ANOVA.

Sono stati inoltre condotti i confronti multipli con il test di Tukey al fine di confrontare i tre gruppi in trattamento in ogni tempo di osservazione (T0, T1, T2, T3, T4). In Fig. 1 e 2 vengono riportati i valori medi dei parametri ematochimici ed enzimatici nei diversi tempi e le significatività relative ai confronti multipli effettuati con il test di Tukey.

I risultati più interessanti sono stati ottenuti sui parametri: azoto uremico, colesterolo, proteine. Infatti per tali parametri il test di Tukey ha dato numerose significatività. In particolare per quanto riguarda l'azoto uremico risulta molto evidente (Fig. 1) che entrambi i trattamenti rispetto al controllo risultano essere significativi a partire dal tempo T2. Per questo parametro risulta una differenza significativa al tempo T1 tra i trattamenti pre e post-alimentati. Discorso analogo può essere fatto per il colesterolo in cui però la significatività nei tempi T1, T2 e T3 risulta essere tra i pre-alimentati verso i controlli. Questo a conferma che, seppure entrambe le diete sono più efficaci rispetto alla dieta

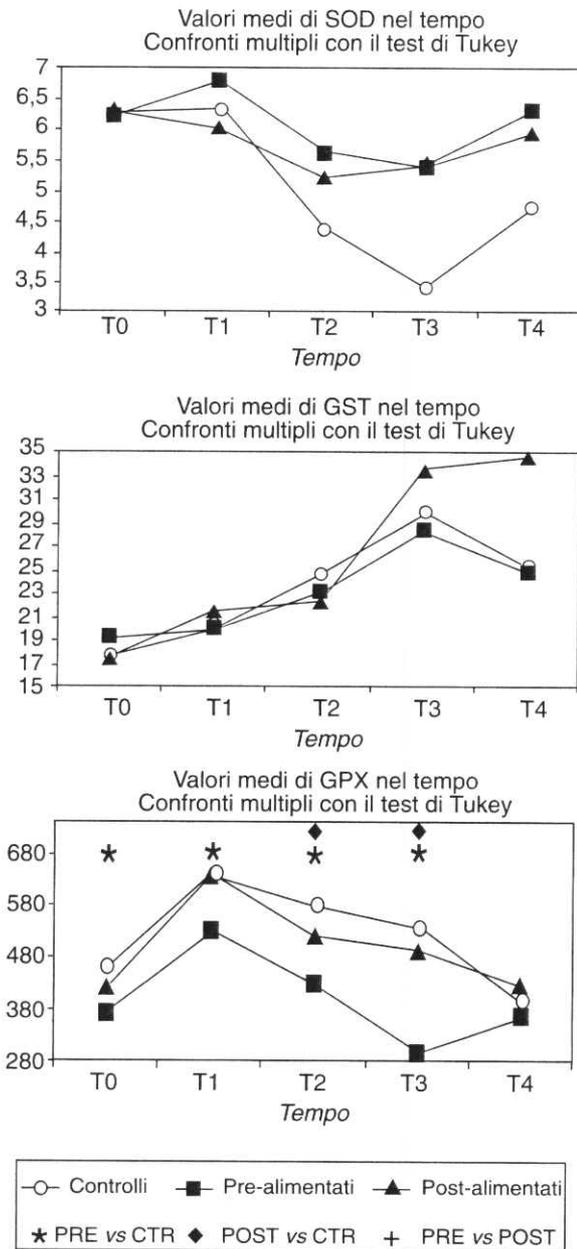


Fig. 2. - Andamento dei valori medi dei parametri enzimatici nel tempo; significatività del test di Tukey. SOD: superossido dismutasi; GST: glutatione-s-trànsferasi; GPX: glutatione perossidasi.

standard (controllo) la significatività statistica si ha solo per il gruppo dei pre-alimentati nei confronti dei controlli.

Per quanto riguarda i parametri enzimatici si può osservare, nei controlli, una diminuzione dell'attività della SOD che permane anche dopo 30 giorni dall'intervento, diminuzione che non si riscontra nei gruppi pre- e post-alimentati (Fig. 2). L'attività della GST aumenta costantemente ai vari tempi di prelievo, sia nei controlli che nei pre- e post-alimentati, mantenendo valori più elevati di quelli basali anche dopo 30 giorni.

La GPX mostra una significatività secondo il test di Tukey (Fig. 2) tra i pre-alimentati verso i controlli già a partire dal tempo T0.

Discussione

Normalmente l'ubiquità e la reattività dei sistemi in grado di produrre specie chimiche ossidanti nei vari tessuti è controbilanciata dalla presenza di un complesso sistema di meccanismi protettivi che prevengono o quanto meno limitano il danno ossidativo.

Se la velocità di produzione delle specie ossidanti supera la capacità dei meccanismi antiossidanti endogeni può innescarsi un danno irreversibile.

Come già detto precedentemente alcuni studi sperimentali hanno suggerito come questo meccanismo sia responsabile dell'insorgenza di alcune patologie renali.

I nostri risultati confermano indirettamente l'ipotesi di cui sopra, mostrando un coinvolgimento dei sistemi antiossidanti enzimatici nel potenziamento dei meccanismi di difesa nei ratti sottoposti a danno renale; danno che viene recuperato più o meno rapidamente con una dieta ricca di sostanze antiossidanti. Analizzando il comportamento dei singoli enzimi, coinvolti nei meccanismi di difesa endogena ai RL, si può osservare come l'attività della SOD subisca nei controlli una diminuzione più marcata rispetto ai gruppi sottoposti sia prima che dopo l'intervento a dieta arricchita. Inoltre, anche dopo 30 giorni non si ha ritorno ai valori iniziali. Questo risultato potrebbe trovare spiegazione oltre che nel trauma dell'intervento chirurgico anche in una riduzione dei livelli di Cu^{+2} e Zn^{+2} , entrambi costituenti del gruppo prostetico dell'enzima; non si può escludere, d'altra parte, né la possibilità di una inattivazione diretta dell'enzima da parte di metaboliti tossici, né l'influenza di una modificazione dei livelli degli elettroliti e del contenuto di H_2O . Il ritorno più rapido a valori di normalità della GPX nei ratti pre- e post-alimentati rispetto ai controlli è probabilmente da correlare alla migliore risposta al danno renale dei ratti pre- e post-alimentati. In particolare la dieta dei pre-alimentati sembrerebbe un trattamento preventivo per il danno renale, essendoci una significatività tra i pre-alimentati verso i controlli già a partire dal tempo T0.

L'aumento dell'attività della GST può essere attribuito ad un meccanismo di difesa che la cellula attua quando sono presenti in circolo componenti tossiche, derivate dal danno renale, con proprietà elettrofili stimolanti una superproduzione dell'enzima, indipendentemente dalla dieta.

In conclusione, dai dati presentati risulta, a nostro giudizio, l'effetto positivo di una dieta ricca di sostanze antiossidanti come stimolo dei meccanismi di difesa

Tabella 1. - Risultati ANOVA per prove ripetute

Parametri	Gruppo	Ripetuta	Interazione gruppo/ripetuta
Creatinina	P = 0,0057	P < 0,0001	P = 0,0052
Azoto uremico	P = 0,0132	P < 0,0001	P = 0,0005
Colesterolo	P = 0,0515	P < 0,0001	P = 0,0039
Glucosio	P = 0,1950	P < 0,0001	P = 0,2674
Proteine totali	P = 0,1098	P = 0,0954	P = 0,0424
SOD	P = 0,0017	P < 0,0001	P = 0,0020
GST	P = 0,0002	P < 0,0001	P < 0,0001
GPX	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001

SOD: superossido dismutasi; GST: glutatione-s-transferasi; GPX: glutatione perossidasi.

naturali rispetto alla sovrapproduzione di sostanze tossiche. Inoltre dai risultati ottenuti si rileva che, seppure la dieta preventiva rispetto alla posticipata favorisca il ritorno ai valori normali più efficacemente per alcuni parametri (creatinina, colesterolo, proteine, GPX), tra le due non c'è una differenza tale da poter essere ritenuta significativa.

Ricevuto il 3 aprile 2000.

Accettato il 20 novembre 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. COLLINS, A.R. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. (Review). *Bioessays* **21**(3): 238-246.
2. LEINONEN, J. & LEHTIMAKI, T. 1997. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* **417**(1): 150-152.
3. SHURTZ-SWIRSKI, R. & MASHIACH, E. 1995. Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron.* **71**: 176-179.
4. NEBOT, C. & MOUTET, M. 1993. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Analytical Biot.* **214**: 442-451.
5. PAGLIA, D.E. & VALENTINE, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **70**: 158-169.
6. HABIG, W.H. 1974. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **49**: 7130-7139.