



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOLOGIA DEI DISTRETTI CORPOREI

XXI CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Stress ossidativo nella sindrome
Normal-weight obese

Fabio GALVANO

A.A. 2008/2009

Docente Guida e Coordinatore: Prof. Antonino DE LORENZO

CAPITOLO 1:

I RADICALI LIBERI

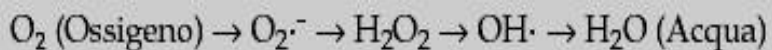
1.1 LE SPECIE RADICALICHE

I radicali liberi sono molecole che presentano un elettrone spaiato, che conferisce loro una marcata instabilità e, conseguentemente, un'elevata reattività con le altre molecole finalizzata al raggiungimento di un livello maggiore di stabilità mediante l'acquisizione di elettrone; a loro volta, le molecole che reagiscono con i radicali liberi diventano instabili e ricercano un elettrone, innescando un meccanismo a "catena". Tale serie di reazioni può durare da frazioni di secondo ad alcune ore e può essere ridimensionata o arrestata solo dalla presenza degli antiossidanti.

Quando respiriamo introduciamo ossigeno, il 95% circa del quale viene utilizzato dalle cellule per produrre energia; la parte rimanente dà origine ai radicali liberi; quindi l'ossigeno, indispensabile per mantenere la vita, diventa paradossalmente anche la più importante fonte di produzione di radicali liberi. Tuttavia, la formazione di radicali liberi è da considerarsi un processo fisiologico e un organismo sano è adeguatamente attrezzato per contrastarli mediante un sistema anti-radicali endogeno.

I radicali liberi sono quindi prodotti di "scarto" che si formano naturalmente all'interno dei mitocondri, dove l'ossigeno viene utilizzato nei processi metabolici

per produrre energia (ossidazione) e viene ridotto ad acqua in un processo di riduzione monovalente a cascata:



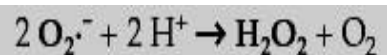
La parziale utilizzazione energetica dell'ossigeno porta a forme *radicaliche* parzialmente ridotte. Per questa ragione si è soliti parlare di radicali liberi centrati sull'ossigeno o radicali dell'ossigeno, o forme parzialmente ridotte dell'ossigeno.

Di seguito sono riportati i radicali più conosciuti:

- $\text{O}_2^{\cdot-}$ superossido radicale anione o anione superossido: prodotto da cellule del sistema immunitario che aggreiscono i microrganismi, ma anche nel corso del normale metabolismo cellulare. Il radicale superossido gioca un ruolo cruciale nella formazione di altre specie radicaliche come il perossido di idrogeno, il radicale idrossile, l'ossigeno singoletto;
- $\text{OH}^{\cdot}$ radicale idrossile: possiede il più elevato potenziale di ossido-riduzione (2310 mV) ed è in grado di attaccare tutte le strutture biochimiche basilari come lipidi, polipeptidi, proteine e le basi del DNA;
- Ossigeno singoletto coinvolto nell'ossidazione del colesterolo;
- $\text{ROO}^{\cdot}$ radicale perossile: possiede un elevato potenziale standard di riduzione (> 1000 mV) ed è coinvolto nelle fasi di propagazione delle reazioni a catena radicaliche di perossidazione lipidica;

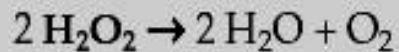
- $\text{LOO}\bullet$ radicale lipoperossido: prodotto dell'ossidazione lipidica;
- $\text{NO}_2^\bullet$ biossido di azoto radicale anione: può innescare reazioni di perossidazione lipidica;
- OONO^- perossinitrito: causa ossidazione diretta di proteine e del DNA;
- H_2O_2 perossido d'idrogeno o acqua ossigenata: chimicamente non rappresenta un radicale libero, e sebbene non possieda un potenziale di pericolosità al pari di altre specie radicaliche può, nondimeno, causare un danneggiamento ossidativo nelle cellule in quanto, in presenza di tracce di metalli di transizione, può portare alla formazione di $\text{OH}\bullet$ (reazione di Fenton).

Il radicale libero prodotto in maggiore quantità è il superossido ($\text{O}_2^\bullet$). Esso si converte per azione dell'enzima superossido dismutasi (SOD) a formare perossido di idrogeno (H_2O_2):

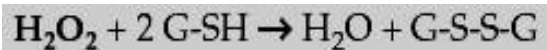


A sua volta, il perossido d'idrogeno può essere disattivato secondo tre reazioni:

- ❖ la prima è una reazione catalizzata dall'enzima catalasi che reagisce molto velocemente con il perossido di idrogeno convertendolo ad acqua e ossigeno:

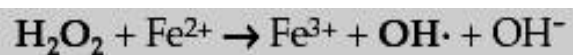


- ❖ la seconda è una reazione che vede implicata la glutatione perossidasi (GPX), un enzima che utilizza, come cofattore, il glutatione ridotto (GSH), una molecola endogena che si ossida reagendo con il perossido di idrogeno; la GPX ha una K_M molto bassa (elevata affinità), per cui interviene già quando l' H_2O_2 è a basse concentrazioni, impedendo che questa reazione dannosa avvenga a spese di strutture cellulari:

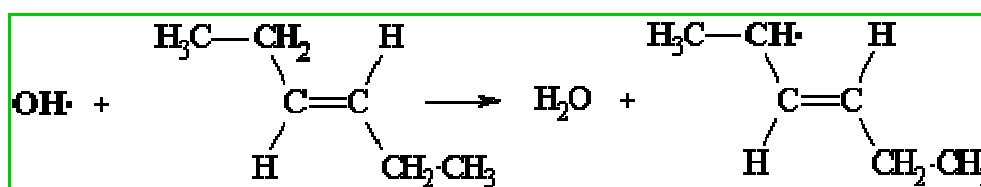


Quando la concentrazione di perossido di idrogeno aumenta, la glutatione perossidasi non riesce a far fronte alla necessità ed il ruolo della catalasi risulta fondamentale.

- ❖ la terza reazione, che avviene grazie all'ossidazione dello ione ferroso o altri ioni di metalli di transizione, genera invece il radicale ossidrile ($\text{OH}\bullet$), che a sua volta è in grado di danneggiare strutture cellulari come il DNA:



Il radicale idrossile ($\text{OH}\bullet$) strappa un idrogeno radicale, tramite *scissione omolitica*, ad un substrato cellulare formando acqua e rigenerando la specie radicalica sulla struttura endogena cellulare. Quest'ultima a sua volta scatena



reazioni radicaliche a catena velocissime e difficilmente arrestabili. Considerando che un uomo di 70 kg utilizza normalmente 3.5 ml O/min/kg e assumendo che circa l'1% dell'ossigeno viene convertito ad anione superossido, vengono prodotti circa 1.72 Kg di radicale superossido all'anno.

1.2 PRODUZIONE ED EFFETTI DEI RADICALI LIBERI

Nel nostro organismo si producono radicali liberi nel corso di almeno quattro processi biologici:

1. durante l'ossidazione finale dei substrati nutrizionali nei mitocondri, che conclude la demolizione dei macronutrienti introdotti con l'alimentazione, con produzione di energia sotto forma di ATP;
2. nelle reazioni immunitarie cellulo-mediate;
3. nelle reazioni di fase I di detossificazione epatica (ossidazione dei substrati eso- ed endo-tossici catalizzati dagli isoenzimi della famiglia del citocromo P-450);

4. nelle fasi di riperfusione dei tessuti dell'organismo interessati da fenomeni ischemici.

Le specie radicaliche possono anche avere origine esogena penetrando nell'organismo per via cutanea, respiratoria o gastrointestinale. L'esposizione a radiazioni ionizzanti, sostanze chimiche, il fumo e lo stress psicofisico portano alla produzione di radicali liberi. I radicali liberi vengono prodotti anche praticando un'attività fisica leggera come camminare, aumentando drasticamente nel corso di attività fisica intensa. La produzione di radicali liberi può essere incrementata in talune condizioni patologiche quali enzimopenie, diabete e ipercolesterolemia.

La fase postprandiale ed il processo di digestione/assorbimento rappresenta un significativo momento di produzione di radicali liberi. Una dieta ipercalorica aumenta l'entità della produzione di radicali liberi, mentre una dieta ipocalorica la riduce. Una dieta di 2400 calorie necessita di 660 g di ossigeno, di cui il 90-95% viene utilizzato per la respirazione, mentre il restante dà luogo a forme reattive dell'ossigeno (radicali liberi e non radicali). L'eccessivo consumo di grassi, specie se sottoposti a prolungati stress termici, oppure irranciditi, ed inoltre particolari modalità di cottura (brace) possono produrre specie reattive con potenziale cancerogeno, aterogeno o epatotossico. L'azione continua dei radicali liberi si evidenzia soprattutto nel precoce invecchiamento delle cellule e nell'insorgere di varie patologie gravi come cancro, diabete, sclerosi multipla, artrite reumatoide, allergie, asma, sclerodermia, morbo di Crohn, lupus eritematoso, enfisema

polmonare, cataratta, retinite pigmentosa ed altre patologie oculari, morbo di Parkinson e Alzheimer, dermatiti, artrosi, patologie del sistema cardiocircolatorio (ipertensione, aterosclerosi, ictus ed infarto).

Il processo ossidativo a carico dei lipidi viene indicato come lipoperossidazione. I lipidi di origine alimentare vengono veicolati nel sangue mediante le lipoproteine. Le lipoproteine a bassa densità, LDL, sono le particelle che trasportano la maggior parte del colesterolo nel plasma. Viene generalmente accettata la teoria secondo la quale l'aumento dei livelli di lipoproteine a bassa densità abbia un ruolo eziologico nell'insorgenza dell'aterosclerosi e delle patologie cardiocoronariche. Tuttavia, le LDL sono di per sé innocue, ma, se ossidate, innescano il meccanismo di formazione della placca aterosclerotica solo.

Sempre a livello endoteliale bisogna inoltre ricordare che l'anione superossido distrugge l'ossido nitrico (NO), una molecola endogena che regola il calibro dei vasi determinando vasodilatazione.

Va inoltre evidenziato che la lipoperossidazione danneggia le membrane cellulari aumentando la frequenza del ciclo cellulare ed anticipando la morte cellulare. Tale meccanismo si estrinseca mediante un'accelerazione del processo di accorciamento dei telomeri, porzioni di DNA localizzate alle estremità dei cromosomi, i quali si accorciano ogni volta che la cellula si divide. I telomeri di una cellula scompaiono dopo circa 50 divisioni cellulari: quindi la singola cellula

sottoposta a stress ossidativo è spinta a replicarsi più frequentemente perdendo prima del tempo la possibilità di riprodursi.

Anche il nostro sistema immunitario, il cervello ed il sistema nervoso sono altamente sensibili ad un eccesso di radicali liberi. In particolare la membrana cellulare ha un ruolo fondamentale nell'attività del sistema immunitario:

- Riconosce gli antigeni, che stimolano la produzione d'anticorpi.
- I recettori localizzati nella membrana cellulare servono come segnale per il riconoscimento da parte delle altre cellule del sistema immunitario.
- Gli anticorpi e le altre proteine che regolano la risposta immunitaria sono secreti dalla membrana cellulare.
- Una volta che un "invasore" è stato riconosciuto, è necessario un grande quantitativo di acidi grassi polinsaturi per duplicare i linfociti specializzati preposti ad attaccare questi "invasori" esterni.
- Le cellule immunitarie hanno anche la capacità di distruggere le altre cellule invase; anche questa capacità dipende dall'integrità della membrana.
- L'integrità della membrana cellulare permette anche di selezionare quali sostanze utili (es. nutrienti) possono passare e quali no.

La membrana esterna delle cellule del sistema immunitario presenta un alto contenuto di acidi grassi che, in quanto polinsaturi, sono maggiormente suscettibili all'attacco dei radicali liberi. E' diffusa opinione che l'azione dei radicali liberi sui

neuroni cerebrali possa avere un ruolo importante nell'eziologia di talune patologie cronico-degenerative del sistema nervoso centrale, quale l'Alzheimer ed il morbo di Parkinson.

CAPITOLO 2

STRESS OSSIDATIVO

2.1 DEFINIZIONE DI STRESS OSSIDATIVO

Il significato biologico e le implicazioni patologiche dello stress ossidativo rappresentano tematiche di grandissima attualità nell'ambito della ricerca medica. E' ormai assodato che esso si associa alle principali patologie cronico-degenerative e con evoluzione parallela al processo d'invecchiamento: patologie cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative, tumorali, infiammatorie sistemiche o a carico di singoli organi. Le più recenti ipotesi eziopatogenetiche dimostrano che lo stress ossidativo è l'elemento patogenetico comune in patologie in prima analisi molto diverse tra loro.

La maggior parte delle patologie e l'invecchiamento degli esseri viventi sono causati da processi chimici ossidativi, dovuti ad una eccessiva produzione di radicali liberi.

La presenza dei radicali liberi in organismi viventi ha normalmente conseguenze negative, come il danneggiamento diretto o indiretto del DNA cellulare e la modificazione strutturale delle proteine.

I radicali liberi possono quindi indurre danni anche gravissimi, modificando le caratteristiche strutturali e funzionali di un tessuto vivente: essi sono, infatti, chiamati in causa nella genesi biochimica di un gran numero di eventi patologici.

Ecco che si chiarisce il significato di stress ossidativo: nell'organismo sano esiste un equilibrio fra i meccanismi ossidativi e le difese antiossidanti; in condizioni normali il potenziale tossico dei radicali liberi è neutralizzato da un complesso sistema di fattori antiossidanti che rappresenta il meccanismo fisiologico di difesa: il rapporto tra fattori ossidanti e difese antiossidanti rappresenta il cosiddetto "bilancio ossidativo".

Lo stress ossidativo è, pertanto, l'espressione biologica di un danno che si verifica quando i fattori pro-ossidanti (farmaci, sostanze tossiche, radiazioni, stati infiammatori, attività fisica esacerbata, etc.) superano le difese antiossidanti endogene (enzimi come la SOD, il coenzima Q10, la catalasi, la perossidasi, etc.) ed esogene (antiossidanti presenti negli alimenti).

2.2 CONDIZIONI CHE PROVOCANO LO STRESS OSSIDATIVO

Si può incorrere in stress ossidativo sia in condizioni normali di salute sia negli stati patologici.

Condizioni normali di salute: si ha aumento della produzione di radicali liberi ad esempio praticando sport o facendo sforzi muscolari.

Infatti, se una persona è seduta consuma un certo quantitativo di ossigeno con una produzione “normale” di radicali liberi. Se la stessa persona corre, fa sport, è sotto sforzo e il consumo di ossigeno può aumentare fino a venti volte; in proporzione aumenta anche la produzione di radicali liberi. Per spiegare l’indubbio effetto salutare dell’attività fisica moderata si ipotizza che essa determini cronicamente una maggiore espressione ed attività dei sistemi antiossidanti endogeni. Elevati valori di stress ossidativo si riscontrano anche in condizioni di stress psico-fisico, esposizione ad inquinamento ambientale, fumo, radiazioni solari, abuso di alcol.

Condizioni patologiche: quasi tutte le patologie presentano valori anomali di radicali liberi. Ad esempio l’obesità, il diabete, l’ipertensione, le patologie allergiche, quelle flogistiche, l’artrite reumatoide, l’Alzheimer, il Parkinson ed altre.

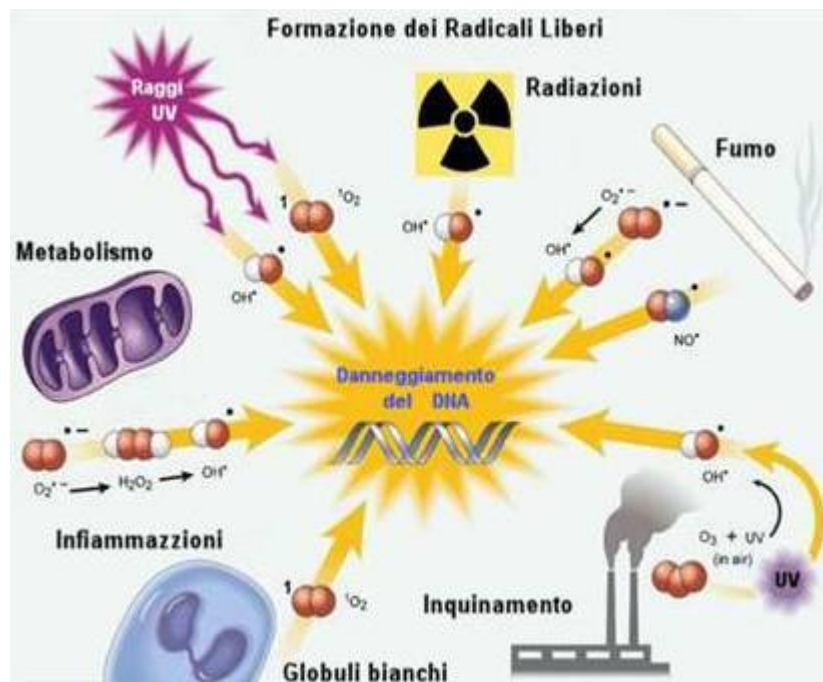


Fig. 1 Formazione dei radicali liberi

2.3 VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO

La possibilità di misurare in forma accurata lo stato ossidante di un sistema biologico appare di fondamentale importanza per la diagnostica clinica, nonché indispensabile in caso di trattamenti farmacologici che potrebbero causare stress ossidativo o per monitorare l'efficacia di terapie antiossidanti.

L'analisi dello stress ossidativo prende in considerazione i livelli ematici di:

- *sostanze antiossidanti*, per esempio vitamina E ed A (in grado di interrompere la catena di reazioni determinata dai radicali liberi);

- *enzimi antiossidanti* (bloccano direttamente i radicali liberi);
- *acidi grassi polinsaturi* (sono componenti essenziali per la costruzione delle membrane biologiche e quindi di importanza vitale per la salute cellulare).

2.4 SISTEMI ANTIOSSIDANTI ENDOGENI

I sistemi antiossidanti endogeni sono costituiti da un pool di enzimi in grado di bloccare la formazione di radicali liberi.

I principali enzimi sono:

- le *superossido dismutasi* (SOD), presenti nel citoplasma e nei mitocondri, che contengono manganese (Mn-SOD), rame e zinco (Cu/Zn-SOD);
- la *glutathione perossidasi* (GPX) contenente selenio;
- la *glutathione transferasi*;
- la *catalasi*.

Le SOD sono metalloproteine che catalizzano la dismutazione dello ione superossido a ossigeno e perossido di idrogeno. Sono state descritte tre classi di SOD, ognuna caratterizzata dal sito attivo e dal metallo che partecipa al sito attivo: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD.

La SOD Rame Zinco è caratteristica delle cellule eucariotiche (presente nel citosol e nel nucleo), la Ferro SOD delle cellule procariotiche, mentre Manganese

SOD si trova invece in entrambi i tipi di cellule (nella matrice mitocondriale). Tali enzimi svolgono attività vitali per gli organismi aerobici.

La GLUTATIONE PEROSSIDASI plasmatica è una selenioproteina che catalizza la reazione di detossificazione degli idroperossidi (H_2O_2 o $ROOH$) in presenza di glutatione (GSH). Il sangue umano contiene, oltre agli enzimi eritrocitari (Se-GPX), una glutatione perossidasi plasma-specifica (pl-GPX).

La *glutathione peroxidase plasma-specific* è un tetramero di circa 94-100 kDa. Ogni unità contiene un sito attivo con un residuo di Selenocisteina. Questa selenioproteina differisce dall'altra glutathione perossidasi per la sua sequenza primaria, la sua regione N-terminale glicosilata e la sua dislocazione extracellulare. Inizialmente è stata riscontrata solamente dal plasma, ma poi è stata rilevata anche nel latte umano.

La *glutathione peroxidase cellulare* o c-GPX, è un membro della famiglia degli enzimi GPX la cui funzione è la detossificazione dei perossidi all'interno della cellula.

Dato che i perossidi possono decomporsi in forme radicaliche altamente reattive, gli enzimi GPX sono cruciali per la difesa dai danni dei radicali liberi e in particolare dalla perossidazione lipidica. Gli enzimi GPX catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno (H_2O_2) ad acqua e quella dei perossidi organici ($ROOH$) ai corrispondenti alcoli stabili (ROH) usando il Glutathione come fonte di equivalenti riducenti.

Con l'eccezione del GPX fosfolipide-idroperossido, che è un monomero, tutti gli altri sono composti da 4 unità identiche. Ogni sub-unità contiene una molecola di Seleno-Cisteina che sembra partecipare attivamente nella donazione di elettroni al substrato, ossidandosi. L'enzima usa poi il Glutathione come donatore di elettroni per rigenerare il sito attivo (Seleno-Cisteina).

Gli enzimi GPX accettano una grande varietà di cofattori, non solamente il glutathione, anche se quest'ultimo è di gran lunga il preferito.

Le CATALASI sono enzimi presenti nella matrice dei perossisomi. Questi enzimi degradano il perossido di idrogeno H_2O_2 (acqua ossigenata) in acqua H_2O e ossigeno; tale funzione è di fondamentale importanza perché il perossido, derivante da alcune reazioni metaboliche, ha un forte potere ossidante e potrebbe risultare estremamente nocivo per la biochimica cellulare.

Le GLUTATIONE S-TRANSFERASI (GSTs) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutathione rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo.

2.5 GLI ANTIOSSIDANTI ESOGENI

Gli organismi oltre a possedere meccanismi antiossidanti propri, possono efficacemente impiegare gli antiossidanti presenti negli alimenti. Gli antiossidanti naturali sono una classe eterogenea di composti accomunati dalla peculiarità di rallentare o bloccare, secondo differenti meccanismi, reazioni di tipo ossidativo.

Essi riportano l'equilibrio chimico nei radicali liberi grazie alla possibilità di fornire loro gli elettroni di cui sono privi, permettendo così ai sistemi enzimatici della cellula di neutralizzarli. Nel donare l'elettrone, l'antiossidante diventa, a sua volta, una specie radicalica, ma molto più stabile di un radicale libero vero e proprio e più facilmente eliminabile dall'organismo. Le piante, in quanto esposte costantemente all'azione dell'ossigeno e della luce, hanno sviluppato nel corso della loro evoluzione efficaci sistemi di difesa per proteggere dall'ossidazione e dai radicali liberi il loro DNA, gli zuccheri, i grassi e le proteine. Gli antiossidanti più diffusi tra i vegetali sono le vitamine, i polifenoli ed alcuni pigmenti. L'importanza dell'assunzione, tramite la dieta, di adeguate quantità delle suddette sostanze che vadano ad integrare i sistemi antiossidanti endogeni è ormai conclamata.

CAPITOLO 3

CARATTERISTICHE E PROPRIETA' DEL PLASMA UMANO

3.1 VALUTARE LO STRESS OSSIDATIVO TRAMITE L'ANALISI DEL PLASMA

Il plasma umano ha sia funzione di trasporto, sia di regolatore della pressione osmotica. E' esposto all'ossigeno e ad una varietà di composti derivati dal metabolismo cellulare e dall'alimentazione. Inoltre, è anche esposto agli ossidanti prodotti principalmente dai fagociti attivati.

Neutralizzando l'azione di questi ossidanti, il plasma fornisce protezione alle cellule endoteliali vasali ed alle lipoproteine circolanti.

Il danno ossidativo alle lipoproteine a bassa densità (LDL) e alle cellule endoteliali è un evento di primaria importanza nello sviluppo delle “strie lipidiche”, la più precoce lesione aterogenica (1). Per queste ragioni, oltre alla facilità di prelievo, il plasma rappresenta un utile modello di fluido extracellulare ed un materiale biologico ideale per monitorare *in vivo* le reazioni radicaliche e lo stress ossidativo.

3.2 DIFESE ANTIOSSIDANTI ENDOGENE PRESENTI NEL PLASMA UMANO

3.2.1 Antiossidanti enzimatici

Mentre le difese antiossidanti intracellulari sono rappresentate da enzimi quali SOD, catalasi, GSH-Px, glutazione reduttasi, fosfolipide idroperossido-glutazione perossidasi e glutazione S-trasferasi, nel plasma umano questi enzimi sono pressoché assenti o presenti in concentrazioni molto più esigue (tab. I).

Enzima	Plasma (U/ml)	Eritrociti (U/1 x10 ¹⁰ cellule)
Superossido dismutasi	5-20	550-800
Catalasi	N.D.	3800-5400
GSH perossidasi	0,4	7,8-10,6
GSSG reduttasi	0,03	2,7-3,7
GSH trasferasi	0,005	1,5-2,5

Tab. 1: livelli di antiossidanti enzimatici nel plasma e negli eritrociti umani.

Marklund (2) ha caratterizzato una SOD extracellulare (ec-SOD) contenente Cu e Zn che è distinta da quella intracellulare. La ec-SOD è una glicoproteina secreta prevalentemente dalle cellule endoteliali e, sebbene la sua concentrazione plasmatica sia normalmente bassa, la quantità circolante aumenta significativamente in seguito ad iniezione di eparina, dimostrando che il legame dell'ec-SOD alla superficie delle cellule endoteliali (ma non delle cellule del sangue) è mediato da eparin-solfati (3).

Il plasma umano possiede anche attività perossidasi (4-7). Recentemente è stata purificata e caratterizzata una GSH-Px selenio-dipendente, antigenicamente diversa da quella presente nei globuli rossi (5, 8, 9), anche se rimane ancora oscuro il suo ruolo biologico. L'enzima, come la ec-SOD, è glicosilata (10), ma sembra essere secreta dalle cellule epatiche piuttosto che dalle cellule endoteliali (11).

Sebbene si ritenga generalmente che il plasma degli individui sani sia scarsamente dotato di catalasi (12), alcuni studi riportano la presenza di catalasi nel plasma o nel siero (13, 14). La catalasi plasmatica potrebbe proteggere l'acido ascorbico dall'ossidazione da parte dell' H_2O_2 e preservare, quindi questo importante antiossidante.

3.2.2 Antiossidanti non-enzimatici di natura proteica

a) Proteine che legano i metalli o complessi biologici del ferro

In presenza di metalli di transizione (prevalentemente ferro e rame) complessati con macromolecole biologiche, i prodotti di riduzione dell'ossigeno possono produrre ossidanti secondari e più reattivi, in particolare il radicale idrossilico ($\text{OH}\bullet$) (15). Per impedire che avvengano tali reazioni, il plasma umano contiene varie proteine che legano strettamente metalli e complessi biologici del ferro (Tab. 2).

La ceruloplasmina, la proteina che trasporta il rame, ha una certa attività scavenger sull' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (16), ma non sull' $\text{OH}\bullet$ (17). Tuttavia la maggiore importanza

biologica della ceruloplasmina consiste nella sua capacità di catalizzare l'ossidazione degli ioni ferrosi a ferrici (*attività ferrossidasica*), impedendo così la lipoperossidazione ferro-indotta e la reazione di Fenton.

Ceruloplasmina	Ha attività ferrossidasica; inibisce la lipoperossidazione ferro- e rame- dipendente; re-incorpora nella ferritina il ferro mobilizzato dalle proteine deputate alla sua conservazione; non reagisce direttamente con i radicali perossilici.
Transferrina	Lega il ferro o inibisce la sua partecipazione alle reazioni di lipoperossidazione e alle reazioni di Haber-Weiss catalizzate dal ferro; può legare il ferro rilasciato dalla ferritina.
Lattoferrina	Azione simile a quella della transferrina.
Albumina	Lega debolmente il rame e fortemente il ferro: il rame legato all'albumina ha ancora attività redox e può partecipare a reazioni di tipo Fenton, dando origine all'OH•.
Emopessina	Elevata affinità per l'eme; inibisce la lipoperossidazione eme-dipendente. Transferrina ed aptoglobina non inibiscono la lipoperossidazione catalizzata da eme.

Aptoglobina	Lega l'emoglobina libera (Hb) e la meta-Hb impedendo che queste proteine catalizzino la lipoperossidazione. La transferrina e l'emopessina non inibiscono la lipoperossidazione mediata da Hb.
--------------------	--

Tab. 2: proteine plasmatiche che legano metalli o complessi biologici del ferro impedendo la loro partecipazione a reazioni radicaliche.

Inoltre, la ceruloplasmina inibisce anche la lipoperossidazione rame-dipendente probabilmente proprio grazie alla sua capacità di legare il rame.

La maggior parte del ferro presente nel plasma umano è legato alla transferrina. Una potenziale fonte di ferro cataliticamente attivo nel plasma umano, tuttavia, è rappresentato dalla ferritina (18). Tale proteina ubiquitaria, è normalmente considerata una proteina intracellulare, ma può essere determinata anche nel plasma di soggetti sani adulti apparentemente non anemici (19). La mobilizzazione del ferro dalla ferritina richiede un riducente di piccole dimensioni quale l' $O_2^{\bullet -}$ rilasciato in circolo dai fagociti attivati. Samokyszyn e coll. (20) hanno dimostrato che la lipoperossidazione è ferritina-dipendente ed è completamente inibita dalla ceruloplasmina che re-incorpora il ferro mobilizzato dalla ferritina.

Inoltre, è stato dimostrato che anche la apotransferrina e la apolactoferrina possono sequestrare il ferro rilasciato dalla ferritina inibendo significativamente la lipoperossidazione ferritina-dipendente (21).

La lattoferrina, un'altra proteina legante il ferro, che si ritiene derivi dai granuli secondari dei polimorfonucleati (PMN), è presente in piccole quantità nel plasma di soggetti sani (22). La transferrina parzialmente saturata e la lattoferrina forniscono un'ulteriore protezione contro la lipoperossidazione ferritina-dipendente.

Come gli ioni rame e ferro liberi, anche l'Hb e l'eme liberi possono potenzialmente partecipare a reazioni radicaliche sia direttamente, sia mediante il release di ferro (12). Sebbene presenti in quantità limitate nei soggetti sani, questi complessi biologici del ferro possono essere rilasciati in circolo durante l'emolisi intravasale che accompagna le emorragie ed alcune malattie che implicano emoglobinopatie o stress meccanici agli eritrociti.

Condizioni di stress ossidativo possono portare alla formazione di meta-Hb, in cui il ferro-eme e la globina si dissociano piuttosto velocemente, rilasciando eme libero in circolo. Nello spazio extracellulare, l'Hb e l'eme vengono immediatamente legati, rispettivamente, dall'aptoglobina e dall'emopessina. I complessi così formati vengono rimossi dal circolo dal fegato e selettivamente captati dalle cellule del parenchima epatico dove l'eme viene degradato a bilirubina.

b) Gruppi sulfidrilici delle proteine

L'albumina umana possiede specifici siti di legame per un vasto numero di ligandi, inclusi gli acidi grassi, il rame ed i tetraidropirroli (23). Sebbene

normalmente l'albumina non inibisca le reazioni radicaliche mediate dal ferro, essa fornisce un'ulteriore protezione contro le ossidazioni mediate dal rame e dall'eme. La struttura altamente stabile dell'albumina umana è dotata di 17 ponti disolfuro; si pensa che i rimanenti residui di cisteina contribuiscano significativamente ai sulfidrili che reagiscono con i radicali perossilici.

In sintesi, le difese antiossidanti fornite dalle proteine plasmatiche sono correlate alla loro capacità di prevenire le reazioni radicaliche catalizzate dagli ioni metallici.

3.2.3 Antiossidanti non enzimatici

Nonostante l'apparente carenza di difese enzimatiche contro le ROS, il plasma umano contiene piccole molecole antiossidanti altamente efficienti che proteggono importanti molecole target dal possibile danno di tipo ossidativo (Tab. 3).

Antiossidanti	Concentrazione plasmatica (μM)
Idrosolubili	

Glucosio	4500
piruvato	30-70
acido urico	160-450
acido ascorbico	30-150
bilirubina	5-20
GSH	<2
Liposolubili	
α -tocoferolo	15-40
ubichinolo-10	0,4-1,0
licopene	0,5-1,0
β -carotene	0,3-0,6
luteina	0,1-0,3
zeaxantina	0,1-0,2
α -carotene	0,05-0,1

Tab. 3: antiossidanti non enzimatici nel plasma umano

a) Antiossidanti idrosolubili

E' noto da tempo che l'acido ascorbico, o vitamina C, è essenziale per la protezione dallo scorbuto. L'attività anti-scorbuto della vitamina C consiste nel suo ruolo di cofattore nelle reazioni di idrossilazione coinvolte nella biosintesi di legami crociati stabili nel collagene.

Questa ed altre funzioni metaboliche dell'acido ascorbico derivano dal suo forte *potenziale riducente*. Questa stessa proprietà ne fa un eccellente antiossidante, dotato di attività scavenger nei confronti di diversi ossidanti quali, per es., $O_2^{\bullet}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ e ossigeno singoletto (24). Durante la sua azione antiossidante, l'acido ascorbico va incontro ad una ossidazione a 2 elettroni con formazione dell'*acido deidroascorbico* e di un *radicale ascorbile* intermedio, relativamente non reattivo.

L'acido deidroascorbico è relativamente instabile e si idrolizza facilmente in acido dichetoglutarico, ma negli eritrociti ed in altre cellule può nuovamente essere ridotto.

Sia l'acido ascorbico che il deidroascorbico sono biologicamente attivi.

Sebbene l'acido ascorbico sia presente nella fase acquosa dei liquidi extra- e intra-cellulari, esso può proteggere i lipidi delle lipoproteine e le biomembrane dal danno perossidativo intercettando direttamente gli ossidanti generati nella fase acquosa, prima che possano attaccare i lipidi. Nonostante l'acido ascorbico sia in grado di agire in maniera sinergica con l' α -tocoferolo legato alle membrane, non agisce in maniera efficace sui radicali lipidici all'interno delle membrane.

L'acido urico è un efficiente *scavenger* di radicali ed è stato proposto che l'aumento della vita media verificatosi nel corso dell'evoluzione umana potrebbe essere parzialmente dovuto all'azione protettiva fornita dall'acido urico presente nel plasma umano (25). Oltre ad agire come scavenger diretto dei ROS, è stato dimostrato che l'acido urico, a concentrazioni fisiologiche, stabilizza l'acido

ascorbico (26), probabilmente mediante la formazione di un complesso di coordinazione stabile con i ferro-ioni (27).

La bilirubina era normalmente considerata solo come un inutile prodotto di scarto del catabolismo, fino a quando nel 1954 fu suggerito per la prima volta che essa potesse anche possedere attività antiossidante (28). Oltre all'acido ascorbico, all'acido urico e alla bilirubina, il plasma umano contiene glucosio (4-5 mM) e piruvato (30-80 μ M), metaboliti che possono reagire con i radicali $\bullet$ OH e con l' H_2O_2 (29, 30). L'attività antiossidante del glucosio e del piruvato può risultare importante nelle colture cellulari, tuttavia il ruolo fisiologico non è ancora stato testato *in vivo*. Forse è più importante sottolineare che, comunque, il glucosio serve come fonte di energia per la produzione di equivalenti riducenti nei globuli rossi.

Il GLUTATIONE (L-glutatione) è il più potente ed importante fra gli antiossidanti prodotti dall'organismo.

Il glutatione è una **combinazione dei tre aminoacidi** (tripeptide) cisteina, acido glutammico e glicina.

Combatte l'invecchiamento attraverso 2 vie principali : l'intestino ed il sistema circolatorio.

E' un potente antiossidante, cioè un disattivatore di radicali liberi con una spiccata azione anti-invecchiamento, protegge le cellule, i tessuti e gli organi del corpo riuscendo a mantenerlo giovane.

Il glutathione ha, inoltre, una **grande capacità disintossicante** grazie alla sua facoltà di chelare i metalli pesanti e tossici quali piombo, cadmio, mercurio ed alluminio; li trasporta via eliminandoli dal corpo.

In alcuni studi fatti sugli animali è stata dimostrata un'azione antitumorale del L-glutathione.

Il glutathione aiuta il fegato a disintossicarsi ed a prevenire possibili danni causati dall'eccessivo consumo di alcool.

E' più efficace della vitamina C nel migliorare l'utilizzo e la biodisponibilità del ferro, neutralizzando gli effetti tossici di alcuni agenti esogeni come i nitriti, nitrati, clorati, derivati del benzolo, derivati del toluolo, anilina etc.

Questi elementi danneggiano l'organismo con un meccanismo insidioso: producono un'ossidazione del ferro trasformandolo dalla sua naturale forma ferrosa (Fe^{2+}) nella forma ferrica (Fe^{3+}) rendendo così il sangue incapace di trasportare l'ossigeno, causando inoltre un aumento della meta-emoglobina (dal 1/2% fino ad un livello a volte mortale del 20/30%). Il processo di compromissione dell'emoglobina porta ad una sindrome ipossica che causa la morte di tutte le cellule per asfissia, compresi i linfociti T4.

Inoltre, il glutathione migliora l'utilizzo degli aminoacidi cisteina e cistina, ed infine inibisce in tutto o in parte i dannosi effetti collaterali dovuti ad un'esposizione ad alte dosi di radiazioni, chemioterapia e raggi X.

Elimina i radicali liberi che si formano dalla perossidazione dei lipidi che, causando la rottura di certe membrane, hanno un impatto negativo su DNA ed RNA e di conseguenza determinano distorsioni cellulari e disfunzioni biochimiche.

Il glutathione impedisce inoltre che i radicali liberi si leghino alle proteine fibrose del corpo, evitando così l'indurimento e il restringimento del collagene (e quindi rughe, mancanza di elasticità nelle arterie etc.).

Per questo motivo il glutathione mantiene sano e "giovane" il sistema circolatorio e protegge dagli effetti dannosi del fumo, insieme ad altri **antiossidanti**.

Protegge il sistema immunitario: quando passano gli anni il livello del glutathione presente nel nostro organismo diminuisce. Aumentando il livello del glutathione possiamo ringiovanire il sistema immunitario.

Diverse documentazioni sono state inviate in visione alle commissioni mediche e ministeriali per prendere atto dell'importanza di utilizzare il glutathione nel trattamento di diverse malattie, tra cui i tumori e l'AIDS.

In sintesi, il plasma umano è dotato di numerosi composti idrosolubili che reagiscono rapidamente con vari ossidanti.

b) antiossidanti liposolubili

Agli inizi degli anni 80 cominciò ad essere riconosciuto il ruolo dell' α -tocoferolo e del β -carotene come antiossidanti plasmatici liposolubili in grado di interrompere le reazioni radicaliche a catena (31, 32).

Anche l'Ubichinolo-10 (coenzima Q-10 ridotto) è un efficace antiossidante liposolubile plasmatico, anche se la sua capacità è ancora sottostimata. Esso è in grado di svolgere attività scavenger sui radicali lipoperossilici con una efficienza leggermente superiore a quella dell' α -tocoferolo (33) e sembra sia in grado di ripristinare l' α -tocoferolo legato alla membrana dal radicale α -toferile (34). L'ubichinolo-10 è distribuito in tutte le lipoproteine e, nel plasma di soggetti sani il 60-80% circa è nella forma ridotta, quindi attiva (34), mentre nei pazienti affetti da malattie associate a stress ossidativo la percentuale scende al 35% (35).

3.3 IMPORTANZA RELATIVA DEI SINGOLI ANTIOSSIDANTI

Numerosi studi *in vitro* hanno rivelato che l'importanza relativa dei singoli antiossidanti nel plasma dipende dalla natura dell'ossidante e dal tipo di molecola target da proteggere contro il danno ossidativo. Inoltre, si deve distinguere tra l'importanza quantitativa (che dipende dalla concentrazione plasmatica

dell'antiossidante e dal numero di molecole di ossidante “spazzate”) e l'importanza qualitativa (che dipende sia dalla sua concentrazione plasmatica, che dalla velocità di reazione con l'ossidante rispetto a quella dell'ossidante con la molecola target).

Alcuni Autori hanno misurato la capacità del plasma umano di “intrappolare” i radicali perossilici ed hanno introdotto il concetto di valore TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter) del plasma quale potenziale indicatore dello *status* antiossidante di una persona (36, 37). Il TRAP del plasma di un individuo sano è pari a circa 820 μM , il che indica che vengono “spazzati” 820 μmoli di radicali perossilici/litro di plasma. Il TRAP rappresenta, quindi, la somma delle capacità antiradicaliche dei quattro principali antiossidanti plasmatici: *acido urico*, *tioli proteici*, *acido ascorbico* e *α -tocoferolo*.

Il TRAP risulta significativamente abbassato nei soggetti affetti da artrite reumatoide, mentre nei neonati è più elevata che negli adulti sani, probabilmente per il più elevato contenuto in acido ascorbico e bilirubina (38).

Il TRAP, tuttavia, non fornisce alcuna indicazione qualitativa. Alcuni Autori (39) hanno osservato che la sequenza del consumo in antiossidanti plasmatici è: tioli proteici > acido urico > α -tocoferolo. Ciò indica che questi antiossidanti hanno una differente reattività verso i radicali perossilici e che gli antiossidanti plasmatici formano diverse linee di difesa. E' stato inoltre dimostrato che l'acido ascorbico è il solo antiossidante endogeno plasmatico che può proteggere tutte le classi di lipidi dai danni ossidativi (40, 41). Quando si utilizza un generatore di radicali

liposolubile invece che idrosolubile, l' α -tocoferolo diventa la prima linea di difesa antiossidante, insieme con l'acido ascorbico (41); appena l'acido ascorbico viene completamente depletato, la bilirubina legata all'albumina si ossida.

La lipoperossidazione contribuisce al consumo di α -tocoferolo; questa vitamina previene la propagazione della perossidazione lipidica (una volta che questa è iniziata) reagendo con i radicali lipoperossilici (LOO•), mentre l'acido ascorbico previene l'iniziazione della lipoperossidazione agendo sui radicali della fase acquosa, prima che possano diffondere nei lipidi plasmatici.

Dai valori riportati in Tab. 3 è evidente che, quantitativamente, l' α -tocoferolo è responsabile della maggior parte della capacità antiossidante del plasma perchè è presente in concentrazioni 15 volte più alte di quelle degli altri antiossidanti lipidici.

3.4 INTERAZIONI TRA PICCOLE MOLECOLE

ANTIOSSIDANTI

Oltre ad agire direttamente sui radicali, alcuni degli antiossidanti non enzimatici possono anche interagire tra loro. E' stato da tempo suggerito che *in vivo* esiste una interazione cooperativa tra la vitamina C, idrosolubile, ed i tocoferoli liposolubili (42); è stato, infatti, dimostrato che l'acido ascorbico presente nella fase acquosa può ridurre il radicale tocoferilico mediante una reazione di trasferimento di idrogeno che rigenera la vitamina E. *In vitro* è stata osservata una interazione altamente efficiente tra vitamina E legata alle membrane

e bilirubina coniugata, mentre altri antiossidanti idrosolubili, come la cisteina o il GSH, hanno scarsa attività sinergica con la vitamina E e l'acido urico nessuna (43-45). Esistono anche interazioni tra gli antiossidanti idrosolubili stessi; per es., l'acido deidroascorbico è ridotto in maniera non enzimatica ad acido ascorbico dal GSH, specialmente in condizioni leggermente acide (46) e l'acido ascorbico può rigenerare l'acido urico dalla sua forma radicalica (47). Nonostante i livelli di GSH nel plasma umano siano molto bassi, il tripeptide rappresenta il principale riducente cellulare e la rigenerazione della forma ridotta della Vitamina C nei globuli rossi può essere importante nel mantenere l'acido ascorbico plasmatico. Di contro, sembra che l'acido ascorbico plasmatico sia ossidato sempre prima dell'acido urico, per cui la rigenerazione dell'acido urico da parte della vitamina C probabilmente non è di rilevanza fisiologica.

In sintesi, il plasma contiene una varietà di molecole antiossidanti che possono proteggere lipidi, proteine e cellule circolanti, così come le cellule dell'endotelio vascolare dal danno ossidativo. Gli *antiossidanti enzimatici* sono presenti solo in *piccole quantità* nel plasma. Al contrario, proteine la cui principale funzione è correlata al trasporto o alla conservazione di ioni rame e ferro, forniscono protezione antiossidante sequestrando questi metalli di transizione in forme incapaci di dare il via a reazioni radicaliche e, insieme a diverse piccole molecole ad attività antiossidante, sono in grado di proteggere efficacemente sia lipidi, proteine e cellule circolanti, sia le cellule endoteliali vasali dai danni di tipo ossidativo.

CAPITOLO 4

4.1 RELAZIONE TRA OBESITA' E STRESS OSSIDATIVO e FINALITA DELLA TESI

Il plasma e altri fluidi biologici sono ricchi di molecole antiossidanti che possono essere suddivise in due gruppi principali: quelle che *prevengono l'inizio* e quelle che *rallentano l'avanzamento* delle reazioni a catena (48, 49).

Il primo gruppo include antiossidanti primari come la ceruloplasmina e la transferrina, che agiscono come chelanti di metalli; l'altro gruppo include le vitamine A, E e C e il glutathione ridotto, che agiscono riducendo la propagazione delle reazioni radicaliche a catena. Inoltre, il plasma contiene anche antiossidanti non ancora caratterizzati che possono contribuire a contrastare lo stress ossidativo. Nei sistemi biologici, per valutare in maniera adeguata lo stress ossidativo, è necessario effettuare una serie di misurazioni. Poiché lo stato antiossidante del plasma umano è dinamico e può essere influenzato da diversi fattori, inclusi la dieta, l'esercizio fisico e alcune patologie, il rapporto tra *potere antiossidante non proteico* del plasma ed i livelli di *nitriti e nitrati*, *lipidi idroperossidi* e *gruppi tiolici* riflette meglio il reale stato di stress ossidativo e, in generale, la condizione di salute.

Numerosi risultati suggeriscono il ruolo patologico dei radicali liberi in una grande varietà di malattie, tra le quali le più importanti sono aterosclerosi, infiammazioni croniche, cancro e diabete (50, 51).

L'OBESITA' rappresenta un fattore di rischio per l'*aterosclerosi*; questo rischio è in parte attribuito all'iperlipidemia, all'ipertensione arteriosa e al diabete mellito insulina-indipendente che spesso si accompagnano all'obesità, tuttavia, anche l'obesità di per se stessa è un fattore di rischio (52-54).

Questo diretto effetto aterogenico dell'obesità potrebbe essere dovuto a diversi meccanismi:

1. insulino-resistenza/iperinsulinemia (55, 56);
2. alterazioni nell'equilibrio tra coagulazione e fibrinolisi, a causa dell'iperproduzione di Inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (57) e di fattori tissutali secreti dal tessuto adiposo (58);
3. eccesso di citochine pro-infiammatorie secrete dal tessuto adiposo, come il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) e l'interleukina-6 (59-61);
4. stimolazione del sistema renina-angiotensina (62) che partecipa all'aterogenesi (63).

E' interessante sottolineare che, tuttavia, si sa poco circa l'effetto dell'obesità sull'equilibrio tra ossidanti ed antiossidanti; inoltre, i radicali liberi giocano un ruolo importante nella patogenesi di altre complicazioni associate all'obesità, quali il diabete mellito, la disfunzione endoteliale, l'ipertensione arteriosa e l'infarto cardiaco (64). Tuttavia, le relazioni tra stress ossidativo, infiammazione ed obesità (insieme ai disordini metabolici ad essa associati) sono ancora oggetto di discussione. Recentemente è stato dimostrato che la prevalenza di obesità è correlata ad una diminuzione degli antiossidanti plasmatici (65), che

l'accumulo di grassi è in relazione con i markers di stress ossidativo (66-68), che lo stress ossidativo è correlato all'indice di massa corporea (BMI) (69, 70) e che, infine, l'obesità può essere classificata come una situazione di infiammazione cronica (71).

De Lorenzo et al. (72) hanno recentemente identificato una categoria di donne metabolicamente obese, ma normo-peso, che presentano un rischio di andare incontro a sindrome metabolica e a malattie cardiovascolari (CVD) potenzialmente elevato, nonostante il loro indice di massa corporea sia normale; queste donne sono state definite *obese normo-peso* (NWO).

La presente tesi di dottorato ha avuto come scopo la valutazione dei livelli di lipidi idroperossidi, di nitriti e nitrati, di gruppi tiolici, e la capacità antiossidante non proteica nel plasma di soggetti NWO ed obesi al fine di verificare la correlazione tra grado di obesità e *status* antiossidante.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 SELEZIONE DEI SOGGETTI

La ricerca è stata condotta su 60 donne italiane (età 20-35 anni), selezionate tra 3000 volontarie sane. In accordo con i criteri del National Cholesterol Education Program (NCEP) (73), sono stati identificati 3 gruppi:

1. 20 donne normo-peso con $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$ (controlli non obesi);
2. 20 donne normo-peso con $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$ e massa grassa (FM%) $> 30\%$ (NWO);
3. 20 donne obese con $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$, massa grassa (FM%) $> 30\%$.

Il gruppo NWO è stato distinto dalle donne controllo adottando criteri di classificazione della percentuale di FM valutata mediante Dual X-ray Assorbimetria (DXA). I criteri di esclusione sono stati: ipertensione, disturbi cardiovascolari, alcoolismo, fumo e assunzione di farmaci.

5.1.1 Misure antropometriche

I parametri antropometrici di tutte le partecipanti sono stati misurati secondo i metodi standard (peso corporeo, altezza e circonferenza vita (74, 75). Il peso corporeo è stato misurato usando una bilancia con scala da 0,1 Kg; l'altezza (in metri) è stata misurata con un'approssimazione di 0,1 cm; la circonferenza vita è

stata misurata con un metro flessibile, con un'approssimazione di 0,5 cm. L'indice di massa corporea è stato calcolato usando la formula:

$$\text{BMI} = \text{peso corporeo (kg)} / \text{altezza}^2 \text{ (metri)}$$

5.1.2 Dual X-ray Assorbimetria (DXA)

La composizione corporea totale è stata esaminata mediante una scansione total body effettuata mediante DXA (Lunar DPX, Medical System, USA) su soggetti posti in posizione supina. Il tempo totale di scansione è stato pari a 20 min, con una esposizione totale alle radiazioni pari a <8SV (72).

5.2 PRELIEVO DEI CAMPIONI DI SANGUE

Il sangue venoso eparinizzato è stato raccolto dopo una notte a digiuno. Il plasma è stato separato dalla sospensione eritrocitaria mediante centrifugazione a 800 g per 10 minuti. I campioni di plasma sono stati immediatamente analizzati per la valutazione dei gruppi tiolici e dei lipidi idroperossidi. Le aliquote di plasma destinate alla determinazione dei livelli dei nitriti-nitrati e della capacità antiossidante non proteica sono stati congelati a -80° C ed analizzati entro 3 giorni.

5.3 CAPACITA' ANTIOSSIDANTE NON PROTEICA

La capacità antiossidante non proteica del plasma è stata valutata misurando la sua capacità scavenger sui radicali liberi. L'anione superossido è stato generato

in vitro come descritto da Russo et al. (76). La miscela di reazione conteneva, in un volume totale di 1 ml: tampone trietanolammina-dietanolammina 100 mM (pH 7.4), 3 mM NADH, 25 mM EDTA, 12.5 mM MnCl_2 , 10 mM β -mercapto-etanolo ed estratto etanologico corrispondenti a 80 μl di plasma. Dopo un'incubazione di 20 min. a 25°C, il decremento di assorbanza a $\lambda=340$ nm è stato misurato spettrofotometricamente. I risultati sono stati espressi come percentuale di inibizione dell'ossidazione del NADH.

5.4 DETERMINAZIONE DEL GLUTATIONE

Il glutatione non è direttamente misurabile ma è stato assimilato ai gruppi tiolici non-proteici dei quali rappresenta oltre il 90%. I gruppi tiolici non-proteici sono stati misurati in 200 μl di plasma usando un'analisi spettrofotometrica a $\lambda=412$ nm basata sulla reazione dei gruppi tiolici con l'acido 2,2'-ditio-bis-dinitrobenzoico (77).

I risultati sono stati espressi come μ moli di gruppi tiolici/ml di plasma, utilizzando un coefficiente di estinzione molare (ϵ_M)=13.600.

5.5 DETERMINAZIONE DEI NITRITI E NITRATI

I livelli di nitriti e nitrati sono stati determinati con un metodo spettrofotometrico a $\lambda=540$ nm basato sulla reazione di diazocopolazione dei nitriti con il reattivo di Griess (78). Il plasma è stato filtrato su membrane di

cellulosa (10.000 PM) a 10.000 g per un'ora a temperatura ambiente per rimuovere proteine ed emoglobina. Secondo la metodica utilizzata, 50 μ l di plasma ultrafiltrato sono stati incubati per 30' a 25°C in tampone fosfato (50 mM pH 7.4) con NADPH (50 μ M) e Nitrato Reduttasi (60 mU). Per rimuovere l'eccesso di NADPH, che potrebbe interferire con il reattivo di Griess, i campioni sono stati trattati con piruvato (5 mM) e lattico deidrogenasi (1U). Dopo dieci minuti, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 250 μ l di reattivo di Griess.

I risultati sono stati espressi come μ moli di nitriti e nitrati/ml di ultrafiltrato, utilizzando per la retta di calibrazione, concentrazioni note di nitriti e nitrati (da 0,1 μ moli a 20 μ moli).

5.6 LIVELLI DI LIPIDI IDROPEROSSIDI

I livelli di lipidi idroperossidi sono stati valutati misurando l'ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} in presenza xilenolo arancio (79). I lipidi idroperossidi (LOOH) ossidano il Fe^{2+} a Fe^{3+} in soluzione acida e questi ultimi, in presenza di xilenolo arancio, formano un complesso Fe^{3+} - xilenolo arancio, che assorbe a $\lambda = 560$ nm.

La miscela di reazione conteneva, in un volume totale di 1 ml: 50 μ l di plasma, xilenolo arancio 100 μ M, solfato ferroso ammonico 250 μ M, metanolo al 90%, idrossitoluene butilato 4 mM, H_2SO_4 25mM. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, l'assorbanza a $\lambda = 560$ nm è stata misurata spettrofotometricamente. I risultati sono stati espressi in nmoli di LOOH/ml

plasma, utilizzando, per la retta di calibrazione, concentrazioni note di H_2O_2 (0,2-20 μM).

CAPITOLO 6

RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 RISULTATI

I dati conseguiti in seguito alle determinazioni effettuate nella presente ricerca hanno messo in evidenza una significativa diminuzione della capacità antiossidante non proteica nel plasma dei soggetti NWO ($75\% \pm 4$) rispetto ai soggetti controllo ($99\% \pm 2$); la riduzione è risultata ancora più accentuata nelle donne obese ($54\% \pm 5.5$) (Fig. 2).

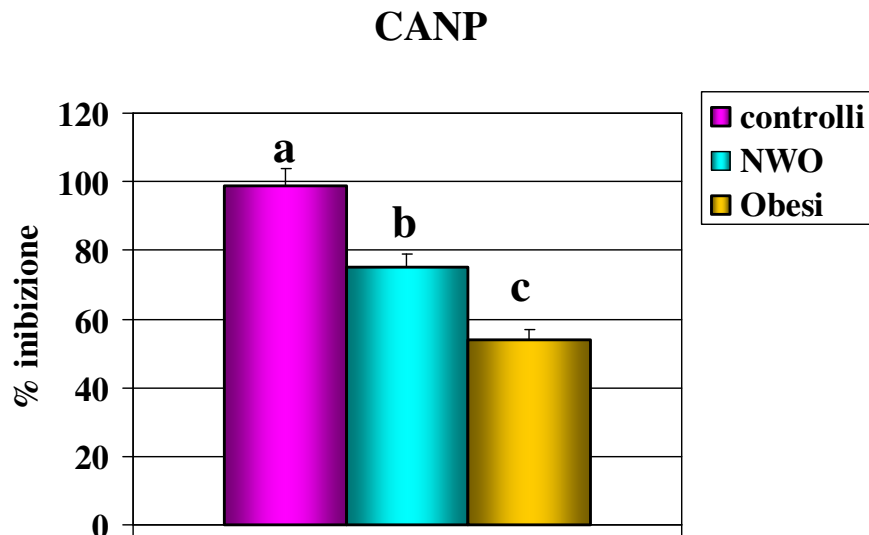


Fig. 2 - Capacità antiossidante non proteica nel plasma di soggetti normo-peso (controlli), di soggetti obesi normo-peso (NWO) e di soggetti obesi. I risultati sono la media $\pm$ D.S. di 3 determinazioni per soggetto ($p < 0,001$ vs controlli).

Tale ridotta capacità antiossidante è in parte attribuibile alla diminuzione dei livelli plasmatici di GSH; infatti è stata riscontrata una significativa riduzione della concentrazione di GSH nel plasma delle donne obese ($0,43 \pm 0,0387$) e NWO ($0,44 \pm 0,047$) rispetto al gruppo di controllo ($0,56 \pm 0,050$) (Fig. 3).

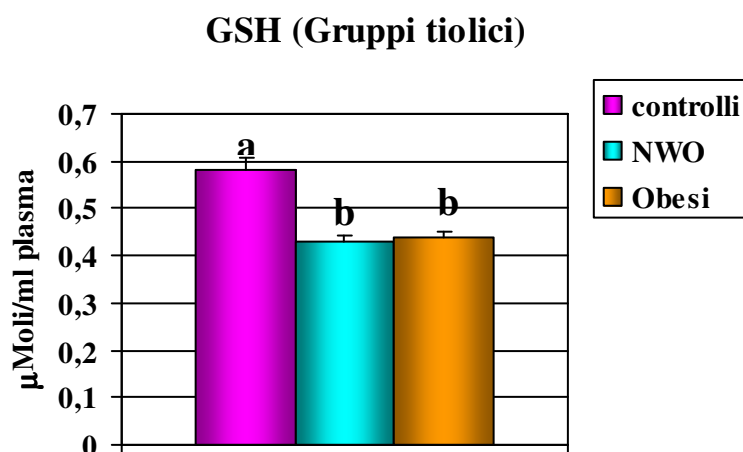


Fig. 3 - GSH (Gruppi tiolici non proteici) nel plasma di soggetti normo-peso (controlli), di soggetti obesi normo-peso (NWO) e di soggetti obesi. I risultati sono la media $\pm$ D.S. di 3 determinazioni per soggetto (lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,001$).

In accordo con tali diminuite difese antiossidanti, i livelli di lipidi idroperossidi plasmatici erano significativamente aumentati nel gruppo obeso ($71,50 \pm 6,94$) e NWO ($66,76 \pm 4,73$) rispetto ai controlli ($38,61 \pm 1,94$) (Fig. 4).

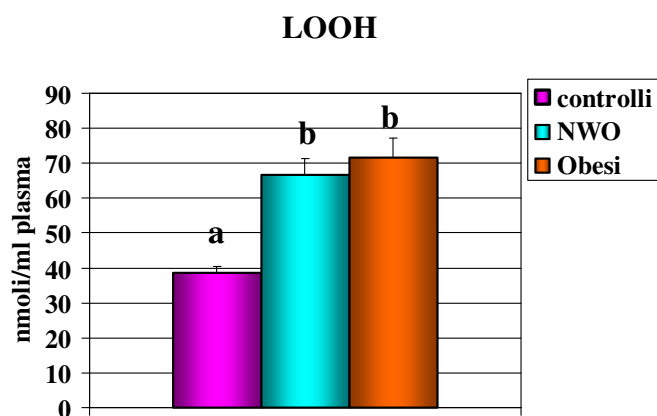


Fig. 4 - Concentrazione di lipidi idroperossidi nel plasma di soggetti normo-peso (controlli), di soggetti obesi normo-peso (NWO) e di soggetti obesi. I risultati sono la media $\pm$ D.S. di 3 determinazioni per soggetto (lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,001$).

In Fig. 5 sono riportati i risultati riguardanti la determinazione dei livelli plasmatici di nitriti e nitrati. Come si può osservare, le concentrazioni plasmatiche di NO₂-/NO₃- sono più basse nelle obese (63,09 ± 4,41) e NWO (66,43 ± 3,98) rispetto al gruppo al controllo (91,94 ± 4,6).

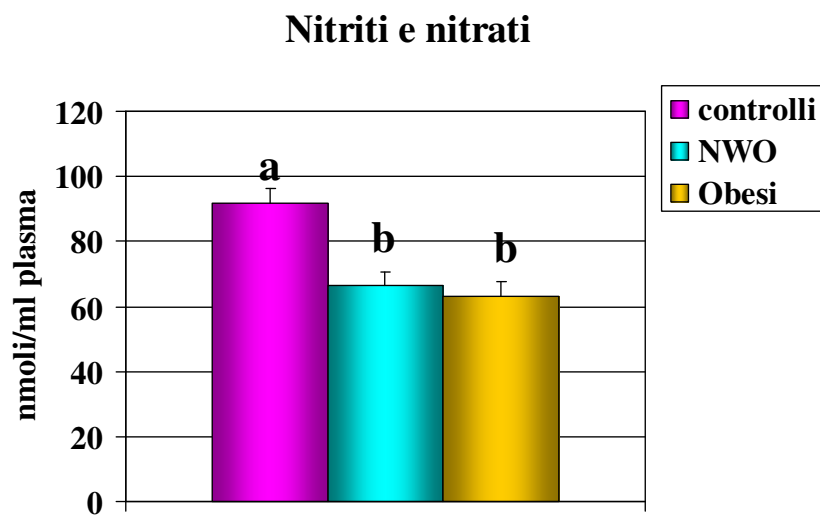


Fig. 5 Livelli di nitriti e nitrati nel plasma di soggetti normo-peso (controlli), di soggetti obesi normo-peso (NWO) e di soggetti obesi. I risultati sono la media ± D.S. di 3 determinazioni per soggetto (lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,001$).

6.2 DISCUSSIONE

Per lungo tempo ritenuto un tessuto metabolicamente inerte e semplicemente deputato ad immagazzinare energia, il tessuto adiposo negli ultimi anni ha assunto una sempre crescente importanza metabolica dovuta alle sue funzioni pleiotropiche al punto da essere definito da Cinti et al. (80) come *organo adiposo*. Infatti, oltre alle ben note fondamentali funzioni di regolazione dell'omeostasi energetica, gli adipociti sono in grado di mediare molti processi fisiologici e patologici mediante la secrezione di numerose molecole nel loro complesso definite come adipocitochine. E' stato dimostrato che alcune adipocitochine, quali la leptina, ed anche fattori proinfiammatori, quali il *tumor necrosis factor* (TNF- α), le interleukine 6 (IL-6) e 1 (IL-1) hanno un ruolo fondamentale nella comparsa di molte delle co-morbidità correlate all'obesità (81-83).

I soggetti affetti da sindrome NWO, nonostante un BMI <25, presentano una massa grassa superiore al 30% ed una massa magra inferiore alla norma e nessuna evidente anomalia metabolica. In uno studio precedente De Lorenzo et. al. (72) hanno evidenziato che in tali soggetti è in atto uno stato di infiammazione sub-clinica supportato da elevati livelli di citochine proinfiammatorie. Il presente studio tesi dimostra che, in soggetti NWO, lo stato infiammatorio è accompagnato da stress ossidativo. Tale affermazione si basa sull'osservazione del fatto che tutti i parametri di stress ossidativo da noi misurati sono risultati significativamente più elevati nei soggetti NWO rispetto ai controlli.

Per quanto attiene al glutatione (GSH) la sua misurazione è fondamentale nella misurazione dello stato redox e di detossificazione dell'organismo. Una generale riduzione dei livelli di GSH è stato osservato nelle malattie cronico-degenerative (84,85) ed, in tal senso, l'obesità non sembra essere un'eccezione. Evidenze di una riduzione di GSH emergono, infatti, da studi effettuati in modelli di obesità (86,87). Chanadiri et al. (88) hanno dimostrato che un aumento di BMI è associato con una significativa riduzione del glutatione eritrocitario. I nostri dati evidenziano che i livelli di GSH dei soggetti NWO erano comparabili con quelli delle obese e significativamente inferiori ai controlli. Coerentemente con i valori di GSH anche la capacità antiossidante non proteica totale (ANPC) è risultata inferiore nelle obese e nelle NWO. Tali evidenze suggeriscono in tali soggetti una condizione di stress ossidativo sistematico. Ad ulteriore supporto di quanto appena affermato si pongono i dati relativi ai lipidi-idroperossidi (LOOH). La perossidazione dei lipidi è un ben conosciuto esempio di danno ossidativo delle membrane cellulari e di altre strutture contenenti lipidi. Modificazioni perossidative di fosfolipidi insaturi, glicolipidi e colesterolo possono avvenire in reazioni innescate da specie radicaliche (radicali ossilici, perossilici idrossilici) e da specie non radicaliche (ossigeno singoletto, ozono e perossinitriti) generate dalla reazione del superossido con l'ossido nitrico (89). Gli LOOH, la cui quantificazione fornisce importanti informazioni sullo stato ossidativo degli obese (90,91) possono risultare seriamente deleteri per le cellule perturbandone la struttura e la funzione delle membrane. Negli stati di infiammazione cronica gli

LOOH sono anche considerati agenti procarcinogeni (92). La relazione tra gli LOOH e l'infiammazione è stata approfonditamente discussa in diversi studi (93-96). I nostri dati aggiungono evidenza a tale relazione.

Per quanto specificatamente attiene i livelli plasmatici di $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ diversi studi hanno evidenziato come negli obesi vi sia una funzione endoteliale ridotta (97) associata al ruolo fondamentale esercitato dai NO_x (98). La concentrazione plasmatica dei metaboliti dell'ossido nitrico (NO) rappresenta un sensibile marker di stress ossidativo. Anche in considerazione del fatto che $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ possono anche agire come scavenger di radicali dell'ossigeno (99,100), la riduzione dei loro livelli plasmatici potrebbe essere dovuto allo stress ossidativo cronico tipico dell'obesità e delle sue co-morbidità. Tuttavia, l'elevata produzione di ROS può spiegare la deplezione di $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ anche in un altro modo: nei soggetti sani, L'effetto dell'insulina sull'endotelio è mediato dai recettori propri dell'insulina e dalle sue vie di segnalazione che si traducono in un aumentato release di NO (90). E' stato dimostrato che la condizione di insulino-resistenza, fortemente presente negli obesi, è la causa di una drastica riduzione nella disponibilità di NO (101) ed i ROS sono stati recentemente proposti come mediatori della compromissione della vasodilatazione indotta da insulina delle arterie coronarie (102).

Nel presente studio, i livelli plasmatici di $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ riscontrati nelle donne obese e NWO sono risultati inferiori rispetto a quelli determinati nel plasma del gruppo di controllo, confermando quindi i risultati di Konukoglu et al (103). Inoltre, è importante sottolineare che nei soggetti NWO, nonostante il normale

BMI, si riscontra frequentemente un'elevata frequenza di obesità viscerale che recentemente è stata correlata a disfunzioni nel pathway dell'NO (104).

La condizione di insulino-resistenza tipica dell'obesità determina una cronica riduzione della biodisponibilità di NO (102,105,106). In modelli animali di obesità le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono state proposte come mediatori della ridotta capacità vaso-dilatatoria indotta dall'insulino-resistenza nelle coronarie di ratti (107).

Nell'obeso sono altamente frequenti i fattori di rischio per l'aterosclerosi.

Numerosi studi hanno messo in evidenza la correlazione tra obesità e aterosclerosi, sottolineando il ruolo essenziale svolto dallo stress ossidativo nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi nell'uomo.

L'aumentata produzione di ROS ed il relativo stress ossidativo associati all'obesità potrebbero quindi essere responsabili dell'aumentato danno ossidativo a carico di lipidi e proteine e, quindi dell'aterosclerosi e delle malattie ad essa associate. Recentemente è stato, infatti, dimostrato che l'accumulo di grassi è strettamente correlato all'aumento di markers sistemici di stress ossidativo e che l'obesità potrebbe essere classificata come una situazione di infiammazione cronica (66-68).

I dati ottenuti in questa ricerca confermano che l'alterazione fra produzione e rimozione di specie radicaliche si verifica non solo nei soggetti obesi, ma anche in condizioni di "pre-obesità"; nel plasma di donne normo-peso, ma classificabili come obese in base alla distribuzione della massa grassa, è stato infatti riscontrato

un significativo aumento dei lipidi idroperossidi; l'aumento di questi noti markers di stress ossidativo era accompagnato da un'altrettanto significativa diminuzione delle capacità antiossidanti non proteiche e dei livelli di GSH, suggerendo una condizione di stress ossidativo sistemico sub-cronico.

Nel loro insieme I nostri dati dimostrano che i valori dei markers di stress ossidativo nei soggetti NWO sono intermedi tra quelli dei sani e quelli degli obesi, ma mediamente più vicini a questi ultimi. Ciò suggerisce chiaramente che lo stress ossidativo può essere una diretta conseguenza della attività metabolica della massa grassa. Ovviamente non si può escludere che nei soggetti NWO, al pari che negli obesi, lo stress ossidativo possa essere il risultato di uno sbilanciamento tra le difese antiossidanti endogene e quelle esogene, riconducibile ad abitudini alimentari tendenti, nei suddetti soggetti, a preferire alimenti ad alta densità calorica ad alimenti quali frutta e verdura ricchi di antiossidanti naturali (vitamine, polifenoli e microelementi) (108). A prescindere dalla causa rimane evidente il fatto che, nel presente studio, i soggetti NWO si trovavano in evidente stress ossidativo quantitativamente comparabile a quello degli obesi. Tale osservazione, di per sé, non è sorprendente. Infatti, l'obesità, oltre ad uno stato infiammatorio generale (109), determina un cronico aumento dei ROS ed una diminuzione delle difese antiossidanti cellulari. Al riguardo è stato recentemente osservato che l'obesità è correlata ad una riduzione della concentrazione degli antiossidanti plasmatici (110,111) e che la massa grassa (112-114) ed il BMI (115-116) sono strettamente correlati con i biomarkers di stress ossidativo. Per queste ragioni lo

stress ossidativo è stato proposto come l'anello di congiunzione tra l'obesità e lo sviluppo delle malattie cardiovascolari, dell'aterosclerosi e dell'insulino-resistenza (117). Al riguardo sono state elaborate diverse teorie. E' stato proposto che la produzione di ROS nell'obesità sia dovuto ad iperglicemia, malfunzionamento dei mitocondri ed alterazione degli enzimi del sistema redox (118). Secondo Bakker et al. (119) l'eccessiva accumulazione di trigliceridi negli adipociti porterebbe ad una elevata produzione di radicale superossido dovuta ad una inibizione del trasporto dell'adenosina nella catena di trasporto degli elettroni. Coppack (120) suggerisce che l'eccessiva adiposità *per se* è una fonte di stress ossidativo, dato che gli adipociti ed i preadipociti producono cospicue quantità di adipocitochine pro-infiammatorie, le quali, oltre a fungere da potente stimolo per la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS) e (NOS) da parte dei macrofagi e dei monociti, sono anche in grado di stimolare l'attività di enzimi generatori di ossidanti quali il NAD(P)H-ossidasi, la NOS-inducibile e la mieloperossidasi. Peraltro, nei soggetti obesi la produzione di ROS è anche sostenuta dai leucociti (121). A prescindere dalla loro genesi, l'elevato livello di ROS/NOS tipico dell'obesità può, a sua volta essere responsabile dell'ossidazione dei lipidi di membrana, delle lipoproteine (LDL) e del DNA. Secondo Musaad and Haynes (122) nei soggetti obesi si innesca un circolo vizioso *infiammazione-stress ossidativo*, dove lo stress ossidativo, mediante l'espressione abnorme di citochine infiammatorie, promuove l'infiammazione ed è, a sua volta, incrementato dall'infiammazione tipica dell'obesità. I dati del presente studio, se considerati

contestualmente con quelli riportati da De Lorenzo et al. (123), non solo supportano questa ipotesi ma dimostrano anche che l'innescò del circolo vizioso *infiammazione-stress ossidativo*, può avvenire in maniera asintomatica ben prima della diagnosi di sindrome metabolica. I nostri dati confermano, inoltre, come la semplice valutazione del BMI in soggetti *borderline*, quali i NWO, può condurre ad una falsa classificazione e, conseguentemente, ad una sottovalutazione del reale stato di salute. Tali soggetti presentano, pertanto, una particolare vulnerabilità in quanto inconsapevolmente esposti ai rischi correlati all'obesità ed alle sue comorbidità.

In conclusione, i risultati della presente tesi suggeriscono che nell'obesità conclamata, ma anche nella pre-obesità, quale quella dei soggetti NWO, è evidenziabile uno stato di stress ossidativo accompagnato da infiammazione che possono predisporre all'insorgenza delle co-morbidità legate all'obesità. Ne consegue l'importanza di un intervento terapeutico mirato al controllo ponderale e della massa grassa nei soggetti NWO, al pari che negli obesi, ma anche ad un efficace contrasto dello stress ossidativo mediante adeguati pattern dietetici.

Bibliografia

1. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. (1996) *J. Clin. Invest.* 97:2601–10.
2. Marklund SL. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:6634-6638.
3. Karlsson K, Marklund SL. (1989) *Lab. Invest.* 60:659-666.
4. Takahashi K, Cohen HJ. (1986) *Blood* 68:640-645.
5. Maddipati KR, Marnett LJ. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:17398-17403.
6. Frei B, Stocker R, Ames BN. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:9748-9752.
7. Terao J, Shibata SS, Matsushita S. (1988) *Anal. Biochem.* 263:2178-2186.
8. Takahashi K, Avissar N, Within J, Cohen H. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 256:677-686.
9. Broderick DJ, Deagen JT, Whanger PD. (1987) *J. Inorg. Biochem.* 30:299-308.
10. Takahashi K, Avissar N, Within J, Cohen H. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 256:677-686.
11. Avissar N, Whithin JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:15850-15855.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1986) *Arch. Biochem Biophys.* 246:501-514.
13. Frei B, Yamamoto Y, Niclas D, Ames BN. (1988b) *Anal. Biochem.* 175:120-130.
14. Link EM, Riley PA. (1988) *Biochem. J.* 249:391-399.

15. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1985) Free Radicals in Biology and Medicine. London:Oxford University Press. (Clarendon).
16. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissman. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:4040-4045.
17. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 924:408-419.
18. Thomas EL, Learn DB, Jefferson MM, Weatherred W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:2178-2186.
19. Jacobs A, Path FRC, Worwood M. (1975) *N. Engl. J. Med.* 292:951-956.
20. Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:21-26.
21. Monteiro HP, Winterbourn CC. (1988) *Biochem. J.* 256:923-928.
22. Rosenmund A, Freidli J, Bebiè H, Straub PW. (1988) *Acta Haematol.* 80:40-48.
23. Peters T. (1985) *Adv. Protein Chem.* 37:161-184.
24. Frei B, England L, Ames BN,. (1989a) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:6377-6381.
25. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:6858-6862.
26. Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P. (1985) *J. Free Radicals Biol. Med.* 1:117-124.
27. Davies KJA, Sevanian A Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. (1986) *Bioch. J.* 235:747-754.

28. Bernhard K, Ritzel G, Steiner KU. (1954) *Helv. Chim. Acta* 37:306-313.
29. Sagone AL Jr, Greenwald J, Kraut EH, bianchine J, Singh D. (1983) *J. Lab. Clin. Med.* 101:97-104.
30. O'Donnell-Tormey J, DeBoer CJ, Nathan CF. (1985) *J. Clin. Invest.* 76:80-86.
31. Burton GW, Ingold KU. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:6472-6477.
32. Burton GW, Ingold KU. (1984) *Science* 224:569-573.
33. Stocker R, Bowry VB, Frei B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1646-1650.
34. Frei B Kim MC, Ames Bn. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4879-4883.
35. Cross CE, Forte TM, Stocker R et al. (1990) *J. Lab. Clin. Med.* 115 :396-404.
36. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. (1985) *FEBS Lett.* 187:33-37.
37. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 924:408-419.
38. Linderman JHN, Van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJHM, Berger HM. (1989) *Pediatr. Res.* 26:20-24.
39. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 924:408-419.
40. Frei B, England L, Ames BN. (1989a) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:6377-6381.
41. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. (1989b) In Emerit I, Packer L. (eds) *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*, pp 155-163. London Plenum Press, England.
42. Tappel AL. (1968) *Geriatrics* 23:97-105.

43. Motoyama T, Miki M, Mino M, Takahashi M, Niki E. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 270:655-661.
44. Stocker R, Peterhans E. (1989b) *Biochim. Biophys. Acta* 1002:238-244.
45. Niki E, Saito M, Yoshikawa Y, Yamamoto Y, Kamiya Y. (1986) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59:471-477.
46. Stocker R, Hunt NH, Weidemann MJ. (1986b) *Biochim. Biophys. Acta* 881:391-397.
47. Maples KR, Mason RP. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:1709-1712.
48. Scott G. (1997) Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition. Coll House, UK, Albino Publishing, 7.
49. Porter NA. (1990) In:Vigo-Pelfrey C., Ed. Membrane lipid oxidation. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 33-38.
50. Smith CV. (1991) *Free Rad. Biol. Med.* 10:217-224,.
51. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. In:Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Eds. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Clarendon Press, 416-508.
52. Hubert HB, Feinleib M. McNamara PM, Castelli WP. *Circulation.* (1983) 67:968-977.
53. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. (1996) *Circulation* 93:1372-1379.
54. Rosengren A, Wedel H, Wilhelmsen L. (1999) *Eur. Heart J.* 20:269-277.
55. Reaven GM, Banting lecture. (1988). *Diabetes* 37:1595-1607.

56. Despres JP, Lamarche B, Mauriege P et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:952-957.
57. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. (1997) *Diabetes* 46:860-867.
58. Samad F, Loskutoff DJ. (1999) *Thromb. Haemost.* 82:742-747.
59. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF; Atkinson RL, Spiegelman BM. (1995) *J. Clin. Invest.* 95:2409-2415.
60. Winkler G, Lakatos P, Nagy Z et al. (1988) *Diabetes Care* 21:1778-1779.
61. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. (1988) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:847-850.
62. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM. J. (1988) *Clin. Endocrinol. Metab.* 83:3925-3929.
63. Oskarsson HJ, Heistad DD. (1997) *Circulation* 95:557-559.
64. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. (1992) *J. Lab. Clin. Med.* 119:598-620
65. Reitman, A., Friedrich, I., Ben-Amotz, A., and Levy, Y. (2002) *Isr. Med. Assoc. J.* 4:590-593
66. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima. Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004) *J. Clin. Invest.* 114:1752-17.

67. Urukawa, H., Katsuki, A., Sumida, Y., Gabazza, E.C., Murashima, S., Morioka, K., Maruyama, N., Kitagawa, N., Tanaka, T., Hori, Y., Nakatani, K., Yano, Y., and Adachi, Y. (2003) *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 88:4673-4676.
68. Zwirska-Korczala K, Jochem J, Rybus-Kalinowska B, Polaniak R, Birkner E. *Pol. Arch. Med. Wewn.* (2003) 110:725-31.
69. Olusi SO. (2002) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26:1159–1164.
70. Keaney JF Jr, et al. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:434–439.
71. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross J.S., Tartaglia, L.A., and Chen, H. (2003) *J. Clin. Invest.* 112:1821-1830.
72. De Lorenzo A, Martinoli R, Vaia F, Di Renzo L. (2006) *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 16:513-523.
73. Executive Summary of the third Report of the National Cholesterol Education Program. (NCPE) Expert Panel on detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (Adult Treatment Panel III). (2001) *JAMA* 285:2486-2497.
74. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Human Kinetics “Champaign, IL, 1998.
75. Karelis AD, St Pierre DH, Conus F, Lhoret RR, Poehlman ET. (2004) *J. Clin. Endocri., Metab.* 89:2569-2575.
76. Russo A. et al. (2000) *Cell Biol. Tox.* 16:91-98.

77. Hu M.L. (1994) In: Packer L., Ed. *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. 233, pp 380-385.
78. Ricart-Janè D et al. (2002) Nitric oxide: *Biol. Chem.* 6:178-185.
79. Wolff SP. (1994) In: Packer L., Ed. *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. 266, p 182-189.
80. Cinti S. (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73:9-15.
81. Fortuno A, Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Diez J. (2003) *J. Physiol. Biochem.* 59:51–60.
82. Ahima RS. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.* 16:307–13.
83. Coppak SW. (2001) *Proc. Nutr. Soc.* 60:349 –56.
84. Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC. (2000) *J. Pediatr. (Rio J.)* 76:125-132.
85. Beeh KM, Beier J, Haas IC, Kornmann O, Micke P, Buhl R. (2002) *Eur. Respir. J.* 19:1119-1123.
86. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Carpenne C, Andre M, Caspar-Bauguil S, Thouvenot JP, Periquet B, Penicaud L, Casteilla L. (2005) *J. Biol. Chem.* 281:12682-12687.
87. Faber P, Johnstone AM, Gibney ER, Elia M, Stubbs RJ, Duthie GG, Calder AG, Lobley GE. (2002) *Clin. Sci. (Lond)* 102:569-77.
88. Chanadiri TV, Esaiashvili MV, Chkhikvishvili ID. (2006) *Georgian Med. News* 131:85-87.

89. Girotti Albert W. Girotti. (1998) *J. Lipid Res.* 39:1529-1542.
90. Yagi K, Matsuoka S, Linnane AW, Zimmet P. Nauru. (1981) *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 27:425-428.
91. Mutlu-Turkoglu U, Oztezcan S, Telci A, Orhan Y, Aykac-Toker G, Sivas A, Uysal M. (2003) *Clin. Exp. Med.* 2:171-174.
92. Jurek D, Udilova N, Jozkowicz A, Nohl H, Marian B, Schulte-Hermann R. (2005) *FASEB J.* 19:97-99.
93. Spiteller G. (2003) *Med. Hypotheses* 60:69-83.
94. Spiteller G. (1998) *Chem. Phys. Lipids* 95:105-162.
95. Memon RA, Staprans I, Noor M, Holleran WM, Uchida Y, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1536-1542.
96. Holzel C, Spiteller G. (1995) *Naturwissenschaften* 82:452-460.
97. Shankar SS, Steinberg HO. (2005) *Semin. Vasc. Med.* 5:56-64.
98. Karagiannis J, Reid JJ, Darby I, Roche P, Rand MJ, Li CG. (2003) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42:497-505.
99. Chowienczyk PJ, Brett SE, Gopaul NK, Meeking D, Marchetti M, Russell Jones DL, Anggard EE, Ritter JM. (2000) *Diabetologia* 43:974-977.
100. Frisbee JC. (2005) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289:R307–R316.
101. Steinberg HO, Baron AD. (2002) *Diabetologia* 45:623–634.

102. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. *J. Clin. Invest.* (1996) 97:2601–2610.
103. Konukoglu D, Serin O, Turhan MS. (2005) *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 33:41-46.
104. Vigili de Kreutzenberg S, Kiwanuka E, Tiengo A, Avogaro A. (2003) *Eur. Heart J.* 24:1210-1215.
105. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, et al. (2000) *Circulation* 101:1780-1784.
106. Tooke JE, Hannemann MM. (2000) *J. Intern. Med.* 247:425-431.
107. Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H854–H860.
108. Vincent HK, Taylor AG. (2006) *Int. J. Obes. (Lond)* 30:400-418.
109. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. (2003) *J. Clin. Invest.* 112:1821-1830.
110. Reitman A, Friedrich I, Ben-Amotz A, Levy Y. (2002) *Isr. Med. Assoc. J.* 4:590-593.
111. Khan NI, Naz L, Yasmeen G. . (2006) *Pak. J. Pharm. Sci.* 19:62-65.
112. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) *J. Clin. Invest.* 114:1752-1761.

113. Urukawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4673-4676.
114. Zwirska-Korczala K, Jochem J, Rybus-Kalinowska B, Polaniak R, Birkner E. (2003) *Pol. Arch. Med. Wewn.* 110:725-31.
115. Olusi SO. (2002) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26:1159–1164.
116. Keaney JF Jr, et al. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:434–439.
117. Higdon JV, Frei B. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:365-357.
118. Park J, Chung JJ, Kim JB. (2007) *Diab. Res. Clin. Pract.* 77 Suppl 1:S11-16.
119. Bakker SJ, Ijzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ. (2000) *Atherosclerosis* 148:17-21.
120. Coppak SW. (2001) *Proc. Nutr. Soc.* 60:349–56.
121. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, et al. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:355–362.
122. Musaad S, Haynes EN. (2007) *Epidemiol. Rev.* 29:98-114.
123. De Lorenzo A., Del Gobbo V., Premrov M.G., Bigioni M., Galvano F., Di Renzo L. (2007) *Am. J. Clin. Nutr.* 85:40-45.