

Indici di laboratorio di stress ossidativo (Rassegna)

Maria Franzini¹, Irene Fornaciari¹, Vanna Fierabracci²

¹Scuola Superiore Sant'Anna, ²Dip. di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche ed Infettivologia, Università di Pisa

RIASSUNTO *Lo stress ossidativo e nitrosativo è un fenomeno ricorrente in molte malattie acute e croniche oltre che nel fisiologico processo d'invecchiamento. Tuttavia non è ancora stato possibile stabilire l'effettivo ruolo delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto nella patologia umana. Per questo motivo è necessario individuare dei marcatori validi di stress ossidativo, che permettano di distinguere i processi biologici fisiologici da quelli patologici e di monitorare la risposta ad un intervento terapeutico. In questa rassegna sono discussi i marcatori di stress ossidativo/nitrosativo più comunemente utilizzati per i quali sono disponibili anche tecniche basate sull'utilizzo di anticorpi.*

Parole chiave: Stress ossidativo; Stress nitrosativo; Marcatore

ABSTRACT *Oxidative stress laboratory indexes. Oxidative/nitrosative stress is now recognized to be a prominent feature of many acute and chronic diseases and even of the normal aging process. However, the effective role of the reactive oxygen and nitrogen species in human pathology has not been defined yet. For that reason is necessary to identify markers of oxidative/nitrosative stress to distinguish normal biological processes from pathogenic one and to monitor responses to therapeutic interventions. In this review, some of the more commonly used markers of oxidative/nitrosative stress, for which immunological assays are available, are discussed.*

Key words: Oxidative stress, Nitrosative stress, Marker

INTRODUZIONE

La presenza di stress ossidativo e nitrosativo descrive una condizione risultante dall'alterazione dell'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e la disponibilità di difese antiossidanti. La principale conseguenza di questo fenomeno è il danno molecolare a carico degli acidi nucleici, dei lipidi e delle proteine che può alterare o compromettere il metabolismo e la vitalità cellulare fino a indurre necrosi o apoptosi. Le ROS e le RNS (Tab. 1) sembrano essere implicate in molti processi patogenetici di malattie umane acute e croniche, come discusso nell'articolo "Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana" di questa parte monografica, tuttavia le difficoltà tecniche nel misurare direttamente le ROS e le RNS non hanno ancora permesso di stabilire il loro effettivo ruolo nella patologia umana. L'analisi diretta delle ROS/RNS è estremamente difficile^{1,2} a causa della loro elevata reattività e breve emivita (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-9} sec rispettivamente per il radicale superossido, l'ossigeno singoletto e il radicale idrossile) l'unica tecnica in grado di evidenziare queste ultime è la spettroscopia di risonanza di *spin* dell'elettrone associata a metodi di *spin trap*, ma questa tecnica non è applicabile nell'ambito clinico diagnostico per la sua complessità^{1,2}.

Lo studio dello stress ossidativo si avvale principalmente di metodi in grado di rilevare le alterazioni indotte su proteine, lipidi e DNA (Tab. 2). Anche la diminuzione delle molecole con capacità antiossidante, ad esempio il glutatione e le vitamine lipo- e idrosolubili, è considerata un marcatore indiretto di stress ossidativo sebbene sia più soggetto all'interferenza della dieta.

Le tecniche utilizzate spaziano dai più semplici saggi spettrofotometrici a quelle più complesse che prevedono l'utilizzo di cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC), gas cromatografia e spettrometria di massa; in questi ultimi anni sono stati messi a punto anche alcuni saggi ELISA. Sono disponibili molteplici procedure per l'analisi dei marcatori indiretti di stress ossidativo sia nei fluidi biologici (sangue, urine, saliva), principalmente usati

Tabella 1
Principali specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto

Ossigeno singoletto	$^1\text{O}_2$
Anione superossido	O_2^-
Perossido di idrogeno	H_2O_2
Radicale idrossile	$\text{HO}\cdot$
Radicale peridrossile	$\text{HO}_2\cdot$
Radicale alcossile	$\text{RO}\cdot$
Radicale idroperossile	$\text{ROO}\cdot$
Acido ipocloroso	HClO
Acido ipobromoso	HBrO
Ozono	O_3
Monossido di azoto	NO
Diossido di azoto	NO_2
Perossinitrito	NO_3^-

Stress ossidativo

Tabella 2

Alcuni marcatori di stress ossidativo quantificabili nei tessuti e fluidi biologici (plasma, siero, urine) generati dall'interazione delle ROS/RNS con molecole biologiche^{3,4}.

Molecola bersaglio	Marcatore	Metodo di analisi	
Proteine	Carbonili	Spettrofotometria	
		ELISA	
		Western blot	
		immunoistochimica	
		NO ₂ -Tyr	GC-MS
		Cl-Tyr	ELISA
	Br-Tyr	Western blot	
		immunoistochimica	
	Tyr-Tyr	Triplo-quadrupolo LC-APCI-MS/MS	
		AGE	ELISA
Lipidi	neopeptidi	Western blot	
		immunoistochimica	
	Prodotti di ossidazione di singoli aminoacidi		
	MDA e TBARS	Spettrofotometria (TBA-Test)	HPLC-fluorimetria (TBA-test)
			ELISA
			immunoistochimica
			4-HNE
		immunoistochimica	
		Dieni coniugati	Spettrofotometria
		F ₂ -isoprostani	GC-MS
ELISA			
Lipoperossidi	RIA		
	GC-MS		
LDL-ossidate	spettrofotometria		
	Immunoistochimica		
DNA	8-OHdG	ELISA	
		GC-MS	
	Basi ossidate	HPLC	
	Rottura della doppia elica	Saggio delle comete	

Abbreviazioni: AGE: composti finali di glicazione; Br-Tyr: 3bromo-tirosina; Cl-Tyr: 3-cloro-tirosina; GC-MS: gas cromatografia-spettrometria di massa; GSH: glutazione ridotto; GSSG: glutazione ossidato; 4-HNE: 4-idrossinonemale; LC-APCI-MS: cromatografia liquida-*atmospheric pressure chemical ionization*-spettrometria di massa; MDA: malonildialdeide; 8-OHdG: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; NO₂-Tyr: 3-nitro-tirosina; TBA: acido tiobarbiturico; TBARS: sostanza reattiva al TBA

negli studi sull'uomo, che nei tessuti, sfruttati per lo studio approfondito di modelli animali.

In questa rassegna sono presi in particolare considerazione i marcatori di stress ossidativo più utilizzati negli studi condotti sull'uomo per i quali sono disponibili anche tecniche basate sull'utilizzo di anticorpi^{3,4}.

Per le tecniche di determinazione del monossido di azoto e dei suoi derivati si rimanda in maniera più dettagliata all'articolo "Metodi di Dosaggio dell'NO e dei suoi derivati" di questa monografia.

BIOMARCATORI DI OSSIDAZIONE DELLE PROTEINE

Il processo di ossidazione delle proteine generalmente comporta l'introduzione di nuovi gruppi funzionali che possono contribuire ad alterare la funzione e il metabolismo delle stesse⁵.

Gli studi sulle modificazioni ossidative delle proteine hanno dimostrato una serie di conseguenze irreversibili incluse frammentazione, alterazione della struttura tridimensionale, aggregazione, che comportano perdita funzionale^{5,6}. Il destino di queste molecole è generalmente la degra-

dazione da parte del proteosoma o dei lisosomi, ma in alcuni casi si formano aggregati che si accumulano all'interno o all'esterno della cellula insensibili alla degradazione.

I residui aminoacidici più sensibili all'ossidazione sono quelli contenenti gruppi aromatici o tiolici, ma anche i residui alifatici sono soggetti a fenomeni di ossidazione con generazione di gruppi carbonilici.

I principali biomarcatori di ossidazione delle proteine sono i gruppi carbonilici e i prodotti di ossidazione della tirosina (Tyr), entrambi discussi nei prossimi paragrafi. Altri marcatori³ sono a) gli idroperossidi e perossidi proteici degli aminoacidi valina (Val), leucina (Leu), lisina (Lys); b) la chinurenina, metabolita di ossidazione del triptofano (Trp); c) la metionina-solfossido e la metionina-sulfone; d) i disolfuri della cisteina. Per questi ultimi marcatori non sono stati sviluppati metodi immunologici e la loro validità come marcatori di stress ossidativo è limitata dalla scarsa stabilità del campione e, nel caso dei gruppi tiolici, dalla reversibilità del processo di ossidazione³.

Carbonili proteici

I gruppi carbonilici sono un generico prodotto di ossidazione delle biomolecole, sulle proteine possono essere generati tramite ossidazione diretta degli aminoacidi prolina (Pro), arginina (Arg), Lys, e treonina (Thr) da parte di radicali liberi, oppure in conseguenza a fenomeni di lipoperossidazione (LPO), legame di α - β -aldeidi insature su residui di istidina (His), Lys, cisteina (Cys) o di glicazione/glicossidazione (reazione tra un carboidrato e un amino-gruppo proteico) con formazione dei composti finali di glicazione⁷⁻⁹ (Fig. 1).

La formazione di gruppi carbonilici sulle proteine è considerato un marcatore di stress ossidativo severo e generalizzato, dalla sua analisi non è possibile estrapolare quale sia l'origine delle ROS/RNS responsabili delle reazioni pro-ossidanti, d'altra parte rappresentano un prodotto di ossidazione chimicamente stabile addirittura nell'arco di 10 anni se il campione è conservato a -80°C ¹⁰.

La misura totale dei carbonili proteici può essere condotta su campioni di plasma, siero, lisati cellulari, proteine purificate e prevede la derivatizzazione di tali gruppi con il composto dinitrofenil-idrazina (DNPH). Dalla reazione si genera un cromoforo idrazone con un picco di assorbimento a 360 nm e un coefficiente di estinzione molare di $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^{11,12}. La determinazione spettrofotometrica

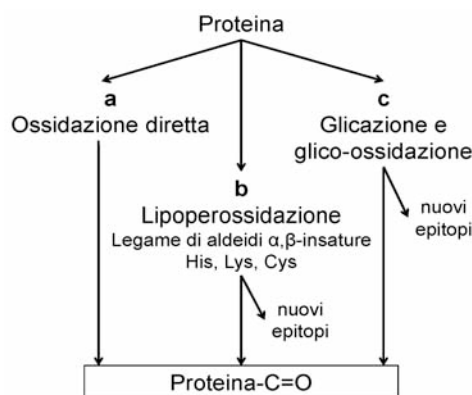


Figura 1

Tre possibili vie di ossidazione delle proteine con conseguente introduzione di gruppi carbonilici e formazione di nuovi epitopi.

diretta è poco utilizzata perché non fornisce informazioni sull'identità delle proteine ossidate, per questo è piuttosto associata a tecniche cromatografiche o elettroforetiche (SDS-PAGE, bidimensionale) per la separazione delle proteine. In quest'ultimo caso la derivatizzazione dei gruppi carbonilici con DNPH è condotta dopo trasferimento delle proteine su membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro) e la rivelazione avviene con l'ausilio di anticorpi specifici che riconoscono il gruppo dinitrofenile (DNP)^{11,13}. Gli anticorpi contro il gruppo DNP sono stati utilizzati anche per sviluppare tecniche ELISA^{11,14} per la quantificazione dei gruppi carbonilici e tecniche di immunoistochimica per localizzare nel tessuto il danno ossidativo^{15,16}.

Un accumulo di carbonili proteici è stato dimostrato nell'invecchiamento cellulare, nel danno da ischemia/riperfusion, nelle infiammazioni croniche, nella fibrosi cistica¹⁷.

Prodotti di ossidazione della Tyr

L'aggregazione proteica è una conseguenza frequente dei fenomeni di ossidazione, ad essa potrebbe contribuire la formazione dei dimeri di Tyr (di-Tyr), tuttavia alcuni autori hanno dimostrato che la formazione del dimero è significativa solo nelle metallo-proteine nelle quali l'intermedio radicalico di reazione è stabilizzato dallo ione metallico associato¹⁸. I principali prodotti di addizione all'anello fenolico della Tyr (Fig. 2), sia come aminoacido libero che facente parte di una proteina, sono: a) L-DOPA, generata dalla reazione con il radicale idrossile; b) 3-cloro-Tyr e 3,5-dicloro-Tyr, prodotto di reazione con l'acido ipocloroso (HClO); c) 3-bromo-Tyr e 3,5-dibromo-Tyr, prodotto di reazione con l'acido ipobromoso (HBrO); d) 3-nitro-Tyr (NO_2^- Tyr), che si forma in seguito a reazione con il monossido di azoto (NO) o l'anione perossinitrito (NO_3^-).

I prodotti di ossidazione delle Tyr rappresentano un marcatore di danno radicalico diretto sulle proteine/aminoacidi a differenza dei gruppi carbonilici che possono generarsi in conseguenza a LPO e glicossidazione. D'altra parte l'analisi dei prodotti di ossidazione delle Tyr è

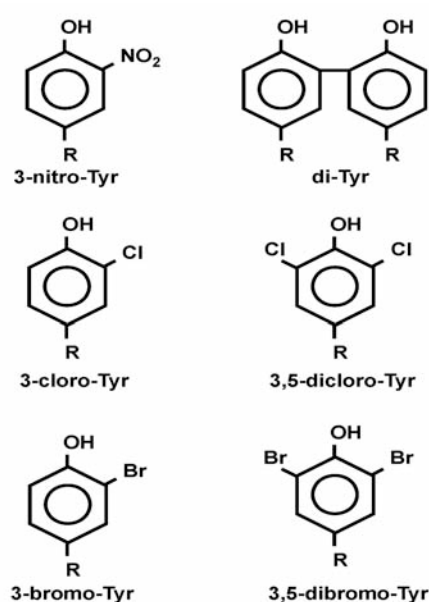


Figura 2

Formule di struttura di alcuni dei prodotti di ossidazione dell'aminoacido tirosina.

più complicata perché solo le tecniche di cromatografia liquida o gas cromatografia associate a spettrometria di massa garantiscono una sufficiente specificità e sensibilità per la rivelazione e quantificazione di queste molecole. Inoltre è necessario utilizzare uno standard interno per valutare eventuali alterazioni dovute alla manipolazione del campione^{4,19-22}.

La cloro-Tyr, bromo-Tyr e in parte la NO₂-Tyr rappresentano prodotti di ossidazione di origine infiammatoria in quanto i macrofagi e i neutrofilii attivati rilasciano anione superossido e NO con successiva formazione di perossinitrito, i neutrofilii producono anche HClO tramite una reazione catalizzata dall'enzima mieloperossidasi^{23,24}, mentre gli eosinofili attivati sono una fonte di HBrO²⁵. Maggiori concentrazioni di Tyr alogenata e nitrosata sulle proteine plasmatiche sono state individuate in varie malattie di origine infiammatoria, quali l'asma, la sindrome da *distress* respiratorio dell'adulto (ARDS), fibrosi cistica, malattia renale cronica, artrite reumatoide, diabete di tipo 1 e 2, aterosclerosi⁴. Queste stesse modificazioni della Tyr sono state riscontrate su lipoproteine LDL e HDL circolanti e isolate da placche aterosclerotiche²⁶⁻²⁹. Rispetto a una popolazione di controllo, pazienti con malattia coronarica presentano una maggiore concentrazione plasmatica di NO₂-Tyr, che si riduce invece nei soggetti in trattamento con statine (inibitori dell'enzima idrossimetilglutaril-CoA reduttasi) a ulteriore conferma degli effetti antiinfiammatori di questa categoria di farmaci^{30,31}.

Per la NO₂-Tyr sono stati sviluppati anche anticorpi specifici da utilizzare in western-blot e tecniche ELISA per rivelare e quantificare la NO₂-Tyr in campioni di plasma, siero, urine, omogenato cellulare³². Queste tecniche sono di più facile esecuzione, ma devono essere considerate semiquantitative perché manca ancora un'adeguata standardizzazione.

Uno dei principali svantaggi della misura della NO₂-Tyr nel plasma è rappresentato dal fatto che le proteine nitrosate tendono a essere degradate³³, la NO₂-Tyr rilasciata reagisce con l'acido 4-idrossifenil acetico (PHPA, un metabolita della Tyr) presente in circolo per formare l'acido 3-nitro-4-idrossifenilacetico (NHPA) secreto nelle urine. Tuttavia il NHPA può derivare anche dalla nitratura diretta del PHPA, la cui concentrazione plasmatica è circa 400 volte più alta di quella della NO₂-Tyr libera. Perciò il PHPA non può essere considerato un marcatore esclusivo per la nitratura delle proteine, ma potrebbe essere valutato come indice di stress nitrosativo³⁴. Per la cloro-Tyr e la bromo-Tyr non sono ancora conosciute le vie per il loro catabolismo. Recentemente è stato pubblicato uno studio realizzato su ratti nel quale è stato dimostrato che all'infusione di cloro-Tyr deuterata segue la presenza nelle urine di acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico (4% della cloro-Tyr infusa), di acido 4-idrossifenilacetico (40% del totale) e tirosina (1%). In base a questi dati è stato ipotizzato che nei mammiferi una delle principali vie per eliminare la cloro-Tyr libera preveda la sua dechlorazione, mentre non ci sono ancora evidenze sperimentali sul destino delle proteine clorinate³⁵.

Formazione di neoepitopi sulle proteine ossidate, studi di immunoistochimica

In seguito alle modificazioni strutturali e all'introduzione di nuovi gruppi funzionali, le proteine ossidate acquisi-

scono nuove proprietà antigeniche.

È stata, infatti, dimostrata la presenza di epitopi specifici sulle proteine di lipoproteine LDL ossidate (ox-LDL) dovuti, almeno in parte, alla presenza di aldeidi derivate dal processo di LPO lipidica, quali la malonaldeide (MDA) e la 4-idrossinonenale (4-HNE). Anticorpi mono e policlonali contro le ox-LDL sono stati utilizzati per la dimostrazione istochimica della presenza di ox-LDL all'interno di lesioni aterosclerotiche³⁶⁻³⁸.

Anche la reazione tra le proteine e HClO comporta la formazione di nuovi epitopi (Cl-Tyr e cloro-ammine), LDL modificate con HClO sono state utilizzate per ottenere anticorpi monoclonali specifici per riconoscere le proteine così modificate e questi anticorpi sono stati utilizzati per studi di immunoistochimica su lesioni aterosclerotiche umane³⁹ e nelle malattie infiammatorie degenerative renali⁴⁰.

Le reazioni di glico-ossidazione introducono nuove strutture antigeniche, tra le quali la più rappresentata è la N-epsilon-(carbossimetil)-lisina⁴¹, anche in questo caso anticorpi monoclonali specifici sono stati utilizzati per studi di localizzazione tissutale in varie malattie con una forte componente infiammatoria⁴²⁻⁴⁵.

Infine, come già descritto, anche la nitratura di proteine comporta la formazione di un nuovo epitopo (NO₂-Tyr) per il quale sono stati prodotti anticorpi specifici⁴⁶⁻⁴⁷.

BIOMARCATORI DI OSSIDAZIONE DEI LIPIDI

I fosfolipidi di membrana e i trigliceridi nelle lipoproteine LDL sono particolarmente suscettibili ad attacco radicalico. Il processo di ossidazione dei lipidi, LPO, ha inizio con la sottrazione di un atomo d'idrogeno da un gruppo metilenico adiacente a un doppio legame di un acido grasso polinsaturo (PUFA), si forma così un radicale centrato su un atomo di carbonio. Dal riarrangiamento del doppio legame si forma un diene coniugato, mentre l'ossigeno molecolare presente reagisce con il radicale centrato sul carbonio formando un radicale perossile che a sua volta reagisce con un altro PUFA formando un idroperossido e un nuovo radicale centrato sul carbonio (Fig. 3). Gli idroperossidi lipidici possono reagire ulteriormente e formare perossidi ciclici, endoperossidi ciclici, aldeidi α,β -insature come la 4-idrossi nonenale (4-HNE), la acroleina, e la malonildialdeide (MDA) (Fig. 4). Oltre alle aldeidi altri prodotti terminali della LPO sono il pentano e l'etano, i dieni 2,3 trans-coniugati, gli isoprostani e i colesterolo-ossidi.

Le aldeidi prodotte nella LPO, sono molecole chimicamente reattive e in grado di reagire e formare legami covalenti con le proteine e gli acidi nucleici, perciò contribuiscono ad amplificare il danno radicalico.

Idroperossidi lipidici e aldeidi possono essere assorbiti anche con la dieta e quindi escreti con le urine. Perciò la misura di queste specie nel plasma e nelle urine non può essere considerata un buon indice di LPO, a meno che non ci sia un stretto controllo sulla dieta.

Malonildialdeide e 4-idrossi nonenale

Uno dei metodi più frequentemente utilizzato per valutare il grado di LPO *in vivo* è la quantificazione della MDA nel plasma o nelle urine con il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA). Il saggio fu inizialmente sviluppato per determinare il grado di perossidazione lipidica nei cibi quale indi-

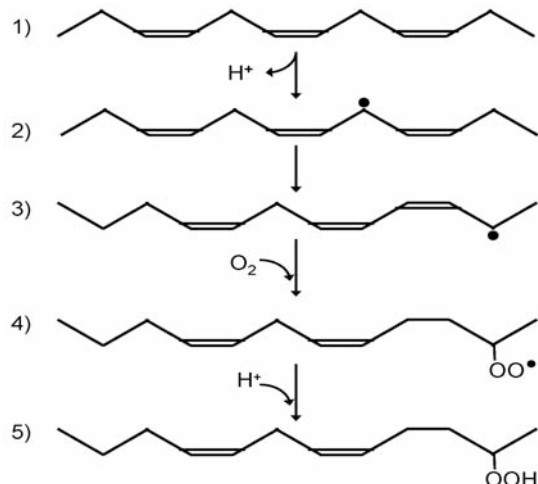


Figura 3

Sequenza delle reazioni nel processo di LPO: 1) sottrazione di un atomo di idrogeno da un acido grasso polinsaturo; 2) formazione di un radicale centrato sul carbonio; 3) riarrangiamento del doppio legame e formazione di un diene coniugato; 4) reazione tra l'ossigeno molecolare e il radicale sull'atomo di carbonio con formazione di un radicale perossile; 5) il radicale perossile reagisce con un altro acido grasso formando un idroperossido lipidico e un nuovo radicale centrato sul carbonio.

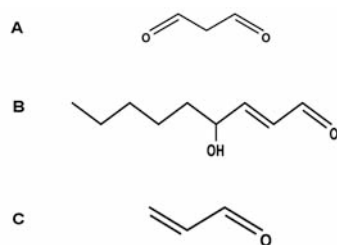


Figura 4

Formule di struttura di tre aldeidi prodotte nella LPO: A) malonildialdeide; B) 4-idrossinonenale; C) acroleina.

cattore di rancidità⁴⁹. In condizioni acide e a elevata temperatura (95°C) la MDA reagisce con il TBA in rapporto di 1 a 2, la concentrazione dell'addotto che si forma è determinata con lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 532 nm. La determinazione spettrofotometrica è semplice, ma non specifica poiché il TBA può reagire con altre sostanze, quali l'acetaldeide, la biliverdina, zuccheri riducenti^{49,50} che nel complesso costituiscono la sostanza TBA reattiva (TBA-reactive substance, TBARS). Per determinare in maniera specifica l'addotto è necessario separarlo dalle sostanze interferenti tramite cromatografia HPLC (colonna C8) associata a un rivelatore fluorimetrico operante alla lunghezza d'onda di eccitazione di 531 nm e di 553 nm per l'emissione⁵¹⁻⁵². È, inoltre, necessario ricordare che la MDA è anche un prodotto secondario del metabolismo dell'acido arachidonico e che è velocemente metabolizzata a biossido di carbonio e acido acetico dalle aldeidi deidrogenasi, perciò la determinazione della MDA con il saggio TBA non può essere considerato un test spe-

cifico per determinare *in vivo* il grado di LPO.

La 4-HNE è la principale aldeide generata in seguito all'attacco di radicali liberi su PUFA omega-6 (acido arachidonico, linoleico, linolenico)⁵³. La 4-HNE reagisce prontamente con proteine, peptidi, fosfolipidi e acidi nucleici, per formare addotti stabili secondo la reazione di addizione di Michael che comporta l'introduzione di nuovi gruppi carbonilici⁵⁴. La 4-HNE libera è metabolizzata in vari modi dalla cellula, può essere ridotta ad alcool dall'aldoso reduttasi, ossidata ad acido carbossilico dall'aldeide deidrogenasi o può formare complessi con il glutatione (GSH) spontaneamente o per l'azione di GSH-transferasi. I coniugati del GSH sono degradati ad acidi mercapturici secreti nelle urine⁵⁵.

Gli addotti delle aldeidi MDA e la 4-HNE con le proteine, ma anche con gli acidi nucleici, possono essere rivelati con specifici anticorpi applicati a tecniche ELISA, di immunostochimica e western-blot. Anche con queste tecniche non è possibile quantificare il danno ossidativo sui lipidi, permettono però di verificare in quali tessuti si è verificata LPO, fermo restando la necessità di una preparazione di controllo con il quale valutare la presenza fisiologica di MDA e 4-HNE.

La presenza di 4-HNE e MDA legate a proteine è stata verificata nelle placche aterosclerotiche⁵⁶, nella placca amiloide del morbo di Alzheimer^{57,58}, nei depositi di amiloide nei pazienti con amiloidosi sistemica⁵⁹. Una maggiore concentrazione di 4-HNE è stata riscontrata anche in pazienti con il morbo di Parkinson⁶⁰ e nel fluido cerebrospinale di pazienti con sclerosi laterale amiotrofica⁶¹. Le proteine neuronali sono particolarmente sensibili all'azione citotossica della 4-HNE⁶².

F2-Isoprostani

Una particolare classe di composti generati durante LPO a carico dell'acido arachidonico sono gli isoprostani. Inizialmente gli isoprostani sono formati come acidi grassi esterificati ai fosfolipidi colpiti da attacco radicalico, poi sono rilasciati in circolo per azione di fosfolipasi di membrana⁶³. In particolare gli F₂-isoprostani (F₂-IsoPs) (Fig. 5) sono la classe più studiata come marcatore di LPO per le seguenti ragioni: a) aumentano in funzione del grado di stress ossidativo⁶⁴⁻⁶⁶; b) le tecniche di analisi a disposizione (gas-cromatografia e cromatografia liquida associata a spettrometria di massa^{64,67}, RIA⁶⁴) permettono di misurare concentrazioni picomolari; c) sono chimicamente stabili nei campioni di fluidi biologici; d) non sembrano essere influenzati dai lipidi contenuti nella dieta^{68,69}; e) sono un prodotto specifico di LPO radicalica e non un prodotto secondario del metabolismo dell'acido arachidonico da parte delle ciclo- e lipo-ossigenasi⁷⁰.

Il plasma è ricco di lipidi e di acido arachidonico, per evitare la formazione di F₂-IsoPs *ex vivo* è consigliabile aggiungere un antiossidante (ad es. il butilidrossitoluene e la trifenilosfina) e conservare il campione a -80°C⁶⁷. Inoltre gli F₂-IsoPs in circolo sono presenti sia liberi che esterificati ai fosfolipidi delle lipoproteine, per quantificare questi ultimi è necessario un processo di idrolisi per ottenerli in forma libera. La emivita degli F₂-IsoPs nel plasma è di circa 18 minuti, quindi la concentrazione plasmatica rappresenta una situazione di equilibrio tra produzione ed eliminazione³.

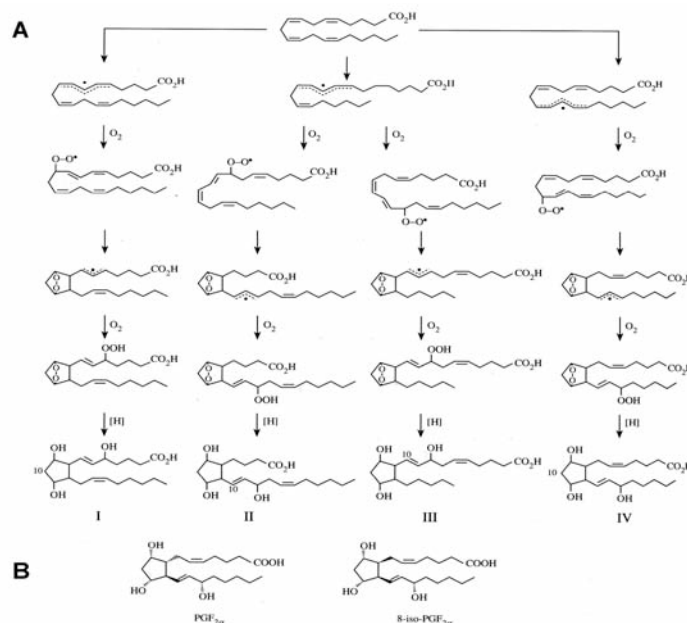


Figura 5

Formazione di F₂-IsoPs dall'acido arachidonico³. A) dall'alto: attacco radicalico e sottrazione di un atomo di idrogeno da tre diverse posizioni. In seguito a reazione con O₂, si formano quattro radicali RO₂• che a loro volta reagiscono con il doppio legame per formare una struttura ciclica originando un nuovo radicale centrato sul carbonio che reagisce nuovamente con O₂. La riduzione dei radicali idroperossili genera 4 isomeri (I-IV). Ogni classe è composta da 16 stereoisomeri per un totale di 64 composti. B) i due F₂-IsoPs riprodotti sono isomeri strutturali della prostaglandina F_{2α}.

Nelle urine gli F₂-IsoPs sono solo in forma libera e il basso contenuto in lipidi riduce il rischio di auto-ossidazione, comunque è consigliata l'aggiunta di EDTA⁶⁷. Gli F₂-IsoPs nelle urine sono stabili e non ulteriormente metabolizzati, perciò se si vuole misurare la produzione di F₂-IsoPs nel tempo è necessario quantificarli nelle urine³.

La validità biologica degli F₂-IsoPs come indice di stress ossidativo è stata comprovata in varie condizioni cliniche, ad esempio nelle infiammazioni acute e croniche, nel danno da ischemia/riperfusion, nel diabete, nell'aterosclerosi^{63,64,71-75}. Recentemente è stato proposto che la concentrazione di 8-iso-PGF_{2-alfa}, il componente della famiglia di F₂-IsoPs più frequentemente misurato nelle urine, rappresenti un fattore indipendente di rischio per le malattie cardiovascolari⁷⁶.

In questi ultimi anni sono state sviluppate anche tecniche immunologiche (RIA, ELISA) per la quantificazione di F₂-IsoPs⁶⁴, ma sono ancora scarsi i dati riguardo l'accuratezza e la precisione di questi saggi e per ciò che concerne il confronto con la tecnica di riferimento (gas cromatografia-spettrometria di massa).

BIOMARCATORI DI OSSIDAZIONE DEL DNA

L'attacco delle ROS, in particolare del radicale idrossile, sugli acidi nucleici può causare mutazioni su specifiche basi e anche rottura della doppia elica. In questo stesso numero speciale, dedicato allo stress ossidativo, un articolo è proprio dedicato al ruolo del danno ossidativo agli acidi nucleici nella patogenesi delle malattie cardiovascolari. Per misurare i prodotti di ossidazione del DNA sono state messe a punto numerosi metodi cromatografici (in fase gassosa o liquida) seguiti da analisi in spettrometria

di massa, ma anche tecniche immunometriche^{3,71,77,78}. Il marcatore di danno ossidativo sul DNA più utilizzato è la 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG)^{3,71,78}, per il quale sono disponibili anche metodi ELISA competitivi per la sua quantificazione in estratti di tessuto o nei fluidi biologici⁷¹. Uno dei principali problemi nello studio del danno ossidativo al DNA è la limitata disponibilità di tessuto umano dal quale estrarre il DNA stesso. La maggior parte degli studi è condotta su DNA estratto da linfociti o dai leucociti totali presupponendo che costituiscano uno specchio per tutti gli altri tessuti⁷⁹.

Durante il processo di riparazione in vivo del DNA, e soprattutto in seguito alla degradazione degli acidi nucleici conseguente alla morte cellulare, la 8-OHdG viene liberata e secreta nelle urine sia come base singola sia inclusa in oligomeri di DNA senza ulteriori modifiche⁸⁰. Data la stabilità e la specificità, la concentrazione di 8-OHdG nelle urine è uno dei marcatori più affidabile per valutare il grado di stress ossidativo sistemico. Comunque bisogna considerare che la 8-OHdG può derivare anche dalla degradazione del deossinucleotide dGTP, e che non è l'unico prodotto di ossidazione del DNA. Quindi la 8-OHdG rappresenta una misura parziale di danno al DNA, relativa solo ai residui di guanina e ai suoi precursori⁸¹.

BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO

In molte condizioni patologiche è possibile riscontrare un aumento dello stress ossidativo, individuare un valido biomarcatore di questa condizione potrebbe aiutare a capire in quali malattie le ROS/RNS hanno un ruolo causale e quindi sviluppare strategie preventive per ritardare lo sviluppo della malattia (Tab. 3).

Tabella 3Marcatori di danno ossidativo associati ad alcune malattie umane^a

<i>Cancro</i>	<i>Morbo di Parkinson</i>
MDA	4-HNE
Rapporto GSH/GSSG	Rapporto GSH/GSSG
NO ₂ -Tyr	Carbonili proteici
8-OHdG	Ferro
<i>Malattie cardiovascolari</i>	<i>Danno da ischemia/riperfusion</i>
4-HNE	F2-Isoprostani
Rapporto GSH/GSSG	Rapporto GSH/GSSG
NO ₂ -Tyr	Aterosclerosi
F2-Isoprostani	MDA
Acroleina	4-HNE
<i>Artrite Reumatoide</i>	Acroleina
F2-Isoprostani	F2-Isoprostani
Rapporto GSH/GSSG	NO ₂ -Tyr
<i>Morbo di Alzheimer</i>	<i>Diabete mellito</i>
MDA	MDA
4-HNE	Rapporto GSH/GSSG
F2-Isoprostani	F2-Isoprostani
Rapporto GSH/GSSG	NO ₂ -Tyr
NO ₂ -Tyr	AGE
AGE	S-glutatioilazione

Abbreviazioni: AGE: composti finali di glicazione; GSH: glutazione ridotto; GSSG: glutazione ossidato; 4-HNE: 4-idrossinonale; MDA: malonildialdeide; 8-OHdG: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; NO₂-Tyr: 3-nitro-tirosina.

^aRiprodotta da Rif 82

Un biomarcatore è definito come una sostanza quantificabile, particolarmente resistente alla degradazione, utilizzata quale indicatore di un particolare stato biologico, normale o patologico, o come indice di risposta a una terapia farmacologica. Secondo questa definizione possono essere considerati marcatori di stress ossidativo sia prodotti di ossidazione delle biomolecole (acidi nucleici, lipidi, proteine) sia il consumo degli antiossidanti.

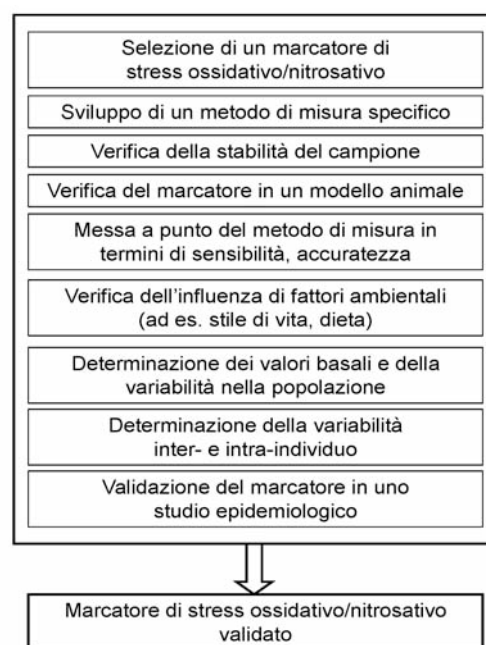
Il biomarcatore ideale di stress ossidativo dovrebbe³:

- essere un prodotto stabile nel tempo, non soggetto ad alterazioni durante la manipolazione e conservazione del campione,
- avere un ruolo nella patogenesi della malattia ed essere predittivo per lo sviluppo futuro della malattia
- essere presente nel tessuto d'indagine o in altro tessuto che comunque rifletta le modificazioni ossidative del primo,
- essere presente in concentrazione tale da essere quantificabile tramite una tecnica specifica, sensibile e riproducibile,
- non essere influenzato da fattori dietetici,
- avere una bassa variabilità biologica ed essere facilmente misurabile nella popolazione.

Nessuno dei marcatori attualmente disponibile soddisfa tutti i criteri elencati, quelli che più si avvicinano dal punto di specificità e stabilità del campione sono la 8-OHdG nelle urine, come marcatore di danno al DNA, gli F₂-isoprostani e i suoi metaboliti nelle urine, come indice di LPO, i prodotti di ossidazione delle Tyr per il danno sulle proteine.

Ad oggi manca ancora una sufficiente validazione analitica dei metodi di analisi dello stress ossidativo che prevede lo sviluppo di metodologie standard, la preparazione

di un adeguato materiale di riferimento e il controllo di qualità. Quindi andrebbero definiti i valori normali per stabilire il livello basale di stress ossidativo/nitrosativo conseguente al metabolismo fisiologico della cellula e successivamente stabilire la validità del biomarcatore con studi di popolazione (Fig. 6).

**Figura 6**

Criteri chiave del processo di validazione di un biomarcatore di stress ossidativo e nitrosativo.

Data la molteplicità dei bersagli delle ROS/RNS e il complesso metabolismo al quale vanno incontro i prodotti delle loro reazioni, è verosimile che l'insieme di più marcatori sia più informativo di uno solo, anche perché ognuno di essi rispecchia una sfaccettatura dell'intero fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

1. **Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB.** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286:R431-44
2. **Swartz HM, Bolton JR, Borg DC.** Biological applications of electron spin resonance. Wiley Interscience New York London. 1972
3. **Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, et al.** Biomarkers. *Mol Aspects Med.* 2002; 23:101-208
4. **Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al.** Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006; 52:601-23
5. **Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324:1-18
6. **Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:1151-63
7. **Stadtman ER, Berlett BS.** Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 1997; 10:485-94
8. **Burcham PC, Kuhan YT.** Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220:996-1001
9. **Vlassara H, Bucala R, Striker L.** Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest.* 1994; 70:138-51
10. **Stadtman ER, Levine RL.** Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003; 25:207-18
11. **Reznick AZ, Packer L.** Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63
12. **Levine RL, Wehr N, Williams JA, et al.** Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol.* 2000; 99:15-24
13. **Talent JM, Kong Y, Gracy RW.** A double stain for total and oxidized proteins from two-dimensional fingerprints. *Anal Biochem.* 1998; 263:31-8
14. **Buss H, Chan TP, Sluis KB, et al.** Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23:361-6
15. **Pompella A, Paolicchi A, Dominici S, et al.** Selective colocalization of lipid peroxidation and protein thiol loss in chemically induced hepatic preneoplastic lesions: the role of gamma-glutamyltranspeptidase activity. *Histochem Cell Biol.* 1996; 106:275-82
16. **Frank J, Pompella A, Biesalski HK.** Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:1096-105
17. **Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, et al.** Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; 9:169-76
18. **Wilks A, Ortiz de Montellano PR.** Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H₂O₂. *J Biol Chem.* 1992; 267:8827-33
19. **Duncan MW.** A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids.* 2003; 25:351-61
20. **Tsikis D, Caidahl K.** Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 814:1-9
21. **Tsikis D, Schwedhelm E, Stutzer FK, et al.** Accurate quantification of basal plasma levels of 3-nitrotyrosine and 3-nitrotyrosinoalbumin by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 784:77-90
22. **Orhan H, Vermeulen NP, Tump C, et al.** Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *J Chromatogr B* 2004; 799:245-54
23. **Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, et al.** Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 341:65-8
24. **Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, et al.** Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* 1998;391:393-7
25. **Wang J, Slungaard A.** Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445:256-60
26. **Hazen SL, Crowley JR, Mueller DM, et al.** Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:909-16
27. **Heinecke JW.** Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:1090-101
28. **Bergt C, Pennathur S, Fu X, et al.** The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:13032-7
29. **Pennathur S, Bergt C, Shao B, et al.** Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004;

- 279:42977-83
30. **Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, et al.** Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2003; 108:426-31
 31. **Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, et al.** Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003; 289:1675-80
 32. **ter Steege JC, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA, et al.** Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med.* 1998; 2:953-63
 33. **Souza JM, Choi I, Chen Q, et al.** Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380:360-6
 34. **Mani AR, Pannala AS, Orié NN, et al.** Nitration of endogenous para-hydroxyphenylacetic acid and the metabolism of nitrotyrosine. *Biochem J* 2003; 374:521-7
 35. **Mani AR, Ippolito S, Moreno JC, et al.** The metabolism and dechlorination of chlorotyrosine in vivo. *J Biol Chem.* 2007; 282:29114-21
 36. **Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, et al.** Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86, 1372-6
 37. **Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al.** Lipoproteins in normal and atherosclerotic aorta. *Eur Heart J.* 1990; 11 Suppl E:88-99
 38. **Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, et al.** Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation--a potential mechanism in atherosclerosis. *J Investig Med.* 1999; 47:151-60
 39. **Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, et al.** Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1996; 97:1535-44
 40. **Malle E, Woienckhaus C, Waeg G, et al.** Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *Am J Pathol.* 1997; 150:603-15
 41. **Ikeda K, Nagai R, Sakamoto T, et al.** Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. *J Immunol Methods.* 1998; 215:95-104
 42. **Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, et al.** Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* 1998; 51:515-9
 43. **Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, et al.** Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol.* 1998; 153:1149-55
 44. **Sun M, Yokoyama M, Ishiwata T, et al.** Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Pathol.* 1998; 79:207-22
 45. **Takayama F, Aoyama I, Tsukushi S, et al.** Immunohistochemical detection of imidazolone and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in aortas of hemodialysis patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998; 44:1101-9
 46. **Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, et al.** Excessive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 1994; 375, 81-8
 47. **Good PF, Werner P, Hsu A, et al.** Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1996; 149:21-8
 48. **Yu TC, Sinnhuber RO.** 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. *Food Technology* 1957; 11:104-8
 49. **Buege JA, Aust SD.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-10.
 50. **Moore K, Roberts LJ 2nd.** Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 1998; 28:659-71
 51. **Londero D, Lo Greco P.** Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma. *J Chromatogr A.* 1996; 729:207-10
 52. **Lykkesfeldt J.** Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem.* 2001; 47:1725-7
 53. **Uchida K.** 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42:318-43
 54. **Uchida K, Stadtman ER.** Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:4544-8
 55. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine. 1999 III ed. Oxford University Press New York
 56. **Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al.** Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989; 84:1086-95
 57. **Yan SD, Chen X, Schmidt AM, et al.** Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:7787-91
 58. **Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, et al.** Evidence that amyloid β -peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002; 23:655-64
 59. **Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, et al.** Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232:497-502
 60. **Jenner P.** Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53:S26-S36
 61. **Barnham KJ, Masters CL, Bush AI.** Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:205-14
 62. **Wataya T, Nunomura A, Smith MA, et al.** High mole-

- cular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J Biol Chem* 2002; 277:4644-8
63. **Roberts LJ and Morrow JD.** Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:505-13
64. **Morrow JD.** Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:279-86
65. **Pratico D, Lawson JA, Rokach J, et al.** The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12:243-7
66. **Pratico D, Rokach J, Lawson J, et al.** F2-Isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chem Phys Lipids.* 2004; 128:165-71
67. **Schwedhelm E, Boger RH.** Application of gas chromatography-mass spectrometry for analysis of isoprostanes: their role in cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 4:1552-61
68. **Richelle M, Turini ME, Guidoux R, et al.** Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett.* 1999; 459:259-62
69. **Higdon JV, Liu J, Du SH, et al.** Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)-isoprostanes. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:714-22
70. **Tsikas D, Schwedhelm E, Suchy MT, et al.** Divergence in urinary 8-iso-PGF(2{alpha}) (iPF(2{alpha})-III, 15-F(2t)-IsoP) levels from gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF(2{alpha}). Possible methodological, mechanistic and clinical implications. *J Chromatogr B.* 2003; 794:237-55
71. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142:231-55
72. **Cracowski JL, Durand T, Bessard G.** Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:360-6
73. **Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ.** Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 2004; 18:1791-800
74. **Janssen LJ.** Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280:L1067-82
75. **Montine TJ, Montine KS, McMahan W, et al.** F2-Isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:269-75
76. **Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, et al.** Urinary 8-iso-prostaglandin F2{alpha} as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation.* 2004; 109:843-8
77. **Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al.** Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:1102-15
78. **Collins AR, Cadet J, Moller L, et al.** Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423:57-65
79. **Halliwell B.** Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:968-74
80. **Lindahl T.** Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Prog. Nucleic Acid.* 2001. *Res. Mol. Biol.* 68, XVII-XXX
81. **Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al.** Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:1102-15
82. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84

Per corrispondenza:

Dott.ssa Maria Franzini
Istituto di Fisiologia Clinica – CNR
Via Moruzzi 1 - 56124 - Pisa
Tel.: 050 3153309 - Fax: 050 3152166
e-mail: m.franzini@sssup.it