

**Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS):
biochimica, patologia, prevenzione, laboratorio
Palermo, 25 Maggio 2005**

Cari Colleghi ed Amici,
siamo lieti di invitarVi a partecipare al Convegno su "Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS): biochimica, patologia, prevenzione, laboratorio" che avrà luogo a Palermo il 25 Maggio 2005.

Il Convegno si inquadra nell'ambito delle attività formative, scientifiche e di aggiornamento che la Cattedra e la Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Palermo congiuntamente alla Sezione Sicilia della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica organizza periodicamente.

Il Convegno si articolerà in 2 Sessioni Scientifiche dal titolo, rispettivamente, "ROS e Patologia" e "ROS: prevenzione e diagnostica", e vedrà la partecipazione di Docenti e Ricercatori che terranno relazioni sulle più recenti acquisizioni inerenti la biochimica e la fisiopatologia delle Specie Reattive dell'Ossigeno e della loro importanza in alcune patologie di larga incidenza come il processo arteriosclerotico e le malattie cardiovascolari, la neurodegenerazione, le neoplasie ed in alcuni processi fisiologici come la senescenza cellulare e l'invecchiamento.

I temi trattati sono tutti di grande interesse nella Medicina Clinica rappresentando le Specie Radicaliche dell'Ossigeno un importante fattore nella eziopatogenesi sia delle malattie cardiovascolari e delle neoplasie maligne che rappresentano, rispettivamente, la prima e seconda causa di mortalità, sia della patologia neurodegenerativa che è in costante aumento nella popolazione mondiale.

Il ruolo del clinico, del biochimico clinico e del nutrizionista deve essere finalizzato a ristabilire quelle condizioni che sono in grado di interferire positivamente sulle relazioni esistenti tra fattori pro-ossidanti, le difese antiossidanti e le relative patologie correlate allo stress ossidativo.

Con l'augurio di incontrarVi numerosi a Palermo e con l'auspicio che il Convegno si riveli per coloro che vi parteciperanno un proficuo evento culturale, Vi porgiamo molti cordiali saluti.

Prof. Marcello Ciaccio
Prof. Stefano Miccichè

Presidenti del Congresso

Biochimica e Fisiopatologia delle Specie Reattive dell'Ossigeno

Marcello Ciaccio, Lavinia Vocca, Antonietta Caruso, Tilde Petrigni, Maria Concetta Gueli*, Egidio Guglielmini e Concetta Scazzone

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

*Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli studi di Palermo

La natura, nella sua ampia e variegata fenomenologia, si presenta spesso a coloro che la studiano con comportamenti che, almeno in apparenza, sembrano paradossali e privi di immediato inquadramento razionale.

Tali fenomeni, invece, nella totalità dei casi una volta compresi rafforzano il convincimento che in natura nulla è lasciato al "caso" ma che tutto segue una logica ben precisa nel determinare un perfetto equilibrio; in definitiva quella omeostasi che permette da milioni di anni la vita sul nostro pianeta.

Tutto ciò è particolarmente palpabile nel campo dei fenomeni biologici dove meccanismi tra loro contrastanti sono spesso presenti nell'ambito di uno stesso organismo vivente e ne sono alla base del perfetto funzionamento in condizioni basali o ne rappresentano la propria capacità adattativa al variare delle condizioni dell'ambiente in cui esso vive.

Lo studio dell'ossigeno, una delle sostanze più abbondanti presenti in natura, e delle sue interazioni con i sistemi biologici che lo utilizzano ci ha posto sicuramente di fronte ad uno dei paradossi più eclatanti.

È ampiamente risaputo, fin dai classici esperimenti di Lavoisier, che non è possibile la vita in assenza di tale elemento (a parte pochi esempi rappresentati da forme di vita microbica), in quanto proprio grazie ad esso possono avvenire tutta una serie di eventi metabolici che culminano nella sintesi di una molecola, l'ATP. Questa rappresenta il comune denominatore per il verificarsi di tutta quella serie di meccanismi biochimici e fisiologici necessitanti di energia disponibile in modo immediato e continuo. L'organismo vivente è una entità termodinamica che deve la sua stessa vitalità alla capacità di mantenere elevato il suo stato entropico grazie all'apporto continuo di materiale nutritivo, il quale una volta metabolizzato fornisce l'energia sufficiente ad evitare il collasso termodinamico, ovvero la morte.

È, quindi, in questa visione che va inquadrato il ruolo fondamentale dell'ossigeno nell'ambito dell'organismo vivente.

In condizioni del tutto normali, nell'ambito di alcune reazioni metaboliche che si verificano nel nostro organismo, si formano delle sostanze dette per le loro caratteristiche chimiche "radicali liberi". Tali radicali sono caratterizzati dal fatto di possedere nell'ambito della loro configurazione elettronica un elettrone "spaiato", cioè un elettrone che occupa un determinato orbitale in maniera esclusiva senza dividerlo con un secondo elettrone avente spin opposto.

Tale condizione rappresenta uno stato di grande instabilità termodinamica, per cui l'ossigeno tende a raggiungere una situazione stabile catturando un elettrone da strutture vicine per poterlo accoppiare al proprio elettrone spaiato.

È chiaro che tale comportamento porterà ad un meccanismo a cascata in quanto le strutture che vengono private di un elettrone a loro volta si troveranno in una situazione di instabilità per cui anch'esse tenderanno a catturare elettroni da molecole limitrofe portando ad una amplificazione di tutto il fenomeno.

L'ossigeno è il principale responsabile della formazione dei radicali liberi e, quindi, mentre da una parte è essenziale per i fenomeni vitali dall'altra contribuisce, quando le difese diminuiscono o quando la produzione aumenta, a causare danni gravi ed irreparabili a livello delle proteine (1), del DNA (2) e delle membrane biologiche con aumento della perossidazione lipidica (Tab. 1) con inevitabile conseguente instaurarsi di processi patologici (3).

La possibilità per la molecola di ossigeno di raggiungere il suo equilibrio energetico è quella di operare una reazione di trasferimento di un elettrone per volta, passando attraverso una serie di intermedi altamente reattivi, quali il radicale superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossile (OH^\cdot).

Alcune di queste sostanze si formano durante il normale metabolismo (ad esempio nella catena respiratoria mitocondriale o nei leucociti) (4), altre si formano ad opera dell'azione fotodinamica della luce tramite la formazione dell'ossigeno singoletto (1O_2), altre ancora a causa di tossici introdotti nell'organismo dall'esterno (Tab. 2). Tali sostanze, una volta formate, qualora persistessero all'interno della cellula creerebbero una serie di danni biologici che porterebbero in brevissimo tempo alla morte cellulare per alterazione di molecole strutturali e funzionali.

Queste specie reattive dell'ossigeno si formano continuamente nel corpo umano e vengono costantemente rimosse dalle naturali difese antiossidanti.

Lo stress ossidativo si verifica quando la produzione di tali sostanze supera la capacità delle difese antiossidanti e/o quando se ne verifica un aumento della produzione (5).

In condizioni fisiologiche la produzione di radicali liberi dell'ossigeno non supera il 5% dell'ossigeno introdotto con la respirazione; tali concentrazioni non costituiscono un elemento patogenetico particolare.

Le specie reattive dell'ossigeno (6) sono implicate in oltre 100 malattie ed è stato dimostrato che queste svolgono un ruolo nella genesi del danno tissutale di molte condizioni morbose (7,8).

La cellula possiede una serie di meccanismi di difesa di varia natura che la proteggono dal danno ossidativo dei radicali e ne permettono il loro smaltimento o neutralizzazione (9). A tale protezione contribuiscono a vari livelli e con varia efficienza enzimi, vitamine, peptidi, oligoelementi e molecole varie che nell'insieme rappresentano uno scudo efficace ma incompleto nei confronti dell'insulto radicalico (Tab. 3).

I sistemi biologici sono, quindi, tutt'altro che indifesi nei confronti dell'insulto radicalico da parte dell'ossigeno, essendo in grado di proteggersi attraverso tutta una serie di meccanismi che non solo individualmente intervengono

Tabella 1*Danni da aumentata produzione di radicali liberi***a livello di proteine**

frammentazione e ossidazione - cross-linking - inattivazione di enzimi - malfunzionamento cellulare citolisi

a livello di DNA

mutagenesi

carcinogenesi

a livello di membrana con aumento della perossidazione lipidica con conseguente

tossicità da farmaci

danni da ri-perfusione post-ischemica

carcinogenesi

modificazioni di LDL

aterosclerosi ed infarto del miocardio

invecchiamento

sclerosi multipla

malattia di Parkinson

anemia di Fanconi

malattie autoimmuni

Tabella 2*Fonti di radicali liberi*

- esogene

- sostanze chimiche (Benzopirene, Paraquat, ecc.)
- farmaci (Streptonigrina, Doxorubicina, ecc.)
- sostanze reattive presenti nello smog (ozono, NO₂, gas di scarico) - agenti fotosensibilizzanti
- raggi ultravioletti
- radiazioni ionizzanti

- endogene

- le catene trasportatrici di elettroni mitocondriale e microsomiale
- sistemi enzimatici (xantina-ossidasi, triptofano-diossigenasi, monoaminoossidasi, prostaglandino- sintitesi)
- leucociti neutrofilici e macrofagi attivati

nel contrastare la minaccia ossidativa ma che sono in grado di interagire tra loro in una logica molecolare perfetta in modo da amplificare al massimo tale difesa.

Particolare importanza assume, quindi, la prevenzione nei confronti di queste sostanze e ciò può essere attuato mediante un attento monitoraggio di quelle che abbiamo definito "difese biologiche". Tra queste primaria importanza hanno le vitamine A (10,11,12,13,14,15,16,17), E (18,19) e C ed alcuni oligoelementi come il Selenio (20,21).

Il coinvolgimento in tali sistemi di difesa di nutrienti come vitamine ed oligoelementi rende intuibile come una alimentazione non carente di tali sostanze e ben equilibrata possa senz'altro essere determinante nel proteggere o ritardare al massimo tutti quei processi fisiologici o/e patologici frutto dei reiterati attacchi radicalici nel tempo alle strutture biologiche (Tab. 4).

Tutto ciò assume importanza ancora maggiore se consideriamo tutti i dati provenienti dalla letteratura scientifica che sempre con maggiore frequenza ci presentano relazioni più o meno dirette tra radicali liberi ed alcune patologie in un rapporto di causa-effetto (Tab. 5) (22).

Tabella 3
Difese biologiche nei confronti dei radicali liberi

difese antiossidanti primarie	- bilirubina
- superossido dismutasi	- ubiquinone 10
- catalasi	- molecole idrofile
- perossidasi	- GSH
- glutatione perossidasi Selenio - dipendente	- acido ascorbico
- glutatione perossidasi Selenio - indipendente	- carnosina
difese antiossidanti secondarie	- carnitina
- micronutrienti	- metaboliti del triptofano
- selenio	- acido urico
- rame	- farmaci
- manganese - zinco	- P-bloccanti
- molecole lipofili	- antiaritmici classe I
- vitamina E	- bloccanti i canali del calcio
- vitamina A	- ACE inibitori
- β -carotene	- anti-aterosclerotici
- vitamina K	- allopurinolo

Tabella 4
Fonti alimentari di:

- Vitamina A
● fegato e olio di fegato di merluzzo
● latte, burro, formaggi
● uova
● pesce
● carote, spinaci, cavoli, zucche
● albicocche, arance, meloni
- Vitamina E
● margarina
● olio di mais, di palme, di soia, di germe di grano
- Vitamina C
● verdure (cavolo verde, prezzemolo, cavolfiore, broccoli, asparagi, carote, spinaci, piselli, rapa, fagiolini)
● frutta (bacche di biancospino, fragole, arance, limoni, pompelmi, mandarini, ananas, mele, pesche)
● Selenio
● burro
● carne di maiale
● uova
● funghi
● peperoni rossi
● cipolle

Tabella 5

Situazioni fisiologiche e patologiche in cui è dimostrato il coinvolgimento dei radicali liberi

- invecchiamento	- reazioni allergiche
- tossicità da farmaci	- shock emorragico
- aterosclerosi e infarto del miocardio	- fibrosi epatica
- AIDS	- sindrome post-trapianto epatico
- sindrome da riperfusione post-ischemica	- degenerazione neuronale
- malattia diabetica	- malattia di Parkinson
- cataratta	- anemia di Fanconi
- carcinogenesi	- malattie autoimmuni
- modificazioni di LDL	- artrite reumatoide
- sclerosi multipla	- sindrome da distress respiratorio
- rettocolite ulcerosa	- malattie respiratorie

Bibliografia

1. Briganti S., Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003 Nov;17(6):663-9.
2. Bartsch H., Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(6):385-91.
3. Ginter E. Effect of free radicals and antioxidant on the vascular wall. *Vnitr Lek.* 2000 Jun;46(6):354-9.
4. Peake J., Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidativestress. *Exerc Immunol Rev.* 2004;10:129-41.
5. Abrescia P, Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Review of Cardiovascular Therapy.*
6. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.
7. Heffner J.E., Repine J.E. Antioxidants and the lung. 51-60.
8. Packer L., Valenza M., Serbinova E., Starke-Reed P., Frost K. and Hagan V. Free radical scavenging is involved in the protective effect of L-Propionyl-carnitine against ischemia-reperfusion injury of the heart. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288:533.
9. Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G., Cottrell B., MacGregor G.R., Wallace D.C. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med.* 2000 Mar 1;28(5):754-66.
10. Ciaccio M., Livrea M.A., Albiero R., Bongiorno A. and Tesoriere L. Vitamin A prevents peroxidative injury in rat tissues in vivo and decreases susceptibility to lipid peroxidation induced in subcellular membrane preparations in vitro. *It J Biochem.* 1993;42(2):97.
11. Ciaccio M., Tesoriere L., Bongiorno A. and Livrea M.A. Peroxidative brain damage by doxorubicin in rats, and prevention of the damage by pretreatment with Vitamin A. *Neurosci Lett.* 1992;S43:23.
12. Ciaccio M., Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi A. M., Livrea M. A. Vitamin A reduces membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. *Atti "Ist International Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL)".* Lugano, 30 Giugno - 3 Luglio 1993.
13. Ciaccio M., Tesoriere L., Pintaudi A.M., Re R., Bongiorno A., Livrea M.A. Role of vitamin A in the antioxidant defence of human LDL. *Atti "Riunione Annuale della Società Italiana di Biochimica - Sezioni Basilicata, Calabria, Campania, Molise, Puglia e Sicilia".* Caserta, 24-25 Marzo 1994.
14. Ciaccio M., Tesoriere L., Pintaudi A.M., Re R., Vailesi Cardillo S., Bongiorno A., Livrea M.A. Vitamin A preserves the cytotoxic activity of Adriamycin while counteracting its peroxidative effects in human leukemic cells in vitro. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;34(2):329.
15. Ciaccio M., Valenza M., Tesoriere L., Bongiorno A., Albiero R., Livrea M.A. Vitamin A inhibits doxorubicin-

induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. *Arch Biochem Biophys.* 1993;302(1):103.

16. Livrea M.A., Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi A.M., Ciaccio M., Riccio A. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(3):401.
17. Tesoriere L., Ciaccio M., Valenza M., Bongiorno A., Maresi E., Albiero R., Livrea M.A. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Therap.* 1994;269(1):430.
18. Petty M.A., Dow J., Grisar J. M., De Jong W. Effect of a cardioselective α -tocopherol analogue on reperfusion injury in rats induced by myocardial ischaemia. *European J Pharmacol.* 1991;192:383.
19. Jordao A.A. Jr, Chiarello P.G., Arantes M.R., Meirelles M.S., Vannucchi H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. *Food Chem Toxicol.* 2004 Mar;42(3):459-64.
20. Lamarche F., Signorini-Allibe N., Gonthier B., Barret L. Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol.* 2004 Jun;33(2):127-38.
21. El-Demerdash F.M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18(1):113-21.
22. Guan Z., Lui C.Y., Morkin E., Bahl J.J. Oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte induced by high-dose alcohol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Dec;44(6):696-702.

Stress Ossidativo ed Invecchiamento Cardiovascolare

Mario Barbagallo

Cattedra di Geriatria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

Nell'ultimo decennio numerosi studi sono stati rivolti a tentare di stabilire un nesso tra danni da radicali liberi e processo di invecchiamento. Secondo la teoria dello "Stress Ossidativo" proposta da Harman nel 1956, gli organismi aerobi producono con le diverse attività metaboliche cellulari una serie di radicali liberi. In condizioni fisiologiche circa l'1-5% dell'ossigeno consumato nelle normali attività metaboliche cellulari dai mitocondri viene convertito in specie reattive dell'ossigeno (ROS). Superossidi e perossidi promuovono poi la produzione di radicali idrossilici che reagiscono con tutti i componenti cellulari, incluse proteine, lipidi e DNA. L'accumulo di radicali liberi è controbilanciato da una complessa rete di sistemi antiossidanti di difesa. I maggiori antiossidanti naturali vengono assunti con la dieta, come vitamina C, vitamina E e carotenoidi. Altre sostanze antiossidanti (e.g. glutatione ed acido urico) sono prodotte dalle cellule e rilasciate in circolo.

Il sistema antiossidante di difesa è poi completato da una serie di enzimi antiossidanti, superossidodismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPX), catalasi. In diversi tessuti umani è stato riscontrato un progressivo aumento età-dipendente dei danni ossidativi a DNA, lipidi e proteine cellulari della perossidazione dei lipidi di membrana e l'accumulo di delezioni del DNA mitocondriale. La teoria dello "Stress Ossidativo" potrebbe essere correlata almeno parzialmente alla teoria della restrizione calorica in quanto sperimentalmente un ridotto apporto calorico-alimentare è in grado di consentire, almeno negli animali da esperimento un aumento della vita media. E' possibile che tale beneficio possa essere legato alla riduzione dello stress ossidativo. A conferma di tale ipotesi è noto che fattori proinfiammatori e/o che aumentano lo stress ossidativo come il sovrappeso e il fumo sono fattori fortemente predittivi di disabilità e patologia cardiovascolare.

Negli ultimi anni, una serie di studi hanno dimostrato che i radicali liberi giocano un ruolo nella patogenesi di un numero crescente di malattie. Un elevato stato ossidativo aumenta la suscettibilità dell'animale e dell'uomo anziano a malattie croniche che accompagnano il processo di invecchiamento, tra le quali le malattie cardiovascolari, l'arteriosclerosi e l'ipertensione. I livelli di pressione arteriosa e l'incidenza e prevalenza di ipertensione tendono ad aumentare con l'età.

E' oggi chiaro che l'ipertensione essenziale si associa ad una aumentata produzione di radicali liberi. Nonostante la relazione causa-effetto tra stress ossidativo ed ipertensione/malattie cardiovascolari sia ancora da stabilire, una aumentata formazione di ROS, indice di stress ossidativo, è stata osservata nell'ipertensione clinica e sperimentale, e la terapia antiossidante potrebbe avere effetti benefici nell'ipertensione ed in alcune malattie cardiovascolari. I meccanismi di difesa contro il danno ossidativo, come i livelli di vitamina E, glutatione, SOD sembrano essere ridotti nei soggetti ipertesi.

L'associazione clinica tra ipertensione, sovrappeso o obesità franca, e alterazioni del metabolismo glucidico è ben conosciuta e la stessa ipertensione essenziale è uno stato associato ad insulino-resistenza. Lo stress ossidati-

vo può contribuire all'instaurarsi dell' insulino-resistenza nell'uomo, e la produzione di radicali liberi che è aumentata nel diabete mellito di tipo 2, potrebbe essere implicata nella genesi delle complicazioni vascolari nei soggetti diabetici. E' stato ipotizzato che lo stress ossidativo possa essere alla base dello sviluppo parallelo delle diverse espressioni cliniche della sindrome da insulino-resistenza, come l' ipertensione e la riduzione della sensibilità insulinica. La carenza di vitamina E può causare una alterazione della funzione vascolare e della vasodilatazione endotelio-dipendente nell' ipertensione, e nel diabete, mentre la terapia antiossidante con vitamina E e/o con glutathione migliora la sensibilità insulinica e riduce la pressione arteriosa in soggetti ipertesi, in diabetici ed in anziani.

Studi nell'uomo hanno suggerito che lo stress ossidativo possa anche essere coinvolto nella patogenesi della cardiomiopatia diabetica. Le modificazioni del rimodellamento cellulare nel cuore diabetico sembrano essere associate ad alterazioni dello stress ossidativo. Il trattamento con vitamina E ha migliorato la performance cardiaca, ridotto lo stress ossidativo e migliorato la sensibilità insulinica.

E' stato ipotizzato un ruolo degli ioni cellulari nel danno cardiovascolare indotto dallo stress ossidativo.

L' ipomagnesemia cronica causa una eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Sostanze antiossidanti con un gruppo SH, come il glutathione, la metionina o il captopril proteggono le cellule dal danno ischemico legato alla carenza del Mg. Freedman ha dimostrato una correlazione tra suscettibilità del miocardio allo stress ossidativo e carenza di Mg e/o di vitamina E. Anche la vitamina E protegge dal danno miocardico e vascolare cerebrale indotto dalla carenza di Mg.

Un aumento delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina è stato associato ad un aumento del rischio cardiovascolare. Il meccanismo esatto con cui l' omocisteina causa il danno vascolare non è conosciuto.

E' stato proposto che un aumento dello stress ossidativo possa essere causa della disfunzione endoteliale e della malattia vascolare d' iperomocisteinemia. A confermare il legame tra iperomocisteinemia e stress ossidativo, dati della letteratura mostrano che l' alterazione acuta della funzione endoteliale legata all' iperomocisteinemia può essere prevenuta dalla somministrazione dell'antiossidante vitamina C.

Alti livelli di omocisteina infatti possono causare la produzione di H₂O₂ e di radicali liberi che in vivo sono causa della perossidazione lipidica. Esiste una correlazione significativa tra livelli circolanti di SOD ed omocisteina, ed è stato suggerito che sostanze antiossidanti possano proteggere dal danno ossidativo causato dalla omocisteina.

Dati recenti della letteratura mostrano che nelle popolazioni dei Paesi industrializzati, la tendenza all'avvicinamento della curva della disabilità a quella della mortalità, con una progressiva compressione della disabilità agli ultimi anni della vita. Tali dati suggeriscono anche la possibilità di ritardare e comprimere il processo di invecchiamento, e il possibile ruolo dello stress ossidativo in tale processo.

A confermare tale ipotesi gli elementi capaci di ritardare la curva della disabilità sono la restrizione calorica e l'attività fisica, influenzano e riducono l'entità dello stress ossidativo mentre l'iperomocisteinemia, il fumo, il sovrappeso, e l'ipertensione arteriosa, tra gli altri fattori di rischio cardiovascolari hanno un effetto pro-ossidante.

Stress Ossidativo e neurodegenerazione

Giovanni Savettieri, Marco D'amelio, Paolo Ragonese

Dipartimento di Neurologia, Oftalmologia, Otorinolaringoiatria e Psichiatria - Università degli Studi di Palermo

Le malattie neurologiche interessano nel mondo, insieme a quelle mentali, circa 450 milioni di individui. Come riportato dal rapporto "Global Burden of Disease" del World Health Organization (WHO) il peso o "burden" delle malattie neurologiche è enorme ed esse devono essere considerate tra i problemi sanitari con priorità assoluta. Secondo il WHO infatti nel 2020 si osserverà un aumento pari al 15%; del computo complessivo del carico assistenziale e sociale dovuto solo a queste patologie; tale aumento è legato ad una serie di fattori, come la morbilità associata alle stesse malattie, ma soprattutto all'allungamento della vita media e quindi ad un aumento del numero delle persone affette. Infatti, l'età è tra i più importanti fattori di rischio per disordini come la demenza di Alzheimer (DA), la malattia di Parkinson (MP) o la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

Diversi elementi accomunano le malattie neurodegenerative. Infatti è ormai sempre più evidente come in una minoranza di casi di DA, di MP o di SLA sia riscontrabile una origine esclusivamente genetica; tuttavia per tutte e tre le malattie, nella maggior parte dei casi la genesi è multifattoriale, con componenti sia genetiche che ambientali.

Inoltre, sebbene queste malattie interessino distretti diversi del sistema nervoso (i neuroni colinergici del telencefalo nella DA, i neuroni della substantia nigra nella MP ed i motoneuroni del midollo spinale nella SLA) sono tutte malattie neurodegenerative in cui è ipotizzabile una via patogenetica comune che può essere ricondotta allo stress ossidativo. Il declino della funzione mitocondriale ed il conseguente stress ossidativo hanno assunto ormai un ruolo determinante nell'insorgenza del danno funzionale che si manifesta nell'invecchiamento cerebrale ma che sembra essere responsabile anche di alcune altre malattie neurodegenerative (Ke, 2004).

Lo stress ossidativo, acuto e cronico, può essere interpretato come un disequilibrio tra la produzione di radicali liberi proossidanti e le difese antiossidanti.

Numerose osservazioni suggeriscono come il cervello sia vulnerabile in maniera particolare allo stress ossidativo (Reiter, 1995; Olanow, 1993; Muller, 1997; Halliwell, 2001). Sebbene l'encefalo costituisca percentualmente una piccolissima quota del nostro organismo, esso consuma circa 1/5 dell'ossigeno totale, elemento che verrebbe in parte poi convertito in specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il cervello inoltre è ricco di acidi grassi polinsaturi, suscettibili al danno dei ROS. Ancora, la catalasi è presente nel cervello in quantità minime e comparativamente al fegato i livelli di glutazione perossidasi e di vitamina E sono bassissimi. Si deve tenere in considerazione il ruolo di alcuni neurotrasmettitori eccitatori, come il glutammato, o quello della dopamina. Il rilascio di glutammato infatti determina a livello postsinaptico una cascata di reazioni che si conclude con la formazione di ROS. Nel caso della dopamina la sua ossidazione da parte delle monoaminossidasi determina la formazione di ROS e quindi un aumento di stress ossidativo a livello della substantia nigra. Infine, la concentrazione della melatonina, un antiossidante endogeno prodotto dalla ghiandola pineale efficace *scavenger* dei ROS, diminuisce con l'aumentare dell'età.

Nella demenza di Alzheimer, caratterizzata clinicamente da deficit progressivo della memoria, declino cognitivo e cambiamenti di personalità, il quadro clinico è legato ad una progressiva disfunzione e morte cellulare della neocorteccia, del sistema limbico, dell'ippocampo e di alcune regioni sottocorticali. Le alterazioni istopatologiche caratteristiche della DA sono le placche senili (amyloid-beta-peptides o A β) e le placche neurofibrillari (aggregati di proteine fosforilate del citoscheletro). La A β , tossica per i neuroni, sarebbe responsabile della morte neuronale tramite un processo di apoptosi. La neurotossicità di A β sarebbe proprio legata ad una aumentata produzione di ROS. Infatti: 1) neuroni in coltura o di linee cellulari neuronali esposti a A β presentano un aumento dei livelli di ROS (Guo, 1998; Guo, 1999a; Guo, 1999b; Keller, 1997; Markesbery, 1997; Markesbery, 1999); 2) in modelli animali di DA (topi transgenici) è stato osservato un aumento dei markers di stress ossidativo (Papolla, 1998; Smith, 1998); 3) la neurotossicità di A β è attenuata da antiossidanti come la vitamina E, i lazaroidi (Behl, 1999a; Behl, 1999b; Behl, 1992; Goodman, 1994; Harris, 1995; Lucca, 1997; Markesbery, 1999), e dagli scavengers dei radicali liberi (Hensley, 1994).

Il danno da stress ossidativo è stato inoltre dimostrato anche nei pazienti affetti da declino cognitivo di grado live, suggerendo che proprio questo tipo di danno potrebbe essere uno dei primi eventi ad verificarsi in corso di DA (Keller, 2005).

Nella Malattia di Parkinson le alterazioni istopatologiche principali, presenti nel 85-100% dei casi, sono rappresentate da inclusioni neuronali intracitoplasmatiche, note come corpi di Lewy.

Nella MP, lo stress ossidativo, legato alla formazione di ROS eccedente le capacità antiossidanti delle cellule (Fahn, 1992), è uno dei meccanismi proposti per la perdita delle cellule del sistema nigrostratale.

Diversi sono i fattori ritenuti responsabili di un aumento dello stress ossidativo nella MP: tra questi l'aumento della deposizione di ferro nella substantia nigra, una diminuzione di ferritina e di glutazione, un difetto della catena respiratoria mitocondriale che coinvolge il complesso I (Shapira, 1992). Oltre alla formazione di H₂O₂ a seguito del metabolismo della dopamina (Dexter, 1991; Jenner, 1992; Chiueh, 1993), devono essere citate anche due tossine responsabili di parkinsonismi secondari e capaci di generare la formazione di radicali idrossilici: la 6-idrossi-dopamina ed il metabolita attivo dell'1-metil-4-fenil-methyl-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (Poirier, 1985; Snyder, 1986).

La SLA, nota anche come malattia di Lou Gehrig, è familiare in circa 1/10 dei casi, con un meccanismo di trasmissione di tipo autosomico dominante (Finglewicz, 2003). Sono state identificate numerose mutazioni del gene della superossido dismutasi (SOD) (Gaudette, 2000; Shaw, 2000; Siddique, 1991; Shaw, 1998), tuttavia non è ancora chiaro se la malattia sia legata ad una riduzione dell'attività dell'enzima o se la mutazione determini in realtà la comparsa di nuove funzioni (Deng, 1993; Rosen, 1993; Jafari-Schlupe, 2004). Vi sono tuttavia evidenze che l'inibizione della SOD determini una degenerazione dei motoneuroni del midollo spinale tramite apoptosi (Rothstein, 1994). I dati finora ottenuti sono comunque suggestivi di un coinvolgimento dei ROS in questa patologia. Studi condotti in vitro hanno dimostrato una aumentata attività perossidasi, con conseguente aumento della formazione di radicali idrossilici, partendo da perossido di idrogeno (Wiedau-Pazos, 1996). Inoltre è stata anche dimostrata una aumentata affinità neuronale per il peroxnitrito, che agirebbe danneggiando diverse componenti neuronali come i neurofilamenti, o i recettori della tirosinasi (Beckman, 1993; Crow, 1997).

In relazione all'ipotizzato ruolo dello stress ossidativo nell'insorgenza delle malattie neurodegenerative, sono stati condotti studi che suggeriscono in vitro ed in modelli animali, l'efficacia di molecole antiossidanti nel prevenire la neurodegenerazione. Tuttavia l'efficacia nella pratica clinica di queste molecole è tuttora controversa.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che abitudini alimentari correlati ad un aumentata assunzione di sostanze antiossidanti possono comunque influenzare il rischio di sviluppare malattia neurodegenerative (Lemeshow, 1998; Etminan, 2005).

Bibliografia

1. Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993; 364, 584.
2. Behl C., Davis J.B., Cole G.M., Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:944-50.
3. Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog*

- Neurobiol 1999a;57:301–23.
4. Behl C. Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int J Vitam Nutr Res* 1999b;69:213–9.
 5. Chiueh, C.C., Miyake, H., Peng, M.T., 1993. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. In: Narabayashi, H., Nagatsu, T., Yanagisawa, N., Mizuno, Y. (Eds.), *Advances in Neurology*, vol. 60. Raven Press, New York, pp. 251–258.
 9. Crow J.P., Sampson J.B., Zhuang Y., et al. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* 1997;69:1936–44.
 10. Deng, H., Hentati, A., Tainer, J.A., et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, 1993; 261, 1047– 1051.
 11. Dexter D.T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells S.E., Jenner P., et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 1991;114:1953–75
 12. Etminan M., Gill S.S., Samii A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2005 Jun;4(6):362-5.
 13. Fahn, S., Cohen, G.. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol*. 1992 ; 32, 804–812
 14. Figlewicz, D.A. Orrell, R.W. The genetics of motor neuron diseases. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord*. 2003; 4, 225–231.
 15. Gaudette M. Hirano M., Siddique T. Current status of SOD1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neurone Diseases* 2000;1:83–90.
 16. Goodman Y., Mattson M.P. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid₁₋₄₂-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 1994;128:1–12.
 17. Guo Q., Christakos S., Robinson N., Mattson M.P. Calbindin blocks the pro-apoptotic actions of mutant presenilin-1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3227–32.
 18. Guo Q., Fu W., Holtsberg F.W., Steiner S.M., Mattson M.P. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res* 1999; 56:457–70.
 19. Guo Q., Sebastian L.S., Sopher B.L., Miller M.W., Ware C.B., Martin G.M., et al. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem* 1999;72:1019–29.
 20. Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18, 685– 716.
 21. Harris M.E., Hensley K., Butterfield A., Leedle R., Carney J.M. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1–40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 1995;131:193–202.
 22. Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., et al. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3270–4.
 23. Jafari-Schluep, H.F., Khoris, J., Mayeux-Portas, V., Hand, C., Rouleau, G., Camu, W. Superoxide dismutase 1 gene abnormalities in familial amyotrophic lateral sclerosis: phenotype/genotype correlations. The French experience and review of the literature. *Rev. Neurol*. 2004; 160, 44– 50.
 24. Jenner P., Dexter D.T., Sian J., Schapira A.H.V., Marsden C.D. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incident Lewy body disease. *Ann Neurol* 1992; 32:582–7
 25. Ke Cui, Xiaoling Luo, Keyi Xu, M.R. Ven Murthy. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28:771– 799.
 26. Keller J.N., Schmitt F.A., Scheff S.W., et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 2005;64:1152–1156.
 27. Keller J.N., Pang Z., Geddes J.W., Begley J.G., Germeyer A., Wang G., et al. Impairment of glucose and

- glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 1997;69:273–83.
28. Lemeshow S., Letenneur L., Dartigues J.F., Lafont S., Orgogozo J.M. Commenges D. Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. *Am J Epidemiol* 1998;148:298–306.
 29. Lucca E., Angeretti N., Forloni G. Influence of cell culture conditions on the protective effect of antioxidants against beta-amyloid toxicity: studies with lazaroids. *Brain Res* 1997;764:293–8.
 30. Markesbery W.R., Carney J.M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999;9:133–48.
 31. Markesbery W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:134–47.
 32. Muller, D.P.R., 1997. Neurological disease. In: Sies, H. (Ed.), *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. Academic Press, New York, pp. 557– 580
 33. Olanow, C.W. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 1993; 16, 439–444.
 34. Pappolla M.A., Chyan Y.J., Omar R.A., Hsiao K., Perry G., Smith M.A., et al. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of β -amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol* 1998;152:871–7.
 35. Poirier, J., Barbeau, A. A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985 ; 131, 1284–1289.
 36. Reiter, R.J., Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995a; 9, 526– 533.
 37. Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., et al. Mutations in Cu/Zn superoxidase dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993 ; 362, 59– 62.
 38. Rothstein, J.D., Bristol, L.A., Hostler, B., Brown, R.H.J., Kuncl, R.W. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *PNAS*, 1994; 91, 4155–4159.
 39. Shapira, A.H.V., Mann, V.M., Cooper, J.M., Krige, D., Jenner, P.J., Marsden, C.D. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1992 ; 32, S116– S124 (Suppl.).
 40. Shaw C.E., Enayat Z.E., Chioza B.A., et al. Mutations in all five exons of SOD-1 may cause ALS. *Ann Neurol* 1998; 43:390-4.
 41. Shaw P.J., Eggett .C.J. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2000;247(suppl 1):I/ 17–27.
 42. Siddique T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance M.A., et al. Linkage of a gene causing amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic locus instability. *N Engl J Med* 1991;324:1381-4.
 43. Smith M.A., Hirai K., Hsiao K., Pappolla M.A., Harris P.L.R., Siedlak S.L., et al. Amyloid-beta deposition in Alzheimer's transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 1998;70:2212–5.
 44. Snyder, S.H., D'Amato, R.J. MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease: the 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology* 1986; 36, 250– 258
 45. Wiedau-Pazos M., Goto J.J., Rabizadeh S., et al. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1996;271:515–18.

Specie Reattive dell'Ossigeno e Cancro

Vittorio Gebbia

Dipartimento di Oncologia Sperimentale ed Applicazioni Cliniche, Università degli Studi di Palermo

Le specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen, ROS) sono in parte prodotte dai processi di xenometabolismo cioè di detossificazione di sostanze tossiche introdotte nell'organismo sia per inalazione che attraverso l'alimentazione. Le ROS sono in grado di reagire con i lipidi di membrana, gli acidi nucleici, le proteine e gli enzimi determinando quindi un danno cellulare che contribuisce significativamente all'insorgenza di numerosi quadri patologici di tipo degenerativo quali le neoplasie maligne.

I rapporti intercorrenti fra ROS e cancro sono estremamente complessi in quanto i radicali liberi possono interve-

nire nel processo di carcinogenesi, nella regolazione del sistema immunitario di difesa nei confronti delle neoplasie, nell'azione di molti farmaci chemioterapici nonché delle radiazioni ionizzanti. Le ROS possono quindi svolgere un ruolo importante sia nella genesi che nella cura delle neoplasie maligne. Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato che una dieta a basso contenuto di antiossidanti è associata ad un più elevato rischio oncogeno. Infatti l'assunzione di basse quantità di frutta e vegetali può essere associata ad un aumento di due volte del rischio di sviluppare alcune neoplasie. Gli agenti ossidanti possono infatti stimolare la divisione cellulare che rappresenta un fattore critico nel processo di mutagenesi alla base della trasformazione carcinomatosa. Ad esempio, il fumo di sigaretta determina livelli notevolmente elevati di stress ossidativo che partecipa in modo determinante al danno cellulare ed in ultima analisi allo sviluppo di un tumore. In maniera analoga gli agenti antiossidanti possono svolgere un effetto protettivo riducendo il danno ossidativo al DNA e riducendo la proliferazione cellulare abnorme. I composti fitochimici come gli allil-solfidi presenti nell'aglio e nelle cipolle, gli isotiocianati presenti nei broccoli e nel cavolo, gli indoli e i terpeni presenti nei vegetali cruciferi e negli oli vegetali posseggono un'azione protettiva nei confronti dell'insorgenza di neoplasie. Pertanto il metabolismo cellulare e l'ambiente sono sorgenti di ROS che in modo continuo interagiscono con i sistemi biologici dove agenti ossidanti ed antiossidanti sono in equilibrio per modulare il danno cellulare e tissutale. Gli effetti cellulari dei ROS sono dipendenti dalla concentrazione e dal tipo di target cellulare. Infatti basse concentrazioni di ROS sono coinvolte positivamente nella traduzione e quindi nella regolazione dell'espressione genica, mentre elevate concentrazioni possono causare la trasformazione cellulare in senso maligno o l'apoptosi a seconda del tipo cellulare, ed in casi più estremi la morte cellulare per necrosi da stress ossidativo. Quindi lo stesso sistema può essere benefico nell'eliminazione delle cellule malate o al contrario pericoloso nel caso che i ROS attacchino le strutture cellulari normali danneggiando il DNA.

Lo stress ossidativo può inibire la crescita delle cellule tumorali attraverso vari meccanismi che includono la up-regulation della p53, l'inattivazione del Bcl-2, e l'accorciamento dei telomeri. Molti chemioterapici quali le antracicline agiscono mediante la produzione di ROS. Sfortunatamente le antracicline possono andare incontro ad un processo di riduzione mediato dal citocromo P-450 all'interno del reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche e del reticolo sarcoplasmatico del muscolo cardiaco causando, almeno in parte, un effetto cardiotossico che rappresenta l'effetto collaterale più temibile dell'impiego delle antracicline. Le radiazioni ionizzanti causano la produzione di ROS mediante un meccanismo diverso da quello delle antracicline. Poiché circa l'80% della massa cellulare è acquosa, la maggior parte dell'energia delle radiazioni è assorbita dall'acqua che va incontro ad un processo di ionizzazione con la produzione di radicali idrossilici capaci di danneggiare il DNA. Tuttavia alcune neoplasie sono in grado di resistere ai trattamenti antitumorali che inducono la formazione dei ROS grazie alla presenza di una importante attività antiossidante conseguente agli elevati livelli intracellulari di glutazione e vitamina E, e/o di enzimi detossificanti come la superossido dismutasi. Un altro fattore condizionante la risposta del tumore ai trattamenti antitumorali è rappresentato dal livello di ossigenazione. L'ipossia contrasta l'azione dei trattamenti inducenti la produzione dei ROS a causa della mancanza di ossigeno molecolare. La morte cellulare per apoptosi è per la maggior parte la conseguenza di questi fenomeni in quanto i mitocondri – che svolgono un ruolo chiave nel processo apoptotico – sono danneggiati molto facilmente dai ROS che inducono la permeabilizzazione delle membrane mitocondriali determinando in tal modo il rilascio di numerose molecole cruciali per il determinismo del processo di apoptosi come le procaspasi, il citocromo c, l'endonucleasi c ed il fattore di induzione della apoptosi che determinano la frammentazione del DNA.

La somministrazione di farmaci chemioterapici determina uno stress ossidativo nei pazienti oncologici come testimoniato dal rilevamento del livello di perossidazione lipidica, dalla diminuzione dei livelli plasmatici di vitamina E, vitamina C, carotene e glutazione. Oltre le antracicline (doxorubicina, epirubicina, daunorubicina), molti altri chemioterapici generano elevati livelli di ROS quali gli agenti alchilanti, i complessi di coordinazione del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), le epipodofillotossine (etoposide e teniposide) e le camptotecine (topotecan e irinotecan). In contrasto con queste classi di chemioterapici, i taxani (paclitaxel e docetaxel), gli alcaloidi della vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina e vinflunina), gli antimetaboliti e gli analoghi delle purine e delle pirimidine generano livelli molto inferiori di ROS.

Da quanto esposto si intuisce il possibile ruolo dei farmaci antiossidanti nella terapia delle neoplasie, ruolo attualmente molto incerto a causa di una importante controversia dovuta al fatto che molti farmaci antitumorali coinvolgono la formazione di ROS per espletare il proprio effetto citotossico. La maggior parte degli oncologi sostengono la teoria della "protezione tumorale" che sostiene che l'uso di antiossidanti è potenzialmente associato al rischio di controbilanciare l'attività citotossica terapeutica dei farmaci antitumorali. Pertanto essi non raccomandano l'impiego di dosi massicce di antiossidanti anche con la dieta e non hanno accettato favorevolmente lo sviluppo di farmaci ad attività citoprotettiva come l'amifostina oggi impiegata come protezione delle mucose in corso di radioterapia o chemioterapia con antracicline. Una parte degli oncologi tuttavia affronta il problema tenendo conto dell'indice terapeutico dei farmaci antitumorali, cioè sostiene che l'impiego degli antiossidanti può forse ridurre di poco l'effetto citotossico, ma può certamente proteggere le cellule cambiali normali. Nonostante queste due posizioni apparentemente contrastanti, molti oncologi impiegano in clinica il glutazione ridotto in dosi elevate come protettore nei confronti della nefro- e della neurotossicità da farmaci antitumorali, quali il cisplatino.

In conclusione i rapporti fra le ROS e le neoplasie maligne è estremamente complesso. Le ROS infatti intervengono in vari momenti sul processo di formazione delle neoplasie umane, sull'azione e forse l'efficacia dei trattamenti

ti chemioterapici e radioterapici nonché sul processo di apoptosi che spesso consegue alla somministrazione dei farmaci antitumorali. Resta da chiarire il ruolo delle terapie antiossidanti nella gestione clinica dei pazienti affetti da tumore maligno.

Nutrienti nella Prevenzione dello Stress Ossidativo

Elena Gorgone, Concetta Scazzone, Antonietta Caruso, Giulia Bivona, Tilde Petrigni, Chiara Bellia e Marcello Ciaccio

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

I radicali liberi sono molecole altamente reattive e instabili che reagiscono molto facilmente e rapidamente con altre molecole dando origine a reazioni indesiderate con prodotti che, come le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), spesso danneggiano le cellule.

Le nostre cellule sono in grado di difendersi dall'attacco dei radicali liberi grazie alla presenza di sostanze antiossidanti endogene ed esogene capaci di neutralizzare la loro azione e di evitare e/o riparare i danni molecolari da essi provocati (Tab.1).

A questi antiossidanti appartengono numerose sostanze eterogenee dal punto di vista sia chimico-fisico che metabolico: vitamine, sali minerali, enzimi e derivati da aminoacidi essenziali.

L'organismo umano si difende, quindi, naturalmente dai radicali liberi poiché possiede degli antiossidanti endogeni che sono le attività enzimatiche superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi e il citocromo C ma questa azione antiossidante endogena non è inesauribile, motivo per cui va integrata e rinforzata con altre sostanze ad attività antiossidante di provenienza esogena che si trovano negli alimenti.

Con l'alimentazione è possibile, infatti, assumere sostanze di varia natura dotate di una discreta e, in alcuni casi elevata, attività antiossidante: pigmenti vegetali che contengono polifenoli e bioflavonoidi, vitamine (A, C, E, K), oligoelementi minerali (selenio, zinco, magnesio, rame) ed enzimi (Q10), tutti presenti specialmente nei vegetali consumati crudi e nella frutta.

Esiste dunque in ogni essere vivente un continuo equilibrio tra fattori pro-ossidanti e difese antiossidanti, un'alterazione del quale induce uno stato fisiologico alterato definito "stress ossidativo".

La vitamina A

La vitamina A si trova in natura in due forme : il retinolo (di origine animale) e i pigmenti carotenoidi, precursori della vitamina A (di origine vegetale).

Il carotenoide più attivo è il betacarotene che costituisce il pigmento colorato della frutta e della verdura, la cui funzione in natura è quella di proteggere i vegetali dalle radiazioni solari.

La vitamina A, in sinergia con la vitamina E ed il selenio, previene la perossidazione lipidica delle membrane cellulari inibendo la formazione di radicali idroperossido.

Inoltre, è necessaria per il mantenimento dell'integrità morfologica e funzionale degli epitelii ed è un costituente della rodopsina, una proteina fotosensibile che si trova nelle cellule a bastoncello della retina.

La dose di retinolo raccomandata nei L.A.R.N. è di 1 mg\die per l'uomo adulto. La fonte naturale più ricca è l'olio di fegato di pesce; burro, uova, latte, ne contengono invece quantità discrete.

Il betacarotene (provitamina A), il cui fabbisogno per l'uomo adulto è di 5 mg\die (in alternativa ad 1 mg\die di retinolo), è presente in elevate quantità nelle carote e nel pomodoro e in generale in tutti i vegetali dal colore giallo-arancio (broccoli, spinaci, radicchio, insalata verde, zucca, banane, albicocche, pesche, arance).

La carenza di vitamina A determina problemi nella visione crepuscolare, secchezza e ruvidità della pelle, perdita

Tabella 1

Antiossidanti biologici

ANTIOSSIDANTI BIOLOGICI

- Enzimatici
 - Superossido dismutasi
 - Catalasi
 - Glutatione per ossidasi
 - Non enzimatici
 - Idrosolubili cellulari (ascorbato, glutatione,...)
 - Plasmatici (acido urico, complesso bilirubina-albumina, gruppi tiolici di proteine, albumina, ceruloplasmina,...)
 - Lipidici (a-tocoferolo, carotenoidi, CoQ₁₀, vitamina K,...)
-

di appetito e suscettibilità alle infezioni; di contro, la vitamina A assunta in eccesso tende ad accumularsi nel fegato dove produce effetti tossici che si manifestano con nausea, cefalea e dermatite.

La vitamina E

La vitamina E appartiene ad un gruppo di composti detti tocoferoli. Esistono in natura sette tipi di tocoferolo: alfa, beta, delta, epsilon, eta, gamma e zeta; l'alfa-tocoferolo è la forma più attiva di vitamina E e possiede un elevato valore biologico e nutritivo.

La sua azione antiossidante si esplica a livello degli acidi grassi delle membrane cellulari ed è dovuta, una volta inserita all'interno delle membrane biologiche, alle sue capacità redox, azione questa notevolmente potenziata dal selenio. Inoltre, è in grado di legare l'ossigeno ed impedirne la trasformazione in perossido tossico. Viene impiegata anche come additivo antiossidante nella conservazione dei cibi con le sigle europee E306, E307, E308, E309.

Si deposita in vari tessuti e soprattutto a livello epatico; non è tossica ma, se assunta in forte eccesso, può determinare cefalea, nausea, stanchezza ed interferire con l'assorbimento intestinale delle altre vitamine liposolubili.

Una sua carenza, invece, può rendere fragili le membrane dei globuli rossi e dare sintomi di astenia e debolezza muscolare.

Il fabbisogno giornaliero è di circa 8 mg (L.A.R.N.) e le fonti alimentari sono soprattutto gli oli vegetali (di germi di grano, arachidi, di oliva, di germi di mais, di girasole e di lino) ma si trova anche nella carne, latte e derivati, tuorlo d'uovo, olive, noci, frutti oleosi, foglie verdi, lattuga.

La vitamina K

In natura la vitamina K si trova principalmente in due forme: la vitamina K₁ (fillochinone), presente nelle piante verdi e la vitamina K₂ (menadione), sintetizzata dai batteri della flora intestinale (specialmente da *Escherichia Coli*). Esiste poi un'altra forma della vitamina, la K₃ (menadione) idrosolubile, che è un prodotto di sintesi utilizzato nel trattamento di pazienti che non riescono ad assorbire la vitamina K a causa di un'alterazione nell'assorbimento dei lipidi.

La vitamina K è stata a ragione definita "vitamina cerotto" per il suo ruolo fondamentale nella coagulazione del sangue. Essa è infatti co-fattore di alcune carbossilasi epatiche che consentono l'attivazione per modifiche post-traduzionali di alcuni fattori della coagulazione quali la protrombina, il fattore VII, IX e X; inoltre, possiede anche attività antiossidante grazie alle proprietà redox della sua struttura chimica, infatti, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato una evidente azione di prevenzione nei confronti del danno ossidativo a livello degli oligodendrociti e dei neuroni.

Il fabbisogno giornaliero di 50-60 mcg (L.A.R.N.) è soddisfatto nell'adulto sano dall'abbondanza di vitamina K negli alimenti e dalla quota prodotta dalla flora batterica intestinale.

La causa più comune di deficit di vitamina K è la sindrome da malassorbimento lipidico; infatti, la deficienza di vitamina K è comune in malattie come il morbo celiaco (cattivo assorbimento intestinale), la sprue (cattivo assorbimento nell'età adulta), e la colite, tutte alterazioni patologiche che colpiscono la mucosa dell'intestino tenue causando una perdita rapida ed incontrollata del contenuto intestinale. Di contro però, dosi molto elevate (> 500 mg/die) sono tossiche, poiché accumulati a livello plasmatico possono causare reazioni di tipo allergico con sviluppo di esantema, prurito, arrossamenti e, raramente, alterazioni della funzionalità epatica.

La vitamina K può essere usata con un discreto livello di sicurezza come antiformentativo nella conservazione dei cibi poiché non ha effetti decoloranti né odore sgradevole e, se viene aggiunta alla frutta che è già naturalmente colorata, aiuta a conservarla aumentandone la stabilità chimico-fisica e preservandone la gradevolezza.

Le verdure a foglia verde sono fonti naturali di vitamina K. Il latte vaccino, lo yogurt, il tuorlo dell'uovo, le melasse scure, l'olio di semi di cartamo, l'olio di fegato di pesce e altri oli poliinsaturi ne sono altre fonti abbastanza ricche. La fonte più importante rimane comunque la produzione endogena da parte dei batteri intestinali in quanto rappresenta una quota quantitativamente costante e indipendente dalla composizione vitaminica della dieta.

La vitamina C

Nota anche come acido ascorbico, da cui proviene il termine "scorbuto" dato alla relativa sindrome carenziale, la vitamina C è un composto idrosolubile.

Una delle proprietà più importanti della vitamina C è la sua capacità antiossidante in quanto è in grado di ossidarsi e ridursi reversibilmente passando da acido ascorbico ad acido deidroascorbico, funzionando da sistema redox. In virtù di questo processo l'agente ossidante dannoso viene neutralizzato.

Il sistema acido ascorbico-deidroascorbico è coinvolto in moltissime funzioni fisiologiche tra le quali:

- metabolismo del collagene, del ferro e della tirosina;
- sintesi e rilascio di neurotrasmettitori;
- sintesi degli ormoni corticosurrenali, degli acidi biliari e della creatinina;
- sintesi e rilascio delle prostaglandine;
- catabolismo dell'istamina.

La rimozione dei radicali liberi ossigenati, come il radicale idrossile e il radicale superossido, riveste notevole importanza a livello dell'occhio e del liquido interstiziale polmonare, assicurandone la protezione contro agenti alta-

mente ossidanti come l'ozono. L'azione della vitamina C, inoltre, è indispensabile per l'ossidazione dell'alfatocoferosile (forma radicalica della vitamina E), come nella respirazione cellulare, nel ricambio del calcio e nella stimolazione del sistema immunitario in risposta a determinate condizioni patologiche, incluso il cancro dello stomaco e dell'esofago, in quanto inibisce fortemente la formazione delle nitrosammine derivate da nitriti e nitrati contenuti in alcuni alimenti.

La vitamina C viene accumulata nell'organismo; pertanto, la prima colazione e i due pasti principali generalmente garantiscono il fabbisogno giornaliero che per gli adulti è di circa 60 mg (L.A.R.N.).

In alcuni casi, dosi eccessive di vitamina C possono risultare tossiche e dare fastidiosi sintomi come bruciore durante la minzione, disordini intestinali, diarrea, meteorismo, dolori addominali, arrossamenti cutanei e nausea.

La sua carenza può portare invece alla comparsa dello scorbuto ed anche a perdita di sangue dalle gengive, fragilità dei capillari, dolori articolari, perdita di appetito e astenia.

E' largamente diffusa sia nel mondo animale che vegetale ed è presente in grandi quantità nei vegetali rosso-arancio e verde in genere (peperoncino rosso piccante, prezzemolo, peperoni verdi, radicchio, spinaci, piselli, cavoli, asparagi, cipolle, carote, cavolfiore, zucche, pomodori) e nella frutta (arance, mandarini, limoni, cedri, pompelmi, mirtilli, lamponi, fragole, banane).

Polifenoli

I polifenoli sono pigmenti (coloranti naturali) presenti in natura nel mondo vegetale caratterizzati chimicamente da una struttura a più anelli aromatici. Tra questi ricordiamo la quercetina, l'epicatechina, i flavonoidi (colore chiaro, dall'avorio al giallo), le antocianidine, le antocianine (colore rosso), ecc.

Esercitano una particolare azione protettiva nei confronti delle lipoproteine a bassa densità (LDL) che trasportano una grossa quota di colesterolo libero e che, in condizioni di forte stress ossidativo, possono andare incontro ad ossidazione e accumularsi al di sotto dell'endotelio favorendo così la formazione della placca aterosclerotica.

I polifenoli hanno, anche, proprietà antinfiammatorie, antiallergiche e antivirali. Hanno, inoltre, una notevole azione protettiva nei confronti delle patologie cardiovascolari e di quelle proliferative.

Sono presenti specialmente nella frutta nelle verdure colorate come cavolo, carota, zucca, fiori di zucca, spinaci, peperoni, mirtilli, ciliegie, prugne, albicocche, meloni, mele, arance, uva nera e prodotti naturali da esse derivati.

Particolarmente presenti nei mirtilli sono le antocianine, antiossidanti che preservano anche l'integrità dei capillari e proteggono la retina.

L'uva nera è ricca anche di resveratrolo, un polifenolo di recente scoperta al quale è stata attribuita una possibile azione di prevenzione dei tumori; la stessa azione sarebbe svolta anche dal vino rosso in cui le concentrazioni di resveratrolo rimangono elevate.

Le foglie del tè sono ricchissime di flavonoidi.

Selenio

Il selenio è un minerale essenziale che si trova in micro-quantità (oligoelemento) nell'organismo. Il suo ruolo come antiossidante è legato al fatto che agisce da co-fattore per la glutatione perossidasi. Una carenza, in genere, è dovuta alla povertà in selenio del suolo dove sono coltivati i vegetali che lo contengono; infatti, il fabbisogno giornaliero consigliato per un adulto varia da un minimo di 50 mcg ad un massimo di 200 mcg al giorno e questa richiesta generalmente viene soddisfatta da una normale alimentazione.

La sintomatologia da carenza non è ancora ben definita anche se ad essa sono riconducibili numerose situazioni patologiche come ipertensione, cardiopatie, neoplasie e invecchiamento precoce.

A dosi anche di poco superiori a quelle raccomandate il selenio diventa estremamente tossico determinando disturbi gastrointestinali e irritazioni polmonari.

Gli alimenti ricchi di selenio sono il lievito di birra, le carni (muscolo e interiora), pesci e frutti di mare, cereali, noci brasiliane, broccoli, cavoli, cetrioli, ravanelli, cipolle, lieviti, melasse e prodotti del latte.

Manganese

L'organismo umano contiene circa 15-20 mg circa di manganese, soprattutto nelle ossa. Questo oligoelemento, anche se in piccola quantità, svolge un ruolo antiossidante molto importante nel prevenire la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in quanto è componente di alcuni metallo-enzimi quali la superossido dismutasi.

Il fabbisogno giornaliero è di 5 mg (L.A.R.N.). Una dieta bilanciata ne contiene circa 4 mg e, comunque, sono rari i casi di carenza, mentre gli eccessi si possono riscontrare solo in caso di avvelenamento industriale o nelle miniere.

E' diffuso in molti alimenti e tra quelli più ricchi ci sono i cereali integrali, l'avocado, il tuorlo d'uovo, la frutta secca, i semi, i legumi, i mirtilli, l'ananas, gli spinaci, i piselli secchi e le verdure verdi.

Rame

Il rame è un oligoelemento che nell'organismo umano svolge molteplici funzioni biologiche tra le quali l'azione

sinergica con l'enzima superossido dismutasi nella trasformazione dei radicali liberi in perossido di idrogeno. È importante per la sintesi dei fosfolipidi, per la produzione dell'acido ribonucleico (RNA) e per l'azione della vitamina C. Favorisce, inoltre, l'accrescimento osseo, lo sviluppo del sistema nervoso e nei globuli rossi è richiesto per la sintesi dell'eme. Contribuisce, infine, a tenere uniti collagene ed elastina, alla produzione di melanina ed è importante nel metabolismo energetico.

La capacità di assorbimento del rame viene ridotta dalla contemporanea presenza di zinco in quanto i due minerali competono per la formazione di composti con le proteine.

La carenza di rame provoca sintomi simili a quelli da carenza di ferro dei quali il più evidente è l'anemia.

Un eccesso produce dismenorrea, alopecia e insonnia. Il fabbisogno giornaliero raccomandato nell'adulto è di circa 2-3 mg (L.A.R.N.). Le fonti naturali sono essenzialmente rappresentate dalla carne in genere, dalle noci, dai cereali e pane integrale e dai legumi.

Zinco

Oligoelemento presente nei muscoli e nel fegato, lo zinco è parte integrante delle ossa e dei denti. Ha un importante ruolo biologico come cofattore di molti enzimi: per esempio, insieme al rame, co-attiva la superossido dismutasi. Interviene, inoltre, nella sintesi delle proteine, nell'azione di alcuni ormoni e neurotrasmettitori, nei processi di accrescimento e di riparazione dei danni tissutali e nella difesa immunitaria. La sua presenza si rende indispensabile per l'ottimale metabolismo del fosforo, nella digestione dei carboidrati, nella sintesi degli acidi nucleici e nell'assorbimento delle vitamine.

Il fabbisogno giornaliero raccomandato nell'adulto è di circa 55 mg (L.A.R.N.).

La carenza di zinco è dovuta generalmente, piuttosto che ad una sua vera e propria mancanza nella dieta, ad un difetto nel suo assorbimento che comporta una situazione patologica con una sintomatologia molto complessa le cui caratteristiche più importanti sono: riduzione della crescita, ipogonadismo, anoressia, nausea, vomito, diarrea, facilità a contrarre le infezioni. Anche l'eccesso di alcol può determinare una carenza di zinco in quanto questo minerale è cofattore dell'alcol deidrogenasi, enzima chiave nel metabolismo dell'etanolo.

Ancora bisogna tenere presente che alcuni alimenti e sali minerali presenti nella dieta come i cereali crudi, le fibre, la caseina del latte, il ferro, il calcio e il rame riducono la quota di zinco assorbita a livello intestinale.

Di contro, un eccesso di zinco può impedire l'assorbimento del ferro e del rame.

Coenzima Q10

Il Coenzima Q appartiene al gruppo degli ubiquinoni. È una molecola di origine endogena e la sua bio-sintesi diminuisce con l'età.

Ha un'azione simile a quella della vitamina E. Il suo ruolo biologico più importante è quello di componente della catena dei trasportatori di elettroni presenti nelle membrane mitocondriali e, quindi, esplica la sua azione antiossidante nella fosforilazione ossidativa. Il fabbisogno giornaliero raccomandato per l'adulto è di circa 5 mg (L.A.R.N.) ma questa quota aumenta con l'avanzare dell'età.

Le fonti alimentari sono carne, pesce, cereali, soia, noci e vegetali in genere.

È noto da tempo in letteratura il ruolo degli antiossidanti nella prevenzione delle patologie cardiovascolari e dei tumori come, anche, nel rallentare gli effetti dell'invecchiamento. È, pertanto, importante intervenire con la farmacoterapia non solo al fine di migliorare gli stati patologici e i loro sintomi ma anche allo scopo di rafforzare tutti i nostri meccanismi di difesa agendo così a livello preventivo. Va senz'altro detto che non sempre la sola alimentazione è sufficiente a raggiungere tali scopi a causa dei contenuti spesso carenti in antiossidanti di alcuni alimenti, motivo per cui si tende a ricorrere sempre più spesso all'uso di integratori vitaminici a titolo noto.

Il ruolo del clinico, del biochimico e del nutrizionista deve essere quindi finalizzato a ristabilire quelle condizioni che sono in grado di interagire positivamente sulle relazioni esistenti tra i fattori pro-ossidanti, le difese antiossidanti e le relative patologie correlate allo stress ossidativo.

Bibliografia

1. Bonnefont-Rosselot D. The role antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol* 2004;3(1):41-52.
2. Borek C. Dietary antioxidant and human cancer. *Integr Cancer ther* 2004;3(4):333-41.
3. Cappelli P., Vannucchi V. *Chimica degli alimenti*; Ed. Zanichelli, 2000.
4. Debier C., Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 2005;93(2):153-74.
5. Hadi A.D., Abdolamir A., Mahatab H., Abolfazl D., Yusef R. Influence of plasma total and antioxidant ability on lipid and protein oxidation products in plasma and erythrocyte ghost obtained from developing and adult rats

pretreated with two vitamin K formulations. *Mol Cell Biochem* 2004;267:195–201.

6. Hathcock J.N., Azzi A., Blumberg J., Bray T., Dickinsons A., Frei B., Jisalal I., Johnston C.S., Kelly F.J., Kraemer K., Packer L., Parthasarathy S., Sies H., Traber M.G. Vitamins E and C safe across a board range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005;81(4):736–45.
7. Kim D.O., Lee CY. Comprehensive study of vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit rev food sci nutr* 2004;44(4):253–73.
8. Livrea M.A., Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi A.M., Ciaccio M., Riccio A. Contribution of vitamin to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Rad Biol Med* 1995;18(3):401-409.
9. Rodato S., Gola I.; Alimentazione e Nutrizione. Ed. Clitt, 2001.
10. Siliprandi N.,Tettamanti G. Biochimica Medica; Ed. Piccin, 2005.
11. Vervoort L.M., Ronden J.E., Thijssen H.H. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomial lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1997;54(8):871–6.
12. Valentine Js., Doucette P.A., Potter S.Z. Copper-Zinc Superoxide dismutase and Amytrophic Lateral Sclerosis. *Annu Rev Biochem* 2004; in press.

L'integrazione antiossidante. Novità dalla ricerca

Mauro Mario Mariani

Specialista in Angiologia

Tra gli integratori antiossidanti disponibili ne spicca uno per le sue particolari ed esclusive caratteristiche: il Deutrosulfazyme, Formula Everett Storey (CELLFOOD®).

Questa sostanza deriva da una formulazione particolare ed esclusiva in cui il deuterio riesce a rimanere stabile, (cosa pressoché impossibile per anni), fino a quando non trova un tessuto a domanda di ossigeno.

Nella sua tipica formulazione in gocce è costituito da Deutrosulfazyme (D₂SO₄) e da una miscela complessa di 78 minerali, 34 enzimi e 17 aminoacidi.

Tranne il solfato di deuterio, ottenuto mediante procedimento brevettato dalla Deutrel Industries Co (USA), il produttore garantisce che tutti i componenti di deutrosulfazyme sono ottenuti mediante estrazione non chimica di principi attivi contenuti esclusivamente in fonti naturali non contaminate (piante naturali e acque meridionali che circondano la Nuova Zelanda, sorgenti minerali naturali, piante fossili).

Il Deutrosulfazyme, utilizzando un legame tra idrogeno e ossigeno così stabile da consentire all'ossigeno di liberarsi in forma molecolare solo all'interno della cellula stessa, riesce a svolgere una efficace azione antiradicalica oltre che ossigenante (produzione di ossigeno nascente e blocco dei radicali liberi).

Così si possono realizzare tre importanti azioni:

- Eliminazione di un radicale libero dell'ossigeno
- Risparmio di uno scavenger
- Produzione di ossigeno nascente

Tra i 17 aminoacidi vi sono tutti e cinque quelli antiossidanti: Arginina, Cistina, Istidina, Lisina e Metionina.

Tra i 34 enzimi vi sono due dei tre antiossidanti endogeni: Catalasi e Perossidasi. Indirettamente però anche il terzo enzima antiossidante endogeno, la SuperOssiDismutasi è garantito grazie all'apporto dei suoi costituenti base: i tre minerali Manganese, Zinco e Rame che troviamo tra i minerali.

Infatti tra i minerali vi sono tutti e sei quelli antiossidanti, oltre a Manganese, Zinco, Rame, troviamo anche Germanio, Selenio, Molibdeno.

La caratteristica distintiva del prodotto è quella di presentare i minerali sotto forma di colloide, in modo da ottimizzare l'assorbimento, ma soprattutto rendere disponibile le sostanze solo in caso di effettiva necessità.

Queste caratteristiche uniche del prodotto ne fanno un potente antiossidante.

In un recente studio effettuato sugli effetti del Deutrosulfazyme (Formula Everett Storey) al d-ROMs test (test che consente la determinazione della concentrazione a livello plasmatico dei radicali liberi) dal Dr. Michael Coyle presso il laboratorio NuLife Sciences Company in Massachusetts-USA, sono stati studiati 60 individui, di cui 32 maschi e 28 femmine tra i 18 ed i 50 anni, divisi in due categorie di età, sopra e sotto i trentanni.

Dopo assunzione di Deutrosulfazyme, Formula Everett Storey (CELLFOOD®) si è avuta una riduzione dello

stress ossidativo tra il 10% ed il 27%.

Fatto importante che tutti i partecipanti, anche i fumatori che avevano i livelli più alti in u.Carr sono rientrati in un range di basso – medio stress da uno stato iniziale alto.

Questo studio conferma le caratteristiche antiossidanti uniche del prodotto.

Deutrosulfazyme, Formula Everett Storey (CELLFOOD®) è un prodotto erboristico naturale ad uso alimentare, notificato presso il Ministero della Sanità.

Biochimica Clinica dello Stress Ossidativo

Chiara Bellia, Lavinia Vocca, Elena Gorgone, Giulia Bivona, Maria Concetta Gueli*, Egidio Guglielmini e Marcello Ciaccio

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

* Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo

Le Specie Radicaliche dell'Ossigeno (ROS) sono molecole contenenti almeno un atomo di ossigeno con un e⁻ spaiato nell'orbitale esterno e, pertanto, altamente reattive. Bassi livelli di ROS sono vitali per molte funzioni fisiologiche della cellula, quali l'esplosione respiratoria a cui vanno incontro neutrofilii, monociti, eosinofili e macrofagi in difesa da agenti microbiologici dannosi, il metabolismo degli eicosanoidi, la vasodilatazione endoteliale NO-dipendente, il metabolismo di xenobiotici ad opera del sistema di ossidazione del citocromo P₄₅₀ microsomiale e svariati pathway di segnalazione intra-cellulare. A ciò si aggiunge che il semplice metabolismo aerobio, comune alla maggior parte dei tipi cellulari, porta alla formazione di ROS; la completa riduzione dell'ossigeno molecolare, che richiede complessivamente 4 e⁻, avviene infatti con il trasferimento di un solo e⁻ per volta e con la conseguente formazione di intermedi altamente reattivi. In condizioni fisiologiche esiste un equilibrio tra i livelli di ROS prodotti durante il normale metabolismo cellulare e i livelli di antiossidanti endogeni, indispensabili per proteggere i tessuti dal danno ossidativo. Variazioni in questo equilibrio, che siano causate da un aumento della produzione di ROS o da una diminuzione dei livelli di antiossidanti, producono una condizione nota come "stress ossidativo"; tale condizione sta alla base di diverse situazioni patologiche, tra le quali ipertensione, aterosclerosi, danno da ischemia/riperfusion, disordini neurologici, tumori, invecchiamento precoce, diabete.

Il laboratorio riveste in questo caso un ruolo fondamentale in quanto costituisce l'unico strumento attualmente a nostra disposizione per la valutazione dello stress ossidativo. Nonostante lo studio dello stress ossidativo sia stato sino ad ora confinato quasi esclusivamente ai laboratori sperimentali, è possibile prevedere il suo coinvolgimento anche nella diagnostica e nel follow-up di svariate patologie, soprattutto se in associazione con le determinazioni biochimico-cliniche già in uso.

Nella valutazione dello stress ossidativo globale ci si può avvalere di diversi parametri, quali i prodotti dell'ossidazione causata da ROS (specialmente idroperossidi ROOH e malondialdeide MDA), attività di enzimi con azione antiossidante (superossido-dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi), ioni metallici che agiscono da catalizzatori nelle reazioni innescate dai ROS (ferro, rame) o da co-attivatori nelle reazioni enzimatiche di demolizione dei ROS (selenio), agenti antiossidanti non enzimatici (α -tocoferolo, vitamina A e β -carotene, glutatione ossidato e ridotto).

I ROS possono essere generati anche dall'accumulo di precursori generalmente non tossici se presenti in concentrazioni fisiologiche; il parametro più importante in tal senso è di certo l'iperomocisteinemia che è ormai accettata come un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (1,2); l'omocisteina plasmatica può essere dosata con metodo immuno-chimico; in alternativa, si possono impiegare tecniche più sensibili e specifiche come l'HPLC. Il meccanismo d'azione che lega l'iperomocisteinemia e le malattie cardiovascolari prevede il coinvolgimento dei ROS: l'omocisteina, infatti, può ossidarsi spontaneamente a omocistina rilasciando due protoni (H⁺) e due elettroni e promuovendo dunque la formazione di ROS (3). Diverse evidenze, inoltre, suggeriscono che i ROS stanno alla base della disfunzione endoteliale (4) e della formazione delle LDL-ossidate (5), eventi tipicamente associati alle malattie cardiovascolari.

Il rilevamento diretto dei radicali superossido e idrossile nei sistemi biologici è difficile sia per la loro bassa concentrazione nel plasma che per la loro emivita estremamente breve. Nonostante ciò sono state messe a punto delle metodiche in grado di dosare in un campione di siero o plasma i metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) i quali, pur dotati di un discreto potere ossidante, sono relativamente più stabili dei radicali che li hanno generati e, pertanto, possono essere quantificati (6).

Di particolare importanza biologica è la perossidazione di acidi grassi poli-insaturi (per es. l'acido arachidonico e l'acido linoleico); la perossidazione lipidica, infatti, può comportare disgregazione delle membrane biologiche e la formazione delle LDL-ossidate che svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'aterosclerosi (7). È possibile determinare i prodotti della lipoperossidazione come la malondialdeide sfruttando la loro reattività con l'acido tiobarbiturico (TBA) (8). Sono state messe a punto, inoltre, delle metodiche ELISA in grado di dosare direttamente le LDL-ossidate o gli auto-anticorpi contro le LDL-ossidate (9,10).

La superossido-dismutasi (SOD), uno dei più importanti enzimi coinvolti nella rimozione dei ROS, agisce rimuovendo

vedendo il radicale superossido (O_2^-) con formazione di perossido di idrogeno (H_2O_2). Nelle cellule eucariotiche esistono due isoforme intracellulari della SOD: la Cu,ZnSOD presente nel citoplasma e nel nucleo, e la MnSOD, localizzata principalmente nel mitocondrio; solo nel 1982 è stata identificata una terza isoforma della SOD (EC-SOD), contenente rame e zinco e presente sulla superficie cellulare e nei fluidi extracellulari come linfa, liquido sinoviale e plasma. La localizzazione della EC-SOD sulla superficie delle cellule è garantita dalle interazioni elettrostatiche che si instaurano tra dei residui di Arg e Lys carichi positivamente all'estremità C-terminale e l'eparina e l'eparansolfato della matrice extracellulare (11). Oltre alla determinazione dell'attività della superossido-dismutasi, che viene effettuata con metodo spettrofotometrico (12), l'attenzione è stata rivolta ultimamente anche ai polimorfismi del gene della MnSOD mitocondriale; in particolare sembrerebbe che il polimorfismo C1183T, che causa una sostituzione Ala-9Val nella sequenza aminoacidica, sia associato all'insorgenza di diverse malattie come il carcinoma alla mammella (13), la schizofrenia (14), l'aterosclerosi (15) confermando dunque il coinvolgimento dello stress ossidativo nella loro eziopatogenesi.

Oltre alla SOD, gli antiossidanti enzimatici di cui l'organismo dispone sono la catalasi, che decompone il perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno, e la glutazione perossidasi, che invece rimuove il perossido di idrogeno convertendo glutazione ridotto (GSH) in glutazione ossidato (GSSG) (Fig.1); entrambe le attività enzimatiche possono essere quantificate per via spettrofotometrica (12).

Tra gli antiossidanti endogeni bisogna annoverare anche molecole non enzimatiche quali il β -carotene, l' α -tocoferolo e l'acido ascorbico; in particolare, l' α -tocoferolo o vitamina E è localizzato nel core idrofobico delle membrane biologiche preservandole dalla lipoperossidazione; l'acido deidroascorbico (ossidato) agisce poi ossidando la forma radicalica dell' α -tocoferolo e convertendolo così nella forma ossidata nuovamente attiva. Sia il GSH/GSSG che il β -carotene e l' α -tocoferolo possono essere dosati mediante HPLC.

Infine, bisogna considerare anche il ruolo di oligo-elementi quali il ferro e il rame che promuovono la formazione di ROS partecipando come catalizzatori alla reazione di Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$), e il selenio che, invece, è il coenzima della glutazione perossidasi.

Nonostante non siano ancora disponibili in letteratura dati che dimostrano un'associazione univoca tra l'aumento dello stress ossidativo e l'insorgenza o la progressione di una specifica malattia, è ormai accertato il coinvolgimento dei ROS nella patogenesi di svariate condizioni patologiche; pertanto, è prevedibile un sempre maggiore interesse sia verso i meccanismi molecolari con cui questi composti provocano la malattia, sia verso la possibilità di impiegare parametri biochimici legati allo stress ossidativo come elementi diagnostici aggiuntivi.

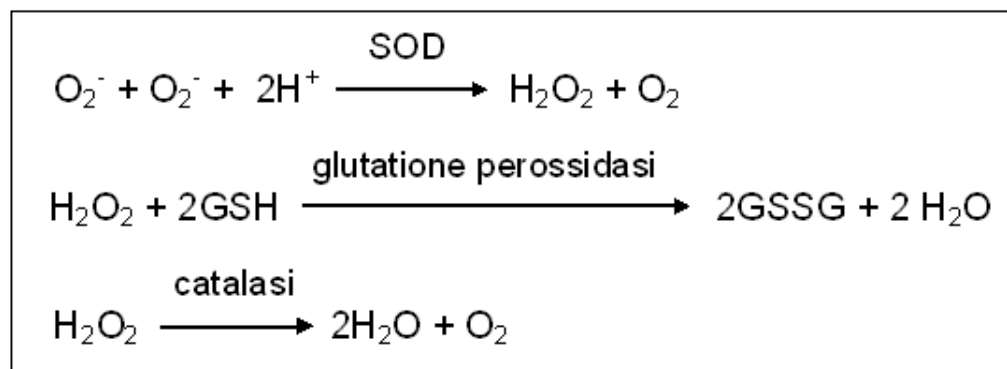


Figura 1
Reazioni catalizzate dagli antiossidanti enzimatici endogeni.

Bibliografia

1. Kario K., Duell B.P., Matsuo T., Sakata T., Kato H., Shimada K., Miyata T. High plasma homocysteine levels in elderly Japanese patients are associated with increased cardiovascular disease risk independently from markers of coagulation activation and endothelial cell damage. *Atherosclerosis* 2001;157:441-449.
2. Anderson J.L., Muhlestein J.B., Horne B.D., Carlquist J.F., Bair T.L., Madsen T.E., Pearson R.R. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:1227-1232.
3. Hayden M.R., Tyagi S.C. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes

- mellitus and atheroscleropathy : the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition J* 2004;3:1-23.
4. Kojda G., Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43:562-571.
 5. Homma Y. Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:265-270.
 6. Gerardi G.M. Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationships to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin Chem Lab Med* 2002;2:104-110.
 7. Aldons J.L. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
 8. Aydin A., Orhan H., Sayal A., Ozata M., Sahin G., Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type 2 diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34:65-70.
 9. Holvoet P., Mertens A., Verhamme P., Bogaerts K., Beyens G., Verhaeghe R., Collin D., Muls E., Van de Werf F.V. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-848.
 10. Yasunobu Y., Hayashi K., Shingu T., Yamagata T., Kajayama G., kambe M. Coronary atherosclerosis and oxidative stress as reflected by autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and oxysterols. *Atherosclerosis* 2001;155:445-453.
 11. Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Rad Biol Med* 2003;35:236-256.
 12. Weidig P.W., McMaster D., bayraktutan U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes Met* 2004;6:42-441.
 13. Millikan R.C., Player J., Renè de Cotret A., Moorman P., Pittman G., Vannappagari V., Tse C.J., Keku T. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and whites. *Breast Cancer Res* 2004;6:R264-R274.
 14. Akyol O., Yanik M., Elyas H., Namli M., Canatan H., Akin H., Yuce H., Ramazan Yilmaz H., Tuktun H., Sogut S., Herken H., Ozyurt H., Asuman Savas H., Zoroglu S. Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:123-131.
 15. Kakko S., Paivansalo M., Koistinen P., Kesaniemi Y.A., Kinnula V.L., Savolainen M.J. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;168:147-152.

La valutazione globale dello Stress Ossidativo. Il ruolo del laboratorio

Eugenio Luigi Iorio

Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo, Parma

La valutazione dello stress ossidativo nei soggetti sani o in pazienti sottoposti a farmacoterapia è la condicio sine qua non per prevenire il danno tissutale e per monitorare l'andamento e la risposta al trattamento di una eventuale patologia in atto in tutte quelle situazioni correlate con la presenza di specie reattive.

Le tecniche di laboratorio disponibili per identificare e quantificare un marcatore biochimico in un campione biologico prevedono generalmente una fase di estrazione che consenta il passaggio dell'analita di interesse dal materiale prelevato in un fluido con caratteristiche chimico-fisiche simili (per esempio estrazione dal siero dei lipoperossidi, sostanze liposolubili, in una soluzione cloroformio-metanolo, in grado di sciogliere i grassi). Segue, poi, una fase di separazione più fine, durante la quale l'estratto (lipidico o acquoso), grazie ad opportune tecniche cromatografiche (in fase gassosa o in fase liquida ad alta risoluzione, HPLC) viene risolto in una serie di frazioni. Infine, grazie, all'impiego di idonei metodi di rivelazione (spettrometria di massa, spettrofotometria, fluorimetria, potenziometria, ecc) è possibile identificare, grazie ad uno standard noto, in quale delle frazioni si trova l'analita di interesse e, in definitiva, precisarne, con ragionevole sicurezza, la natura e la concentrazione.

Purtroppo, questa metodologia solo raramente è applicabile nella routine clinica quando l'obiettivo della valutazione è lo stress ossidativo. Infatti, i radicali liberi sono, per definizione, specie chimiche estremamente reattive, a brevissima emivita, e l'unica tecnica in grado di evidenziarli è la spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone (ESR o EPR) che, eseguita talvolta con particolari accorgimenti (metodi di spin trap), costituisce il golden standard per valutazioni nel vivente.

Sfortunatamente, però, l'ESR è una tecnica piuttosto complessa, richiede una strumentazione e delle professionalità non disponibili in tutti i laboratori, ed è particolarmente costosa, per cui viene utilizzata non per indagini di routine o studi di screening, quanto, piuttosto, per validare altri metodi di laboratorio, come accaduto, per esempio, proprio con il d-ROMs test.

Anche quando correttamente eseguita, comunque, l'ESR fornisce informazioni solo sulla componente pro-ossidante dello stress ossidativo e non su quella antiossidante. Si è ripetutamente sottolineato, invece, che lo stress ossidativo è la conseguenza della rottura di un equilibrio tra produzione di specie reattive ed efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti. Questo squilibrio porta ad un eccesso di metaboliti reattivi dell'ossigeno, quali, ad esempio, gli idroperossidi (ROOH) che, versati in circolo, vanno a costituire i marcatori e gli amplificatori del danno tissutale e, in definitiva, i responsabili ultimi, insieme ad altri prodotti di ossidazione, dell'invecchiamento e delle patologie correlate con lo stress ossidativo.

Sulla base di queste considerazioni preliminari, è opportuno che la valutazione di laboratorio dello stress ossidativo sia "globale", cioè tenga conto sia della componente pro-ossidante che di quella anti-ossidante.

Poiché, come si è detto, l'ESR non è utilizzabile di routine, la valutazione dello status pro-ossidante di un individuo viene abitualmente eseguita con una serie di metodiche che alcuni ricercatori hanno battezzato con il termine di "fingerprinting" (impronta digitale). Secondo questo approccio, l'esistenza in un organismo vivente di specie reattive, non altrimenti misurabili routinariamente, viene valutata attraverso la documentazione (nei tessuti e/o nei liquidi extracellulari) della presenza di specie molecolari variamente modificate dall'attacco dei radicali liberi. In tale contesto, poiché la perossidazione è uno dei più comuni meccanismi del danno indotto dai ROS, il dosaggio degli idroperossidi (d-ROMs test, POX-ACT assay) fornisce un'indicazione molto affidabile dello status pro-ossidante di un individuo. E, più in generale, la documentazione nei fluidi biologici della presenza di idroperossidi, così come di MDA o di isoprostani, fornisce "l'impronta digitale" più o meno accurata e fedele della componente ossidante dello stress ossidativo di un individuo.

I test per la valutazione della componente antiossidante mirano generalmente a determinare lo "spessore" o "potere" o "attività" della barriera antiossidante plasmatica nel suo complesso (TAS, FRAP, BAP, ORAC) e, in alcuni casi specifici, a quantificarne alcune importanti componenti, quali ad esempio i gruppi tiolici o singoli antiossidanti (es. ascorbato, tocoferoli).

Una valutazione globale dello stress ossidativo si rende necessaria ogni qualvolta si sospetti una situazione di stress ossidativo (anche a fronte di valori normali o addirittura ridotti di test dello status proossidante) e, più in generale, ogni qualvolta si intende monitorare una terapia antiossidante.

Potere Antiossidante del Pigmento Algale Ficocianina

Benedetti S., Benvenuti F., Pagliarani S., Francogli S., Canestrari F.

Istituto di Istologia e Analisi di Laboratorio, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

La ficocianina (FC) è la maggiore ficobiliproteina presente nelle alghe verdi-azzurre (Cianobatteri) con funzione di pigmento fotosintetico accessorio, assorbe infatti energia luminosa nella regione del visibile tra 550 e 650 nm (assorbimento massimo a 620 nm) trasferendola al centro di reazione della clorofilla a (1). Strutturalmente la FC è composta da subunità polipeptidiche α e β che si associano con alta affinità nel monomero ($\alpha\beta$); i monomeri a loro volta si uniscono a formare l'esamero ($\alpha\beta$)₆, l'unità funzionale della proteina (2).

Le caratteristiche spettroscopiche della FC, così come il suo colore blu intenso, sono da attribuirsi alla presenza nella sua struttura chimica di un cromoforo, detto ficocianobilina (FCB), costituito da quattro anelli tetrapirrolici a catena aperta e legato alla proteina mediante ponti disolfuro (2). La FCB ha una struttura chimica simile a quella della bilirubina, un pigmento biliare che in vivo presenta note proprietà di scavenger delle specie reattive dell'ossigeno (3); a conferma di questa analogia, numerosi studi hanno evidenziato che la FC estratta dalla microalga *Spirulina Platensis* ha importanti capacità antiossidanti sia *in vivo* che *in vitro* (4), inibisce infatti la perossidazione lipidica sia negli epatociti (5) che negli eritrociti (6) e protegge il DNA dal danno ossidativo (7).

La FC rappresenta fino al 15% del peso secco della *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA), una microalga che cresce selvatica nel Lago Klamath (Oregon, USA) e che viene ad oggi utilizzata come integratore alimentare grazie all'elevato valore nutrizionale e nutriterapico (8, 9). Recentemente abbiamo investigato le proprietà antiossidanti di un estratto commerciale di AFA arricchito di FC (Nutratech, Urbino) in eritrociti umani incubati con il generatore di perossi radicali AAPH (50 mM) (10). In accordo con la letteratura, abbiamo evidenziato che l'estratto algale è efficace nel proteggere i globuli rossi dal danno ossidativo, con riduzione significativa dei livelli di emolisi e lipoperossidazione eritrocitaria per una concentrazione di FC pari a 100 nM (10). Risultati analoghi sono stati ottenuti in campioni di plasma ossidati con rame cloruro (CuCl₂, 100 μ M), con riduzione dose-dipendente della formazione di sottoprodotti dell'ossidazione lipidica sia precoci (dieni coniugati) che tardivi (malonidialdeide).

L'ossidazione della FC da parte dei sopracitati agenti pro-ossidanti è associata a caratteristiche modificazioni del

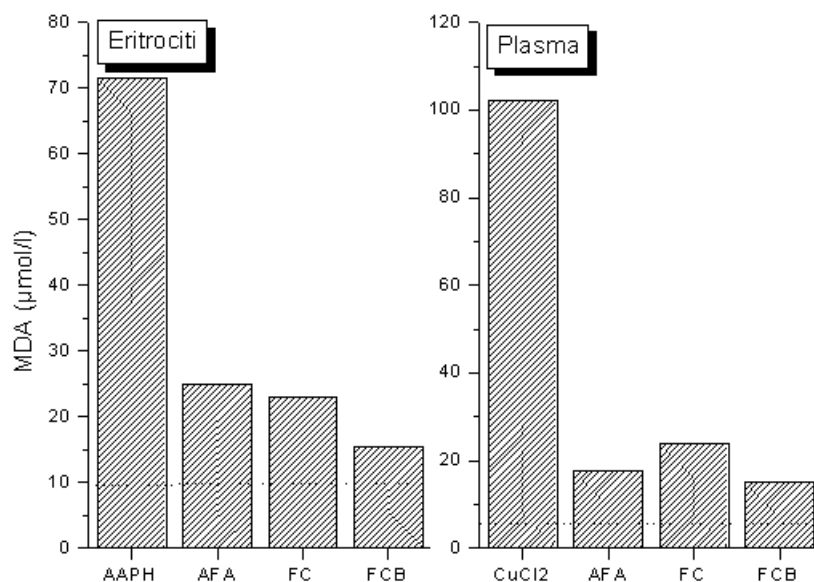


Figura 1

Inibizione della lipoperossidazione in campioni di eritrociti e di plasma trattati per 2 ore a 37°C rispettivamente con AAPH 50 mM e CuCl₂ 100 µM. I livelli di malondialdeide si riducono significativamente sia in presenza dell'estratto algale intero di AFA (contenuto in FC pari a 1 µM) che in presenza delle due molecole purificate (FC e FCB 1 µM). La linea tratteggiata indica il controllo non ossidato

suo spettro di assorbimento, si osserva infatti una progressiva diminuzione dell'assorbimento a 620 nm con graduale scomparsa del colore blu intenso; tali evidenze sottolineano il coinvolgimento del gruppo prostetico FCB nel potere antiossidante della proteina.

Alla luce di tali risultati, la FC ed il suo cromoforo FCB sono stati purificati per la prima volta dall'estratto algale di AFA e ne sono state investigate le proprietà strutturali e biochimiche al fine di meglio comprendere i meccanismi coinvolti nell'attività antiossidante.

In breve, l'analisi elettroforetica ha evidenziato che la FC pura è composta da subunità α e β con peso molecolare rispettivamente di 18500 e 21900; il peso complessivo del monomero ($\alpha\beta$) è quindi attorno a 40000. In condizioni native, la FC ha un peso molecolare pari a 120000, ciò significa che, dopo estrazione cellulare, la proteina si trova in forma trimerica ($\alpha\beta$)₃. Per quanto riguarda la FCB (liposolubile, assorbimento massimo a 374 nm), l'analisi mediante RP-HPLC ha dimostrato che la subunità α lega una sola molecola di FCB, mentre alla subunità β sono legate due ficobiline, sono quindi presenti tre cromofori per ogni monomero ($\alpha\beta$).

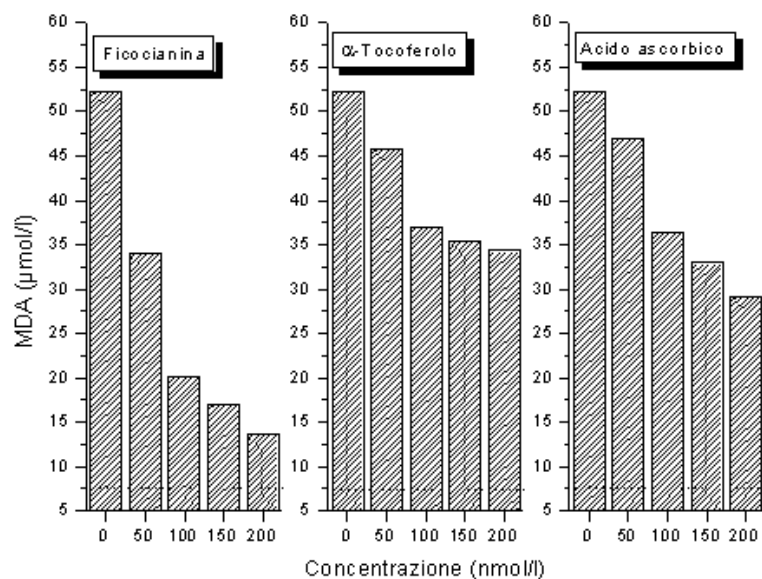
Con l'utilizzo delle molecole purificate, le nuove prove di ossidazione in vitro con AAPH (50 mM) e CuCl₂ (100 µM) hanno confermato che il potere antiossidante della FC risiede proprio nel cromoforo; infatti a parità di concentrazione, la FCB inibisce i livelli di lipoperossidazione nei campioni di plasma ed eritrociti umani in maniera simile alla FC pura (Fig. 1).

L'attività antiossidante di FC e FCB è stata inoltre confrontata mediante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) con quella di α -tocoferolo, acido ascorbico e glutatione, utilizzando come substrato ossidabile la fluorescina (λ_{ex} 485 nm e λ_{em} 520 nm) e come generatore di perossi radicali AAPH. I dati ottenuti hanno permesso di evidenziare che, a parità di concentrazione, la FC e la FCB sono antiossidanti naturali più potenti dei comuni antiossidanti plasmatici, come anche mostrato in Fig. 2.

Nel loro insieme, tali risultati rendono la microalga AFA una fonte di integrazione naturale estremamente interessante e versatile non solo nella copertura di carenze nutrizionali ma anche a scopi preventivi e terapeutici in tutte le patologie che abbiano i processi ossidativi come fattori causali determinanti. Le attuali ricerche si stanno svolgendo in questa direzione.

Bibliografia

1. Glazer A.N. Phycobiliproteins. *Methods Enzymol* 1988; 167:291-303
2. Padyana A.K., et al. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 893-898

**Figura 2**

Inibizione della lipoperossidazione in campioni di plasma trattati per 2 ore a 37°C con CuCl₂ 100 μM. Per ogni concentrazione testata (50-200 nM), la FC pura inibisce maggiormente la formazione di malonildiadeide rispetto a α-tocoferolo e acido ascorbico. La linea tratteggiata indica il controllo non ossidato.

3. Stocker R., et al. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:5918-22
4. Bhat V.B., Madyastha K.M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2000; 18,275:20-25
5. Vadiraja B.B., Gaikwad N.W., Madyastha K.M. Hepatoprotective effect of C-phycoyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. Biochem Biophys Res Commun 1998; 249:428-431
6. Romay C., Gonzalez R. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. J Pharm Pharmacol 2000; 52:367-368
7. Bhat V.B., Madyastha K.M. Scavenging of peroxy nitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from Spirulina platensis: protection against oxidative damage to DNA. Biochem Biophys Res Commun 2001; 285:262-266
8. Jensen G.S., et al. Consumption of Aphanizomenon flos-aquae has rapid effects on the circulation and function of immune cells in humans. JANA 2000; 2:50-58
9. Jensen G.S., Ginsberg D.I., Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. JANA 2001; 3:24-30
10. Benedetti S. et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga Aphanizomenon flos-aquae. Life Sci 2004; 75:2353-62