

STRESS OSSIDATIVO E TEMPI DI RECUPERO NEL CANE DA CACCIA

OXIDATIVE STRESS AND RECOVERY OF HUNTING DOGS

ANNA PASQUINI ⁽¹⁾, ELENA LUCHETTI ⁽²⁾, GIOVANNI CARDINI ⁽²⁾

RIASSUNTO

Una sovrapproduzione di radicali liberi, in particolare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che non viene efficacemente contrastata dalla barriera antiossidante plasmatica, durante l'esercizio fisico aerobio, determina uno stress ossidativo nell'organismo. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la possibilità di utilizzare i test fotometrici d-ROMs (derivati dei metaboliti reattivi dell'ossigeno) e BAP (potenziale antiossidante biologico) (Diacron, Grosseto, It) per monitorare i tempi di recupero in cani da caccia allenati dopo un'attività fisica aerobica. Due gruppi di cani, rispettivamente 9 pointer e 9 bracchi, sono stati monitorati, con d-ROMs e BAP test, nello svolgimento di una prova di caccia pratica, con prelievi di sangue svolti ad intervalli regolari durante la fase di caccia e nella settimana di riposo successiva. I dati ottenuti per entrambi i parametri indagati, raggruppati per momento di campionamento, sono stati analizzati, tramite l'ANOVA e il test Tukey-Kramer per evidenziare le eventuali differenze significative tra i gruppi per $p < 0.05$. I risultati ottenuti hanno evidenziato uno stress ossidativo in tutti i soggetti esaminati da subito prima ad un ora dopo la fine della prova ed un graduale recupero dei valori fisiologici nel tempo fino a circa il 90% dei soggetti dopo una settimana di riposo.

Parole chiave: hunting dog, oxidative status, ROS, antioxidants, aerobic exercise.

SUMMARY

During aerobic exercise, an intensive reactive oxygen species (ROS) production together an ineffective total antioxidant power, can induce an oxidative stress condition. The aim of this study was to verify the use of d-ROMs (reactive oxygen metabolites derivatives) and BAP (biological antioxidant potential) photometric tests (Diacron, Grosseto, It) to monitor recovery times of dogs after a practical hunting trial. Nine pointers and nine hounds were tested, at regular intervals, during the hunting trial and the following week. Both parameters data, collected on the basis of sampling time, were analyzed by ANOVA test and Tukey-Kramer test. Statistically significant differences between various groups were evidenced ($p < 0.05$). Results point out oxidative stress in every subject before the exercise until one hour after the trial. A gradual recovery of physiologic parameters happen, in nearly 90% of dogs after a rest week.

Key words: hunting dog, oxidative status, ROS, antioxidants, aerobic exercise.

⁽¹⁾ Dottorando in Medicina veterinaria, Anno 2006.

⁽²⁾ Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Francesco Camillo.

INTRODUZIONE

L'attività fisica, aerobica, anaerobica e di resistenza, provoca un aumento della produzione di sostanze ossidanti in base all'intensità dello sforzo muscolare; in particolare, è stato dimostrato che la produzione di radicali liberi dell'ossigeno è proporzionale all'intensità dell'attività fisica (Alessio et al., 2000; Leeuwenburgh & Heinecke, 2001; Apor & Radi, 2006).

Una sovrapproduzione di radicali liberi, in particolare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che non viene efficacemente contrastata dalla barriera antiossidante plasmatica (BAP) determina l'instaurarsi di uno stress ossidativo nell'organismo. Durante l'esercizio aerobio, quando il consumo di ossigeno da parte dei tessuti è marcatamente incrementato, può quindi instaurarsi uno stress ossidativo e conseguenti danni cellulari, a carico delle componenti lipidiche, proteiche e degli acidi nucleici (Alessio et al., 2000; Ji, 1999; Watson et al., 2005). Gli antiossidanti, a livello muscolare ed ematico sono principalmente rappresentati da tre enzimi intracellulari, superossidodismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GSH-Px), che costituiscono una prima linea di difesa; la comparsa di uno stress ossidativo attiva anche i sistemi enzimatici di "scavenger" (Vitamine A, C, E) (Balakrishnan & Anuradha, 1998; Ji, 1999; Leaf et al., 1999; Alessio et al., 2000). A riposo l'attività di CAT, SOD e GPX risultano più elevate in soggetti allenati (up-regulation) (Miyazaki et al., 2001). L'aumento delle difese antiossidanti in allenamento si accompagna ad una riduzione della perossidazione lipidica eritrocitaria indotta da un intenso esercizio fisico (Miyazaki et al., 2001).

In medicina sportiva, sono stati eseguiti alcuni studi sul monitoraggio dello stato ossidativo in atleti di varie discipline, con particolare riguardo ai differenti tipi di esercizio fisico svolto (Ji, 1999; Child et al., 2000; Watson et al., 2005; Miyazaki et al., 2001). A tale proposito è stato osservato che i markers dello stress ossidativo permangono nell'organismo per alcuni giorni (Apor & Radi, 2006).

In medicina veterinaria, in particolare in cani da slitta, Hinchcliff et al. nel 2000 hanno dimostrato che ripetuti esercizi di resistenza inducono una perossidazione lipidica ed una riduzione degli antiossidanti plasmatici, tramite la rilevazione degli isoprostani e delle concentrazioni sieriche di vitamina E e del TAS (stato antiossidante totale). Altri studi sono stati condotti, dagli stessi autori, per valutare gli effetti di una integrazione dietetica con antiossidanti sul danno ossidativo indotto dall'esercizio fisico nei cani da slitta (Baskin et al., 2000; Piercy et al., 2000; Dunlap et al., 2005).

Una valutazione globale dello stato ossidativo è possibile tramite l'utilizzo dei test fotometrici d-ROMs (derivati dei metaboliti reattivi dell'ossigeno) e BAP (potenziale antiossidante biologico) validati in medicina umana ed impiegati in varie discipline mediche (Alberti et al., 2000).

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la possibilità di utilizzare i test d-ROMs e BAP per monitorare i tempi di recupero in cani da caccia allenati dopo un'attività fisica aerobica.

MATERIALI E METODI

Due gruppi di cani, rispettivamente 9 pointer e 9 bracchi, sono stati monitorati nello svolgimento di una prova di caccia pratica. I soggetti inclusi erano adulti, alimentati con un mangime commerciale secco di alta qualità e stavano svolgendo un'attività sportiva giornaliera, da 5 mesi. Per l'ammissione allo studio ogni soggetto è stato sottoposto ad una visita clinica e ad esami di laboratorio tendenti a valutarne lo stato di salute, tra cui: emogramma, test di immunofluorescenza diretta per leishmaniosi, test della filaria occulta, esami biochimici (urea, colesterolo totale, creatinina, trigliceridi, glicemia, AST, ALT, fosfatasi alcalina totale, GGT), elettroforesi delle sieroproteine. Ogni soggetto è stato testato in una prova di lavoro (turno di caccia pratica) della durata di 15 minuti, che prevede un lavoro di tipo aerobico, al quale è seguito un periodo di 7 giorni di riposo. I due turni di caccia sono stati svolti nei luoghi e nei tempi normalmente utilizzati dai cani durante il regolare allenamento. Ciascun cane del primo gruppo è stato sottoposto a 5 prelievi di sangue: prima dell'inizio del lavoro; subito dopo; dopo 1 ora; dopo un giorno e dopo una settimana. Ai soggetti appartenenti al secondo gruppo è stato effettuato un prelievo ematico anche al terzo giorno dopo il lavoro. Il sangue è stato posto in microprovette eparinate e centrifugate immediatamente con un'apposita microcentrifuga portatile. Su ciascun campione di plasma sono stati quindi eseguiti i test d-ROMs e BAP, precedentemente validati per la specie canina (Cardini et al., 2005). Le analisi sono state effettuate con lo spettrofotometro portatile *microFREE* (Diacron, Grosseto, It). I dati ottenuti per entrambi i parametri indagati, raggruppati per momento di campionamento, sono stati analizzati, tramite l'ANOVA e il test Tukey-Kramer per evidenziare le eventuali differenze significative tra i gruppi per $p < 0.05$.

RISULTATI

Le Tab. I e II raccolgono i valori medi relativi ai d-ROMs e al BAP calcolati per ogni gruppo nei differenti prelievi.

L'ANOVA ha evidenziato nel gruppo di Pointer: per i d-ROMs una differenza altamente significativa (** $p < 0.01$) tra i valori relativi agli ultimi due prelievi rispetto ai precedenti; per il BAP, una differenza significativa (* $p < 0.05$) tra i valori dei campioni prelevati subito dopo e dopo un'ora rispetto agli altri tre campionamenti ed in particolare a quello relativo al prelievo dopo sette giorni. Nel gruppo dei bracchi sono emerse differenze significative nei valori di d-ROMs tra i prelievi del terzo e del settimo giorno, uguali tra loro, rispetto ai precedenti; i valori di BAP del prelievo subito prima e di quello dopo sette giorni sono diversi dai valori intermedi, ed anche tra loro, essendo l'ultimo valore più elevato.

Tab. I. Valori (media dei d-ROMs (U.CARR), raggruppati per momento di campionamento. ND* non determinato. *d-ROMs (U. CARR) values (media± ES) in various sampling time ND* not defined.*

	POINTER <i>Pointer</i>	BRACCO <i>Hound</i>
Subito prima/ <i>Immediately pre</i>	143±8.4 a	194±12.7 a
Subito dopo/ <i>Immediately post</i>	144±8.4 a	168±12.7 ab
Dopo 1h/ <i>1h post</i>	150±8.4 a	161±12.7 ab
Dopo 1g/ <i>1die post</i>	106±8.4 b	113±12.7 bc
Dopo 3gg/ <i>3 post exercise</i>	ND*	109±12.7 c
Dopo 7gg/ <i>7 die post exercise</i>	75±8.4 b	75±12.7 c

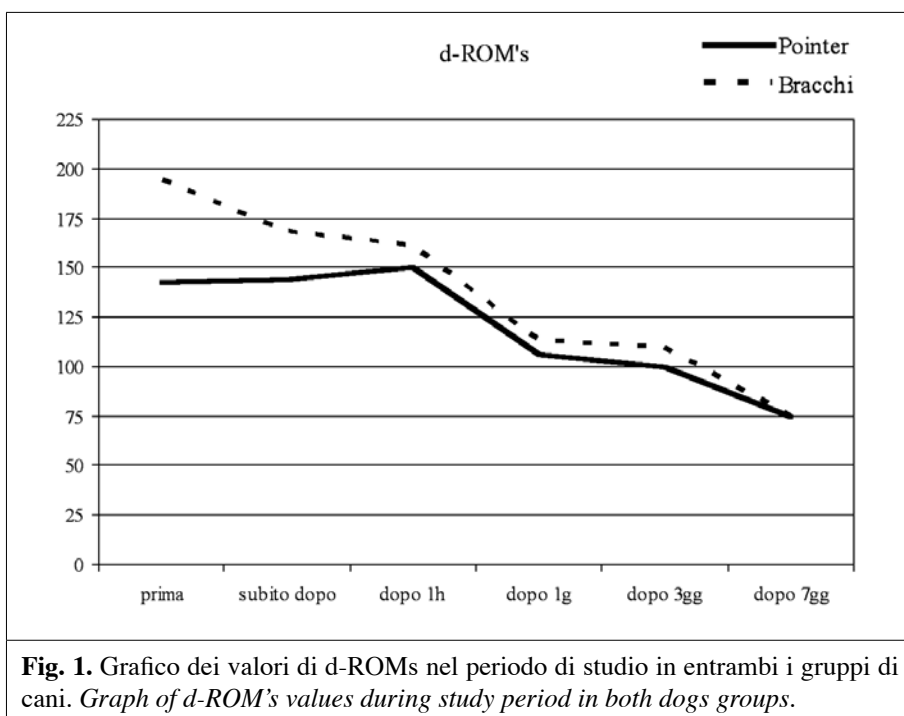
Tab. II. Valori (media ± ES) del BAP raggruppati per momento di campionamento BAP (µmoli/l) ND* non determinato. *BAP values (media± ES) in various sampling time ND* not defined.*

	POINTER <i>Pointer</i>	BRACCO <i>Hound</i>
Subito prima/ <i>Immediately pre</i>	2084±284 ab	2114±129 a
Subito dopo/ <i>Immediately post</i>	1946±367 a	1870±129 ab
Dopo 1h/ <i>1h post</i>	1939±484 a	2002±129 ab
Dopo 1g/ <i>1die post</i>	2286±384 ab	2109±129 ab
Dopo 3gg/ <i>3 post exercise</i>	ND*	2107±129 ab
Dopo 7gg/ <i>7 die post exercise</i>	2452±271 b	2472±129 b

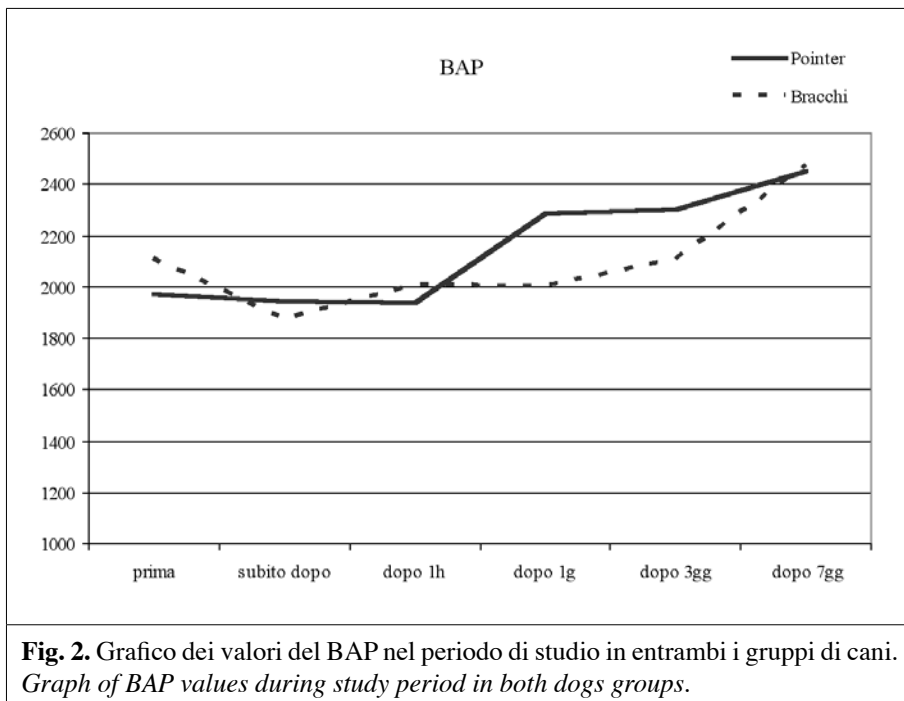
DISCUSSIONE

In tutti i soggetti di entrambe le prove, si è verificato uno stress ossidativo dal momento subito prima della prova ad un'ora dopo la fine della stessa dovuto ad una aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno e non ad una diminuzione della barriera antiossidante plasmatica, rimasta sempre all'interno dei valori fisiologici. I valori dei d-ROMs sono risultati ampiamente al di sopra del limite superiore dell'intervallo di riferimento (92 U.CARR) nei primi tre prelievi, in tutti i cani di entrambi i gruppi. Dopo un giorno dalla fine della prova si assiste ad un abbassamento del valore medio della concentrazione di d-ROMs che raggiunge, dopo sette giorni di riposo, un valore compreso nel range di normalità. In particolare, nel gruppo dei Pointer

si è assistito ad un ripristino del regolare stato ossidativo nel 33% dei soggetti dopo 1 giorno e dell'88% dopo una settimana di riposo; nel gruppo dei Bracchi, il recupero è stato dell'11% dei soggetti dopo 1 giorno, del 44% dopo 3 giorni e dell'89% dopo una settimana. Per quanto riguarda il BAP, le cui concentrazioni rimangono all'interno dell'intervallo di riferimento in tutti i campionamenti, i valori medi mostrano un innalzamento significativo dopo sette giorni dalla prova in entrambi i gruppi di caccia. Le Figg. 1 e 2 mostrano graficamente l'andamento dei due parametri, rispettivamente d-ROMs (Fig. 1) e BAP (Fig. 2), determinati nei due gruppi, nelle quali è possibile osservare un comportamento analogo dei parametri esaminati nei due gruppi di cani.



I metodi spettrofotometrici utilizzati, di semplice esecuzione in campo ma anche dotati di accuratezza e precisione, possono essere facilmente impiegati per verificare l'insorgenza dello stress ossidativo durante lo svolgimento di un'attività fisica ed anche per valutare i tempi con i quali i soggetti riescono a ripristinare uno stato ossidativo ottimale. Le osservazioni riportate, confermano la validità dello stato ossidativo nell'offrire corrette indicazioni nella gestione del cane da caccia. In seguito al monitoraggio dei parametri ossidanti e antiossidanti è possibile intervenire propriamente su carichi e tempi di lavoro ed eventualmente sull'apporto dietetico di antiossidanti, al fine di ottimizzare le performances dei soggetti nel pieno rispetto del loro benessere.



BIBLIOGRAFIA

- ALBERTI, A., BOLOGNINI, L., MACCIANTELLI, D. AND CARRATELLI M., (2000). The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylendiamine: a possibile indicatopr of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.*, 26(3): 253-267.
- ALESSIO H.M., HAGERMAN A.E., FULKERSON B.K., AMBROSE J., RICE R.E., WILEY R.L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32(9): 1578-1581.
- APOR P., RADIA A. (2006) Physical exercise, oxidative stress and damage. *Orv. Hetil.*, 147(22): 1025-1031.
- BALAKRISHNAN S.D., ANURADHA C.V. (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell. Biochem. and Func.* 16(4): 269-275.
- BASKIN R.C., HINCHCLIFF R.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., HAYEK M.G., CHEW B.P., BURR J.R., SWENSON R.A. (2000). Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 61(8): 886-891.
- CARDINI G., PASQUINI A., LUCHETTI E., MARCHETTI V., VOLTINI B. (2005). La determinazione dei radicali liberi dell'ossigeno (d-ROMs Test) e del potenziale antiossidante biologico (BAP Test) nel siero: intervalli di riferimento nella specie canina. *Atti SISVet*, 53: 331-332.
- CHILD R.B., WILKINSON D.M., FALLOWFIELD J.L. (2000). Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidant capacity and half-maeathon running performance. *Phys. Biochem.*, 21: 325-331.

- DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K. (2006). total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *Comp. Chem. Phys.*, 143(4): 429-434.
- HINCHCLIFF K.W., REINHART G.A., DISILVESTRO R., REYNOLDS A., BLOSTEIN-FUJII A., SWENSON R.A. (2000). Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *Am. J. Vet. Res.*, 61(5): 512-517.
- JI L.L. (1999). Antioxidant and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222(3): 283-292.
- LEAF D.A., KLEINMAN M.T., HAMILTON M., DEITRICK R.W. (1999). The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training. *Am. J. Med. Sci.*, 317(5): 295-300.
- LEE U.WENBURGH C., HEINECKE J.W. (2001). Oxidative stress and antioxidant in exercise. *Curr. Med. Chem.*, 8(7): 829-838.
- MIYAZAKI H., OHISHI S., OOKAWARA T., KIZAKI T., TOSHINAI K., HA S., HAGA S., JI L.L., OHNO H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 84: 1-6.
- PIERCY R.J., HINCHCLIFF K.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., BASKIN C.R., HAYEK M.G., BURR J.R., SWENSON R.R. (2000). Effect of dietary supplements containing antioxidant on attenuation of muscle damage in exercising sled dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 61(11): 1438-1445.
- WATSON T.A., MACDONALD-WICKS L.K., GARG M.L. (2005). Oxidative stress and antioxidant in athletes undertaking regular exercise training. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 15(2): 131.

