

Obesità, microbiota e stress ossidativo

Angiola Vanzo¹, Andrea Bolner², Giampietro Nordera², Ottavio Bosello³

¹Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN), ULSS 6, Vicenza

²Centro Stress Ossidativo (CSOx), Casa di cura privata Villa Margherita, Vicenza

³Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

Obesity, microbiota and oxidative stress. Only in recent years, scientific societies and governments of many countries have considered obesity and its precursors, namely overweight, such as a disease that causes other diseases and reduces life quality and expectancy. According to the latest researches, obesity is a complex disease, with multifactorial etiology, not exclusively linked to eating disorders and lifestyle, which contribute inflammatory, infectious, toxic and also mental phenomena. Among many pathogenetic and pathophysiological invoked mechanisms, the effects of oxidative stress have recently received special attention. The imbalance between the production of free oxygen and nitrogen radicals and the physiological contrast mechanisms could actually play a causal role in the development of obesity by stimulating the deposition of white adipose tissue and altering the assumption of food. Oxidative stress and systemic inflammation are also key factors in the pathogenesis of obesity-related diseases, including atherosclerosis, insulin resistance, type 2 diabetes and cancer. Despite the correlation between obesity and oxidative stress, none of the biochemical markers of oxidative damage can be considered predictive of obesity; on the contrary, some markers seem to predict the development and progression of cardiovascular and metabolic disease in overweight and obese subjects. Recent observations also demonstrate the existence of quantitative and qualitative differences in the intestinal microbiota between individuals at high and low risk of development of obesity and related complications. Therefore, the intestinal microbiota might play a key role in the pathogenesis of obesity.

INTRODUZIONE

Fin dagli anni a cavallo tra V e IV secolo a.C., Ippocrate di Kos parlava dei pericoli per la salute e per la longevità in coloro che erano "assai grassi"; a essi Ippocrate raccomandava di alimentarsi con moderazione senza trascurare l'esercizio fisico. Nel I secolo d.C., Aulo Cornelio Celso confermò i rischi dell'eccesso di adipe che egli chiamò *obesitas*: da allora, soprattutto la medicina araba medievale dedicò molta attenzione al sovrappeso, che iniziò a essere studiato come un vero problema medico. Negli ultimi anni del primo millennio, Avicenna dedicò un'intera sezione del suo Canone di Medicina agli inconvenienti dovuti all'obesità: problemi respiratori, cardiovascolari, infertilità, morte improvvisa. Malgrado queste osservazioni storiche, il giudizio di malattia riferito al sovrappeso è rimasto a lungo incerto nella maggior parte delle culture. Per secoli infatti, fame e denutrizione sono stati problemi dominanti per la maggior parte

dell'umanità e un corpo ben nutrito appariva, prima di tutto, un segno di salute e prosperità. A partire dalla prima metà del XX secolo, il problema dell'obesità è comparso piuttosto regolarmente nei testi di medicina: a esso si riconoscevano, in genere, i rischi che comporta per la salute, ma la scarsa frequenza con cui il fenomeno si riscontrava nella popolazione generale non gli ha permesso di trovare la giusta rilevanza. Anzi, il fatto che obesità e sovrappeso fossero prevalenti nelle classi sociali più agiate ha continuato a conferire loro un'aura di benessere e opulenza. Solo nel secondo dopoguerra e, in modo eclatante, negli ultimi trent'anni, l'obesità è davvero divenuta oggetto di studio della scienza medica.

OBESITÀ: UNA MALATTIA MULTIFATTORIALE

La necessità di avere un approccio multidisciplinare al problema obesità è apparsa ben presto evidente. Che questa condizione avesse una qualche componente

Corrispondenza a: Andrea Bolner, Centro Stress Ossidativo, Casa di cura privata Villa Margherita, Via Costacolonna 6, 36057 Arcugnano (VI). Tel. 0444997099, Fax 0444997099, E-mail bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 10.09.2016

Revisionato: 16.10.2016

Accettato: 09.11.2016

Publicato on-line: 26.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.028

ereditaria, infatti, era noto da tempo: tuttavia, fino a qualche decennio fa, le effettive implicazioni genetiche erano rimaste un fatto quasi del tutto sconosciuto. L'avvento delle nuove tecnologie di indagine e studi su modelli animali hanno in breve tempo permesso di individuare più di 500 geni candidati collegati a questo fenotipo. L'obesità umana appare, oggi, una condizione geneticamente complessa che tende ad associarsi a una moltitudine di complicanze (insulino-resistenza, diabete tipo 2, dislipidemia, arteriosclerosi, ipertensione) influenzate, a loro volta, dallo stile di vita, ma anche legate a predisposizioni genetiche spesso indipendenti l'una dall'altra. Un quadro, dunque, molto difficile da districare e da individuare che fa sospettare come la parola "obesità" sia, in realtà, un ombrello troppo grande che finisce per raccogliere sotto di sé fenomeni anche molto diversi dal punto di vista eziopatologico. Più recentemente, gli studi sul genoma si sono arricchiti con osservazioni di epigenetica che hanno individuato, anche nell'obesità, cause ambientali in grado, a loro volta, di modificare il fenotipo alterando direttamente il genoma attraverso processi di metilazione del DNA e di metilazione e acetilazione delle proteine istoniche.

Stranamente, nonostante i progressi fatti nell'individuazione delle sue basi molecolari, l'obesità rimane a oggi una condizione definita e descritta esclusivamente su base morfologica: eccesso di peso corporeo per eccesso di massa grassa. La diagnosi di obesità dipende, infatti, dalla constatazione che l'indice di massa corporea ["body mass index" (BMI), calcolato come rapporto tra la massa-peso, espressa in kg, e il quadrato dell'altezza, espressa in m] o la percentuale di grasso corporeo ["fat mass" (FM)] di un individuo superano certi limiti convenzionalmente fissati: per BMI, $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ in entrambi i sessi; per FM, $>25\%$ negli uomini e $>32\%$ nelle donne. Non è richiesta, dunque, per la diagnosi la presenza di particolari sintomi o segni, né la compromissione di una o più funzioni fisiologiche.

Altrettanto curiosamente, solo di recente le maggiori istituzioni sanitarie internazionali e i governi di molti paesi hanno finalmente abbracciato l'idea che l'obesità e il suo precursore, il sovrappeso, debbano essere considerate malattie da contrastare in quanto provocano altre malattie e che si tratti di condizioni che riducono qualità e aspettativa di vita (1). Pur riaprendosi di tanto in tanto il dibattito se l'obesità possa essere considerata una vera malattia e se essa costituisca un reale pericolo per la salute (negli ultimi due decenni sono stati, infatti, pubblicati articoli in cui si postula addirittura un ruolo protettivo dell'eccesso ponderale tanto da far parlare del cosiddetto "obesity paradox"), è ormai assodato che l'obesità è una condizione cronica associata a elevata morbilità e mortalità precoce (2). Per tali ragioni gli specialisti sono oggi principalmente impegnati a ricercarne le basi eziologiche che, come già accennato, non paiono affatto scontate. Com'era infatti atteso sulla base delle ipotesi di multifattorialità formulate dai primi ricercatori, il quadro che si va delineando per l'obesità è quello di una patologia complessa non esclusivamente legata a disordini alimentari e dello stile di vita, cui

possono concorrere fenomeni di tipo infiammatorio, infettivo, tossico e anche psichiatrico.

OBESITÀ E STRESS OSSIDATIVO

Recentemente, tra i molti meccanismi eziopatogenetici e fisiopatologici invocati, si è posta particolare attenzione agli effetti conseguenti allo stress ossidativo (3). Il termine stress ossidativo o "squilibrio redox" indica l'insieme delle alterazioni biochimiche che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste sono esposte a un eccesso di agenti ossidanti: l'effetto è costituito da alterazioni metaboliche, danno e morte cellulare. Lo stress origina da uno sbilanciamento del rapporto tra la produzione di radicali liberi [sia della specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia di quelle dell'azoto (RNS)] e la relativa neutralizzazione metabolica.

Studi epidemiologici, clinici e sperimentali hanno dimostrato che l'obesità è strettamente associata ad alterazioni dello stato redox e al conseguente aumento del rischio metabolico (4-9). Lo stress ossidativo può essere una conseguenza, ma anche una causa dell'obesità. L'ipernutrizione cronica, l'elevato contenuto di grassi, specie grassi saturi (SFA) e acidi grassi di tipo "trans", e di carboidrati nella dieta, specie a basso indice glicemico, stimolano vie intracellulari che portano a stress ossidativo attraverso molteplici meccanismi biochimici, quali la generazione di superossido da parte delle NADPH-ossidasi (Nox), la fosforilazione ossidativa mitocondriale, l'auto-ossidazione della gliceraldeide, l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), le vie dei polioli e delle esosamine (10-12).

Lo stress ossidativo potrebbe svolgere un ruolo causale nello sviluppo dell'obesità, stimolando la deposizione di tessuto adiposo bianco e alterando l'assunzione di cibo: colture cellulari e studi su animali dimostrano che lo stress ossidativo aumenta la proliferazione dei pre-adipociti, la successiva differenziazione degli adipociti e la dimensione degli adipociti maturi (13-15). ROS e RNS sembrano essere coinvolte nel controllo del peso corporeo, esercitando effetti diversi sui neuroni ipotalamici che controllano il comportamento della fame e della sazietà (16).

È stato anche dimostrato che l'obesità è direttamente in grado di indurre stress ossidativo sistemico; infatti, l'accumulo di grasso aumenta l'attività Nox e lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) negli adipociti, comportando un conseguente aumento della produzione di ROS (13, 17). Altri fattori che contribuiscono allo stress ossidativo nell'obesità sono l'anomala generazione post-prandiale di ROS (18), l'iperleptinemia (19), l'infiammazione cronica (20) e la disfunzione tissutale (12) con riduzione delle difese antiossidanti (21, 22). Come dimostrato anche in altre patologie, stress ossidativo e infiammazione sembrano essere strettamente collegati anche nell'obesità, per quanto resti difficile stabilire l'esatta sequenza temporale del loro rapporto. Stress ossidativo sistemico e infiammazione sono fattori chiave anche nella

patogenesi delle malattie correlate all'obesità, tra cui aterosclerosi, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e tumori (23, 24). È stato recentemente ipotizzato che l'aumento dello stress ossidativo e l'infiammazione nell'obesità favoriscano anche i processi di invecchiamento (25).

È noto, al contrario, che la restrizione calorica e la conseguente riduzione ponderale hanno come effetto la riduzione dei marcatori di ossidazione, l'aumento delle difese antiossidanti e il miglioramento del rischio metabolico e cardiovascolare associati all'obesità (26).

RUOLO DI ROS, RNS E BARRIERA ANTIOSSIDANTE

In condizioni fisiologiche, i mitocondri sono il principale sito di produzione intracellulare di ROS. I radicali dell'ossigeno e dell'azoto, tuttavia, possono derivare anche da numerose attività metaboliche di membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico, lisosomi, perossisomi ed enzimi citosolici. È indispensabile sottolineare che, a basse concentrazioni, ROS e RNS sono messaggeri intracellulari che esercitano una moltitudine di effetti biologici fondamentali, tra cui la difesa immunitaria e la trasmissione del segnale; per tale ragione non debbono essere inopinatamente contrastati con interventi esterni.

Per controllare i livelli di ROS e RNS, infatti, i tessuti possiedono molecole antiossidanti che lavorano in sinergia per ridurre al minimo la citotossicità dei radicali liberi. Composti endogeni antiossidanti non enzimatici sono, ad esempio, urato, bilirubina, glutazione, ubiquinolone (coenzima Q10), tioredoxina; anche alcune proteine, quali ferritina, transferrina, lattoferrina, ceruloplasmina, agiscono come antiossidanti in quanto sono capaci di legare e sequestrare metalli di transizione che, se in eccesso, potrebbero dare inizio a reazioni ossidative a catena come, ad esempio, accade nella reazione di Fenton (27).

Importanti enzimi antiossidanti endogeni sono la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPx), la glutazione reduttasi e S-transferasi, la catalasi, la tioredoxina reduttasi, la perossiredoxina (PRX) e la NAD(P)H/ubichinone ossidoriduttasi (NQO1). Recentemente, anche la famiglia delle paraoxonasi (PON) si è rivelata essere una classe di enzimi antiossidanti che gioca un ruolo importante in alcune malattie associate all'obesità, tra cui quelle cardiovascolari (CVD) e il diabete mellito (28, 29). In particolare, essendo presente sulla superficie delle lipoproteine ad alta densità (HDL), PON1 protegge le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le cellule circolanti contro i danni ossidativi, evitando così risposte infiammatorie nelle cellule della parete arteriosa.

Anche l'eme ossigenasi-1 (HO-1), enzima limitante nel metabolismo dell'eme, può essere considerato un enzima antiossidante in quanto in grado di ridurre lo stress ossidativo e inibire l'infiammazione. Recenti risultati indicano che HO-1 svolge un ruolo benefico nelle CVD, nella regolazione del peso corporeo, nel

metabolismo del diabete e nell'obesità (30-32).

Accanto alle componenti enzimatiche e non enzimatiche endogene, la barriera antiossidante si avvale anche del contributo degli antiossidanti alimentari, che comprendono in primo luogo le vitamine C ed E assieme a un ampio spettro di composti bioattivi. Zinco, manganese e selenio sono considerati nutrienti essenziali proprio in virtù dell'importanza che essi rivestono sull'attività degli enzimi antiossidanti: SOD utilizza infatti come cofattori manganese (Mn-SOD), rame e zinco (Cu-, Zn-SOD), mentre GPx1-4 e GPx6 contengono selenio.

Quando i livelli endogeni di ROS e RNS aumentano e/o la barriera antiossidante si riduce, l'equilibrio redox fisiologico si altera causando danneggiamenti ossidativi del DNA, dei lipidi e delle proteine, che possono evolvere in importanti alterazioni molecolari e strutturali fino alla morte cellulare (33).

Numerose osservazioni dimostrano che l'elevata deposizione di grassi è strettamente correlata a uno squilibrio redox. Sovrappeso e obesità in età giovanili sono stati collegati a elevati livelli di stress ossidativo (4, 5): soggetti obesi presentano livelli più elevati di LDL ossidate (oxLDL) e prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AAOP) rispetto ai soggetti di controllo (34). Negli adulti, BMI, grasso corporeo totale e circonferenza della vita sono positivamente correlati con i livelli di F2-isoprostani urinari (marcatori di danno ossidativo lipidico) e inversamente con l'attività PON1 (35-37). È interessante notare che il monitoraggio dei livelli di F2-isoprostani può far prevedere il mantenimento o la perdita di adiposità totale nel corso del tempo: una significativa associazione inversa tra F2-isoprostani urinari e aumento di peso nel corso di un periodo di controllo di 5 anni è stata infatti dimostrata sia dall'"Atherosclerosis Study" (38) che dall'"Health, Aging, and Body Composition Study" (39). Questa associazione inversa è stata interpretata come una risposta fisiologica positiva dell'organismo per contrastare l'eccesso di adiposità e/o una risposta catabolica all'infiammazione. Nei topi, l'obesità indotta dalla dieta aumenta lo stress ossidativo a livello cerebrale (40) e l'obesità indotta dalla dieta ad alto contenuto di grassi correla con una disfunzione mitocondriale e con un aumento dello stress ossidativo, tanto nel muscolo scheletrico quanto nel fegato (41). Cuori di roditori mantenuti in dieta ricca di grassi mostrano contemporaneamente elevate concentrazioni lipidiche, evidenze di ossidazione delle proteine e aumentati livelli dei marcatori di apoptosi (42).

Nonostante la forte associazione tra obesità e stress ossidativo, nessuno dei suddetti marcatori di danno ossidativo può essere considerato un predittore di sviluppo di obesità, mentre essi paiono in grado di predire lo sviluppo e la progressione di CVD e malattie metaboliche nelle persone in sovrappeso e obese (43).

È stata anche dimostrata una correlazione positiva tra marcatori di stress ossidativo e marcatori di infiammazione, iperglicemia e iperlipidemia. In soggetti giovani in sovrappeso e obesi, gli AOPP correlano

positivamente con obesità centrale, trigliceridemia e insulinemia, mentre correlano negativamente con il rapporto glucosio/insulina e il colesterolo HDL, suggerendo un aumento del rischio metabolico in questa popolazione (6, 7). Elevate concentrazioni di 8-idrossi-deossi-guanosina (8-OHdG), marcatore di danno ossidativo sul DNA, sono state inoltre dimostrate in soggetti prediabetici (44).

STRESS OSSIDATIVO NELLE MALATTIE CORRELATE ALL'OBESITÀ

Prove recenti hanno suggerito che lo stress ossidativo potrebbe essere il legame meccanicistico tra obesità e comorbidità, quali steatoepatite non alcolica, sindrome metabolica, diabete di tipo 2, CVD, apnea ostruttiva del sonno e alcuni tumori (45-47).

L'oncogenesi è certamente un fenomeno multifattoriale in cui lo squilibrio redox svolge un ruolo chiave. Studi epidemiologici hanno dimostrato una correlazione positiva tra aumento del rischio e peggiore prognosi del cancro, e BMI e distribuzione del grasso (48, 49). Sovrappeso e obesità sono responsabili del 14% delle morti per cancro negli uomini e del 20% nelle donne; la mortalità obesità-correlata è soprattutto osservata per i tumori della prostata e dello stomaco negli uomini, della mammella, endometrio, cervice, utero, ovaie nelle donne, e nei tumori gastrointestinali in entrambi i sessi (49). I principali determinanti coinvolti nella cancerogenesi e progressione del cancro sembrano essere il bilancio energetico, l'iperinsulinemia, lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica.

Prove convincenti indicano che livelli di stress ossidativo medio-alti causano danni al DNA che si traducono in instabilità genomica associata all'attivazione di oncogeni e/o all'inattivazione di geni oncosoppressori (24). L'alterata espressione genica può essere dovuta sia all'azione diretta del danno ossidativo sul DNA sia mediata da alterazioni epigenetiche; in particolare, i ROS hanno dimostrato di poter alterare il modello epigenetico con produzione di sostanze cancerogene che inducono ipermetilazione e/o provocando modificazioni degli istoni e l'espressione dei microRNA, favorendo l'oncogenesi e la progressione del cancro. La scoperta che i pazienti insulino-resistenti mostrano un elevato rischio per diversi tipi di tumore sostiene ulteriormente la teoria dello stretto legame tra stress ossidativo, infiammazione cronica e oncogenesi (24).

EQUILIBRIO REDOX, PERDITA DI PESO E ATTIVITÀ FISICA

Sono stati proposti diversi meccanismi di incremento nella generazione di ROS e RNS per spiegare il maggiore stress ossidativo nei soggetti obesi: alterazione dei livelli di lipidi e del metabolismo glucidico, infiammazione cronica (20), disfunzione tissutale (12),

iperleptinemia (19) e anormale produzione postprandiale di ROS (18). È suggestivo pensare che la restrizione calorica e il calo ponderale possano rappresentare un efficace mezzo per contrastarne l'iperproduzione. Tra gli effetti positivi della riduzione del peso in individui obesi, infatti, i più documentati sono la diminuzione del danno ossidativo e dell'infiammazione. La perdita di peso ottenuta tramite dieta ipocalorica influenza la produzione di ROS, come indicato da specifici marcatori di stress ossidativo e proteine coinvolte nei processi ossidativi mitocondriali correlati. Diversi studi dimostrano che la carbonilazione proteica, la perossidazione lipidica, le oxLDL e gli F2-isoprostani, così come marcatori infiammatori quali la proteina C-reattiva, l'interleuchina (IL) 8 e l'espressione di geni coinvolti nella cascata fattore di necrosi tumorale- α /fattore nucleare kappa B (TNF- α /NF- κ B), diminuiscono a seguito della riduzione del peso (50-54). Inoltre, le funzioni metaboliche migliorano con la riduzione dello stress ossidativo, come evidenziato da un aumento dei livelli di adiponectina e da una migliore funzionalità epatica (55).

STRESS OSSIDATIVO, OBESITÀ E MICROBIOTA

Grande interesse è stato recentemente rivolto dalla comunità scientifica alla caratterizzazione della flora microbica intestinale (microbiota) mediante il sequenziamento del suo genoma (microbioma), in quanto la sua composizione ha trovato spesso correlazione e importanti implicazioni in numerosi stati patologici, tra i quali l'obesità. Alcune osservazioni dimostrano, infatti, differenze quantitative e qualitative nel microbiota intestinale tra i soggetti ad alto e basso rischio di sviluppo di obesità e le complicanze a essa correlate, come insulino-resistenza e diabete di tipo 2 (56). Studi di trapianto di microbiota eseguiti sia negli animali che nell'uomo suggeriscono che il dismicrobismo intestinale può di per sé causare un aumento di peso e insulino-resistenza (57). I meccanismi ipotizzati sono maggiore efficienza di assorbimento di energia dal cibo, modificazione della permeabilità intestinale, rilascio di ormoni intestinali, induzione di stress ossidativo e infiammazione (58). La composizione microbica della flora intestinale è influenzata dal peso corporeo e da alcuni componenti della dieta, quali fibre, polifenoli e lipidi. I due *phylum* maggiormente rappresentati sono quello dei *Bacteroidetes* (50-60%) e dei *Firmicutes* (25-30%); mentre i batteri del primo gruppo si nutrono prevalentemente di fibre vegetali e sono in grado di assimilare pochi grassi della dieta, quelli del secondo si caratterizzano per la loro capacità di procurarsi nutrimento principalmente da grassi e zuccheri alimentari favorendone, al contempo, l'assorbimento da parte dell'organismo ospite. Nei soggetti obesi, la perdita di peso riduce il rapporto *Firmicutes*/*Bacteroidetes* (59), mentre una dieta ricca di grassi e il

carico calorico lo aumenta (60). Una relativamente elevata abbondanza di *Firmicutes* è associata a endotossinemia metabolica a causa di un maggiore assorbimento di lipopolisaccaride (LPS), che raggiunge la circolazione e induce stress ossidativo, infiammazione e danni di segnalazione dell'insulina (56, 58). In realtà, alcuni studi riportano che i probiotici, microrganismi viventi, tra cui *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, e i prebiotici, componenti alimentari non vitali, tra cui gli "insulin-like" fruttani, conferiscono un beneficio per la salute che è associato alla modulazione del microbiota (58). Più volte prebiotici e probiotici sono stati dimostrati capaci di regolare il metabolismo dei soggetti obesi e dei disturbi correlati all'obesità (56, 58, 61, 62).

Uno studio condotto su roditori per individuare l'effetto di nuovi probiotici sulla sindrome metabolica (MS) indotta da dieta ricca in fruttosio sottolinea la capacità della flora intestinale di migliorare lo stress ossidativo. Gli animali che si nutrono con una dieta ricca di fruttosio sviluppano le caratteristiche cliniche della sindrome metabolica e presentano un aumento delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, trigliceridi, colesterolo e livelli totali di marcatori dello stress ossidativo, così come della massa del fegato e dei lipidi rispetto ai controlli (63). Il trattamento probiotico abbassa quasi tutti questi parametri e riduce la lipogenesi. Altri studi sottolineano il ruolo positivo dei probiotici anche nella modulazione dello stato redox. Nei pazienti diabetici di tipo 2, il consumo di 300 g/giorno di yogurt probiotico contenente *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* migliora la glicemia e i parametri antiossidanti [capacità antiossidante totale (TAC), SOD e GPx] e decrementa l'ossidazione lipidica [malondialdeide (MDA)] (64).

I probiotici contrastano, inoltre, lo stress ossidativo indotto da esercizio fisico: il consumo giornaliero per 4 settimane di una miscela di due ceppi di probiotici, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, aumenta i livelli plasmatici della TAC e diminuisce i ROS (65). In soggetti sani, il consumo giornaliero per 3 settimane di 150 g di latte di capra fermentato con *Lactobacillus fermentum* aumenta la TAC e diminuisce i marcatori ossidativi nel sangue umano e nelle urine (oxLDL, F2-isoprostani e rapporto glutazione ossidato/ridotto) (66).

Interessanti osservazioni sono state fatte in merito alla relazione tra alcuni antiossidanti alimentari, i polifenoli in particolare, e microbiota. La composizione della flora microbica intestinale, infatti, sembra in grado di agire direttamente sulla bioattività di sostanze come i polifenoli, che sono componenti presenti normalmente nella dieta, noti per il loro effetto antiossidante *in vitro*, ma anche per la loro bassa biodisponibilità *in vivo*. La presenza o meno di microbi in grado di metabolizzare i polifenoli potrebbe, almeno in parte, spiegare la variabilità inter-individuale degli effetti benefici sulla salute osservati a seguito dell'integrazione alimentare con polifenoli. Poiché allo stesso tempo, i polifenoli, cambiando lo stato redox intestinale, sono in grado di controllare le sotto-popolazioni del microbiota, si può

ben ritenere che l'interconnessione microbiota-polifenoli possa rappresentare un nuovo obiettivo per gli studi sull'obesità e sulle altre patologie mediate da stress ossidativo (67).

STRESS OSSIDATIVO E LABORATORIO CLINICO

Il laboratorio clinico, oltre all'indiscussa capacità di descrivere in dettaglio il quadro fisiopatologico molecolare dell'obesità (68-70), riveste un ruolo fondamentale anche negli studi sullo stress ossidativo (Tabella 1). Infatti, questi si fondano principalmente su analisi volte a valutare l'entità del potenziale ossidante nei fluidi corporei, plasma e urine principalmente, l'efficacia dei meccanismi di contrasto e l'evidenza di alterazioni molecolari conseguenti a un eventuale sbilanciamento tra essi.

L'analisi diretta dei radicali liberi ROS e RNS è resa particolarmente difficile dalla loro elevata reattività e breve emivita e si avvale di tecniche quali la spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone (ESR) e i metodi di "spin-trap", che, pur rappresentando il "gold standard", sono solo raramente disponibili (71, 72). Abbastanza frequente è, perciò, il ricorso alla misurazione dei radicali liberi mediante determinazione indiretta degli idroperossidi plasmatici che si formano per azione dei ROS (73).

Più composito è il pannello degli analiti che concorrono a formare la barriera antiossidante: ne fanno parte, infatti, numerose classi molecolari, talune ad attività enzimatica e altre ad azione antiossidante non enzimatica (Tabella 1). Tra queste ultime si distinguono due classi di antiossidanti: quelli endogeni, fisiologicamente presenti, come glutazione, coenzima Q10, acido urico, bilirubina, melatonina, tioredoxina, e quelli esogeni introdotti con la dieta come le vitamine A, E, K, C, l'acido lipoico, i polifenoli e i flavonoidi (74).

Oltre ai vari metodi proposti per valutare, mediante analisi spettrofotometriche, la capacità antiossidante ematica nella sua totalità (75-77), numerosi metodi cromatografici consentono di analizzare singolarmente molte tra le principali componenti della barriera. Per alcuni analiti, come glutazione e coenzima Q10, sono stati proposti anche metodi che permettono di misurare contemporaneamente tanto la frazione ossidata quanto quella ridotta e, in base al loro rapporto, valutare la presenza di uno sbilanciamento ossido-riduttivo rispetto all'equilibrio fisiologico (78, 79).

A causa della varietà dei componenti della barriera antiossidante è però spesso necessario ricorrere alla determinazione di più marcatori per descrivere un quadro sufficientemente ampio, ancorché incompleto. Recentemente, nell'ottica di superare questa necessità, sono stati fatti tentativi di valutazione dinamica dell'intero complesso enzimatico antiossidante mediante analisi proteomica quantitativa (80).

Forse ancora più utile della valutazione del rapporto tra potere ossidante e antiossidante nei liquidi corporei è l'individuazione e la determinazione dei marcatori di

Tabella 1

Principali marcatori misurabili per la valutazione dello stress ossidativo nell'obesità e rispettive tecniche di analisi

<i>Potenziale ossidante</i>		
Analisi diretta dei radicali liberi ROS e RNS		Spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone e spin-trap
Analisi indiretta di ROS (idroperossidi plasmatici)		Spettrofotometria
<i>Barriera antiossidante enzimatica</i>		
Catalasi		Cinetica enzimatica
Superossidodismutasi (SOD)		Cinetica enzimatica, ELISA
Perossiredoxina		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione perossidasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione reduttasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione S-transferasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Tioredoxina redattasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Eme-ossigenasi 1		Cinetica enzimatica, ELISA
NADPH-ubichinone ossidoriduttasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Paraoxonasi		Cinetica enzimatica, ELISA
<i>Barriera antiossidante non enzimatica</i>		
Endogeni	Glutazione	Spettrofotometria, ELISA, HPLC
	Coenzima Q10	ELISA, HPLC
	Acido urico	Spettrofotometria
	Bilirubina	Spettrofotometria
	Tioredoxina	ELISA, HPLC
	Ferritina	Immunochimica
	Transferrina	Immunochimica
	Lattoferrina	ELISA
	Ceruloplasmina	Spettrofotometria, ELISA
	Melatonina	HPLC
Esogeni	Vitamina A	HPLC
	Vitamina E	HPLC
	Vitamina K	HPLC
	Vitamina C	HPLC
	Acido lipoico	HPLC
	Polifenoli	HPLC
	Flavonoidi	HPLC
	Oligoelementi: zinco, manganese, selenio	Fotometria, assorbimento atomico
Analisi del potenziale antiossidante plasmatico totale		Spettrofotometria

ROS, specie reattive dell'ossigeno; RNS, specie reattive dell'azoto.

danno. L'eccessiva produzione di ROS e RNS non contrastata da un'efficace barriera antiossidante, infatti, può essere causa di alterazioni molecolari ossidative a carico di tutte le classi di macromolecole biologiche, con conseguenti inevitabili effetti a livello di funzioni cellulari, organi e tessuti.

Il processo di ossidazione delle proteine comporta,

ad esempio, l'introduzione di nuovi gruppi funzionali che possono contribuire ad alterarne funzione e metabolismo. Principali marcatori di ossidazione delle proteine sono i gruppi carbonilici, i prodotti di ossidazione della tirosina (ad es., la 3-nitrotirosina), gli idroperossidi e perossidi proteici di valina, leucina, lisina, la chinurenina, la metionina-sulfossido e

metionina-sulfone e i disolfuri della cisteina (74). Anche i prodotti di glicazione avanzata delle proteine (AGE) e gli AOPP sono stati più volte proposti come oggetto di studio nella valutazione del danno ossidativo nel comparto proteico (81).

L'attacco dei ROS, in particolare del radicale idrossile, sugli acidi nucleici può anche essere causa di mutazioni attraverso la modificazione di specifiche basi azotate e rottura della doppia elica del DNA. Il marcatore di danno ossidativo più spesso utilizzato a tale riguardo è la 8-idrossi-deossiguanosina (8-OHdG) (82), ma anche altri analiti sono stati proposti per il loro probabile maggiore contenuto informativo, come ad esempio la 8-idrossi-guanina (8-OH-Gua) (83).

Di evidente interesse negli studi sull'obesità sono le alterazioni ossidative a carico dei lipidi. I fosfolipidi di membrana e i trigliceridi contenuti nelle LDL sono, infatti, molecole particolarmente suscettibili all'attacco radicalico. Gli idroperossidi lipidici, che originano dalla prima reazione ossidativa che determina un riarrangiamento molecolare a livello dei doppi legami, sono a loro volta specie reattive che innescano una reazione a catena la quale porta alla formazione di perossidi ciclici e ad aldeidi α - β insature, come la malondialdeide (MDA) e la 4-idrossi-nonenale (4-HNE); queste ultime, accanto alle oxLDL e alle specie reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs), sono frequentemente studiate come marcatori di ossidazione lipidica (84, 85). Da ultimo, è necessario osservare che una particolare classe di composti generati dalla lipoperossidazione dell'acido arachidonico, gli F2-isoprostani, per effetto della loro stabilità e indipendenza dalla dieta, sono stati proposti come miglior marcatore di ossidazione lipidica. Tuttavia, poiché la loro determinazione è considerata affidabile solo se condotta mediante cromatografia liquida associata a spettrometria di massa, il loro impiego diagnostico risulta attualmente problematico (86, 87).

CONCLUSIONI

Tra le molteplici ipotesi formulate sull'eziopatologia dell'obesità, è suggestivo pensare che un ruolo chiave possa essere attribuito alla relazione tra stress ossidativo e microbiota intestinale. Molteplici evidenze tendono a dimostrare che fattori genetici, epigenetici e stile di vita concorrono a determinare nell'obeso uno sbilanciamento dell'equilibrio redox correlato con l'alterazione della flora microbica intestinale. Interventi medici volti non solo a modificare l'apporto calorico, ma anche a modulare e migliorare la composizione della dieta con l'obiettivo di riequilibrare l'asse microbiota-stato redox appaiono perciò, ancor più che in passato, strumenti promettenti nella terapia dell'obesità. E' pertanto auspicabile che, mediante analisi biochimiche e genetiche mirate alla descrizione dei marcatori di stress ossidativo e alla caratterizzazione del microbiota, il laboratorio clinico possa svolgere presto un ruolo importante.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. World Health Organization fact sheet for world wide prevalence of obesity. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
2. Nishida C, Ko, GT, Kumanyika S. Body fat distribution and non communicable diseases in populations: overview of the 2008 WHO expert consultation on waist circumference and waist-hip ratio. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:2-5.
3. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117-32.
4. Warolin J, Coenen KR, Kantor JL, et al. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy black and white American youth. *Pediatr Obes* 2014;9:43-52.
5. Tran B, Oliver S, Rosa J, et al. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:683680.
6. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, et al. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008;41:943-9.
7. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso, S, Murria-Estal R, et al. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:237-43.
8. Hermsdorff HH, Barbosa KB, Volp AC, et al. Gender-specific relationships between plasma oxidized low-density lipoprotein cholesterol, total antioxidant capacity, and central adiposity indicators. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:884-91.
9. Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:792-9.
10. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.
11. Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A, et al. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: Potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Exp Mol Med* 2010;42:245-53.
12. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:269-84.
13. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
14. Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 2009;284:10601-9.
15. Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev* 2013;22:878-88.
16. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:78-87.
17. Mlinar B, Marc J. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1925-35.
18. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al. Prolonged

- reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4476–9.
19. Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:168–78.
 20. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701–11.
 21. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:590–7.
 22. Strauss RS. Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). *J Pediatr* 1999;134:160–5.
 23. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111:1448–54.
 24. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res* 2013;47:243–56.
 25. Tzanetakou IP, Katsilambros NL, Benetos A, et al. Is obesity linked to aging? Adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Res Rev* 2012;11:220–9.
 26. Bigornia SJ, Mott MM, Hess DT, et al. Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals. *Obesity* 2010;18:754–9.
 27. Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, et al. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E77–86.
 28. Abelló D, Sancho E, Camps J. Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *Int J Mol Sci* 2014;15:20997–1010.
 29. Li YR, Zhu H, Kauffmann M, et al. Paraoxonases function as unique protectors against cardiovascular diseases and diabetes: updated experimental and clinical data. *Exp Biol Med* (Maywood) 2014;239:899–906.
 30. Chan KH, Ng MK, Stocker R. Haem oxygenase-1 and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci* 2011;120:493–504.
 31. Abraham NG, Junge JM, Drummonds GS. Translational significance of heme oxygenase in obesity and metabolic syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:17–36.
 32. Negi G, Nakkina V, Kamble P, et al. Heme oxygenase-1, a novel target for the treatment of diabetic complications: focus on diabetic peripheral neuropathy. *Pharmacol Res* 2015;102:158–67.
 33. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012;70:257–65.
 34. D'Archivio M, Annuzzi G, Vari R, et al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur J Clin Invest* 2012;42:70–8.
 35. Keane JF Jr, Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434–9.
 36. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, et al. HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: a comparison between healthy and obese subjects. *Obesity* 2010;18:1079–84.
 37. Aslan M, Horoz M, Sabuncu T, et al. Serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress in obese subjects. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121:181–6.
 38. Il'yasova D, Wang F, Spasojevic I, et al. Urinary F2-isoprostanes, obesity, and weight gain in the IRAS cohort. *Obesity* 2012;20:1915–21.
 39. Kanaya AM, Wassel CL, Stoddard PJ, et al. F2-isoprostanes and adiposity in older adults. *Obesity* 2011;19:861–7.
 40. Freeman LR, Zhang L, Nair A, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med* 2013;56:226–33.
 41. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLoS One* 2013;8:e54059.
 42. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012;197:857–67.
 43. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, et al. Oxidative stress drivers and modulators in obesity and cardiovascular disease: from biomarkers to therapeutic approach. *Curr Med Chem* 2015;22:582–95.
 44. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011;164:899–904.
 45. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61.
 46. Rahimi RS, Landaverde C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: clinical implications and treatment. *Nutr Clin Pract* 2013;28:40–51.
 47. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:378–400.
 48. Fujihara S, Mori H, Kobara H, et al. Metabolic syndrome, obesity, and gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:483623.
 49. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38.
 50. Solá E, Navarro S, Medina P, et al. Activated protein C levels in obesity and weight loss influence. *Thromb Res* 2009;123: 697–700.
 51. Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *Omics* 2008;12:251–61.
 52. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, et al. Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction. *Eur J Nutr* 2009;48:341–7.
 53. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:355–62.
 54. Kuennen MR. Interaction between race and weight loss intervention strategy: effect on markers of inflammation and fat distribution in overweight women. *Obesity* 2012;20:1335–6.
 55. You JS, Park JY, Zhao X, et al. Relationship among serum taurine, serum adipokines, and body composition during 8-week human body weight control program. *Adv Exp*

- Med Biol 2013;776:113–20.
56. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39–58.
 57. Vrieze A, van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913–6.
 58. Diamant M, Blaak EE, de Vos WM. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obes Rev* 2011;12: 272–81.
 59. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022–3.
 60. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58–65.
 61. Arora T, Singh S, Sharma RK. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 2013;29:591–6.
 62. Park DY, Ahn YT, Huh CS, et al. Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2013;19:274–83.
 63. Toop C, Gentili S. Fructose beverage consumption induces a metabolic syndrome phenotype in the rat: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2016;8:E577.
 64. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 2012;28:539–43.
 65. Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, et al. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr Microbiol* 2011;62:1689–96.
 66. Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br J Nutr* 2003;90:449–56.
 67. Bolca S, van de Wiele T, Possemiers S. Gut metabolites govern health effects of dietary polyphenols. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:220–5.
 68. Di Francesco V, Antonioli A, Fantin F, et al. Nel soggetto anziano il contenuto di grassi del pasto influenza il profilo degli ormoni e il senso di fame postprandiali. *Biochim Clin* 2010;34:331–6.
 69. Zoico E, Rossi A, Zamboni M. Adipocitochine e complicanze metaboliche dell'obesità. *Biochim Clin* 2010;35:10–9.
 70. Tozzoli R. Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica. *RIMeL/IJLaM* 2010;6(suppl):18–23.
 71. Lee MC. Assessment of oxidative stress and antioxidant property using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *J Clin Biochem Nutr* 2013;52:1–8.
 72. Khoo NK, Cantu-Medellin N, Devlin JE, et al. Obesity-induced tissue free radical generation: an in vivo immunospin trapping study. *Free Radic Biol Med* 2012;52:2312–9.
 73. Gletsu-Miller N, Hansen JM, Jones DP, et al. Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight loss surgery. *Obesity* 2009;17:439–46.
 74. Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V. Indici di laboratorio di stress ossidativo. *Ligand Assay* 2009;14:41–50.
 75. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998;44:1309–15.
 76. Lorgis L, Zeller M, Dentan G, et al. The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010;213:616–21.
 77. Pavlatou MG, Papastamataki M, Apostolakou F, et al. FORT and FORD: two simple and rapid assays in the evaluation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab Clin Exper* 2009;58:1657–62.
 78. Tang PH, Miles MV, De Grauw A, et al. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Clin Chem* 2001;47:256–65.
 79. Serru V, Baudin B, Ziegler F, et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:1321–4.
 80. Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, et al. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem* 2013;288:1979–90.
 81. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K, et al. Plasma biomarkers of oxidative and AGE-mediated damage of proteins and glycosaminoglycans during healthy ageing: a possible association with ECM metabolism. *Mech Ageing Dev* 2012;133:538–48.
 82. Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000;72:1082–7.
 83. Li YS, Song MF, Kasai H, et al. 8-hydroxyguanine in urine and serum as an oxidative stress marker: effects of diabetes and aging. *J UOEH* 2013;35:119–27.
 84. McGrath LT, McGleenon, Brennan S, et al. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *Q J Med* 2001;94:485–90.
 85. Parra D, Bandarra NM, Kiely M, et al. Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *Eur J Nutr* 2007;46:460–7.
 86. Wiswedel I, Peter D, Gardemann A, et al. Serum concentrations of F2-isoprostanes and 4-hydroxynonenal in hemodialysis patients in relation to inflammation and renal anemia. *Biomark Insights* 2008;3:419–28.
 87. Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, et al. Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy* 2015;66:393–405.